

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5227302号  
(P5227302)

(45) 発行日 平成25年7月3日(2013.7.3)

(24) 登録日 平成25年3月22日(2013.3.22)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 9/10 (2006.01)

C 1 2 N 9/10

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 1/21

請求項の数 25 (全 113 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2009-500611 (P2009-500611)  
 (86) (22) 出願日 平成19年3月15日(2007.3.15)  
 (65) 公表番号 特表2009-529890 (P2009-529890A)  
 (43) 公表日 平成21年8月27日(2009.8.27)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2007/064104  
 (87) 国際公開番号 W02007/106903  
 (87) 国際公開日 平成19年9月20日(2007.9.20)  
 審査請求日 平成22年3月12日(2010.3.12)  
 (31) 優先権主張番号 60/783, 205  
 (32) 優先日 平成18年3月15日(2006.3.15)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 60/784, 616  
 (32) 優先日 平成18年3月21日(2006.3.21)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 503220392  
 ディーエスエム アイピー アセッツ ビ  
 ー、ブイ、  
 オランダ国、 6 4 1 1 ティーイー ヘ  
 ーレン、 ヘット オーバールーン 1  
 (74) 代理人 100102978  
 弁理士 清水 初志  
 (74) 代理人 100102118  
 弁理士 春名 雅夫  
 (74) 代理人 100160923  
 弁理士 山口 裕孝  
 (74) 代理人 100119507  
 弁理士 刑部 俊  
 (74) 代理人 100142929  
 弁理士 井上 隆一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 P U F Aポリケチドシンターゼ系を用いた異種生物における多価不飽和脂肪酸の生産方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

長鎖PUFA遊離脂肪酸(FFA)のアシル-CoAへの変換を触媒するアシル-CoAシンターゼ(ACoAS)をコードする核酸配列を含む、単離された核酸分子であって、核酸配列がSEQ ID NO: 83のアミノ酸配列を有するACoASと少なくとも90%のアミノ酸配列同一性を有するアシル-CoAシンターゼ(ACoAS)をコードする、核酸分子。

【請求項 2】

核酸配列が、SEQ ID NO: 83のアミノ酸配列を有するアシル-CoAシンターゼ(ACoAS)をコードする、請求項1記載の単離された核酸分子。

【請求項 3】

核酸配列が、SEQ ID NO: 82を含む、請求項1記載の単離された核酸分子。

【請求項 4】

請求項1~3のいずれか一項記載の核酸分子によってコードされる、単離されたタンパク質。

【請求項 5】

発現制御配列と機能的に連結された、請求項1~3のいずれか一項記載の核酸分子を含む組換え核酸分子。

【請求項 6】

請求項5記載の組換え核酸分子を含む組換え宿主細胞。

【請求項 7】

10

20

微生物である、請求項6記載の組換え宿主細胞。

【請求項 8】

植物細胞である、請求項6記載の組換え宿主細胞。

【請求項 9】

請求項1～3のいずれか一項記載の単離された核酸分子を発現するように遺伝的に改変されている、遺伝的に改変された非ヒト生物。

【請求項 10】

請求項1～3のいずれか一項記載の単離された核酸分子を発現するように遺伝的に改変されている、遺伝的に改変された非ヒト生物。

【請求項 11】

請求項3記載の単離された核酸分子を発現するように遺伝的に改変されている、遺伝的に改変された非ヒト生物。

【請求項 12】

PUFAシンターゼおよびホスホパンテテインルトランスフェラーゼ（PPTアーゼ）を発現する、請求項9～11のいずれか一項記載の遺伝的に改変された非ヒト生物。

【請求項 13】

前記シンターゼおよびPPTアーゼを発現するように遺伝的に改変されている、請求項12記載の遺伝的に改変された非ヒト生物。

【請求項 14】

PUFAを発現させるために非ヒト生物を形質転換するための方法であって、PUFAシンターゼをコードする核酸分子、ホスホパンテテインルトランスフェラーゼ（PPTアーゼ）をコードする核酸分子、および請求項1～3のいずれか一項記載の核酸分子によって非ヒト生物を形質転換する段階を含む方法。

【請求項 15】

非ヒト生物が、該非ヒト生物によって発現される脂肪酸シンターゼ（FAS）を欠失または不活性化させるための遺伝的改変を含む、請求項14記載の方法。

【請求項 16】

非ヒト生物が、該非ヒト生物における、マロニルCoAをめぐるPUFAシンターゼとの競合を減少させるため、またはマロニルCoAのレベルを上昇させるための遺伝的改変を含む、請求項14記載の方法。

【請求項 17】

非ヒト生物が植物である、請求項14記載の方法。

【請求項 18】

非ヒト生物が微生物である、請求項14記載の方法。

【請求項 19】

非ヒト生物が動物である、請求項14記載の方法。

【請求項 20】

動物細胞である、請求項6記載の組換え宿主細胞。

【請求項 21】

核酸配列が、SEQ ID NO：83のアミノ酸配列を有するACoASと少なくとも95%のアミノ酸配列同一性を有するアシル-CoAシンターゼ（ACoAS）をコードする、請求項1記載の単離された核酸分子。

【請求項 22】

核酸配列が、SEQ ID NO：83のアミノ酸配列を有するACoASと少なくとも96%のアミノ酸配列同一性を有するアシル-CoAシンターゼ（ACoAS）をコードする、請求項1記載の単離された核酸分子。

【請求項 23】

核酸配列が、SEQ ID NO：83のアミノ酸配列を有するACoASと少なくとも97%のアミノ酸配列同一性を有するアシル-CoAシンターゼ（ACoAS）をコードする、請求項1記載の単離された核酸分子。

10

20

30

40

50

## 【請求項 2 4】

核酸配列が、SEQ ID NO : 83のアミノ酸配列を有するACoASと少なくとも98%のアミノ酸配列同一性を有するアシル-CoAシンターゼ (ACoAS) をコードする、請求項 1 記載の単離された核酸分子。

## 【請求項 2 5】

核酸配列が、SEQ ID NO : 83のアミノ酸配列を有するACoASと少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するアシル-CoAシンターゼ (ACoAS) をコードする、請求項 1 記載の単離された核酸分子。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

10

## 【0001】

## 発明の分野

本発明は概して、多価不飽和脂肪酸 (PUFA)、特に長鎖PUFA (LCPUFA) の生産を改良するための、そのようなPUFA (すなわち、PUFA PKS系またはPUFAシンターゼ) を産生するようにPKS様の系 (PKS-like system) によって遺伝的に改変された宿主生物における、アクセサリタンパク質および標的の使用に関する。本発明はまた、そのようなアクセサリタンパク質を発現するように遺伝的に改変された、またはそのような標的に関して改変された生物、ならびにそのような生物を作製および使用する方法にも関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

20

## 発明の背景

多価不飽和脂肪酸 (PUFA) は、栄養学的用途、薬学的用途、産業的用途および他の目的に有用であると考えられている。しかし、天然供給源から、および化学合成からのPUFAの現在の供給は、商業的需要に対して十分でない。油糧種子作物に由来する植物油は比較的安価であり、魚油に付随する汚染の問題がない。しかし、商業的に開発された植物油中に見いだされるPUFAは、典型的には、リノール酸 (9位および12位に2個の二重結合を有する18個の炭素 18:2 9,12) およびリノレン酸 (18:3 9,12,15) に限定される。リノレン酸およびリノレン酸から、より飽和度が高くかつ長鎖のPUFAを生成させる脂肪酸合成のためには、多数の別個のデサチュラーゼおよびエロンガーゼ酵素が必要である。このため、EPAおよびドコサヘキサ塩酸 (DHA) などのPUFAの発現のために植物宿主細胞を操作するには、合成を達成するために、いくつかの別個の酵素の発現が必要になると思われる。さらに、このようなPUFAの利用可能な量での産生のためには、さらなる操作の取り組みも必要と思われる。このため、ポリケチドシンターゼ様の系である、PUFAの産生のための代替的な系の発見は、「古典的」または「標準的」な脂肪酸合成経路のデサチュラーゼおよびエロンガーゼを用いる植物または他の生物 (例えば、微生物) の遺伝子操作に代わる重要な選択肢をもたらした。

30

## 【0003】

内因的に産生される脂肪酸の改変によって油糧種子作物植物にPUFAを産生させるために多くの取り組みがなされてきた。脂肪酸エロンガーゼおよびデサチュラーゼに対するさまざまな個々の遺伝子を用いたこれらの植物の遺伝的改変により、EPAなどのPUFAを有意なレベルで含む上に、より短鎖かつ不飽和度の低い混合性PUFAをも有意なレベルで含む葉または種子が作製されている (Qi et al., Nature Biotech. 22:739 (2004) (非特許文献1) ; PCT公開番号WO 04/071467 (特許文献1) ; Abbadi et al., Plant Cell 16:1 (2004) (非特許文献2) ; Napier and Sayanova, Proceedings of the Nutrition Society (2005), 64:387-393 (非特許文献3) ; Robert et al., Functional Plant Biology (2005) 32:473-479 (非特許文献4) ; または米国特許出願公開第2004/0172682号 (特許文献2) ) 。

40

## 【0004】

したがって、油糧種子植物において所望のPUFAに富む多量の脂質 (例えば、トリアシルグリセロール (TAG) およびリン脂質 (PL) ) を効率的かつ効果的に産生させるための方法に対しては、当技術分野における需要が依然としてある。

50

## 【 0 0 0 5 】

ポリケチドシンターゼ (PKS) 系は、脂肪酸シンターゼ (FAS) 系と関係のある酵素複合体として当技術分野で一般的に知られているが、これは往々にして、典型的には脂肪酸とほとんど類似性を示さない特化した産物を産生するように高度に改変されている。しかし、現在では、ポリケチドシンターゼ系は、アセチル-CoAおよびマロニル-CoAから多価不飽和脂肪酸 (PUFA) を合成することのできる海洋細菌およびある種の藻類に存在することが示されている。これらの系を本明細書ではPUFA PKS系、PUFAの産生のためのPKS様の系、またはPUFAシンターゼ系と称するが、それらはすべて本明細書において互換的に用いられる。

## 【 0 0 0 6 】

シュワネラ属 (*Shewanella*) および別の海洋細菌であるビブリオ-マリナス (*Vibrio marinus*) におけるPUFA合成のためのPUFA PKS経路は、米国特許第6,140,486号 (特許文献3) に詳細に記載されている。真核生物ヤブレッツボカビ科 (*Thraustochytrid*) のシゾキトリウム属 (*Schizochytrium*) におけるPUFA合成のためのPUFA PKS経路は、米国特許第6,566,583号 (特許文献4) に詳細に記載されている。シゾキトリウム属におけるPUFA PKS系のさらなる記載およびヤブレッツボカビ属 (*Thraustochytrium*) におけるPUFA PKS系の同定を含め、ヤブレッツボカビ目 (*Thraustochytriales*) のメンバーなどの真核生物におけるPUFA合成のためのPUFA PKS経路は、これらの系の使用法に関する詳細を含めて、2002年12月19日に公開された米国特許出願公開第20020194641号 (特許文献5)、および2006年12月21日に公開されたPCT公開番号WO 2006/135866 (特許文献6) に詳細に記載されている。2004年11月25日に公開された米国特許出願公開第20040235127号 (特許文献7) は、ヤブレッツボカビ属におけるPUFA PKS系の詳細な構造的記述、ならびにそのような系を用いたエイコサペンタエン酸 (C20:5, -3) (EPA) および他のPUFAの生産に関するさらなる詳細を開示している。2005年5月12日に公開された米国特許出願公開第20050100995号 (特許文献8) は、シュワネラ-オレヤナ (*Shewanella olleyana*) およびシュワネラ-ジャポニカ (*Shewanella japonica*) におけるPUFA PKS系の構造的および機能的な記述、ならびにそのような系の使用法を開示している。これらの出願はまた、微生物および植物を含む生物の遺伝的改変も、PUFA PKS経路を含む遺伝子ならびにそのような生物によるPUFAの産生とともに開示している。さらに、PCT特許公報番号WO 05/097982 (特許文献9) はウルケニア属 (*Ulkenia*) におけるPUFA PKS系を開示しており、米国特許出願公開第20050014231号 (特許文献10) はスラウストキトリウム-アウレウム (*Thraustochytrium aureum*) 由来のPUFA PKS遺伝子およびタンパク質を開示している。以上に特定した出願はそれぞれ、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。

## 【 0 0 0 7 】

したがって、PUFAシンターゼファミリーの酵素の基本的なドメイン構造および配列上の特徴は記載されており、PUFAシンターゼ酵素がさまざまなPUFA (例えば、エイコサペンタエン酸 (EPA; C20:5n-3)、ドコサヘキサエン酸 (DHA; 22:6n-3) およびドコサペンタエン酸 (DPA n-6; C22:5n-6)) のデノボ合成を行うことは実証されている。また、PUFA生成物が宿主生物のリン脂質 (PL) 中に、場合によっては中性脂質 (例えば、トリアシルグリセロール (TAG)) 中に蓄積しうることも実証されている。しかし、本発明者らが知る限りでは、酵素からそれらの標的へのPUFAの輸送のための正確な機序は、本発明の以前には明確に述べられてはいない。

## 【 0 0 0 8 】

生物における標的目的地へのPUFAの輸送の機序は、そのようなPUFAを産生するように遺伝的に改変された生物におけるPUFAの産生の効率を高めるため、および/または産生を改良するために意味を持つ可能性があるため、当技術分野ではこの機序に関する情報に対する需要がある。したがって、当技術分野では、そのような機序に関する知識を利用する、そのようなPUFAを産生するように遺伝的に改変された植物および微生物におけるものを含む、PUFA生産の改良された方法に対しても需要がある。

## 【 0 0 0 9 】

【特許文献 1】WO 04/071467

【特許文献 2】米国特許出願公開第2004/0172682号

【特許文献 3】米国特許第6,140,486号

【特許文献 4】米国特許第6,566,583号

【特許文献 5】米国特許出願公開第20020194641号

【特許文献 6】WO 2006/135866

【特許文献 7】米国特許出願公開第20040235127号

【特許文献 8】米国特許出願公開第20050100995号

【特許文献 9】WO 05/097982

【特許文献 10】米国特許出願公開第20050014231号

10

【非特許文献 1】Qi et al., Nature Biotech. 22:739 (2004)

【非特許文献 2】Abbadì et al., Plant Cell 16:1 (2004)

【非特許文献 3】Napier and Sayanova, Proceedings of the Nutrition Society (2005), 64:387-393

【非特許文献 4】Robert et al., Functional Plant Biology (2005) 32:473-479

【発明の開示】

【0010】

#### 発明の概要

本発明の1つの態様は、長鎖PUFA遊離脂肪酸 (FFA) のアシル-CoAへの変換を触媒するアシル-CoAシンテターゼ (ACoAS) をコードする核酸配列を含む、単離された核酸分子であって、核酸配列が以下からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するACoASと少なくとも60%同一なアシル-CoAシンテターゼ (ACoAS) をコードする、核酸分子に関する：SEQ ID NO : 83、SEQ ID NO : 85、SEQ ID NO : 87、SEQ ID NO : 89、SEQ ID NO : 91、SEQ ID NO : 93、SEQ ID NO : 95、SEQ ID NO : 97およびSEQ ID NO : 99。1つの局面において、核酸配列は、以下からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するアシル-CoAシンテターゼ (ACoAS) をコードする：SEQ ID NO : 83、SEQ ID NO : 85、SEQ ID NO : 87、SEQ ID NO : 89、SEQ ID NO : 91、SEQ ID NO : 93、SEQ ID NO : 95、SEQ ID NO : 97およびSEQ ID NO : 99。1つの局面において、核酸配列は、以下からなる群より選択されるアミノ酸配列をコードする：SEQ ID NO : 83、SEQ ID NO : 85およびSEQ ID NO : 97。1つの局面において、核酸配列は、以下からなる群より選択される：SEQ ID NO : 82、SEQ ID NO : 84、SEQ ID NO : 86、SEQ ID NO : 88、SEQ ID NO : 90、SEQ ID NO : 92、SEQ ID NO : 94、SEQ ID NO : 96およびSEQ ID NO : 98。

20

30

【0011】

本発明のさらにもう1つの態様は、リン脂質 (PL) またはトリアシルグリセロール (TAG) の生成においてPUFA-CoAを基質として利用するタンパク質をコードする核酸配列を含む、単離された核酸分子であって、タンパク質が以下からなる群より選択されるアミノ酸配列と少なくとも60%同一なアミノ酸配列を含む、核酸分子に関する：SEQ ID NO : 102、SEQ ID NO : 104、SEQ ID NO : 107、SEQ ID NO : 110およびSEQ ID NO : 113。1つの局面において、核酸配列は、以下からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする：SEQ ID NO : 102、SEQ ID NO : 104、SEQ ID NO : 107、SEQ ID NO : 110およびSEQ ID NO : 113。1つの局面において、核酸配列は、SEQ ID NO : 102およびSEQ ID NO : 104からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする。1つの局面において、核酸配列は、SEQ ID NO : 100、SEQ ID NO : 102、SEQ ID NO : 103、SEQ ID NO : 105、SEQ ID NO : 106、SEQ ID NO : 108、SEQ ID NO : 109、SEQ ID NO : 111およびSEQ ID NO : 112からなる群より選択される。

40

【0012】

本発明のもう1つの態様は、上記の核酸分子のいずれかによってコードされる、単離されたタンパク質に関する。

【0013】

本発明のもう1つの態様は、発現制御配列と機能的に連結された、上記の核酸分子のい

50

ずれかを含む組換え核酸分子に関する。

【 0 0 1 4 】

本発明のさらにもう1つの態様は、上記の組換え核酸分子のいずれかを含む組換え宿主細胞に関する。1つの局面において、宿主細胞は微生物である。もう1つの局面において、宿主細胞は植物細胞である。

【 0 0 1 5 】

本発明のもう1つの態様は、遺伝的に改変された生物であって、上記の核酸分子のいずれかまたはそれらの任意の組み合わせを発現するように遺伝的に改変された生物に関する。1つの局面において、生物はPUFAシンターゼおよびホスホパンテティニルトランスフェラーゼ（PPTアーゼ）を発現する。1つの局面において、生物はシンターゼおよびPPTアーゼを発現するように遺伝的に改変されている。1つの局面において、それは、生物によって発現される脂肪酸シンターゼ（FAS）を欠失または不活性化させるためのさらなる遺伝的改変を含む。1つの局面において、生物は、生物における、マロニルCoAをめぐるPUFAシンターゼとの競合を減少させるため、またはマロニルCoAのレベルを上昇させるためのさらなる遺伝的改変を含む。

【 0 0 1 6 】

もう1つの態様は、遺伝的に改変された生物であって、少なくとも1つの多価不飽和脂肪酸（PUFA）および1つのホスホパンテティニルトランスフェラーゼ（PPTアーゼ）を生成するPUFAシンターゼを発現し、かつ、長鎖PUFA遊離脂肪酸（FFA）のアシル-CoAへの変換を触媒する1つまたは複数の異種アシル-CoAシンターゼ（ACoAS）またはそれらの相同体を発現するための遺伝的改変を含む生物に関する。1つの局面において、生物は、PUFAシンターゼを内因的に発現する生物由来のアシル-CoAシンターゼ（ACoAS）またはその相同体をコードする核酸配列を含む核酸分子によって形質転換されている。1つの局面において、生物は、クリプテコディニウム・コーニイ（*Cryptocodinium cohnii*）由来のアシル-CoAシンターゼ（ACoAS）またはその相同体をコードする核酸配列を含む核酸分子によって形質転換されており、そのACoASまたはその相同体は長鎖PUFA遊離脂肪酸（FFA）のアシル-CoAへの変換を触媒する。1つの局面において、生物は、ヤブレッツボカビ目の微生物由来のアシル-CoAシンターゼ（ACoAS）またはその相同体をコードする核酸配列を含む核酸分子によって形質転換されており、そのACoASまたはその相同体は長鎖PUFA遊離脂肪酸（FFA）のアシル-CoAへの変換を触媒する。1つの局面において、生物は、シゾキトリウム属由来のアシル-CoAシンターゼ（ACoAS）またはその相同体をコードする核酸配列を含む核酸分子によって形質転換されており、そのACoASまたはその相同体は長鎖PUFA遊離脂肪酸（FFA）のアシル-CoAへの変換を触媒する。1つの局面において、生物は、生物によって発現される脂肪酸シンターゼ（FAS）を欠失または不活性化させるためのさらなる遺伝的改変を含む。1つの局面において、生物は、生物における、マロニルCoAをめぐるPUFAシンターゼとの競合を減少させるため、またはマロニルCoAのレベルを上昇させるためのさらなる遺伝的改変を含む。1つの局面において、生物は、PUFAを内因的に産生する生物由来の1つまたは複数の異種タンパク質を発現するためのさらなる遺伝的改変を含み、そのタンパク質はリン脂質（PL）またはトリアシルグリセロール（TAG）の生成においてPUFA-CoAを基質として利用する。

【 0 0 1 7 】

もう1つの態様は、遺伝的に改変された生物であって、少なくとも1つの多価不飽和脂肪酸（PUFA）を生成するPUFAシンターゼおよびホスホパンテティニルトランスフェラーゼ（PPTアーゼ）を発現し、かつ、生物によって発現される脂肪酸シンターゼ（FAS）を欠失または不活性化させるための遺伝的改変を含む生物に関する。1つの局面において、生物は、生物における、マロニルCoAをめぐるPUFAシンターゼとの競合を減少させるため、またはマロニルCoAのレベルを上昇させるためのさらなる遺伝的改変を含む。

【 0 0 1 8 】

もう1つの態様は、遺伝的に改変された生物であって、少なくとも1つの多価不飽和脂肪酸（PUFA）を生成するPUFAシンターゼおよびホスホパンテティニルトランスフェラーゼ（

10

20

30

40

50

PPTアーゼ)を発現し、かつ、生物における、マロニルCoAをめぐるPUFAシンターゼとの競合を減少させるため、またはマロニルCoAのレベルを上昇させるための遺伝的改変を含む生物に関する。1つの局面において、生物は、生物によって発現される脂肪酸シンターゼ(FAS)を欠失または不活性化させるためのさらなる遺伝的改変を含む。

【0019】

さらにもう1つの態様は、遺伝的に改変された生物であって、少なくとも1つの多価不飽和脂肪酸(PUFA)を生成するPUFAシンターゼおよびホスホパンテティニルトランスフェラーゼ(PPTアーゼ)を発現し、かつ、PUFAを内因的に産生する生物由来の1つまたは複数の異種タンパク質を発現するための遺伝的改変を含み、そのタンパク質がリン脂質(PL)またはトリアシルグリセロール(TAG)の生成においてPUFA-CoAを基質として利用する、生物に関する。1つの局面において、タンパク質はDAGATまたはLPAATである。1つの局面において、生物は、リン脂質(PL)またはトリアシルグリセロール(TAG)の生成においてPUFA-CoAを基質として利用するヤブレッツボカビ科またはラビリンチュラ科(Labyrinthulid)由来のタンパク質をコードする核酸配列を含む核酸分子によって形質転換されている。1つの局面において、生物は、リン脂質(PL)またはトリアシルグリセロール(TAG)においてPUFA-CoAを基質として利用するシゾキトリウム属由来のタンパク質をコードする核酸配列を含む核酸分子によって形質転換されている。1つの局面において、生物は、長鎖PUFA遊離脂肪酸(FFA)のアシル-CoAへの変換を触媒する1つまたは複数の異種アシル-CoAシンターゼ(ACoAS)またはその相同体を発現するためのさらなる改変を含む。1つの局面において、生物は、生物によって発現される脂肪酸シンターゼ(FAS)を欠失または不活性化させるためのさらなる遺伝的改変を含む。1つの局面において、生物は、生物における、マロニルCoAをめぐるPUFAシンターゼとの競合を減少させるため、またはマロニルCoAのレベルを上昇させるためのさらなる遺伝的改変を含む。

【0020】

1つの態様において、本発明は、微生物、植物、植物の部分または植物細胞を含む、遺伝的に改変された生物であって、少なくとも1つの多価不飽和脂肪酸(PUFA)を生成するPUFAシンターゼおよびホスホパンテティニルトランスフェラーゼ(PPTアーゼ)によって遺伝的に改変されており、かつ、KASIIおよびKASIIIからなる群より選択されるタンパク質の発現または活性を阻害するための遺伝的改変を含む生物を提供する。

【0021】

もう1つの態様において、本発明は、微生物、植物、植物の部分または植物細胞を含む、遺伝的に改変された生物であって、少なくとも1つの多価不飽和脂肪酸(PUFA)を生成するPUFAシンターゼおよびホスホパンテティニルトランスフェラーゼ(PPTアーゼ)によって遺伝的に改変されており、PUFAシンターゼまたはPPTアーゼをコードする少なくとも1つの核酸分子が、SEQ ID NO: 81によって表されるプラスチドターゲティング配列をコードする核酸配列と機能的に連結されている、生物を提供する。

【0022】

1つのさらなる態様において、本発明は、微生物、植物、植物の部分または植物細胞を含む、遺伝的に改変された生物であって、少なくとも1つの多価不飽和脂肪酸(PUFA)を生成するPUFAシンターゼおよびホスホパンテティニルトランスフェラーゼ(PPTアーゼ)によって遺伝的に改変されており、KASIIおよびKASIIIからなる群より選択されるタンパク質の発現または活性を阻害するための遺伝的改変を含み、かつ、長鎖PUFA遊離脂肪酸(FFA)のアシル-CoAへの変換を触媒する1つまたは複数の異種アシル-CoAシンターゼ(ACoAS)またはその相同体を発現するためのさらなる遺伝的改変を含む生物を提供する。

【0023】

さらにもう1つのさらなる態様において、本発明は、微生物、植物、植物の部分または植物細胞を含む、遺伝的に改変された生物であって、少なくとも1つの多価不飽和脂肪酸(PUFA)を生成するPUFAシンターゼおよびホスホパンテティニルトランスフェラーゼ(PPTアーゼ)によって遺伝的に改変されている生物を提供する；ここでPUFAシンターゼまたはPPTアーゼをコードする少なくとも1つの核酸分子は、SEQ ID NO: 81によって表される

ものを非限定的に含むプラスチドターゲット配列をコードする核酸配列と機能的に連結されている；または、ここで生物は、長鎖PUFA遊離脂肪酸（FFA）のアシル-CoAへの変換を触媒する1つまたは複数の異種アシル-CoAシンターゼ（ACoAS）またはその相同体を発現するためのさらなる遺伝的改変を含む。

【0024】

1つの態様において、本発明は、微生物、植物、植物の部分または植物細胞を含む、遺伝的に改変された生物であって、少なくとも1つの多価不飽和脂肪酸（PUFA）を生成するPUFAシンターゼおよびホスホパンテティニルトランスフェラーゼ（PPTアーゼ）によって遺伝的に改変された生物を提供する；ここで生物は、タンパク質、例えばKASIIおよびKASIIIからなる群より選択されるタンパク質の発現または活性を阻害するための遺伝的改変を含む；ここで生物は、PUFAを内因的に産生する生物由来の1つまたは複数の異種タンパク質を発現するためのさらなる遺伝的改変を含む；かつ、ここでそのタンパク質は、リン脂質（PL）またはトリアシルグリセロール（TAG）の生成においてPUFA-CoAを基質として利用する。

10

【0025】

さらにもう1つの態様において、本発明は、微生物、植物、植物の部分または植物細胞を含む、遺伝的に改変された生物であって、少なくとも1つの多価不飽和脂肪酸（PUFA）を生成するPUFAシンターゼおよびホスホパンテティニルトランスフェラーゼ（PPTアーゼ）によって遺伝的に改変された生物を提供する；ここで生物は、タンパク質、例えばKASIIおよびKASIIIからなる群より選択されるタンパク質の発現または活性を阻害するための遺伝的改変を含む；ここで生物は、PUFAを内因的に産生する生物由来の1つまたは複数の異種タンパク質を発現するためのさらなる遺伝的改変を含む；ここでそのタンパク質は、リン脂質（PL）またはトリアシルグリセロール（TAG）の生成においてPUFA-CoAを基質として利用する；かつ、ここで生物は、長鎖PUFA遊離脂肪酸（FFA）のアシル-CoAへの変換を触媒する1つまたは複数の異種アシル-CoAシンターゼ（ACoAS）またはその相同体を発現するためのさらなる遺伝的改変を含む。

20

【0026】

もう1つの態様において、本発明は、微生物、植物、植物の部分または植物細胞を含む、遺伝的に改変された生物であって、少なくとも1つの多価不飽和脂肪酸（PUFA）を生成するPUFAシンターゼおよびホスホパンテティニルトランスフェラーゼ（PPTアーゼ）によって遺伝的に改変された生物を提供する；ここでPUFAシンターゼまたはPPTアーゼをコードする少なくとも1つの核酸分子は、SEQ ID NO：81によって表されるものを非限定的に含むプラスチドターゲット配列をコードする核酸配列と機能的に連結されている；ここで生物は、PUFAを内因的に産生する生物由来の1つまたは複数の異種タンパク質を発現するためのさらなる遺伝的改変を含み、そのタンパク質はリン脂質（PL）またはトリアシルグリセロール（TAG）の生成においてPUFA-CoAを基質として利用する。

30

【0027】

もう1つの態様において、本発明は、微生物、植物、植物の部分または植物細胞を含む、遺伝的に改変された生物であって、少なくとも1つの多価不飽和脂肪酸（PUFA）を生成するPUFAシンターゼおよびホスホパンテティニルトランスフェラーゼ（PPTアーゼ）によって遺伝的に改変された生物を提供する；ここでPUFAシンターゼまたはPPTアーゼをコードする少なくとも1つの核酸分子は、SEQ ID NO：81によって表されるものを非限定的に含むプラスチドターゲット配列をコードする核酸配列と機能的に連結されている；ここで生物は、PUFAを内因的に産生する生物由来の1つまたは複数の異種タンパク質を発現するためのさらなる遺伝的改変を含み、そのタンパク質はリン脂質（PL）またはトリアシルグリセロール（TAG）の生成においてPUFA-CoAを基質として利用する；かつ、ここで生物は、長鎖PUFA遊離脂肪酸（FFA）のアシル-CoAへの変換を触媒する1つまたは複数の異種アシル-CoAシンターゼ（ACoAS）またはその相同体を発現するためのさらなる遺伝的改変を含む。

40

【0028】

50



1つの態様において、本発明は、微生物、植物、植物の部分または植物細胞を含む、遺伝的に改変された生物であって、少なくとも1つの多価不飽和脂肪酸（PUFA）を生成するPUFAシンターゼおよびホスホパンテティニルトランスフェラーゼ（PPTアーゼ）によって遺伝的に改変された生物を提供する；ここで生物は、タンパク質、例えばKASIIおよびKASIIIからなる群より選択されるタンパク質の発現または活性を阻害するための遺伝的改変を含む；かつ、ここで生物は、内因性の脂肪酸シンターゼ（FAS）または生物によって発現されるFASと関連のあるタンパク質を欠失または不活性化させるためのさらなる遺伝的改変を含む。

【0029】

1つの態様において、本発明は、微生物、植物、植物の部分または植物細胞を含む、遺伝的に改変された生物であって、少なくとも1つの多価不飽和脂肪酸（PUFA）を生成するPUFAシンターゼおよびホスホパンテティニルトランスフェラーゼ（PPTアーゼ）によって遺伝的に改変された生物を提供する；ここで生物は、タンパク質、例えばKASIIおよびKASIIIからなる群より選択されるタンパク質の発現または活性を阻害するための遺伝的改変を含む；ここで生物は、内因性の脂肪酸シンターゼ（FAS）または生物によって発現されるFASと関連のあるタンパク質を欠失または不活性化させるためのさらなる遺伝的改変を含む；かつ、ここで生物は、長鎖PUFA遊離脂肪酸（FFA）のアシル-CoAへの変換を触媒する1つまたは複数の異種アシル-CoAシンテターゼ（ACoAS）またはその相同体を発現するためのさらなる遺伝的改変を含む。

【0030】

1つの態様において、本発明は、微生物、植物、植物の部分または植物細胞を含む、遺伝的に改変された生物であって、少なくとも1つの多価不飽和脂肪酸（PUFA）を生成するPUFAシンターゼおよびホスホパンテティニルトランスフェラーゼ（PPTアーゼ）によって遺伝的に改変された生物を提供する；ここで生物は、タンパク質、例えばKASIIおよびKASIIIからなる群より選択されるタンパク質の発現または活性を阻害するための遺伝的改変を含む；ここで生物は、内因性の脂肪酸シンターゼ（FAS）または生物によって発現されるFASと関連のあるタンパク質を欠失または不活性化させるためのさらなる遺伝的改変を含む；ここで生物は、PUFAを内因的に産生する生物由来の1つまたは複数の異種タンパク質を発現するためのさらなる遺伝的改変を含む；かつ、ここでそのタンパク質は、リン脂質（PL）またはトリアシルグリセロール（TAG）の生成においてPUFA-CoAを基質として利用する。

【0031】

1つの態様において、本発明は、微生物、植物、植物の部分または植物細胞を含む、遺伝的に改変された生物であって、少なくとも1つの多価不飽和脂肪酸（PUFA）を生成するPUFAシンターゼおよびホスホパンテティニルトランスフェラーゼ（PPTアーゼ）によって遺伝的に改変された生物を提供する；ここで生物は、タンパク質、例えばKASIIおよびKASIIIからなる群より選択されるタンパク質の発現または活性を阻害するための遺伝的改変を含む；ここで生物は、内因性の脂肪酸シンターゼ（FAS）または生物によって発現されるFASと関連のあるタンパク質を欠失または不活性化させるためのさらなる遺伝的改変を含む；ここで生物は、長鎖PUFA遊離脂肪酸（FFA）のアシル-CoAへの変換を触媒する1つまたは複数の異種アシル-CoAシンテターゼ（ACoAS）またはその相同体を発現するためのさらなる遺伝的改変を含む；ここで生物は、PUFAを内因的に産生する生物由来の1つまたは複数の異種タンパク質を発現するためのさらなる遺伝的改変を含む；かつ、ここでそのタンパク質は、リン脂質（PL）またはトリアシルグリセロール（TAG）の生成においてPUFA-CoAを基質として利用する。もう1つの態様において、本発明は、微生物、植物、植物の部分または植物細胞を含む、遺伝的に改変された生物であって、少なくとも1つの多価不飽和脂肪酸（PUFA）を生成するPUFAシンターゼおよびホスホパンテティニルトランスフェラーゼ（PPTアーゼ）によって遺伝的に改変された生物を提供する；ここでPUFAシンターゼまたはPPTアーゼをコードする少なくとも1つの核酸分子は、SEQ ID NO：81によって表されるものを非限定的に含むプラスチドターゲティング配列をコードする核酸配列と機能的に

