



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) **PI0709713-1 A2**

(22) Data de Depósito: 05/05/2007
(43) Data da Publicação: 26/07/2011
(RPI 2116)



(51) *Int.Cl.:*
C12N 9/10 2006.01
C12N 15/63 2006.01
C12N 5/10 2006.01

(54) Título: **POLINUCLEOTÍDEO, PROTEÍNA, VETOR, ORGANISMO TRANSFORMADO, MÉTODOS PARA PRODUZIR UM LIPÍDEO OU ÁCIDO GRAXO, PARA PRODUZIR UM ALIMENTO, UMA DROGA OU UM MATERIAL INDUSTRIAL, PARA AVALIAR A CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE ÁCIDO GRAXO DE UM FUNGO DE TESTE PRODUTOR DE LIPÍDEO, E PARA SELECIONAR UM FUNGO PRODUTOR DE LIPÍDEO, E, ALIMENTO, DROGA OU INDUSTRIAL MATERIAL**

(30) Prioridade Unionista: 08/05/2006 JP 2006-128779

(73) Titular(es): Suntory Limited

(72) Inventor(es): Misa Ochiai

(74) Procurador(es): Momsen, Leonardos & CIA.

(86) Pedido Internacional: PCT JP2007059815 de 05/05/2007

(87) Publicação Internacional: WO WO2007/129770 de 15/11/2007

(57) Resumo: POLINUCLEOTÍDEO, PROTEÍNA, VETOR, ORGANISMO TRANSFORMADO, MÉTODOS PARA PRODUZIR UM LIPÍDEO OU ÁCIDO GRAXO, PARA PRODUZIR UM ALIMENTO, UMA DROGA OU UM MATERIAL INDUSTRIAL, PARA AVALIAR A CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE ÁCIDO GRAXO DE UM FUNGO DE TESTE PRODUTOR DE LIPÍDEO, E PARA SELECIONAR UM FUNGO PRODUTOR DE LIPÍDEO, E, ALIMENTO, DROGA OU INDUSTRIAL MATERIAL A presente invenção proporciona ácido-graxo-sintetases que são responsáveis pela síntese de ácido graxo novo, polinucleotídeos que codificam tais ácido-graxo-sintetases (e.g., um polinucleotídeo compreendendo (a) um polinucleotídeo consistindo da sequência de nucleotídeos de Posições 1 a 12486 de SEQ ID NO: 1, ou (b) um polinucleotídeo que hibridiza sob condições estridentes em um polinucleotídeo compreendendo uma sequência de nucleotídeos complementar à sequência de nucleotídeos de Posições 1 a 12486 de SEQ ID NO: 1, e que codifica uma proteína possuindo uma atividade de ácido-graxo-sintetase, vetores de expressão e transformantes compreendendo tais polinucleotídeos, métodos para produzir alimento e outros produtos usando tais transformantes, produtos alimentícios produzidos por tais métodos, e métodos para avaliar e selecionar fungos de teste produtores de lipídeo.

“POLINUCLEOTÍDEO, PROTEÍNA, VETOR, ORGANISMO TRANSFORMADO, MÉTODOS PARA PRODUZIR UM LIPÍDEO OU ÁCIDO GRAXO, PARA PRODUZIR UM ALIMENTO, UMA DROGA OU UM MATERIAL INDUSTRIAL, PARA AVALIAR A CAPACIDADE DE

5 FORMAÇÃO DE ÁCIDO GRAXO DE UM FUNGO DE TESTE PRODUTOR DE LIPÍDEO, E PARA SELECIONAR UM FUNGO PRODUTOR DE LIPÍDEO, E, ALIMENTO, DROGA OU INDUSTRIAL MATERIAL”

CAMPO TÉCNICO

10 A presente invenção refere-se a um gene que codifica ácido-graxo-sintetase, e aos seus usos.

ARTE ANTERIOR

Genes de ácido-graxo-sintetase que são responsáveis pela síntese de ácido graxo novo têm sido clonados em uma variedade de

15 organismos e totalmente estudados (e.g., Documento de Não-Patente 1: E. Schweizer et al., Microbiol. Mol. Biol. Rev., 68, 501-517 (2004)).

Em algumas bactérias e em fungos e animais, as denominadas enzimas multifuncionais de "tipo I" tais como aquelas mostradas abaixo são conhecidas em catalisarem uma série de reações em síntese de ácido graxo.

20 Tipo Ia: (Fungos) AC-ER-DH-MPT/ACP-KR-KR-KS-PPT, $\alpha_6\beta_6$ ($\beta + \alpha$: aprox. 3.950 aminoácidos). (Bactérias) AC-ER-DH-MPT-ACP-KR-KS-PPT, α_6 , estrutura na qual as subunidades β e α de ácido-graxo-sintetase fúngica (FAS) são conectadas cabeça-em-cauda (α : aprox. 3.000 aminoácidos).

25 Tipo Ib: (Animais) KS-AT-DH-ER-KR-ACP-TE, α_2 (α : aprox. 2.500 aminoácidos). As abreviações acima representam o seguinte:

AC: ac(et)il-transferase

AT: malonil/acetil-transferase

MPT: malonil/palmitoil-transferase

CS: cetoacil-sintase

CR: cetoacil-redutase

DH: desidratase

ER: enoil-redutase

5 ACP: proteína carreadora de acila

TE: tioesterase

PPT: palmitoil/palmitoil-transferase.

Na levedura *Saccharomyces cerevisiae* (também abreviada como "*S. cerevisiae*"), síntese de ácido graxo novo é realizada por uma ácido-graxo-sintetase (um complexo de $\alpha_6\beta_6$ composto de subunidades β codificadas pelo gene FAS 1 e subunidades α codificadas pelo gene FAS2) de até 18 carbonos (ácido esteárico). Em adição, ELO1, ELO2 e ELO3 são conhecidos como genes de ácido-graxo-elongase. É considerado que ELO1 é responsável pela extensão do comprimento de cadeias C12 a C16 para de C16 a C18, ELO2 é responsável pela extensão de comprimento de cadeias C16 a C18 para C22, e ELO3 é responsável pela extensão de comprimento de cadeias C18 a C24 para C26.

Ao mesmo tempo, o fato de que, em fungo produtor de lipídeo *Mortierella alpina* (também abreviado abaixo como "*M. alpina*"), uma cepa mutante possuindo uma atividade de alongamento de ácido graxo diminuída de ácido palmítico para ácido esteárico pode ser obtida por tratamento mutagênico (Documento de Patente 1: Pedido de Patente Japonesa Publicado de No. 2001-245687) sugere que, pelo menos, enzimas diferentes são responsáveis pela síntese de até ácido palmítico e pela síntese de ácido palmítico a ácido esteárico.

Contudo, os genes de ácido-graxo-sintetase que são responsáveis pela síntese de ácido graxo novo em fungos produtores de lipídeo tal como *M. alpina* ainda não têm sido previamente clonados.

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

À luz do discutido acima, tem existido um desejo para identificar as enzimas de síntese de ácido graxo que são responsáveis pela síntese de ácido graxo novo em fungos produtores de ácido graxo tal como *M. alpina* e os genes que codificam tais enzimas.

5 Os inventores têm conduzido investigações extensivas, como um resultado das quais têm tido sucesso na clonagem de um gene de ácido-graxo-sintetase responsável pela síntese de ácido graxo novo no fungo produtor de lipídeo *M. alpina* e têm finalmente chegado à presente invenção. Conseqüentemente, a invenção proporciona os seguintes polinucleotídeos, proteínas, vetores de expressão, transformantes, métodos para produção de
10 alimentos e outros produtos usando tais transformantes, alimentos e produtos alimentícios produzidos por tais métodos, e métodos para avaliar e selecionar fungos de teste produtores de lipídeo.

(1) Um polinucleotídeo selecionado de qualquer um dos
15 seguintes (a) a (h):

(a) um polinucleotídeo compreendendo um polinucleotídeo consistindo da seqüência de nucleotídeos de Posições 1 a 12486 de SEQ ID NO: 1;

(b) um polinucleotídeo compreendendo um polinucleotídeo
20 consistindo da seqüência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 2 ou uma sua parte;

(c) um polinucleotídeo compreendendo um polinucleotídeo codificador de uma proteína possuindo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 3;

(d) um polinucleotídeo compreendendo um polinucleotídeo
25 codificador de uma proteína que consiste de uma seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 na qual um ou mais aminoácidos estão deletados, substituídos, inseridos e/ou adicionados, e que possui uma atividade de ácido-graxo-sintetase;

(e) um polinucleotídeo compreendendo um polinucleotídeo

codificador de uma proteína possuindo 60% ou mais de identidade com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, e que possui uma atividade de ácido-graxo-sintetase;

5 (f) um polinucleotídeo compreendendo um polinucleotídeo que hibridiza sob condições estringentes em um polinucleotídeo consistindo de uma sequência de nucleotídeos complementar à sequência de nucleotídeos de Posições 1 a 12486 de SEQ ID NO: 1, e que codifica uma proteína possuindo uma atividade de ácido-graxo-sintetase;

10 (g) um polinucleotídeo compreendendo um polinucleotídeo que hibridiza sob condições estringentes em um polinucleotídeo consistindo de uma sequência de nucleotídeos complementar à sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 2 ou uma sua parte, e que codifica uma proteína possuindo uma atividade de ácido-graxo-sintetase; e

15 (h) um polinucleotídeo compreendendo um polinucleotídeo que hibridiza sob condições estringentes em um polinucleotídeo consistindo de uma sequência de nucleotídeos complementar à sequência de nucleotídeos de um polinucleotídeo codificador de uma proteína consistindo da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, e que codifica uma proteína possuindo uma atividade de ácido-graxo-sintetase.

20 (2) O polinucleotídeo de (1) acima que é selecionado de qualquer um dos seguintes (i) a (m):

(i) um polinucleotídeo compreendendo um polinucleotídeo codificador de uma proteína que consiste de uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 na qual um a dez aminoácidos estão deletados, substituídos,
25 inseridos e/ou adicionados, e que possui uma atividade de ácido-graxo-sintetase;

(j) um polinucleotídeo compreendendo um polinucleotídeo codificador de uma proteína possuindo 90% ou mais de identidade com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, e que possui uma atividade de

ácido-graxo-sintetase;

(k) um polinucleotídeo compreendendo um polinucleotídeo que hibridiza sob condições elevadamente estridentes em um polinucleotídeo consistindo de uma seqüência de nucleotídeos complementar à seqüência de nucleotídeos de Posições 1 a 12486 de SEQ ID NO: 1, e que codifica uma proteína possuindo uma atividade de ácido-graxo-sintetase;

(1) um polinucleotídeo compreendendo um polinucleotídeo que hibridiza sob condições elevadamente estridentes em um polinucleotídeo consistindo de uma seqüência de nucleotídeos complementar à seqüência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 2 ou uma sua parte, e que codifica uma proteína possuindo uma atividade de ácido-graxo-sintetase; e

(m) um polinucleotídeo compreendendo um polinucleotídeo que hibridiza sob condições elevadamente estridentes em um polinucleotídeo consistindo de uma seqüência de nucleotídeos complementar à seqüência de nucleotídeos de um polinucleotídeo codificador de uma proteína consistindo da seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, e que codifica uma proteína possuindo uma atividade de ácido-graxo-sintetase.

(3) O polinucleotídeo de (1) acima, compreendendo um polinucleotídeo que consiste da seqüência de nucleotídeos de Posições 1 a 12486 de SEQ ID NO: 1.

(4) O polinucleotídeo de (1) acima, compreendendo um polinucleotídeo que consiste da seqüência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 1.

(5) O polinucleotídeo de (1) acima, compreendendo um polinucleotídeo que consiste da seqüência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 2.

(6) O polinucleotídeo de (1) acima, compreendendo um polinucleotídeo que codifica uma proteína consistindo da seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

(7) O polinucleotídeo de qualquer um de (1) a (6) acima que é DNA.

(8) Uma proteína codificada pelo polinucleotídeo de qualquer um de (1) a (7) acima.

(8a) Uma proteína que compreende a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

5 (8b) Uma proteína que compreende uma seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 na qual um ou mais aminoácidos estão deletados, substituídos, inseridos e/ou adicionados, e que possui uma atividade de ácido-graxo-sintetase.

10 (8c) Uma proteína possuindo 60% ou mais de identidade com a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, e que possui uma atividade de ácido-graxo-sintetase.

(9) Um vetor compreendendo o polinucleotídeo de qualquer um de (1) a (7) acima.

15 (9a) O vetor de (9) acima que compreende um cassete de expressão compreendendo os seguintes componentes (a) a (c):

(a) um promotor que transcreve em uma célula hospedeira;

(b) o polinucleotídeo de qualquer um de (1) a (7) acima que está unido ao promotor; e

20 (c) um sinal que funciona dentro de uma célula hospedeira em conexão com a terminação de transcrição e poliadenilação de uma molécula de RNA.

(9b) O vetor de (9a) acima no qual a célula hospedeira é um fungo produtor de lipídeo (e.g., *M. alpina*) ou uma levedura (e.g., *S. cerevisiae*).

25 (10) Um organismo transformado possuindo introduzido no mesmo o polinucleotídeo de qualquer um de (1) a (7) acima.

(11) Um organismo transformado possuindo introduzido no mesmo o vetor de (9) acima.

(12) O organismo transformado de (11) acima possuindo uma

capacidade de formação de ácido graxo aumentada devido à introdução do vetor de (9) acima.

(13) O organismo transformado de qualquer um de (10) a (12) acima, no qual o organismo é um fungo produtor de ácido graxo.

5 (14) O organismo transformado de (13) acima, no qual o fungo produtor de ácido graxo é *Mortierella alpina*.

(15) Um método para produzir um lipídeo ou ácido graxo usando o organismo transformado de qualquer um de (10) a (14) acima.

10 (16) Um método para produzir um alimento, uma droga ou um material industrial usando o organismo transformado de qualquer um de (10) a (14) acima.

(16a) O método de produção de (16) acima, no qual o alimento é um alimento contendo óleo e gordura.

15 (17) Um alimento, uma droga ou um material industrial produzido pelo método de (16) acima.

(17a) O alimento ou material industrial de (17) acima, no qual o alimento é um alimento contendo óleo e gordura.

20 (18) Um método para avaliar a capacidade de formação de ácido graxo de um fungo de teste produtor de lipídeo, que compreende o uso de um iniciador ou uma sonda planejado(a) baseado(a) na seqüência de nucleotídeos de um gene de ácido-graxo-sintetase possuindo a seqüência de nucleotídeos de Posições 1 a 12486 de SEQ ID NO: 1.

25 (18a) Um método para selecionar, pelo método de (18) acima, um fungo produtor de lipídeo possuindo uma capacidade de formação de ácido graxo alta.

(18b) Um método para produzir um óleo e uma gordura usando o fungo produtor de lipídeo selecionado pelo método de (18a) acima.

(19) Um método para avaliar a capacidade de formação de ácido graxo de um fungo de teste produtor de lipídeo, compreendendo cultivar

um fungo de teste produtor de lipídeo e medir um nível de expressão de um gene de ácido-graxo-sintetase possuindo a seqüência de nucleotídeos de Posições 1 a 12486 de SEQ ID NO: 1.

(19a) Um método para selecionar um fungo produtor de lipídeo possuindo uma capacidade alta para formar ácidos graxos de 16 carbonos, compreendendo avaliar fungos de teste produtores de lipídeo pelo método de (19) acima, e selecionar um fungo produtor de lipídeo possuindo um nível de expressão alto do gene de ácido-graxo-sintetase.

(19b) Um método para produzir um óleo e uma gordura, compreendendo o uso do fungo produtor de lipídeo selecionado pelo método de (19a) acima.

(20) Um método para selecionar um fungo produtor de lipídeo, compreendendo: cultivar um fungo de referência produtor de lipídeo e um fungo de teste produtor de lipídeo, medir um nível de expressão de um gene de ácido-graxo-sintetase possuindo a seqüência de nucleotídeos de Posições 1 a 12486 de SEQ ID NO: 1 em cada fungo produtor de lipídeo, e selecionar um fungo de teste produtor de lipídeo que expressa o gene mais elevadamente do que o fungo de referência produtor de lipídeo.

(21) Um método para selecionar um fungo produtor de lipídeo, compreendendo: cultivar um fungo de referência produtor de lipídeo e um fungo de teste produtor de lipídeo, determinar quantitativamente a proteína de (8) acima em cada fungo produtor de lipídeo, e selecionar um fungo de teste produtor de lipídeo contendo uma quantidade maior de proteína do que o fungo de referência produtor de lipídeo. Isto é, um método para selecionar um fungo produtor de lipídeo, compreendendo as etapas de cultivar uma pluralidade de fungos produtores de lipídeo, determinar quantitativamente a proteína de (8) acima em cada fungo produtor de lipídeo, e selecionar dentre estes um fungo de teste produtor de lipídeo contendo uma quantidade grande de proteína.

Os polinucleotídeos da invenção, quando utilizado para transformar organismos tais como fungos produtores de lipídeo (e.g., *M. alpina*) e leveduras, são úteis para aplicação na manufatura de alimentos, cosméticos, drogas (e.g., preparações externas para pele), sabões e
5 semelhante.

Ácidos graxos podem ser eficientemente produzidos pelo método para produzir lipídeos ou ácidos graxos da invenção. Além disso, pelo emprego dos nucleotídeos da invenção em transformação de leveduras e outros organismos, lipídeos ou ácidos graxos possuindo um conteúdo alto de
10 ácidos graxos de 16 carbonos (e.g., ácido palmítico, ácido palmitoleico) podem ser produzidos. A presente invenção portanto é benéfica para aumentar a capacidade para produzir tais ácidos graxos.

Pelo uso de fungos produtores de lipídeo que têm sido avaliados e selecionados usando os métodos para avaliar e selecionar fungos
15 produtores de lipídeo da invenção, óleos e lipídeos das composições desejadas (e.g., óleos e lipídeos possuindo uma proporção alta de ácidos graxos de 16 carbonos) podem ser eficientemente manufaturados.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

FIG. 1 (1-1 a 1-5) mostra o alinhamento de seqüências de aminoácidos para proteínas FAS1 conhecidas (de *Saccharomyces cerevisiae*,
20 *Candida albicans*, e *Aspergillus nidulans*).

MELHOR MODO PARA REALIZAR A INVENÇÃO

Como mostrado em detalhe nos exemplos da invenção subsequente descritos, os inventores têm sido bem sucedidos pela
25 primeira vez na clonagem de cDNA de comprimento total para uma ácido-graxo-sintetase da cepa 1S4 de *M. alpina*, que é um fungo produtor de lipídeo. Além disso, têm obtido a seqüência de bases do DNA genômico para a ácido-graxo-sintetase de cepa 1S-4 de *M. alpina* (SEQ ID NO: 2), e a seqüência de aminoácidos putativa para aquela ácido-graxo-sintetase (SEQ ID NO: 3). Este

DNA e esta enzima podem ser obtidos usando, por exemplo, as técnicas mencionadas nos exemplos da invenção subsequente descritos, técnicas de engenharia genética conhecidas, e técnicas de síntese conhecidas. Os polinucleotídeos de ácido-graxo-sintetase proporcionados pela presente invenção, quando empregados para transformar organismos tais como fungos produtores de lipídeo ou leveduras, são úteis para a produção de óleos e lipídeos com tais levedura ou fungos produtores de lipídeo transformados (e.g., *M. alpina*) e para a manufatura de alimentos, drogas (e.g., preparações externas para pele), materiais industriais (tais como para cosméticos e sabões) e semelhante que utilizam tais óleos e lipídeos.

1. Polinucleotídeos da invenção

Conseqüentemente, em um aspecto, a invenção proporciona os seguintes polinucleotídeos:

(a) um polinucleotídeo compreendendo um polinucleotídeo consistindo da seqüência de nucleotídeos de Posições 1 a 12486 de SEQ ID NO: 1;

(b) um polinucleotídeo compreendendo um polinucleotídeo consistindo da seqüência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 2 ou uma sua parte;

(c) um polinucleotídeo compreendendo um polinucleotídeo codificador de uma proteína possuindo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 3;

(d) um polinucleotídeo compreendendo um polinucleotídeo codificador de uma proteína que consiste de uma seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO:3 na qual um ou mais aminoácidos estão deletados, substituídos, inseridos e/ou adicionados, e que possui uma atividade de ácido-graxo-sintetase;

(e) um polinucleotídeo compreendendo um polinucleotídeo codificador de uma proteína possuindo 60% ou mais de identidade com a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, e que possui uma atividade de

ácido-graxo-sintetase;

(f) um polinucleotídeo compreendendo um polinucleotídeo que hibridiza sob condições estringentes em um polinucleotídeo consistindo de uma seqüência de nucleotídeos complementar à seqüência de nucleotídeos de Posições 1 a 12486 de SEQ ID NO: 1, e que codifica uma proteína consistindo de uma atividade de ácido-graxo-sintetase;

(g) um polinucleotídeo compreendendo um polinucleotídeo que hibridiza sob condições estringentes em um polinucleotídeo consistindo de uma seqüência de nucleotídeos complementar à seqüência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 2 ou uma sua parte, e que codifica uma proteína possuindo uma atividade de ácido-graxo-sintetase; e

(h) um polinucleotídeo compreendendo um polinucleotídeo que hibridiza sob condições estringentes em um polinucleotídeo consistindo de uma seqüência de nucleotídeos complementar à seqüência de nucleotídeos de um polinucleotídeo codificador de uma proteína consistindo da seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, e que codifica uma proteína possuindo uma atividade de ácido-graxo-sintetase.

Como aqui usado, o termo "polinucleotídeo" refere-se a DNA ou RNA.

Como aqui usado, "parte do DNA consistindo da seqüência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 2" inclui, por exemplo, a porção da seqüência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 2 correspondendo ao exon.

"Um polinucleotídeo que hibridiza sob condições estringentes" refere-se aqui a um polinucleotídeo que é obtido, por exemplo, por hibridização de colônia, hibridização de placa ou hibridização de Southern usando como a sonda todo ou parte de um polinucleotídeo consistindo da seqüência de nucleotídeos complementar à seqüência de nucleotídeos de Posições 1 a 12486 de SEQ ID NO: 1 e a seqüência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 2, ou um polinucleotídeo consistindo de uma seqüência de

nucleotídeos codificadora da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 3. O método de hibridização usado pode ser um método descrito, por exemplo, em Sambrook & Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Vol. 3 (Cold Spring Harbor, Laboratory Press 2001) ou Ausubel: *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons, 1987-1997).

Como aqui usado, "condições estringentes" podem ser referir às condições de estringência baixa, condições de estringência moderada e condições de estringência alta. "Condições de estringência baixa" são, por exemplo, 5x SSC, 5x solução de Denhart, SDS 0,5% e formamida 50% a 32°C. "Condições de estringência moderada" são, por exemplo, 5x SSC, 5x solução de Denhart, SDS 0,5% e formamida 50% a 42°C. "Condições de estringência alta" são, por exemplo, 5x SSC, 5x solução de Denhart, SDS 0,5% e formamida 50% a 50°C. Sob estas condições, é esperado que DNA de homologia mais alta seja obtido eficientemente em temperatura mais alta. Múltiplos fatores estão envolvidos em estringência de hibridização, incluindo temperatura, concentração de sonda, comprimento de sonda, força iônica, tempo e concentrações de sal, e uma pessoa experiente na arte pode apropriadamente selecionar estes fatores para realizar uma estringência similar.

Um exemplo de um kit comercial que pode ser usado para hibridização é AlkPhos Direct Labeling Reagents (Amersham Pharmacia Biotech). De acordo com o protocolo que acompanha o kit, após incubação com uma sonda marcada durante a noite, a membrana é lavada com um tampão de lavagem primário contendo SDS 0,1% (p/v) a 55°C, após a qual o DNA hibridizado pode ser detectado.

Outros polinucleotídeos que podem ser hibridizados incluem DNAs possuindo cerca de 60% ou mais, cerca de 70% ou mais, 71% ou mais, 72% ou mais, 73% ou mais, 74% ou mais, 75% ou mais, 76% ou mais, 77% ou mais, 78% ou mais, 79% ou mais, 80% ou mais, 81% ou mais, 82% ou

mais, 83% ou mais, 84% ou mais, 85% ou mais, 86% ou mais, 87% ou mais, 88% ou mais, 89% ou mais, 90% ou mais, 91% ou mais, 92% ou mais, 93% ou mais, 94% ou mais, 95% ou mais, 96% ou mais, 97% ou mais, 98% ou mais, 99% ou mais, 99,1% ou mais, 99,2% ou mais, 99,3% ou mais, 99,4% ou mais, 99,5% ou mais, 99,6% ou mais, 99,7% ou mais, 99,8% ou mais ou 99,9% ou mais de identidade ao DNA de SEQ ID NO: 1 (ou a seqüência de nucleotídeos de Posições 1 a 12486 de SEQ ID NO: 1), o DNA de SEQ ID NO: 2, ou o DNA codificadora da seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, conforme determinado com programa de computador de pesquisa de homologia, tais como FASTA ou BLAST, usando os parâmetros pré-estabelecidos.

Identidade entre seqüências de aminoácidos ou seqüências de nucleotídeos podem ser determinadas usando o algoritmo BLAST de Karlin e Altschul (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:2264-2268 (1990); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 5873 (1993)). Programas chamados BLASTN e BLASTX baseados no algoritmo BLAST têm sido desenvolvidos (Altschul SF, et al., J. Mol. Biol. 215: 403 (1990)). Quando uma seqüência de nucleotídeos é analisada usando BLASTN, os parâmetros são ajustados para, por exemplo, $\text{escore} = 100$ e comprimento de palavra = 12. Quando uma seqüência de aminoácidos é analisada usando BLASTX, os parâmetros são ajustados para, por exemplo, $\text{escore} = 50$ e comprimento de palavra = 3. Quando os programas BLAST e Gapped BLAST são usados, os parâmetros pré-estabelecidos para os respectivos programas são empregados.