連結されている；かつ、ここで生物は、内因性の脂肪酸シンターゼ（FAS）または生物によって発現されるFASと関連のあるタンパク質を欠失または不活性化させるためのさらなる遺伝的改変を含む。

【0032】

もう1つの態様において、本発明は、微生物、植物、植物の部分または植物細胞を含む、遺伝的に改変された生物であって、少なくとも1つの多価不飽和脂肪酸（PUFA）を生成するPUFAシンターゼおよびホスホパンテティニルトランスフェラーゼ（PPTアーゼ）によって遺伝的に改変された生物を提供する；ここでPUFAシンターゼまたはPPTアーゼをコードする少なくとも1つの核酸分子は、SEQ ID NO：81によって表されるものを非限定的に含むプラスチドターゲット配列をコードする核酸配列と機能的に連結されている；ここで生物は、内因性の脂肪酸シンターゼ（FAS）または生物によって発現されるFASと関連のあるタンパク質を欠失または不活性化させるためのさらなる遺伝的改変を含む；かつ、ここで生物は、長鎖PUFA遊離脂肪酸（FFA）のアシル-CoAへの変換を触媒する1つまたは複数の異種アシル-CoAシンターゼ（ACoAS）またはその相同体を発現するためのさらなる遺伝的改変を含む。

10

【0033】

もう1つの態様において、本発明は、微生物、植物、植物の部分または植物細胞を含む、遺伝的に改変された生物であって、少なくとも1つの多価不飽和脂肪酸（PUFA）を生成するPUFAシンターゼおよびホスホパンテティニルトランスフェラーゼ（PPTアーゼ）によって遺伝的に改変された生物を提供する；ここでPUFAシンターゼまたはPPTアーゼをコードする少なくとも1つの核酸分子は、SEQ ID NO：81によって表されるものを非限定的に含むプラスチドターゲット配列をコードする核酸配列と機能的に連結されている；ここで生物は、内因性の脂肪酸シンターゼ（FAS）または生物によって発現されるFASと関連のあるタンパク質を欠失または不活性化させるためのさらなる遺伝的改変を含む；ここで生物は、PUFAを内因的に産生する生物由来の1つまたは複数の異種タンパク質を発現するためのさらなる遺伝的改変を含む；かつ、ここでそのタンパク質は、リン脂質（PL）またはトリアシルグリセロール（TAG）の生成においてPUFA-CoAを基質として利用する。

20

【0034】

もう1つの態様において、本発明は、微生物、植物、植物の部分または植物細胞を含む、遺伝的に改変された生物であって、少なくとも1つの多価不飽和脂肪酸（PUFA）を生成するPUFAシンターゼおよびホスホパンテティニルトランスフェラーゼ（PPTアーゼ）によって遺伝的に改変された生物を提供する；ここでPUFAシンターゼまたはPPTアーゼをコードする少なくとも1つの核酸分子は、SEQ ID NO：81によって表されるものを非限定的に含むプラスチドターゲット配列をコードする核酸配列と機能的に連結されている；ここで生物は、内因性の脂肪酸シンターゼ（FAS）または生物によって発現されるFASと関連のあるタンパク質を欠失または不活性化させるためのさらなる遺伝的改変を含む；ここで生物は、長鎖PUFA遊離脂肪酸（FFA）のアシル-CoAへの変換を触媒する1つまたは複数の異種アシル-CoAシンターゼ（ACoAS）またはその相同体を発現するためのさらなる遺伝的改変を含む；かつ、ここで生物は、PUFAを内因的に産生する生物由来の1つまたは複数の異種タンパク質を発現するためのさらなる遺伝的改変を含む；かつ、ここでそのタンパク質は、リン脂質（PL）またはトリアシルグリセロール（TAG）の生成においてPUFA-CoAを基質として利用する。

30

40

【0035】

1つの態様において、本発明は、微生物、植物、植物の部分または植物細胞を含む、遺伝的に改変された生物であって、少なくとも1つの多価不飽和脂肪酸（PUFA）を生成するPUFAシンターゼおよびホスホパンテティニルトランスフェラーゼ（PPTアーゼ）によって遺伝的に改変されており、タンパク質、例えばKASIIおよびKASIIIからなる群より選択されるタンパク質の発現または活性を阻害するための遺伝的改変を含む生物を提供する；かつ、生物は、生物における、マロニルCoAをめぐるPUFAシンターゼとの競合を減少させるため、またはマロニルCoAのレベルを上昇させるためのさらなる遺伝的改変を含む。

50

## 【0036】

1つの態様において、本発明は、微生物、植物、植物の部分または植物細胞を含む、遺伝的に改変された生物であって、少なくとも1つの多価不飽和脂肪酸（PUFA）を生成するPUFAシンターゼおよびホスホパンテティニルトランスフェラーゼ（PPTアーゼ）によって遺伝的に改変されており、タンパク質、例えばKASIIおよびKASIIIからなる群より選択されるタンパク質の発現または活性を阻害するための遺伝的改変を含み、かつ、生物における、マロニルCoAをめぐるPUFAシンターゼとの競合を減少させるため、またはマロニルCoAのレベルを上昇させるためのさらなる遺伝的改変を含む生物を提供する；ここで生物は、長鎖PUFA遊離脂肪酸（FFA）のアシル-CoAへの変換を触媒する1つまたは複数の異種アシル-CoAシンターゼ（ACoAS）またはその相同体を発現するためのさらなる遺伝的改変を含む。

10

## 【0037】

1つの態様において、本発明は、微生物、植物、植物の部分または植物細胞を含む、遺伝的に改変された生物であって、少なくとも1つの多価不飽和脂肪酸（PUFA）を生成するPUFAシンターゼおよびホスホパンテティニルトランスフェラーゼ（PPTアーゼ）によって遺伝的に改変されており、タンパク質、例えばKASIIおよびKASIIIからなる群より選択されるタンパク質の発現または活性を阻害するための遺伝的改変を含み、かつ、生物における、マロニルCoAをめぐるPUFAシンターゼとの競合を減少させるため、またはマロニルCoAのレベルを上昇させるためのさらなる遺伝的改変を含む生物を提供する；ここで生物は、PUFAを内因的に産生する生物由来の1つまたは複数の異種タンパク質を発現するためのさらなる遺伝的改変を含む；かつ、ここでそのタンパク質は、リン脂質（PL）またはトリアシルグリセロール（TAG）の生成においてPUFA-CoAを基質として利用する。

20

## 【0038】

1つの態様において、本発明は、微生物、植物、植物の部分または植物細胞を含む、遺伝的に改変された生物であって、少なくとも1つの多価不飽和脂肪酸（PUFA）を生成するPUFAシンターゼおよびホスホパンテティニルトランスフェラーゼ（PPTアーゼ）によって遺伝的に改変されており、タンパク質、例えばKASIIおよびKASIIIからなる群より選択されるタンパク質の発現または活性を阻害するための遺伝的改変を含み、かつ、生物における、マロニルCoAをめぐるPUFAシンターゼとの競合を減少させるため、またはマロニルCoAのレベルを上昇させるためのさらなる遺伝的改変を含む生物を提供する；ここで生物は、内因性の脂肪酸シンターゼ（FAS）または生物によって発現されるFASと関連のあるタンパク質を欠失または不活性化させるためのさらなる遺伝的改変を含む。

30

## 【0039】

1つの態様において、本発明は、微生物、植物、植物の部分または植物細胞を含む、遺伝的に改変された生物であって、少なくとも1つの多価不飽和脂肪酸（PUFA）を生成するPUFAシンターゼおよびホスホパンテティニルトランスフェラーゼ（PPTアーゼ）によって遺伝的に改変されており、タンパク質、例えばKASIIおよびKASIIIからなる群より選択されるタンパク質の発現または活性を阻害するための遺伝的改変を含み、かつ、生物における、マロニルCoAをめぐるPUFAシンターゼとの競合を減少させるため、またはマロニルCoAのレベルを上昇させるためのさらなる遺伝的改変を含む生物を提供する；ここで生物は、長鎖PUFA遊離脂肪酸（FFA）のアシル-CoAへの変換を触媒する1つまたは複数の異種アシル-CoAシンターゼ（ACoAS）またはその相同体を発現するためのさらなる遺伝的改変を含む；ここで生物は、PUFAを内因的に産生する生物由来の1つまたは複数の異種タンパク質を発現するためのさらなる遺伝的改変を含む；かつ、ここでそのタンパク質は、リン脂質（PL）またはトリアシルグリセロール（TAG）の生成においてPUFA-CoAを基質として利用する。

40

## 【0040】

1つの態様において、本発明は、微生物、植物、植物の部分または植物細胞を含む、遺伝的に改変された生物であって、少なくとも1つの多価不飽和脂肪酸（PUFA）を生成するPUFAシンターゼおよびホスホパンテティニルトランスフェラーゼ（PPTアーゼ）によって遺

50

伝的に改変されており、タンパク質、例えばKASIIおよびKASIIIからなる群より選択されるタンパク質の発現または活性を阻害するための遺伝的改変を含み、かつ、生物における、マロニルCoAをめぐるPUFAシンターゼとの競合を減少させるため、またはマロニルCoAのレベルを上昇させるためのさらなる遺伝的改変を含む生物を提供する；ここで生物は、長鎖PUFA遊離脂肪酸（FFA）のアシル-CoAへの変換を触媒する1つまたは複数の異種アシル-CoAシンターゼ（ACoAS）またはその相同体を発現するためのさらなる遺伝的改変を含む；かつ、ここで生物は、内因性の脂肪酸シンターゼ（FAS）または生物によって発現されるFASと関連のあるタンパク質を欠失または不活性化させるためのさらなる遺伝的改変を含む。

#### 【0041】

1つの態様において、本発明は、微生物、植物、植物の部分または植物細胞を含む、遺伝的に改変された生物であって、少なくとも1つの多価不飽和脂肪酸（PUFA）を生成するPUFAシンターゼおよびホスホパンテティニルトランスフェラーゼ（PPTアーゼ）によって遺伝的に改変されており、タンパク質、例えばKASIIおよびKASIIIからなる群より選択されるタンパク質の発現または活性を阻害するための遺伝的改変を含み、かつ、生物における、マロニルCoAをめぐるPUFAシンターゼとの競合を減少させるため、またはマロニルCoAのレベルを上昇させるためのさらなる遺伝的改変を含む生物を提供する；ここで生物は、PUFAを内因的に産生する生物由来の1つまたは複数の異種タンパク質を発現するためのさらなる遺伝的改変を含む生物を提供する；ここでそのタンパク質は、リン脂質（PL）またはトリアシルグリセロール（TAG）の生成においてPUFA-CoAを基質として利用する；かつ、ここで生物は、内因性の脂肪酸シンターゼ（FAS）または生物によって発現されるFASと関連のあるタンパク質を欠失または不活性化させるためのさらなる遺伝的改変を含む。

#### 【0042】

1つの態様において、本発明は、微生物、植物、植物の部分または植物細胞を含む、遺伝的に改変された生物であって、少なくとも1つの多価不飽和脂肪酸（PUFA）を生成するPUFAシンターゼおよびホスホパンテティニルトランスフェラーゼ（PPTアーゼ）によって遺伝的に改変されており、タンパク質、例えばKASIIおよびKASIIIからなる群より選択されるタンパク質の発現または活性を阻害するための遺伝的改変を含み、かつ、生物における、マロニルCoAをめぐるPUFAシンターゼとの競合を減少させるため、またはマロニルCoAのレベルを上昇させるためのさらなる遺伝的改変を含む生物を提供する；ここで生物は、長鎖PUFA遊離脂肪酸（FFA）のアシル-CoAへの変換を触媒する1つまたは複数の異種アシル-CoAシンターゼ（ACoAS）またはその相同体を発現するためのさらなる遺伝的改変を含む；ここで生物は、PUFAを内因的に産生する生物由来の1つまたは複数の異種タンパク質を発現するためのさらなる遺伝的改変を含む；ここでそのタンパク質は、リン脂質（PL）またはトリアシルグリセロール（TAG）の生成においてPUFA-CoAを基質として利用する；かつ、ここで生物は、内因性の脂肪酸シンターゼ（FAS）または生物によって発現されるFASと関連のあるタンパク質を欠失または不活性化させるためのさらなる遺伝的改変を含む。

#### 【0043】

もう1つの態様において、本発明は、微生物、植物、植物の部分または植物細胞を含む、遺伝的に改変された生物であって、少なくとも1つの多価不飽和脂肪酸（PUFA）を生成するPUFAシンターゼおよびホスホパンテティニルトランスフェラーゼ（PPTアーゼ）によって遺伝的に改変されており、PUFAシンターゼまたはPPTアーゼをコードする少なくとも1つの核酸分子が、SEQ ID NO：81によって表されるものを非限定的に含むプラスチドターゲット配列をコードする核酸配列と機能的に連結されており、かつ、生物における、マロニルCoAをめぐるPUFAシンターゼとの競合を減少させるため、またはマロニルCoAのレベルを上昇させるためのさらなる遺伝的改変を含む生物を提供する。

#### 【0044】

もう1つの態様において、本発明は、微生物、植物、植物の部分または植物細胞を含む、遺伝的に改変された生物であって、少なくとも1つの多価不飽和脂肪酸（PUFA）を生成するPUFAシンターゼおよびホスホパンテティニルトランスフェラーゼ（PPTアーゼ）によ

って遺伝的に改変されており、PUFAシンターゼまたはPPTアーゼをコードする少なくとも1つの核酸分子が、SEQ ID NO: 81によって表されるものを非限定的に含むプラスチドターゲット配列をコードする核酸配列と機能的に連結されており、かつ、生物における、マロニルCoAをめぐるPUFAシンターゼとの競合を減少させるため、またはマロニルCoAのレベルを上昇させるためのさらなる遺伝的改変を含む生物を提供する；かつ、ここで生物は、長鎖PUFA遊離脂肪酸（FFA）のアシル-CoAへの変換を触媒する1つまたは複数の異種アシル-CoAシンターゼ（ACoAS）またはその相同体を発現するためのさらなる遺伝的改変を含む。

【0045】

もう1つの態様において、本発明は、微生物、植物、植物の部分または植物細胞を含む、遺伝的に改変された生物であって、少なくとも1つの多価不飽和脂肪酸（PUFA）を生成するPUFAシンターゼおよびホスホパンテティニルトランスフェラーゼ（PPTアーゼ）によって遺伝的に改変されており、PUFAシンターゼまたはPPTアーゼをコードする少なくとも1つの核酸分子が、SEQ ID NO: 81によって表されるものを非限定的に含むプラスチドターゲット配列をコードする核酸配列と機能的に連結されており、かつ、生物における、マロニルCoAをめぐるPUFAシンターゼとの競合を減少させるため、またはマロニルCoAのレベルを上昇させるためのさらなる遺伝的改変を含む生物を提供する；ここで生物は、PUFAを内因的に産生する生物由来の1つまたは複数の異種タンパク質を発現するためのさらなる遺伝的改変を含む；かつ、ここでそのタンパク質は、リン脂質（PL）またはトリアシルグリセロール（TAG）の生成においてPUFA-CoAを基質として利用する。

【0046】

もう1つの態様において、本発明は、微生物、植物、植物の部分または植物細胞を含む、遺伝的に改変された生物であって、少なくとも1つの多価不飽和脂肪酸（PUFA）を生成するPUFAシンターゼおよびホスホパンテティニルトランスフェラーゼ（PPTアーゼ）によって遺伝的に改変されており、PUFAシンターゼまたはPPTアーゼをコードする少なくとも1つの核酸分子が、SEQ ID NO: 81によって表されるものを非限定的に含むプラスチドターゲット配列をコードする核酸配列と機能的に連結されており、かつ、生物における、マロニルCoAをめぐるPUFAシンターゼとの競合を減少させるため、またはマロニルCoAのレベルを上昇させるためのさらなる遺伝的改変を含む生物を提供する；ここで生物は、内因性の脂肪酸シンターゼ（FAS）または生物によって発現されるFASと関連のあるタンパク質を欠失または不活性化させるためのさらなる遺伝的改変を含む。

【0047】

もう1つの態様において、本発明は、微生物、植物、植物の部分または植物細胞を含む、遺伝的に改変された生物であって、少なくとも1つの多価不飽和脂肪酸（PUFA）を生成するPUFAシンターゼおよびホスホパンテティニルトランスフェラーゼ（PPTアーゼ）によって遺伝的に改変されており、PUFAシンターゼまたはPPTアーゼをコードする少なくとも1つの核酸分子が、SEQ ID NO: 81によって表されるものを非限定的に含むプラスチドターゲット配列をコードする核酸配列と機能的に連結されており、かつ、生物における、マロニルCoAをめぐるPUFAシンターゼとの競合を減少させるため、またはマロニルCoAのレベルを上昇させるためのさらなる遺伝的改変を含む生物を提供する；ここで生物は、長鎖PUFA遊離脂肪酸（FFA）のアシル-CoAへの変換を触媒する1つまたは複数の異種アシル-CoAシンターゼ（ACoAS）またはその相同体を発現するためのさらなる遺伝的改変を含む；ここで生物は、PUFAを内因的に産生する生物由来の1つまたは複数の異種タンパク質を発現するためのさらなる遺伝的改変を含む；かつ、ここでそのタンパク質は、リン脂質（PL）またはトリアシルグリセロール（TAG）の生成においてPUFA-CoAを基質として利用する。

【0048】

もう1つの態様において、本発明は、微生物、植物、植物の部分または植物細胞を含む、遺伝的に改変された生物であって、少なくとも1つの多価不飽和脂肪酸（PUFA）を生成するPUFAシンターゼおよびホスホパンテティニルトランスフェラーゼ（PPTアーゼ）によ

って遺伝的に改変されており、PUFAシンターゼまたはPPTアーゼをコードする少なくとも1つの核酸分子が、SEQ ID NO: 81によって表されるものを非限定的に含むプラスチドターゲット配列をコードする核酸配列と機能的に連結されており、かつ、生物における、マロニルCoAをめぐるPUFAシンターゼとの競合を減少させるため、またはマロニルCoAのレベルを上昇させるためのさらなる遺伝的改変を含む生物を提供する；ここで生物は、長鎖PUFA遊離脂肪酸（FFA）のアシル-CoAへの変換を触媒する1つまたは複数の異種アシル-CoAシンターゼ（ACoAS）またはその相同体を発現するためのさらなる遺伝的改変を含む；かつ、ここで生物は、内因性の脂肪酸シンターゼ（FAS）または生物によって発現されるFASと関連のあるタンパク質を欠失または不活性化させるためのさらなる遺伝的改変を含む。

10

#### 【0049】

もう1つの態様において、本発明は、微生物、植物、植物の部分または植物細胞を含む、遺伝的に改変された生物であって、少なくとも1つの多価不飽和脂肪酸（PUFA）を生成するPUFAシンターゼおよびホスホパンテテインルトランスフェラーゼ（PPTアーゼ）によって遺伝的に改変されており、PUFAシンターゼまたはPPTアーゼをコードする少なくとも1つの核酸分子が、SEQ ID NO: 81によって表されるものを非限定的に含むプラスチドターゲット配列をコードする核酸配列と機能的に連結されており、かつ、生物における、マロニルCoAをめぐるPUFAシンターゼとの競合を減少させるため、またはマロニルCoAのレベルを上昇させるためのさらなる遺伝的改変を含む生物を提供する；ここで生物は、PUFAを内因的に産生する生物由来の1つまたは複数の異種タンパク質を発現するためのさらなる遺伝的改変を含む；かつ、ここでそのタンパク質は、リン脂質（PL）またはトリアシルグリセロール（TAG）の生成においてPUFA-CoAを基質として利用する；かつ、ここで生物は、内因性の脂肪酸シンターゼ（FAS）または生物によって発現されるFASと関連のあるタンパク質を欠失または不活性化させるためのさらなる遺伝的改変を含む。

20

#### 【0050】

もう1つの態様において、本発明は、微生物、植物、植物の部分または植物細胞を含む、遺伝的に改変された生物であって、少なくとも1つの多価不飽和脂肪酸（PUFA）を生成するPUFAシンターゼおよびホスホパンテテインルトランスフェラーゼ（PPTアーゼ）によって遺伝的に改変されており、PUFAシンターゼまたはPPTアーゼをコードする少なくとも1つの核酸分子は、SEQ ID NO: 81によって表されるものを非限定的に含むプラスチドターゲット配列をコードする核酸配列と機能的に連結されており、かつ、生物における、マロニルCoAをめぐるPUFAシンターゼとの競合を減少させるため、またはマロニルCoAのレベルを上昇させるためのさらなる遺伝的改変を含む生物を提供する；ここで生物は、長鎖PUFA遊離脂肪酸（FFA）のアシル-CoAへの変換を触媒する1つまたは複数の異種アシル-CoAシンターゼ（ACoAS）またはその相同体を発現するためのさらなる遺伝的改変を含む；ここで生物は、PUFAを内因的に産生する生物由来の1つまたは複数の異種タンパク質を発現するためのさらなる遺伝的改変を含む；かつ、ここでそのタンパク質は、リン脂質（PL）またはトリアシルグリセロール（TAG）の生成においてPUFA-CoAを基質として利用する；かつ、ここで生物は、内因性の脂肪酸シンターゼ（FAS）または生物によって発現されるFASと関連のあるタンパク質を欠失または不活性化させるためのさらなる遺伝的改変を含む。いくつかの態様において、生物は、タンパク質KASIIまたはKASIIIの一方の発現または活性を阻害するための遺伝的改変を含む。

30

40

#### 【0051】

他の態様において、生物は、KASIIまたはKASIIIの前記阻害の非存在下と比較して上昇したレベルの前記少なくとも1つのPUFAを産生する。

#### 【0052】

遺伝的改変は、KASIIの発現もしくは活性を阻害するRNAi構築物、またはKASIIIの発現もしくは活性を阻害するRNAi構築物を用いた生物の形質転換を含みうる。RNAi構築物には、SEQ ID NO: 122またはSEQ ID NO: 124によって本明細書で表される核酸配列が含まれる。

50

## 【 0 0 5 3 】

他の態様において、遺伝的改変は、KASIIの発現もしくは活性を阻害するアンチセンス核酸分子、またはKASIIIの発現もしくは活性を阻害するアンチセンス核酸分子を用いた生物の形質転換を含みうる。アンチセンス核酸分子には、SEQ ID NO : 123またはSEQ ID NO : 125によって本明細書中に表される核酸配列が含まれうる。

## 【 0 0 5 4 】

生物が、長鎖PUFA遊離脂肪酸 (FFA) のアシル-CoAへの変換を触媒する1つまたは複数の異種アシル-CoAシンターゼ (ACoAS) またはその相同体を発現するためのさらなる遺伝的改変を含む態様において、生物は、クリプトコディニウム・コーニイ由来のアシル-CoAシンターゼ (ACoAS) またはその相同体をコードする核酸配列を含み、そのACoASまたはその相同体が長鎖PUFA遊離脂肪酸 (FFA) のアシル-CoAへの変換を触媒する、核酸分子によって形質転換させることができる。他の態様において、生物は、シゾキトリウム属由来のアシル-CoAシンターゼ (ACoAS)、またはシゾキトリウム属由来のACoASをコードするアミノ酸配列と少なくとも60%同一な相同体をコードする核酸配列を含み、そのACoASまたはその相同体が長鎖PUFA遊離脂肪酸 (FFA) のアシル-CoAへの変換を触媒する、核酸分子によって形質転換される。さらに他の態様において、生物は、以下からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するACoASと少なくとも60%同一なアシル-CoAシンターゼ (ACoAS) をコードする核酸配列を含む核酸分子によって形質転換される：SEQ ID NO : 83、SEQ ID NO : 85、SEQ ID NO : 87、SEQ ID NO : 89、SEQ ID NO : 91、SEQ ID NO : 93、SEQ ID NO : 95、SEQ ID NO : 97およびSEQ ID NO : 99。さらに他の態様において、生物は、以下からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するアシル-CoAシンターゼ (ACoAS) をコードする核酸配列を含む核酸分子によって：SEQ ID NO : 83、SEQ ID NO : 85、SEQ ID NO : 87、SEQ ID NO : 89、SEQ ID NO : 91、SEQ ID NO : 93、SEQ ID NO : 95、SEQ ID NO : 97およびSEQ ID NO : 99；より好ましくは、以下からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するアシル-CoAシンターゼ (ACoAS) をコードする核酸配列によって形質転換される：SEQ ID NO : 83、SEQ ID NO : 85およびSEQ ID NO : 97。なおさらなる態様において、生物は、SEQ ID NO : 83またはSEQ ID NO : 85のアミノ酸配列を有するアシル-CoAシンターゼ (ACoAS) をコードする核酸配列を含む核酸分子によって、およびSEQ ID NO : 97のアミノ酸配列を有するアシル-CoAシンターゼ (ACoAS) をコードする核酸配列を含む核酸分子によって形質転換される。加えてさらなる態様において、生物は、以下からなる群より選択される核酸配列を含む核酸分子によって形質転換される：SEQ ID NO : 82、SEQ ID NO : 84、SEQ ID NO : 86、SEQ ID NO : 88、SEQ ID NO : 90、SEQ ID NO : 92、SEQ ID NO : 94、SEQ ID NO : 96およびSEQ ID NO : 98。

## 【 0 0 5 5 】

生物が、PUFAを内因的に産生する生物由来の1つまたは複数の異種タンパク質を発現するためのさらなる遺伝的改変を含み；かつ、タンパク質がリン脂質 (PL) またはトリアシルグリセロール (TAG) の生成においてPUFA-CoAを基質として利用する、いくつかの態様において、生物はPUFAシンターゼを内因的に発現する。他の態様において、タンパク質はDAGATまたはLPAATである。他の態様において、生物は、リン脂質 (PL) またはトリアシルグリセロール (TAG) の生成においてPUFA-CoAを基質として利用するヤブレッツボカビ科またはラビリンチュラ科由来のタンパク質をコードする核酸配列を含む核酸分子によって形質転換されている。さらに他の態様において、生物は、リン脂質 (PL) またはトリアシルグリセロール (TAG) の生成においてPUFA-CoAを基質として利用するシゾキトリウム属由来のタンパク質をコードする核酸配列を含む核酸分子によって形質転換されている。いくつかの態様において、核酸配列は、以下からなる群より選択されるアミノ酸配列と少なくとも60%同一なアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする：SEQ ID NO : 102、SEQ ID NO : 104、SEQ ID NO : 107、SEQ ID NO : 110およびSEQ ID NO : 113。他の態様において、生物は、以下からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする核酸配列によって：SEQ ID NO : 102、SEQ ID NO : 104、SEQ ID NO : 107、SEQ ID NO : 110およびSEQ ID NO : 113；より好ましくは、以下からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むタ

ンパク質をコードする核酸配列を含む核酸分子によって形質転換される：SEQ ID NO：102 およびSEQ ID NO：104。さらに他の態様において、生物は、SEQ ID NO：102のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする核酸配列を含む核酸分子、およびSEQ ID NO：104のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする核酸配列によって形質転換される。他の態様において、生物は、以下からなる群より選択される核酸配列を含む核酸分子によって形質転換されている：SEQ ID NO：100、SEQ ID NO：102、SEQ ID NO：103、SEQ ID NO：105、SEQ ID NO：106、SEQ ID NO：108、SEQ ID NO：109、SEQ ID NO：111およびSEQ ID NO：112。また生物は、リン脂質（PL）またはトリアシルグリセロール（TAG）の生成においてPUFA-CoAを基質として利用するクリプテコディニウム-コーニイ由来のタンパク質をコードする核酸配列を含む核酸分子によって形質転換されている。ある態様において、生物は、以下からなる群より選択される核酸配列と少なくとも90%同一な核酸配列を含む核酸分子によって形質転換されている：SEQ ID NO：114、SEQ ID NO：115、SEQ ID NO：116、SEQ ID NO：117、SEQ ID NO：118、SEQ ID NO：119、SEQ ID NO：120およびSEQ ID NO：121。

#### 【0056】

前記の態様のいずれのいくつかの態様において、PUFAシンターゼは、ヤブレッツボカビ科またはラビリンチュラ科由来のPUFAシンターゼからの少なくとも1つの機能性ドメインを含む。いくつかの態様において、PUFAシンターゼは、ヤブレッツボカビ目の微生物由来のPUFAシンターゼからの少なくとも1つの機能性ドメインを含む。他の態様において、PUFAシンターゼは、以下からなる群より選択される生物由来のPUFAシンターゼからの少なくとも1つの機能性ドメインを含む：シゾキトリウム属、ヤブレッツボカビ属、ウルケニア属およびラビリンチュラ属（Labyrinthula）。さらに他の態様において、PUFAシンターゼは、シゾキトリウム属American Type Culture Collection（ATCC）番号20888、ヤブレッツボカビ属23B ATCC番号20892およびこれらの微生物のいずれかの突然変異株からなる群より選択される生物由来のPUFAシンターゼからの少なくとも1つの機能性ドメインを含む。いくつかの態様において、PUFAシンターゼは、海洋細菌由来のPUFAシンターゼからの少なくとも1つの機能性ドメインを含む。他の態様において、PUFAシンターゼは、シュワネラ属、モリテラ属（Moritella）およびフォトバクテリウム属（Photobacterium）属からなる群より選択される生物由来のPUFAシンターゼからの少なくとも1つの機能性ドメインを含む。さらに他の態様において、PUFAシンターゼは、以下を含む1つまたは複数のタンパク質からなる：

- 少なくとも1つのエノイル-ACPレダクターゼ（ER）ドメイン；
- 少なくとも4つのアシルキャリアータンパク質（ACP）ドメイン；
- 少なくとも2つの -ケトアシル-ACPシンターゼ（KS）ドメイン；
- 少なくとも1つのアシルトランスフェラーゼ（AT）ドメイン；
- 少なくとも1つの -ケトアシル-ACPレダクターゼ（KR）ドメイン；
- 少なくとも2つのFabA様 -ヒドロキシアシル-ACPデヒドラーゼ（DH）ドメイン；および
- 少なくとも1つの鎖長因子（CLF）ドメイン；
- 少なくとも1つのマロニル-CoA:ACPアシルトランスフェラーゼ（MAT）ドメイン。

#### 【0057】

さらなる態様において、PUFAシンターゼは、以下を含む1つまたは複数のタンパク質からなる：

- 2つのエノイルACP-レダクターゼ（ER）ドメイン；
- 8つまたは9つのアシルキャリアータンパク質（ACP）ドメイン；
- 2つの -ケトアシル-ACPシンターゼ（KS）ドメイン；
- 1つのアシルトランスフェラーゼ（AT）ドメイン；
- 1つのケトレダクターゼ（KR）ドメイン；
- 2つのFabA様 -ヒドロキシアシル-ACPデヒドラーゼ（DH）ドメイン；
- 1つの鎖長因子（CLF）ドメイン；および
- 1つのマロニルCoA:ACPアシルトランスフェラーゼ（MAT）ドメイン。

#### 【0058】



加えてさらなる態様において、PUFAシンターゼは少なくとも約25 の温度でPUFAを生成する細菌PUFAシンターゼであり、ここでPUFAシンターゼは、以下を含む1つまたは複数のタンパク質からなる：

- 少なくとも1つのエノイルACP-レダクターゼ（ER）ドメイン；
- 少なくとも6つのアシルキャリアータンパク質（ACP）ドメイン；
- 少なくとも2つの  $\beta$ -ケトアシル-ACPシンターゼ（KS）ドメイン；
- 少なくとも1つのアシルトランスフェラーゼ（AT）ドメイン；
- 少なくとも1つのケトレダクターゼ（KR）ドメイン；
- 少なくとも2つのFabA様  $\beta$ -ヒドロキシアシル-ACPデヒドラゼ（DH）ドメイン；
- 少なくとも1つの鎖長因子（CLF）ドメイン；
- 少なくとも1つのマロニル-CoA:ACPアシルトランスフェラーゼ（MAT）ドメイン；および
- 少なくとも1つの4'-ホスホパンテティニルトランスフェラーゼ（PPTアーゼ）ドメイン

10

#### 【0059】

いくつかの態様において、PUFAシンターゼは、以下からなる群より選択される、1つまたは複数の配列を含む：SEQ ID NO：1～32のいずれか1つ、およびSEQ ID NO：35～80のいずれか1つ。

#### 【0060】

いくつかの態様において、PUFAシンターゼをコードする1つまたは複数の核酸配列は、植物または植物細胞におけるPUFAシンターゼの発現を改善するために最適化されている。他の態様において、PUFAシンターゼおよびPPTアーゼの発現は、植物または植物細胞のプラスチドに対してターゲティングされている。

20

#### 【0061】

いくつかの態様において、遺伝的に改変された生物は植物であり、植物は油糧種子植物である。他の態様において、植物は双子葉植物である。さらに他の態様において、植物は、以下からなる群より選択されるが、それらには限定されない：キャノーラ、ダイズ、ナタネ、アマニ、トウモロコシ、ベニバナ、ヒマワリおよびタバコ。

#### 【0062】

さらに他の態様において、遺伝的に改変された生物は、以下からなる群より選択される少なくとも1つの多価不飽和脂肪酸（PUFA）を産生する：EPA（C20:5、n-3）、DHA（C22:6、n-3）、DPA（C22:5、n-6またはn-3）、ARA（C20:4、n-6）、GLA（C18:3、n-6）および/またはSDA（C18:4、n-3））ならびにそれらの任意の組み合わせ。いくつかの態様において、遺伝的に改変された生物は、以下からなる群より選択される少なくとも1つの多価不飽和脂肪酸（PUFA）を産生する：DHA、EPAおよびDPA n-6。他の態様において、遺伝的に改変された生物は、DHAおよびDPA n-6を産生する。さらに他の態様において、遺伝的に改変された生物はARAを産生する。

30

#### 【0063】

いくつかの態様において、遺伝的に改変された生物は、前記少なくとも1つのPUFAを少なくとも0.5重量%産生する。他の態様において、前記少なくとも1つのPUFA以外の、前記PUFAシンターゼによって生成される総脂肪酸は、前記生物によって産生される総脂肪酸の約10重量%未満を構成する。さらに他の態様において、前記少なくとも1つのPUFA以外の、前記PUFAシンターゼによって生成される総脂肪酸は、前記生物によって産生される総脂肪酸の約5重量%未満を構成する。