Os seguintes polinucleotídeos da invenção podem ser obtidos por uma técnica de engenharia genética conhecida ou uma técnica de síntese conhecida.

2. Proteínas da invenção e polinucleotídeos que codificam as proteínas

Em outro aspecto, a invenção proporciona proteínas

codificadas por um ou mais dos polinucleotídeos (a) a (h) acima.

Em ainda outro aspecto, a invenção proporciona:

(a) uma proteína que compreende a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 3;

5 (b) uma proteína que compreende uma seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 na qual um ou mais aminoácidos estão deletados, substituídos, inseridos e/ou adicionados, e que possui uma atividade de ácido-graxo-sintetase; ou

10 (c) uma proteína possuindo 60% ou mais de identidade com a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, e que possui uma atividade de ácido-graxo-sintetase.

Em ainda outro aspecto, a invenção proporciona um polinucleotídeo que compreende uma seqüência de nucleotídeos codificadora da proteína acima.

15 A proteína (b) ou (c) acima é tipicamente uma variante da proteína naturalmente ocorrente de SEQ ID NO: 3, e pode ser obtida artificialmente pelo uso de uma técnica de mutagênese sítio-específica em, por exemplo, Sambrook & Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Vol. 3 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001); Ausubel,
20 Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, 1987-1997); Nuc. Acids. Res., 10, 6487 (1982); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6409 (1982); Gene, 34, 315 (1985); Nuc. Acids. Res., 13, 4431 (1985); ou Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488 (1985).

25 No relatório descritivo, a "proteína que consiste de uma seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO:3 na qual um ou mais aminoácidos estão deletados, substituídos, inseridos e/ou adicionados, e que possui uma atividade de ácido-graxo-sintetase" é exemplificada por proteínas que consistem de uma seqüência de aminoácidos na qual de 1 a 500, de 1 a 100, de 1 a 90, de 1 a 80, 1 a 70, de 1 a 60, de 1 a 50, de 1 a 40, de 1 a 39, de 1 a

38, de 1 a 37, de 1 a 36, de 1 a 35, de 1 a 34, de 1 a 33, de 1 a 32, de 1 a 31, de 1 a 30, de 1 a 29, de 1 a 28, de 1 a 27, de 1 a 26, de 1 a 25, de 1 a 24, de 1 a 23, de 1 a 22, de 1 a 21, de 1 a 20, de 1 a 19, de 1 a 18, de 1 a 17, de 1 a 16, de 1 a 15, de 1 a 14, de 1 a 13, de 1 a 12, de 1 a 11, de 1 a 10, de 1 a 9, de 1 a 8, de 1 a 7, de 1 a 6 (de 1 a vários), de 1 a 5, de 1 a 4, de 1 a 3, 1 ou 2, ou 1 resíduo de aminoácido na seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO:3 tem sido deletado, substituído, inserido e/ou adicionado, e que possuem uma atividade de ácido-graxo-sintetase. Um número menor de resíduos de aminoácido deletados, substituídos, inseridos e/ou adicionados acima é geralmente mais preferido. Tais proteínas são exemplificadas por proteínas possuindo uma seqüência de aminoácidos com cerca de 60% ou mais, cerca de 70% ou mais, 71% ou mais, 72% ou mais, 73% ou mais, 74% ou mais, 75% ou mais, 76% ou mais, 77% ou mais, 78% ou mais, 79% ou mais, 80% ou mais, 81% ou mais, 82% ou mais, 83% ou mais, 84% ou mais, 85% ou mais, 86% ou mais, 87% ou mais, 88% ou mais, 89% ou mais, 90% ou mais, 91% ou mais, 92% ou mais, 93% ou mais, 94% ou mais, 95% ou mais, 96% ou mais, 97% ou mais, 98% ou mais, 99% ou mais, 99,1% ou mais, 99,2% ou mais, 99,3% ou mais, 99,4% ou mais, 99,5% ou mais, 99,6% ou mais, 99,7% ou mais, 99,8% ou mais ou 99,9% ou mais de identidade à seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, e possuindo uma atividade de ácido-graxo-sintetase. Uma identidade percentual mais alta é geralmente mais preferível. A atividade de ácido-graxo-sintetase pode ser medida, por exemplo, pelo método descrito em James K Stoops et al., J.B.C. 253, 4464-4475 (1978).

A deleção, substituição, inserção e/ou adição de um ou mais resíduos de aminoácido na seqüência de aminoácidos da proteína da invenção significa que um ou mais resíduos de aminoácido é deletado, substituído, inserido e/ou adicionado em qualquer uma ou mais posições na mesma seqüência. Quaisquer dois ou mais tipos de mudanças dentre deleções, substituições inserções e adições podem ocorrer concorrentemente.

Exemplos de resíduos de aminoácido mutuamente substituíveis são dados abaixo. Resíduos de aminoácido pertencendo ao mesmo grupo são mutuamente substituíveis.

Grupo A: leucina, isoleucina, norleucina, valina, norvalina, alanina, ácido 2-amino-butanóico, metionina, o-metil-serina, t-butil-glicina, t-butil-alanina, ciclo-hexil-alanina;

Grupo B: ácido aspártico, ácido glutâmico, ácido isoaspártico, ácido isoglutâmico, ácido 2-amino-adípico, ácido 2-amino-subérico;

Grupo C: asparagina, glutamina;

Grupo D: lisina, arginina, ornitina, ácido 2,4-diamino-butanóico, ácido 2,3-diamino-propionico;

Grupo E: prolina, 3-hidróxi-prolina, 4-hidróxi-prolina;

Grupo F: serina, treonina, homo-serina; e

Grupo G: fenil-alanina, tirosina.

A proteína da invenção também pode ser produzida por um processo de síntese química tal como o processo Fmoc process (processo de fluorenil-metil-óxi-carbonila) ou o processo tBoc (processo de t-butil-óxi-carbonila). Em adição, sintetizadores de peptídeo disponíveis de, por exemplo, Advanced ChemTech, PerkinElmer, Pharmacia, Protein Technology Instrument, Synthecell-Vega, PerSeptive e Shimadzu Corporation podem ser usados para síntese química.

3. Vector da invenção e transformantes nos quais o vetor tem sido introduzido

Em um outro aspecto, a invenção proporciona um vetor de expressão que compreende o polinucleotídeo da invenção. O vetor de expressão da invenção compreende um dos seguintes polinucleotídeos:

(a) um polinucleotídeo compreendendo um polinucleotídeo consistindo da sequência de nucleotídeos de Posições 1 a 12486 de SEQ ID NO: 1;

(b) um polinucleotídeo compreendendo um polinucleotídeo consistindo da seqüência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 2 ou uma sua parte;

(c) um polinucleotídeo compreendendo um polinucleotídeo codificador de uma proteína possuindo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 3;

(d) um polinucleotídeo compreendendo um polinucleotídeo codificador de uma proteína que consiste de uma seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 na qual um ou mais aminoácidos estão deletados, substituídos, inseridos e/ou adicionados, e que possui uma atividade de ácido-graxo-sintetase;

(e) um polinucleotídeo compreendendo um polinucleotídeo codificador de uma proteína possuindo 60% ou mais de identidade com a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, e que possui uma atividade de ácido-graxo-sintetase;

(f) um polinucleotídeo compreendendo um polinucleotídeo que hibridiza sob condições estridentes em um polinucleotídeo consistindo de uma seqüência de nucleotídeos complementar à seqüência de nucleotídeos de Posições 1 a 12486 de SEQ ID NO: 1, e que codifica uma proteína consistindo de uma atividade de ácido-graxo-sintetase;

(g) um polinucleotídeo compreendendo um polinucleotídeo que hibridiza sob condições estridentes em um polinucleotídeo consistindo de uma seqüência de nucleotídeos complementar à seqüência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 2 ou uma sua parte, e que codifica uma proteína possuindo uma atividade de ácido-graxo-sintetase; ou

(h) um polinucleotídeo compreendendo um polinucleotídeo que hibridiza sob condições estridentes em um polinucleotídeo consistindo de uma seqüência de nucleotídeos complementar à seqüência de nucleotídeos de um polinucleotídeo codificador de uma proteína consistindo da seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, e que codifica uma proteína possuindo

uma atividade de ácido-graxo-sintetase.

O vetor da invenção geralmente compreende um cassete de expressão compreendendo os seguintes componentes: (i) um promotor que transcreve em uma célula hospedeira; (ii) o polinucleotídeo de qualquer um de (a) a (h) acima que está unido ao promotor; e (iii) um sinal que funciona dentro de uma célula hospedeira em conexão com a terminação de transcrição e poliadenilação de uma molécula de RNA. O vetor construído nesta maneira é introduzido em uma célula hospedeira. Células hospedeiras adequadas para uso na invenção são exemplificadas por leveduras e fungos produtores de lipídeo.

Cepas fúngicas mencionadas, por exemplo, em Mycotaxon, Vol. XLIV, No. 2, pp. 257265 (1992) podem ser usadas como o fungo produtor de lipídeo. Exemplos ilustrativos incluem microorganismos pertencentes ao gênero *Mortierella*, tais como os seguintes microorganismos pertencentes ao subgênero *Mortierella*: *Mortierella elongata* 1FO8570, *Mortierella exigua* IFO8571, *Mortierella hygrophila* IFO5941, e *Mortierella alpina* IFO8568, ATCC16266, ATCC32221, ATCC42430, CBS219,35, CBS224,37, CBS250,53, CBS343,66, CBS527,72, CBS528,72, CBS529,72, CBS608,70 e CBS754,68; e os seguintes microorganismos pertencentes ao subgênero *Micromucor*: *Mortierella isabellina* CBS194,28, IFO6336, IFO7824, IFO7873, IFO7874, IFO8286, IFO8308 e 1FO7884, *Mortierella nana* 1FO8190, *Mortierella ramanniana* IFO5426, IFO8186, CBS112,08, CBS212,72, 1FO7825, IFO8184, IFO8185 e IFO8287, e *Mortierella vinacea* CBS236,82. *Mortierella alpina* é especialmente preferido.

Exemplos ilustrativos de leveduras incluem *Saccharomyces cerevisiae* NBRC1951, NBRC1952, NBRC1953 e NBRC1954. Estas células hospedeiras que têm sido transformadas com o vetor da invenção são capazes de muito eficientemente produzirem em particular ácidos graxos possuindo 16 átomos de carbono.

O vetor usado para introdução em fungos produtores de lipídeo é exemplificado por, mas não limitado a, pDura5 (Appl. Microbiol. Biotechnol., 65, 419-425, (2004)).

5 O vetor utilizado para introdução em uma levedura pode ser um vetor de multicópias (vetor YEp), um vetor de cópia única (vetor YCp), ou um vetor de integração cromossômica (vetor YIp). Um exemplo de um vetor YEp conhecido é YEp24 (J. R. Broach et al., Experimental Manipulation of Gene Expression (Academic Press, New York; 1983), 83), um exemplo de um vetor YCp é YCp50 (M. D. Rose et al., Gene 60: 237
10 (1987)), e um exemplo de um vetor YIp é YIp5 (K. Struhl et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 1035 (1979)). Todos estes estão prontamente disponíveis.

Qualquer combinação de promotores e terminadores pode ser usada para regulação de expressão de gene na célula hospedeira, desde que
15 funcionem na célula hospedeira. Por exemplo, quando um fungo produtor de lipídeo é empregado, pode ser feito uso do promotor de gene de histona H4,1 ou do promotor de gene de gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase.

Exemplos de marcadores seletivos que podem ser usados durante transformação incluem marcadores auxotróficos (ura5, niaD),
20 marcadores de resistência à droga (higromicina, zeocina), genes de resistência à geneticina (G418r), genes de resistência a cobre (CUP1) (Marin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 337 (1984)), e genes de resistência à cerulenina (fas2m, PDR4) (respectivamente Junji Inokoshi et al., Biochemistry, 64, 660 (1992); e Hussain et al., Gene, 101: 149 (1991)).

25 Um método comumente conhecido pode ser utilizado para transformar a célula hospedeira. No caso de fungos produtores de lipídeo, exemplos de métodos adequados incluem eletroporação (Mackenzie D.A., et al., Appl. Environ. Microbiol. 66, 4655-4661 (2000)) e o método de liberação de partículas (o método descrito em Pedido de Patente Japonesa Publicado de

No. 2005-287403, intitulado "Method for Breeding Lipídeo-Producing Fungi" [método para geração de fungos produtores de lipídeo]). No caso de leveduras, exemplos não-limitantes, ilustrativos de métodos apropriados incluem eletroporação, o método de esferoplasto (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75: 1929 (1978)), o método de acetato de lítio (J. Bacteriology, 153: 163 (1983)), e os métodos descritos em Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75: 1929 (1978) e em Methods in Yeast Genetics, 2000 Edition: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual.

Mais especificamente, no caso de fungos produtores de lipídeo, o hospedeiro é inoculado em um meio Czapek-Dox e cultivado por 2 semanas a 28°C para formar esporos. Os esporos são então colhidos, e um gene é introduzido nos mesmos pelo método de liberação de partículas (descrito em Pedido de Patente Japonesa Publicado de No. 2005-287403, intitulado "Method for Breeding Lipídeo-Producing Fungi" [método para geração de fungos produtores de lipídeo]) ou semelhante. A seguir, os esporos compreendendo o gene introduzido são posicionados sobre um meio de ágar padrão contendo um antibiótico ou semelhante a ser usado como um marcador seletivo ou, quando um marcador auxotrófico é para ser empregado, sobre um meio de ágar faltante do nutriente a ser usado como o marcador de modo a obter um transformante. Alternativamente, no caso de leveduras, o hospedeiro é cultivado em um meio nutriente padrão (e.g., o meio YEPD descrito em Genetic Engineering, Vol. 1 (Plenum Press, New York; 1979), p. 117) de modo que a densidade óptica do meio em 600 nm (OD600) esteja entre 1 e 6. As células cultivadas são então colhidas por centrifugação, lavadas, e pré-tratadas com íons de metal alcalino, em uma concentração de cerca de 1 a 2 M. As células são deixadas em repouso a 30°C por cerca de 60 minutos, então são deixadas em repouso juntas com o DNA a ser introduzido (cerca de 1 a 20 µg) a cerca de 30°C por cerca de 60 minutos. Poli(etileno-glicol), preferivelmente um poli(etileno-glicol) possuindo um peso molecular

de cerca de 4.000 daltons, é adicionado em uma concentração final de 20% a 50%. As células são deixadas em repouso a cerca de 30°C por cerca de 30 minutos, então são tratadas com calor a cerca de 42°C por cerca de 5 minutos. Preferivelmente, a suspensão celular resultante é lavada com um meio
5 nutriente padrão, adicionado em uma quantidade predeterminada de meio nutriente padrão fresco, e deixada em repouso a cerca de 30°C por cerca de 60 minutos. A cultura resultante é inoculada sobre um meio de ágar padrão contendo um antibiótico ou semelhante a ser usado como um marcador seletivo ou, quando um marcador auxotrófico é para ser empregado, sobre um
10 meio de ágar faltante do nutriente a ser usado como o marcador de modo a obter um transformante. Outras técnicas de clonagem comuns podem ser encontradas, por exemplo, em Sambrook & Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Vol. 3 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001) e Methods in Yeast Genetics: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor
15 Laboratory Press; Cold Spring Harbor, NY).

4. Método para produzir um lipídeo ou ácido graxo da invenção

Em ainda um outro aspecto, a invenção proporciona um método para produzir um lipídeo ou um ácido graxo usando a levedura ou o
20 fungo produtor de lipídeo transformado.

Como aqui usado, "lipídeo" refere-se aos lipídeos simples contendo, por exemplo, um composto feito de um ácido graxo e um álcool com uma ligação éster entre ambos (e.g. um glicerídeo) ou um seu análogo (e.g., um éster de colesterol), lipídeos complexos adicionalmente possuindo,
25 por exemplo, um ácido fosfórico, um aminoácido ou açúcar ligado em um lipídeo simples, e lipídeos derivados que são hidrolisados de lipídeo e não se dissolvem em água.

"Óleos e gorduras" referem-se aqui aos ésteres de gliceróis e ácidos graxos (glicerídeos).

"Ácidos graxos" referem-se aqui aos ácidos monocarboxílicos alifáticos (ácidos carboxílicos possuindo um único grupo carboxila, no qual os átomos de carbono são ligados juntos na forma de uma cadeia) de fórmula geral RCOOH (R sendo um grupo alquila). Ácidos graxos incluem ácidos graxos saturados não possuindo ligações duplas na cadeia de hidrocarboneto, e ácidos graxos insaturados que contêm uma ligação dupla.

O lipídeo ou ácido graxo da invenção pode ser extraído na seguinte maneira das células transformadas de acordo com a presente invenção. No caso de organismos transformados (e.g., leveduras ou fungos produtores de lipídeo), após completitude do cultivo, as células cultivadas são colhidas por uma técnica convencional tal como centrifugação ou filtração. As células são totalmente enxaguadas e preferivelmente secas. Secagem pode ser realizada por liofilização, secagem com ar ou semelhante. As células secas são rompidas, tal como com um Dynomill ou ultra-sonicamente, então preferivelmente são submetidas ao tratamento de extração com um solvente orgânico sob uma corrente de nitrogênio. Solventes orgânicos que podem ser usados incluem éter, hexano, metanol, etanol, clorofórmio, diclorometano e éter de petróleo. Alternativamente, resultados bons também podem ser obtidos por extração alternada com metanol e éter de petróleo, ou por extração usando um sistema de camada única de clorofórmio-metanol-água como o solvente. Pela separação do solvente orgânico do extrato sob uma pressão reduzida, pode ser obtido um lipídeo contendo ácido graxo.

Separação de ácido graxo do lipídeo contendo ácido graxo acima no estado de um ácido graxo misto ou éster de ácido graxo misto pode ser realizada por concentração e separação de acordo com uma técnica convencional (e.g., o método de adição de uréia, o método de separação por esfriamento, cromatografia em coluna).

Usando o método para produzir um lipídeo ou ácido graxo da invenção, um ácido graxo pode ser eficientemente produzido pelo aumento do

conteúdo de ácido graxo das células. Alternativamente, quando uma levedura é usada como o hospedeiro, um lipídeo ou ácido graxo possuindo um conteúdo alto de ácido graxo saturado ou insaturado de 16 carbonos (e.g., ácido palmítico ou ácido palmitoleico) pode ser obtido, que é particularmente útil quando há uma necessidade para produzir um tal ácido graxo em uma quantidade grande e/ou em uma eficiência alta.

O lipídeo ou ácido graxo assim obtido pode ser usado de acordo com um método convencional em tais aplicações como a manufatura de alimentos contendo lipídeo, drogas contendo lipídeo (e.g., preparações externas para pele), e materiais industriais contendo lipídeo (materiais iniciais para cosméticos, sabões e semelhante).

Para ilustrar, devido ao fato de que ácido palmitoleico é um ácido graxo que está presente em uma concentração de pelo menos cerca de 10% em sebo de humano e reputadamente desempenha um papel maior na regeneração de sebo, ele pode ser utilizado ao se incluído em cosméticos para pele para prevenção de envelhecimento da pele ou em preparações externas para pele. Por exemplo, em um paciente possuindo um distúrbio de pele tal como eczema, independente da idade do paciente, regeneração do tecido da pele pode ser promovida pela suplementação de ácido palmitoleico. Portanto, o lipídeo ou ácido graxo obtido pelo método para produzir um lipídeo ou ácido graxo da invenção pode ser vantajosamente usado na produção de cosméticos e drogas (e.g., preparações externas para pele) produzidos para tais propósitos como a prevenção de envelhecimento da pele ou para regeneração de tecido.

Conseqüentemente, em ainda outro aspecto, a invenção proporciona um método para produzir um alimento, cosmético, droga, sabão ou semelhante usando a levedura transformada ou o fungo produtor de lipídeo transformado da invenção. Este método inclui a etapa de formar um lipídeo ou ácido graxo usando a levedura transformada ou o fungo produtor de

lipídeo transformado da invenção. O alimento, cosmético, droga, sabão ou semelhante contendo o lipídeo ou ácido graxo que tem sido formado é preparado por um método convencional. Nesta maneira, o alimento, cosmético, droga, sabão ou semelhante manufaturado pelo método da invenção contém um lipídeo ou ácido graxo formado usando a levedura transformada ou o fungo produtor de lipídeo transformado da invenção. Em adição, a invenção também proporciona o alimento, cosmético, droga, sabão ou semelhante manufaturado por um tal método.

A forma do cosmético (composição) ou droga (composição) da invenção não está sujeita à qualquer limitação particular. Qualquer forma adequada, tal como aquela de uma solução, pasta, gel, sólido ou pó, pode ser empregada. Composições de cosmético ou composições de droga de acordo com a invenção podem ser usadas, por exemplo, em cosméticos ou preparações externas para pele tais como óleos, loções, cremes, emulsões, geles, xampus, enxágües para cabelo, condicionadores para cabelo, vernizes de unha, bases, batons, pós faciais, máscaras faciais, pomadas, perfumes, pós, colônias, pastas de dente, sabões, aerossóis e espumas limpadoras; e em agentes melhoradores e inibidores de envelhecimento da pele, agentes melhoradores e inibidores de dermatite, agentes de banho, medicações para crescimento de cabelo, soros para pele, filtros solares, e agentes inibidores e melhoradores para cortes, pele rachada, e pele seca, rugosa.

Composições de cosmético de acordo com a invenção também podem opcionalmente incluir outros óleos e gorduras e/ou corantes, fragrâncias, conservantes, tensoativos, pigmentos e antioxidantes, etc. A proporção na qual tais ingredientes são incluídos pode ser apropriadamente decidida por uma pessoa experiente na arte de acordo com o propósito intencionado (por exemplo, óleos e gorduras podem ser incluídos na composição em uma proporção de 1 a 99,99% em peso, preferivelmente de 5 a 99,99% em peso, e mais preferivelmente de 10 a 99,95% em peso).

Composições de droga de acordo com a invenção (e.g., preparações externas para pele) podem opcionalmente incluir outros ingredientes farmacêuticamente aceitáveis (e.g., ingredientes antiinflamatórios) ou ingredientes adjuvantes (e.g., ingredientes lubrificantes, ingredientes veículo).

5 Por exemplo, exemplos ilustrativos de outros ingredientes em cosméticos ou preparações externas para pele incluem medicações para acne, agentes anti-caspa e anti-prurido, antiperspirantes, medicações para queimadura, agentes anti-carrapato e piolhos, amaciantes de queratina, medicações de xeroderma, agentes antivirais e intensificadores de absorção percutânea.

10 Exemplos de alimentos de acordo com a invenção incluem suplementos dietéticos, alimentos para saúde, alimentos funcionais, alimentos para criança, leite modificado para bebê, leite modificado para bebê prematuro, e alimentos geriátricos. Neste relatório descritivo, "alimentos" referem-se genericamente aos produtos ingeríveis que são sólidos, fluidos,
15 líquidos, ou suas misturas.

"Suplementos dietéticos" referem-se aos alimentos fortificados com ingredientes nutricionais específicos. "Alimentos para saúde" referem-se aos alimentos considerados saudáveis ou bons para a saúde, e incluem suplementos dietéticos, alimentos naturais e alimentos de dieta. "Alimentos
20 funcionais" referem-se aos alimentos para reposição de ingredientes nutricionais que possuem funções de regulação corporal, e são sinônimos de alimentos com usos para saúde especificados. "Alimentos para criança" referem-se aos alimentos dados a crianças de até cerca de 6 anos de idade. "Alimentos geriátricos" referem-se aos alimentos que têm sido tratados de
25 modo a serem mais fáceis para digestão e absorção do que os alimentos não tratados. "Leite modificado para bebê" refere-se às fórmulas de leite dadas a crianças de até 1 ano de idade. "Leite modificado para bebê prematuro" refere-se às fórmulas de leite dadas a bebês prematuros de até cerca de 6 meses de idade.

Exemplos de formas destes alimentos incluem alimentos naturalmente ocorrentes tais como carne, peixe e nozes (alimentos tratados com óleos e gorduras); alimentos nos quais óleos e gorduras são adicionados no momento da preparação, tais como alimento chinês, talharim japonês e sopas; alimentos preparados usando óleos e gorduras como um meio de transferência de calor, tais como tempurá, alimentos intensamente fritos, tofu frito, arroz frito, rosquinha, e petisco doce japonês frito conhecido como *karinto*; alimentos baseados em óleo e gordura ou alimentos processados obtidos pela adição de óleos e gorduras durante o processamento, tais como manteiga, margarina, maionese, molho de salada, chocolate, talharim pré-cozido seco, caramelo, biscoitos, bolachas, bolos, sorvete; e alimentos que têm sido acabados por borrifo ou cobertura com óleo e uma gordura, tais como biscoitos crocantes de arroz *okaki*, biscoitos duros e pães doce de passas conhecidos como *anpan*. Contudo, os alimentos da invenção não são limitados aos alimentos contendo óleos e gorduras, e também incluem, por exemplo, pães, talharins, arroz, doces (balas duras, goma de mascar, balas de goma, balas secas prensadas, doces japoneses), alimentos agrícolas tais como tofu e alimentos processados feitos de tofu; alimentos fermentados tais como saquê, licor medicinal, vinho de cozimento de arroz (*mirin*), vinagre, molho de soja e *miso*; alimentos obtidos de animais de fazenda, tais como iogurte, presunto, tocinho defumado e lingüiça; produtos de frutos do mar tais como pasta de peixe moldada (*kamaboko*), alimentos fritos baseados em peixe conhecidos como bolos de peixe *hanpen* e *agetan*; e também bebidas de frutas, bebidas não-alcoólicas, bebidas esportivas, bebidas alcoólicas e chá.