40

#### 【0064】

加えてさらなる態様において、植物、植物の部分または植物細胞における総脂肪酸プロフィールは、少なくとも20個の炭素および4つまたはそれ以上の炭素-炭素二重結合を有する少なくとも1つの多価不飽和脂肪酸（PUFA）を少なくとも約0.5重量%含み、植物または植物の部分における総脂肪酸プロフィールは、以下のPUFAをすべての合計で5%未満含む： $\beta$ -リノレン酸（GLA；18:3、n-6）、18個の炭素および4つの炭素-炭素二重結合を有するPUFA、20個の炭素および3つの炭素-炭素二重結合を有するPUFA、ならびに22個の炭素お

50

よび2つまたは3つの炭素-炭素二重結合を有するPUFA。

【0065】

加えてさらなる態様において、植物、植物の部分または植物細胞における総脂肪酸プロファイルは、少なくとも20個の炭素および4つまたはそれ以上の炭素-炭素二重結合を有する少なくとも1つの多価不飽和脂肪酸（PUFA）を少なくとも約0.5重量%含み、植物または植物の部分における総脂肪酸プロファイルは、以下のPUFAをそれぞれ1%未満含む： -リノレン酸（GLA；18:3、n-6）、18個の炭素および4つの炭素-炭素二重結合を有するPUFA、20個の炭素および3つの炭素-炭素二重結合を有するPUFA、ならびに22個の炭素および2つまたは3つの炭素-炭素二重結合を有するPUFA。

【0066】

なおさらなる態様において、植物、植物の部分または植物細胞における総脂肪酸プロファイルは、少なくとも20個の炭素および4つまたはそれ以上の炭素-炭素二重結合を有する少なくとも1つの多価不飽和脂肪酸（PUFA）を少なくとも約0.5重量%含む、植物または植物の部分における総脂肪酸プロファイルは、 -リノレン酸（GLA；18:3、n-6）およびジホモ - リノレン酸（DGLAまたはHGLA；20:3、n-6）を2%未満含む。

【0067】

他の態様において、遺伝的に改変された生物における総脂肪酸プロファイルは、 -リノレン酸（GLA；18:3、n-6）およびジホモ - リノレン酸（DGLAまたはHGLA；20:3、n-6）を1重量%未満含む。

【0068】

他の態様において、遺伝的に改変された生物における総脂肪酸プロファイルは、少なくとも20個の炭素および4つまたはそれ以上の炭素-炭素二重結合を有する少なくとも1つの多価不飽和脂肪酸（PUFA）を少なくとも約0.5重量%含み、植物または植物の部分における総脂肪酸プロファイルは、 -リノレン酸（GLA；18:3、n-6）を1%未満含む。

【0069】

他の態様において、遺伝的に改変された生物における総脂肪酸プロファイルは、 -リノレン酸（GLA；18:3、n-6）を0.5重量%未満含む。

【0070】

本発明はまた、本発明の遺伝的に改変された生物のいずれかから得られる油も提供する。1つの態様において、本発明は、検出可能な量のDHA（ドコサヘキサエン酸（C22:6、n-3））およびDPA（ドコサペンタエン酸（C22:5、n-6））を含む油を提供し、ここでDPAn-6とDHAとの比は1:1であるか1:1を上回り、その植物油は本発明の遺伝的に改変された生物のいずれかから得られる。

【0071】

遺伝的に改変された生物が植物である場合、本発明は、その植物から得られる種子を提供する。

【0072】

本発明はまた、本発明の任意の油または種子を含む食品も提供する。

【0073】

本発明はまた、本発明の油を含む医薬生成物も提供する。

【0074】

本発明はまた、本発明の種子から油を回収する段階を含む、少なくとも1つのPUFAを含む油を生産するための方法も提供する。

【0075】

本発明はまた、本発明の任意の遺伝的に改変された生物から油を回収する段階を含む、少なくとも1つのPUFAを含む油を生産するための方法も提供する。

【0076】

本発明はまた、本発明の任意の遺伝的に改変された植物または微生物を成育させる段階を含む、少なくとも1つの多価不飽和脂肪酸（PUFA）を生産するための方法も提供する。

【0077】

10

20

30

40

50

本発明はさらに、少なくとも1つのPUFAを含む栄養補助食品または治療用生成物を個体に対して提供するための方法であって、個体に対して、本発明の遺伝的に改変された生物、本発明の種子、本発明の油、本発明の食品、または本発明の医薬生成物を提供する段階を含む方法を提供する。

【0078】

本発明はまた、前記の遺伝的に改変された生物を作製するための方法であって、PUFAシンターゼおよびPPTアーゼをコードする1つまたは複数の核酸分子によって生物を形質転換する段階を含み、生物がKASIIおよびKASIIIからなる群より選択されるタンパク質の発現または活性を阻害するための遺伝的改変を含む、方法も提供する。

【0079】

本発明はまた、前記の遺伝的に改変された生物を作製するための方法であって、PUFAシンターゼおよびPPTアーゼをコードする1つまたは複数の核酸分子によって生物を形質転換する段階、ならびにKASIIおよびKASIIIからなる群より選択されるタンパク質の発現または活性を阻害するために生物をさらに遺伝的に改変する段階を含む方法も提供する。

【0080】

本発明はまた、PUFAを発現させるために生物を形質転換するための工程であって、PUFAシンターゼをコードする核酸分子、ホスホパンテティニルトランスフェラーゼ（PPTアーゼ）をコードする核酸分子、および本明細書に記載したアシル-CoAシンターゼまたはアシルトランスフェラーゼのいずれかによって生物を形質転換する段階を含む工程も提供する。1つの局面において、生物は、生物によって発現される脂肪酸シンターゼ（FAS）を欠失または不活性化させるための遺伝的改変を含む。1つの局面において、生物は、生物における、マロニルCoAをめぐるPUFAシンターゼとの競合を減少させるため、またはマロニルCoAのレベルを上昇させるための遺伝的改変を含む。生物には、例えば植物または微生物が含まれる。

【0081】

#### 発明の詳細な説明

本発明は一般に、多価不飽和脂肪酸（PUFA）、特に長鎖PUFA（LCPUFA）の生産の改良のための、そのようなPUFAを産生するように遺伝的に改変された宿主生物における、タンパク質または標的（本明細書では一般に「アクセサリータンパク質」または「アクセサリー標的」と称する）およびそのようなタンパク質をコードする核酸分子の提供に関する。本発明はまた、そのようなタンパク質のいくつかを発現するように遺伝的に改変された生物、ならびにそのような生物を作製および使用する方法にも関する。本発明はまた、PUFAを産生する生物に対するさらなる遺伝的改変（PUFAを産生させるための遺伝的改変によるものを含む）にも関し、それには生物における特定の遺伝子または標的の欠失または不活性化が含まれる。特に、本発明は、生物によるPUFA産生および/または蓄積を改善または向上させるための、PUFA PKS系を（内因的に、または遺伝子操作によって）発現する生物の遺伝的改変に関する。例えば、本発明はまた、突然変異誘発、またはプラスチドオルガネラならびにサイトゾルに対する酵素のターゲティングなどによる、基質をめぐる競合する酵素のダウンレギュレーションへの人為的操作、およびより高い酵素活性への人為的操作にも関する。

【0082】

本発明によれば、PUFA PKS系（PUFAシンターゼ系としても知られ、これはPUFA PKS系またはPUFAの産生のためのPKS様の系と互換的に用いられる）を発現するように遺伝的に改変された生物であって、そのような系を、または少なくとも生物の遺伝的な改変に用いられるその特定のPUFA PKS系またはその部分を天然に（内因的に、遺伝的改変を伴わずに）発現しない生物は、生物によって内因的に発現されないPUFA PKS系または別のタンパク質による生物の改変に関して、本明細書で「異種」宿主生物と称することができる。また、本発明の遺伝的改変を、PUFA PKS系を内因的に発現する宿主生物におけるPUFA産生を改良するために用いることもでき、この場合、生物は異なるPUFA PKS系またはその部分によってさらに改変されることはない。

## 【 0 0 8 3 】

より詳細には、本発明者らは、シゾキトリウム属PUFAシンターゼ（主としてDHAおよびDPAAn-6）の脂肪酸生成物がそれらの酵素から遊離脂肪酸（FFA）として放出されること、およびその放出機構が酵素と不可分であることを初めて発見および開示した。この生成物の放出機構はすべてのヤブレッツボカビ科PUFA PKS（PUFAシンターゼ）酵素系の特徴であると考えられており、すべてのラビリンチュラ科の系を含む、すべての真核生物PUFA PKS系の特徴である可能性もある。さらに、本発明者らは、シゾキトリウム属をモデルとして用いて、DHAおよびDPA FFAがその後に、内因性アシル-CoAシンターゼ（ACoASもしくはACS）またはシンターゼの作用によってエステル化されて補酵素A（CoA）となることを示している。これらの活性化型の脂肪酸（アシル-CoA）は続いて、PLおよびTAGを生成する酵素の基質としての役を果たす。

10

## 【 0 0 8 4 】

シゾキトリウム属の内因性酵素は、そのPUFAシンターゼのFFA生成物をアシル-CoAに変換し、続いてそれらをPLおよびTAGの合成に用いる効率が非常に高い。これはシゾキトリウム属の油およびPL画分におけるDHAおよびDPAの蓄積が高レベルであることによって実証される。しかし、理論に拘束されるわけではないが、本発明者らは、PUFAシンターゼ系を形質転換で導入しうる異種宿主に存在するACoAS酵素は、そのような反応を、PUFAシンターゼのドナー生物由来のACoASが行うほど効率的には遂行できないと考えている。加えて、そのような新たな宿主生物においてPLおよびTAGを生成する内因性アシルトランスフェラーゼ酵素は、特にPUFAシンターゼの由来となった生物と比較すると、PUFA-CoAを基質として効率的には利用しないように思われる。本発明者らはまた、ある種の生物由来のアシルトランスフェラーゼが、他の生物由来の同様の酵素よりも、宿主生物の油および油画分におけるPUFA、特にある種のPUFAの蓄積のためには一般により優れた酵素であることも提唱する（例えば、ある生物由来のアシルトランスフェラーゼは、異なる生物由来のアシルトランスフェラーゼよりも、より多くのDHA-CoA単位をTAGに転移させる可能性がある）。したがって、本発明者らは、そのPUFAをPUFAシンターゼ酵素（PUFA PKS系）を介して、または別のアシル鎖合成系を通じて産生し、そのPLおよびTAG中に高レベルのPUFAを蓄積させる、シゾキトリウム属のような、ただしシゾキトリウム属には限定されない生物（例えば、ヤブレッツボカビ科または別の生物、特に別の真核生物）が、そのような酵素をコードする遺伝子の優れた供給源として役立つと考えられることを本明細書で開示する。

20

30

## 【 0 0 8 5 】

PUFAシンターゼからのFFAとしてのPUFA生成物の放出という本発明者らによる発見は、その系を異種宿主に移行させるという点で課題および機会の両方を意味し、異種宿主生物におけるPUFAの産生の効率を制御および改良するための重要な機会を提供する。

## 【 0 0 8 6 】

説明として挙げると、長鎖PUFA（LCPUFA）は、「標準的」または「古典的」なPUFA合成経路（以下に定義する）の一部として、FFAとしては生じない。実際には、生物が通常、FFAとしてのPUFAに遭遇するのは、それが外因性に与えられた場合のみである。例えば、大腸菌（*E. coli*）は、ほとんどの細菌と同じく、PUFAを合成しない。これらの生物によって産生される、炭素が16個および18個の飽和または一不飽和脂肪酸は、II型FAS系を介してアシルキャリアータンパク質（ACP）上で合成される。アシル-ACPはPL生成酵素の基質としての役を果たす。大腸菌は種々のFFAを外因性炭素源として利用することができる。そのようなFFAは、PLに組み込まれる前または分解サイクルに入る前に、アシル-CoAに変換される。FadD遺伝子は、大腸菌における唯一の既知のACoAS酵素をコードし、その遺伝子における突然変異は、FFAを唯一の炭素源として成育する能力を失わせる。

40

## 【 0 0 8 7 】

真核生物は典型的には、I型脂肪酸シンターゼ（FAS）（または高等植物の場合にはII型FAS）を用いて飽和脂肪酸（炭素が16個および18個）を産生する。FAS系の生成物は、FFA（例えば、動物FAS）として、またはアシル-CoA（例えば、真菌FAS）として放出されうる。植物の場合には、II型FASはプラスチド内に局在する。この場合には、炭素が16個また

50

は18個の脂肪酸はII型FASを介して生成され、多くの場合は、その脂肪酸がACPと結合する時に単一の二重結合が形成される。アシル-ACPはプラスチドPLの生成のための基質としての役を果たす。プラスチドから輸出されるよう定められた脂肪酸（細胞質PLに用いるため、またはTAG合成のために）の場合は、アシル-ACPチオエステラーゼがチオエステル結合を分解してFFAを放出する。続いてFFAはプラスチドから輸出され、細胞質ACoASによってアシル-CoAに変換される。これらのアシル-CoAはPLおよびTAGの合成酵素の基質としての役を果たす。

#### 【0088】

真核生物における長鎖PUFA（LCPUFA）の合成のための「標準的」または「古典的」な経路は、中鎖長の飽和または一不飽和脂肪酸（例えば、上記のFAS系の生成物）の修飾を伴う。これらの修飾は伸長段階および不飽和化段階からなる。伸長反応の基質は脂肪酸アシル-CoA（伸長される脂肪酸鎖）およびマロニル-CoA（各伸長反応のたびに付加される2個の炭素の源）である。エロンガーゼ反応の生成物は、直鎖状鎖に2つの炭素が付加された脂肪酸アシル-CoAである。この反応サイクルでは遊離脂肪酸（FFA）は通常は生じない。デサチュラーゼは、酸素依存的反応における2つの水素の抽出により、既存の脂肪酸鎖の中にシス二重結合を作り出す。デサチュラーゼの基質は、PL（例えば、ホスフォチジルコリン（phosphatidylcholine））のグリセロール骨格に対してエステル化される、アシル-CoA（ある種の動物において）または脂肪酸である。この場合も、FFAは、この反応機構では生じない。このため、「標準的」または「古典的」なLCPUFA合成経路においてFFAが生じる唯一の時点は、ある種のFAS系からの脂肪酸の放出時のみである。以上に考察したように、これらは典型的には、炭素が16個または18個の脂肪酸であり、通常は飽和または一不飽和脂肪酸であって、EPAまたはDHAのようなより長鎖のPUFAではない。長鎖PUFA生成に関するこの方式の1つの帰結は、経路において中間体がしばしば蓄積し、それらは往々にして系によって生成される新規脂肪酸の大半に相当することである。

#### 【0089】

したがって、本発明によれば、PUFAの生成のための「標準的」または「古典的」な経路に対する言及は、中鎖長の飽和脂肪酸（例えば、脂肪酸シクターゼ（FAS）系の生成物）が一連の伸長反応および不飽和化反応によって修飾される脂肪酸合成経路のことを指す。伸長反応の基質は脂肪酸アシル-CoA（伸長される脂肪酸鎖）およびマロニルCoA（各伸長反応のたびに付加される2個の炭素の源）である。エロンガーゼ反応の生成物は、直鎖状鎖に2つの炭素が付加された脂肪酸アシル-CoAである。デサチュラーゼは、酸素依存的反応における2つの水素の抽出により、既存の脂肪酸鎖の中にシス二重結合を作り出す。そのような経路およびそのような経路に関与する遺伝子は文献で周知である（例えば、背景の項を参照）。

#### 【0090】

PUFA PKS（PUFAシクターゼ）酵素（以下に詳述する）を介した長鎖PUFAの合成のための経路は、上記の「標準的」経路とは非常に異なる。PUFAシクターゼはマロニル-CoAを炭素源として利用し、中間体を意味のある量として放出することなしに、最終的なPUFAを生成する。酸素を必要としない機構を用いて、合成時に適切なシス二重結合が付加される。NADPHが合成サイクルにおける還元剤として用いられる。少なくともヤブレッツボカビ科PUFA PKS系では、本発明者らによって本明細書で初めて開示されたように、これらの酵素がPUFA生成物をFFAとして放出する。この放出機構は酵素自体の一部である。このように、PUFA酵素系からのFFAとしてのLCPUFAの放出はシゾキトリウム属のPUFA PKS系の独特な特徴であり、ヤブレッツボカビ科におけるもののようすべての真核生物PUFAシクターゼ系の特徴である可能性が高い。

#### 【0091】

したがって、本発明者らは、PUFA PKS系（PUFAシクターゼ系）を異種宿主（例えば、その特定のPUFA PKS系を内因的に発現しない宿主生物）において発現させる場合に、所望の区画または脂質画分におけるPUFAの生成および蓄積を最適化することに関して考慮すべき要因は、その宿主の内因性アシル-CoAシクターゼ（ACoAS）酵素が、導入された系のFFA

10

20

30

40

50

生成物に対応するアシル-CoAの変換のための基質として認識する能力であることを提唱する。以上に考察したように、PUFA PKS系を導入しうるほとんどの異種宿主生物は通常、FFAとしてのPUFAには、それが外因性に与えられた場合しか遭遇しないため、宿主生物は、宿主生物による所望の脂質画分または区画におけるPUFAの最適な産生および蓄積において阻害因子を提示しうる、FFAを取り扱うための最適なアクセサリタンパク質を有すべき場所に有していない可能性がある。例えば、ACoAS活性を有するタンパク質のファミリーがいくつか存在すること、およびこれらの酵素に関するFFA基質の選好性はかなり特異的であることが周知である。このため、いくつかの潜在的な宿主に存在するACoASは、長鎖PUFA FFAをアシル-CoAに効率的には変換しない可能性があり、そのような宿主が通常、そのようなPUFAのFFA型に遭遇しない場合には特にそうである。加えて、宿主生物が、PLおよびTAGを生成し、PUFA-CoAを基質として利用しうる、最適なアシルトランスフェラーゼを有していない可能性もある。さらに、PUFA PKS系を内因的に発現する宿主生物においてさえ、本発明者らは、生物における油および油画分中へのPUFAの蓄積を改良するために、本明細書で考察した修飾を用いて、生物を遺伝的に改変することが可能であると考えている。

10

#### 【0092】

上記の経路および本発明者らによる発見は、PUFAシンターゼの発現による異種（または本来の）宿主におけるPUFAの産生に関して、いくつかの指針または戦略を提供する。

#### 【0093】

##### 1. 遺伝子の最適化

20

タンパク質の発現を得るためには、遺伝子配列を異種宿主のそれに適合させるための最適化が必要な可能性がある。これは以下に述べる実施例で例証されており、そこでは、シゾキトリウム属由来のPUFA PKS系からのタンパク質をコードする遺伝子が、細菌宿主ならびに酵母におけるコドン用法に対して最適化されている。細菌における使用に対して最適化された遺伝子は、植物におけるシゾキトリウム属PUFA PKSの発現のためにも有用であることが見いだされた。これらの最適化された遺伝子に関する詳細については以下に述べる。

#### 【0094】

##### 2. PPTアーゼの発現

本発明者らは、大腸菌、酵母および植物に存在する内因性PPTアーゼが、PUFAシンターゼのACPドメインを活性化できないことを突き止めた。本発明者らは以前に、内因性PPTアーゼがPUFAシンターゼのACPドメインを活性化しない宿主において用いうる、適した代替的なPPTアーゼである、ネンジュモ（Nostoc）由来のHetI（米国特許出願公開第20020194641号に記載）を同定した。他の適したPPTアーゼも記載されており、容易に入手することができる。種々の異種宿主細胞におけるPPTアーゼが記載されており、以下に例示されている。

30

#### 【0095】

##### 3. 基質の流れの改変 / FASの阻害

PUFAシンターゼは、伸長反応のためにマロニル-CoAを炭素源として利用する。マロニル-CoAはまた、FAS、細胞質脂肪酸伸長反応および他の酵素（例えば、カルコンシンターゼ）によっても用いられる。PUFAシンターゼはマロニル-CoAをめぐってこれらの他の酵素系と競合する。このことは、PUFAシンターゼ経路の流れを増大させる1つのやり方が、マロニル-CoAのプールをめぐって競合するその能力を強化することであることを示している。この基質をめぐって競合する能力を強化するために考えられるやり方は数多く存在する。これらには、1) 競合性経路の阻害、これには例えば、そのような経路に関与する酵素またはサブユニットの発現レベルを低下させることによる（例えば、アンチセンスRNA、RNAi、共抑制または突然変異の使用による）、FAS経路内の任意の要素の阻害が含まれる、2) 競合性経路が減弱化またはブロックされている異種宿主（例えば、細胞質中の脂肪酸を伸長させる能力がブロックされているキャノーラ）におけるPUFAシンターゼの発現、および/または3) マロニル-CoAのプールを増加させること（例えば、アセチル-CoAカルボキ

40

50

シラーゼの発現による)が非限定的に含まれる。この戦略の例は以下により詳細に述べられており、実施例に例示されている。

【0096】

#### 4. アシル-CoAシンターゼの発現

シゾキトリウム属に存在する酵素は、PUFAシンターゼの遊離脂肪酸生成物をアシル-CoAに効率的に変換する。異種宿主に存在する酵素は、そのような遊離脂肪酸が典型的にはそのような生物に遭遇しないと思われるため、これらの反応を同程度の効率では遂行できないと思われる。例えば、そのような異種宿主における、さまざまなPUFAシンターゼの遊離脂肪酸生成物(例えば、DHA、DPA n-6、EPAまたは他の生成物)をアシル-CoAに効率的に変換するアシル-CoAシンターゼ酵素の発現は、そのような生成物を蓄積する能力の増大をもたらし可能性がある。この点に関して、シゾキトリウム属、またはPUFAシンターゼ経路を介してPUFAを産生する他の生物は、そのような酵素をコードする遺伝子の優れた供給源として役立つと考えられる(以下の説明および実施例を参照)。

【0097】

#### 5. アシルトランスフェラーゼおよび関連酵素の発現

シゾキトリウム属に存在する酵素は、PUFAシンターゼのアシル-CoA型の生成物を効率的に利用して、PLおよびTAG分子を合成する。異種宿主に存在する酵素は、PUFA-CoAが典型的にはそのような生物に遭遇しないと思われるため、これらの反応を同程度の効率では遂行できないと思われる。例えば、そのような異種宿主における、さまざまなPUFAシンターゼのアシル-CoA生成物(例えば、DHA-CoA、DPA n-6-CoA、EPA-CoAまたは他のもの)をPLまたはTAG分子に効率的に組み込むPLまたはTAG合成酵素の発現は、そのような生成物を蓄積する能力の増大をもたらし可能性がある。この点に関して、シゾキトリウム属、またはPUFAシンターゼ経路を介してPUFAを産生する他の生物は、そのような酵素をコードする遺伝子の優れた供給源として役立つと考えられる(以下の説明および実施例を参照)。

【0098】

#### 6. オルガネラ特異的な発現

異種宿主に蓄積するPUFAの量を増加させる、またはそのプロフィールを変化させるために利用しうる他の方法も本明細書では想定している。一例として、PUFAシンターゼ系を宿主内の別個の区画で発現させ、それにより、蓄積の増大をもたらしと思われる別個のマロニル-CoAプールを得ることができる(例えば、植物細胞のプラスチドおよび細胞質において)。この戦略も以下の実施例に例示されている。

【0099】

したがって、本発明は、異種宿主生物におけるPUFAの生成および/または蓄積の阻害に対する解決策を提供するとともに、PUFA PKS系を用いてPUFAを(遺伝的改変によって、または内因的に)産生する任意の生物においてPUFAの産生を制御または強化するという類いまれな機会も提供する。特に、本発明は、生物による、特に生物における所望の区画または脂質画分におけるPUFAの産生および/または蓄積を強化または増大させるための、PUFA PKS系を発現するように遺伝的に改変された生物において発現させうるタンパク質およびそのようなタンパク質をコードする核酸分子の形態にあるさまざまな標的、ならびに本明細書に記載された他の遺伝的改変および戦略を提供する。そのような標的を本明細書では一般に、PUFA PKS系に対する「アクセサリー」標的と称することができる。本明細書で用いる場合、標的は、本明細書に記載したような宿主生物における発現または過剰発現が望まれる核酸分子および/もしくはそのコードされるタンパク質、ならびに欠失もしくは不活性化のための標的、またはさらには標的オルガネラ(例えば、植物のプラスチドに対するターゲティング)のいずれでもありうる。換言すれば、標的は、PUFAの生成のための酵素系、特にPUFA PKS系に付加される要素、またはその系の任意の改変であることができ、ここで標的は、宿主生物における脂肪酸の産生および/または蓄積の増大または改良という点に関して有用であると同定される。

【0100】

PUFA PKS系(PUFAシンターゼ)

10

20

30

40

50

したがって、本発明は、PUFA PKS系とともに用いるためのアクセサリタンパク質および他の標的の提供を対象とする。本明細書で用いる場合、PUFA PKS系（これはPUFAシンターゼ系またはPUFAシンターゼと称してもよい）は一般に、以下の識別的な特徴を有する：（１）それはPUFA、特に長鎖PUFAを、系の天然生成物として生成する；および（２）それは、選択されたサイクルにおけるトランス-シス異性化およびエノイル還元反応を含む、脂肪酸鎖の反復的处理と非反復的处理との両方を遂行する複合体として構築される複数の多機能性タンパク質を含む。加えて、PUFAシンターゼ酵素に存在するACPドメインは、補因子（4-ホスホパンテテイン）の結合による活性化も必要とする。この補因子の結合はホスホパンテテインルトランスフェラーゼ（PPTアーゼ）によって行われる。宿主生物の内因性PPTアーゼがPUFAシンターゼのACPドメインを活性化することができなければ、その機能を遂行しうるPPTアーゼを与えることが必要である。本発明者らは、ネンジュモ属のHetI酵素が、PUFAシンターゼのACPドメインを活性化するための例示的でかつ適切なPPTアーゼであるとして同定している。PUFA PKS系またはPUFAシンターゼに対する言及は、生物においてPUFAを産生するように複合体中で働く遺伝子およびそれらにコードされる産物のすべてをまとめて指す。したがって、PUFA PKS系は具体的には、天然生成物がPUFAであるPKS系のことを指す。

#### 【0101】

より具体的には、本明細書において言及されるPUFA PKS系は、多価不飽和脂肪酸（PUFA）、特に長鎖PUFA（LCPUFA）を生成物として生成する。例えば、PUFA PKS系を内因的に（天然に）含む生物は、この系を用いてPUFAを作り出す。本発明によれば、PUFAとは、炭素鎖の長さが少なくとも16個の炭素、より好ましくは少なくとも18個の炭素、より好ましくは少なくとも20個の炭素、より好ましくは22個またはそれ以上の炭素であって、少なくとも3つまたはそれ以上の二重結合、好ましくは4つまたはそれ以上、より好ましくは5つまたはそれ以上、さらにより好ましくは6つまたはそれ以上の二重結合を有し、すべての二重結合がシス配置にある脂肪酸のことである。本明細書における長鎖多価不飽和脂肪酸（LCPUFA）に対する言及は、より詳細には、炭素鎖の長さが18およびそれ以上、好ましくは炭素鎖の長さが20およびそれ以上であって、3つまたはそれ以上の二重結合を含む脂肪酸のことを指す。-6系列のLCPUFAには以下が含まれる：-リノレン酸（C18:3）、ジ-ホモ-リノレン酸（C20:3n-6）、アラキドン酸（C20:4n-6）、アドレン酸（adrenic acid）（ドコサテトラエン酸またはDTAとも呼ばれる）（C22:4n-6）およびドコサペンタエン酸（C22:5n-6）が含まれる。-3系列のLCPUFAには以下が含まれる：-リノレン酸（C18:3）、エイコサトリエン酸（C20:3n-3）、エイコサテトラエン酸（C20:4n-3）、エイコサペンタエン酸（C20:5n-3）、ドコサペンタエン酸（C22:5n-3）およびドコサヘキサエン酸（C22:6n-3）。LCPUFAにはまた、C28:8（n-3）を非限定的に含む、22個を上回る炭素および4つまたはそれ以上の二重結合を有する脂肪酸も含まれうる。

#### 【0102】

本発明によるPUFA PKS系はまた、選択されたサイクルにおけるトランス-シス異性化およびエノイル還元反応を含む、脂肪酸鎖の反復的处理と非反復的处理との両方を遂行する複合体として構築される複数の多機能性タンパク質（さらに単機能性タンパク質が、特に海洋細菌由来のPUFA PKS系に関して含まれうる）も含む。これらのタンパク質は、本明細書において、コアPUFA PKS酵素複合体またはコアPUFA PKS系と称することもできる。これらのタンパク質の内部に含まれるドメインおよびモチーフの一般的な機能は当技術分野で個々に公知であり、海洋細菌および真核生物由来のさまざまなPUFA PKS系に関して詳細に記載されている（例えば、米国特許第6,140,486号；米国特許第6,566,583号；Metz et al., Science 293:290-293 (2001)；米国特許出願公開第20020194641号；米国特許出願公開第20040235127号；米国特許出願公開第20050100995号およびPCT公開第W0 2006/135866号を参照）。これらのドメインは、単一のタンパク質として（すなわち、ドメインおよびタンパク質は同義である）、または上述したように単一のタンパク質の中の2つもしくはそれ以上の（複数の）ドメインの1つとして見いだされる。

#### 【0103】



海洋細菌およびヤブレッツボカビ属のメンバー由来のさまざまなPUFA PKS系ドメインの構成、ならびにそのようなPUFA PKS系を含む遺伝子およびタンパク質の構造的および機能的な特徴は、詳細に記載されている（例えば、米国特許第6,140,486号；米国特許6,566,583号；Metz et al., Science 293:290-293 (2001)；米国特許出願公開第20020194641号；米国特許出願公開第20040235127号；米国特許出願公開第20050100995号およびPCT公開第WO 2006/135866を参照）。

#### 【0104】

本発明において有用な、PUFA PKS系およびそれらのタンパク質またはドメインには、細菌性および非細菌性PUFA PKS系の両方が含まれる。非細菌性PUFA PKS系とは、真核生物または古細菌といった細菌ではない生物由来の、またはそれから派生したPUFA PKS系のことである。真核生物は細胞の分化の程度に基づいて原核生物とは区別され、真核生物の方がより高度に分化している。一般に、原核生物は核膜を持たず、細胞分裂の間に有糸分裂を示さず、染色体を1つだけ有し、その細胞質中に70Sリボソームを含み、ミトコンドリア、小胞体、葉緑体、リソソームおよびゴルジ体を有さず、鞭毛は存在する場合は単一の細線維で構成される。これに対して、真核生物は、核膜を有し、細胞分裂の間に有糸分裂を示し、多くの染色体を有し、その細胞質中に80Sリボソームを含み、ミトコンドリア、小胞体、葉緑体（藻類において）、リソソームおよびゴルジ体を含み、鞭毛は存在する場合は多くの細線維で構成される。一般に、細菌は原核生物であり、一方、藻類、真菌類、原生生物、原生動物および高等植物は真核生物である。本発明によれば、細菌PUFA PKSの機能性ドメインを有する非細菌性PUFA PKSの機能性ドメイン、さらには他のPKS系（I型反復またはモジュラー、II型またはIII型）またはFAS系由来のPKS機能性ドメインまたはタンパク質を組み入れた、遺伝的に改変された植物を作製することができる。

#### 【0105】

好ましくは、本発明のPUFA PKS系は、典型的には3つまたはそれ以上のタンパク質上に含まれる、少なくとも以下の生物活性ドメインを含む：

(a) 少なくとも1つのエノイル-ACPレダクターゼ（ER）ドメイン；(b) 複数のアシルキャリアータンパク質（ACP）ドメイン（例えば、少なくとも1つ～4つの、好ましくは少なくとも5つのACPドメイン、いくつかの態様においては最大で6つ、7つ、8つ、9つ、10個または10個を上回るACPドメイン）；(c) 少なくとも2つの  $\beta$ -ケトアシル-ACPシンターゼ（KS）ドメイン；(d) 少なくとも1つのアシルトランスフェラーゼ（AT）ドメイン；(e) 少なくとも1つの  $\beta$ -ケトアシル-ACPレダクターゼ（KR）ドメイン；(f) 少なくとも2つのFabA様  $\beta$ -ヒドロキシアシル-ACPデヒドラーゼ（DH）ドメイン；(g) 少なくとも1つの鎖長因子（CLF）ドメイン；(h) 少なくとも1つのマロニル-CoA:ACPアシルトランスフェラーゼ（MAT）ドメイン。1つの態様において、本発明によるPUFA PKS系はまた、デヒドラーゼ（DH）の保存的活性部位モチーフを含む少なくとも1つの領域も含む。

#### 【0106】

1つの好ましい態様において、PUFA PKS系は、少なくとも以下の生物活性ドメインを含む：(a) 少なくとも1つのエノイル-ACPレダクターゼ（ER）ドメイン；(b) 少なくとも5つのアシルキャリアータンパク質（ACP）ドメイン；(c) 少なくとも2つの  $\beta$ -ケトアシル-ACPシンターゼ（KS）ドメイン；(d) 少なくとも1つのアシルトランスフェラーゼ（AT）ドメイン；(e) 少なくとも1つの  $\beta$ -ケトアシル-ACPレダクターゼ（KR）ドメイン；(f) 少なくとも2つのFabA様  $\beta$ -ヒドロキシアシル-ACPデヒドラーゼ（DH）ドメイン；(g) 少なくとも1つの鎖長因子（CLF）ドメイン；および(h) 少なくとも1つのマロニルCoA:ACPアシルトランスフェラーゼ（MAT）ドメイン。1つの態様において、本発明によるPUFA PKS系はまた、FabA様DHドメインの一部ではない、デヒドラーゼ（DH）の保存的活性部位モチーフを含む少なくとも1つの領域またはドメインも含む。これらのドメインのそれぞれの構造的および機能的な特徴は、米国特許出願公開第20020194641号；米国特許出願公開第20040235127号；米国特許出願公開第20050100995号；およびPCT公開第WO 2006/135866号に詳細に記載されている。