Os alimentos da invenção podem estar alternativamente na forma de preparações de droga tais como cápsulas; ou em formas processadas tais como alimentos de fluidez livre, dietas semi-digeridas, dietas elementares, bebidas energéticas e alimentos enterais obtidos por formulação de óleo e gordura da invenção juntos com ingredientes tais como proteínas, açúcares,

gorduras, elementos traço, vitaminas, emulsificadores e agentes aromatizantes.

5. Métodos para avaliar a capacidade de formação de ácido graxo dos fungos de teste produtores de lipídeo e para selecionar os fungos produtores de lipídeo da invenção

Em aspectos adicionais, a invenção proporciona (i) um método para avaliar a capacidade de formação de ácido graxo de um fungo de teste produtor de lipídeo, compreendendo o uso de um iniciador ou uma sonda planejado(a) baseado(a) na seqüência de nucleotídeos de um gene de ácido-graxo-sintetase possuindo a seqüência de nucleotídeos de Posições 1 a 12486 de SEQ ID NO: 1; (ii) um método para avaliar a capacidade de formação de ácido graxo de um fungo de teste produtor de lipídeo, compreendendo as etapas de cultivar um fungo de teste produtor de lipídeo e medir o nível de expressão de um gene de ácido-graxo-sintetase possuindo a seqüência de nucleotídeos de Posições 1 a 12486 de SEQ ID NO: 1; e (iii) um método para selecionar um fungo produtor de lipídeo, compreendendo as etapas de cultivar um fungo de referência produtor de lipídeo e um fungo de teste produtor de lipídeo, medir o nível de expressão de um gene de ácido-graxo-sintetase possuindo a seqüência de nucleotídeos de Posições 1 a 12486 de SEQ ID NO: 1 em cada fungo produtor de lipídeo, e selecionar um fungo de teste produtor de lipídeo que expressa o gene mais elevadamente do que o fungo de referência produtor de lipídeo. A seqüência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 2 pode ser usada em vez da seqüência de nucleotídeos de Posições 1 a 12486 de SEQ ID NO: 1.

Técnicas gerais para realizar um tal método de avaliação são conhecidas na arte e incluem aquelas descritas, por exemplo, em WO 01/040514 e Pedido de Patente Japonesa Publicado de No. H8-205900. O método de avaliação é brevemente descrito abaixo.

Primeiro, o genoma do fungo de teste produtor de lipídeo é

preparado. A preparação pode ser realizada por qualquer método conhecido, tal como um envolvendo o uso de um kit comercial; e.g., um DNeasy Plant Kit (QIAGEN). Um iniciador ou uma sonda planejado(a) baseado(a) na seqüência de nucleotídeos de gene de ácido-graxo-sintetase de Posições 1 a 12486 de SEQ ID NO: 1 ou de SEQ ID NO: 2 (preferivelmente a seqüência de nucleotídeos de Posições 1 a 12486 de SEQ ID NO: 1) é então usado para determinar se este gene mesmo ou uma seqüência de nucleotídeos específica no gene está presente no genoma do fungo de teste produtor de lipídeo que tem sido preparado. Uma técnica conhecida pode ser usado para planejar o iniciador ou a sonda.

Uma técnica conhecida pode ser usada para detectar o gene ou uma seqüência de nucleotídeos específica no mesmo. Por exemplo, uso, como iniciador, de um polinucleotídeo compreendendo parte da ou toda a seqüência de nucleotídeos específica ou de um polinucleotídeo compreendendo uma seqüência de nucleotídeos complementar à seqüência de nucleotídeos específica, e uso, como outro iniciador, de um polinucleotídeo compreendendo parte de ou toda uma seqüência de nucleotídeos a montante ou a jusante da seqüência de nucleotídeos específica ou um polinucleotídeo compreendendo uma seqüência de nucleotídeos complementar à seqüência de nucleotídeos a montante ou a jusante, o ácido nucleico do fungo produtor de lipídeo é amplificado pelo método de reação em cadeia da polimerase (PCR), a presença ou ausência de produto de amplificação é determinada, e os pesos moleculares de quaisquer tais produtos são medidos. O número de nucleotídeos nos polinucleotídeos usados como os iniciadores é geralmente de pelo menos 10 pb, e preferivelmente de 15 a 25 pb. É geralmente apropriado se o número de nucleotídeos na porção do polinucleotídeo entre os iniciadores seja de 300 a 2.000 pb.

As condições de reação para o método de PCR não estão sujeitas a qualquer limitação particular. Por exemplo, condições dentro das

seguintes faixas podem ser utilizadas: temperatura de desnaturação, 90 a 98°C; temperatura de anelamento, 40 a 60°C; temperatura de extensão, 60 a 75°C; número de ciclos, 10 ou mais. O produto de reação obtido como um resultado pode ser separado por uma técnica tal como eletroforese em gel de agarose, e os pesos moleculares dos produtos de amplificação podem ser medidos. Usando este método, a capacidade do fungo produtor de lipídeo para formar ácidos graxos é predita e avaliada baseado no fato de se os pesos moleculares dos produtos amplificados são suficientemente grandes para conterem a molécula de DNA para porções específicas. A capacidade acima pode ser ainda mais acuradamente predita e avaliada pela análise da seqüência de nucleotídeos dos produtos de amplificação.

Além disso, na prática da invenção, pelo cultivo do fungo de teste produtor de lipídeo e pela medição do nível de expressão do gene de ácido-graxo-sintetase possuindo a seqüência de nucleotídeos de Posições 1 a 12486 de SEQ ID NO: 1, também é possível avaliar a capacidade de formação de ácido graxo do fungo de teste produtor de lipídeo. Isto pode ser feito pelo cultivo do fungo de teste produtor de lipídeo, e pela determinação quantitativa do mRNA ou do produto proteína do gene de ácido-graxo-sintetase possuindo a seqüência de nucleotídeos de Posições 1 a 12486 de SEQ ID NO: 1. A determinação quantitativa do mRNA ou da proteína pode ser conduzida usando uma técnica conhecida. Por exemplo, o mRNA pode ser determinado quantitativamente pela hibridização de northern ou RT-PCR quantitativa, e a proteína pode ser determinada quantitativamente por western blotting (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 1994-2003).

Em adição, um fungo produtor de lipídeo adequado pode ser selecionado pelo cultivo de fungos de teste produtores de lipídeo, medição do nível de expressão de um gene de ácido-graxo-sintetase possuindo a seqüência de nucleotídeos de Posições 1 a 12486 de SEQ ID NO: 1, e seleção de um fungo de teste produtor de lipídeo possuindo um nível de expressão do

gene de ácido-graxo-sintetase que está de acordo com a capacidade de formação de ácido graxo desejada. Alternativamente, é possível cultivar um fungo de referência produtor de ácido graxo e fungos de teste produtores de ácido graxo, medir o nível de expressão do gene em cada um dos fungos produtores de lipídeo, comparar os níveis de expressão do gene no fungo de referência produtor de lipídeo e nos fungos de teste produtores de lipídeo, e selecionar o fungo de teste produtor de lipídeo desejado. Especificamente, fungos produtores de lipídeo adequados podem ser selecionados pelo cultivo de um fungo de referência produtor de lipídeo e de fungos de teste produtores de lipídeo, medição das quantidades de expressão do gene de ácido-graxo-sintetase possuindo a seqüência de nucleotídeos de Posições 1 a 12486 de SEQ ID NO: 1 em cada fungo produtor de lipídeo, e seleção de um fungo de teste produtor de lipídeo dentro da expressão deste gene que é mais alta do que no fungo de referência produtor de lipídeo.

Alternativamente, um fungo de teste produtor de lipídeo desejado pode ser selecionado pelo cultivo de fungos de teste produtores de lipídeo, e seleção de um fungo produtor de lipídeo que possui uma capacidade de formação de ácido graxo alta ou baixa ou no qual o gene de ácido-graxo-sintetase contendo a seqüência de nucleotídeos de Posições 1 a 12486 de SEQ ID NO: 1 mostra uma atividade alta ou baixa de ácido-graxo-sintetase. Em tais casos, fungos produtores de lipídeo nos quais o vetor da invenção descrito acima tem sido introduzido, fungos produtores de lipídeo nos quais expressão do polinucleotídeo (DNA) da invenção descrito acima está suprimida, fungos produtores de lipídeo que têm sido submetidos ao tratamento mutagênico, e fungos produtores de lipídeo que tem sido espontaneamente mutados podem ser usados como os fungos de teste produtores de lipídeo ou o fungo de referência produtor de lipídeo. A capacidade de formação de ácido graxo pode ser medida usando um método para determinação quantitativa do nível de ácido graxos dentro das células de fungo, e a atividade de ácido-graxo-

sintetase pode ser medida utilizando o método descrito em James K. Stoops et al., J.B.C. 253, 4464-4475 (1978).

Devido ao fato de ser portanto possível pela invenção a avaliação da capacidade de formação de ácido graxo de fungos produtores de lipídeo (e.g., *M. alpina*), e a seleção de um fungo produtor de lipídeo desejado (e.g., um fungo produtor de lipídeo possuindo uma capacidade de formação de ácido graxo alta ou um fungo produtor de lipídeo possuindo um conteúdo alto de ácido graxo por célula), podem ser eficientemente manufaturados gorduras e óleos de uma composição desejada.

Além disso, o nível de expressão do gene de ácido-graxo-sintetase pode ser usado como um indicador para tais propósitos como investigação das condições de cultivo para realização eficiente de produção de ácido graxo, e para controle do processo de cultivo.

EXEMPLOS

Exemplos são dados abaixo para ilustrar mais completamente a presente invenção, mas não são intencionados para limitarem o escopo da invenção.

Análise EST

Cepa 1S-4 de *M. alpina* foi inoculada em 100 mL de meio (1,8% de glicose, 1% de extrato de levedo, pH 6,0) e pré-cultivada por 3 dias a 28°C. A seguir, 5 litros de meio (1,8% de glicose, 1% de pó de soja, 0,1% de azeite de oliva, 0,01% de Adekanol, 0,3% de KH_2PO_4 , 0,1% de Na_2SO_4 , 0,05% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,05% de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, pH 6,0) foram adicionados em um biorreator de 10 litros (Able Co., Tóquio), após o qual a quantidade inteira da pré-cultura acima foi inoculada nos mesmos e cultivado sob aeração sob agitação por 8 dias a 300 rpm, 1 vvm e 26°C. Glicose em quantidades correspondendo a 2%, 2% e 1,5% foi adicionada nas culturas nos dias 1, 2 e 3 de cultivo, respectivamente. As células foram colhidas em estágios diferentes nos dias 1, 2, 3, 6 e 8 de cultivo, e o RNA total foi preparado pelo método de

cloridrato de guanidina / CsCl. Um Oligotex-dT30 Super mRNA Purification Kit (Takara Bio) foi usado para realizar a purificação por poli(A)+RNA do RNA total. Uma biblioteca de cDNA para cada estágio foi construída usando o ZAP-cDNA Gigapack III Gold Cloning Kit (Stratagene), e foi realizada
 5 análise de sequência de uma passagem (8.000 clones x 5 estágios) a partir da extremidade 5' do cDNA.

Pesquisa de homólogo de FAS

A sequência de nucleotídeos assim obtida foi pesquisada para os homólogos conhecidos de gene de ácido-graxo-sintetase por BLAST.
 10 Como um resultado, foram encontradas duas sequências de nucleotídeos possuindo homologia extremamente alta com porções da subunidade α de uma ácido-graxo-sintetase de *Schizosaccharomyces pombe* (Número de Acesso GB de BAB62032; o gene foi FAS2). Estas sequências tiveram seções em comum, e foram consideradas como originárias de um único gene. A
 15 sequência obtida como um resultado da montagem correspondeu aos nucleotídeos 12262 a 12920 em SEQ ID NO: 1 (cDNA). Contudo, homólogos do gene FAS1 não puderam ser encontrados.

Obtenção de uma sequência parcial de um homólogo de FAS1

Devido ao fato de que um homólogo de FAS1 não foi
 20 encontrado pela análise acima, foi realizado o alinhamento de sequências de aminoácidos de proteína FAS1 conhecidas (Número GB de P07149 de *Saccharomyces cerevisiae*; Número GB de P34731 de *Candida albicans*; Número GB de AAB41494 de *Aspergillus nidulans*) (FIG. 1). Baseado nas sequências (1) e (2) do domínio conservado:

25 Sequência (1): QGSQEQQGMGM (SEQ ID NO: 4)

Sequência (2): ATQFRQPALT (SEQ ID NO: 5),

os seguintes iniciadores degenerados foram planejados:

Flh-f: CARGGNWSNCARGARCARGGNATGGGNATG

(SEQ ID NO: 6)

Flh-r: GTNARNGCNGGYTGNGTRAAYTGNGTNGC (SEQ ID NO: 7).

O cDNA de *M. alpina* 1S-4 foi sintetizado a partir de RNA total obtido pela análise EST descrita acima usando iniciadores hexaméricos aleatórios com o SuperScript Fast Strand System for RT-PCR (Invitrogen). Usando o cDNA de *M. alpina* 1S-4 com o modelo, 30 ciclos de reação PCR - cada ciclo consistindo de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 50°C e 1 minuto a 72°C - foram realizados com ExTaq (Takara Bio), dando deste modo fragmentos de DNA de aproximadamente 300 pb. Os fragmentos de DNA obtidos foram TA clonados com um TA Cloning Kit (Invitrogen), e o plasmídeo assim obtido foi chamado de pCR-MaFAS1-1. A sequência de nucleotídeos foi então determinada. Análise BLAST mostrou que há um grau alto de homologia com parte da subunidade β da ácido-graxo-sintetase.

Triagem da biblioteca de cDNA

Homólogos de FAS1 e homólogos de FAS2 foram triados como segue a partir da biblioteca de cDNA. Um DIG Labeling System (Roche) foi usado para triagem. Com o plasmídeo pCRMaFAS1-1 como o modelo, uma sonda DIG-marcada para homólogos de FAS1 foi preparada usando o iniciador F1-1f: 5'-GCTCTGTATGACTCTTCCCCC-3' (SEQ ID NO: 8) e o iniciador F1-1r: 5'-GCCAAAAGACCGTTGGGTGAC-3, (SEQ ID NO: 9).

Uma sonda para homólogos de FAS2 foi preparada com o cDNA da cepa 1S4 de *M. alpina* como o modelo e usando os iniciadores F2-1f: 5'-GGTGCAGGAGCGGGACTGAGTG-3' (SEQ ID NO: 10) e F2-1r: 5,-CGCATTGCAACCGCAACCGCG-3, (SEQ ID NO: 11) pela realização de 30 ciclos de reação - cada ciclo consistindo de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C e 1 minuto a 72°C - com ExTaq (Takata Bio). O fragmento de DNA de aproximadamente 170 pb obtido foi TA clonado com um TOPO-TA Cloning Kit (Invitrogen), e o plasmídeo resultante foi chamado de pCR-MaFAS2-1.

Uma sonda DIG-marcada foi preparada por PCR com o plasmídeo pCR-MaFAS2-1 como o modelo e usando os iniciadores F2-1f e F2-1r.

Triagem da biblioteca de cDNA foi realizada usando estas sondas. Clones positivos não puderam ser obtidos com a sonda para os homólogos de FAS1.

Contudo, quando a sonda para homólogos de FAS2 foi usada, foi possível obter vários clones positivos. O clone mais longo incluiu uma sequência que correspondeu aos nucleotídeos 7861 a 12,920 (5,060 pb) de SEQ ID NO: 1 (cDNA). Este clone foi chamado de plasmídeo pBSMAFAS2-1. Contudo, quando comparado com o gene FAS2 conhecido, não pareceu incluir o comprimento total.

Construção de biblioteca genômica

A cepa 1S-4 de *M. alpina* foi inoculada em 100 ml de um meio líquido (1% de glicose, 0,5% de extrato de levedo, pH 6,0), e cultivada sob agitação a 28°C por 4 dias. As células foram colhidas por filtração com um filtro, e o DNA genômico foi extraído pelo método CTAB.

O DNA genômico assim obtido (aproximadamente 200 µg) foi rapidamente digerido com a enzima de restrição Sau3AI de modo que a distribuição do DNA clivado fosse centrada próxima de 20 kb. Os fragmentos de DNA resultantes foram submetidos à centrifugação em gradiente de densidade de sacarose de 10% a 40% sacarose (rotor, SW28 (Beckman), 25,000 rpm, 10°C, 24 horas), e fracionados usando um Automatic Liquid Charger (Advantec) e uma Micro Tube Pump (Eyela) em frações de 1 ml. As frações possuindo distribuições centradas próximas de 20 kpb foram purificadas. Com os fragmentos de DNA assim obtidos, foi preparada uma biblioteca genômica usando o XBlueSTAR/BamHI Vector Kit (Novagen).

Triagem de biblioteca genômica

Os homólogos de FAS1 e homólogos de FAS2 foram triados da biblioteca genômica na mesma maneira como no exemplo acima (triagem

da biblioteca de cDNA). Como um resultado, foram obtidos clones que foram positivos ambos com a sonda para homólogos de FAS 1 e a sonda para homólogos de FAS2. Parte da seqüência de nucleotídeos do inserto deste clone (15.539 pb de SEQ ID NO: 2 (genoma)) foi seqüenciada.

5 De uma comparação com a seqüência de aminoácidos de proteínas FAS1 e proteínas FAS2 conhecidas, foi inferido que os nucleotídeos 1062 a 1064 (ATG) em SEQ ID NO: 2 (genoma) funcionam como um códon de iniciação. Também foi inferido que os homólogos de FAS1 e os homólogos de FAS2 são codificados por um polipeptídeo único.

10 Clonagem de cDNA de comprimento total

Primeiro, com o cDNA de *M. alpina* 1S-4 como o modelo e usando o iniciador F1-2f: ATGACTACCGCACAGTCCAACTTGACC (SEQ ID NO: 12) e o iniciador F1-1r, 30 ciclos de reação PCR - cada ciclo consistindo de 10 segundos a 98°C e 15 minutos a 68°C - foram realizados com LATaq (Takara Bio). O fragmento de DNA de aproximadamente 5,4 kb
15 obtido como um resultado foi clonado com um TOPO-TA Cloning Kit (Invitrogen), dando um plasmídeo que foi chamado de pCR-MAFAS-1. A seqüência de nucleotídeos do inserto foi checada, e verificado que corresponde aos nucleotídeos 1 a 5435 de SEQ ID NO: 1 (cDNA). O DNA foi
20 digerido com a enzima de restrição EcoRI, e o fragmento de DNA de 5,4 kb DNA obtido foi ligado no sítio de EcoRI do vetor pBluescriptII SK+. Foi selecionado o produto no qual o nucleotídeo de número 1 em SEQ ID NO: 1 (cDNA) está localizado no lado de SacI de um sítio de multiclonagem no vetor pBluescriptII SK+. O plasmídeo resultante foi chamado de pBS-
25 MAFAS-1.

A seguir, um fragmento de DNA de aproximadamente 2 kb obtido por digestão do plasmídeo pBSMAFAS2-1 com as enzimas de restrição Apal e EcoRV foi ligado nos sítios ApaI e EcoRV do vetor pBluescript II SK+. O plasmídeo resultante foi chamado de pBS-FAS2. A

seguir, com o cDNA de *M. alpina* 1S-4 como o modelo e usando o iniciador F1-3f: TGTCTTGAAGAGCAAGGAGTGG (SEQ ID NO: 13) e o iniciador F2-2r: GCGTAGTAGTCGCCGTGCTCAGCCATC (SEQ ID NO: 14), dez ciclos de reação - cada ciclo consistindo de 2 minutos a 92°C seguido por 10 segundos a 92°C, 30 segundos a 55°C e 8 minutos at 68°C, então vinte ciclos de reação - cada ciclo consistindo de 10 segundos a 92°C, 30 segundos a 55°C e 8 minutos mais 10 segundos a 68°C - foram realizados com Pfu Turbo DNA Polymerase (Stratagene). O fragmento de DNA de aproximadamente 3,6 kb DNA obtido como um resultado foi clonado no vetor pCR4 Blunt-TOPO usando o Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit (Invitrogen), e o plasmídeo resultante foi chamado de pCR-MAFAS-5. O fragmento de DNA de aproximadamente 3,1 kb DNA obtido por digestão do plasmídeo pCR-MAFAS-5 com as enzimas de restrição EcoRV e SpeI foi ligado com o fragmento de DNA de 4,9 kb obtido por digestão do plasmídeo pBS-MAFAS-2 com as enzimas de restrição EcoRV e SpeI. O plasmídeo resultante foi chamado de pBS-MAFAS-3.

Em adição, um fragmento de DNA de 2,6 kb obtido por digestão de pBS-MAFAS2-1 com a enzima de restrição EcoRV foi ligado com um fragmento de DNA obtido por digestão do plasmídeo pBS-MAFAS-3 com a enzima de restrição EcoRV. O fragmento de DNA inserido foi confirmado em estar orientado na direção apropriada, dando assim o plasmídeo pBS-MaFAS.

O plasmídeo pBS-MaFAS compreende DNA possuindo a seqüência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 1, e foi considerado em incluir o comprimento total do cDNA de homólogo de FAS de *M. alpina* 1S-4. CDS foi a seqüência de nucleotídeos 1 a 12489, e ORF foi a seqüência de nucleotídeos 1 a 12486, de SEQ ID NO: 1. A seqüência de aminoácidos putativa é mostrada em SEQ ID NO: 3 (proteína).

Esta seqüência de aminoácidos, quando comparada com os

genes de ácido-graxo-sintetase conhecidos, teve a estrutura de ácido-graxo-sintetases de fungos conhecidos na qual as subunidades β e α estão conectadas de cabeça-em-cauda. Contudo, foi baixa a homologia de ácido-graxo-sintetases de tipo I de origem bacteriana conhecida em ter uma estrutura similar. Quando a sequência de aminoácidos desta proteína foi comparada com as sequências de aminoácidos de ácido-graxo-sintetases de origem fúngica nas quais a subunidade β e a subunidade α estão conectadas, a identidade foi de cerca de 50%. Houve duas repetições de um motivo composto de 165 aminoácidos correspondendo à parte da sequência conservada (COG4982) de 3-oxo-acil-[proteína carreadora de acila].

Além disso, quando comparado com a sequência genômica obtida no início, este gene teve 7 íntrons. Em SEQ ID NO: 2, houve 8 exons: bases 1062 a 1304, bases 2140 a 2679, bases 2778 a 4724, bases 4823 a 7027, bases 7115 a 7243, bases 7339 a 7497, bases 7582 a 10668 e bases 10772 a 14947; e 7 íntrons: bases 1305 a 2139, bases 2680 a 2777, bases 4725 a 4822, bases 7028 a 7114, bases 7244 a 7338, bases 7498 a 7581, e bases 10669 a 10771.

Construção de vetor de expressão para a levedura *Saccharomyces cerevisiae*

O plasmídeo pBS-MaFAS foi digerido com a enzima de restrição ApaI, e então as extremidades foram cegadas com um DNA Blunting Kit (Takara Bio). Isto foi seguido pela digestão com a enzima de restrição EcoRI, dando um fragmento de DNA de aproximadamente 13 kb. Este fragmento de DNA foi digerido com a enzima de restrição BamHI, então cegado e subsequentemente ligado com o vetor pYE22m (Biosci. Biotech. Biochem., 59, 12211228, 1995) digerido com a enzima de restrição EcoRI, construindo deste modo o plasmídeo pYE-MaFAS.

Análise de ácido graxo de levedura de expressão alta de MaFAS

Duas cepas aleatoriamente selecionadas dentre os transformantes obtidos pela transformação de cepa EH1315 de levedura *S.*

cerevisiae (Appl. Microbiol. Biotechnol., 30, 515-520, 1989) com o plasmídeo pYE-MaFAS foram chamadas de cepa MaFAS-1 e cepa MaFAS-2. Em adição, uma cepa aleatoriamente selecionada dentre os transformantes obtidos pela transformação da cepa EH1315 de levedura *S. cerevisiae* com o vetor pYE22m foi usada como o controle (cepa C-1). Uma alça de platina de cada uma destas cepas foi inoculada em 10 ml de um meio líquido SC-Trp ou 10 ml de um meio líquido YPD, e cultivada a 30°C por 2 dias. As células foram então colhidas por separação centrífuga e liofilizadas. Os ácidos graxos nas células foram convertidos em seus metil-ésteres pelo método de ácido clorídrico / metanol, e extraídos com hexano. O hexano foi então destilado, e análise cromatográfica a gás foi realizada. Os resultados são mostrados em Tabela 1.

Tabela 1

Composição de ácido graxo de células de levedura crescidas em meios diferentes

Meio	SC-Trp			YPD		
Cepa	C-1	FAS-1	FAS-2	C-1	FAS-1	FAS-2
Composição de ácido graxo (%)						
14:0	nd	1,2	1,2	nd	nd	1,4
14:1	nd	1,0	1,1	nd	nd	nd
16:0	4,7	10,9	10,6	5,4	13,7	13,0
16:1	38,3	52,2	53,0	34,0	59,8	57,0
18:0	3,7	2,6	2,5	5,6	nd	2,9
18:1	51,3	28,5	27,9	52,3	26,5	24,1

Na cepa C-1, a proporção de ácidos graxos de 18 carbonos ácido esteárico e ácido oleico foi mais alta do que aquela de ácidos graxos de 16 carbonos, enquanto que a cepa MaFAS-1 e a cepa MaFAS-2 que teve expressão alta de MaFAS, a proporção de ácidos graxos de 16 carbonos ácido palmítico e ácido palmitoleico foi mais alta.

Construção de vetor de expressão no fungo produtor de lipídeo *Mortierella alpina*

O plasmídeo pBlueHpt (Publicação JP Publicada de No. 2005-

287403) foi digerido com NcoI e BamHI, e então MCS 1-F e MCS 1-R nos quais a terminação 5' foi fosforilada foram anelados e inseridos, para dar o plasmídeo pBlueHptMCS.

MCS 1-F:5'-catggatcctctagactgcaggcatgcaagcttctcga (SEQ ID NO: 15)

5 MCS 1-R:5'-ctaggagatctgacgtccgtacgttcgaagagctctag (SEQ ID NO: 16)

O plasmídeo pDura5 (Appl. Microbiol. Biotechnol., 65, 419-425,(2004)) foi digerido com a enzima de restrição BamHI, e então as extremidades foram cegadas, seguido por auto-ligação. Então, o plasmídeo obtido foi digerido com a enzima de restrição XbaI, e então as extremidades foram cegadas, seguido por auto-ligação. Ademais, o plasmídeo obtido foi digerido com a enzima de restrição HindIII, e então as extremidades foram cegadas, seguido por auto-ligação. Após o plasmídeo obtido ser digerido com EcoRI, foi inserido um fragmento possuindo cerca de 1,7 kpb obtido por digestão do plasmídeo pBlueHptMCS com EcoRI. Um plasmídeo possuindo o promotor de gene histonH4,1 inserido na mesma direção foi selecionado, e designado como vetor plasmídeo pDura5MCS.

O plasmídeo pBS-MaFAS foi digerido com a enzima de restrição ApaI, e então as extremidades foram cegadas usando o DNA Blunting Kit (Takara Bio). O produto foi então digerido com a enzima de restrição XbaI, dando um fragmento de DNA de aproximadamente 13 kb. Este fragmento de DNA foi digerido com a enzima de restrição HindIII, então cegado, após o qual ele foi ligado no vetor pDura5MCS digerido com a enzima de restrição XbaI, construindo deste modo o plasmídeo pDura5-MaFAS.

25 Transformação do fungo produtor de lipídeo *M. alpina*

Usando o plasmídeo pDura5-MaFAS, transformação pelo método de liberação de partícula foi realizada, com o uso de cepa Δura-3 requerendo uracila, como hospedeiro, derivada de *M. alpina* de acordo com o método do Documento de Patente (método para geração de fungos produtores

de lipídeo). Um meio de ágar SC (0,5% de Base Nitrogenada de Levedura sem Aminoácidos e Sulfato de Amônio (Difco), 0,17% de sulfato de amônio, 2% de glicose, 0,002% de adenina, 0,003% de tirosina, 0,0001% de metionina, 0,0002% de arginina, 0,0002% de histidina, 0,0004% lisina, 0,0004% triptofano, 0,0005% de treonina, 0,0006% de isoleucina, 0,0006% de leucina, 0,0006% de fenil-alanina, 2% de ágar) foi usado para seleção dos transformantes.

Dois dos transformantes obtidos foram chamados de cepa FAS-3 e cepa FAS-4. Uma cepa aleatoriamente selecionada na qual pDura5 tem sido introduzido foi chamada de cepa C-2. Estas cepas foram inoculadas em um meio líquido contendo 2% de glicose e 1% de extrato de levedo, e cultivadas com agitação a 28°C. No dia 3 do cultivo, uma solução de glicose 20% foi adicionada em uma quantidade correspondendo a 1/20 da cultura líquida. No dia 4, um pouco das células foi colhido e liofilizado. Os ácidos graxos das células foram convertidos nos metil-ésteres correspondentes, então extraídos com hexano. O hexano foi destilado e análise cromatográfica gasosa foi realizada, determinando deste modo quantitativamente a quantidade de ácidos graxos por célula. As quantidades são mostradas em Tabela 2.

Tabela 2

Conteúdo de ácido graxo (%) por célula

Cepa	FAS-3	FAS-4	C-2
	30,6	30,1	28,1

Comparado com a cepa C-2, a quantidade de ácido graxo por célula aumentou nas cepas FAS-3 e FAS-4.

APLICABILIDADE INDUSTRIAL

A presente invenção é útil para melhorar a produtividade de ácido graxo, para a produção de ácidos graxos desejados, e/ou para a produção de qualquer um dos seguintes que contêm ácidos graxos desejados: alimentos, cosméticos, preparações externas para pele e/ou sabões.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Suntory Limited

<120> Ácido-graxo-sintase, polinucleotídeo codificador da mesma, e seus usos

<130> PCT07-0017

<150> JP2006-128779

<151> 2006-05-08

<160> 16

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 12926

<212> DNA

<213> Mortierella alpina

<400> 1

atgactaccg	cacagtccaa	cttgacccgt	cctttggccc	tcaagcaagg	aactttctgag	60
gtctcgatcc	tcgttccttc	ggatgtctgg	gtagcggctg	aacaacttcg	tgaggagttt	120
ctgatctcgg	tcgaggctgc	tcctgcagag	gaggccgcag	cgaccggaag	tgctgacgat	180
caggccccgg	agatggcttt	ggtggcccg	tttctcaaat	ttgctacgga	caagagcgag	240
cagagcgatc	cttcactgca	gttcattcct	gtgctgagaa	ccgtcttcct	gttctttgtc	300
accaaatacc	ttaaaggaaa	cgacatccac	gcggtcactc	gacttttagc	aaaggatacc	360
cgggtggtga	tcataaatgc	gttcttctcg	gccttggtct	tcctccgtgc	tacggaggct	420
cttgcacccg	aggactacac	cccgccaaac	tcggcactat	ttgccgctgc	tcaggaggga	480
aaggctaagc	tgtttgccat	ctttggcgg	cagggcaata	tcgaggagta	ctttgacgag	540
ctggcagaca	tctacacgac	ctataccacg	ttggtgcagg	actacgtcga	ggacatggct	600
gcagtgttgc	gcgagcacgc	cagatcggat	gatgcctcgg	tcttccactc	caagggactg	660
gatgtcatgg	ggtggttgag	gagcccagac	tcgaagccag	atggtgcgta	tctggtttca	720
gcacccgtct	ctctgccctt	gattggactt	gtccagctta	tgcattacta	tgtgatgctc	780
aaggttcttg	accagactcc	cgcccagctt	cgcgatgtta	ttcttggttc	gacgggacac	840
tcccagggca	tcatactcgtc	tgtggtcatc	tcatactcgg	ccacattcga	ggagttcttt	900
gctaactctc	gtaaggcact	gggacttctt	ttctggatcg	gaacccgctc	ccaggaggctc	960
tacctctaaa	ccacctctaa	tcccgccatt	cttcaagact	cgctctctaa	caatgaaggc	1020
aaccctactc	ctatgctggt	tgtcaactct	ttgcgcgcat	ctgagggtcca	gaagtacgtc	1080
gaggccacca	accgccatth	gccagaggac	cgcaagatca	agatcgcgct	tattaacgga	1140
ccccgctcat	ctatctgcac	gggacctcct	caatcgttgt	acggcctgaa	ccttgctctt	1200
cgcaagctca	aggctcccac	gggacctggag	cagggtcgtg	tacctttttc	gcagagaaaag	1260
gtcaagttct	cgtcccgttt	cttgcccac	actgcacctt	tccactcttc	gtatctggat	1320
ggcgtctctg	ccctggtcga	gagcgatatt	gtcgggtacg	acctgaggtt	tgaccatacc	1380
cagatgacca	tccccgtctt	ctcaaccgac	tctggaaagg	acattgcagg	atcgccctact	1440
attactacgg	accttgtaaa	tcaaatttgt	tcccttccc	tgcactggga	gaaggcgact	1500
gctatggcag	gattgaccca	tgtgatcgat	ttcggccccg	gcggctcctc	gggcgtcggc	1560
tctttgacgg	cccgaacaa	ggacggcacg	ggtgtccagg	tgatgctggc	cggcgcttct	1620
gagggcgtca	accgcgagct	gtcgtacaaa	cccacatct	tcgatgccaa	cccagctgct	1680
ctgcgctatg	cccccaactg	ggccaatgag	ttccagccaa	agctggttcg	ctccgtcaac	1740
ggcgagatcc	acatcgacac	tcgcatgtcc	cgctctcttt	ccaagcccc	attgatggctc	1800
gccggaatga	ccccctcgac	tgtaacgag	ggctttgtca	tgctgttat	gaatgccgg	1860
taccacgttg	agctggccgg	tggtggacac	tataacgagg	ccgcgggtccg	cagcaaggctc	1920
aagaagatca	tcagctcac	cactcctgga	gccggtatca	ctctcaaac	cctcttcac	1980
aatgtgcgcc	agtggggctt	ccaagctccc	ttggtgccca	agctccgtcg	cgagggcctc	2040
cccatggagg	gcttttgttg	cgctgccgg	gttccctcgc	tcgaggctcg	agacgagttc	2100
atcactgaca	tgctcagtgc	cggaatccgt	cacatctcct	tcaagcctgg	ctcggccgag	2160
gccatccgcc	aggtcttggc	gatcgccaat	gccaccctg	agatgcccat	cgttcttcag	2220
tggactggtg	gccgtgctgg	tggccatcac	agtttcgagg	atttccatca	gcccatacctg	2280
gagacatact	ctgccatccg	tcgtcaccct	aacgttgtcc	tggtggccgg	ctctggtttc	2340
ggtggcgctg	aggacaccta	cccctacctc	acaggtgact	ggtctgtcca	gctcgactac	2400

cctcccatgc	cttttgatgg	tatgcttttt	ggttcacgcg	tcattggtggc	caaggaggga	2460
atggcttcgc	ttggtgtgaa	gcaggctatt	gtcgatgcac	ccggagtcga	ggactctgag	2520
tgggaaaaga	cttacaaggg	acccaccgga	ggcgtcatga	ctgtccgttc	cgaattggga	2580
gagcccattc	ataaaattgc	aaccgcgga	gtcaagctgt	ggaaggagat	ggacgacacc	2640
atctttgctc	tgcccaagga	caagcgtccc	gctgccctct	tggccaagaa	ggactacatc	2700
atcaagcgtc	tgaacgctga	cttccaaaag	gtctggttcg	gtaagaaggc	caacggcagc	2760
gttgctgata	ttcaggacat	gacttatgag	gaggtcatca	accgcttgat	tgagctcatg	2820
tttatcaagc	atgaggagcg	ctggattgat	cactctcacc	gcaacttgct	cggcgacatc	2880
cttcgccgga	ttgaggagcg	cttcggttggc	gttgagaaga	agtccattgt	ccaaaccttc	2940
tctcagcttg	acatcccttt	tgcgtttgcc	caggagtttg	tcgacaccta	tcccttgacc	3000
aagaccacgc	tcttgactac	cgaggatgtt	ggatacttct	tgttcttgat	gaaccgtcgt	3060
ggacaaaagc	ccgtgccatt	cattcccgtg	ctcgacaagg	actttgaggt	gtggtttaag	3120
aaggactctc	tctggcaggc	cgaggacttg	gccgctgttg	ttgatcagga	tgtgcagcgc	3180
acctgcattc	ttcagggacc	tgccgccgtc	cgctatgcaa	ccaaggtgga	tgagcccgtc	3240
aaggatatatt	tggacggcat	cttccacagc	cacattgcct	ggttgaagga	gcgttattac	3300
aacaacaacg	atgccaacat	tccccaggtc	gagtactttg	gcggcaagcc	cggacgcttc	3360
gagtccgctt	tggatgctgt	cttgcccttg	gtcaaggtcg	agacttacga	caacggcaag	3420
gtcaagatgg	tggagacctc	catgctagag	tcaagcttgc	ccaagaatga	ggattggctc	3480
gagtaccttg	ctggccagga	cccctcttgg	ttccgcgcc	tcttgactgc	ccccgcgtc	3540
attcaaggga	agaagttctt	ggataatcct	cttgcacgca	tcttccgtcc	tctgtctctc	3600
caagccgttc	acttcgagta	cgccgaggac	aagttgcaaa	ccattaccgt	ttacgatcgt	3660
cgctcctggg	ctgcttccag	caagtcgagc	gagctctctc	cctcgcttcg	cgcccgtctg	3720
cagcccaacg	agctcattga	ggtcgtgctg	gtggagaaga	acggcgagcg	tttgattcct	3780
ttccctctcc	tcttccacta	cacccccgag	aagggatatg	cccctatcca	tgaggtcatg	3840
gagggtcgca	acgagagaa	caaggagttc	tactacaagc	tttggttccc	ttcagaggag	3900
gatcaattca	acgcctgcct	ggccactgat	gccttcaccg	aaaagtttat	ttgcaatggg	3960
gagcagggtca	gcacgccaga	gatcaaggag	ttttgccagg	ctgtcggaaa	ccaggccgag	4020
ctctacgttg	agcgcgccca	gaaagttgtc	tatgcgccca	tggattttgc	tattgtcgtt	4080
ggctggaagt	ctatcatcaa	ggccatcttc	cccaagtcga	ttgacgggtga	tctgttgaag	4140
cttgtccatc	tctcgaacgg	cttccgtatg	ttagatggcg	ccgagtcctt	gaagcaaggc	4200
gacattgttg	acactgttgc	cgagatcaat	gccgttgcca	acaacgattc	cgggaagtgt	4260
gttcagggtca	agggcgtggg	tctgcgtgag	ggcaagcgcg	tcattggaggt	gacctcggag	4320
ttcttgtagc	gcggcacctt	tgtggattac	cagaacacat	tccaaaagac	ggttgagacc	4380
cccatggagg	ttaagctgac	gtccgccaa	gatgtggctg	tcttgaagag	caaggagtgg	4440
atccagtggg	ccgagggtga	gcacaccgtc	gggcctaatt	cgctccttgg	cttccgcctg	4500
aacacgattg	ttcgcttcaa	gaacaagacc	accttctcgc	atgttgagac	cactggtacc	4560
gtgtcgatgc	agatttccac	taaggagcat	gtcgagattg	ccactgttca	ctatagcaac	4620
gacgaggaga	ctcaggga	tcccgtcctc	gcctacttga	agcgcctcgg	ttctcctatc	4680
gagcaggcca	tccacttcga	gaacggtgga	tattctgtca	tgcgcgaggg	ttcctcagc	4740
tcgagggtca	tttctccctt	cagcaatgag	ccctatgcta	aggtttcggg	tgactttaac	4800
cctatccacg	ttaaccctta	ctttgctgat	ctcgtgagc	tccctggcac	tattacccat	4860
ggcatgtgga	ctagtgcctc	gacccgcaag	tttgtggaga	tctttgctgc	agagaatcat	4920
cctcagcgtg	tactagcta	cgagggtcaag	ttcctttcta	tgggtgcttc	tcaggaccgt	4980
ctttcgacca	agttatcgca	cattggaatg	atcaacggaa	agaagatcat	caaagtggaa	5040
actttcaacc	agaacggcag	caaggttgtt	gagggcactg	ctgagattga	tcagcccacg	5100
atcgctatg	tgttactggt	acagggatct	caggagcagg	gaatgggaat	ggctctgtat	5160
gactcttccc	ccgtcgccaa	ggacatctgg	cagagagccg	accgtcattt	cttggaatac	5220
tatggcttct	ccattctgga	tattgtccgc	aacaatcctc	tgaagaagac	gattcacttt	5280
ggtggtccca	agggtaacgc	cattcgtcag	aattacatgt	cgatgcgcta	cgatcaagtt	5340
gaccaggatg	gtcccatcaa	atctttgcct	ctgttccccg	gcataacga	gaccacgcac	5400
ttttacacct	tccagtcacc	caacggtctt	ttggctgcca	ctcagttcac	acagcctgcc	5460
ttgaccctta	tggagaaggc	cgcccttcgag	gacatgcgct	ccaagggttt	gatccagggc	5520
aactgtgcct	ttgccggtca	ctcgtcggga	gagtactctg	ctcttgctgc	cattggtgag	5580
gtccttccca	tcgaatcctt	ggttgatgtc	gtcttctacc	gtggtatgac	catgcagggtc	5640
gctgttcccc	gcgactctgt	cggccgctcc	aactatggaa	tggctgccat	caacccatcg	5700
cgtgtctcgc	ccacattcaa	cgactctgct	ctccgctatg	tctgtgacgc	aatcgccaga	5760
cagtcgaacg	gtcttttggg	aattgtcaat	gagaacgttg	agaactggca	gtatgttgct	5820
gctggtgagc	tttctaactt	ggacgctctc	tcgactgtcc	tgaactacct	caagggtcag	5880
aagatcgatc	ttcagaagct	gatggagacc	atgcccttgg	aagaggtcaa	gaagcacttg	5940
tctcagatca	ttgccggcgc	ccttgagaag	gttgcggaga	aggttgccaa	ggatggtcac	6000
atcaagcctg	agcgcggtgt	tgctaccatc	cccttggctg	gaatcgatgt	ccccttccac	6060
tctagcttct	tgttgcctgg	tgctgcctcc	ttccgcacct	atctcgccaa	gaagatcaac	6120
cctacgttca	ttaacgtgcc	cctgttgact	tccaagtaca	ttcccaattt	gactgctcag	6180

cccttcagca	ttgagaagtc	ctacattgag	ggcgtctaca	acctcacgtc	gtctccccgt	6240
ctggccaagg	tcctcaagaa	ctggatcgac	accaagctga	ctgccaagca	gcagcagcgt	6300
ctgggatata	ctctcttggt	cgagttgctc	gcttaccagt	tcgcttcgcc	cgtccggttg	6360
attgagaccc	aggatagact	cttcaaggag	tacaacgtcg	tccgcttgat	tgagggttga	6420
ccctcgccca	cgctctgtgg	tatggcccaa	cgcacgtca	agttcaagta	cgaggcttat	6480
gatgatgcct	tgaccttcca	gcgttcgact	ctttgcacgt	ccaaggactc	caaggagatt	6540
tattatgcca	tggacaatgt	cgagtcctcg	gctcctgctc	cggctgccag	tgctgctgct	6600
cccgccecca	aagccacccc	agtggccgct	gcagceccc	ctcccgtggc	tgctgcgcgt	6660
gcaggacctg	ctgccgccc	ttcagatgtc	cccatcaagg	cccttgagat	cttgcacgtg	6720
atcggttgccc	aaaagggtcaa	gaagactctc	gaagaggtcc	ctctctcgaa	ggccatcaag	6780
gatctttag	gaggcaagtc	gactcttcag	aacgaaatct	tgggtgatct	tcagaaggag	6840
tttggttagca	gcggattccc	tgagaagggc	gaggaggctc	ctctggagga	gcttgccaac	6900
gctcttcagg	gcaacttcaa	cggagctctt	ggaaagcaga	ccacttcgct	catcgccaag	6960
atgattggat	ccaagatgcc	cgggtggtat	tcgctctcga	ctgccaaggg	atacctggcc	7020
aaggcccacg	gcctgggtcc	tgctccgtgcc	gatgctgcgc	tcttggtcgg	tttgacgatg	7080
gagcccgag	cccgtctggg	cgcggttcc	gaggccaatg	cttggttgga	ttcggtcgct	7140
caggcttacg	cccgcggtgc	tggtatctcg	ctgctcggtg	gtgccccgc	tggtggtgcc	7200
gctcccgta	tgatggcggc	tgctggccct	gctgctgctg	gtcctgcagc	tgctggtgct	7260
gatgctccta	tcaaggctat	tgacattctt	cacgtcattg	ttgccccaaa	gatcaagaag	7320
actgtcgagg	agggtccact	ctcgaaggcc	atcaaggatc	ttggttggtg	caagtcgact	7380
ctgcagaacg	agatcttggg	tgatcttcag	aaggagtttg	gcagcagtg	cttccctgag	7440
aaggcgagg	aggctccttt	ggaagatctc	ggaaatgctc	tccagggtaa	ctttggtgga	7500
tccttgggca	tgacagcgac	ctcggttgat	gccaaagtga	tgggatccaa	gatgccaggt	7560
ggatttacct	agtcctcagc	caaggcttac	ctcgctcgt	cttatggctt	gggtccactc	7620
cgcgctgacg	gtgcgttgct	cttggtgtgc	actatggagc	ccagcgcccg	cctcggtacc	7680
gagggtgatg	ccaaggcttg	ggttgacact	gtcgcccaag	cttacgctcg	tcgtgccggt	7740
atttccttgg	gaggcgcg	cggcggtgct	gtcgctggtg	gtgccgttgg	tggtgccatg	7800
atgaacagt	aggagttaa	ccaattccag	gccaaagcaga	acgcgatgat	gtaccagcac	7860
ctcgagatct	atgctcgta	ccttgagaag	gatctccgtg	ctggcgaaaa	gcagtacgag	7920
gaggagaagc	tggcgaccct	gcgcttgacg	gcagatatcg	accagtggat	ggctgagcac	7980
ggcgactact	acgcgaggg	catcaagcct	gccttcagcg	ccaagaaggc	ccgcaagtac	8040
gactcacact	ggaactgggt	ccgtcaggat	gccatgtcgc	tcttgtaaga	catgatcttt	8100
ggccgactca	ccgtcggtga	ccgcgaggtc	gtggcccagt	gcattccatgt	catgaaccgc	8160
gctaaccccc	agttgcttga	gtttatgatc	taccacattg	acaacactgc	tgctgatcgc	8220
ggcaagacct	atgctttggc	caaggagttt	ggtaacatgt	tgatcgagaa	ctgtcgcgag	8280
gttctggaag	ccgcgcctgt	ctacaaggat	gtcgggtgtc	ctaccggtcc	ccagacgacg	8340
atcgataaca	agggcaatat	cttgtagag	gaggttcagc	gcgtgggtgt	ccgcaagctg	8400
gatcactatg	tcaaggatat	ggtcgctggt	ggcaagatgt	ccgagtacag	caaccgccag	8460
aagggtcgaga	agaaccttgc	tcagatctac	aagatcatta	aggctcagaa	cacgatgaag	8520
tcttcctcca	agttggcgat	caagtcactc	tacggcgagg	tcattccatgc	catgaacatg	8580
tccaacacca	tcattccgtga	ggagaagaac	cgcggtgcc	gcccgtccg	ccgcgcctcg	8640
gccgttccca	gcgcgaccg	ccctaagaag	gaggccaaga	aggagaccat	tccttcttg	8700
cacctcaaga	agaagaaccc	ccagtctgag	agcggatggg	agttcagta	gcgtttgaca	8760
agcgtttact	tggtatgtct	gaccaacatt	gcgcgcgacg	gtgttacatt	tgagaaccgc	8820
atggtcctga	tgaccggtgc	tggaaaggac	tcgatcggag	cctcgatcct	caagggtctc	8880
ttgtccggag	gagccaaggt	tggtgtcacg	acctcgcgct	tcagccgtga	tgtgaccgag	8940
tactaccaat	cgatctacca	gcgccacgga	tccaagaact	catgcttgg	tggtgttccc	9000
ttcaacggag	gctccaagca	ggatgtcgac	gcacttgta	actacattta	cgataaggat	9060
ctcaagaagg	gtcttggtg	ggatctcgac	tacatcatcc	ccttcgctgc	catctcggtc	9120
cagggcaagg	agattgacaa	catcgactcg	cagtcggagc	tgggtcaccg	tatcatgttg	9180
accaacgttt	tgctctgct	cggaaacgtt	aaggccaaga	agatggagca	cggctacgac	9240
actcgccctg	ctcaggtcat	cctgcccttg	tcgccaacc	acggaacctt	cggagctgac	9300
ggtctctatg	gtgagtctaa	ggttgctctc	gagaccttg	tcaaccgctg	gagttccgag	9360
tcttggggcg	cctatctgac	catcaccgga	gccgttattg	gctggactcg	cggtagtgga	9420
ttgatgagcg	gtaacaacat	tgtggccgag	ggcctggaga	agtacgggtg	ccgcaccttc	9480
tctggccagg	agatggcatt	caacattctc	ggtctcatgc	atccctcgat	caccaacctc	9540
tgccaggtcg	agcctgtctg	ggccgacttg	aacggtggtc	ttcagtaact	gccaacctg	9600
aacgaaatct	cggccaactt	gcgtgccgaa	taccgcaga	cggccgagat	ccgcaaggcg	9660
atcgtcaccg	agaacactct	ggatttcaag	gagaccacg	gtgctgaggc	cgagcgtaag	9720
caccaacccc	acaaggtcac	gcctcggtgc	aacatgaaat	tccctttccc	tgagctgaag	9780
gactacaagg	acctgtcgca	cgctcacaag	ctccgcggca	tgctcgatct	tgagaagggt	9840
gtcgtcgta	ctggtttctc	tgaggtcgga	ccttggggta	actcgcgcac	tcgctgggaa	9900
atggaggcta	atggccagtt	ctcactcgag	ggatgcattg	agatggcctg	gatcatgggc	9960