#### 【0107】

本発明によれば、3-ケトアシル-ACPシンターゼ (KS) 生物活性 (機能) を有するドメインまたはタンパク質は、FAS (およびPKSの) 伸長反応サイクルの初期段階を行う酵素として特徴づけられる。「3-ケトアシル-ACPシンターゼ」という用語は、「3-ケトアシル-ACPシンターゼ」、「3-ケトアシル-ACPシンターゼ」および「3-ケトアシルACPシンターゼ」という用語、ならびに類似の派生語と互換的に用いることができる。伸長が定められたアシル基は、その酵素の活性部位にあるシステイン残基とチオエステル結合によって連結される。多段階反応において、アシル-酵素はマロニル-ACPとの縮合を受けて、3-ケトアシル-ACP、CO<sub>2</sub>および遊離酵素を生成する。KSは伸長サイクルにおいて鍵となる役割を果たし、多くの系において、反応サイクルの他の酵素よりも強い基質特異性を持つことが示されている。例えば、大腸菌は3つの別個のKS酵素を有する。それぞれが、その生物の生理機能においてそれ自体に特有の役割を持つ (Magnuson et al., Microbiol. Rev. 57, 522 (1993))。本明細書に記載の海洋細菌およびヤブレッツボカビ科に記載されているPUFA-PKS系の2つのKSドメインは、一続きのPUFA生合成反応において別個の役割を有する可能性がある。酵素の1つのクラスとして、KSは詳細に特徴づけられている。多くの実証済みのKS遺伝子の配列が公知であり、その活性部位モチーフが同定され、いくつかの結晶構造が決定されている。タンパク質 (またはタンパク質のドメイン) は、公知のKS配列との相同性により、酵素のKSファミリーに属すると容易に同定することができる。

#### 【0108】

本発明によれば、マロニル-CoA:ACPアシルトランスフェラーゼ (MAT) 生物活性 (機能) を有するドメインまたはタンパク質は、マロニル部分をマロニル-CoAからACPに転移させるものとして特徴づけられる。「マロニル-CoA:ACPアシルトランスフェラーゼ」という用語は、「マロニルアシルトランスフェラーゼ」および類似の派生語と同義的に用いることができる。活性部位モチーフ (GxSxG) に加えて、これらの酵素は、それらをMAT酵素と同定させるカギとなる位置に、RおよびQアミノ酸による拡張モチーフを有する (例えば、以下に述べるATドメインとは対照的に)。いくつかのPKS系 (しかし、PUFA PKSドメインではない) において、MATドメインは、メチル-マロネートまたはエチル-マロネートをACP基に (対応するCoAエステルから) 選好的に取り付け、それにより、直鎖状炭素鎖に分枝を導入する。MATドメインは、公知のMAT配列とのそれらの相同性およびそれらの拡張モチーフ構造によって認識されうる。

#### 【0109】

アシルキャリアータンパク質 (ACP) 生物活性 (機能) を有するドメインまたはタンパク質は、タンパク質の共有結合した補因子に対するチオエステル結合を介して脂肪アシル鎖を成長させるための担体として機能する、小型ポリペプチド (典型的には、80個~100個のアミノ酸の長さ) として特徴づけられる。それらは単独の単位として、またはより大きなタンパク質の内部のドメインとして存在する。ACPは、ACPの高度に保存されたセリン残基へのCoAのホスホパントेटイニル部分の転移によって、不活性のアポ型から機能性のホロ型へと変換される。アシル基は、ホスホパントेटイニル部分の遊離末端でのチオエステル結合によってACPに結合される。ACPは、放射性パントेटインによる標識化および公知のACPとの配列相同性によって同定することができる。上述したモチーフ (LGIDS\*) の変形物の存在もACPの特徴的サイン (signature) である。

#### 【0110】

本発明によれば、3-ケトアシル-ACPレダクターゼ (KR) 生物活性 (機能) とも称されるケトレダクターゼ活性を有するドメインまたはタンパク質は、3-ケトアシル型のACPのピリジン-ヌクレオチド依存的還元を触媒するものとして特徴づけられる。それはデノボ脂肪酸生合成伸長サイクルにおける最初の還元段階であり、ポリケチド生合成においてしばしば行われる反応である。「3-ケトアシル-ACPレダクターゼ」という用語は、「ケトレダクターゼ」、「3-ケトアシル-ACPレダクターゼ」、「3-ケトアシルACPレダクターゼ」という用語およびその用語の類似の派生語と同義的に用いることができる。顕著な配列類似性が、エノイルACPレダクターゼ (ER) の1つのファミリー、FASの他のレダクターゼ (しかし、PUFA PKS系に存在するERファミリーではない) および短鎖アルコールデヒドロゲナ

ーゼファミリーとの間に観察される。以上に示したPUFA PKS領域のPfam解析により、そのコア領域における短鎖アルコールデヒドロゲナーゼファミリーとの相同性が明らかになっている。同じ領域のBlast解析により、コア領域における公知のKR酵素とのマッチのほか、特徴づけられた他のPUFA PKS系由来のドメインとの相同性のある拡張領域が明らかになっている。

#### 【0111】

本発明によれば、ドメインまたはタンパク質は以下の根拠に基づいて鎖伸長因子（CLF）と称される。CLFは当初、II型（解離した酵素）PKS系の特徴として記載され、伸長サイクルの数を決定し、それ故に最終生成物の鎖の長さの決定に役割を果たすものと仮定された。CLFアミノ酸配列はKSドメインと相同性を示す（かつ、KSタンパク質とヘテロ二量体を形成すると考えられる）が、それらは活性部位システインを欠いている。PKS系におけるCLFの役割は議論的となっている。新たな証拠（C. Bisang et al., Nature 401, 502 (1999)）により、PKS系のプライミング（伸長させるための最初のアシル基を供給すること）における役割が示唆されている。この役割において、CLFドメインはマロネート（マロニル-ACPのような）からカルボキシル基を除去し、それによりKS活性部位に転移される酢酸基を形成すると考えられる。したがって、この酢酸基は、最初の伸長（縮合）反応を受けることのできる「プライミング」分子として作用する。II型CLFの相同体は、いくつかのモジュール式PKS系において「ローディング（loading）」ドメインとして同定されている。CLFの配列特徴を有するドメインは、現在同定されているすべてのPUFA PKS系に見いだされており、それぞれの場合に多ドメインタンパク質の部分として見いだされる。

#### 【0112】

「アシルトランスフェラーゼ」または「AT」に対する言及は、多数の別個のアシル転移反応を行うことができる酵素の一般的なクラスのことを指す。「アシルトランスフェラーゼ」という用語は、「アシル・トランスフェラーゼ」という用語と同義的に用いることができる。本明細書に記載したPUFA PKS系で同定されているATドメインは互いに対して、および現在調べられている他のPUFA PKS系のすべてに存在するドメインと良好な相同性を示し、特定の機能が同定されているいくつかのアシルトランスフェラーゼ（例えば、マロニル-CoA:ACPアシルトランスフェラーゼ、MAT）と非常に弱い相同性を示す。MATと弱い相同性があるにもかかわらず、このATドメインは、それがそのような酵素に特徴的な拡張モチーフ構造を持たないことから、MATとして機能するとは考えられていない（上記のMATドメインの記載を参照）。本開示の目的において、PUFA PKS系におけるATドメインに関して考えられる機能には、以下が非限定的に含まれる：ORFA ACPドメインから水への脂肪酸アシル基の転移（すなわち、チオエステラーゼ 脂肪酸アシル基を遊離脂肪酸として放出する）、CoAなどのアクセプターへの脂肪酸アシル基の転移、さまざまなACPドメイン間でのアシル基の転移、または親油性アクセプター分子（例えば、リゾホスファチジン酸）への脂肪酸アシル基の転移。

#### 【0113】

本発明によれば、このドメインはエノイルレダクターゼ（ER）生物活性を有する。ER酵素は、脂肪酸アシル-ACPにおけるトランス二重結合（DH活性により導入された）を還元し、結果としてそれらの炭素を完全に飽和させる。PUFA-PKS系におけるそのERドメインは、ER酵素の新たに特徴づけられたファミリーと相同性を示す（Heath et al., Nature 406, 145 (2000)）。HeathおよびRockは、肺炎連鎖球菌（*Streptococcus pneumoniae*）から関心対象の遺伝子をクローニングし、その遺伝子から発現されたタンパク質を精製して、それがER活性を有することをインビトロアッセイで示すことによって、ER酵素のこの新たなクラスを同定した。現在調べられているPUFA PKS系はすべて、肺炎連鎖球菌のERタンパク質と相同性を示すシゾキトリウム属ERドメインと非常に高い配列相同性を有する、少なくとも1つのドメインを含む。

#### 【0114】

本発明によれば、デヒドラーゼまたはデヒドラターゼ（DH）活性を有するタンパク質またはドメインは脱水反応を触媒する。本明細書で一般的に用いる場合、DH活性に対する言

及は、典型的には、FabA様  $\beta$ -ヒドロキシアシル-ACPデヒドラーゼ (DH) 生物活性のことを指す。FabA様  $\beta$ -ヒドロキシアシル-ACPデヒドラーゼ (DH) 生物活性は、 $\beta$ -ケトアシル-ACPからHOHを除去し、炭素鎖にトランス二重結合を最初に生じさせる。「FabA様  $\beta$ -ヒドロキシアシル-ACPデヒドラーゼ」という用語は、「FabA様  $\beta$ -ヒドロキシ・アシル-ACPデヒドラーゼ」、「 $\beta$ -ヒドロキシアシル-ACPデヒドラーゼ」、「デヒドラーゼ」という用語および類似の派生語と同義的に用いることができる。PUFA PKS系のDHドメインは、そのFAS系と関連する細菌DH酵素に対して (他のPKS系のDHドメインに対してよりも) 相同性を示す。細菌DHのサブセットであるFabA様DHは、シス-トランスイソメラーゼ活性を有する (Heath et al., J. Biol. Chem., 271, 27795 (1996))。これはFabA様DHタンパク質に対する相同性であり、本明細書に記載したDHドメインの1つまたはすべてがPUFA PKS生成物におけるシス二重結合の挿入の原因となることを示している。

10

#### 【0115】

また、本発明において有用なPUFA PKSタンパク質が、本明細書において非FabA様DH活性または非FabA様  $\beta$ -ヒドロキシアシル-ACPデヒドラーゼ (DH) 生物活性と総称される、FabA様 (例えば、上記のシス-トランス活性はFabA様活性と関連する) とは特徴づけられないデヒドラーゼ活性を有してもよい。より具体的には、保存的活性部位モチーフ (ほぼ13アミノ酸長: L\*xxHxxxGxxxxP; 例えば、SEQ ID NO: 70のアミノ酸2504~2516に示されている; \*このモチーフでは、LをIとすることもできる) が、PKS系におけるデヒドラーゼドメインに見いだされる (Donadio S, Katz L. Gene. 1992 Feb 1;111(1):51-60)。本明細書においてデヒドラーゼ (DH) の保存的活性部位モチーフまたはDHモチーフとも称される、この保存的モチーフは、これまでに記載されているすべての公知のPUFA-PKS配列の類似の領域および本明細書に記載したPUFA PKS配列の中に見いだされるが、このモチーフはごく最近になって発見されたと考えられる。この保存的モチーフは、PUFA-PKS配列中のまだ特徴づけられていない高相同性領域の内部にある。提唱されているPUFA-PKSを介したPUFAの生合成は非FabA様の脱水を必要とし、このモチーフはその反応の原因である可能性がある。

20

#### 【0116】

例証を目的として、いくつかのPUFA PKS系の構造について以下に詳細に述べる。しかし、本発明はこれらのPUFA PKS系の使用には限定されないことが理解されるべきである。

#### 【0117】

30

#### シゾキトリウム属のPUFA PKS系

1つの態様において、シゾキトリウム属由来のPUFA PKS系は、少なくとも以下の生物活性ドメインを含む: (a) 2つのエノイル-ACPレダクターゼ (ER) ドメイン; (b) 5つ~10個またはそれ以上のアシルキャリアータンパク質 (ACP) ドメイン、1つの局面においては9つのACPドメイン; (c) 2つの  $\beta$ -ケトアシル-ACPシンターゼ (KS) ドメイン; (d) 1つのアシルトランスフェラーゼ (AT) ドメイン; (e) 1つの  $\beta$ -ケトアシル-ACPレダクターゼ (KR) ドメイン; (f) 2つのFabA様  $\beta$ -ヒドロキシアシル-ACPデヒドラーゼ (DH) ドメイン; (g) 1つの鎖長因子 (CLF) ドメイン; および (h) 1つのマロニル-CoA:ACPアシルトランスフェラーゼ (MAT) ドメイン。1つの態様において、本発明によるシゾキトリウム属PUFA PKS系はまた、FabA様DHドメインの一部ではない、デヒドラーゼ (DH) の保存的活性部位モチーフを含む少なくとも1つの領域またはドメインも含む。これらのドメインの構造的および機能的な特徴は、当技術分野で個別的に一般に知られている (例えば、米国特許6,566,583号; Metz et al., Science 293:290-293 (2001); 米国特許出願公開第20020194641号; およびPCT公開第WO 2006/135866を参照)。

40

#### 【0118】

以前に記載されている、シゾキトリウム属のコアPUFA PKS系を構成するオープンリーディングフレームは3つある。各オープンリーディングフレームのドメイン構造は以下の通りである。

#### 【0119】

シゾキトリウム属のオープンリーディングフレームA (OrfA) :

50

OrfAに関する全ヌクレオチド配列は、本明細書にSEQ ID NO:1として表されている。OrfAは、本明細書にSEQ ID NO:2として表されている2910アミノ酸の配列をコードする、8730ヌクレオチドの配列（終止コドンを含めず）である。OrfAの内部には12個のドメインがある：(a)1つの -ケトアシル-ACPシンターゼ（KS）ドメイン；(b)1つのマロニル-CoA:ACPアシルトランスフェラーゼ（MAT）ドメイン；(c)9つのアシルキャリアタンパク質（ACP）ドメイン；および(d)1つのケトレダクターゼ（KR）ドメイン。シゾキトリウム属ATCC 20888株、およびシゾキトリウム属N230D株と命名されたATCC 20888株の娘株の両方から、OrfAをコードするゲノムDNAクローン（プラスミド）が単離され、シーケンシングが行われている。

#### 【0120】

シゾキトリウム属ATCC 20888株から単離された、本明細書においてJK1126と記載されるゲノムクローンは、本発明者らの知る限りでは、SEQ ID NO:1の1～8730位に及ぶヌクレオチド配列を含み、対応するアミノ酸配列SEQ ID NO:2をコードする。ゲノムクローンpJK1126（シゾキトリウム属ATCC 20888株由来の「OrfA」遺伝子を含む大腸菌プラスミドベクターの形態では、pJK1126 OrfAゲノムクローンと命名される）は、American Type Culture Collection（ATCC），10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209 USAに2006年6月8日に寄託され、ATCCアクセッション番号PTA-7648が割り当てられている。pJK1126 OrfAゲノムクローンのヌクレオチド配列およびこのプラスミドによってコードされるアミノ酸配列は本発明に含まれる。

#### 【0121】

シゾキトリウム属N230D株から単離された、本明細書においてpJK306 OrfAゲノムクローンおよびpJK320 OrfAゲノムクローンと記載される2つのゲノムクローンはともに（部分的重複クローン）、本発明者らの知る限りでは、SEQ ID NO:1のヌクレオチド配列を含み、SEQ ID NO:2のアミノ酸配列をコードする。ゲノムクローンpJK306（シゾキトリウム属N230D株由来のOrfA遺伝子の5'部分を含む大腸菌プラスミドの形態では、pJK306 OrfAゲノムクローンと命名される（pJK320と2.2kBが重複））は、American Type Culture Collection（ATCC），10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209 USAに2006年6月8日に寄託され、ATCCアクセッション番号PTA7641が割り当てられている。pJK306 OrfAゲノムクローンのヌクレオチド配列およびこのプラスミドによってコードされるアミノ酸配列は本発明に含まれる。ゲノムクローンpJK320（シゾキトリウム属N230D株由来のOrfA遺伝子の3'部分を含む大腸菌プラスミドの形態では、pJK320 OrfAゲノムクローンと命名される（pJK306と2.2kBが重複））は、American Type Culture Collection（ATCC），10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209 USAに2006年6月8日に寄託され、ATCCアクセッション番号PTA-7644が割り当てられている。pJK320 OrfAゲノムクローンのヌクレオチド配列およびこのプラスミドによってコードされるアミノ酸配列は本発明に含まれる。

#### 【0122】

OrfAにおける第1のドメインはKSドメインであり、これは本明細書においてORFA-KSとも称され、ORFA-KSドメインをコードする配列を含むヌクレオチド配列は本明細書にSEQ ID NO:7として表されている（SEQ ID NO:1の1～1500位）。ORFA-KSドメインを含むアミノ酸配列は本明細書にSEQ ID NO:8として表されている（SEQ ID NO:2の1～500位）。ORFA-KSドメインは活性部位モチーフ：DXAC\*（\*アシル結合部位C<sub>215</sub>）を含むことを指摘しておく。また、シゾキトリウム属KS領域の末端にある特徴的モチーフであるGFGGもSEQ ID NO:2におけるこのドメインに存在し、したがってSEQ ID NO:8に存在する。

#### 【0123】

OrfAにおける第2のドメインはMATドメインであり、これは本明細書においてORFA-MATとも称され、ORFA-MATドメインをコードする配列を含むヌクレオチド配列は本明細書にSEQ ID NO:9として表されている（SEQ ID NO:1の1723～3000位）。ORFA-MATドメインを含むアミノ酸配列は本明細書にSEQ ID NO:10として表されている（SEQ ID NO:2の575～1000位）。MATドメインは93位にアスパラギン酸を含み、94位にヒスチジンを含む（それぞれS

EQ ID NO : 2の667位および668位に対応)。ORFA-MATドメインは、本明細書にSEQ ID NO : 11として表されている活性部位モチーフ : GHS<sup>\*</sup>XG ( <sup>\*</sup>アシル結合部位S<sub>706</sub> ) を含むことを指摘しておく。

#### 【 0 1 2 4 】

OrfAのドメイン3~11は9つの縦列したACPドメインであり、これは本明細書においてORFA-ACPとも称される(配列における第1のドメインはORFA-ACP1であり、第2のドメインはORFA-ACP2であり、第3のドメインはORFA-ACP3であり、以下も同様)。第1のACPドメインであるORFA-ACP1は、SEQ ID NO : 1 (OrfA) の約3343位から約3600位に及ぶヌクレオチド配列の内部に含まれる。ORFA-ACP1ドメインをコードする配列を含むヌクレオチド配列は、本明細書にSEQ ID NO : 12として表されている (SEQ ID NO : 1の3343~3600位)。第1のACPドメインを含むアミノ酸配列は、SEQ ID NO : 2の約1115位~約1200位に及ぶ。ORFA-ACP1ドメインを含むアミノ酸配列は、本明細書にSEQ ID NO : 13として表されている (SEQ ID NO : 2の1115~1200位)。ORFA-ACP1ドメインは、本明細書ではSEQ ID NO : 14によって表されている活性部位モチーフ : LGIDS<sup>\*</sup> ( <sup>\*</sup>パンテテイン結合モチーフS<sub>1157</sub> ) を含むことを指摘しておく。

#### 【 0 1 2 5 】

9つのACPドメインはすべて、ヌクレオチド配列およびアミノ酸配列が高度に保存的であり、このため、各ドメインの配列を個別の配列識別子によって本明細書中に表してはいない。しかし、本明細書に開示した情報に基づいて、当業者は、他の8つのACPドメインのそれぞれを含む配列を容易に決定することができる。9つのACPドメインはいずれもSEQ ID NO : 1の約3283位~約6288位のOrfAの領域に及び、これはSEQ ID NO : 2の約1095~約2096位のアミノ酸位置に対応する。9つのすべてのドメインを含むACP領域全体に関するヌクレオチド配列は、本明細書にSEQ ID NO : 16として表されている。SEQ ID NO : 16によって表される領域は、個々のACPドメインの間のリンカーセグメントを含む。9つのドメインの反復の間隔は、SEQ ID NO : 16のおよそ330ヌクレオチド毎である (隣接する活性部位のセリン間を計測したアミノ酸の実際の数104~116アミノ酸の範囲である)。9つのACPドメインのそれぞれは、パンテテイン結合モチーフLGIDS<sup>\*</sup> (本明細書ではSEQ ID NO : 14によって表されている) を含み、ここでS<sup>\*</sup>はパンテテイン結合部位セリン (S) である。パンテテイン結合部位セリン (S) は、各ACPドメイン配列の中央近くに位置する。ACPドメイン領域の各末端および各ACPドメインの間にはプロリン (P) およびアラニン (A) に高度に富んだ領域があり、これはリンカー領域と考えられる。例えば、ACPドメイン1と2との間には配列 :

APAPVKAAAPAAPVASAPAPA

があり、これは本明細書にSEQ ID NO : 15として表されている。SEQ ID NO : 2のアミノ酸配列に関して、9つのACPドメインのそれぞれについての活性部位セリン残基 (すなわち、パンテテイン結合部位) の位置は以下の通りである : ACP1 = S<sub>1157</sub> ; ACP2 = S<sub>1266</sub> ; ACP3 = S<sub>1377</sub> ; ACP4 = S<sub>1488</sub> ; ACP5 = S<sub>1604</sub> ; ACP6 = S<sub>1715</sub> ; ACP7 = S<sub>1819</sub> ; ACP8 = S<sub>1930</sub> ; および ACP9 = S<sub>2034</sub>。ACPドメインの平均サイズがリンカーを除いて約85アミノ酸、リンカーを含めて約110アミノ酸であり、活性部位セリンがほぼドメインの中央にあることを考慮して、当業者は、OrfAにおける9つのACPドメインのそれぞれの位置を容易に決定することができる。

#### 【 0 1 2 6 】

OrfAにおけるドメイン12はKRドメインであり、これは本明細書においてORFA-KRとも称され、ORFA-KRドメインを含む配列を含むヌクレオチド配列は、本明細書にSEQ ID NO : 17として表されている (SEQ ID NO : 1の6598~8730位)。ORFA-KRドメインを含むアミノ酸配列は本明細書にSEQ ID NO : 18として表されている (SEQ ID NO : 2の2200~2910位)。KRドメインの内部には、短鎖アルデヒドデヒドロゲナーゼ (KRはこのファミリーのメンバーである) と同源性を有するコア領域がある。このコア領域はSEQ ID NO : 1の約7198位~約7500位に及び、SEQ ID NO : 2のアミノ酸位置2400~2500位に対応する。

#### 【 0 1 2 7 】

シゾキトリウム属のオープンリーディングフレームB (OrfB) :

OrfBに関する全ヌクレオチド配列は、本明細書にSEQ ID NO: 3として表されている。OrfBは、本明細書にSEQ ID NO: 4として表されている2059アミノ酸の配列をコードする、6177ヌクレオチドの配列（終止コドンを含めず）である。OrfBの内部には4つのドメインがある：(a) 1つの-ケトアシル-ACPシンターゼ (KS) ドメイン；(b) 1つの鎖長因子 (CLF) ドメイン；(c) 1つのアシルトランスフェラーゼ (AT) ドメイン；および(d) 1つのエノイルACP-レダクターゼ (ER) ドメイン。

## 【0128】

シゾキトリウム属ATCC 20888株、およびシゾキトリウム属N230D株と命名されたATCC 20888株の娘株の両方から、OrfBをコードするゲノムDNAクローン（プラスミド）が単離され、シーケンシングが行われている。

## 【0129】

シゾキトリウム属ATCC 20888株から単離された、本明細書においてpJK1129と記載されるゲノムクローンは、本発明者らの知る限りでは、SEQ ID NO: 3のヌクレオチド配列を含み、SEQ ID NO: 4のアミノ酸配列をコードする。ゲノムクローンpJK1129（シゾキトリウム属ATCC 20888株由来の「OrfB」遺伝子を含む大腸菌プラスミドベクターの形態では、pJK1129 OrfBゲノムクローンと命名される）は、American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209 USAに2006年6月8日に寄託されており、ATCCアクセッション番号PTA7649が割り当てられている。pJK1126 OrfBゲノムクローンのヌクレオチド配列およびこのプラスミドによってコードされるアミノ酸配列は本発明に含まれる。

## 【0130】

シゾキトリウム属N230D株から単離された、本明細書においてpJK324 OrfBゲノムクローンと記載されるゲノムクローンは、本発明者らの知る限りでは、SEQ ID NO: 3のヌクレオチド配列を含み、SEQ ID NO: 4のアミノ酸配列をコードする。ゲノムクローンpJK324（シゾキトリウム属N230D株由来のOrfB遺伝子配列を含む大腸菌プラスミドの形態では、pJK324 OrfBゲノムクローンと命名される）は、American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209 USAに2006年6月8日に寄託されており、ATCCアクセッション番号PTA7643が割り当てられている。pJK324 OrfBゲノムクローンのヌクレオチド配列およびこのプラスミドによってコードされるアミノ酸配列は本発明に含まれる。

## 【0131】

OrfBにおける第1のドメインはKSドメインであり、これは本明細書においてORFB-KSとも称され、ORFB-KSドメインをコードする配列を含むヌクレオチド配列は本明細書にSEQ ID NO: 19として表されている（SEQ ID NO: 3の1~1350位）。ORFB-KSドメインを含むアミノ酸配列は本明細書にSEQ ID NO: 20として表されている（SEQ ID NO: 4の1~450位）。このKSドメインはSEQ ID NO: 20の371位に（同じくSEQ ID NO: 20の371位にも）バリンを含む。ORFB-KSドメインは活性部位モチーフ：DXAC\*（\*アシル結合部位C<sub>196</sub>）を含むことを指摘しておく。また、このKS領域の末端にある特徴的モチーフであるGFGGもSEQ ID NO: 4におけるこのドメインに存在し、したがってSEQ ID NO: 20に存在する。

## 【0132】

OrfBにおける第2のドメインはCLFドメインであり、これは本明細書においてORFB-CLFとも称され、ORFB-CLFドメインをコードする配列を含むヌクレオチド配列は本明細書にSEQ ID NO: 21として表されている（SEQ ID NO: 3の1378~2700位）。ORFB-CLFドメインを含むアミノ酸配列は本明細書にSEQ ID NO: 22として表されている（SEQ ID NO: 4の460~900位）。ORFB-CLFドメインは、アシル結合性システインを伴わないKS活性部位モチーフを含むことを指摘しておく。

## 【0133】

OrfBにおける第3のドメインはATドメインであり、これは本明細書においてORFB-ATとも称され、ORFB-ATドメインをコードする配列を含むヌクレオチド配列は本明細書にSEQ ID

NO : 23として表されている (SEQ ID NO : 3の2701~4200位)。ORFB-ATドメインを含むアミノ酸配列は本明細書にSEQ ID NO : 24として表されている (SEQ ID NO : 4の901~1400位)。ORFB-ATドメインは、アシルトランスフェラーゼ (AT) タンパク質に特徴的な活性部位モチーフGxS<sup>\*</sup>xG ( <sup>\*</sup>アシル結合部位S<sub>1140</sub> ) を含むことを指摘しておく。

【 0 1 3 4 】

OrfBにおける第4のドメインはERドメインであり、これは本明細書においてORFB-ERとも称され、ORFB-ERドメインをコードする配列を含むヌクレオチド配列は本明細書にSEQ ID NO : 25として表されている (SEQ ID NO : 3の4648~6177位)。ORFB-ERドメインを含むアミノ酸配列は本明細書にSEQ ID NO : 26として表されている (SEQ ID NO : 4の1550~2059位)。

【 0 1 3 5 】

シゾキトリウム属のオープンリーディングフレームC (OrfC) :

OrfCに関する全ヌクレオチド配列は、本明細書にSEQ ID NO : 5として表されている。OrfCは、本明細書にSEQ ID NO : 6として表されている1502アミノ酸の配列をコードする、4506ヌクレオチドの配列 (終止コドンを含めず) である。OrfCの内部には3つのドメインがある : (a) 2つのFabA様-ヒドロキシアシル-ACPデヒドラーゼ (DH) ドメイン ; および (b) 1つのエノイルACPレダクターゼ (ER) ドメイン。

【 0 1 3 6 】

シゾキトリウム属ATCC 20888株、およびシゾキトリウム属N230D株と命名されたATCC 20888株の娘株の両方から、OrfCをコードするゲノムDNAクローン (プラスミド) が単離され、シーケンシングが行われている。

【 0 1 3 7 】

シゾキトリウム属ATCC 20888株から単離された、本明細書においてpJK1131と記載されるゲノムクローンは、本発明者らの知る限りでは、SEQ ID NO : 5のヌクレオチド配列を含み、SEQ ID NO : 6のアミノ酸配列をコードする。ゲノムクローンpJK1131 (シゾキトリウム属ATCC 20888株由来の「OrfC」遺伝子を含む大腸菌プラスミドベクターの形態では、pJK1131 OrfCゲノムクローンと命名される) は、American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209 USAに2006年6月8日に寄託されており、ATCCアクセッション番号PTA7650が割り当てられている。pJK1131 OrfCゲノムクローンのヌクレオチド配列およびこのプラスミドによってコードされるアミノ酸配列は本発明に含まれる。

【 0 1 3 8 】

シゾキトリウム属N230D株から単離された、本明細書においてpBR002 OrfCゲノムクローンと記載されるゲノムクローンは、本発明者らの知る限りでは、SEQ ID NO : 5のヌクレオチド配列を含み、SEQ ID NO : 6のアミノ酸配列をコードする。ゲノムクローンpBR002 (シゾキトリウム属N230D株由来のOrfC遺伝子配列を含む大腸菌プラスミドベクターの形態では、pBR002 OrfCゲノムクローンと命名される) は、American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209 USAに2006年6月8日に寄託されており、ATCCアクセッション番号PTA7642が割り当てられている。pBR002 OrfCゲノムクローンのヌクレオチド配列およびこのプラスミドによってコードされるアミノ酸配列は本発明に含まれる。

【 0 1 3 9 】

OrfCにおける第1のドメインはDHドメインであり、これは本明細書においてORFC-DH1とも称される。これはOrfCにおける2つのDHドメインの1つであり、このためDH1と命名されている。ORFC-DH1ドメインをコードする配列を含むヌクレオチド配列は本明細書にSEQ ID NO : 27として表されている (SEQ ID NO : 5の1~1350位)。ORFC-DH1ドメインを含むアミノ酸配列は本明細書にSEQ ID NO : 28として表されている (SEQ ID NO : 6の1~450位)。

【 0 1 4 0 】

OrfCにおける第2のドメインはDHドメインであり、これは本明細書においてORFC-DH2とも称される。これはOrfCにおける2つのDHドメインの第2のものであり、このためDH2と命

10

20

30

40

50



名されている。ORFC-DH2ドメインをコードする配列を含むヌクレオチド配列は本明細書にSEQ ID NO: 29として表されている (SEQ ID NO: 5の1351~2847位)。ORFC-DH2ドメインを含むアミノ酸配列は本明細書にSEQ ID NO: 30として表されている (SEQ ID NO: 6の451~949位)。このDHドメインは、SEQ ID NO: 30の426~440位にアミノ酸H-G-I-A-N-P-T-F-V-H-A-P-G-K-I (SEQ ID NO: 6の876~890位) を含む。

#### 【0141】

OrfCにおける第3のドメインはERドメインであり、これは本明細書においてORFC-ERとも称され、ORFC-ERドメインをコードする配列を含むヌクレオチド配列は本明細書にSEQ ID NO: 31として表されている (SEQ ID NO: 5の2995~4506位)。ORFC-ERドメインを含むアミノ酸配列は本明細書にSEQ ID NO: 32として表されている (SEQ ID NO: 6の999~1502位)。

#### 【0142】

##### ヤブレッツボカビ属のPUFA PKS系

1つの態様において、ヤブレッツボカビ属のPUFA PKS系は、少なくとも以下の生物活性ドメインを含む: (a) 2つのエノイル-ACPレダクターゼ (ER) ドメイン; (b) 5つ~10個またはそれ以上のアシルキャリアータンパク質 (ACP) ドメイン、1つの局面においては8つのACPドメイン; (c) 2つの  $\beta$ -ケトアシル-ACPシンターゼ (KS) ドメイン; (d) 1つのアシルトランスフェラーゼ (AT) ドメイン; (e) 1つの  $\beta$ -ケトアシル-ACPレダクターゼ (KR) ドメイン; (f) 2つのFabA様  $\beta$ -ヒドロキシアシルACPデヒドラーゼ (DH) ドメイン; (g) 1つの鎖長因子 (CLF) ドメイン; および (h) 1つのマロニル-CoA:ACPアシルトランスフェラーゼ (MAT) ドメイン。1つの態様において、本発明によるヤブレッツボカビ属PUFA PKS系はまた、FabA様DHドメインの一部ではない、デヒドラーゼ (DH) の保存的活性部位モチーフを含む少なくとも1つの領域またはドメインも含む。これらのドメインの構造および機能的な特徴は、当技術分野で個別的に一般に知られている (例えば、米国特許公報第2004035127号、前記を参照)。

#### 【0143】

以前に記載されている、コアヤブレッツボカビ属23BのコアPUFA PKS系を構成するオープンリーディングフレームは3つある。各オープンリーディングフレームのドメイン構造は以下の通りである。

#### 【0144】

##### ヤブレッツボカビ属23BのオープンリーディングフレームA (OrfA):

Th. 23B OrfAに関する全ヌクレオチド配列は本明細書にSEQ ID NO: 38として表されている。Th. 23B OrfAは、本明細書にSEQ ID NO: 39として表されている2811アミノ酸の配列をコードする、8433ヌクレオチドの配列 (終止コドンを含めず) である。SEQ ID NO: 38は、Th. 23B OrfAにおける以下のドメインをコードする: (a) 1つの  $\beta$ -ケトアシル-ACPシンターゼ (KS) ドメイン; (b) 1つのマロニル-CoA:ACPアシルトランスフェラーゼ (MAT) ドメイン; (c) 8つのアシルキャリアータンパク質 (ACP) ドメイン; および (d) 1つの  $\beta$ -ケトアシル-ACPレダクターゼ (KR) ドメイン。

#### 【0145】

ヤブレッツボカビ属23Bから単離された、本明細書においてTh23BOrfA\_pBR812.1およびTh23BOrfA\_pBR811 (OrfAゲノムクローン) と記載される2つのゲノムクローンはともに (部分的重複クローン)、本発明者らの知る限りでは、SEQ ID NO: 38のヌクレオチド配列を含み、SEQ ID NO: 39のアミノ酸配列をコードする。ゲノムクローンTh23BOrfA\_pBR812.1 (ヤブレッツボカビ属23B由来のOrfA遺伝子配列を含む大腸菌プラスミドベクターの形態では、Th23BOrfA\_pBR812.1ゲノムクローンと命名される) は、American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209 USAに2007年3月1日に寄託され、ATCCアクセッション番号\_\_\_\_\_が割り当てられている。OrfAゲノムクローンの1つであるTh23BOrfA\_pBR812.1のヌクレオチド配列、およびこのプラスミドによってコードされるアミノ酸配列は本発明に含まれる。ゲノムクローンTh23BOrfA\_pBR811 (ヤブレッツボカビ属23B由来のOrfA遺伝子配列を含む大腸菌プラスミドベクターの形態では

10

20

30

40

50

、Th23BOrfA\_pBR811ゲノムクローンと命名される)は、American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209 USAに2007年3月1日に寄託され、ATCCアクセッション番号\_\_\_\_\_が割り当てられている。OrfAゲノムクローンの1つであるTh23BOrfA\_pBR811のヌクレオチド配列、およびこのプラスミドによってコードされるアミノ酸配列は本発明に含まれる。

【0146】

Th. 23B OrfAにおける第1のドメインはKSドメインであり、これは本明細書においてTh. 23B OrfAKSとも称され、本明細書にSEQ ID NO: 40として表されている、SEQ ID NO: 38の約1位～約1500位に及ぶヌクレオチド配列の内部に含まれる。Th. 23B KSドメインを含むアミノ酸配列は、本明細書にSEQ ID NO: 41として表されている、SEQ ID NO: 39の約1位～約500位に及ぶ領域である。SEQ ID NO: 39のこの領域は、SEQ ID NO: 39の1位～約450位(同じくSEQ ID NO: 41の1位～約450位)に及ぶ、FabB(β-ケトアシル-ACPシンターゼ)に対するPfamマッチを有する。Th. 23B OrfA-KSドメインは活性部位モチーフ: DXAC<sup>\*</sup>(<sup>\*</sup>アシル結合部位C<sub>207</sub>)を含むことを指摘しておく。また、Th. 23B KS領域の末端にある特徴的モチーフであるGFGGも、SEQ ID NO: 39の453～456位(同じくSEQ ID NO: 41の453～456位)に存在する。

10

【0147】

Th. 23B OrfAにおける第2のドメインはMATドメインであり、これは本明細書においてTh. 23B OrfA-MATとも称され、本明細書にSEQ ID NO: 42として表されている、SEQ ID NO: 38の約1503位～約3000位に及ぶヌクレオチド配列の内部に含まれる。Th. 23B MATドメインを含む領域は、本明細書でSEQ ID NO: 43によって表されている、約501位～約1000位に及ぶSEQ ID NO: 39の領域である。SEQ ID NO: 39のこの領域は、SEQ ID NO: 39の約580位～約900位(SEQ ID NO: 43の80～400位)に及ぶ、FabD(マロニル-CoA:ACPアシルトランスフェラーゼ)に対するPfamマッチを有する。Th. 23B OrfA-MATドメインは、SEQ ID NO: 39の695～699位によって表されている活性部位モチーフ: GHS<sup>\*</sup>XG(<sup>\*</sup>アシル結合部位S<sub>697</sub>)を含むことを指摘しておく。

20

【0148】

Th. 23B OrfAのドメイン3～10は8つの縦列したACPドメインであり、これは本明細書においてTh. 23B OrfA-ACPとも称される(配列における第1のドメインはOrfA-ACP1であり、第2のドメインはOrfA-ACP2であり、第3のドメインOrfA-ACP3であり、以下も同様)。第1のTh. 23B ACPドメインであるTh. 23B OrfA-ACP1は、本明細書にSEQ ID NO: 44として表されている、SEQ ID NO: 38(OrfA)の約3205位～約3555位に及ぶヌクレオチド配列の内部に含まれる。第1のTh. 23B ACPドメインを含むアミノ酸配列は、本明細書でSEQ ID NO: 45によって表されている、SEQ ID NO: 39の約1069位～約1185位に及ぶSEQ ID NO: 39の領域である。

30

【0149】

Th. 23B OrfAにおける8つのACPドメインは互いに隣接しており、ホスホパンテテイン結合部位モチーフ、LGXDS<sup>\*</sup>(SEQ ID NO: 46によって表されている)の存在によって同定され、ここでS<sup>\*</sup>はホスホパンテテイン結合部位である。SEQ ID NO: 39に関して、8つのS<sup>\*</sup>部位のそれぞれのアミノ酸位置は、1128(ACP1)、1244(ACP2)、1360(ACP3)、1476(ACP4)、1592(ACP5)、1708(ACP6)、1824(ACP7)および1940(ACP8)である。8つのTh. 23B ACPドメインはすべて、ヌクレオチド配列およびアミノ酸配列が高度に保存的であり、このため、各ドメインの配列を個別の配列識別子によって本明細書中に表してはいない。しかし、本明細書に開示した情報に基づいて、当業者は、SEQ ID NO: 38およびSEQ ID NO: 39における他の7つのACPドメインのそれぞれを含む配列を容易に決定することができる。

40

【0150】

8つのTh. 23B ACPドメインはいずれも、SEQ ID NO: 38の約3205位から約5994位までのTh. 23B OrfAの領域に及び、これはSEQ ID NO: 39の約1069～約1998位のアミノ酸位置に対応する。8つのすべてのドメインを含むACP領域全体に関するヌクレオチド配列は、本明細

50

書にSEQ ID NO : 47として表されている。SEQ ID NO : 47は、本明細書でSEQ ID NO : 48によって表されているアミノ酸配列をコードする。SEQ ID NO : 48は、個々のACPドメインの間のリンカーセグメントを含む。8つのドメインに関する反復の間隔は、SEQ ID NO : 48のおよそ116アミノ酸毎であり、各ドメインは活性部位モチーフ（上記）の中心に位置する約116個のアミノ酸からなると考えることができる。

【 0 1 5 1 】

Th. 23B OrfAにおける最後のドメインはKRドメインであり、これは本明細書においてTh. 23B OrfA-KRとも称され、本明細書でSEQ ID NO : 49によって表されている、SEQ ID NO : 38の約6001位～約8433位に及ぶヌクレオチド配列の内部に位置する。Th. 23B KRドメインを含むアミノ酸配列は、本明細書でSEQ ID NO : 50によって表されている、SEQ ID NO : 39の約2001位～約2811位に及ぶSEQ ID NO : 39の領域である。SEQ ID NO : 39のこの領域は、SEQ ID NO : 39の約2300位～約2550位（SEQ ID NO : 50の300～550位）に及ぶ、FabG（-ケトアシル-ACPレダクターゼ）に対するPfamマッチを有する。

10

【 0 1 5 2 】

ヤブレッツボカビ属23BのオープンリーディングフレームB (OrfB) :

Th. 23B OrfBに関する全ヌクレオチド配列は本明細書にSEQ ID NO : 51として表されており、これは本明細書にSEQ ID NO : 52として表されている1935アミノ酸の配列をコードする、5805ヌクレオチドの配列（終止コドンを含めず）である。SEQ ID NO : 51は、Th. 23B OrfBにおける以下のドメインをコードする：(a) 1つの -ケトアシル-ACPシンターゼ（KS）ドメイン；(b) 1つの鎖長因子（CLF）ドメイン；(c) 1つのアシルトランスフェラーゼ（AT）ドメイン；および(d) 1つのエノイル-ACPレダクターゼ（ER）ドメイン。

20

【 0 1 5 3 】

ヤブレッツボカビ属23Bから単離された、本明細書においてTh23BOrfB\_pBR800 (OrfBゲノムクローン)と記載されるゲノムクローンは、本発明者らの知る限りでは、SEQ ID NO : 51のヌクレオチド配列を含み、SEQ ID NO : 52のアミノ酸配列をコードする。ゲノムクローンTh23BOrfB\_pBR800（ヤブレッツボカビ属23B由来のOrfB遺伝子配列を含む形態では、Th23B OrfB\_pBR800ゲノムクローンと命名される）は、American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209 USAに2007年3月1日に寄託され、ATCCアクセッション番号\_\_\_\_\_が割り当てられている。OrfBゲノムクローンであるTh23BOrfB\_pBR800のヌクレオチド配列、およびこのプラスミドによってコードされるアミノ酸配列は本発明に含まれる。

30

【 0 1 5 4 】

Th. 23B OrfBにおける第1のドメインはKSドメインであり、これは本明細書においてTh. 23B OrfB-KSとも称され、本明細書にSEQ ID NO : 53として表されている、SEQ ID NO : 51 (Th. 23B OrfB) の約1位～約1500位に及ぶヌクレオチド配列の内部に含まれる。Th. 23B KSドメインを含むアミノ酸配列は、本明細書にSEQ ID NO : 54として表されている、SEQ ID NO : 52の約1位～約500位に及ぶSEQ ID NO : 52の領域である。SEQ ID NO : 52のこの領域は、約1位～約450位（SEQ ID NO : 54の1～450位）に及ぶ、FabB（-ケトアシル-ACPシンターゼ）に対するPfamマッチを有する。Th. 23B OrfB-KSドメインは活性部位モチーフ：DXAC<sup>\*</sup>を含み、ここでC<sup>\*</sup>はアシル基結合の部位であり、C<sup>\*</sup>はSEQ ID NO : 52の201位にあることを指摘しておく。また、KS領域の末端にある特徴的モチーフであるGFGGも、SEQ ID NO : 52のアミノ酸434～437位に存在する。

40

【 0 1 5 5 】

Th. 23B OrfBにおける第2のドメインはCLFドメインであり、これは本明細書においてTh. 23B OrfB-CLFとも称され、本明細書にSEQ ID NO : 55として表されている、SEQ ID NO : 51 (OrfB) の約1501位～約3000位に及ぶヌクレオチド配列の内部に含まれる。CLFドメインを含むアミノ酸配列は、本明細書にSEQ ID NO : 56として表されている、SEQ ID NO : 52の約501位～約1000位に及ぶSEQ ID NO : 52の領域である。SEQ ID NO : 52のこの領域は、約550位～約910位（SEQ ID NO : 56の50～410位）に及ぶ、FabB（-ケトアシル-ACPシンターゼ）に対するPfamマッチを有する。CLFはKSタンパク質との相同性を有するが、これ

50

はKSタンパク質においてアシル基が結合する活性部位システインを欠いている。

【 0 1 5 6 】

Th. 23B OrfBにおける第3のドメインはATドメインであり、これは本明細書においてTh. 23B OrfB-ATとも称され、本明細書にSEQ ID NO : 58として表されている、SEQ ID NO : 51 (Th. 23B OrfB) の約3001位 ~ 約4500位に及ぶヌクレオチド配列の内部に含まれる。Th. 23B ATドメインを含むアミノ酸配列は、本明細書にSEQ ID NO : 58として表されている、SEQ ID NO : 52の約1001位 ~ 約1500位に及ぶSEQ ID NO : 52の領域である。SEQ ID NO : 52のこの領域は、約1100位 ~ 約1375位 (SEQ ID NO : 58の100 ~ 375位) に及ぶ、FabD (マロニル-CoA:ACPアシルトランスフェラーゼ) に対するPfamマッチを有する。PUFAシンターゼのこのATドメインはMATタンパク質との相同性を有するが、これはMATの拡張モチーフ (鍵となるアルギニンおよびグルタミン残基) を欠いており、マロニル-CoAの転移には関与しないと考えられる。アシルトランスフェラーゼのGXS<sup>\*</sup>XGモチーフは存在し、ここでS<sup>\*</sup>はアシル結合の部位であり、SEQ ID NO : 52に関しては1123位に位置する。

【 0 1 5 7 】

Th. 23B OrfBにおける第4のドメインはERドメインであり、これは本明細書においてTh. 23B OrfB-ERとも称され、本明細書にSEQ ID NO : 59として表されている、SEQ ID NO : 51 (OrfB) の約4501位 ~ 約5805位に及ぶヌクレオチド配列の内部に含まれる。Th. 23B ERドメインを含むアミノ酸配列は、本明細書にSEQ ID NO : 60として表されている、SEQ ID NO : 52の約1501位 ~ 約1935位に及ぶSEQ ID NO : 52の領域である。SEQ ID NO : 52のこの領域は、約1501位 ~ 約1810位 (SEQ ID NO : 60の1 ~ 310位) に及ぶ、2-ニトロプロパンジオキシゲナーゼに関連したジオキシゲナーゼのファミリーに対するPfamマッチを有する。このドメインがERとして機能することを、肺炎連鎖球菌由来の新たに特徴づけられたER酵素に対する相同性からさらに予測することができる。

【 0 1 5 8 】

ヤブレッツボカビ属23BのオープンリーディングフレームC (OrfC) :

Th. 23B OrfCに関する全ヌクレオチド配列は本明細書にSEQ ID NO : 61として表されており、これは本明細書にSEQ ID NO : 62として表されている1470アミノ酸の配列をコードする、4410ヌクレオチドの配列 (終止コドンを含めず) である。SEQ ID NO : 61は、Th. 23B OrfCにおける以下のドメインをコードする : (a) 両方ともFabAタンパク質 (トランス-2-デセノイル-ACPの合成およびこの生成物のシス-3-デセノイル-ACPへの可逆的異性化を触媒する酵素) との相同性を有する、2つのFabA様 -ヒドロキシアシル-ACPデヒドラーゼ (DH) ドメイン ; および (b) シゾキトリウム属OrfBのERドメインに対する高度の相同性を有する、1つのエノイル-ACPレダクターゼ (ER) ドメイン。

【 0 1 5 9 】

ヤブレッツボカビ属23Bから単離された、本明細書においてTh23BOrfC\_pBR709A (OrfCゲノムクローン) と記載されるゲノムクローンは、本発明者らの知る限りでは、SEQ ID NO : 61のヌクレオチド配列を含み、SEQ ID NO : 62のアミノ酸配列をコードする。ゲノムクローンTh23BOrfC\_pBR709A (ヤブレッツボカビ属23B由来のOrfC遺伝子配列を含む大腸菌プラスミドベクターの形態では、Th23BOrfC\_pBR709Aゲノムクローンと命名される) は、American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209 USAに2007年3月1日に寄託され、ATCCアクセッション番号\_\_\_\_\_が割り当てられている。OrfCゲノムクローンであるTh23BOrfC\_pBR709Aのヌクレオチド配列、およびこのプラスミドによってコードされるアミノ酸配列は本発明に含まれる。

【 0 1 6 0 】

Th. 23B OrfCにおける第1のドメインはDHドメインであり、これは本明細書においてTh. 23B OrfC-DH1とも称され、本明細書にSEQ ID NO : 63として表されている、SEQ ID NO : 61の約1位 ~ 約1500位 (OrfC) に及ぶヌクレオチド配列の内部に含まれる。Th. 23B DH1ドメインを含むアミノ酸配列は、本明細書にSEQ ID NO : 64として表されている、SEQ ID NO : 62の約1位 ~ 約500位に及ぶSEQ ID NO : 62の領域である。SEQ ID NO : 62のこの領域は、上述したように、約275位 ~ 約400位 (SEQ ID NO : 64の275 ~ 400位) に及ぶ、FabAに対す

るPfamマッチを有する。

【 0 1 6 1 】

Th. 23B OrfCにおける第2のドメインもDHドメインであり、これは本明細書においてTh. 23B OrfC-DH2とも称され、本明細書にSEQ ID NO : 65として表されている、SEQ ID NO : 61 (OrfC) の約1501位 ~ 約3000位に及ぶヌクレオチド配列の内部に含まれる。Th. 23B DH2ドメインを含むアミノ酸配列は、本明細書にSEQ ID NO : 66として表されている、SEQ ID NO : 62の約501位 ~ 約1000位に及ぶSEQ ID NO : 62の領域である。SEQ ID NO : 62のこの領域は、上述したように、約800位 ~ 約925位 (SEQ ID NO : 66の300 ~ 425位) に及ぶ、FabAに対するPfamマッチを有する。

【 0 1 6 2 】

Th. 23B OrfCにおける第3のドメインはERドメインであり、これは本明細書においてTh. 23B OrfC-ERとも称され、本明細書にSEQ ID NO : 67として表されている、SEQ ID NO : 61の約3001位 ~ 約4410位 (OrfC) に及ぶヌクレオチド配列の内部に含まれる。Th. 23B ERドメインを含むアミノ酸配列は、本明細書にSEQ ID NO : 68として表されている、SEQ ID NO : 62の約1001位 ~ 約1470位に及ぶSEQ ID NO : 62の領域である。SEQ ID NO : 62のこの領域は、上述したように、約1025位 ~ 約1320位 (SEQ ID NO : 68の25 ~ 320位) に及ぶ、2-ニトロプロパンジオキシゲナーゼに関連したジオキシゲナーゼに対するPfamマッチを有する。このドメインがERとして機能すること、肺炎連鎖球菌由来の新たに特徴づけられたER酵素に対する相同性からさらに予測することができる。

【 0 1 6 3 】

シュワネラ-ジャポニカのPUFA PKS

以前に記載されている、シュワネラ-ジャポニカのコアPUFA PKS系およびそのPPTアーゼを構成するオープンリーディングフレームは5つある。各オープンリーディングフレームのドメイン構造は以下の通りである。

【 0 1 6 4 】

SEQ ID NO : 69は、シュワネラ-ジャポニカのコスミド3F3に関するヌクレオチド配列であり、これは15個のORFを含むことが見いだされている。この微生物におけるPUFA PKS系に関連するORFは以下のように特徴づけられる。

【 0 1 6 5 】

pfaA (SEQ ID NO : 69のヌクレオチド10491 ~ 18854) は、以下のドメインを内部に持つPUFA PKSタンパク質であるPFAS A (SEQ ID NO : 70) をコードする： -ケトアシル-シンターゼ (KS) (SEQ ID NO : 69のヌクレオチド10575 ~ 12029、SEQ ID NO : 70のアミノ酸29 ~ 513) ; マロニル-CoA:ACPアシルトランスフェラーゼ (MAT) (SEQ ID NO : 69のヌクレオチド12366 ~ 13319、SEQ ID NO : 70のアミノ酸625 ~ 943) ; 6つの縦列したアシル-キャリアータンパク質 (ACP) ドメイン (SEQ ID NO : 69のヌクレオチド14280 ~ 16157、SEQ ID NO : 70のアミノ酸1264 ~ 1889) ; -ケトアシル-ACPレダクターゼ (KR) (SEQ ID NO : 69のヌクレオチド17280 ~ 17684、SEQ ID NO : 70のアミノ酸2264 ~ 2398) ; および、本明細書でDHモチーフ領域と称する、デヒドラターゼ (DH) の保存的活性部位モチーフLxxHxxxGxxxxP (SEQ ID NO : 70のアミノ酸2504 ~ 2516) を含む、SEQ ID NO : 70のアミノ酸2399 ~ 2787の間のPFASタンパク質の領域。

【 0 1 6 6 】

PFAS Aにおいて、KS活性部位DXAC\*はSEQ ID NO : 70のアミノ酸226 ~ 229に位置し、ここでC\*はアシル結合の部位である。MAT活性部位であるGHS\*XGはSEQ ID NO : 70のアミノ酸721 ~ 725に位置し、ここでS\*はアシル結合部位である。LGXDS\*のACP活性部位は以下の位置に位置する：SEQ ID NO : 70におけるアミノ酸1296 ~ 1300、アミノ酸1402 ~ 1406、アミノ酸1513 ~ 1517、アミノ酸1614 ~ 1618、アミノ酸1728 ~ 1732およびアミノ酸1843 ~ 1847、ここでS\*はホスホパンテテイン結合部位である。PFAS Aはまた、SEQ ID NO : 70のアミノ酸2399 ~ 2787の間に、以上に言及したデヒドラターゼ (DH) の保存的活性部位モチーフLxxHxxxGxxxxP (SEQ ID NO : 70のアミノ酸2504 ~ 2516) も含む。

【 0 1 6 7 】

10

20

30

40

50

pfaB (SEQ ID NO : 69のヌクレオチド18851 ~ 21130) は、以下のドメインを内部に含むPUFA PKSタンパク質であるPFAS B (SEQ ID NO : 71) をコードする：アシルトランスフェラーゼ (AT) (SEQ ID NO : 69のヌクレオチド19982 ~ 20902、SEQ ID NO : 71のアミノ酸378 ~ 684)。

【0168】

PFAS Bにおいて、活性部位GXS<sup>\*</sup>XGモチーフはSEQ ID NO : 71のアミノ酸463 ~ 467に位置し、ここでS<sup>\*</sup>はアシル結合の部位である。

【0169】

pfaC (SEQ ID NO : 69のヌクレオチド21127 ~ 27186) は、以下のドメインを内部に含むPUFA PKSタンパク質であるPFAS C (SEQ ID NO : 72) をコードする：KS (SEQ ID NO : 69のヌクレオチド21139 ~ 22575、SEQ ID NO : 72のアミノ酸5 ~ 483)；鎖長因子 (CLF) (SEQ ID NO : 69のヌクレオチド22591 ~ 23439、SEQ ID NO : 72のアミノ酸489 ~ 771)；ならびに、DH1 (SEQ ID NO : 69のヌクレオチド25408 ~ 25836、SEQ ID NO : 72のアミノ酸1428 ~ 1570) およびDH2 (SEQ ID NO : 69のヌクレオチド26767 ~ 27183、SEQ ID NO : 72のアミノ酸181 ~ 2019) と称する2つのFabA 3-ヒドロキシアシル-ACPデヒドラターゼ。

【0170】

PFAS Cにおいて、KS活性部位DXAC<sup>\*</sup>はSEQ ID NO : 72のアミノ酸211 ~ 214に位置し、ここでC<sup>\*</sup>はアシル結合の部位である。

【0171】

pfaD (SEQ ID NO : 69のヌクレオチド27197 ~ 28825) は、以下のドメインを内部に含むPUFA PKSタンパク質であるPFAS D (SEQ ID NO : 73) をコードする：エノイルレダクターゼ (ER) (SEQ ID NO : 69のヌクレオチド27446 ~ 28687、SEQ ID NO : 73のアミノ酸84 ~ 497)。

【0172】

pfaE (逆相補鎖上のSEQ ID NO : 69のヌクレオチド6150 ~ 7061) は、同定されたドメイン (SEQ ID NO : 69のヌクレオチド6504 ~ 6944、SEQ ID NO : 74のアミノ酸40 ~ 186) を有する4'-ホスホパンテテイルトランスフェラーゼ (PPTアーゼ) である、PFAS E (SEQ ID NO : 74) をコードする。

【0173】

#### シュワネラ-オレヤナのPUFA PKS

以前に記載されている、シュワネラ-オレヤナコアPUFA PKS系およびそのPPTアーゼを構成するオープンリーディングフレームは5つある。各オープンリーディングフレームのドメイン構造は以下の通りである。

【0174】

SEQ ID NO : 75は、シュワネラ-オレヤナのコスミド9A10に関するヌクレオチド配列であり、これは17個のORFを含むことが見いだされている。この微生物におけるPUFA PKS系に関連するORFは以下のように特徴づけられる。

【0175】

pfaA (SEQ ID NO : 75のヌクレオチド17437 ~ 25743) は、以下のドメインを内部に含むPUFA PKSタンパク質であるPFAS A (SEQ ID NO : 76) をコードする： $\beta$ -ケトアシル-シンターゼ (KS) (SEQ ID NO : 75のヌクレオチド17521 ~ 18975、SEQ ID NO : 76のアミノ酸29 ~ 513)；マロニル-CoA:ACPアシルトランスフェラーゼ (MAT) (SEQ ID NO : 75のヌクレオチド19309 ~ 20265、SEQ ID NO : 76のアミノ酸625 ~ 943)；6つの縦列したアシル-キャリアータンパク質 (ACP) ドメイン (SEQ ID NO : 75のヌクレオチド21259 ~ 23052、SEQ ID NO : 76のアミノ酸1275 ~ 1872)； $\beta$ -ケトアシル-ACPレダクターゼ (KR) (SEQ ID NO : 75のヌクレオチド24154 ~ 24558、SEQ ID NO : 76のアミノ酸2240 ~ 2374)；および、本明細書でDHモチーフ領域と称する、デヒドラターゼ (DH) の保存的活性部位モチーフLxxHxxxGxxxxP (SEQ ID NO : 76のアミノ酸2480 ~ 2492) を含む、SEQ ID NO : 76のアミノ酸2241 ~ 2768の間のPFASタンパク質の領域。

【0176】

10

20

30

40

50

PFAS Aにおいて、KS活性部位DXAC<sup>\*</sup>はSEQ ID NO: 76のAA 226~229に位置し、ここでC<sup>\*</sup>アシル結合の部位である。MAT活性部位であるGHS<sup>\*</sup>XGはSEQ ID NO: 76のアミノ酸721~725に位置し、ここでS<sup>\*</sup>はアシル結合部位である。LGXDS<sup>\*</sup>のACP活性部位は以下に位置する: SEQ ID NO: 76におけるアミノ酸1307~1311、アミノ酸1408~1412、アミノ酸1509~1513、アミノ酸1617~1621、アミノ酸1721~1725およびアミノ酸1826~1830、ここでS<sup>\*</sup>はホスホパンテテイン結合部位である。PFAS Aはまた、SEQ ID NO: 76のアミノ酸2241~2768の間に、以上に言及したデヒドラターゼ(DH)の保存的活性部位モチーフLxxHxxxGxxxxP (SEQ ID NO: 76のアミノ酸2480~2492)も含む。

【0177】

pfaB (SEQ ID NO: 75のヌクレオチド25740~27971)は、以下のドメインを内部に含むPUFA PKSタンパク質であるPFAS B (SEQ ID NO: 77)をコードする: アシルトランスフェラーゼ(AT) (SEQ ID NO: 75のヌクレオチド26837~27848、SEQ ID NO: 77のアミノ酸366~703)。

【0178】

PFAS Bにおいて、活性部位GXS<sup>\*</sup>XGモチーフはSEQ ID NO: 77のアミノ酸451~455に位置し、ここでS<sup>\*</sup>はアシル結合の部位である。

【0179】

pfaC (SEQ ID NO: 75のヌクレオチド27968~34030)は、以下のドメインを内部に含むPUFA PKSタンパク質であるPFAS C (SEQ ID NO: 78)をコードする: KS (SEQ ID NO: 75のヌクレオチド27995~29431、SEQ ID NO: 78のアミノ酸10~488); 鎖長因子(CLF) (SEQ ID NO: 75のヌクレオチド29471~30217、SEQ ID NO: 78のアミノ酸502~750); ならびに、DH1 (SEQ ID NO: 75のヌクレオチド32258~32686、SEQ ID NO: 78のアミノ酸1431~1573)およびDH2 (SEQ ID NO: 75のヌクレオチド33611~34027、SEQ ID NO: 78のアミノ酸182~2020)と称する2つのFabA 3-ヒドロキシアシル-ACPデヒドラターゼ。

【0180】

PFAS Cにおいて、KS活性部位DXAC<sup>\*</sup>はSEQ ID NO: 78のアミノ酸216~219に位置し、ここでC<sup>\*</sup>はアシル結合の部位である。

【0181】

pfaD (SEQ ID NO: 75のヌクレオチド34041~35669)は、以下のドメインを内部に含むPUFA PKSタンパク質であるPFAS D (SEQ ID NO: 79)をコードする: エノイルレダクターゼ(ER) (SEQ ID NO: 75のヌクレオチド34290~35531、SEQ ID NO: 79のアミノ酸84~497)。

【0182】

pfaE (逆相補鎖上のSEQ ID NO: 75のヌクレオチド13027~13899)は、同定されたドメイン (SEQ ID NO: 75のヌクレオチド13369~13815、SEQ ID NO: 80のアミノ酸29~177)を有する4'-ホスホパンテテインイルトランスフェラーゼ(PPTアーゼ)である、PFAS E (SEQ ID NO: 80)をコードする。

【0183】

最適化されたPUFA PKS配列を含む他のPUFA PKS配列

本発明は、異種宿主におけるPUFA PKS系の発現に用いるためのさまざまな最適化された配列を含み、その例は以下に提示されている。当業者は、最適化された配列、特に、異種宿主における好ましいコドン用法またはより優れた発現および機能のために最適化された配列を作製しうると考えられる。

【0184】

sOrfA

sOrfAと命名されたSEQ ID NO: 35は、酵母における最適化されたコドン用法のために再合成された、シゾキトリウム属由来のOrfAをコードする核酸配列 (SEQ ID NO: 1)を表す。SEQ ID NO: 1およびSEQ ID NO: 35はそれぞれSEQ ID NO: 2をコードする。

【0185】

sOrfB

10

20

30

40

50

sOrfBと命名されたSEQ ID NO: 36は、酵母における最適化されたコドン用法のために再合成された、シゾキトリウム属由来のOrfBをコードする核酸配列 (SEQ ID NO: 3) を表す。SEQ ID NO: 3およびSEQ ID NO: 36はそれぞれSEQ ID NO: 4をコードする。

【0186】

#### OrfB<sup>\*</sup>

OrfB<sup>\*</sup>と命名されたSEQ ID NO: 37は、植物細胞における使用のためにSEQ ID NO: 3の一部分の内部に再合成され、OrfB<sup>\*</sup>とも称される、大腸菌における最適化されたコドン用法のために最初は開発された極めて類似した配列に由来するシゾキトリウム属由来のOrfBをコードする核酸配列 (SEQ ID NO: 3) を表す。OrfB<sup>\*</sup>はいずれの型 (大腸菌用および植物用) も、SacII断片 (SEQ ID NO: 3における一意的な部位) に対するBspHI再合成 (SEQ ID NO: 3のヌクレオチド4415) を除いて、SEQ ID NO: 3と同一である。どちらのバージョン (大腸菌および植物) も、orfBの元のゲノム配列 (SEQ ID NO: 3) と比較して、遺伝子の開始部付近に他の2つのコドン改変を有する。第1に、第4のコドンであるアルギニン (R) が、ゲノム配列におけるCGGからorfB<sup>\*</sup>ではCGCに変化している。第2に、第5のコドンであるアスパラギン (N) が、ゲノム配列におけるAATからorfB<sup>\*</sup>ではAACに変化している。SEQ ID NO: 37を作り出すための植物ベクター中へのこの遺伝子のクローニングを容易にするために、大腸菌orfB<sup>\*</sup>配列中の、遺伝子の開始部から20塩基の箇所にPstI部位 (CTGCAG) も人為的に作製した。この変化は、コードされるタンパク質のアミノ酸配列を変化させなかった。SEQ ID NO: 37およびSEQ ID NO: 3 (ならびに大腸菌用のOrfB<sup>\*</sup>型) はいずれもSEQ ID NO: 4をコードする。

【0187】

#### PUFAの産生および蓄積の改良のためのアクセサリタンパク質ならびさらなる標的および戦略

本発明によれば、異種宿主におけるPUFAの産生および/もしくは蓄積のため、または内因性宿主におけるPUFAの産生および/もしくは蓄積の改良のためのPUFA PKS系は、PUFAの産生のための上記のさまざまな標的または戦略の1つまたは複数を利用することが好ましい (上記の6つの指針および戦略を参照)。これらの戦略には、とりわけ、上記のコアPUFA PKS系の部分ではない (すなわち、PUFAシンターゼ酵素複合体それ自体の部分ではない) と考えられるタンパク質と定義されるが、本発明のコアPUFAシンターゼ酵素複合体を用いたPUFA産生のため、または少なくとも効率的なPUFA産生のためには必要と思われる、または必要である、さまざまなアクセサリタンパク質の使用が含まれる。これらの戦略にはまた、マロニル-CoAのプールをめぐって競合するその能力を強化することにより、PUFAシンターゼ経路を通じての基質マロニル-CoAの流れを増大させるためのさまざまな遺伝的改変も含まれる。本発明のこれらの態様の変形物について以下に述べる。

【0188】

#### ホスホパンテティニルトランスフェラーゼ (PPTアーゼ)

異種宿主におけるPUFAの産生のための一般的な指針および戦略の下で以上に考察したように、PUFAを生成するためには、PUFA PKS系は、4'-ホスホパンテティニル部分を補酵素Aからアシルキャリアータンパク質 (ACP) ドメインに転移させるアクセサリタンパク質とともに働かなくてはならない。このため、PUFA PKS系は少なくとも1つの4'-ホスホパンテティニルトランスフェラーゼ (PPTアーゼ) ドメインを含むと考えることができ、またはそのようなドメインはPUFA PKS系にとってのアクセサリドメインまたはタンパク質であると考えることができる。PPTアーゼの構造的および機能的な特徴は、例えば、米国特許出願公開第20020194641号; 米国特許出願公開第20040235127号; および米国特許出願公開第20050100995号に詳細に記載されている。

【0189】

本発明によれば、4'-ホスホパンテティニルトランスフェラーゼ (PPTアーゼ) 生物活性 (機能) を有するドメインまたはタンパク質は、4'-ホスホパンテティニル部分を補酵素Aからアシルキャリアータンパク質 (ACP) に転移させる酵素として特徴づけられる。ACPの不変セリン残基へのこの転移は、不活性なアポ型をホロ型に活性化する。ポリケチドおよ



び脂肪酸のいずれの合成においても、ホスホパンテテイン基は、成長中のアシル鎖とチオエステルを形成する。PPTアーゼは、脂肪酸合成、ポリケチド合成および非リボソーム性ペプチド合成において十分に特徴づけられている酵素のファミリーである。多くのPPTアーゼの配列が公知であり、結晶構造が決定されている上に（例えば、Reuter K, Mofid MR, Marahiel MA, Ficner R. "Crystal structure of the surfactin synthetase-activating enzyme sfp: a prototype of the 4'-phosphopantetheinyl transferase superfamily" EMBO J. 1999 Dec 1;18(23):6823-31）、活性にとって重要なアミノ酸残基の突然変異分析も行われている（Mofid MR, Finking R, Essen LO, Marahiel MA. "Structure-based mutational analysis of the 4'-phosphopantetheinyl transferases Sfp from *Bacillus subtilis*: carrier protein recognition and reaction mechanism" Biochemistry. 2004 Apr 13;43(14):4128-36）。PPTアーゼにおけるこれらの不変かつ高度に保存されたアミノ酸は、上記の両方のシウネラ菌株由来のpfaE ORFの範囲内に含まれる。

#### 【0190】

本明細書に記載したOrfA ACPドメインを基質として認識することが以前に実証されている1つの異種PPTアーゼは、ネンジュモ属PCC 7120（以前はアナベナ属（*Anabaena*）PCC 7120と呼ばれた）のHetIタンパク質である。HetIは、ネンジュモ属において、その生物の異質細胞に存在する糖-脂質層の構成要素である長鎖ヒドロキシ脂肪酸の合成に関与することが知られている遺伝子クラスター内に存在する（Black and Wolk, 1994, J. Bacteriol. 176, 2282-2292; Campbell et al., 1997, Arch. Microbiol. 167, 251-258）。HetIは、そのクラスター内に存在するタンパク質HglEのACPドメインを活性化することが高い。HglEの2つのACPドメインは、シゾキトリウム属OrfAに見られるACPドメインに対して高度の配列相同性を有する。SEQ ID NO: 34はネンジュモ属HetIタンパク質のアミノ酸配列を表しており、これは、シゾキトリウム属およびヤブレツボカビ属由来のPUFA PKS系を含む、本明細書に記載したPUFA PKS系とともに用いる機能性PPTアーゼである。SEQ ID NO: 34はSEQ ID NO: 33によってコードされる。HetIの内因性開始コドンとは同定されていない（推定されるタンパク質にはメチオニンが全く存在しない）。オープンリーディングフレームの5'末端付近に、いくつかの有望な代替的開始コドン（例えば、TTGおよびATT）が存在する。メチオニンコドン（ATG）は配列中に存在しない。しかし、最も5'側の有望な代替的開始コドン（TTG）をメチオニンコドン（ATG、NdeI制限酵素認識部位の一部として）と置き換えるためのPCRを用い、コード配列の3'末端にXhoI部位を導入することでHetI発現構築物の構築を完了したところ、コードされるPPTアーゼ（SEQ ID NO: 34）は機能的であったことが示されている。