ttcatcaaac	atcacaaatgg	taacctcaag	tctggctccc	cttactctgg	ctgggtcgat	10020
gccaaagactg	aagagccccgt	caaggatcgc	gatgtgaaag	ccaagtacga	gaagcagatc	10080
ttggagcaca	ctggtatccg	tctgattgag	cccagactct	ttggagggtta	tgatcccaag	10140
cgtaaggggac	tgcttcagga	ggtcttgatc	gaccatgatc	ttgaggcctt	tgagggtctcg	10200
aaggaggagg	cccagatggt	caagcttgag	cacggcgaca	aggtcgacat	ttacgaggag	10260
gagtctggtc	agtgggccgt	caagttcaag	aagggcgcta	acatgtatat	tcccaaggcc	10320
ctgaagttcg	atcgtcttgt	tgctggccag	atccccactg	gatgggatgc	tgcccgcctt	10380
ggagtaccca	aggacatcat	tgaccaggtc	gatactatta	ccctttatgt	cttgggtctcg	10440
accgtggagg	ccttggttgc	ctcgggtatc	actgatecct	atgagttcta	ccagtacgtt	10500
cacgtgtctg	aggttgga	tacagctgga	tccggtgtcg	gaggcatgct	ctcgtctcgc	10560
ggcatgtacc	gcggtcgcgt	gatggatgat	cctgtgcaga	aggatatctt	gcaggagtcc	10620
ttcatcaaca	cgatgcctgc	ctgggtcaac	atgctgctcc	tgctatcctc	tggaacctatc	10680
aagacacccg	tcggagcttg	tgccaccgct	gtcagatctg	tcgagattgg	tgtggatacg	10740
atccagagcg	gtaaggcaaa	gatttgtatt	gtcggaggct	acgatgactt	ccaggaggaa	10800
ggttcgtacg	agtttgccaa	catgaaggcg	accagcaaca	ccgaggaaga	gtttgcgcgt	10860
ggacgtacgc	ccaaggagat	gtcccgcctt	gcaacctcga	cccgtcttgg	attcatggag	10920
tctcacggag	ctggtattga	gattttgatg	caggccaagc	ttgccgtgga	gatgggtgtg	10980
cccattttacg	gtatcgtcgg	tctcaccaac	actgccaccg	acaaggaggg	tcgctctgtt	11040
ccagctcctg	gacaggggtg	cctcaccact	gctcgtgagg	ctaagggcaa	gatgccttcg	11100
cgcttcttgg	acatcaagta	ccgcaagcgc	cagatcgatt	cccgcgcgagc	tcagattaag	11160
caatgggtcg	agaacgagta	tgctgagctc	cgctacgagc	tcgatgagct	caaggccagc	11220
aacagcctca	ccgtctcgga	agaagagtat	cttgctgctg	agactgagcg	cattcagaag	11280
gaagccaagc	gtcagcaccg	cgaggccctt	aacctgtggg	gcaatgagtt	ctacagacag	11340
gacctcaga	tcgctcctct	gcgtggtgcc	cttgctcctt	ttggcttgac	gatcgatgac	11400
attggtgttg	gatccttcca	cggtacctcc	accaaggcca	acgacaagaa	cgaatccgaa	11460
gtcgtcaaca	agcagctcga	gcatttgggt	cgagcaagg	gtaacgcttt	gccctctatc	11520
tggaaaaagt	acctcacggg	acatcccaag	ggtgctgctg	ctgcctggat	gatgaacggg	11580
gtcctgcaag	tcctccagac	gggtctcatt	cccggaaacc	gtaacgcgca	caacattgac	11640
gacacaatga	gacagtatga	gcacgtcttg	tacacctcgc	ggtcgattca	gactgatggg	11700
gtcaaggccg	gtctgctcaa	atcggttcgg	ttcggccagg	tcggagggtga	agttctcctg	11760
atccactcgg	attacattct	tggtgcattg	gaggagcacg	agtacgaggc	ttacaagggtc	11820
aagcagcagg	cgcgccaggc	caagtcgtac	cggtacttgc	atgactctat	gaccggcggc	11880
cctgcccttg	tccagggtcaa	gaacgctccc	ccatactcgc	ccgagctcga	gtcccccggtg	11940
tacttgaacc	ccaaggcccg	tgcgagctac	aacaacgcga	ccaagtcctg	ggcgttcaac	12000
gctaagcacc	tggtacccga	gtctgacaag	attgatgtgg	acatgacgcg	tgcgattctg	12060
gagacgtccg	ctcaagagtc	attaggtgtg	acgtcctcgt	cttcgcgcgg	tgtgggtgtg	12120
gatgtggaaa	tggtctctgc	gatcaacatt	gagaacgaca	cggtcttgga	gcgtaacctt	12180
accagcagg	agattgacta	ctgtctgagc	cgaccggatc	ctcaggctag	ctttgctggg	12240
cggtggtctg	ccaaggaggc	cgtggttaag	gccgtttcgt	cgttctcgct	cgactctgag	12300
aagggttgga	cacagggtgc	aggagcgga	ctgagtga	ttgagattgt	gatggcagag	12360
agcggcgcac	cctcggtggg	gttctcgggt	gcggcccagg	aggcggcggc	caaggccggc	12420
gtcaaggaga	tcaaggcttc	gatcagccat	tctggcgcgt	acgcggttgc	ggttgcaaat	12480
gcgttgtaaa	aacctccccct	ctccttcaag	tgttcttggt	ctttcatttt	ttctttcgtt	12540
cttttaattg	cgcttgcttg	tgctttcttc	agtagagttc	tcttttttct	ttctttcattc	12600
tatttcttta	cttcttatac	cttttcatgg	gcccttgat	acaaacaact	tataaataaa	12660
aagggtgttc	tgcggtggg	gtgggaggcg	ggccacgatg	ggtttcaagc	aggtatgatg	12720
gaagaaggct	ctacattctc	aagagaacag	ctggggagtg	acaggttgag	ttgaacgcaa	12780
cgcttctctt	cttgctcctt	ttattttcta	gttctcccga	gtcccttctt	gactacttgg	12840
cttacgcaac	aagtaccag	cgcgctcct	tcaccttcac	ttacgagagc	aatatctcta	12900
aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	ctcgac				12926

<210> 2

<211> 15539

<212> DNA

<213> Mortierella alpina

<400> 2

tccagggttc	cagggttcg	agaatataat	aaatctttga	aagagagaca	gaggaggcag	60
aggcaattca	tcttgggatc	gactgggatg	cgagagacag	aggcggttgt	ttatttaatg	120
tagtagtgca	gcacatcaat	gacctatagg	gcaatgatgg	tagtgggtgg	tgactagagg	180
cgccaggacg	acgcaagcat	agatgcagct	aatcgtgcag	tgtgcagcga	cagtgatggg	240
ctgccctgaa	tctgcacgca	aggacagcgg	tgctatgtcc	aaatcgagaa	ggcgggttcc	300

agagggacag	cgcgacagac	tgggtccaaat	gttgggggca	atctcgcagc	tggctgggtt	360
tgagacgaag	aagccgagag	tgaaaatttt	gttctatcgg	aggaatgggg	ggacggaggc	420
cgtgctaggg	ccttgtagga	agccaggctc	atcgtatggc	ctgccagggc	tggtgagaag	480
gagctcgctt	agaccccccc	acaatgttgg	atggggagtg	tgcaagagca	atcaaaaagta	540
ccaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	ataagatcct	gccctatcag	ctggataaga	tatccgcttg	600
ctgtaggtgt	cgtatgtgtt	gtggtgtatt	gcggatcaag	cttcaagggtg	ctgttggggtg	660
ttataattatt	ccttgcgctg	gaaccccttt	cgctttcttt	tcttctcttc	ttcttcccca	720
tcttccacct	ccatctccct	ccgcaatctt	ctttctctcc	tcagcctctt	catctcgaca	780
ctccgcatcc	tttgttcatt	actcattatt	gcatagaaca	acctgcaatc	tcctttgtat	840
tccttctgta	tctacctcgc	atctcctcct	gttctcttgc	attatcgtct	ttcacaccca	900
cctctatctc	tttctcgaaa	gcaagaacat	cctattgaaa	agttgcattc	aattgtcctt	960
tgttctcttt	gaaaaagtta	accgctgaaa	gccgatactt	catcctttat	atcatccaaa	1020
agaaaacata	tctaaaaaaa	ccagaacgcc	ttttcttaat	catgactacc	gcacagtcca	1080
acttgaccgg	tcctttggcc	ctcaagcaag	gaacttctga	ggtctcgatc	ctcgttcctt	1140
cggatgtctg	ggtagcggct	gaacaacttc	gtgaggagtt	tctgatctcg	gtcgaaggctg	1200
ctcctgcaga	ggaggccgca	gcgaccggaa	gtgctgacga	tcaggccccg	gagatggctt	1260
tggtagggccg	ttttctcaaa	tttgctacgg	acaagagcga	gcaggtaaaag	gaacatgcta	1320
cgcttcattc	ttgttttagca	tcgacattgg	cagtgggtggg	tgggtgggat	tgggggtttt	1380
tatatagttt	ttcttgcggtg	ctaggaacgc	agcggaaaaag	cagcagcctc	aatggcagga	1440
agtgcgctcag	agaaacagga	aagaccagat	gcgactcttt	tttttttttg	ttttttgtt	1500
cttggtgtgt	agggcaggag	gcgatctgga	gattgtggca	gaaaaggctg	ccctcagacc	1560
atgtaacacc	caacaaaaaa	aaagtgaaca	gaataaggaa	ggggagcgtg	tgttaccata	1620
ccttttgatt	tggacccttc	ttcttcaaga	gagagggatg	catgcacaca	tcagcctctc	1680
cgagggataa	caagggcggg	atctctcacc	tcatcgtcgt	tttccccct	ccttttccgc	1740
cttcaatgct	gacggagtgg	gaagtggagg	aggtggatat	cgttgagagc	ggggcggggt	1800
cagcgagacg	gtcaaagagc	ggatcgtaaa	aaaaaaaaaa	aaagcgtctg	ctagttcttt	1860
cccttgctct	tatttttggg	tcctttctct	tcaccacgac	caaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	1920
aaaaaaaaaa	aaaaattaaa	tttagcgttt	caatgaaagg	gtgagagagt	ggtggtacat	1980
ttggtttccc	acgatctgct	tgcagatgtg	caaccagacg	tgcaggccgc	cttcagggtt	2040
actgggcgtg	attctgtatg	gctttgacca	aagcagccgt	aaggcaagag	ctaacagcaa	2100
gtcgatgcac	cactttcttc	ttttcttttt	gtactataga	gcgatccttc	actgcagttc	2160
attcctgtgc	tgagaaccgt	cttcctgttc	tttgtcacca	aataacctta	aggaaacgac	2220
atccacgcgg	tcactcgact	tttagcaaa	gatacccggg	tggatgatcat	caatgcgttc	2280
ttctcggcct	tggctcttct	ccgtgctacg	gaggctcttg	cacccgagga	ctacaccccc	2340
ccaacctcgg	cactatttgc	cgctgctcag	gagggaaaag	ctaagctgtt	tgccatcttt	2400
ggcggtcagg	gcaatatcga	ggagtacttt	gacgagctgg	cagacateta	cacgacctat	2460
accacgttgg	tgcaggacta	cgctcaggac	atggctgcag	tgttgccgca	gcacgccaga	2520
tcggatgatg	cctcggctct	ccactccaag	ggactggatg	tcatgggggtg	ggtgaggagc	2580
ccagactcga	agccagatgt	tgcgtatctg	gtttcagcac	ccgtctctct	gcccttgatt	2640
ggacttgctc	tgactatgca	ttactatgtg	atgtccaagg	taagagcaac	tacaggtcaa	2700
tacaccaagt	tgagaatcat	caactccaca	gatgctgacc	ccattatatt	cattcaaaac	2760
tttaaacgcg	gtaacagggt	cttgaccaga	ctcccgccta	gcttcgcgat	gttattcttg	2820
gttcgacggg	acactcccag	ggcatcatct	cgtctgtggt	catctcatcc	tcggccacat	2880
tcgaggagtt	ctttgctaac	tctcgtaagg	cactgggact	tcttttctgg	atcggaaccc	2940
gtcctccagga	ggtctacct	caaaccaccc	tcaatcccgc	cattcttcaa	gactcgctct	3000
ctaacaatga	aggcaacct	actcctatgc	tggttgtcaa	ctctttgocg	gcactctgag	3060
tccagaagta	cgtcgaaggc	accaaccgcc	atgttgccaga	ggaccgcaag	atcaagatcg	3120
cgcttattaa	cggacccccg	tcacttatct	gcacgggacc	tcctcaatcg	ttgtacggcc	3180
tgaaccttgc	tcttcgcaag	ctcaaggctc	ccacgggcct	ggagcagggt	cgtgtaccct	3240
tttcgcagag	aaaggtcaag	ttctcgtccc	gtttcttgcc	catcactgca	cccttccact	3300
cttcgtatct	ggatggcgct	tctgccctgg	tcgagagcga	tattgctcgg	tacgacctga	3360
ggtttgacca	taccagatg	accatccccg	tcttctcaac	cgactctgga	aaggacattg	3420
caggatcgcc	tactattact	acggaccttg	tcaatcaaat	ttgttccctt	cccggtgcact	3480
gggagaaggc	gactgctatg	gcaggattga	cccatgtgat	cgatttcggc	cccggcggct	3540
cctcgggctg	cggctctttg	acggccccga	acaaggacgg	cacgggtgtc	caggtgatgc	3600
tggccggcgc	ttctgagggc	gtcaaccgcg	agctgtcgta	caaaccogac	atcttcgatg	3660
ccaaccagc	tgctctgcgc	tatgccccca	actgggcca	tgagttccag	caaagctgg	3720
ttcgctccgt	caacggcgag	atccacatcg	acactcgcat	gtcccgcctc	ctttccaagc	3780
ccccattgat	ggtcgcggga	atgaccccc	cgactgttaa	cgagggtttt	gtcagtgctg	3840
ttatgaatgc	cggttaccac	gttgagctgg	ccggtgggtg	acactataac	gaggccggcg	3900
tccgcagcaa	ggtcaagaag	atcatgcagc	tcaccactcc	tggagccggt	atcactctca	3960
acacctctt	catcaatgtg	cgccagtggg	gcttccaagc	tcocctgggtg	cccaagctcc	4020
gtcgcgaggg	cctccccatg	gagggctttt	gttgcgctgc	cgggtgttccc	tcgctcgagg	4080

tgcgagacga	gttcatcact	gacatgctca	gtgccggaat	cogtcacatc	tccttcaagc	4140
ctggctcggc	cgaggccatc	cgccaggtct	tggcgatcgc	caatgcccac	cctgagatgc	4200
ccatcgttct	tcagtggact	ggtggccgtg	ctgggtggcca	tcacagtttc	gaggatttcc	4260
atcagcccat	cctggagaca	tactctgcca	tcgctcgtca	ccctaacgtt	gtcctgggtg	4320
ccggctctgg	tttcgggtggc	gctgaggaca	cctaccctta	cctcacaggt	gactgggtctg	4380
tccagctcga	ctaccctccc	atgccttttg	atggtatgct	ttttggttca	cgcgatcatgg	4440
tggccaagga	gggaatggct	tcgcttggtg	tgaagcaggc	tattgtcgat	gcacccggag	4500
tcgaggactc	tgagtgggaa	aagacttaca	agggacccac	cggaggcgctc	atgactgtcc	4560
gttccgaatt	gggagagccc	attcataaaa	ttgcaaccoc	cggagtcaag	ctgtggaagg	4620
agatggacga	caccatcttt	gctctgcccc	aggacaagcg	tcccgtctgcc	ctcttgggcca	4680
agaaggacta	catcatcaag	cgtctgaacg	ctgacttcca	aaaggtaaat	aagtcgttgc	4740
cgttgactc	acgctcggct	ggtatactta	catgccgcgc	gcaaccagtt	attaaccagc	4800
tagcatgtga	ttatggtatt	aggtctggtt	cggtagaag	gccaacggca	gcgttgctga	4860
tcttcaggac	atgacttatg	aggaggtcat	caaccgcttg	attgagctca	tgtttatcaa	4920
gcatgaggag	cgctggattg	atcactctca	ccgcaacttg	ctcggcgaca	tccttcgccg	4980
gattgaggag	cgcttcgttg	gcgttgagaa	gaagtccatt	gtccaaacct	tctctcagct	5040
tgacatccct	tttgcgtttg	cccaggagtt	tgtcgacacc	tatccctga	ccaagaccca	5100
gctcttgact	accgaggatg	ttggatactt	cttgttcttg	atgaaccgtc	gtggacaaaa	5160
gcccgtggcca	ttcattcccc	tgctcgacaa	ggactttgag	gtgtggttta	agaaggactc	5220
tctctggcag	gccgaggact	tggccgctgt	gtttgatcag	gatgtgcagc	gcacctgcat	5280
tcttcaggga	cctgccgcgc	tccgctatgc	aaccaagggtg	gatgagcccc	tcaaggatat	5340
tttgacggc	atcttcacaa	gccacattgc	ctggttgaag	gagcgttatt	acaacaacaa	5400
cgatgccaac	attccccagg	tcgagtactt	tggcggaag	cccggacgct	tcgagtcggc	5460
cttgatgct	gtcttgccct	tggtaagggt	cgagacttac	gacaacggca	aggtcaagat	5520
ggtggagacc	tccatgctag	agtcaagctt	gccaagaat	gaggattggc	tcgagtacct	5580
tgctggccag	gacccctctt	ggttcgcgc	cctcttgact	gccccgcgc	tcattcaagg	5640
caagaagttc	ttggataatc	ctcttgacg	catcttccgt	cctcgtgtct	ctcaagccgt	5700
tcacttcgag	tacgccgagg	acaagttgca	aaccattacc	gtttacgatc	gtcgtcctct	5760
gtctgcttcc	agcaagtcga	gcgagctctc	tccctcgctt	cgcgcccgtc	tgacgcccac	5820
cgagctcatt	gaggtcgtgc	tgggtggagaa	gaacggcgag	cgtttgattc	ctttccctct	5880
cctcttccac	tacacccccg	agaagggata	tgccccctatc	catgaggtca	tggagggctc	5940
caacgagaga	atcaaggagt	tctactacaa	gctttggttc	ccttcagagg	aggatcaatt	6000
caacgcctgc	ctggccactg	atgccttcac	cgaaaagttt	atttgcaatg	gtgagcagg	6060
cagcacgcca	gagatcaagg	agttttgcca	ggctgtcgga	aaccaggccg	agctctacgt	6120
tgagcgccgc	cagaaagtgt	tctatgcgcc	catggatttt	gctattgtcg	ttggctggaa	6180
gtctatcatc	aaggccatct	tccccaaagtc	gattgacgggt	gatctgttga	agcttgtcca	6240
tctctcgaac	ggcttcgcta	tgtagatgg	cgccgagtc	ttgaagcaag	gcgacattgt	6300
tgacactggt	gccgagatca	atgccgttgc	caacaacgat	tccgggaagt	tggttcagg	6360
caaggcgctg	gttctcgctg	agggcaagcg	cgtcatggag	gtgacctcgg	agttcttgta	6420
ccgcggcacc	tttgtggatt	accagaacac	attccaaaag	acgggttgaga	ccccatgga	6480
ggttaagctg	acgtccgcca	aggatgtggc	tgtcttgaag	agcaaggagt	ggatccagt	6540
ggccgagggt	gagcacaccg	tcgggcctaa	tgcgtccttg	gtcttccgcc	tgaacacgat	6600
tgctcgcttc	aagaacaaga	ccaccttctc	gcatgttgag	accactggta	ccgtgtcgat	6660
gcagatttcc	actaaggagc	atgtcgagat	tgccactggt	cactatagca	acgacgagga	6720
gactcaggga	aatcccgtec	tcgcctactt	gaagcgctcg	ggttctccta	tcgagcaggc	6780
catccacttc	gagaacgggtg	gatattctgt	catgcccgag	ggttccctca	gctcggaggt	6840
catttctccc	ttcagcaatg	agccctatgc	taagggttctg	ggtgacttta	accctatcca	6900
cgtaaacctc	tactttgctg	atctcgctga	gctccctggc	actattaccc	atggcatgtg	6960
gactagtgcc	tcgacccgca	agtttgtgga	gatctttgct	gcagagaatc	atcctcagcg	7020
tgtcactagg	ttagttcggt	ttcttttccg	cattgcttga	gagtatgcac	tctagtattc	7080
tttccggcgt	agctaattct	tgattcttct	ctctagctac	gaggtcaagt	tcctttctat	7140
ggtgcttcc	caggaccgtc	tttcgaccaa	gttatcgac	attggaatga	tcaacggaaa	7200
gaagatcatc	aaagtggaaa	ctttcaacca	gaacggcagc	aaggtaaaac	cagaaacgtc	7260
ttgttagcat	ttcatgtgaa	aaatcgcgta	acctgttgga	atcatttatt	aacgttggca	7320
gcgattcatt	tggcacagg	tgttgagggc	actgctgaga	ttgatcagcc	cacgatcgcc	7380
tatgtgttca	ctggacagg	atctcaggag	cagggaatgg	gaatggctct	gtatgactct	7440
tccccgctcg	ccaaggacat	ctggcagaga	gccgaccgtc	atttcttgga	aaactatgg	7500
atgtaccttg	ccagcttttc	ttgttatgat	attcgttctc	tttcggttatg	ctgtaactga	7560
tcgattttgt	tccttttgac	aggcttctcc	attcttgata	ttgtccgcaa	caatcctctg	7620
aagaagacga	ttcacttttg	tggccccaa	gttaacgcca	ttcgtcagaa	ttacatgtcg	7680
atgcgctacg	atcaagttga	ccaggatggc	tccatcaaat	ctttgcctct	gttccccggc	7740
atcaacgaga	ccacgcactt	ttacaccttc	cagtcaccca	acgggtcttt	ggctgccact	7800
cagttcacac	agcctgcctt	gacccttatg	gagaaggccg	ccttcgagga	catgcgctcc	7860

aagggtttga	tccagggcaa	ctgtgccttt	gccggtcact	cgctcggaga	gtactctgct	7920
cttgctgcca	ttggtgaggt	ccttcccatc	gaatccttgg	ttgatgtcgt	cttctaccgt	7980
ggtatgacca	tgcaggtcgc	tgttccccgc	gactctgtcg	gccgctccaa	ctatggaatg	8040
gtcgccatca	acccatcgcg	tgtctcgccc	acattcaacg	actctgctct	ccgctatgtc	8100
gtggacgcaa	tcgccagaca	gtcgaacggt	cttttgghaa	ttgtcaatga	gaacgttgag	8160
aactggcagt	atggtgctgc	tggtgagctt	tctaacttgg	acgctctctc	gactgtcctg	8220
aactacctca	aggtgcagaa	gatcgatctt	cagaagctga	tgagagaccat	gcccttggha	8280
gaggtcaaga	agcacctgtc	tcagatcatt	gccggcgccc	ttgagaaggt	tgccgagaag	8340
gttgccaagg	atggtcacat	caagcctgag	cgcggtgttg	ctaccatccc	cttggctgga	8400
atcgatgtcc	ccttccactc	tagcttcttg	ttgtccggtg	tcgctccctt	ccgcacctat	8460
ctcgccaaga	agatcaaccc	tacgttcatt	aacgtgcccc	tggtgacttc	caagtacatt	8520
cccaatttga	ctgctcagcc	cttcagcatt	gagaagtcct	acattgaggg	cgtctacaac	8580
ctcacgtcgt	ctccccgtct	ggccaaggtc	ctcaagaact	ggatcgacac	caagctgact	8640
gccaagcagc	agcagcgtct	gggatatact	ctcttggtcg	agttgctcgc	ttaccagttc	8700
gcttcgcccc	tccgttggtg	tgagaccacg	gatagactct	tcaaggagta	caacgtcgtc	8760
cgcttgattg	aggttgagcc	ctcgcccacg	ctctgttgta	tgccccaacg	cacgctcaag	8820
ttcaagtaag	aggttatga	tgatgccttg	accttccagc	gttcgactct	ttgcacgtcc	8880
aaggactcca	aggagattta	ttatgccatg	gacaatgtcg	agtccctggc	tccgtctccg	8940
gctgccagtg	ctgctgctcc	cgcctccaaa	gccaccccag	ttgccgctgc	agcccccgct	9000
cccgtggctg	tcgcccgtgc	aggacctgct	gccgcccgtt	cagatgtccc	catcaaggcc	9060
cttgagatct	tcgatgtgat	cgttgcccaa	aaggtaacga	agactctcga	agaggtccct	9120
ctctgaaggg	ccatcaagga	tcttgtagga	ggcaagtcga	ctcttcagaa	cgaaatcttg	9180
ggtgatcttc	agaaggagtt	tggtagcagc	ggattccctg	agaaggcgga	ggaggctcct	9240
ctggaggagc	ttgccaacgc	tcttcagggc	aacttcaacg	gagctcttgg	aaagcagacc	9300
acttcgctca	tcgccaagat	gattggatcc	aagatgcccc	gtggttatcc	gctctcgact	9360
gccaagggat	acctggccaa	ggcccacggc	ctgggtcctg	tccgtgccga	tgctgcgctc	9420
ttggtcggtt	tgacgatgga	gcccgcagcc	cgtctgggcg	ccgttccctga	ggccaatgct	9480
tggttggtat	cggctcgctca	ggcttacgcc	cgccgtgctg	gtatctcgct	gtcggctggt	9540
gcccccgctg	gtggtgccgc	tcccgtcatg	atggcggtcg	ctggccctgc	tgctgctggt	9600
cctgcagctg	ctggtgctga	tgctcctatc	aaggctattg	acattcttca	cgtcattggt	9660
gccccaaaaga	tcaagaagac	tgctgaggag	gtcccactct	cgaaggccat	caaggatctt	9720
gttggtggca	agtcgactct	gcagaacgag	atcttgggtg	atcttcagaa	ggagtttggc	9780
agcagtggtt	tccctgagaa	gggcgaggag	gtcccttggg	aagatctcgg	aaatgctctc	9840
cagggttaact	ttggtggatc	cttgggcatg	cagacgacct	cgttgattgc	caagatgatg	9900
ggatccaaga	tgccagggtg	atttaccacg	tccctagcca	aggcttacct	cgcctcgtct	9960
tatggcttgg	gtccactccg	cgtgacggt	cggttgctct	tggtgtcac	tatgagccc	10020
agcgcccgcg	tcggatccga	gggtgatgcc	aaggcttggg	tggaactgt	cgccccagct	10080
taogctcgte	gtgcccgtat	tcccttggga	ggcgccggcg	gcggtgctgt	cgctggtggt	10140
gccgttggtg	gtgccatgat	gaacagttag	gagttcaacc	aattccaggc	caagcagaac	10200
gcgatgatgt	accagcacct	cgagatctat	gctcgttacc	ttgagaagga	tctccgtgct	10260
ggcgaaaagc	agtacgagga	ggagaagctg	gcgacctgc	gcttgaggc	agatatcgac	10320
cagtggtatg	ctgagcacgg	cgactactac	gccgagggca	tcaagcctgc	cttcagcgcc	10380
aagaaggccc	gcaagtacga	ctcacactgg	aactgggtcc	gtcaggatgc	catgtcgctc	10440
ttgtacgaca	tgatcttttg	ccgactcacc	gtcgttgacc	gcgaggctcg	ggcccagtg	10500
atccatgtca	tgaaccgcgc	taacccccag	ttgcttgagt	ttatgatcta	ccacattgac	10560
aacactgctg	ctgatcgcg	caagacctat	gctttggcca	aggagtttgg	taacatggtg	10620
atcgagaact	gtcgcgaggt	tctggaagcc	gcgcctgtct	acaaggatgg	tgagtctgct	10680
tttcttttca	cacctctct	cacatgtaac	gcttaagatt	atgatcagct	agctaatgac	10740
atcctccttt	tgtttggttg	tttttcta	agtcggtgtt	cctaccggtc	cccagacgac	10800
gatcgataac	aagggaata	tcttgtagga	ggaggttcag	cgcgtgggtg	tccgcaagct	10860
ggatcactat	gtcaaggata	tggtcgcttg	tggcaagatg	tccgagtaca	gcaaccgcca	10920
gaaggtgcag	aagaaccttg	ctcagatcta	caagatcatt	aaggctcaga	acacgatgaa	10980
gtcttctctc	aagttggcga	tcaagtcact	ctacggcgag	gtcatccatg	ccatgaacat	11040
gtccaacacc	atcatccgtg	aggagaagaa	ccgcgctgcc	agccgcgtcc	gccgcgctc	11100
ggcggttccc	agcgccgacc	gccctaagaa	ggaggccaag	aaggagacca	ttcccttctt	11160
gcacctcaag	aagaagaacc	cccagtctga	gagcggtatg	gagttcagtc	agcgtttgac	11220
aagcgtttac	ttggatgtct	tgaccaacat	tgcgcgcgac	ggtgttacat	ttgagaaccg	11280
catggtctct	atgaccggtg	ctggaagga	ctcgatcgga	gcctcgatcc	tcaagggtct	11340
cttgccggga	ggagccaagg	ttgttggtac	gacctcgcg	ttcagccgtg	atgtgaccga	11400
gtactacca	tcgatctacc	agcgccacgg	atccaagaac	tcagtcttgg	ttgttggtcc	11460
cttcaacgga	ggctccaagc	aggatgtcga	cgcacttgct	aactacattt	acgataagga	11520
tctcaagaag	ggtcttggt	gggatctcga	ctacatcctc	cccttcgctg	ccatctcggt	11580
ccagggaag	gagattgaca	acatcgactc	gcagtcgag	ctggctcacc	gtatcatggt	11640