#### 【0191】

本明細書に記載したOrfA ACPドメインを基質として認識することが以前に示されているもう1つの異種PPTアーゼは、枯草菌（*Bacillus subtilis*）に由来するsfpである。Sfpは十分に特徴づけられており、広範囲にわたる基質を認識する能力のために広く用いられている。公開されている配列情報（Nakana, et al., 1992, Molecular and General Genetics 232: 313-321）に基づき、コード領域を、規定された上流および下流の隣接DNA配列とともに、pACYC-184クローニングベクター中にクローニングすることにより、sfpに関する発現ベクターが以前に作製されている。この構築物は、大腸菌においてシゾキトリウム属OrfA、B\*およびCと共発現されて、適切な条件下で、それらの細胞におけるDHAの蓄積をもたらす能力によって実証されているように、機能性PPTアーゼをコードする（米国特許出願公開第20040235127号を参照）。

#### 【0192】

本発明によるPUFA PKS系を発現させるために生物（例えば、微生物または植物）を遺伝的に改変する場合に、ある種の宿主生物は、PUFAを産生するためにPUFA PKSとともに働く必要のあるアクセサリタンパク質（例えば、PPTアーゼ）を内因的に発現する可能性がある。しかし、ある種の生物は、生物が同種アクセサリタンパク質をたとえ内因的に産生しても、生物によるPUFAの産生を可能にする、および/または強化するために、本明細書に記載した1つまたは複数のアクセサリタンパク質をコードする核酸分子によって形

質転換することができる（すなわち、ある種の異種アクセサリータンパク質は、宿主細胞の内因性アクセサリータンパク質よりも、形質転換されたPUFAシンターゼタンパク質の方がより効果的または効率的に働く可能性がある）。本発明は、アクセサリ-PPTアーゼを含む本発明のPUFA PKS系によって遺伝的に改変された細菌、酵母および植物の一例を提供する。

#### 【0193】

したがって、本発明の1つの態様は、遺伝的に改変された宿主細胞または生物（例えば、微生物もしくは植物、またはその細胞）であって、本明細書に記載したようなコアPUFA PKS系に加えて、本明細書に記載したようなPPTアーゼも発現するように遺伝的に改変された宿主細胞または生物に関する。適したPPTアーゼは以上に記載されており、当技術分野で記載されてもいる。PPTアーゼは、1つまたは複数のコアPUFA PKSタンパク質をコードする核酸分子の1つまたは複数として、同一のまたは異なる構築物上で発現させることができる。いずれの態様も実施例において例証されている（実施例12および13を参照）。1つの局面において、PPTアーゼはネンジュモ属Het1（本明細書でSEQ ID NO: 33および34によって表されている）である。

#### 【0194】

本発明の1つの態様において、PUFAの産生および蓄積は、（例えば、この態様に従ってPUFA PKS酵素とともに導入されたPPTアーゼとの競合を避けるために）宿主細胞または宿主生物によって発現される内因性PPTアーゼの発現または活性を低下させること（阻害すること、ダウンレギュレートすること、減少させること）によって強化される。内因性PPTアーゼ活性の阻害は、アンチセンスRNA、RNAi、共抑制または突然変異の導入の使用を非限定的に含む、任意の適した、遺伝子の欠失または不活性化の方法によって達成することができる。

#### 【0195】

本発明は、異種宿主におけるPUFAの産生および/または蓄積を増加させるために、単独で、または本明細書に記載した任意の1つもしくは複数の戦略（例えば、以下の任意の1つ、2つ、3つ、4つまたは5つ：コドン最適化、オルガネラターゲティング、マロニル-CoAをめぐるPUFAシンターゼの競合の強化（例えば、FASの阻害による）、アシルCoAシンターゼの発現、および/または1つもしくは複数のアシルトランスフェラーゼもしくは関連酵素の発現）と組み合わせて利用される、本明細書に記載したPUFAシンターゼの発現を伴っての外因性PPTアーゼの発現（単独で、または内因性PPTアーゼの阻害と組み合わせて）を含む。

#### 【0196】

##### マロニルCoAの流れの改変 / FASの阻害

以上に考察したように、PUFA PKS系（PUFAシンターゼ）の基質であるマロニル-CoAは、脂肪酸シンターゼ系（FAS）、細胞質脂肪酸伸長反応および他の酵素（例えば、カルコンシンターゼ）によっても利用される。このため、PUFAシンターゼは、マロニル-CoAをめぐるこれらの他の酵素系と競合する。したがって、本発明の1つの態様は、マロニル-CoAのプールをめぐる競合するPUFAシンターゼ酵素の能力を強化することによって、PUFAシンターゼ経路を通じてのマロニル-CoAの流れを増大させるための方法および遺伝的改変に関する。本明細書で提唱する方法には、以下が非限定的に含まれる：1）競合性経路の阻害、これには例えば、そのような経路に関与する酵素またはサブユニットの発現レベルを低下させることによる（例えば、アンチセンスRNA、RNAi、共抑制または突然変異の使用による）、FAS経路内の任意の要素の阻害が含まれる、2）競合性経路が減弱化またはブロックされている異種宿主（例えば、細胞質中の脂肪酸を伸長させる能力がブロックされているキャノーラ）におけるPUFAシンターゼの発現、および/または3）マロニル-CoAのプールを増加させること（例えば、アセチル-CoAカルボキシラーゼの発現による）。

#### 【0197】

より具体的には、1つの局面において、本発明はまた、PUFA PKS系によるPUFAの産生および/または蓄積と競合もしくは干渉する可能性のある遺伝子を欠失もしくは不活性化さ

せるため、またはそのような遺伝子によってコードされる酵素の活性のレベルを低下させるための、PUFAを産生する宿主生物、特に異種PUFA PKS系を発現する宿主生物の遺伝的改変も含む。例えば、本発明者らは、PUFA PKS系によって形質転換された宿主生物におけるFAS活性を低下させることにより、正常レベルのFAS活性を保っている宿主生物と比較して、PUFAの産生および蓄積が改善することを見いだしている（実施例における、シゾキトリウム属での例示的な実験、ならびに酵母および植物に関して詳述した実験を参照されたい）。

#### 【0198】

1つの態様においては、FAS経路を通じての脂肪酸の生成を阻害するさまざまな酵素が想定される。多くの酵素が、本発明のこの態様に関する適した標的となる可能性があり、2つの特に有用な標的を以下に例示して詳述する。本発明者らは、シゾキトリウム属においてFAS酵素をノックアウトしうることを実証しており（実施例参照）、この戦略は異種宿主に適用することができる。もう1つの態様において、本発明者らは、酵母宿主において生化学的方法によってFAS系を阻害することができ、FAS系の生化学的ターゲティングの非存在下と比較して、PUFAシンターゼおよびPPTアーゼを発現する酵母においてPUFA産生の改良がもたらされることも実証している。ある種の他の宿主には同様の戦略が適用可能と思われる。

#### 【0199】

さらに、植物において、本発明者らは、アンチセンスまたはRNAi技術を用いたKasIIまたはKasIIIの阻害によるFAS経路の阻害が、PUFAシンターゼおよびPPTアーゼを発現する異種宿主におけるPUFA産生を改善することも実証している。本発明はこれらの特定の標的には限定されないが、異種宿主におけるPUFAの産生および/または蓄積を増加させるために、単独で、または本明細書に記載した任意の1つもしくは複数の戦略（例えば、コドン最適化、オルガネラターゲティング、アシルCoAシンターゼの発現、および/または1つもしくは複数のアシルトランスフェラーゼもしくは関連酵素の発現）と組み合わせて、本明細書に記載したPUFAシンターゼおよびPPTアーゼの発現を伴って阻害のためにこれらの酵素の一方または両方を標的とすることは、本発明の1つの局面である。

#### 【0200】

種子において、主としてトリアシルグリセロール（TAG）の形態にある脂質は、同化性酵素経路を通じての同化産物から派生する。一般に、還元炭素は植物の他の部分から師部を介して種子に送達される。植物種子において、TAGの生合成は細胞内にて種々のオルガネラの内部で行われる（Ohlrogge and Browse, 1995, Plant Cell 7: 957-970）。プラスチドの内部では、C2単位を脂肪族アシル鎖に反復的に付加し、鎖を次の伸長のために準備させるII型可溶性脂肪酸シンターゼ（FAS）複合体によって、短い炭素前駆体が長鎖脂肪酸に変換される（Slabas and Fawcett, 1992, Plant Molecular Biology 19: 169-191）。C2単位の8回または9回の縮合により、膜脂質を特徴づけるC16およびC18脂肪酸が生じる。初期のFAS活性は、核にコードされ、プラスチドを標的とする、マロニル基をマロニル-CoAからアシルキャリアータンパク質（ACP）に転移させる酵素マロニル-CoA:ACPトランスアシラーゼ（MCAT）によって遂行される（Yasuno et al., 2004, Journal of Biological Chemistry 292: 8242-8251）。これは基質マロニル-ACPを形成し、それは以後の伸長のためのC2単位を提供する。合成における次の段階は、核にコードされ、プラスチドを標的とする3-ケトアシル-アシルキャリアータンパク質シンターゼIII（KAS III）の触媒活性によって達成され、ここでマロニル-CoAとドナーであるマロニル-ACPとの縮合により、ブチリル（C4）-ACPがもたらされる。ACPにより活性化されたアシル鎖の以後のすべての延長は、核にコードされ、プラスチドを標的とする3-ケトアシル-アシルキャリアータンパク質シンターゼI（KAS I）および3-ケトアシル-アシルキャリアータンパク質シンターゼII（KAS II）アイソザイムによって行われる。KAS Iはブチリル（C4）-ACPからミリストイル（C14）-ACPまでを基質として利用することによって、C4-ACPをC16-ACPに変換する縮合反応を触媒し、KAS IIはパルミトイル（C16）-ACPを利用することによって、最後の段階を遂行してステアロイル（C18）-ACPを生じさせる（Carlsson et al., 2002

10

20

30

40

50

, Plant Journal 29: 761-770) )。したがって、KasIIIまたはKasIIの発現を阻害または減弱化することによって、種子発生の間の脂肪酸生合成の阻害を達成しうられる。

【0201】

1つの態様において、本発明は、宿主細胞におけるKasIIまたはKasIIIのいずれかのRNAiターゲティングを含む、核酸分子による異種宿主生物または細胞の形質転換を含む。1つの態様において、宿主細胞は植物細胞である。1つの態様において、本発明は、宿主細胞におけるKasIIまたはKasIIIのいずれかのアンチセンスターゲティングを含む、核酸分子による異種宿主生物または細胞の形質転換を含む。1つの好ましい態様において、宿主細胞は植物細胞である。

【0202】

1つの態様において、本発明は、実施例13に記載したようにCHSAイントロンによるKASII RNAiである、SEQ ID NO: 122によって表される核酸配列を含む核酸分子による異種宿主生物または細胞の形質転換を含む。1つの態様において、本発明は、実施例13に記載したようにCHSAイントロンによるKAS III RNAiである、SEQ ID NO: 124によって表される核酸配列を含む核酸分子による異種宿主生物または細胞の形質転換を含む。1つの態様において、本発明は、実施例13に記載したようにKAS IIアンチセンス核酸配列である、SEQ ID NO: 123によって表される核酸配列を含む核酸分子による異種宿主生物または細胞の形質転換を含む。1つの態様において、本発明は、実施例13に記載したようにKAS IIIアンチセンス核酸配列である、SEQ ID NO: 125によって表される核酸配列を含む核酸分子による異種宿主生物または細胞の形質転換を含む。

【0203】

マロニル-CoAプールをめぐって競合するPUFAシンターゼ酵素の能力を強化するためのそのほかの方法には、競合性経路が減弱化またはブロックされている異種宿主（例えば、細胞質中の脂肪酸を伸長させる能力がブロックされているキャノーラ）におけるPUFAシンターゼの発現が含まれる。他の適した異種宿主（天然の生物、ならびにノまたはランダム突然変異およびスクリーニングおよびノもしくは定方向的な突然変異によって同定された突然変異株）は、FAS経路などの競合性経路の減弱化またはブロックのための、ティリング法（tilling）、育種、マーカーを利用した選択などの手法によって選択することができる。

【0204】

アセチル-CoAカルボキシラーゼなどの他の酵素の発現も、すべての酵素系が利用可能なマロニル-CoAのプールを増加させ、それ故にPUFA PKS系を通じての流れを改善する。

【0205】

本発明は、異種宿主におけるPUFAの産生およびノまたは蓄積を増加させるために、単独で、または本明細書に記載した任意の1つもしくは複数の戦略（例えば、以下の任意の1つ、2つ、3つまたは4つ：コドン最適化、オルガネラターゲティング、アシルCoAシンターゼの発現、およびノまたは1つもしくは複数のアシルトランスフェラーゼもしくは関連酵素の発現）と組み合わせて利用される、本明細書に記載したPUFAシンターゼの発現を伴った外因性PPTアーゼの発現（単独で、または内因性PPTアーゼの阻害と組み合わせて）を用いるPUFA PKS系の能力を改良するためのいずれかの態様の実行を含む。

【0206】

アシル-CoAシンターゼ

本発明のもう1つの態様は、長鎖PUFA遊離脂肪酸（FFA）のアシル-CoAへの変換を触媒するアシル-CoAシンターゼ（ACoAS）タンパク質を提供する。

【0207】

本発明者らは、PUFA PKS系によるPUFAの内因性産生体であるシゾキトリウム属が、そのPUFA PKS系のFFA生成物をアシル-CoAに変換させることのできる1つまたは複数のACoASを持っていることを明らかにした。これは、この生物ではそのような画分に高レベルのPUFAが蓄積するという事実によって立証されている。したがって、シゾキトリウム属、ならびにPUFA PKS系を内因的に含む他の生物（例えば、他のヤブレッツボカビ科生物）またはPUFA

10

20

30

40

50

を産生する他の真核生物（タラシオシラ-シュードナナ（*Thalassiosira pseudonana*）またはクリプテコディニウム-コーニイなど）は、異種宿主によって発現されるPUFA PKS系の生成物の蓄積を許容または増加させるのに有用な酵素をコードする遺伝子の優れた供給源である。

#### 【0208】

本発明者らは、シゾキトリウム属において、アシル-CoAシンターゼ（ACoAS）活性が公知であるか疑われるタンパク質に対する相同性を有するタンパク質をコードする9つの核酸配列を同定した。本発明者らは、これらの配列の1つまたはいくつかは、シゾキトリウム属PUFAシンターゼのFFA生成物をアシル-CoAに変換しうるACoASをコードする遺伝子と関連すると考えており、宿主生物におけるPUFA産生および／または蓄積を増加させるためにこれらの配列のいくつかを利用しうることを実証した。このため、それらは、シゾキトリウム属PUFAシンターゼまたは別のPUFAシンターゼが発現される異種宿主におけるPUFAの蓄積を増加させるために、高い有用性を有すると考えられる。理論に拘束されることはないが、本発明者らは、本発明者らによって発見されたACoASが、シゾキトリウム属のそれに類似した産物プロフィールでPUFAシンターゼを発現する宿主において、ならびにシゾキトリウム属PUFAシンターゼのそれとは異なる産物プロフィールでPUFAシンターゼを発現する宿主において、PUFA蓄積を増加させるために有用であると考えている。実際に、本明細書に提示した実施例は、シゾキトリウム属由来のいくつかのACoASが、シゾキトリウム属PUFA PKS系によって遺伝的に改変された酵母株において、さらには同様に遺伝的に改変された植物においても、PUFAの蓄積を増加させることを実証している。加えて、シゾキトリウム属ACoASは、他の生物由来のPUFAシンターゼによって生成されるEPAを、そのEPAがFFAとして存在するならば、認識するのに有効であると期待される。さらに、本発明によって提供される開示を考慮すれば、他の生物由来のACoASをコードする遺伝子を、そのようなPUFAシンターゼを発現する異種宿主生物で用いるために同定して利用することができる。これらのACoASタンパク質およびそれをコードする核酸は本発明に含まれ、それらの相同体および生物活性断片も同様である。これらのタンパク質および核酸分子について、以下および実施例において詳細に考察する。

#### 【0209】

本発明の1つの態様は、長鎖PUFA遊離脂肪酸（FFA）のアシル-CoAへの変換を触媒する、単離されたアシル-CoAシンターゼ（ACoAS）に関する。本発明の1つの局面において、単離されたACoASは、PUFA PKS系（PUFAシンターゼ）を内因的に発現する生物に由来する。そのような生物には、ヤブレッツボカビ科が非限定的に含まれる。1つの局面において、単離されたACoASは、シゾキトリウム属、ヤブレッツボカビ属またはウルケニア属に由来する。もう1つの局面において、単離されたACoASは、シゾキトリウム属ATCC 20888株、または油産生の改良のために突然変異誘発および選択によってシゾキトリウム属ATCC 20888株から導き出された菌株であるシゾキトリウム属N230D株に由来する。もう1つの局面においては、宿主細胞または生物におけるPUFAの産生および／または蓄積を増加させるために任意のPUFA PKS系とともに機能する任意のACoASを、本発明において用いることができる。本発明は、本明細書に記載したような具体的な例には限定されない。

#### 【0210】

もう1つの局面において、単離されたACoASは、SEQ ID NO：82、84、86、88、90、92、94、96または98のいずれか1つから選択されるヌクレオチド配列によってコードされる。もう1つの局面において、単離されたACoASは、SEQ ID NO：82、84、86、88、90、92、94、96または98のいずれか1つから選択されるヌクレオチド配列によってコードされるタンパク質をコードする縮重性の核酸配列によってコードされる。さらにもう1つの局面において、単離されたACoASは、SEQ ID NO：83、85、87、89、91、93、95、97もしくは99のいずれか1つから選択されるアミノ酸配列、または、そのような配列の任意の生物活性断片もしくはドメインを含む、そのようなアミノ酸配列のいずれかの相同体（以下に述べる）を含む。1つの好ましい態様において、単離されたACoASは、本明細書でSEQ ID NO：83、85、87、89、91、93、95、97もしくは99によって表されているアミノ酸配列、またはそのよう

なアミノ酸配列の相同体を含む。1つのより好ましい態様において、単離されたACoASは、本明細書でSEQ ID NO: 83、85、87、91もしくは97によって表されているアミノ酸配列、またはそのような配列の相同体を含むが、SEQ ID NO: 83、85または97が特に好ましい。任意の1つまたは複数のアシル-CoAシンテターゼの組み合わせも本発明に含まれる。

#### 【0211】

本発明は、異種宿主におけるPUFAの産生および/または蓄積を増加させるために、単独で、または本明細書に記載した任意の1つもしくは複数の戦略（例えば、以下の任意の1つ、2つ、3つまたは4つ：コドン最適化、オルガネラターゲットティング、マロニル-CoAをめぐるPUFAシンテターゼの競合の強化（例えば、FASの阻害による）、アシルCoAシンテターゼの発現、および/または1つもしくは複数のアシルトランスフェラーゼもしくは関連酵素の発現）と組み合わせて利用される、本明細書に記載したようなPUFAシンテターゼ、および外因性PPTアーゼ（単独で、または内因性PPTアーゼの阻害と組み合わせて）を伴っての、本明細書に記載および例示したような1つまたは複数のアシル-CoAシンテターゼの発現を含む。

#### 【0212】

##### アシルトランスフェラーゼ

上記の異種宿主におけるPUFAの産生および/または蓄積を増加させるためのもう1つの戦略と関連して、本発明のもう1つの態様は、PLまたはTAGの生成においてPUFA-CoAを基質として利用する、さらなるアシルトランスフェラーゼタンパク質（例えば、3-グリセロール-リン酸アシルトランスフェラーゼ（GPAT）、リゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼ（LPAAT）およびジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ（DAGAT））、またはPLもしくはTAGにおけるPUFAの富化をもたらす他のアシルトランスフェラーゼ（例えば、リン脂質:ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ（PDAT））を提供する。本発明は、特に生物におけるPUFAの産生および蓄積を強化するための、そのような単離されたタンパク質およびその相同体、そのようなタンパク質をコードする核酸分子、そのようなタンパク質を発現する遺伝的に改変された生物、ならびにそのようなタンパク質を用いるさまざまな方法を含む。

#### 【0213】

加えて、本発明者らはまた、PLまたはTAGの生成においてPUFA-CoAを基質として利用することができ、それ故に、PUFAシンテターゼによって生成されるPUFAの蓄積を強化するためにPUFAシンテターゼを発現する異種宿主生物において用いるさらなるアクセサリタンパク質となる酵素も本明細書において開示する。候補となる酵素には、3-グリセロール-リン酸アシルトランスフェラーゼ（GPAT）、リゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼ（LPAAT）およびジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ（DAGAT）が非限定的に含まれる。アシル-CoAを利用するこれらのタンパク質のそれぞれ、およびそれをコードする核酸は本発明に含まれる。例えば、DAGAT活性を有する酵素をコードすると考えられる、シゾキトリウム属の核酸配列が同定されている（例えば、ScDAGATを参照）。加えて、同じく以下に述べるように、LPAATまたはDAGAT活性を有する酵素をコードすると考えられるクリプテコディニウム-コーニイの配列も同定されている。これらのタンパク質、その生物活性相同体、および核酸分子、ならびに他のアシルトランスフェラーゼタンパク質、その相同体、および核酸分子は本発明に含まれ、具体的な例については以下で詳細に考察する。

#### 【0214】

本発明のもう1つの態様は、PLまたはTAGの生成においてPUFA-CoAを基質として利用する、単離されたタンパク質（例えば、3-グリセロール-リン酸アシルトランスフェラーゼ（GPAT）、リゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼ（LPAAT）およびジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ（DAGAT））に関する。好ましいタンパク質には、GPAT、LPAATおよびDAGATから選択されるアシルトランスフェラーゼのいずれかが含まれる。1つの局面において、単離されたタンパク質は、PUFA PKS系（PKSシンテターゼ）または少なくともPUFAの生成のための生合成経路を内因的に発現する生物に由来する。そのような生

物には、ヤブレッツボカビ科またはクリプテコディニウム-コーニイが非限定的に含まれる。1つの局面において、単離されたアシルトランスフェラーゼは、シゾキトリウム属、ヤブレッツボカビ属またはウルケニア属に由来する。もう1つの局面において、単離されたアシルトランスフェラーゼは、シゾキトリウム属ATCC 20888株またはシゾキトリウム属N230 D株に由来する。もう1つの局面において、アシルトランスフェラーゼはクリプテコディニウム-コーニイに由来する。もう1つの局面においては、宿主細胞または生物におけるPUFAの産生および/または蓄積を増加させるために任意のPUFA PKS系とともに機能する任意のアシルトランスフェラーゼを、本発明において用いることができる。本発明は、本明細書に記載したような具体的な例には限定されない。

#### 【0215】

もう1つの局面において、単離されたアシルトランスフェラーゼは、SEQ ID NO: 100、102、103、105、106、108、109、111、112または114~121のいずれか1つから選択されるヌクレオチド配列によってコードされる。もう1つの局面において、単離されたアシルトランスフェラーゼは、SEQ ID NO: 100、102、103、105、106、108、109、111、112または114~121のいずれか1つから選択されるヌクレオチド配列によってコードされるタンパク質をコードする縮重性の核酸配列によってコードされる。さらにもう1つの局面において、単離されたアシルトランスフェラーゼは、SEQ ID NO: 101、104、107、110もしくは113のいずれか1つから選択されるアミノ酸配列、または、そのような配列の任意の生物活性断片もしくはドメインを含む、そのようなアミノ酸配列のいずれかの相同体（以下に述べる）を含む。1つの好ましい態様において、単離されたアシルトランスフェラーゼは、本明細書でSEQ ID NO: 101、104、107、110もしくは113によって表されているアミノ酸配列、またはそのようなアミノ酸配列の相同体を含む。1つのより好ましい態様において、単離されたアシルトランスフェラーゼは、本明細書でSEQ ID NO: 101もしくは104によって表されているアミノ酸配列、またはそのような配列の相同体を含むが、SEQ ID NO: 101が特に好ましい。本明細書に記載したアシルトランスフェラーゼの組み合わせも、本発明における使用のために含まれる。

#### 【0216】

さらにもう1つの局面において、単離されたアシルトランスフェラーゼは、SEQ ID NO: のいずれか1つから選択されるアミノ酸配列、または、そのような配列の任意の生物活性断片もしくはドメインを含む、そのようなアミノ酸配列のいずれかの相同体（以下に述べる）を含む。

#### 【0217】

本発明は、異種宿主におけるPUFAの産生および/または蓄積を増加させるために、単独で、または本明細書に記載した任意の1つもしくは複数の戦略（例えば、以下の任意の1つ、2つ、3つまたは4つ：コドン最適化、オルガネラターゲティング、マロニル-CoAをめぐるPUFAシンターゼの競合の強化（例えば、FASの阻害による）、アシルCoAシンターゼの発現、および/または1つもしくは複数のアシルトランスフェラーゼもしくは関連酵素の発現）と組み合わせて利用される、本明細書に記載したようなPUFAシンターゼ、および外因性PPTアーゼ（単独で、または内因性PPTアーゼの阻害と組み合わせて）を伴っての、本明細書に記載および例示したような1つまたは複数のアシル-CoAシンターゼの発現を含む。

#### 【0218】

##### オルガネラ特異的な発現

上記のもう1つの戦略と関連して、本発明の1つの態様は、宿主の1つまたは複数のオルガネラに対する、PUFAシンターゼ酵素、PPTアーゼおよび/またはアクセサリタンパク質の任意の1つもしくは複数の発現のターゲティング、ならびに/または標的指向的な遺伝的改変に関する。例えば、1つの態様において、PUFAシンターゼ系およびPPTアーゼの発現は、植物のプラスチドに対してターゲティングされる。もう1つの態様において、PUFAシンターゼ系およびPPTアーゼの発現はサイトソルに対してターゲティングされる。もう1つの態様において、PUFAシンターゼ系およびPPTアーゼの発現は植物のプラスチドおよび

サイトゾルの両方に対してターゲティングされる。これらの態様のいずれかにおいて、他の標的をプラスチドまたはサイトゾルに向かわせることができる。1つの局面において、アシル-CoAシンターゼの発現はサイトゾルに対してターゲティングされ、もう1つの態様において、そのような発現はプラスチドに対してターゲティングされる。1つの態様において、1つのアシル-CoAシンターゼはサイトゾルに対してターゲティングされ、もう1つのアシル-CoAシンターゼはプラスチドに対してターゲティングされる。好ましくは、アシル-CoAシンターゼは、DHAおよび/またはDPA遊離脂肪酸をアシル-CoAに変換し、続いてそれがアシルトランスフェラーゼによって利用されるように、サイトゾル中で発現される。アシルトランスフェラーゼは一般に、小胞体に対して共翻訳的に (co-translationally) ターゲティングされる。1つまたは複数の宿主酵素を阻害するための遺伝的改変などによるFAS系の阻害を、PUFAシンターゼが発現されるのと同じオルガネラに向かわせることができる。

10

#### 【0219】

1つの例示的なプラスチドターゲティング配列はアブラナ (*Brassica napus*) のアシル-ACPチオエステラーゼに由来し、コードされるターゲティングペプチドのアミノ酸配列は、本明細書でSEQ ID NO: 81によって表されている。種々の他のプラスチドターゲティング配列が当技術分野で公知であり、異種宿主が植物または植物細胞であってプラスチドに対するターゲティングが望まれるような態様に用いることができる。

#### 【0220】

本発明は、異種宿主におけるPUFAの産生および/または蓄積を増加させるために、単独で、または本明細書に記載した任意の1つもしくは複数の戦略 (例えば、以下の任意の1つ、2つ、3つまたは4つ: コドン最適化、オルガネラターゲティング、マロニル-CoAをめぐるPUFAシンターゼの競合の強化 (例えば、FASの阻害による)、アシルCoAシンターゼの発現、および/または1つもしくは複数のアシルトランスフェラーゼもしくは関連酵素の発現) と組み合わせて利用される、本明細書に記載したようなPUFAシンターゼ、および外因性PPTアーゼ (単独で、または内因性PPTアーゼの阻害と組み合わせて) を伴っての、オルガネラターゲティング (例えば、植物におけるプラスチドまたは葉緑体に対する) の使用を含む。

20

#### 【0221】

プラスチドまたは葉緑体に対する遺伝子産物のターゲティングは、さまざまなタンパク質のアミノ末端に見いだされ、輸入時に切断されて成熟タンパク質を生じるシグナル配列によって制御される (例えば、葉緑体ターゲティングについては、例えば、Comai et al., J. Biol. Chem. 263: 15104-15109 (1988) を参照)。異種産物の葉緑体への輸入を生じさせるために、これらのシグナル配列を異種遺伝子産物と融合させることができる (van den Broeck et al. Nature 313: 358-363 (1985))。RUBISCOタンパク質、CABタンパク質、EPSPシンターゼ酵素、GS2タンパク質、および葉緑体に局在することが知られている他の多くのタンパク質をコードするcDNAから、適切なシグナル配列をコードするDNAを単離することができる。

30

#### 【0222】

本発明のさまざまな態様において、本発明に用いられるタンパク質の局在を細胞内区画、例えばプラスチドまたは葉緑体に向かわせることは特に有益であると思われる。タンパク質は、そのアミノ末端に葉緑体移行ペプチド (CTP) を含めることによって、葉緑体に向かわせることができる。同様に、タンパク質は、そのN末端にプラスチド移行性またはシグナル伝達性ペプチドを含めることによって、プラスチドに向かわせることができる。

40

#### 【0223】

前駆体を葉緑体輸入機構に向かわせる葉緑体ターゲティングペプチドをアミノ末端に含むより大きな前駆体タンパク質として合成された、葉緑体を標的とする天然のタンパク質が当技術分野で周知である。葉緑体ターゲティングペプチドは一般に、葉緑体オルガネラ内部に位置する特異的なエンドプロテアーゼによって切断され、それにより、標的とされた成熟型の、好ましくは活性のある酵素が前駆体から葉緑体環境内に放出される。植物細胞

50



胞の葉緑体またはプラスチドに対して遺伝子または遺伝子産物のターゲティングを向けさせるのに適したペプチドをコードする配列の例には、ペチュニアEPSPS CTP、アラビドプシスEPSPS CTP2およびイントロン、ならびに当業者に公知である他のものが含まれる。そのようなターゲティング配列は、所望の発現されたタンパク質をそれが最も効果的に機能する細胞構造に移行させる、または所望の発現されたタンパク質を所望の表現型機能のために必要な細胞プロセスが集中している細胞領域に移行させる。葉緑体ターゲティングペプチドの具体的な例は当技術分野で周知であり、これにはシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) のリブローズニリン酸カルボキシラーゼ小サブユニット $at5g10140$ 移行ペプチド、シロイヌナズナのEPSPS移行ペプチドおよびトウモロコシ (*Zea mays*) のリブローズニリン酸カルボキシラーゼ小サブユニット移行ペプチドが含まれる。

10

#### 【0224】

最適化された移行ペプチドは、例えば、Van den Broeck et al., "Targeting of a foreign protein to chloroplasts by fusion to the transit peptide from the small subunit of ribulose 1,5-biphosphate carboxylase", *Nature*, 313:358-363 (1985)によって記載されている。原核生物および真核生物シグナル配列は、例えば、Michaelis et al. (1982) *Ann. Rev. Microbiol.* 36, 425によって開示されている。本発明に用いる移行ペプチドのそのほかの例には、Von Heijne et al., *Plant Mol. Biol. Rep.* 9:104-126 (1991); Mazur et al., *Plant Physiol.* 85: 1110 (1987); Vorst et al., *Gene* 65: 59 (1988)に記載されたもののような葉緑体移行ペプチドが含まれる。Chen & Jagendorf (*J. Biol. Chem.* 268: 2363-2367 (1993)) は、異種導入遺伝子の輸入のための葉緑体移行ペプチドの使用を記載している。用いられたこのペプチドは、ニコチアナ-ブルムバギニフォリア (*Nicotiana glauca*) 由来の $rbcS$ 遺伝子からの移行ペプチドである (Poulsen et al. *Mol. Gen. Genet.* 205: 193-200 (1986))。本明細書において異種タンパク質を葉緑体に局在させるのに機能した1つのCTPは、アブラナのアシル-ACPチオエステラーゼに由来した。

20

#### 【0225】

遺伝子を葉緑体またはプラスチドに局在させるための代替的な手段には、葉緑体またはプラスチドの形質転換が含まれる。本出願で想定している分子を組み入れるために葉緑体DNAのみが改変された組換え植物を作製することができる。葉緑体において機能するプロモーターは当技術分野で公知である (Hanley-Bowden et al., *Trends in Biochemical Sciences* 12:67-70, 1987)。異種DNAが挿入された葉緑体を含む細胞を入手するための方法および組成物は、例えば、Daniellら (米国特許第5,693,507号; 1997) およびMaligaら (米国特許第5,451,513号; 1995) によって記載されている。

30

#### 【0226】

##### 戦略の組み合わせ

本発明によれば、1つまたは複数の標的PUFAの産生および蓄積のための異種宿主の作製において、宿主におけるPUFAの産生および/または蓄積を改良するための、本明細書に記載した戦略の任意の1つまたは複数 (任意の組み合わせ) を用いることができる。実際に、戦略のさまざまな組み合わせは相加的または相乗的と考えられ、1つまたは複数のそのような戦略の非存在下と比較して、PUFAの産生および/または蓄積の改良をもたらすことが予期される。実際に、実施例は、宿主生物 (異種宿主であるもの、およびPUFA PKS系を天然に発現する生物の両方) におけるPUFAの産生のための、戦略の種々の組み合わせを含む、複数の例示的な戦略を提供している。

40

#### 【0227】

本発明による、PUFAの産生のための、適した遺伝的に改変された宿主細胞または生物は、以下の基本属性を有する。宿主細胞または生物はPUFA PKS系を発現し、これは本明細書に記載したようなコアPUFA PKS酵素、およびコアPUFA PKS酵素とともに用いた場合にPUFAを生成させるのに有効なPPTアーゼを含む。PUFA PKS系および/またはPPTアーゼは、宿主細胞もしくは生物によって内因的に産生されてもよく、または宿主において異種タンパク質として発現させてもよい (例えば、組換え技術により)。コアPUFA PKS酵素および/ま

50

たはPPTアーゼをコードする核酸分子は、宿主細胞または生物におけるコドン用法またはより優れた発現のために最適化することができる。宿主細胞または生物をさらに、本明細書に記載されたもののいずれか、または当技術分野で公知である他のものを含む、1つ、2つ、3つまたはそれ以上のアシル-CoAシンテターゼを発現するように改変することもできる。宿主細胞または生物をさらに、本明細書に記載されたもののいずれか、または当技術分野で公知である他のものを含む、1つ、2つ、3つまたはそれ以上のアシルトランスフェラーゼを発現するように改変することもできる。宿主細胞または生物をさらに、基質であるマロニル-CoAをめぐって競合するPUFA PKS系の能力を強化するために、遺伝的に改変すること（または他の様式で選択もしくは作製すること）もできる。1つの局面において、これは、この特性を天然に、または天然の、選択された、もしくは定方向的な突然変異が原因で、または育種もしくは他の手法によって有する生物の選択によって達成される。もう1つの局面において、これは、FAS系のような、マロニル-CoAをめぐってPUFA PKSと競合する経路における1つまたは複数の酵素を選択的に阻害することによって達成される。これらの態様のいずれにおいても、PUFA PKSまたはアクセサリタンパク質のターゲティングまたは改変は、植物のプラスチドに対するということのように、オルガネラ特異的でありうる。

【0228】

コアPUFA PKS系およびPPTアーゼとともに用いるためのいくつかの好ましい組み合わせには、以下が非限定的に含まれる：（1）1つ、2つまたはそれ以上のアシル-CoAシンテターゼの発現；（2）FASの阻害（例えば、KASIIまたはKASIIIの阻害による）；（3）1つ、2つまたはそれ以上のアシル-CoAシンテターゼの発現とFASの阻害（例えば、KASIIまたはKASIIIの阻害による）との組み合わせ；（4）1つ、2つまたはそれ以上のアシルトランスフェラーゼの発現；（5）1つ、2つまたはそれ以上のアシル-CoAシンテターゼの発現；FASの阻害（例えば、KASIIまたはKASIIIの阻害による）；および1つ、2つまたはそれ以上のアシルトランスフェラーゼの発現の組み合わせ。

【0229】

植物において本明細書で例証している改変のいくつかの例示的な組み合わせ（実施例13参照）には、PUFA PKS（例えば、シゾキトリウム属由来）および異種PPTアーゼ（例えば、ネンジュモ属由来のHetI）の発現と以下とのものが含まれる：

- （a）アシル-CoAシンテターゼ（例示されているのはACS-1およびACS-2である）の発現；
- （b）FASの阻害（例示されているのは、KASII RNAi、KAS II アンチセンス、KASIII RNAi、およびKASIII アンチセンスによる阻害である）；
- （c）アシル-CoAシンテターゼの発現とFASの阻害との組み合わせ（例示されているのは、ACS-1の発現と、KASII RNAi、KAS II アンチセンス、KASIII RNAiおよびKASIII アンチセンスのそれぞれによるFASの阻害とのものである）；
- （d）アシルトランスフェラーゼ（例示されているのはLPAAT-1である）の発現；
- （e）アシルトランスフェラーゼの発現と、アシル-CoAシンテターゼの発現およびFASの阻害との組み合わせ（例示されているのは、DAGAT-1の発現とACS-1の発現とのものであり、それぞれの組み合わせはKASII RNAiまたはKASIII アンチセンスによるFASの阻害を伴う）；
- （f）アシルトランスフェラーゼの発現と、2つのアシル-CoAシンテターゼの発現およびFASの阻害との組み合わせ（例示されているのは、DAGAT-1の発現とACS-1の発現、ACS-8の発現とのものであり、それぞれの組み合わせはKASII RNAiまたはKASIII アンチセンスによるFASの阻害を伴う）；
- （g）2つのアシルトランスフェラーゼの発現と、アシル-CoAシンテターゼの発現およびFASの阻害との組み合わせ（例示されているのは、DAGAT-1およびLPAAT-1の発現とACS-1の発現とのものであり、それぞれの組み合わせはKASII RNAiまたはKASIII アンチセンスによるFASの阻害を伴う）；および
- （h）2つのアシルトランスフェラーゼの発現と、2つのアシル-CoAシンテターゼの発現およびFASの阻害との組み合わせ（例示されているのは、DAGAT-1およびLPAAT-1の発現と

10

20

30

40

50

、ACS-1およびACS-8の発現とのものであり、それぞれの組み合わせはKASII RNAiまたはKASIIIアンチセンスによるFASの阻害を伴う)。

【0230】

改変のこれらの組み合わせ、または本明細書に記載した任意の他の改変または改変の組み合わせを用いた任意の植物または植物細胞が、本発明に含まれる。さらに、本明細書に記載した任意の他の改変または改変の組み合わせを用いた任意の宿主細胞または生物も本発明に含まれ、標的PUFAを含む油を含む、そのような細胞または生物に由来する任意の産物も同様である。本発明のこれらの態様のすべては、本明細書に記載した、遺伝的に改変された生物ならびにそのような生物を作製および使用する方法の任意のものに関する議論に対して適用される。

10

【0231】

遺伝的に改変された細胞、生物、ならびにそれを作製および使用する方法

意味のある高収量の1つまたは複数の所望の多価不飽和脂肪酸または他の生物活性分子を産生させる目的で、微生物もしくは植物におけるPUFA PKS系の活性および特に最終生成物を変化させるため、またはPUFA PKS系を微生物もしくは植物に導入するために、生物、好ましくは微生物または植物を遺伝的に改変することができる。本発明は、そのような遺伝的改変の有効性を改良または強化するための、特にPUFA PKS系の最終生成物、好ましくはPUFAの産生および/または蓄積を改良または強化するための方法に関する。

【0232】

したがって、本発明の1つの態様は、遺伝的に改変された生物であって、PUFA PKS系を発現し、かつ、宿主によるPUFA (またはPUFA PKS系の他の生物活性生成物) の産生および/または蓄積の改良のために本明細書に記載したようなアクセサリータンパク質を発現するように遺伝的に改変されており、かつ/または、宿主の内部で基質をめぐって競合するPUFA PKSの能力を強化するために (例えば、FAS経路および本明細書に記載した他の競合性経路の阻害により)、自然選択および突然変異を含む任意の方法によって遺伝的に改変されている生物に関する。PUFA PKS系が宿主にとって異種性であるならば、生物は同じく、以上に詳述したPUFA PKSアクセサリータンパク質としてPPTアーゼを発現するようにも遺伝的に改変されることが好ましい。1つの態様において、生物は、本明細書に記載したACoAS、好ましくはPUFA PKS系の由来となった生物と同じ属、種もしくは特定の生物に由来する、またはPUFA PKS系によって生成された長鎖PUFA遊離脂肪酸 (FFA) のアシル-CoAへの変換を触媒しうるACoASを発現するように遺伝的に改変されている。もう1つの態様において、生物は、PLまたはTAGの生成においてPUFA-CoAを基質として利用するタンパク質を発現するように遺伝的に改変されている。さらにもう1つの態様において、生物は、上記のACoAS、およびPLまたはTAGにおいてPUFA-CoAを基質として利用するタンパク質の両方を発現するように遺伝的に改変されている。1つの態様において、PUFA PKS系が宿主にとって内因性であるならば、その生物を、宿主生物におけるPUFA (またはPUFA PKS系の別の生物活性生成物) の産生および/または蓄積を改良または強化する上記のような異種アクセサリータンパク質を発現するように遺伝的に改変すること、および/または、生物によって内因的に発現されるそのようなアクセサリータンパク質の発現および/または生物活性を増強、最適化または強化するために (例えば、宿主において内因性PUFA PKS系とともに働く内因性ACoASの発現または活性を改善するために) 生物を遺伝的に改変することができる。1つの態様において、生物は、宿主の内部で基質をめぐって競合するPUFA PKSの能力を強化するために (例えば、FAS経路および本明細書に記載した他の競合性経路の阻害により)、自然選択および突然変異、定方向的な突然変異、またはランダム突然変異およびスクリーニングなどを含む任意の方法によって遺伝的に改変されている。1つの態様において、生物におけるFAS経路は阻害される。1つの態様において、生物におけるKASIIおよび/またはKASIIIは阻害される。本発明のこれらの態様は以上に詳述されている。好ましい遺伝的に改変された生物には、遺伝的に改変された微生物および遺伝的に改変された植物が含まれる。

20

30

40

【0233】

50

生物はPUFA PKS系を内因的に発現してもよいが、本発明は、PUFA PKS系を発現するように遺伝的に改変された生物（異種宿主）におけるPUFAの産生および／または蓄積を強化するために特に有用である。生物によって発現されるPUFA PKS系には、任意のPUFA PKS系、例えば、特定の生物に完全に由来するPUFA PKS系（例えば、シゾキトリウム属PUFA PKS系）のほか、複数の異なるPUFA PKS系から、および／または種々の非PUFA PKS系（例えば、I型モジュラー、I型反復、II型またはIII型PKS系）からのタンパク質および／またはドメインをコードする核酸配列を「混合してマッチングさせること」によって（例えば、シゾキトリウム属PUFA PKSタンパク質および／またはドメインを、例えば、ヤブレッツボカビ属、ウルケニア属、シュワネラ属、モリテラ属および／またはフォトバクテリウム属など由来のPUFA PKSタンパク質および／またはドメインと混合することによって）作製されるPUFA PKS系が含まれるが、この場合は異なる生物由来のタンパク質および／またはドメインが組み合わされて完全な機能性PUFA PKS系を形成する。異なる生物由来のPUFA PKS遺伝子またはタンパク質を組み合わせることを含め、PUFA PKS系は、米国特許第6,140,486号；米国特許6,566,583号；Metz et al., Science 293:290-293 (2001)；米国特許出願公開第20020194641号；米国特許出願公開第20040235127号；米国特許出願公開第20050100995号；およびPCT公開第WO 2006/135866；前記）に詳細に記載されている。PUFA PKS遺伝子およびタンパク質は以下にも開示されている：PCT特許公報第WO 05/097982号；および米国特許出願公開第20050014231号。以上に特定した開示、ならびに本明細書に記載した遺伝子およびタンパク質は、参照により本明細書に組み入れられる。

#### 【0234】

したがって、本発明に含まれるのは、生物を遺伝的に改変するための方法であって：本明細書に具体的に記載した任意のPUFA PKS系を非限定的に含むPUFA PKS系の少なくとも1つの機能性ドメインもしくはタンパク質（またはその生物活性断片もしくは相同体）をコードする、生物における少なくとも1つの核酸配列を遺伝的に改変すること、および／またはそのようなドメインもしくはタンパク質をコードする核酸配列を含む少なくとも1つの組換え核酸分子を発現させることによる方法である。加えて、本方法は、ACoASおよび／またはPLもしくはTAGの生成においてPUFA-CoAを基質として利用するタンパク質、少なくとも1つの機能性ドメインもしくはタンパク質をコードする、生物における少なくとも1つの核酸配列を遺伝的に改変すること、および／またはそのようなタンパク質をコードする核酸配列を含む少なくとも1つの組換え核酸分子を発現させることによって、生物を遺伝的に改変することを含む。本方法はさらに、生物におけるKASIIまたはKASIIIの阻害を非限定的に含む、FAS系のような、基質をめぐってPUFA PKSと競合する経路を阻害するために生物を遺伝的に改変することを含みうる。1つの態様において、外因性に導入された核酸配列のいずれかを、宿主におけるコドン用法または発現改善のために最適化することができる。1つの態様において、導入された核酸配列のいずれかを、生物の1つまたは複数のオルガネラに対してターゲティングすることができる。そのような配列のさまざまな態様、生物を遺伝的に改変するための方法、具体的な改変、およびそれらの組み合わせは以上に詳述されており、本明細書に含まれる。典型的には、本方法は、特定の生物活性分子または分子を産生する特定の遺伝的に改変された生物を作製するために用いられる。好ましくは、遺伝的に改変された生物は遺伝的に改変された微生物または遺伝的に改変された植物である。

#### 【0235】

好ましくは、本発明の遺伝的に改変された生物は、EPA (C20:5, n-3)、DHA (C22:6, n-3)、DPA (C22:5, n-6またはn-3)、ARA (C20:4, n-6)、GLA (C18:3, n-6)、ALA (C18:3, n-3) および／またはSDA (C18:4, n-3) を非限定的に含む、1つまたは複数の多価不飽和脂肪酸、より好ましくは、EPA (C20:5, n-3)、DHA (C22:6, n-3)、DPA (C22:5, n-6またはn-3) もしくはDTA (C22:4, n-6) またはそれらの任意の組み合わせを非限定的に含む、1つまたは複数のより長鎖のPUFAを産生する。1つの特に好ましい態様において、本発明の遺伝的に改変された植物は、EPA (C20:5, n-3)、DHA (C22:6, n-3) および／もしくはDPA (C22:5, n-6またはn-3) またはそれらの任意の組み合わせを非限定的に含む

、1つまたは複数の多価不飽和脂肪酸を産生する。

【0236】

本発明によれば、遺伝的に改変された生物には、組換え技術を用いて、または古典的な突然変異誘発およびスクリーニング手法によって改変された生物が含まれる。本明細書で用いる場合、遺伝子発現の低下、遺伝子の機能の低下、遺伝子産物（すなわち、遺伝子によりコードされるタンパク質）の機能の低下をもたらす遺伝的改変は、遺伝子の不活性化（完全または部分的）、欠失、中断、遮断またはダウンレギュレーションと呼ぶことができる。例えば、そのような遺伝子によってコードされるタンパク質の機能の低下をもたらす遺伝子における遺伝的改変は、遺伝子の完全な欠失（すなわち、遺伝子が存在しない、そのためタンパク質が存在しない）、タンパク質の不完全な翻訳をもたらすもしくはタンパク質の翻訳をもたらさない（例えば、タンパク質が発現されない）遺伝子における突然変異、またはタンパク質の本来の機能を低下させるもしくは消失させる（例えば、低下した酵素活性もしくは作用を有する、または酵素活性もしくは作用を有しないタンパク質が発現される）遺伝子における突然変異の結果でありうる。遺伝子発現または機能の増加をもたらす遺伝的改変は、遺伝子の増幅、過剰産生、過剰発現、活性化、増強、付加またはアップレギュレーションと呼ぶことができる。

10

【0237】

本発明による生物の遺伝的改変は、好ましくは、PUFA PKS系が内因性で遺伝的に改変されているか、生物への組換え核酸分子の導入を伴う内因性であるか（内因性の系を改変する選択肢を有する、または有しない）、または組換え技術によって完全に供給されるかのいずれであるかにかかわらず、生物によって発現されるPUFA PKS系の活性に影響を及ぼす。PUFA PKS系またはそのような系を発現する生物のPUFA産生プロファイルを変化させることには、遺伝的改変の非存在下と比較して（すなわち、改変されていない野生型の生物または少なくともPUFA合成に関しては改変されていない生物 すなわち、生物はPUFA合成に関連しない他の改変を有しうる、と比較して）、宿主生物による任意の1つまたは複数のPUFAの産生に何らかの検出可能または測定可能な変化を生じさせることが含まれる。PUFA PKS系の活性に影響を及ぼすことには、遺伝的改変の非存在下と比較して、生物によって発現されるPUFA PKS系に何らかの検出可能なまたは測定可能な変化または改変を引き起こす任意の遺伝的改変が含まれる。PUFA PKS系における検出可能な変化または改変には、以下が非限定的に含まれうる：遺伝的改変が存在しない内因性PUFA PKS系と比較して、改変されたPUFA PKS系におけるドメインの任意の1つまたは複数の発現および/または生物活性の変化または改変（増加または減少の導入）；生物が測定可能/検出可能なPUFA PKS系活性を獲得する（すなわち、生物は遺伝的改変の前にはPUFA PKS系を含まなかった）ような、生物へのPUFA PKS系活性の導入。

20

30

【0238】

PUFA PKS系に対するアクセサリタンパク質を含む、PUFA PKS系における機能性ドメインまたはタンパク質の活性を高めることについての言及は、ドメインまたはタンパク質または系の機能性の増大をもたらすドメインまたはタンパク質を含む（またはドメインもしくはタンパク質が導入される）生物における任意の遺伝的改変のことを指し、これにはドメインまたはタンパク質または系のより高い活性（例えば、特異的活性またはインビボでの酵素活性）、ドメインまたはタンパク質または系の阻害または分解の低下、およびドメインまたはタンパク質または系の過剰発現が含まれうることに留意されたい。例えば、遺伝子コピー数を増加させることができ、天然のプロモーターのレベルよりも高い発現レベルを与えるプロモーターの使用によって発現レベルを上昇させることができ、または遺伝子を、その遺伝子によってコードされるドメインもしくはタンパク質の活性を高めるように遺伝子工学もしくは古典的突然変異誘発によって改変することができる。

40

【0239】

同様に、PUFA PKS系に対するアクセサリタンパク質を含む、PUFA PKS系における機能性ドメインまたはタンパク質の活性を低下させることについての言及は、ドメインまたはタンパク質の機能の低下をもたらすようなドメインまたはタンパク質を含む（またはドメ

50

インもしくはタンパク質が導入される)生物における任意の遺伝的改変のことを指し、これにはドメインまたはタンパク質の活性の低下、ドメインまたはタンパク質の阻害または分解の増大、およびドメインまたはタンパク質の発現の低下もしくは消失が含まれる。例えば、本発明のドメインまたはタンパク質の作用は、ドメインもしくはタンパク質の産生を遮断することもしくは低下させること、ドメインもしくはタンパク質をコードする遺伝子もしくはその一部分を「ノックアウトすること」、ドメインもしくはタンパク質の活性を低下させること、またはドメインもしくはタンパク質の活性を阻害することによって低下させることができる。ドメインまたはタンパク質の産生を遮断することまたは低下させることには、ドメインまたはタンパク質をコードする遺伝子を、増殖培地における誘導化合物の存在を必要とするプロモーターの制御下に配置することが含まれうる。その誘導物質が培地から涸渇する条件を確立することにより、ドメインまたはタンパク質をコードする遺伝子の発現(したがって、タンパク質合成)を停止させることができる。本発明者らは、実施例の項で、ヤブレッツボカビ科微生物において標的遺伝子を欠失(ノックアウト)させうることを実証している。ドメインまたはタンパク質の活性を遮断することまたは低下させることには、また、参照により本明細書に組み入れられる米国特許第4,743,546号に記載された方法に類似した切り出し技術アプローチを用いることが含まれうると考えられる。このアプローチを用いるためには、関心対象のタンパク質をコードする遺伝子を、ゲノムからの遺伝子の特異的かつ制御された切り出しを可能にする特定の遺伝子配列の間にクローニングする。切り出しは、米国特許第4,743,546号におけるような培養物の培養温度の推移によって、または他の何らかの物質的もしくは栄養的シグナルによって促すことができる。

10

20

#### 【0240】

##### 遺伝的に改変された微生物

本明細書で用いる場合、遺伝的に改変された微生物には、遺伝的に改変された細菌、原生生物、微小藻類、真菌類またはその他の微生物が含まれうる。そのような遺伝的に改変された微生物は、所望の結果(すなわち、PUFA PKS活性および/またはPUFA PKS系を用いた所望の生成物の産生の増大または改変)が達成されるように、その正常な(すなわち、野生型または天然の)形態から改変された(すなわち、突然変異または変化した)ゲノムを有する。微生物の遺伝的改変は、古典的な系統開発および/または分子遺伝学の手法を用いて達成されうる。そのような技術は当技術分野で公知であり、微生物については、例えば、Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Labs Pressにおいて一般に開示されている。この文献(Sambrookら、同上)は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。遺伝的に改変された微生物には、そのような改変が微生物の内部に望ましい効果を与えるような様式で核酸分子が挿入、欠失または改変された(すなわち、例えば、ヌクレオチドの挿入、欠失、置換および/または反転により突然変異した)微生物が含まれうる。

30

#### 【0241】

遺伝的改変に適した宿主微生物の例には、サッカロミセス-セレビスエ(*Saccharomyces cerevisiae*)、サッカロミセス-カールスベルゲンシス(*Saccharomyces carlsbergensis*)を含む酵母、またはカンジダ(*Candida*)、クルイペロマイセス(*Kluyveromyces*)などの他の酵母、または他の真菌、例えばアスペルギルス(*Aspergillus*)、ノイロスポラ(*Neurospora*)、ペニシリウム(*Penicillium*)などの繊維状真菌が非限定的に含まれる。細菌細胞を宿主として用いることもできる。これらには、発酵工程において有用となりうる大腸菌(*Escherichia coli*)が非限定的に含まれる。または、単に一例であるが、ラクトバシラス属(*Lactobacillus*)の種またはバシラス属(*Bacillus*)の種などの宿主を宿主として用いることもできる。

40

#### 【0242】

本発明で用いるための他の宿主には、以下を非限定的に含む属からの微生物が含まれる: ヤブレッツボカビ科に属するヤブレッツボカビ属、ジャポノキトリウム属(*Japonochytrium*)、アブラノキトリウム属(*Aplanochytrium*)、エリナ属(*Elina*)およびシゾキトリウ

50

ム属、ラビリンチュラ科に属するラビリンチュラ属、ラビリンチュロイデス属 (*Labyrinthuloides*) およびラビリントミキサ属 (*Labyrinthomyxa*)。これらの属に含まれる好ましい種には、以下に述べる任意の種が非限定的に含まれる。ヤブレッツボカビ目の特に好ましい菌株には、以下が非限定的に含まれる：シゾキトリウム属 (S31) (ATCC 20888)；シゾキトリウム属 (S8) (ATCC 20889)；シゾキトリウム属 (LC-RM) (ATCC 18915)；シゾキトリウム属 (SR21)；シゾキトリウム属 N230D、シゾキトリウム-アグレガツム (*Schizochytrium aggregatum*) (Goldstein et Belsky) (ATCC 28209)；シゾキトリウム-リマシヌム (*Schizochytrium limacinum*) (Honda et Yokochi) (IFO 32693)；ヤブレッツボカビ属 (23B) (ATCC 20891)；トラウストキトリウム-ストリアツム (*Thraustochytrium striatum*) (Schneider) (ATCC 24473)；スラウストキトリウム-アウレウム (*Thraustochytrium aureum*) (Goldstein) (ATCC 34304)；トラウストキトリウム-ロゼウム (*Thraustochytrium roseum*) (Goldstein) (ATCC 28210)；およびジャボノキトリウム属 (L1) (ATCC 28207)。

#### 【 0 2 4 3 】

本発明によれば、「ヤブレッツボカビ科生物 (*thraustochytrid*)」という用語は、ヤブレッツボカビ科 (*Thraustochytriaceae*) を含む、ヤブレッツボカビ目の任意のメンバーのことを指し、「ラビリンチュラ科生物 (*Labyrinthulid*)」という用語は、ラビリンチュラ科 (*Labyrinthulaceae*) を含む、ラビリンチュラ目の任意のメンバーのことを指す。ラビリンチュラ科のメンバーは一時、ヤブレッツボカビ目のメンバーであると考えられていたが、そのような生物の分類法のさらに最近の改訂により、この科は現在ではラビリンチュラ目のメンバーであると考えられており、ラビリンチュラ目およびヤブレッツボカビ目は両方ともラビリンチュラ菌門 (*Labyrinthulomycota*) のメンバーと考えられている。進展の結果、ヤブレッツボカビ科生物およびラビリンチュラ科生物の分類は頻繁に改訂されている。しかし、分類学の理論家は現在一般に、これらの微生物の両方の群を、ストラメノパイル (*stramenopile*) の系譜に属する藻類または藻類様原生生物に位置づけている。ヤブレッツボカビ科生物およびラビリンチュラ科生物の現在の分類法上の位置づけは以下のようにまとめることができる。

界：ストラメノパイル (クロミスタ)

門：ラビリンチュラ菌門

網：ラビリンチュラ網 (*Labyrinthulomycetes*)

目：ラビリンチュラ目

科：ラビリンチュラ科

目：ヤブレッツボカビ目

科：ヤブレッツボカビ科

#### 【 0 2 4 4 】

しかしながら、分類法上の不確定性は残るため、本発明においてヤブレッツボカビ科生物として記載した菌株には以下の生物が含まれると考えることが、本発明の目的には最善であると考えられる：目：ヤブレッツボカビ目；科：ヤブレッツボカビ科；属：ヤブレッツボカビ属 (種：アルヂメンタレ (*arudimentale*)、アウレウム、ベンチコラ (*benthicola*)、グロボサム (*globosum*)、キネイ (*kinnei*)、モチバム (*motivum*)、マルチルジメンテール (*multirudimentale*)、パキデルマム (*pachydermum*)、プロリフェルム (*proliferum*)、ローゼウム (*roseum*)、ストリアツム (*striatum*)、ウルケニア属 (種：アメーボイデア (*amoeboidea*)、ケルゲレンシス (*kerguelensis*)、ミヌタ (*minuta*)、プロファンダ (*profunda*)、ラジアタ (*radiata*)、サイレンス (*sailens*)、サルカリアナ (*sarkariana*)、シゾキトロプス (*schizochytrops*)、ビスルゲンシス (*visurgensis*)、ヨーケンシス (*yorkensis*)、シゾキトリウム属 (種：アグレガツム (*aggregatum*)、リムナセウム (*limnaceum*)、マングロベイ (*mangrovei*)、ミヌツム (*minutum*)、オクトスポルム (*octosporum*)、ジャボノキトリウム属 (種：マリナム (*marinum*)、アブラノキトリウム属 (種：ハリオチディス (*haliotidis*)、ケルグエレンシス (*kerguelensis*)、プロファンダ (*profunda*)、ストックノイ (*stocchinoi*)、アルトルニア属 (種：

クロウキイ (*crouchii*) またはエリナ属 (種: マリサルバ (*marisalba*)、シノリフィカ (*sinorifica*))。ウルケニア属に関する原記載は論文審査を要するジャーナル誌には掲載されていないため、この属およびそれに属すると位置づけられた種の正当性については若干疑問が残っていることに留意されたい。本発明の目的において、ウルケニア属に属するとして記載された種は、ヤブレッツボカビ属のメンバーであるとみなすことが考えられる。

#### 【0245】

本発明においてラビリンチュラ科生物として記載した菌株には、以下の生物が含まれる: 目: ラビリンチュラ目、科: ラビリンチュラ科、属: ラビリンチュラ属 (種: アルジェリエンシス (*algeriensis*)、コエノシスチス (*coenocystis*)、シャトニイ (*chattonii*)、マクロシスチス (*macrocystis*)、マクロシスチス-アトランティカ (*macrocystis atlantica*)、マクロシスチス-マクロシスチス (*macrocystis macrocystis*)、マリナ (*marina*)、ミヌタ (*minuta*)、ロスコフェンシス (*roscoffensis*)、バルカノビイ (*valkanovii*)、ピテリナ (*vitellina*)、ピテリナ-パシフィカ (*vitellina pacifica*)、ピテリナ-ピテリナ (*vitellina vitellina*)、ゾプフィイ (*zopfii*)、ラビリンチュロイデス属 (種: ハロチディス (*haliotidis*)、ヨルケンシス (*yorkensis*))、ラビリントミキサ属 (種: マリナ (*marina*))、ディプロフリス属 (*Diplophrys*) (種: アーケリ (*archeri*))、ピロソラス属 (*Pyrrosorus*) (種: マリヌス (*marinus*))、ソロジプロフリス属 (*Sorodiplophrys*) (種: ステルコレア (*stercorea*)) またはクラミドミクサ属 (*Chlamydomyxa*) (種: ラビリンチュロイデス (*labyrinthuloides*)、モンタナ (*montana*)) (しかし、ピロソラス属、ソロジプロフリス属またはクラミドミクサ属の正確な分類法上の位置づけについては現時点で合意は得られていない)。

#### 【0246】

本発明の1つの態様において、微生物の内因性PUFA PKS系および/または内因性PUFA PKSアクセサリータンパク質 (例えば、ACoAS) は、例えば、遺伝子工学の手法を含む、古典的な突然変異誘発および選択手法および/または分子遺伝学の手法によって遺伝的に改変される。遺伝子工学の手法には、例えば、内因性遺伝子の一部分を欠失させるため、または内因性遺伝子の一部分を異種配列で置き換えるためのターゲティング組換えベクターの使用が含まれる。宿主ゲノムに導入しうる異種配列の例には、別のPKS系由来の少なくとも1つの機能性PUFA PKSドメインもしくはタンパク質、または場合によってはPUFA PKS系全体 (例えば、PUFA PKS系と関連する全ての遺伝子) をコードする配列が含まれる。異種配列にはまた、PUFA PKS系由来の天然ドメインの改変された機能性ドメイン (相同体) をコードする配列も含まれる。宿主ゲノムに導入しうるその他の異種配列には、本明細書に記載したアクセサリータンパク質のように、内因性PUFA PKS系の活性に影響を及ぼすタンパク質をコードする核酸配列が含まれる。例えば、ACoAS、特にPUFA PKS系とともに働く内因性ACoASと比較して宿主におけるPUFAの産生および/または蓄積を強化するACoASをコードする核酸分子を、宿主ゲノムに導入することができる。

#### 【0247】

##### 遺伝的に改変された植物

本発明のもう1つの態様は、遺伝的に改変された植物であって、本明細書に記載したようなPPTアーゼを含むPUFA PKS系を組換え的に発現するように遺伝的に改変されており、かつ、宿主によるPUFA (またはPUFA PKS系の他の生物活性生成物) の産生および/または蓄積の改良のために本明細書に記載したようなアクセサリータンパク質を発現するように、ならびに/または、PUFA PKS系と競合する経路を阻害するために (例えば、FAS系の阻害)、さらに遺伝的に改変されている植物に関する。好ましくは、そのようなアクセサリータンパク質は、ACoASおよび/またはPLもしくはTAGの生成においてPUFA-CoAを基質として利用するタンパク質 (例えば、GPAT、LFAATまたはDAGAT) である。

#### 【0248】

本明細書で用いる場合、遺伝的に改変された植物には、高等植物、特に任意の消費可能な植物または本発明の所望の生物活性分子 (例えば、PUFA) を産生させるのに有用な植物



を含む、任意の遺伝的に改変された植物が含まれる。「植物の部分」とは、本明細書で用いる場合、種子（成熟種子および未熟種子を含む）、花粉、胚、花、果実、苗条、葉、根、茎、外植片などを非限定的に含む、植物の任意の部分を含む。遺伝的に改変された植物は、所望の結果（すなわち、PUFA PKS活性ならびに／またはPUFA PKS系を用いた所望の生成物の産生および／もしくは蓄積の増大または改変）が達成されるように、その正常な（すなわち、野生型または天然の）形態から改変された（すなわち、突然変異または変化した）ゲノムを有する。植物の遺伝的改変は、微生物の遺伝的改変は、古典的な系統開発および／または分子遺伝学の手法を用いて達成される。所望のアミノ酸配列をコードする組換え核酸分子がその植物のゲノムに組み入れられているトランスジェニック植物を作製するための方法は、当技術分野で公知である。本発明に従って遺伝的に改変するのに好ましい植物は、ヒトを含む動物による消費に適した植物であることが好ましい。

10

#### 【0249】

本発明に従って遺伝的に改変するのに好ましい植物（すなわち、植物宿主細胞）には、双子葉植物および单子葉植物の両方を含む任意の高等植物、特に作物植物、とりわけその油のために用いられる植物を含む、消費可能な植物が非限定的に含まれる。そのような植物には、例えば、以下のものが非限定的に含まれる：キャノーラ、ダイズ、ナタネ、アマニ、トウモロコシ、ベニバナ、ヒマワリおよびタバコ。すなわち、任意の植物種または植物細胞を選択することができる。本明細書で用いられる特定の細胞、およびそれらから成育される、または導き出される植物には、以下から得られる細胞が非限定的に含まれる：キャノーラ（*Brassica rapa* L.）；ダイズ（*Glycine max*）；ナタネ（*Brassica* spp.）；アマニ／アマ（*Linum usitatissimum*）；モロコシ（トウモロコシ）（*Zea mays*）；ベニバナ（*Carthamus tinctorius*）；ヒマワリ（*Helianthus annuus*）；タバコ（*Nicotiana tabacum*）；シロイヌナズナ、ブラジルナッツ（*Betholettia excelsa*）；トウゴマ（*Ricinus communis*）；ココナッツ（*Cocos nucifera*）；コリアンダー（*Coriandrum sativum*）；ワタ（*Gossypium* spp.）；ラッカセイ（*Arachis hypogaea*）；ホホバ（*Simmondsia chinensis*）；カラシ（*Brassica* spp.および*Sinapis alba*）；アブラヤシ（*Elaeis guineensis*）；オリーブ（*Olea europaea*）；イネ（*Oryza sativa*）；カボチャ（*Cucurbita maxima*）；オオムギ（*Hordeum vulgare*）；コムギ（*Triticum aestivum*）；およびウキクサ（*Lemnaceae* sp.）。本明細書に鑑み、植物種の内部での遺伝的バックグラウンドはさまざまでありうることに留意すべきである。

20

30

#### 【0250】

特に望ましい形質、例えば病害抵抗性、植物形質転換の容易さ、油の含量またはプロファイルなどに関して最適化された、これらの植物からの植物系統を、本明細書に従って作製、選択または同定することができる。好ましい植物系統は、植物育種を通じて、またはマーカーを利用した育種およびティリング法などを通じて選択することができる。本明細書で述べたアクセサリタンパク質、経路の標的指向的な阻害、および／またはPUFA PKS系（PUFAシンターゼ）のいずれかに関して変化した活性を呈する植物系統が、特に有用である。

#### 【0251】

1つのさらなる態様において、植物細胞培養物を本明細書に従って用いることもできる。そのような態様においては、植物細胞を分化した植物に成育させて、通常の農業の慣行を用いて栽培することはせず、その代わりに液体培地中で成育させて維持する。

40

#### 【0252】

他の好ましい植物には、医薬生成物、香味剤、ニュートラシューティカル薬、機能的食品成分もしくは美容的活性物質として用いられる化合物を産生することが知られているような植物、またはこれらの化合物／作用物質を産生するように遺伝的に操作された植物が含まれる。