gaccaacggt	ttgcgtctgc	tcggaaacgt	taaggccaag	aagatggagc	acggctacga	11700
cactcgccct	gctcaggtca	tcctgccctt	gtcgcccaac	cacggaacct	tcggagctga	11760
cggtctctat	ggtgagttca	aggttgctct	cgagaccttg	ttcaaccgct	ggagttccga	11820
gtcttggggc	gcctatctga	ccatcacccg	agccgttatt	ggctggactc	gcgggtactg	11880
attgatgagc	ggtaacaaca	ttgtggccga	gggcctggag	aagtaagggt	tcgcacacct	11940
ctctggccag	gagatggcat	tcaacattct	cggtctcatg	catccctcga	taccaaacct	12000
ctgccagggt	gagcctgtct	gggccgactt	gaacgggtgt	cttcagtact	tgcccaacct	12060
gaacgaaatc	tcggccaact	tgcgtgccga	ataccgccag	acggccgaga	tcgcgaaggc	12120
gatcgtcacc	gagaacactc	tggatttcaa	ggagaccac	ggtgctgagg	ccgagcgtaa	12180
gcaccaaccc	cacaagggtc	cgcctcgtgc	caacatgaaa	ttccctttcc	ctgagctgaa	12240
ggactacaag	gacctgtcgc	acgctcacaa	gctccgcggc	atgctcgatc	ttgagaaggt	12300
tgtcgctcgt	actggtttct	ctgaggtcgg	accttggggg	aactcgcgca	ctcgctggga	12360
aatggagggt	aatggccaagt	tctcactcga	gggatgcatt	gagatggcct	ggatcatggg	12420
cttcatcaaa	catcacaatg	gtaacctcaa	gtctggctcc	ccttactctg	gctgggtcga	12480
tgccaagact	gaagagcccg	tcaaggatcg	cgatgtgaaa	gccaagtacg	agaagcagat	12540
cttgaggcac	actggtatcc	gtctgattga	gcccagagctc	tttgagggtt	atgatcccaa	12600
gcgtaaggga	ctgcttcagg	aggtcttgat	cgacctgat	cttgaggcct	ttgaggtctc	12660
gaaggaggag	gcccagatgt	tcaagcttga	gcacggcgac	aaggctcgaca	tttacgagga	12720
ggagtctggt	cagtgggccg	tcaagttcaa	gaagggcgct	aacatgtata	ttcccaaggc	12780
cctgaagttc	gatcgctctt	ttgctggcca	gatccccact	ggatgggatg	ctgcccgcct	12840
tggagtaccc	aaggacatca	ttgaccagggt	cgatactatt	accctttatg	cttggtcttc	12900
gaccgtggag	gccttgggtg	cctcgggtat	cactgactct	tatgagttct	accagtacgt	12960
tcacgtgtct	gaggttgga	atacagctgg	atccgggtgc	ggaggcatgc	tctcgcttcg	13020
cggcattgtac	cgcggtcgcg	tgatggatga	tcctgtgcag	aaggatatct	tgccaggagtc	13080
cttcatcaac	acgatgcctg	cctgggtcaa	catgctgctc	ctgtcactct	ctggacctat	13140
caagacaccc	gtcggagcct	gtgccaccgc	tgtcagagtc	gtcgagattg	gtgtggatac	13200
gatccagagc	ggtaaggcaa	agatttgtat	tgtcggaggc	tacgatgact	tcaggaggga	13260
aggttcgtac	gagtttgcca	acatgaaggc	gaccagcaac	accgaggaag	agtttgcgca	13320
tggacgtacg	cccaaggaga	tgtcccgcgc	tgcaacctcg	accgcctctg	gattcatgga	13380
gtctcacgga	gctgggtatt	agattttgat	gcaggccaag	cttgccgtgg	agatgggtgt	13440
gccattttac	ggtatcgctg	gtctcaccaa	cactgccacc	gacaaggagg	gtcgctctgt	13500
tcagctcct	ggacagggtg	tcctcaccac	tgtcgtgag	gctaagggca	agatgccttc	13560
gcgccttctg	gacatcaagt	accgcaagcg	ccgatcgat	tcccgccgag	ctcagattaa	13620
gcaatgggtc	gagaacgagt	atgctgagct	ccgctacgag	ctcgatgagc	tcaaggccag	13680
caacagcctc	accgtctcgg	aagaagagta	tcttgctgct	gagactgagc	gcattcagaa	13740
ggaagccaag	cgtcagcacc	gcgaggccct	taacctgtgg	ggcaatgagt	tctacagaca	13800
ggaccctcag	atcgctcctc	tgcgtgggtg	ccttgccctc	tttggttga	cgatcgatga	13860
cattggtggt	ggatccttcc	acggtacctc	caccaaggcc	aacgacaaga	acgaatccga	13920
agtcgtcaac	aagcagctcg	agcatttggt	tcgcagcaag	ggtaacgctt	tgccctctat	13980
ctggcaaaa	tacctcacgg	gacatcccaa	gggtgctgct	gctgcctgga	tgatgaacgg	14040
tgtcctgcaa	gtcctccaga	cgggtctcat	tcccggaaac	cgtaacgccg	acaacattga	14100
cgacacaatg	agacagtatg	agcacgtctt	gtacacctcg	cggtcgattc	agactgattg	14160
tgtcaaggcc	ggtctgtcca	aatcgttcgg	tttcggccag	gtcggagggtg	aagttctcct	14220
gattccactg	gattacattc	ttggtgcatt	ggaggagcac	gagtagcagg	cttacaagggt	14280
caagcagcag	gcgcgccagg	ccaagtcgta	ccggtacttg	catgactcta	tgaccggcgg	14340
ccctgccctg	gtccagggtca	agaacgctcc	cccatactcg	cccagagctcg	agtcccccg	14400
gtacttgaac	cccaaggccc	gtgcgcagta	caacaacgcg	accaagtcct	gggcgttcaa	14460
cgctaagcac	ctggtaccgg	agtctgacaa	gattgatgtg	gacatgacgc	gtgcgattct	14520
ggagacgtcc	gctcaagagt	cattaggtgt	gacgtcctcg	tcttcgcgcg	gtgtgggtgt	14580
ggatgtggaa	atggtctctg	cgatcaacat	tgagaacgac	acgttcttgg	agcgtaactt	14640
taccagcag	gagattgact	actgtctgag	ccgaccggat	cctcaggcta	gctttgctgg	14700
tcggtgggtc	gccaaggagg	ccgtgggtta	ggccgtttcg	tcgttctcgc	tcgactctga	14760
gaagggtgtg	acacagggtg	caggagcggg	actgagttag	attgagattg	tgatggcaga	14820
gagcggcgca	ccctcgggtg	tgttctcggg	tgcggcccag	gaggcggcgg	ccaaggccgg	14880
cgtcaaggag	atcaagggtc	cgatcagcca	ttctggcgcg	tacgcgggtg	cggttgcaaa	14940
tgcgttgtaa	aaacctcccc	tctccttcaa	gtgttcttgt	tctttcattt	tttctttcgt	15000
tcttttaatt	gcgcttgctt	gtgctttctt	cagtagaggt	ctcttttttc	tttcttcatt	15060
ctatttcttt	acttcttata	ccttttctat	ggcccttgta	tacaaacaac	ttataaataa	15120
aaagggtggt	ctgcgggtgg	ggtgggaggc	gggccacgat	gggtttcaag	caggatgat	15180
ggaagaaggc	tctacattct	caagagaaca	gctggggagt	gacagggtga	ggtgaacgca	15240
acgcttctct	tcttgccctc	tttattttct	agttctcccg	agtccttctc	tgactacttg	15300
gcttacgcaa	caagtaccca	gcgcgcctcc	ttcaccttca	cttacgagag	caatatctct	15360
aaaaaaaaat	aatgcttcta	ttgtacttca	aaatgcagtg	cgatgattat	gatgcttttg	15420

tggatgctcc gactatctac atccccaggg gtaggggttt catccctctc gatgcccttc 15480
 cttctcgttc agccgtgcgt tggctctga gcctcactgt ccagcgttcc tcgccgata 15539

<210> 3
 <211> 4162
 <212> PRT
 <213> *Mortierella alpina*

<400> 3

Met	Thr	Thr	Ala	Gln	Ser	Asn	Leu	Thr	Arg	Pro	Leu	Ala	Leu	Lys	Gln	1	5	10	15
Gly	Thr	Ser	Glu	Val	Ser	Ile	Leu	Val	Pro	Ser	Asp	Val	Trp	Val	Ala	20	25	30	
Ala	Glu	Gln	Leu	Arg	Glu	Glu	Phe	Leu	Ile	Ser	Val	Glu	Ala	Ala	Pro	35	40	45	
Ala	Glu	Glu	Ala	Ala	Ala	Thr	Gly	Ser	Ala	Asp	Asp	Gln	Ala	Pro	Glu	50	55	60	
Met	Ala	Leu	Val	Ala	Arg	Phe	Leu	Lys	Phe	Ala	Thr	Asp	Lys	Ser	Glu	65	70	75	80
Gln	Ser	Asp	Pro	Ser	Leu	Gln	Phe	Ile	Pro	Val	Leu	Arg	Thr	Val	Phe	85	90	95	
Leu	Phe	Phe	Val	Thr	Lys	Tyr	Leu	Lys	Gly	Asn	Asp	Ile	His	Ala	Val	100	105	110	
Thr	Arg	Leu	Leu	Ala	Lys	Asp	Thr	Arg	Val	Val	Ile	Ile	Asn	Ala	Phe	115	120	125	
Phe	Ser	Ala	Leu	Val	Phe	Leu	Arg	Ala	Thr	Glu	Ala	Leu	Ala	Pro	Glu	130	135	140	
Asp	Tyr	Thr	Pro	Pro	Thr	Ser	Ala	Leu	Phe	Ala	Ala	Ala	Gln	Glu	Gly	145	150	155	160
Lys	Ala	Lys	Leu	Phe	Ala	Ile	Phe	Gly	Gly	Gln	Gly	Asn	Ile	Glu	Glu	165	170	175	
Tyr	Phe	Asp	Glu	Leu	Ala	Asp	Ile	Tyr	Thr	Thr	Tyr	Thr	Thr	Leu	Val	180	185	190	
Gln	Asp	Tyr	Val	Glu	Asp	Met	Ala	Ala	Val	Leu	Arg	Glu	His	Ala	Arg	195	200	205	
Ser	Asp	Asp	Ala	Ser	Val	Phe	His	Ser	Lys	Gly	Leu	Asp	Val	Met	Gly	210	215	220	
Trp	Leu	Arg	Ser	Pro	Asp	Ser	Lys	Pro	Asp	Val	Ala	Tyr	Leu	Val	Ser	225	230	235	240
Ala	Pro	Val	Ser	Leu	Pro	Leu	Ile	Gly	Leu	Val	Gln	Leu	Met	His	Tyr	245	250	255	
Tyr	Val	Met	Leu	Lys	Val	Leu	Asp	Gln	Thr	Pro	Ala	Gln	Leu	Arg	Asp	260	265	270	
Val	Ile	Leu	Gly	Ser	Thr	Gly	His	Ser	Gln	Gly	Ile	Ile	Ser	Ser	Val	275	280	285	
Val	Ile	Ser	Ser	Ser	Ala	Thr	Phe	Glu	Glu	Phe	Phe	Ala	Asn	Ser	Arg	290	295	300	
Lys	Ala	Leu	Gly	Leu	Leu	Phe	Trp	Ile	Gly	Thr	Arg	Ser	Gln	Glu	Val	305	310	315	320
Tyr	Pro	Gln	Thr	Thr	Leu	Asn	Pro	Ala	Ile	Leu	Gln	Asp	Ser	Leu	Ser	325	330	335	
Asn	Asn	Glu	Gly	Asn	Pro	Thr	Pro	Met	Leu	Val	Val	Asn	Ser	Leu	Arg	340	345	350	
Ala	Ser	Glu	Val	Gln	Lys	Tyr	Val	Glu	Ala	Thr	Asn	Arg	His	Leu	Pro	355	360	365	
Glu	Asp	Arg	Lys	Ile	Lys	Ile	Ala	Leu	Ile	Asn	Gly	Pro	Arg	Ser	Ser	370	375	380	
Ile	Cys	Thr	Gly	Pro	Pro	Gln	Ser	Leu	Tyr	Gly	Leu	Asn	Leu	Ala	Leu	385	390	395	400
Arg	Lys	Leu	Lys	Ala	Pro	Thr	Gly	Leu	Glu	Gln	Gly	Arg	Val	Pro	Phe	405	410	415	
Ser	Gln	Arg	Lys	Val	Lys	Phe	Ser	Ser	Arg	Phe	Leu	Pro	Ile	Thr	Ala				

			420						425						430			
Pro	Phe	His	Ser	Ser	Tyr	Leu	Asp	Gly	Val	Ser	Ala	Leu	Val	Glu	Ser			
		435					440					445						
Asp	Ile	Ala	Arg	Tyr	Asp	Leu	Arg	Phe	Asp	His	Thr	Gln	Met	Thr	Ile			
	450					455				460								
Pro	Val	Phe	Ser	Thr	Asp	Ser	Gly	Lys	Asp	Ile	Ala	Gly	Ser	Pro	Thr			
465					470					475					480			
Ile	Thr	Thr	Asp	Leu	Val	Asn	Gln	Ile	Cys	Ser	Leu	Pro	Val	His	Trp			
				485					490					495				
Glu	Lys	Ala	Thr	Ala	Met	Ala	Gly	Leu	Thr	His	Val	Ile	Asp	Phe	Gly			
				500				505					510					
Pro	Gly	Gly	Ser	Ser	Gly	Val	Gly	Ser	Leu	Thr	Ala	Arg	Asn	Lys	Asp			
		515					520					525						
Gly	Thr	Gly	Val	Gln	Val	Met	Leu	Ala	Gly	Ala	Ser	Glu	Gly	Val	Asn			
	530					535					540							
Arg	Glu	Leu	Ser	Tyr	Lys	Pro	Asp	Ile	Phe	Asp	Ala	Asn	Pro	Ala	Ala			
545					550					555					560			
Leu	Arg	Tyr	Ala	Pro	Asn	Trp	Ala	Asn	Glu	Phe	Gln	Pro	Lys	Leu	Val			
				565					570					575				
Arg	Ser	Val	Asn	Gly	Glu	Ile	His	Ile	Asp	Thr	Arg	Met	Ser	Arg	Leu			
				580				585					590					
Leu	Ser	Lys	Pro	Pro	Leu	Met	Val	Ala	Gly	Met	Thr	Pro	Ser	Thr	Val			
		595					600					605						
Asn	Glu	Gly	Phe	Val	Ser	Ala	Val	Met	Asn	Ala	Gly	Tyr	His	Val	Glu			
	610					615					620							
Leu	Ala	Gly	Gly	Gly	His	Tyr	Asn	Glu	Ala	Ala	Val	Arg	Ser	Lys	Val			
625					630					635					640			
Lys	Lys	Ile	Met	Gln	Leu	Thr	Thr	Pro	Gly	Ala	Gly	Ile	Thr	Leu	Asn			
				645					650					655				
Thr	Leu	Phe	Ile	Asn	Val	Arg	Gln	Trp	Gly	Phe	Gln	Ala	Pro	Leu	Val			
				660				665					670					
Pro	Lys	Leu	Arg	Arg	Glu	Gly	Leu	Pro	Met	Glu	Gly	Phe	Cys	Cys	Ala			
		675					680					685						
Ala	Gly	Val	Pro	Ser	Leu	Glu	Val	Ala	Asp	Glu	Phe	Ile	Thr	Asp	Met			
	690					695					700							
Leu	Ser	Ala	Gly	Ile	Arg	His	Ile	Ser	Phe	Lys	Pro	Gly	Ser	Ala	Glu			
705					710					715					720			
Ala	Ile	Arg	Gln	Val	Leu	Ala	Ile	Ala	Asn	Ala	His	Pro	Glu	Met	Pro			
				725					730					735				
Ile	Val	Leu	Gln	Trp	Thr	Gly	Gly	Arg	Ala	Gly	Gly	His	His	Ser	Phe			
				740				745					750					
Glu	Asp	Phe	His	Gln	Pro	Ile	Leu	Glu	Thr	Tyr	Ser	Ala	Ile	Arg	Arg			
		755					760											

Tyr Glu Glu Val Ile Asn Arg Leu Ile Glu Leu Met Phe Ile Lys His
 930 935 940
 Glu Glu Arg Trp Ile Asp His Ser His Arg Asn Leu Leu Gly Asp Ile
 945 950 955 960
 Leu Arg Arg Ile Glu Glu Arg Phe Val Gly Val Glu Lys Lys Ser Ile
 965 970 975
 Val Gln Thr Phe Ser Gln Leu Asp Ile Pro Phe Ala Phe Ala Gln Glu
 980 985 990
 Phe Val Asp Thr Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gln Leu Leu Thr Thr Glu
 995 1000 1005
 Asp Val Gly Tyr Phe Leu Phe Leu Met Asn Arg Arg Gly Gln Lys
 1010 1015 1020
 Pro Val Pro Phe Ile Pro Val Leu Asp Lys Asp Phe Glu Val Trp
 1025 1030 1035
 Phe Lys Lys Asp Ser Leu Trp Gln Ala Glu Asp Leu Ala Ala Val
 1040 1045 1050
 Val Asp Gln Asp Val Gln Arg Thr Cys Ile Leu Gln Gly Pro Ala
 1055 1060 1065
 Ala Val Arg Tyr Ala Thr Lys Val Asp Glu Pro Val Lys Asp Ile
 1070 1075 1080
 Leu Asp Gly Ile Phe His Ser His Ile Ala Trp Leu Lys Glu Arg
 1085 1090 1095
 Tyr Tyr Asn Asn Asn Asp Ala Asn Ile Pro Gln Val Glu Tyr Phe
 1100 1105 1110
 Gly Gly Lys Pro Gly Arg Phe Glu Ser Ala Leu Asp Ala Val Leu
 1115 1120 1125
 Pro Leu Val Lys Val Glu Thr Tyr Asp Asn Gly Lys Val Lys Met
 1130 1135 1140
 Val Glu Thr Ser Met Leu Glu Ser Ser Leu Pro Lys Asn Glu Asp
 1145 1150 1155
 Trp Leu Glu Tyr Leu Ala Gly Gln Asp Pro Ser Trp Phe Arg Ala
 1160 1165 1170
 Leu Leu Thr Ala Pro Ala Val Ile Gln Gly Lys Lys Phe Leu Asp
 1175 1180 1185
 Asn Pro Leu Ala Arg Ile Phe Arg Pro Arg Val Ser Gln Ala Val
 1190 1195 1200
 His Phe Glu Tyr Ala Glu Asp Lys Leu Gln Thr Ile Thr Val Tyr
 1205 1210 1215
 Asp Arg Arg Ser Trp Ser Ala Ser Ser Lys Ser Ser Glu Leu Ser
 1220 1225 1230
 Pro Ser Leu Arg Ala Arg Leu Gln Pro Asn Glu Leu Ile Glu Val
 1235 1240 1245
 Val Leu Val Glu Lys Asn Gly Glu Arg Leu Ile Pro Phe Pro Leu
 1250 1255 1260
 Leu Phe His Tyr Thr Pro Glu Lys Gly Tyr Ala Pro Ile His Glu
 1265 1270 1275
 Val Met Glu Gly Arg Asn Glu Arg Ile Lys Glu Phe Tyr Tyr Lys
 1280 1285 1290
 Leu Trp Phe Pro Ser Glu Glu Asp Gln Phe Asn Ala Cys Leu Ala
 1295 1300 1305
 Thr Asp Ala Phe Thr Glu Lys Phe Ile Cys Asn Gly Glu Gln Val
 1310 1315 1320
 Ser Thr Pro Glu Ile Lys Glu Phe Cys Gln Ala Val Gly Asn Gln
 1325 1330 1335
 Ala Glu Leu Tyr Val Glu Arg Arg Gln Lys Val Val Tyr Ala Pro
 1340 1345 1350
 Met Asp Phe Ala Ile Val Val Gly Trp Lys Ser Ile Ile Lys Ala
 1355 1360 1365
 Ile Phe Pro Lys Ser Ile Asp Gly Asp Leu Leu Lys Leu Val His
 1370 1375 1380
 Leu Ser Asn Gly Phe Arg Met Leu Asp Gly Ala Glu Ser Leu Lys
 1385 1390 1395
 Gln Gly Asp Ile Val Asp Thr Val Ala Glu Ile Asn Ala Val Val

1400	Asn	Asn	Asp	Ser	Gly	Lys	1405	Leu	Val	Gln	Val	Lys	1410	Gly	Val	Val	Leu
1415	Arg	Glu	Gly	Lys	Arg	Val	1420	Met	Glu	Val	Thr	Ser	1425	Glu	Phe	Leu	Tyr
1430	Arg	Gly	Thr	Phe	Val	Asp	1435	Tyr	Gln	Asn	Thr	Phe	1440	Gln	Lys	Thr	Val
1445	Glu	Thr	Pro	Met	Glu	Val	1450	Lys	Leu	Thr	Ser	Ala	1455	Lys	Asp	Val	Ala
1460	Val	Leu	Lys	Ser	Lys	Glu	1465	Trp	Ile	Gln	Trp	Ala	1470	Glu	Gly	Glu	His
1475	Thr	Val	Gly	Pro	Asn	Ala	1480	Ser	Leu	Val	Phe	Arg	1485	Leu	Asn	Thr	Ile
1490	Val	Arg	Phe	Lys	Asn	Lys	1495	Thr	Thr	Phe	Ser	His	1500	Val	Glu	Thr	Thr
1505	Gly	Thr	Val	Ser	Met	Gln	1510	Ile	Ser	Thr	Lys	Glu	1515	His	Val	Glu	Ile
1520	Ala	Thr	Val	His	Tyr	Ser	1525	Asn	Asp	Glu	Glu	Thr	1530	Gln	Gly	Asn	Pro
1535	Val	Leu	Ala	Tyr	Leu	Lys	1540	Arg	Ser	Gly	Ser	Pro	1545	Ile	Glu	Gln	Ala
1550	Ile	His	Phe	Glu	Asn	Gly	1555	Gly	Tyr	Ser	Val	Met	1560	Pro	Glu	Gly	Ser
1565	Phe	Ser	Ser	Glu	Val	Ile	1570	Ser	Pro	Phe	Ser	Asn	1575	Glu	Pro	Tyr	Ala
1580	Lys	Val	Ser	Gly	Asp	Phe	1585	Asn	Pro	Ile	His	Val	1590	Asn	Pro	Tyr	Phe
1595	Ala	Asp	Leu	Ala	Glu	Leu	1600	Pro	Gly	Thr	Ile	Thr	1605	His	Gly	Met	Trp
1610	Thr	Ser	Ala	Ser	Thr	Arg	1615	Lys	Phe	Val	Glu	Ile	1620	Phe	Ala	Ala	Glu
1625	Asn	His	Pro	Gln	Arg	Val	1630	Thr	Ser	Tyr	Glu	Val	1635	Lys	Phe	Leu	Ser
1640	Met	Val	Leu	Pro	Gln	Asp	1645	Arg	Leu	Ser	Thr	Lys	1650	Leu	Ser	His	Ile
1655	Gly	Met	Ile	Asn	Gly	Lys	1660	Lys	Ile	Ile	Lys	Val	1665	Glu	Thr	Phe	Asn
1670	Gln	Asn	Gly	Ser	Lys	Val	1675	Val	Glu	Gly	Thr	Ala	1680	Glu	Ile	Asp	Gln
1685	Pro	Thr	Ile	Ala	Tyr	Val	1690	Phe	Thr	Gly	Gln	Gly	1695	Ser	Gln	Glu	Gln
1700	Gly	Met	Gly	Met	Ala	Leu	1705	Tyr	Asp	Ser	Ser	Pro	1710	Val	Ala	Lys	Asp
1715	Ile	Trp	Gln	Arg	Ala	Asp	1720	Arg	His	Phe	Leu	Glu	1725	Asn	Tyr	Gly	Phe
1730	Ser	Ile	Leu	Asp	Ile	Val	1735	Arg	Asn	Asn	Pro	Leu	1740	Lys	Lys	Thr	Ile
1745	His	Phe	Gly	Gly	Pro	Lys	1750	Gly	Asn	Ala	Ile	Arg	1755	Gln	Asn	Tyr	Met
1760	Ser	Met	Arg	Tyr	Asp	Gln	1765	Val	Asp	Gln	Asp	Gly	1770	Ser	Ile	Lys	Ser
1775	Leu	Pro	Leu	Phe	Pro	Gly	1780	Ile	Asn	Glu	Thr	Thr	1785	His	Phe	Tyr	Thr
1790	Phe	Gln	Ser	Pro	Asn	Gly	1795	Leu	Leu	Ala	Ala	Thr	1800	Gln	Phe	Thr	Gln
1805	Pro	Ala	Leu	Thr	Leu	Met	1810	Glu	Lys	Ala	Ala	Phe	1815	Glu	Asp	Met	Arg
1820	Ser	Lys	Gly	Leu	Ile	Gln	1825	Gly	Asn	Cys	Ala	Phe	1830	Ala	Gly	His	Ser
1835	Leu	Gly	Glu	Tyr	Ser	Ala	1840	Leu	Ala	Ala	Ile	Gly	1845	Glu	Val	Leu	Pro
1850	Ile	Glu	Ser	Leu	Val	Asp	1855	Val	Val	Phe	Tyr	Arg	1860	Gly	Met	Thr	Met
1865							1870						1875				

Gln	Val	Ala	Val	Pro	Arg	Asp	Ser	Val	Gly	Arg	Ser	Asn	Tyr	Gly
	1880					1885					1890			
Met	Val	Ala	Ile	Asn	Pro	Ser	Arg	Val	Ser	Pro	Thr	Phe	Asn	Asp
	1895					1900					1905			
Ser	Ala	Leu	Arg	Tyr	Val	Val	Asp	Ala	Ile	Ala	Arg	Gln	Ser	Asn
	1910					1915					1920			
Gly	Leu	Leu	Glu	Ile	Val	Asn	Glu	Asn	Val	Glu	Asn	Trp	Gln	Tyr
	1925					1930					1935			
Val	Ala	Ala	Gly	Glu	Leu	Ser	Asn	Leu	Asp	Ala	Leu	Ser	Thr	Val
	1940					1945					1950			
Leu	Asn	Tyr	Leu	Lys	Val	Gln	Lys	Ile	Asp	Leu	Gln	Lys	Leu	Met
	1955					1960					1965			
Glu	Thr	Met	Pro	Leu	Glu	Glu	Val	Lys	Lys	His	Leu	Ser	Gln	Ile
	1970					1975					1980			
Ile	Ala	Gly	Ala	Leu	Glu	Lys	Val	Ala	Glu	Lys	Val	Ala	Lys	Asp
	1985					1990					1995			
Gly	His	Ile	Lys	Pro	Glu	Arg	Gly	Val	Ala	Thr	Ile	Pro	Leu	Ala
	2000					2005					2010			
Gly	Ile	Asp	Val	Pro	Phe	His	Ser	Ser	Phe	Leu	Leu	Ser	Gly	Val
	2015					2020					2025			
Ala	Pro	Phe	Arg	Thr	Tyr	Leu	Ala	Lys	Lys	Ile	Asn	Pro	Thr	Phe
	2030					2035					2040			
Ile	Asn	Val	Pro	Leu	Leu	Thr	Ser	Lys	Tyr	Ile	Pro	Asn	Leu	Thr
	2045					2050					2055			
Ala	Gln	Pro	Phe	Ser	Ile	Glu	Lys	Ser	Tyr	Ile	Glu	Gly	Val	Tyr
	2060					2065					2070			
Asn	Leu	Thr	Ser	Ser	Pro	Arg	Leu	Ala	Lys	Val	Leu	Lys	Asn	Trp
	2075					2080					2085			
Ile	Asp	Thr	Lys	Leu	Thr	Ala	Lys	Gln	Gln	Gln	Arg	Leu	Gly	Tyr
	2090					2095					2100			
Thr	Leu	Leu	Val	Glu	Leu	Leu	Ala	Tyr	Gln	Phe	Ala	Ser	Pro	Val
	2105					2110					2115			
Arg	Trp	Ile	Glu	Thr	Gln	Asp	Arg	Leu	Phe	Lys	Glu	Tyr	Asn	Val
	2120					2125					2130			
Val	Arg	Leu	Ile	Glu	Val	Gly	Pro	Ser	Pro	Thr	Leu	Cys	Gly	Met
	2135					2140					2145			
Ala	Gln	Arg	Thr	Leu	Lys	Phe	Lys	Tyr	Glu	Ala	Tyr	Asp	Asp	Ala
	2150					2155					2160			
Leu	Thr	Phe	Gln	Arg	Ser	Thr	Leu	Cys	Thr	Ser	Lys	Asp	Ser	Lys
	2165					2170					2175			
Glu	Ile	Tyr	Tyr	Ala	Met	Asp	Asn	Val	Glu	Ser	Ser	Ala	Pro	Ala
	2180					2185					2190			
Pro	Ala	Ala	Ser	Ala	Ala	Ala	Pro	Ala	Pro	Lys	Ala	Thr	Pro	Val
	2195					2200					2205			
Ala	Ala	Ala	Ala	Pro	Ala	Pro	Val	Ala	Val	Ala	Ala	Ala	Gly	Pro
	2210					2215					2220			
Al														

2345	Thr Met Glu Pro Ala Ala	2350	Arg Leu Gly Ala Val	2355	Pro Glu Ala Asn
2360	Ala Trp Leu Asp Ser Val	2365	Ala Gln Ala Tyr Ala	2370	Arg Arg Ala Gly
2375	Ile Ser Leu Ser Ala Gly	2380	Ala Pro Ala Gly Gly	2385	Ala Ala Pro Val
2390	Met Met Ala Ala Ala Gly	2395	Pro Ala Ala Ala Gly	2400	Pro Ala Ala Ala
2405	Val Ala Asp Ala Pro Ile	2410	Lys Ala Ile Asp Ile	2415	Leu His Val Ile
2420	Val Ala Gln Lys Ile Lys	2425	Lys Thr Val Glu Glu	2430	Val Pro Leu Ser
2435	Lys Ala Ile Lys Asp Leu	2440	Val Gly Gly Lys Ser	2445	Thr Leu Gln Asn
2450	Glu Ile Leu Gly Asp Leu	2455	Gln Lys Glu Phe Gly	2460	Ser Ser Gly Phe
2465	Pro Glu Lys Gly Glu Glu	2470	Ala Pro Leu Glu Asp	2475	Leu Gly Asn Ala
2480	Leu Gln Gly Asn Phe Gly	2485	Gly Ser Leu Gly Met	2490	Gln Thr Thr Ser
2495	Leu Ile Ala Lys Met Met	2500	Gly Ser Lys Met Pro	2505	Gly Gly Phe Thr
2510	Gln Ser Ser Ala Lys Ala	2515	Tyr Leu Ala Ser Ser	2520	Tyr Gly Leu Gly
2525	Pro Leu Arg Ala Asp Gly	2530	Ala Leu Leu Leu Gly	2535	Val Thr Met Glu
2540	Pro Ser Ala Arg Leu Gly	2545	Ser Glu Gly Asp Ala	2550	Lys Ala Trp Leu
2555	Asp Thr Val Ala Gln Ala	2560	Tyr Ala Arg Arg Ala	2565	Gly Ile Ser Leu
2570	Gly Gly Gly Gly Gly Gly	2575	Ala Val Ala Gly Gly	2580	Ala Val Gly Gly
2585	Ala Met Met Asn Ser Glu	2590	Glu Phe Asn Gln Phe	2595	Gln Ala Lys Gln
2600	Asn Ala Met Met Tyr Gln	2605	His Leu Glu Ile Tyr	2610	Ala Arg Tyr Leu
2615	Glu Lys Asp Leu Arg Ala	2620	Gly Glu Lys Gln Tyr	2625	Glu Glu Glu Lys
2630	Leu Ala Thr Leu Arg Leu	2635	Gln Ala Asp Ile Asp	2640	Gln Trp Met Ala
2645	Glu His Gly Asp Tyr Tyr	2650	Ala Glu Gly Ile Lys	2655	Pro Ala Phe Ser
2660	Ala Lys Lys Ala Arg Lys	2665	Tyr Asp Ser His Trp	2670	Asn Trp Val Arg
2675	Gln Asp Ala Met Ser Leu	2680	Leu Tyr Asp Met Ile	2685	Phe Gly Arg Leu
2690	Thr Val Val Asp Arg Glu	2695	Val Val Ala Gln Cys	2700	Ile His Val Met
2705	Asn Arg Ala Asn Pro Gln	2710	Leu Leu Glu Phe Met	2715	Ile Tyr His Ile
2720	Asp Asn Thr Ala Ala Asp	2725	Arg Gly Lys Thr Tyr	2730	Ala Leu Ala Lys
2735	Glu Phe Gly Asn Met Leu	2740	Ile Glu Asn Cys Arg	2745	Glu Val Leu Glu
2750	Ala Ala Pro Val Tyr Lys	2755	Asp Val Gly Val Pro	2760	Thr Gly Pro Gln
2765	Thr Thr Ile Asp Asn Lys	2770	Gly Asn Ile Leu Tyr	2775	Glu Glu Val Gln
2780	Arg Val Gly Val Arg Lys	2785	Leu Asp His Tyr Val	2790	Lys Asp Met Val
2795	Ala Gly Gly Lys Met Ser	2800	Glu Tyr Ser Asn Arg	2805	Gln Lys Val Gln
2810		2815		2820	

Lys	Asn	Leu	Ala	Gln	Ile	Tyr	Lys	Ile	Ile	Lys	Ala	Gln	Asn	Thr
	2825					2830					2835			
Met	Lys	Ser	Ser	Ser	Lys	Leu	Ala	Ile	Lys	Ser	Leu	Tyr	Gly	Glu
	2840					2845					2850			
Val	Ile	His	Ala	Met	Asn	Met	Ser	Asn	Thr	Ile	Ile	Arg	Glu	Glu
	2855					2860					2865			
Lys	Asn	Arg	Arg	Ala	Ser	Arg	Val	Arg	Arg	Ala	Ser	Ala	Val	Pro
	2870					2875					2880			
Ser	Ala	Asp	Arg	Pro	Lys	Lys	Glu	Ala	Lys	Lys	Glu	Thr	Ile	Pro
	2885					2890					2895			
Phe	Leu	His	Leu	Lys	Lys	Lys	Asn	Pro	Gln	Ser	Glu	Ser	Gly	Trp
	2900					2905					2910			
Glu	Phe	Ser	Gln	Arg	Leu	Thr	Ser	Val	Tyr	Leu	Asp	Val	Leu	Thr
	2915					2920					2925			
Asn	Ile	Ala	Arg	Asp	Gly	Val	Thr	Phe	Glu	Asn	Arg	Met	Val	Leu
	2930					2935					2940			
Met	Thr	Gly	Ala	Gly	Lys	Asp	Ser	Ile	Gly	Ala	Ser	Ile	Leu	Lys
	2945					2950					2955			
Gly	Leu	Leu	Ser	Gly	Gly	Ala	Lys	Val	Val	Val	Thr	Thr	Ser	Arg
	2960					2965					2970			
Phe	Ser	Arg	Asp	Val	Thr	Glu	Tyr	Tyr	Gln	Ser	Ile	Tyr	Gln	Arg
	2975					2980					2985			
His	Gly	Ser	Lys	Asn	Ser	Cys	Leu	Val	Val	Val	Pro	Phe	Asn	Gly
	2990					2995					3000			
Gly	Ser	Lys	Gln	Asp	Val	Asp	Ala	Leu	Val	Asn	Tyr	Ile	Tyr	Asp
	3005					3010					3015			
Lys	Asp	Leu	Lys	Lys	Gly	Leu	Gly	Trp	Asp	Leu	Asp	Tyr	Ile	Ile
	3020					3025					3030			
Pro	Phe	Ala	Ala	Ile	Ser	Val	Gln	Gly	Lys	Glu	Ile	Asp	Asn	Ile
	3035					3040					3045			
Asp	Ser	Gln	Ser	Glu	Leu	Ala	His	Arg	Ile	Met	Leu	Thr	Asn	Val
	3050					3055					3060			
Leu	Arg	Leu	Leu	Gly	Asn	Val	Lys	Ala	Lys	Lys	Met	Glu	His	Gly
	3065					3070					3075			
Tyr	Asp	Thr	Arg	Pro	Ala	Gln	Val	Ile	Leu	Pro	Leu	Ser	Pro	Asn
	3080					3085					3090			
His	Gly	Thr	Phe	Gly	Ala	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gly	Glu	Ser	Lys	Val
	3095					3100					3105			
Ala	Leu	Glu	Thr	Leu	Phe	Asn	Arg	Trp	Ser	Ser	Glu	Ser	Trp	Gly
	3110					3115					3120			
Ala	Tyr	Leu	Thr	Ile	Thr	Gly	Ala	Val	Ile	Gly	Trp	Thr	Arg	Gly
	3125					3130					3135			
Thr	Gly	Leu	Met	Ser	Gly	Asn	Asn	Ile	Val	Ala	Glu	Gly	Leu	Glu
	3140					3145					3150			
Lys	Tyr	Gly	Val	Arg	Thr	Phe	Ser	Gly	Gln	Glu	Met	Ala	Phe	Asn
	3155					3160					3165			
Ile	Leu	Gly	Leu	Met	His	Pro	Ser	Ile	Thr	Asn	Leu	Cys	Gln	Val
	3170					3175					3180			
Glu	Pro	Val	Trp	Ala	Asp	Leu	Asn	Gly	Gly	Leu	Gln	Tyr	Leu	Pro
	3185					3190					3195			
Asn	Leu	Asn	Glu	Ile	Ser	Ala	Asn	Leu	Arg	Ala	Glu	Tyr	Arg	Gln
	3200					3205					3210			
Thr	Ala	Glu	Ile	Arg	Lys	Ala	Ile	Val	Thr	Glu	Asn	Thr	Leu	Asp
	3215					3220					3225			
Phe	Lys	Glu	Thr	His	Gly	Ala	Glu	Ala	Glu	Arg	Lys	His	Gln	Pro
	3230					3235					3240			
His	Lys	Val	Thr	Pro	Arg	Ala	Asn	Met	Lys	Phe	Pro	Phe	Pro	Glu
	3245					3250					3255			
Leu	Lys	Asp	Tyr	Lys	Asp	Leu	Ser	His	Ala	His	Lys	Leu	Arg	Gly
	3260					3265					3270			
Met	Leu	Asp	Leu	Glu	Lys	Val	Val	Val	Val	Thr	Gly	Phe	Ser	Glu
	3275					3280					3285			
Val	Gly	Pro	Trp	Gly	Asn	Ser	Arg	Thr	Arg	Trp	Glu	Met	Glu	Ala

3290	Asn Gly Gln Phe Ser Leu	3295	Glu Gly Cys Ile Glu	3300	Met Ala Trp Ile
3305	Met Gly Phe Ile Lys His	3310	His Asn Gly Asn Leu	3315	Lys Ser Gly Ser
3320	Pro Tyr Ser Gly Trp Val	3325	Ala Lys Thr Glu	3330	Glu Pro Val Lys
3335	Asp Arg Asp Val Lys Ala	3340	Lys Tyr Glu Lys Gln	3345	Ile Leu Glu His
3350	Thr Gly Ile Arg Leu Ile	3355	Glu Pro Glu Leu Phe	3360	Gly Gly Tyr Asp
3365	Pro Lys Arg Lys Gly Leu	3370	Leu Gln Glu Val Leu	3375	Ile Asp His Asp
3380	Leu Glu Ala Phe Glu Val	3385	Ser Lys Glu Glu Ala	3390	Gln Met Phe Lys
3395	Leu Glu His Gly Asp Lys	3400	Val Asp Ile Tyr Glu	3405	Glu Glu Ser Gly
3410	Gln Trp Ala Val Lys Phe	3415	Lys Lys Gly Ala Asn	3420	Met Tyr Ile Pro
3425	Lys Ala Leu Lys Phe Asp	3430	Arg Leu Val Ala Gly	3435	Gln Ile Pro Thr
3440	Gly Trp Asp Ala Ala Arg	3445	Phe Gly Val Pro Lys	3450	Asp Ile Ile Asp
3455	Gln Val Asp Thr Ile Thr	3460	Leu Tyr Val Leu Val	3465	Ser Thr Val Glu
3470	Ala Leu Val Ala Ser Gly	3475	Ile Thr Asp Pro Tyr	3480	Glu Phe Tyr Gln
3485	Tyr Val His Val Ser Glu	3490	Val Gly Asn Thr Ala	3495	Gly Ser Gly Val
3500	Gly Gly Met Leu Ser Leu	3505	Arg Gly Met Tyr Arg	3510	Gly Arg Val Met
3515	Asp Asp Pro Val Gln Lys	3520	Ile Leu Gln Glu	3525	Ser Phe Ile Asn
3530	Thr Met Pro Ala Trp Val	3535	Asn Met Leu Leu Leu	3540	Ser Ser Ser Gly
3545	Pro Ile Lys Thr Pro Val	3550	Gly Ala Cys Ala Thr	3555	Ala Val Glu Ser
3560	Val Glu Ile Gly Val Asp	3565	Thr Ile Gln Ser Gly	3570	Lys Ala Lys Ile
3575	Val Ile Val Gly Gly Tyr	3580	Asp Asp Phe Gln Glu	3585	Glu Gly Ser Tyr
3590	Glu Phe Ala Asn Met Lys	3595	Ala Thr Ser Asn Thr	3600	Glu Glu Glu Phe
3605	Ala His Gly Arg Thr Pro	3610	Lys Glu Met Ser Arg	3615	Pro Ala Thr Ser
3620	Thr Arg Ser Gly Phe Met	3625	Glu Ser His Gly Ala	3630	Gly Ile Glu Ile
3635	Leu Met Gln Ala Lys Leu	3640	Ala Val Glu Met Gly	3645	Val Pro Ile Tyr
3650	Gly Ile Val Gly Leu Thr	3655	Asn Thr Ala Thr Asp	3660	Lys Glu Gly Arg
3665	Ser Val Pro Ala Pro Gly	3670	Gln Gly Val Leu Thr	3675	Thr Ala Arg Glu
3680	Ala Lys Gly Lys Met Pro	3685	Ser Arg Leu Leu Asp	3690	Ile Lys Tyr Arg
3695	Lys Arg Gln Ile Asp Ser	3700	Arg Arg Ala Gln Ile	3705	Lys Gln Trp Val
3710	Glu Asn Glu Tyr Ala Glu	3715	Leu Arg Tyr Glu Leu	3720	Asp Glu Leu Lys
3725	Ala Ser Asn Ser Leu Thr	3730	Val Ser Glu Glu Glu	3735	Tyr Leu Ala Ala
3740	Glu Thr Glu Arg Ile Gln	3745	Lys Glu Ala Lys Arg	3750	Gln His Arg Glu
3755		3760		3765	

Ala	Leu	Asn	Leu	Trp	Gly	Asn	Glu	Phe	Tyr	Arg	Gln	Asp	Pro	Gln
3770						3775					3780			
Ile	Ala	Pro	Leu	Arg	Gly	Ala	Leu	Ala	Ser	Phe	Gly	Leu	Thr	Ile
3785						3790					3795			
Asp	Asp	Ile	Gly	Val	Gly	Ser	Phe	His	Gly	Thr	Ser	Thr	Lys	Ala
3800						3805					3810			
Asn	Asp	Lys	Asn	Glu	Ser	Glu	Val	Val	Asn	Lys	Gln	Leu	Glu	His
3815						3820					3825			
Leu	Gly	Arg	Ser	Lys	Gly	Asn	Ala	Leu	Pro	Ser	Ile	Trp	Gln	Lys
3830						3835					3840			
Tyr	Leu	Thr	Gly	His	Pro	Lys	Gly	Ala	Ala	Ala	Ala	Trp	Met	Met
3845						3850					3855			
Asn	Gly	Val	Leu	Gln	Val	Leu	Gln	Thr	Gly	Leu	Ile	Pro	Gly	Asn
3860						3865					3870			
Arg	Asn	Ala	Asp	Asn	Ile	Asp	Asp	Thr	Met	Arg	Gln	Tyr	Glu	His
3875						3880					3885			
Val	Leu	Tyr	Thr	Ser	Arg	Ser	Ile	Gln	Thr	Asp	Gly	Val	Lys	Ala
3890						3895					3900			
Gly	Leu	Leu	Lys	Ser	Phe	Gly	Phe	Gly	Gln	Val	Gly	Gly	Glu	Val
3905						3910					3915			
Leu	Leu	Ile	His	Ser	Asp	Tyr	Ile	Leu	Gly	Ala	Leu	Glu	Glu	His
3920						3925					3930			
Glu	Tyr	Glu	Ala	Tyr	Lys	Val	Lys	Gln	Gln	Ala	Arg	Gln	Ala	Lys
3935						3940					3945			
Ser	Tyr	Arg	Tyr	Leu	His	Asp	Ser	Met	Thr	Gly	Gly	Pro	Ala	Leu
3950						3955					3960			
Val	Gln	Val	Lys	Asn	Ala	Pro	Pro	Tyr	Ser	Pro	Glu	Leu	Glu	Ser
3965						3970					3975			
Pro	Val	Tyr	Leu	Asn	Pro	Lys	Ala	Arg	Ala	Gln	Tyr	Asn	Asn	Ala
3980						3985					3990			
Thr	Lys	Ser	Trp	Ala	Phe	Asn	Ala	Lys	His	Leu	Val	Pro	Glu	Ser
3995						4000					4005			
Asp	Lys	Ile	Asp	Val	Asp	Met	Thr	Arg	Ala	Ile	Leu	Glu	Thr	Ser
4010						4015					4020			
Ala	Gln	Glu	Ser	Leu	Gly	Val	Thr	Ser	Ser	Ser	Ser	Arg	Gly	Val
4025						4030					4035			
Gly	Val	Asp	Val	Glu	Met	Val	Ser	Ala	Ile	Asn	Ile	Glu	Asn	Asp
4040						4045					4050			
Thr	Phe	Leu	Glu	Arg	Asn	Phe	Thr	Gln	Gln	Glu	Ile	Asp	Tyr	Cys
4055						4060					4065			
Leu	Ser	Arg	Pro	Asp	Pro	Gln	Ala	Ser	Phe	Ala	Gly	Arg	Trp	Ser
4070						4075					4080			
Ala	Lys	Glu	Ala	Val	Val	Lys	Ala	Val	Ser	Ser	Phe	Ser	Leu	Asp
4085						4090					4095			
Ser	Glu	Lys	Val	Trp	Thr	Gln	Gly	Ala	Gly	Ala	Gly	Leu	Ser	Glu
4100						4105					4110			
Ile	Glu	Ile	Val	Met	Ala	Glu	Ser	Gly	Ala	Pro	Ser	Val	Val	Phe
4115						4120					4125			
Ser	Gly	Ala	Ala	Gln	Glu	Ala	Ala	Ala	Lys	Ala	Gly	Val	Lys	Glu
4130						4135					4140			
Ile	Lys	Val	Ser	Ile	Ser	His	Ser	Gly	Ala	Tyr	Ala	Val	Ala	Val
4145						4150					4155			
Ala	Asn	Ala	Leu											
4160														

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Sequência de aminoácidos conservada 1

<400> 4

Gln Gly Ser Gln Glu Gln Gly Met Gly Met
1 5 10

<210> 5
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sequência de aminoácidos conservada 2

<400> 5

Ala Thr Gln Phe Arg Gln Pro Ala Leu Thr
1 5 10

<210> 6
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> iniciador Flh-f

<220>
<221> característica_misc.
<222> (6)..(6)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> característica_misc.
<222> (9)..(9)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> característica_misc.
<222> (21)..(21)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> característica_misc.
<222> (27)..(27)
<223> n is a, c, g, or t

<400> 6
carggnwsnc argarcargg natgggnatg

30

<210> 7
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> iniciador Flh-r

<220>
<221> característica_misc.
<222> (3)..(3)
<223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> característica_misc.
 <222> (6)..(6)
 <223> n is a, c, g, or t

<220>
 <221> característica_misc.
 <222> (9)..(9)
 <223> n is a, c, g, or t

<220>
 <221> característica_misc.
 <222> (15)..(15)
 <223> n is a, c, g, or t

<220>
 <221> característica_misc.
 <222> (24)..(24)
 <223> n is a, c, g, or t

<220>
 <221> característica_misc.
 <222> (27)..(27)
 <223> n is a, c, g, or t

<400> 7
 gtnarngcng gytgngtraa ytgngtngc

29

<210> 8
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> iniciador Fl-1f

<400> 8
 gctctgtatg actcttcccc c

21

<210> 9
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> iniciador Fl-1r

<400> 9
 gccaaaagac cggtgggtga c

21

<210> 10
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> iniciador F2-1f

<400> 10
 ggtgcaggag cgggactgag tg

22

<210> 11
 <211> 22
 <212> DNA

<213> Artificial
 <220>
 <223> iniciador F2-1r

 <400> 11
 cgcatttgca accgcaaccg cg 22

 <210> 12
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> iniciador Fl-2f

 <400> 12
 atgactaccg cacagtccaa cttgacc 27

 <210> 13
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> iniciador Fl-3f

 <400> 13
 tgtcttgaag agcaaggagt gg 22

 <210> 14
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> iniciador F2-2r

 <400> 14
 gcgtagtagt cgccgtgctc agccatc 27

 <210> 15
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> iniciador MCS1-F

 <400> 15
 catggatcct ctagactgca ggcatgcaag cttctcga 38

 <210> 16
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> iniciador MCS1-R

 <400> 16
 ctaggagatc tgacgtccgt acgttcgaag agctctag 38

REIVINDICAÇÕES

1. Polinucleotídeo, caracterizado pelo fato de ser selecionado de qualquer um dos seguintes (a) a (h):

5 (a) um polinucleotídeo compreendendo um polinucleotídeo consistindo da seqüência de nucleotídeos de Posições 1 a 12486 de SEQ ID NO: 1;

(b) um polinucleotídeo compreendendo um polinucleotídeo consistindo da seqüência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 2 ou uma sua parte;

10 (c) um polinucleotídeo compreendendo um polinucleotídeo codificador de uma proteína possuindo a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 3;

(d) um polinucleotídeo compreendendo um polinucleotídeo codificador de uma proteína que consiste de uma seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO:3 na qual um ou mais aminoácidos estão deletados, substituídos, inseridos e/ou adicionados, e que possui uma atividade de ácido-graxo-sintetase;

15 (e) um polinucleotídeo compreendendo um polinucleotídeo codificador de uma proteína possuindo 60% ou mais de identidade com a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, e que possui uma atividade de ácido-graxo-sintetase;

20 (f) um polinucleotídeo compreendendo um polinucleotídeo que hibridiza sob condições estringentes em um polinucleotídeo consistindo de uma seqüência de nucleotídeos complementar à seqüência de nucleotídeos de Posições 1 a 12486 de SEQ ID NO: 1, e que codifica uma proteína possuindo uma atividade de ácido-graxo-sintetase;

25 (g) um polinucleotídeo compreendendo um polinucleotídeo que hibridiza sob condições estringentes em um polinucleotídeo consistindo de uma seqüência de nucleotídeos complementar à seqüência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 2 ou uma sua parte, e que codifica uma proteína possuindo

uma atividade de ácido-graxo-sintetase; e

(h) um polinucleotídeo compreendendo um polinucleotídeo que hibridiza sob condições estringentes em um polinucleotídeo consistindo de uma seqüência de nucleotídeos complementar à seqüência de nucleotídeos de um polinucleotídeo codificador de uma proteína consistindo da seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, e que codifica uma proteína possuindo uma atividade de ácido-graxo-sintetase.

2. Polinucleotídeo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de ser selecionado de qualquer um dos seguintes (i) a

(m):

(i) um polinucleotídeo compreendendo um polinucleotídeo codificador de uma proteína que consiste de uma seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 na qual um a dez aminoácidos estão deletados, substituídos, inseridos e/ou adicionados, e que possui uma atividade de ácido-graxo-sintetase;

(j) um polinucleotídeo compreendendo um polinucleotídeo codificador de uma proteína possuindo 90% ou mais de identidade com a seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, e que possui uma atividade de ácido-graxo-sintetase;

(k) um polinucleotídeo compreendendo um polinucleotídeo que hibridiza sob condições elevadamente estringentes em um polinucleotídeo consistindo de uma seqüência de nucleotídeos complementar à seqüência de nucleotídeos de Posições 1 a 12486 de SEQ ID NO: 1, e que codifica uma proteína possuindo uma atividade de ácido-graxo-sintetase;

(l) um polinucleotídeo compreendendo um polinucleotídeo que hibridiza sob condições elevadamente estringentes em um polinucleotídeo consistindo de uma seqüência de nucleotídeos complementar à seqüência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 2 ou uma sua parte, e que codifica uma proteína possuindo uma atividade de ácido-graxo-sintetase; e

(m) um polinucleotídeo compreendendo um polinucleotídeo que hibridiza sob condições elevadamente estridentes em um polinucleotídeo consistindo de uma seqüência de nucleotídeos complementar à seqüência de nucleotídeos de um polinucleotídeo codificador de uma proteína consistindo da seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, e que codifica uma proteína possuindo uma atividade de ácido-graxo-sintetase.

3. Polinucleotídeo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de compreender um polinucleotídeo que consiste da seqüência de nucleotídeos de Posições 1 a 12486 de SEQ ID NO: 1.

4. Polinucleotídeo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de compreender um polinucleotídeo que consiste da seqüência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 1.

5. Polinucleotídeo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de compreender um polinucleotídeo que consiste da seqüência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 2.

6. Polinucleotídeo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de compreender um polinucleotídeo que codifica uma proteína consistindo da seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

7. Polinucleotídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de ser DNA.

8. Proteína, caracterizada pelo fato de ser codificada pelo polinucleotídeo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 7.

9. Vetor, caracterizado pelo fato de compreender o polinucleotídeo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 7.

10. Organismo transformado, caracterizado pelo fato de possuir introduzido no mesmo polinucleotídeo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 7.

11. Organismo transformado, caracterizado pelo fato de possuir introduzido no mesmo o vetor como definido na reivindicação 9.

12. Organismo transformado de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de possuir uma capacidade de formação de ácido graxo aumentada devido à introdução do vetor como definido na reivindicação 9.

5 13. Organismo transformado de acordo com qualquer uma das reivindicações 10 a 12, caracterizado pelo fato de que o organismo é um fungo produtor de ácido graxo.

14. Organismo transformado de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que o fungo produtor de ácido graxo é
10 *Mortierella alpina*.

15. Método para produzir um lipídeo ou ácido graxo, caracterizado pelo fato de usar o organismo transformado como definido em qualquer uma das reivindicações 10 a 14.

16. Método para produzir um alimento, uma droga ou um
15 material industrial, caracterizado pelo fato de usar o organismo transformado como definido em qualquer uma das reivindicações 10 a 14.

17. Alimento, droga ou industrial material, caracterizado pelo fato de ser produzido(a) pelo método como definido na reivindicação 16.

18. Método para avaliar a capacidade de formação de ácido
20 graxo de um fungo de teste produtor de lipídeo, caracterizado pelo fato de compreender o uso de um iniciador ou uma sonda planejado(a) baseado(a) na sequência de nucleotídeos de um gene de ácido-graxo-sintetase possuindo a sequência de nucleotídeos de Posições 1 a 12486 de SEQ ID NO: 1.

19. Método para avaliar a capacidade de formação de ácido
25 graxo de um fungo de teste produtor de lipídeo, caracterizado pelo fato de compreender cultivar um fungo de teste produtor de lipídeo; e medir um nível de expressão de um gene de ácido-graxo-sintetase possuindo a sequência de nucleotídeos de Posições 1 a 12486 de SEQ ID NO: 1.

20. Método para selecionar um fungo produtor de lipídeo,

- caracterizado pelo fato de compreender: cultivar um fungo de referência produtor de lipídeo e um fungo de teste produtor de lipídeo; medir um nível de expressão de um gene de ácido-graxo-sintetase possuindo a seqüência de nucleotídeos de Posições 1 a 12486 de SEQ ID NO: 1 em cada fungo produtor
- 5 de lipídeo; e selecionar um fungo de teste produtor de lipídeo que expressa o gene mais elevadamente do que o fungo de referência produtor de lipídeo.

Fig.1-1

Saccharomyces cerevisiae	Candida albicans	Aspergillus nidulans	1	100	MDAYSTRPLTL SHGSLHVLVPTASFFIASQLQEQFNKIILPEPTEGFADDEFTTPAELVGKFLGYVSSLYEPS—KVGQFDQ —NSTHRPFQLTHGSIEHITLVPNDLFFNYSQKDEFIKITLPEPTEGFADDEPSSPAELYGKFIGFISNAQFP—Q MYGTSTGPQTGINTPRSSQSLRPLISHGSLFESFLVPTSLHEHASQLKDTFTASLPEPTDELQDDPSSPAELVARYIGHVAHEVEEGEDDAHGNTNQD
			101	200	VNLQLETFENCYLEGNDIHAANKLQENDITLVKTKELIKNYITARIIMAKRPFDKKSNSALFRAVGEGNAQLVAIFGGQGNITDDYFEELROLYQTYHV IVELSLKDFESRFLDNNDNIHSFAVKLLDDETYPTIAKVKENIKNYKAVKSINKVESNLLYHCKH—DAKLVVAIFGGQGNITDDYFEELRELYTLYQG VLKLTLEFEFRAFMRGNDVHVAATLPGITAKKVLVVEAYYAG—RAAAGRPTKP—YDSALFRAASDEKARIYSVLGGQGNIEEYFDELREVMNTYTS
			201	300	LVGBLJKFSAEITLSELIRITLDAEKVFTQGLNIEMLENPSNTPDKDYLISIPISQPLIGVQLAHYVWTAKLIGFTPGBELRSYLKGATGHSQGLVTAVA LIEDLLVSI/AEKENQLHPS—FDKIYTGGLNLSWLKHPEFTPDQDYLESPVSCRVIQVQLCHYTIITCKVLGLTPGGEFRNSLKWSTGHSQGLVTAVT FYDDLTSSSAELLOSLSREP—DANKLYPKGLNVMQWLREPDTQPDVDVLVSAPVSLPLTBLVOLAHFVATGRVLGKEPGEILERFSGTTHGSSQGIVTAAA
Saccharomyces cerevisiae	Candida albicans	Aspergillus nidulans	301	400	IAETDSWESFFVSRKAIITVLFFIQVQVEAYNPITSLPPSILEDSEINNEGVPSPMILSISNLTQEQVQDYVNKTNSHLPAQKQVEISLVNGAKNLVWSQP IAASDSNDSLKNSLTAVSLILFISGRQLSTYPTSLPPTMEQDSLNGEGRSPMILSVRDLISKQVEKFEQTNSHLPREKHIAISLINGARNLVLSQP IATATTWESFHKAIVANALTMLFWJGLRSQQAYPRTSIAPSVLQDSIENGEGTIPMILSIRDLPRTAVQGEHIDMIHQHLPEDRHISISLVNSARNFVVTGP
			401	500	PQSLYGLNLTIRKAKAPSGLDQSRIPFESERKLKFSNRFLPVASPFHSHLLVPASDLINKDLVKNVSVNAKDIQIPVYDTFDGSDLRVLSSGS—ISERIVD PESLYGFNIENLRNQKAPMGLDQSRVPFESERKLKCSNRFLPIFAPFHSHLDADATELILDDVKEHGLSFEGLKIPVYDTFDGSDFGALKEP—TIDRWVK PLSLYGLNLTIRKAKAPSGLDQSRVPFESERKLKCSNRFLPIFAPFHSHLYSADFRTMEDLEVEISPKS—LTIPVYGTKTGDDLRAISDANVVPALVR

Fig.1-2

Saccharomyces cerevisiae	501 600 C I I R L P V K W I E T T I Q F K - A T H I L D F G P G A S G L G V L T H R N K D G T G V R V I V A G T L D I N - P D D D Y G F K Q E I F D V T S N - G L K K N P N W L E E Y H P K L I K N K S B K I F
Candida albicans	L I T E L P V H W E E A T N H K - A T H I L D F G P G A S G L G V L T H R N K E G T G A R I I L A G T L D S N P I D D E Y G F K H E I F Q T S A D K A I K W A P D W L K E L R P T L V K N S E G K I Y
Aspergillus nidulans	M I T H D P V N W E O T T A F P N A T H I V D E G P G G I S G L G V L T N R N K D G T G V R V I L A G S M D G T - N A E V G Y K P E L F D R D E H - S V K Y A I D W V K E Y G P R L V K N A T G Q T F
Saccharomyces cerevisiae	601 700 V E T K F S K L I G R P P E L V P G M T P C T V S P D E V A A T T N A G Y T I E L A G G Y F S A G M T A A I D S V W S Q I E K G S T F G I N L I Y V N P F M L Q W G I P L I K E L R S K G Y P I Q F
Candida albicans	V K T K F S Q L L G R A P I N V A G M T P T T Y N T D I V S A S L N A G Y H I E L A G G Y F S P V M M T R A I D D I V S R I K P G Y G L G I N L I Y V N P F M L Q W G I P L I K D L R E K G Y P I G S
Aspergillus nidulans	V D T K M S R L L G I P P I N V A G M T P T T V P N D E V A A T T N A G Y H I E L A G G Y Y N A K T M T E A I T K I E K A I P P G R G I T V N L I Y V N P R A M G W I P L I G K L R A D G V P I E G
Saccharomyces cerevisiae	701 800 L T I G A G V P S I E V A S E Y I E T L G L K Y L G L K P G S I D A I S Q V I N I A K A N P F P I A L Q W T G G R G G G H S F E D A H T P M L Q M Y S K I R R H P N I M L I F G S G F G S A D D T Y
Candida albicans	L T I G A G V P S I E V A T E Y I E D L G L T H L G L K P G S I D A I S Q V I A I A K A N P I F P I N L Q W T G G R G G G H S F E D F H Q P I I Q M Y S K I R R C S N I M L V A G S F G S D E D T Y
Aspergillus nidulans	L T I G A G V P S I E V A N E Y I E T L G I K H I A F K P G S I D A I Q Q V I N I A K A N P F P V I L Q W T G G R G G G H S F E D F H Q P I L Q M Y S R I R R H E N I I L V A G S F G G A E D T Y
Saccharomyces cerevisiae	801 900 P Y L I T G E N S T K E D Y P P M P F D G F L F G S R V M I A K E V K T S P D A K K G I A A G T G V P D D K W E O T Y K K P T G G I V T V R S E M G E P I H K I A T R G V M L W K E F D E T I F N L P K N
Candida albicans	P Y L S G Y N S E K E N Y P P M P F D Q V L F G S R V M T S K E S H T S L A A K K L I V E C K G V P D Q W E O T Y K K P T G G I I T V R S E M G E P I H K I A T R G V M F W K E L D D T I F N L P K N
Aspergillus nidulans	P Y L S G A N W S S R F G Y P P M P F D G G L F G S R M M T A K E A H T S K N A K Q A I V D A P G L D D Q D W E K T Y K G A A G G V T V L S E M G E P I H K L A T R G V L F W H E M D O K I F K L D K A
Saccharomyces cerevisiae	901 1000 K L V R T L E A K R D Y I I S P L N A D F Q K P W F A T V - N G G A R D I A T M T Y E E V A K R L V E L M F I R S T N S N F D V T W R T F T G D F L R R V E E R F T K S K - T L S L I Q S Y S L D K P
Candida albicans	K L L D A L A K K R D H I I K K L N N D F Q K P W F G K N I - A N G V C D L Q E M T Y K E V A N R L V E L M Y K K S H R W I D Y S L R N M Y G D F L R R V E E R F T S S A G T V S L L Q N F N Q L N E R
Aspergillus nidulans	K R V P E L A K K O R D Y I I K K L N D D F Q K W F G R N S A B E T V D L E D M T Y A E V W H R M V D L M Y K V H E G R W I D D S L K K L T G D F I R R V E E R F T A E G G A S L L Q N Y S E L N W P

Fig.1-3

Saccharomyces cerevisiae	1001	DEAIEKVFNAYPAAREQFLNAQDIDHFTSNGQNPWQKPVPFVRVLDRRFEIFFKKOSLWQSEHLEAVVDDVDVQRTGILHGPVAAQFTKVIDEPIKSIMDG	1100
		EQFTADFFEKFPQAGKQIISEEDCDYFLMLAARPGQKPVFPVILDEREFFEKKOSLWQSEDESVDVEDVQRTGILHGPVASQVTSKVDEPIQDILNS	
	Aspergillus nidulans	YPAVDNILAAYPEAATQLINAOQVQHFLLLGRRGGQKPVFPVPSLDENFEYWFKKOSLWQSEDELEAVVGDDVQRTGILQGPMAAKFSTVIDEPVGDILNS	
Saccharomyces cerevisiae	1101	IHDGHIKKLLHQYGGDESKIPAVEYFGQES-----PVDVQSQVDSSVSSEDSAVFKATSSSTDEESIFKALAGSEINWRHASFLCSFITQDKMVFVSNP	1200
	Candida albicans	IHEGHTARL IKEEYAGDESKIPVWEYFGGKK-----PASYSATSNIIDGNQVVEIDSELPNKQEWLDDLAGTELNMLQAFISTDRIVQGSKHVSNP	
	Aspergillus nidulans	IHDGHIKSLIKQNYNGDETTPITETFFGGRLSEAGEDIEMDGLTISEDANKISYRLSSSAADLPEVNRWQRLLAGRSYSWRHALFSADVFGGHRFQTNP	
Saccharomyces cerevisiae	1201	IRKVFKPSQGNVVEISNGNTSKTWTLSERVQGELEKPTVILKLLKENIQMENIENRTMDGKPSLPLLYNFPDNGFAPISEVMEDNRQRIKENYWK	1300
	Candida albicans	IHDILTPAKHSKVTID-----KTKKLTAFENIKGDLPRWEITELVKPNTIQSSEIERTADTNPVAPLKYKNPADGFAPILEIMEDRNERIKEFTWK	
	Aspergillus nidulans	LKRVLAPSTGMYVEIANPEDAPKTVISVREPYGSGKLKVTVDIKLNEKGPALTLTYEORTAENGVPVPLTEFTYHPDTGYAPIREVMDSRNDRIKEFTYR	
Saccharomyces cerevisiae	1301	LWID-----EPFNLDPRDVIKQKOFETAKEVYDETHAVGNNGCEDFVSRPDRMTLAPMDFAIVVGWRAIHKAI FPNVTVDGDL LKL VHL SNGYKMIIPGAKPL	1400
	Candida albicans	LMFGSSVPYSNDINVEKATLQDEITLSSQTISEETHAIGNKQCAFDRPQKATLAPMDFAIVIGWKAIIKAI FPKSVDDGDL LKL VHL SNGYKMITGAAPL	
	Aspergillus nidulans	IMFG-NKQVFPYTPITATFNGGREITTSQAVADFVHVGNTGENFVERPQKENVAPMDFAIVAGWKAIIKPIFPRTIDGDL LKL VHL SNGFKMVPGAOPL	
Saccharomyces cerevisiae	1401	QVGDVYSTTAVIESVNGDTGKIVDVVGTLSRNGKPVMEVTSQFFYRGVYTD FENITFOKTVEPVQNHIIKTSKDI AVLRSKEWFLDDEDFDLNKTILTF	1500
	Candida albicans	KKGDVYSTYAEIKAVLNQPSGKLVEWGTIYREGKPVMEVTSQFLYRGEYNDYQNTFOKVTETPVQVAFSAKDLAVLRSKEWFLHLEKD-VQFDVLTF	
	Aspergillus nidulans	KYGDVLDTTAQINSIINEESGKIIVEVGGTIRRDQKPIIHVTSQFLYRGVYTD FENITFOKQEPVPMQVHLASSRDVAIILRSKEWFLDMDDVELLGGTLTF	

Fig. 1-4

Saccharomyces cerevisiae	1501	1600
	ETETEVTFKNANI FSSVKCFQP IKVLEPTKETVE IQ IVDYEAGASHGIP VDFLKRNGSTLEQKVNLENP IPIA—VLDSYTPBSTNEPYARVSGDLNP I	
	RCESYKFKSANVYSS I KTI TGOVL ELPTKEV IQVGSVDYEAGSYGNPVTDL SRNGKT I EES I I FEMAIPLSSGEELTSKAPGTNEPYA I VSGDYNP I	
Candida albicans		
Aspergillus nidulans		
Saccharomyces cerevisiae	1601	1700
	HVSRHFASYANLEPQT I THGMFSSASVRAL I ENWAADSSSRVQYTGQFVDIMVLPNTAL KTS IQHVGM I NGRKL IKFETR-NEDDVVL TGEAE I EQPVT	
	HVSRVFAAYAKLPQT I THGMVSSASIRALVEEWAANNVAARYAFKQDFVGNVLPNDLTQTMEHVGM I NGRKI IKVETRNVETELPVLI TGEAE I EQPTT	
Candida albicans		
Aspergillus nidulans		
Saccharomyces cerevisiae	1701	1800
	TFVFTGGSGEQGGMGL YKT SKAODVNNRADNHFKD TYGFS I LD I VNNPVL T I HFGGKGR I RENYSAMI FET I VDG-KL KTEK I FKE I NEHSTS	
	ITYVFTGGSGEQGGMGL YNSSEVAREVNDKADRFVNNYGF'S I LD I VQNNPVL T I HFGGAKGRA I RQNY I GMMFET I GEDGALKSEK I FKQ I DETTTS	
Candida albicans		
Aspergillus nidulans		
Saccharomyces cerevisiae	1801	1900
	YTFRSEKGLLSATQFTOPAL TLMKAAFE DL KSKGL I PADATFAGHSLGEYAAALASLADVMS I ESLVEVVFYRGNTMQVAVPRDELGRSNYGM I A I NFGR	
	YTFVSPYGLLSATQFTOPAL TLMKAAVED I KSKGL I FSD I NFAHSLGEYSALSSLANMIP I ESLVDVVFYRGNTMQVAVPRDELGRSNYGM I VAVNPSR	
Candida albicans		
Aspergillus nidulans		
Saccharomyces cerevisiae	1901	2000
	VAKSFSOEALQYVVERVGR TGMVLE I VNNVVENQYVAAAGDLRALDTVTNVLNF I KLOK I DI I ELQKSL SLEEVEGHLFE I IDEASKKSAVKPRPL KLE	
	VSAFEDDSALRFVVDVAVANKTNILLE I VNNVVENQYVAAAGDLRALDTLTNVLNVK I NK I DI I VKLQEQNS I EKVKHEHLVE I NDEVAAKSLAKPOP I DLLE	
	ISKTFNEQALQYVVGNI SEQTGMVLE I VNNVVAQYVAAAGDLRALDGLTNLLNYLKAQNT I DIPALMOSHSLEDVKAHLVNI I HECVKQTEAKPKP I NLE	
Candida albicans		
Aspergillus nidulans		

Fig.1-5

	2001	2100
Saccharomyces cerevisiae	RGFACIPLVGIISVPFHSTYLMNGVKPKSFLEKQNIKENWVARLQGIIPNL TAKPFQVTKEVFQDYVDLTGSEPIKEIIDNWIEQEQS	
Candida albicans	RGFAVIPLEKGISVPEHSSYLMGSKPKPQDLIGKYIPNL TAKPFELTKVFQSYVDLTGSEKIKSIDNWIEQYE	
Aspergillus nidulans	RGFATIPLEKQIDVPFHSTFLRSGVKPERSFLIKKINKTTIDPSKLVGKYIPNVTARPFBIITKEVFEDYVRLTNSPRIAHLANWIEKYEEGTGGSRHGGT	
	2101	
Saccharomyces cerevisiae	—	
Candida albicans	—	
Aspergillus nidulans	TAASS	

RESUMO

“POLINUCLEOTÍDEO, PROTEÍNA, VETOR, ORGANISMO TRANSFORMADO, MÉTODOS PARA PRODUZIR UM LIPÍDEO OU ÁCIDO GRAXO, PARA PRODUZIR UM ALIMENTO, UMA DROGA OU UM MATERIAL INDUSTRIAL, PARA AVALIAR A CAPACIDADE DE

5 FORMAÇÃO DE ÁCIDO GRAXO DE UM FUNGO DE TESTE PRODUTOR DE LIPÍDEO, E PARA SELECIONAR UM FUNGO PRODUTOR DE LIPÍDEO, E, ALIMENTO, DROGA OU INDUSTRIAL MATERIAL”

10 A presente invenção proporciona ácido-graxo-sintetases que são responsáveis pela síntese de ácido graxo novo, polinucleotídeos que codificam tais ácido-graxo-sintetases (e.g., um polinucleotídeo compreendendo (a) um polinucleotídeo consistindo da seqüência de nucleotídeos de Posições 1 a 12486 de SEQ ID NO: 1, ou (b) um

15 polinucleotídeo que hibridiza sob condições estridentes em um polinucleotídeo compreendendo uma seqüência de nucleotídeos complementar à seqüência de nucleotídeos de Posições 1 a 12486 de SEQ ID NO: 1, e que codifica uma proteína possuindo uma atividade de ácido-graxo-sintetase, vetores de expressão e transformantes compreendendo tais

20 polinucleotídeos, métodos para produzir alimento e outros produtos usando tais transformantes, produtos alimentícios produzidos por tais métodos, e métodos para avaliar e selecionar fungos de teste produtores de lipídeo.