#### 【0253】

以上に考察したように、本発明のPUFA PKSシンターゼは、FAS系の脂肪酸生成物を利用しない。その代わりに、それは最終的なPUFA生成物（主PUFA生成物）を、FASおよびエロ

50

ンガーゼ（マロニル-CoA）によって利用されるのと同じ低分子量の前駆体分子から生成する。したがって、合成サイクルにおける中間体は有意な量では放出されず、PUFA生成物（本明細書では主PUFA生成物とも称される）は脂質のリン脂質（PL）およびトリアシルグリセロール（TAG）画分に効率的に移行する。実際に、PUFA PKS系は2つの標的または主PUFA生成物を生成するが（例えば、シゾキトリウム属由来のPUFA PKS系はDHAおよびDPA n-6の両方を主生成物として生成する）、DPAはDHAを生成するための経路における中間体ではない。そうではなくて、それぞれが同じPUFA PKS系における別個の生成物である。このため、PUFA PKS遺伝子は、植物などの異種宿主においてPUFA、特に長鎖PUFA（LCPUFA）を含む油を産生させる優れた手段であり、この場合に油は「標準的」なPUFA経路（以下に定義する）によって生成される油に混入する副生成物も中間体も実質的に含まない（同じく以下に定義する）。

10

#### 【0254】

したがって、本明細書に記載したような植物の遺伝子操作を介して、所望の鎖長および所望の数の二重結合を有する多価不飽和脂肪酸を、ひいては、そのような植物から得られる、これらのPUFAを含む油糧種子および油（すなわち、そのような植物の油糧種子から得られる）を生産することは、本発明の1つの目的である。本発明によって生産しうるPUFAの例には、DHA（ドコサヘキサエン酸（C22:6、n-3））、ARA（エイコサテトラエン酸またはアラキドン酸（C20:4、n-6））、DPA（ドコサペンタエン酸（C22:5、n-6またはn-3））およびEPA（エイコサペンタエン酸（C20:5、n-3））およびそれらの任意の組み合わせが非限定的に含まれる。本発明は、PUFAを生成するポリケチドシンターゼ様の系の使用を通じての、本発明者らによる遺伝的に改変された植物の開発により、1つまたは複数の所望の（標的または主）PUFAに富む商業的に価値のある脂質の生産を可能にする。

20

#### 【0255】

本発明によれば、「主PUFA」、「標的PUFA」、「意図したPUFA」または「所望のPUFA」に対する言及は、PUFAを生産するために用いられる酵素経路の意図した、または標的とする生成物である特定の1つまたは複数のPUFAのことを指す。例えば、FAS系の生成物を改変するためにエロンガーゼおよびデサチュラーゼを用いる場合には、一緒に用いた場合に標的または所望のPUFA（例えば、DHAまたはEPA）を生成する、エロンガーゼおよびデサチュラーゼの特定の組み合わせを選択することができる。以上に考察したように、標準的経路によって生成されるそのような標的または所望のPUFAは、その系によって生成される生成物の大半を実際には占める中間体および副生成物の形成のため、系によって生成される総脂肪酸に占めるパーセンテージとしてのPUFAの量という点では、実際には「主」PUFAではない。しかし、系において用いられるエロンガーゼまたはデサチュラーゼによって生成される標的または意図したPUFA生成物に言及する場合であっても、「主PUFA」という用語を用いてもよい。

30

#### 【0256】

本発明において好ましいようにPUFA PKS系を用いる場合、特定の生物に由来する所定のPUFA PKS系は、特定の生物由来のPUFA PKS系の選択が指定の標的または主PUFAの生成をもたらすと考えられるように、特定のPUFAを生成すると考えられる。例えば、シゾキトリウム属由来のPUFA PKS系の使用は、標的または主PUFAとしてのDHAおよびDPA n-6の生成をもたらすと考えられる。一方、さまざまなシュワネラ属の種由来のPUFA PKS系の使用は、標的または主PUFAとしてのEPAの生成をもたらすと考えられる。主または標的PUFAの比は、特定のPUFA PKS系の選択、およびそれが発現される具体的な条件に対してその系がどのように応答するかに応じて異なりうることを指摘しておく。例えば、ヤブレッツボカビ属23B（ATCC番号20892）由来のPUFA PKS系も、標的または主PUFAとしてのDHAおよびDPA n-6の生成をもたらすと考えられる；しかし、ヤブレッツボカビ属23Bの場合には、DHAとDPA n-6との比は約10：1であり（約8：1～約40：1の範囲にわたりうる）、一方、シゾキトリウム属ではこの比は典型的には約2.5：1である。したがって、ヤブレッツボカビ属のPUFA PKS系またはタンパク質もしくはドメインの使用は、標的PUFAがたとえ同じであっても、シゾキトリウム属と比較して、生物によって産生されるPUFAの比を変化させることができる。加えて

40

50

、以下で考察するように、異なるPUFA PKS系またはPUFA PKSおよびPKS系からのタンパク質およびドメインを混合することによって所定のPUFA PKS系を改変することもでき、または標的PUFA生成物および／もしくは比を変化させるために所定のPUFA PKS系のドメインまたはタンパク質を改変することもできる。

#### 【0257】

本発明によれば、PUFAを生成する酵素系の「中間体生成物」または「副生成物」に対する言及は、系の標的または主PUFAの生成の結果として酵素系によって生成されるが、主または標的PUFAではない任意の生成物、特に脂肪酸生成物のことを指す。1つの態様において、中間体および副生成物には、野生型植物によって、または指定された遺伝的改変のためのレシピエントとして用いられる親植物によって天然に産生されるが、野生型植物によって、または指定された遺伝的改変のためのレシピエントとして用いられる親植物によって産生されるレベルと比較して、遺伝的改変の結果としてより上回るレベルで産生されることからここでは中間体または副生成物として分類される、標的でない脂肪酸が含まれる。以上に考察したように、中間体および副生成物はPUFA合成のための標準的経路において特に意味が大きく、PUFA PKS経路においては実質的に意味が小さい。1つの酵素系の主または標的PUFAは、主または標的生成物が異なるPUFAである異なる酵素系の中間体でありうることを指摘しておくが、PUFA PKS系は中間体の生成を実質的に回避するため、これは特にPUFA生成の標準的経路の生成物について言えることである。例えば、EPAを生成するための標準的経路を用いる場合には、GLA、DGLAおよびSDAなどの脂肪酸が中間体生成物として有意な量で生成される（例えば、米国特許出願公開2004/0172682号はこの点を例証している）。同様に、米国特許出願公開2004/0172682号によっても例証されているように、DHAを生成するための標準的経路を用いる場合には、上述した脂肪酸鎖に加えて、ETAおよびEPA（上記の第1の例における標的PUFAであることに注目）が有意な量で生成され、実際に、総脂肪酸生成物に占める比率として標的PUFAそれ自体よりも有意に多い量で存在しうる。この後者の点は米国特許出願公開2004/0172682号でも示されており、そこでは、標準的経路によってDHAを産生するように操作された植物が、総脂肪酸に占めるパーセンテージとして、標的としたDHAよりも多くのEPAを産生した。

#### 【0258】

意味のある高収量の1つまたは複数の所望の多価不飽和脂肪酸を産生させるために、植物を、植物にPUFA PKS系が導入されるように遺伝的に改変することができる。植物はPUFA PKS系を内因的に含まないことが知られており、このため、本発明のPUFA PKS系は、類いまれな脂肪酸産生能力を有する植物を作製するための機会となる。同じ植物において、EPA、DHA、DPA（n3またはn6）、ARA、GLA、SDAおよびそれらの任意の組み合わせを含む他のものを含む、1つまたは複数のPUFAを産生するように植物を遺伝的に操作することは、本発明の1つの特に好ましい態様である。本発明は、さまざまな比および形態にある、種々の「人工的に設計された油（designer oil）」の任意のものを作り出す能力を提供する。さらに、本明細書に記載した特定の海洋生物由来のPUFA PKS遺伝子は、PUFA産生の範囲をより容易に拡張し、大半の作物植物を成育させるために用いられる温度範囲内でそのようなPUFAを首尾よく産生させるための機会も提供する。

#### 【0259】

したがって、本発明の1つの態様は、本明細書に記載したようなコアPUFA PKS酵素複合体およびPPTアーゼを含む、遺伝的に改変された植物または植物の部分（例えば、ここで植物は本明細書に記載のPUFA PKS系を発現するように遺伝的に改変されている）に関し、ここで植物は、宿主によるPUFA（またはPUFA PKS系の他の生物活性生成物）の産生および／または蓄積の改良のために本明細書に記載したようなアクセサリタンパク質を発現するようにさらに遺伝的に改変されている、かつ／または、植物は、本明細書に記載したようにPUFA PKS系と競合する経路を阻害するために（例えば、FAS系の阻害）、遺伝的に改変されている。好ましくは、そのようなアクセサリタンパク質は、植物がPUFAを産生するようにする、ACoASおよび／またはPLもしくはTAGの生成においてPUFA-CoAを基質として利用するタンパク質（例えば、GPAT、LFAATまたはDAGAT）である。

## 【0260】

好ましくは、そのようなさらなる遺伝的改変は、マロニル-CoAプールをめぐる競合を減少させることによってPUFAシントラーゼ経路を通じての流れを増大させる、任意の改変（天然の、選択された、または合成された）である。この基質をめぐる競合する能力を強化するために考えられるやり方は数多く存在する。これらには、1) 競合性経路の阻害、これには例えば、そのような経路に關与する酵素またはサブユニットの発現レベルを低下させることによる（例えば、アンチセンスRNA、RNAi、共抑制または突然変異の使用による）、FAS経路内の任意の要素の阻害が含まれる、2) 競合性経路が減弱化またはブロックされている異種宿主（例えば、細胞質中の脂肪酸を伸長させる能力がブロックされているキャノーラ）におけるPUFAシントラーゼの発現、および/または3) マロニル-CoAのプールを増加させること（例えば、アセチル-CoAカルボキシラーゼの発現による）が非限定的に含まれる。1つの態様において、KASIIおよび/またはKASIIIは植物において阻害される（例えば、RNAiにより、またはアンチセンスにより）。

10

## 【0261】

以上に考察したように、本発明において有用な、遺伝的に改変された植物は、PUFA PKS系を発現するように遺伝的に改変されている。PUFA PKS系には、例えば、米国特許6,566,583号；米国特許出願公開第20020194641号；米国特許出願公開第20040235127号；米国特許出願公開第20050100995号；およびPCT公開第WO 2006/135866号に記載されたいずれかのPUFA PKS系のような、任意のPUFA PKS系が含まれる。PUFA PKS系は、シゾキトリウム属 American Type Culture Collection (ATCC) 番号20888およびそれから派生した変異株（例えば、N230D株）；ヤブレッツボカビ属23B ATCC番号20892およびそれから派生した変異株；シュワネラ-オレヤナ Australian Collection of Antarctic Microorganism (ACAM) 株番号644およびそれから派生した変異株；またはシュワネラ-ジャポニカ ATCC株番号BAA-316およびそれから派生した変異株由来のPUFA PKS系などの、これらの特許および特許公報において同定されて特徴づけられている具体的なPUFA PKS系から選択しうるが、それらには限定されない。

20

## 【0262】

1つの態様において、PUFA PKS系は、以上のPUFA PKS系の任意のものから選択されたドメインであって、以上に考察したような最低限の要件を満たす完全なPUFA PKS系を形成するように組み合わせられた（混合してマッキングさせた）ドメインを含む。また、植物を、PUFA PKS系におけるドメインの代わりになりうる、I型PKS系（反復またはモジュラー）、II型PKS系および/またはIII型PKS系を非限定的に含む、別のPKS系の少なくとも1つのドメインまたはその生物活性断片によって、さらに改変することもできる。さらに、PUFA PKS系のドメインのいずれかを、PUFA PKS系におけるそのドメインの機能を改変または強化するために（例えば、系によって生成されるPUFAのタイプまたはその比を改変するために）、天然の構造から改変することもできる。キメラ性PUFA PKSタンパク質を作製するための、ドメインのそのような混合は、以上に参照した特許および特許公報に記載されている。

30

## 【0263】

好ましくは、以上に特定した特徴のいずれかを有する植物は、本明細書に詳述したようなPUFA PKS系（PUFAシントラーゼ）を発現するように遺伝的に改変された植物である（すなわち、PUFA PKS系は、植物において標的PUFAを生成する酵素系である）。1つの態様において、植物は、シゾキトリウム属、ヤブレッツボカビ属、ウルケニア属、ジャポノキトリウム属、アブラノキトリウム属、アルトルニア属 (Althornia) またはエリナ属を非限定的に含むヤブレッツボカビ科生物由来のPUFA PKSタンパク質/ドメインで構成されるPUFA PKS系を発現するように遺伝的に改変されている。1つの態様において、植物は、ラビリンチュラ科生物由来のPUFA PKSタンパク質/ドメインから構成されるPUFA PKS系を発現するように遺伝的に改変されている。もう1つの態様において、植物は、シュワネラ-ジャポニカまたはシュワネラ-オレヤナを非限定的に含む海洋細菌由来のPUFA PKSタンパク質/ドメインから構成されるPUFA PKS系を発現するように遺伝的に改変されている。1つの態様に

40

50

において、植物は、上記のようなシゾキトリウム属のOrfsA、BおよびC（その相同体または合成バージョンを含む）ならびにPPTアーゼ（例えば、HetI）（例えば、SEQ ID NO：1～32およびSEQ ID NO：33ならびに上記のシゾキトリウム属PUFA PKS系の考察を参照）から構成されるPUFA PKS系を発現するように遺伝的に改変されている。もう1つの態様において、植物は、上記のようなヤブレッツボカビ属のOrfsA、BおよびC（その相同体または合成バージョンを含む）ならびにPPTアーゼ（例えば、HetI）（例えば、SEQ ID NO：38～68およびSEQ ID NO：33、ならびに上記のヤブレッツボカビ属PUFA PKS系の考察を参照；同じく米国特許出願公開第20050014231号も参照されたい）から構成されるPUFA PKS系を発現するように遺伝的に改変されている。もう1つの態様において、植物は、上記のような他のヤブレッツボカビ科のOrfsA、BおよびC（その相同体または合成バージョンを含む）ならびにPPTアーゼ（例えば、HetI）（例えば、PCT特許公報第WO 05/097982号を参照）から構成されるPUFA PKS系を発現するように遺伝的に改変されている。もう1つの態様において、植物は、上記のようなシュワネラ属などの海洋細菌由来のPUFA PKS Orfs（その相同体または合成バージョンを含む）ならびにPPTアーゼ（例えば、内因性シュワネラPPTアーゼ）（例えば、シュワネラ-ジャポニカについてはSEQ ID NO：1～6、シュワネラ-オレヤナについてはSEQ ID NO：7～12を参照）から構成されるPUFA PKS系を発現するように遺伝的に改変されている。もう1つの態様において、植物は、そのようなPUFA PKS系からのドメインおよびタンパク質の任意の組み合わせ（例えば、キメラ性PUFA PKS系）を発現するように遺伝的に改変されている。

#### 【0264】

なお、以上に考察したように、植物の遺伝的改変には、コアPUFA PKS酵素複合体とともに働いて植物によるPUFAの産生を実現、促進もしくは強化すると考えられる1つもしくは複数のアクセサリタンパク質の導入、および／または、本明細書に記載したFAS系の阻害、または本明細書に記載したものと同一結果を達成するための他の戦略の使用などによる、PUFA PKS系を通じてのマロニル-CoA基質の流れの増大をもたらす遺伝的改変が含まれる。植物の遺伝的改変にはまた、好ましい宿主コドン用法に対する遺伝子の最適化、ならびに特定のオルガネラ（例えば、プラスチド）に対するPUFAシンターゼ酵素のターゲティングも含まれる。

#### 【0265】

好ましくは、植物は油糧種子植物であり、ここで油糧種子および／または油糧種子中の油はPUFA PKS系によって生成される油を含む。そのような油は、PUFA PKS系の生成物である、検出可能な量の少なくとも1つの標的または主PUFAを含む。加えて、そのような油は、標的または主PUFA生成物でなく、野生型植物において内因性FAS系によっては天然に産生されない中間体または副生成物を実質的に含まない（すなわち、野生型植物は、FAS系を介して炭素18個のPUFAなどのいくつかのより短鎖または中鎖のPUFAを産生するが、PUFA PKS系による遺伝的改変の結果として、植物において新たな、または追加的な脂肪酸が産生されると考えられる）。換言すれば、野生型植物（遺伝的に改変されていない）または指定された遺伝的改変のためのレシピエントとして用いられる親植物からの総脂肪酸のプロフィールと比較して、追加的な脂肪酸（遺伝的改変に起因する新たな脂肪酸または増加した脂肪酸）の大半は、PUFA PKS系によって遺伝的に改変された植物によって産生される総脂肪酸のプロフィールにおいて、PUFA PKS系の標的とした、または意図したPUFA生成物で構成される（すなわち、遺伝的に改変された植物によって産生された総脂肪酸における追加的または新たな脂肪酸の大半は標的PUFAである）。

#### 【0266】

さらに、PUFAを合成するための系の中間体もしくは副生成物を「実質的に含まない」、または実質的な量で存在する中間体もしくは副生成物を有しないとは、PUFAを生成するための酵素系の導入または存在の結果として、遺伝的に改変された植物（および／または植物の部分および／または種子油画分）において産生された、任意の中間体または副生成物の脂肪酸（標的でないPUFA）（すなわち、野生型植物または指定された遺伝的改変のためのレシピエントとして用いられる親植物によっては産生されない）が、植物によって産生

される総脂肪酸の約10重量%未満、より好ましくは植物によって産生される総脂肪酸の約9重量%未満、より好ましくは約8重量%未満、より好ましくは約7重量%未満、より好ましくは約6重量%未満、より好ましくは約5重量%未満、より好ましくは約4重量%未満、より好ましくは約3重量%未満、より好ましくは約2重量%未満、より好ましくは約1重量%未満、より好ましくは植物によって産生される総脂肪酸の約0.5重量%未満で存在することを意味する。

【0267】

1つの好ましい態様において、PUFAを合成するための系の中間体もしくは副生成物を「実質的に含まない」、または実質的な量で存在する中間体もしくは副生成物を有しないと、PUFAを生成するための酵素系の結果として、遺伝的に改変された植物（および/または植物の部分および/または種子油画分）において産生された、任意の中間体または副生成物の脂肪酸（すなわち、野生型植物または標的PUFAの産生のための指定された遺伝的改変のレシピエントとして用いられる親植物によっては産生されない）が、追加的な脂肪酸 produced by植物によって産生される追加的な総脂肪酸（追加的な脂肪酸は、野生型植物または標的PUFAの産生のための指定された遺伝的改変のレシピエントとして用いられる親植物によって天然に産生される脂肪酸または脂肪酸のレベルと定義される）の約10重量%未満、より好ましくは、植物によって産生される追加的な総脂肪酸の約9重量%未満、より好ましくは約8重量%未満、より好ましくは約7重量%未満、より好ましくは約6重量%未満、より好ましくは約5重量%未満、より好ましくは約4重量%未満、より好ましくは約3重量%未満、より好ましくは約2重量%未満、より好ましくは約1重量%未満で存在することを意味する。したがって、標準的経路を介してPUFAを産生するように遺伝的に改変された植物の脂肪酸プロフィールとは対照的に、PUFA PKS系による遺伝的改変に起因する脂肪酸生成物の大半は、標的とした、または意図した脂肪酸生成物であると考えられる。

【0268】

PUFA PKS系の標的生成物が、DHA、DPA（n-6またはn-3）またはEPAなどの長鎖PUFAである場合、そのようなPUFA PKSによって遺伝的に改変された植物の総脂質中に実質的な量では存在しない中間体生成物および副生成物には、以下が非限定的に含まれる： -リノレン酸（GLA；18:3、n-6）；ステアリドン酸（STAまたはSDA；18:4、n-3）；ジホモ- -リノレン酸（DGLAまたはHGLA；20:3、n-6）、アラキドン酸（ARA、C20:4、n-6）；エイコサトリエン酸（ETA；20:3、n-9）およびさまざまな他の中間体または副生成物、例えば20:0；20:1（ 5）；20:1（ 11）；20:2（ 8,11）；20:2（ 11,14）；20:3（ 5,11,14）；20:3（ 11,14,17）；ミード酸（20:3； 5,8,11）；または20:4（ 5,1,14,17）。加えて、標的生成物がDHAなどの特定のPUFAである場合には、遺伝的に改変された植物の総脂質中に実質的な量では存在しない中間体生成物および副生成物には、この例におけるEPAのような、異なるPUFA PKS系の天然生成物である他のPUFAを含む、他のPUFAも含まれる。本発明のPUFA PKS系を、所望であれば、GLA、SDAまたはDGLAを含みうるPUFAである標的PUFAを産生させるために用いることもできることに留意すべきである。

【0269】

本明細書に記載したようなPUFA PKS系の遺伝的基盤およびドメイン構造に関する知識を用いて、本発明者らは、そのようなPUFA PKS系をコードする構築物を設計および作製しており、PUFA PKS系を発現するトランスジェニック植物を作製することに成功した。これらのトランスジェニック植物は、PUFAを含む油を産生し、その油は標準的PUFA経路において蓄積する中間体生成物を実質的に含まない。本発明者らはまた、トランスジェニック植物の作製の前に、概念実証実験として、別の真核生物である酵母においてPUFAを産生させるための構築物の使用についても実証している。それらの例は、標的PUFAとしてDHAおよびDPA n-6を生成するPUFA PKS系による酵母および植物の形質転換がいずれも、これらのPUFAの両方を植物および酵母の総脂肪酸における主要な追加的な脂肪酸として産生すること（すなわち、野生型植物で産生される脂肪酸は差し引かれる）、ならびに、野生型植物または親植物の脂肪酸中に存在しない他の脂肪酸はいずれも事実上検出不能であったことを実証している。本発明の遺伝的に改変された植物ならびにその部分および油の具体的な特徴

について、以下に詳述する。

【0270】

本発明によれば、遺伝的に改変された植物には、古典的な突然変異誘発およびスクリーニング手法と組み合わせることのできる、組換え技術を用いてに改変された植物が含まれる。本明細書で用いる場合、遺伝子発現の低下、遺伝子の機能の低下、遺伝子産物（すなわち、遺伝子によりコードされるタンパク質）の機能の低下をもたらす遺伝的改変は、遺伝子の不活性化（完全または部分的）、欠失、中断、遮断またはダウンレギュレーションと呼ぶことができる。例えば、そのような遺伝子によってコードされるタンパク質の機能の低下をもたらす遺伝子における遺伝的改変は、遺伝子の完全な欠失（すなわち、遺伝子が存在しない、そのためタンパク質が存在しない）、タンパク質の不完全な翻訳をもたらすもしくはタンパク質の翻訳をもたらさない（例えば、タンパク質が発現されない）遺伝子における突然変異、またはタンパク質の本来の機能を低下させるもしくは消失させる（例えば、低下した酵素活性もしくは作用を有する、または酵素活性もしくは作用を有しないタンパク質が発現される）遺伝子における突然変異の結果でありうる。遺伝子発現または機能の増加をもたらす遺伝的改変は、遺伝子の増幅、過剰産生、過剰発現、活性化、増強、付加またはアップレギュレーションと呼ぶことができる。

10

【0271】

本発明による植物の遺伝的改変は、植物による1つまたは複数のPUFAの産生をもたらす。植物によって産生されるPUFAプロファイルおよびPUFAの比は、PUFA PKS系の由来となった生物によって産生されるPUFAプロファイルおよびPUFAの比と必ずしも同じである必要はない。

20

【0272】

遺伝的に改変された植物の作製に関して、植物の遺伝子工学のための方法も当技術分野で周知である。例えば、双子葉植物および単子葉植物のための生物学的および物理的な形質転換プロトコルを含む、植物形質転換のためのさまざまな方法が開発されている（例えば、Goto-Fumiyuki et al., 1999, Nature Biotech 17: 282-286）。例えば、Miki et al., "Procedures for Introducing Foreign DNA into Plants" in Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, Glick, B.R. and Thompson, J.E. Eds. (CRC Press, Inc., Boca Raton, 1993) pp. 67-88を参照されたい。さらに、植物細胞または組織の形質転換および植物の再生のためのベクターおよびインビトロ培養方法も入手可能である。例えば、Gruber et al., "Vectors for Plant Transformation" in Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, Glick, B.R. and Thompson, J.E. Eds. (CRC Press, Inc., Boca Raton, 1993) pp. 89-119を参照されたい。

30

【0273】

植物に発現ベクターを導入するために最も広く利用されている方法は、アグロバクテリウム（*Agrobacterium*）の天然の形質転換系に基づく。例えば、Horsch et al., Science 227:1229 (1985)を参照されたい。*A. ツメファシエンス*（*A. tumefaciens*）および*A. リゾゲネス*（*A. rhizogenes*）は、植物細胞を遺伝的に形質転換する植物病原性の土壌細菌である。*A. ツメファシエンス*および*A. リゾゲネス*のそれぞれTiおよびRiプラスミドは、植物の遺伝的形質転換に関与する遺伝子を保有する。例えば、Kado, C.I., Crit. Rev. Plant Sci. 10:1 (1991)を参照されたい。アグロバクテリウムベクター系およびアグロバクテリウムを介した遺伝子導入の方法に関する記載は、Gruber et al., 前記、Miki et al., 前記、Moloney et al., Plant Cell Reports 8:238 (1989)、ならびに米国特許第4,940,838号および同第5,464,763号を含む、多くの参考文献によって提供されている。

40

【0274】

植物形質転換のもう1つの一般に適用可能な方法は、DNAが微小発射体（microprojectile）の表面で運搬される、微小発射体を介した形質転換である。発現ベクターは、植物細胞壁および膜を貫通させるのに十分なスピードにまで微小発射体を加速する遺伝子銃装置を用いて植物組織に導入される。Sanford et al., Part. Sci. Technol. 5:27 (1987), Sanford, J.C., Trends Biotech. 6:299 (1988), Sanford, J.C., Physiol. Plant 79:206

50

(1990), Klein et al., *Biotechnology* 10:268 (1992)。

【 0 2 7 5 】

植物に対するDNAの物理学的送達のためのもう1つの方法は、標的細胞の超音波処理である。Zhang et al., *Bio/Technology* 9:996 (1991)。または、リポソームまたはスフェロプラスト融合が、発現ベクターを植物に導入するために用いられている。Deshayes et al., *EMBO J.*, 4:2731 (1985), Christou et al., *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 84:3962 (1987)。CaCl<sub>2</sub>沈降、ポリビニルアルコールまたはポリ-L-オルニチンを用いたプロトプラストへのDNAの直接的な取込みも報告されている。Hain et al., *Mol. Gen. Genet.* 199:161 (1985)およびDraper et al., *Plant Cell Physiol.* 23:451 (1982)。プロトプラストならびに全細胞および組織のエレクトロポレーションも記載されている。Donn et al., In *Abstracts of VIIth International Congress on Plant Cell and Tissue Culture IAPTC*, A2-38, p. 53 (1990); D'Halluin et al., *Plant Cell* 4:1495-1505 (1992)およびSpencer et al., *Plant Mol. Biol.* 24:51-61 (1994)。さらに、シリコンカーバイド (silicon carbide) のホイスカー (Kaepler et al., 1990, *Plant Cell Reports*) および、例えば花浸漬 (flower dipping) 法 (Clough and Bent, 1998, *Plant J.* 16: 735-743) を用いた植物形質転換を用いることもできる。

10

【 0 2 7 6 】

厳密な植物形質転換の方法は、選択した植物種および形質転換のために選択した植物細胞のタイプ (例えば、胚軸および子葉といった実生由来の細胞または胚組織) に応じて幾分異なると考えられる。

20

【 0 2 7 7 】

本明細書で前述したように、1つの態様において、選択される植物はベニバナである。ベニバナ形質転換体を入手するための方法論は、Baker and Dyer (*Plant Cell Reports*, 1996, 16: 106-110) に記載されている。

【 0 2 7 8 】

植物細胞への遺伝子構築物の導入の後に植物細胞を成育させ、苗条および根などの分化組織の出現に続いて成熟植物を作じさせる。典型的には、多数の植物を生じさせる。植物を再生させるための方法は当業者に一般に公知であると考えられ、例えば、以下に記載がある: *Plant Cell and Tissue Culture*, 1994, Vasil and Thorpe Eds. Kluwer Academic Publishers and in: *Plant Cell Culture Protocols (Methods in Molecular Biology* 11, 1999 Hall Eds Humana Press)。

30

【 0 2 7 9 】

したがって、本発明に含まれるのは、ある種の海洋細菌および任意のヤブレッツボカビ科または他の真核生物のPUFA PKS系からの遺伝子を利用することによって、植物細胞を遺伝的に改変するための方法であり、さらに、EPA、DHA、DPA (n-3またはn-6)、ARA、GLA、SDAおよび他のものを含むようにPUFA産物の範囲を拡張および/または変更するための遺伝子混合も利用することができる。これらの改変されたPUFA産生プロフィールを得るための方法には、種々の生物由来の遺伝子をヤブレッツボカビ科PUFA PKS遺伝子の中に混合することだけでなく、本明細書に開示した内因性ヤブレッツボカビ科PUFA PKS遺伝子を遺伝的に改変するさまざまな方法も含まれる。ヤブレッツボカビ科PUFA PKS系および海洋細菌PUFA PKS系の遺伝的基盤およびドメイン構造に関する知識は、種々のPUFAプロフィールを生じる新規な遺伝的に改変された生物を設計するための基盤を提供する。ヤブレッツボカビ科または大腸菌などの微生物において調製された新規PUFA PKS構築物を単離して、類似のPUFA産生特性を植物に対して付与する目的で植物を形質転換するために用いることができる。本発明に含まれるPUFA PKS系の特定の改変に関する詳細な考察は、例えば、米国特許出願公開第20020194641号; 米国特許出願公開第20040235127号; および米国特許出願公開第20050100995号に記載されている。

40

【 0 2 8 0 】

遺伝的に改変された植物は、好ましくは、発酵培地中で培養するか、または土壌のような適した培地中で成育させる。適切または有効な発酵培地は、上記に詳細に論じられてい

50



る。高等植物のために適した増殖培地には、土壌、砂、根の成長を補助するその他の任意の粒状培地（例えば、パーミキュライト、パーライトなど）または水耕栽培、ならびに適当な光、水および高等植物の成長を最適化する栄養補給剤を非限定的に含む、植物のための任意の増殖培地が含まれる。本発明の遺伝的に改変された植物は、PUFA PKS系の活性を通じてPUFAを産生するように操作されている。PUFAは、植物から化合物を抽出する精製工程を通じて回収することができる。1つの好ましい態様において、PUFAは植物を収集することによって回収される。1つの特に好ましい態様において、PUFAは植物から油を収集することによって回収される。植物はその自然の状態で消費されてもよく、または消費可能な産物へさらに加工処理されてもよい。

【0281】

10

好ましくは、本発明の遺伝的に改変された植物は、EPA (C20:5、n-3)、DHA (C22:6、n-3)、DPA (C22:5、n-6またはn-3)、ARA (C20:4、n-6)、GLA (C18:3、n-6)、ALA (C18:3、n-3)、および/またはSDA (C18:4、n-3)を非限定的に含む、1つまたは複数の多価不飽和脂肪酸、より好ましくは、EPA (C20:5、n-3)、DHA (C22:6、n-3)、DPA (C22:5、n-6またはn-3)またはDTA (C22:4、n-6)を非限定的に含む、1つまたは複数の長鎖脂肪酸 (LCPUFA)を産生する。1つの特に好ましい態様において、本発明の遺伝的に改変された植物は、EPA (C20:5、n-3)、DHA (C22:6、n-3)および/またはDPA (C22:5、n-6またはn-3)を非限定的に含む、1つまたは複数の多価不飽和脂肪酸を産生する。

【0282】

20

したがって、本発明の1つの態様は、植物、好ましくは油糧種子植物であって、少なくとも1つのPUFA (標的PUFA)を産生し (例えば、油糧種子植物であればその成熟種子中に、または油糧種子植物の種子の油の中に)、かつ、植物またはPUFAが蓄積する植物の部分 (例えば、植物が油糧種子植物であれば成熟種子、または油糧種子植物の種子の油)における総脂肪酸プロファイルが検出可能な量のこの1つまたは複数のPUFAを含む植物に関する。好ましくは、標的PUFAは少なくとも20炭素型のPUFAであって、少なくとも3つの二重結合を有し、好ましくは少なくとも4つの二重結合、さらにより好ましくは少なくとも5つの二重結合を有する。さらに、標的PUFAは好ましくは、植物 (すなわち、遺伝的改変が存在しない野生型植物、または指定された遺伝的改変のためのレシピエントとして用いられる親植物)によって天然には産生されないPUFAである。好ましくは、植物における、またはPUFAが蓄積する植物の部分 (植物の種子油を含む)における総脂肪酸プロファイルは、標的PUFAを総脂肪酸の少なくとも0.1重量%含み、より好ましくは、少なくとも1つの多価不飽和脂肪酸 (標的PUFAまたはPUFA)を、植物によって産生される総脂肪酸の少なくとも約0.2重量%、より好ましくは少なくとも約0.3重量%、より好ましくは少なくとも約0.4重量%、より好ましくは少なくとも約0.5重量%、より好ましくは少なくとも約1重量%、より好ましくは少なくとも約1.5重量%、より好ましくは少なくとも約2重量%、より好ましくは少なくとも約2.5重量%、より好ましくは少なくとも約3重量%、より好ましくは少なくとも約3.5重量%、より好ましくは少なくとも約4重量%、より好ましくは少なくとも約4.5重量%、より好ましくは少なくとも約5重量%、より好ましくは少なくとも約5.5重量%、より好ましくは少なくとも約10重量%、より好ましくは少なくとも約15重量%、より好ましくは少なくとも約20重量%、より好ましくは少なくとも約25重量%、より好ましくは少なくとも約30重量%、より好ましくは少なくとも約35重量%、より好ましくは少なくとも約40重量%、より好ましくは少なくとも約45重量%、より好ましくは少なくとも約50重量%、より好ましくは少なくとも約55重量%、より好ましくは少なくとも約60重量%、より好ましくは少なくとも約65重量%、より好ましくは少なくとも約70重量%、より好ましくは少なくとも約75重量%、より好ましくは75重量%超、または標的PUFAの0.1重量%から75重量%または75重量%超 (最大で100重量%または約100重量%)までの0.1重量%刻みでの任意のパーセンテージで含む。本明細書で一般的に用いる場合、PUFA産生のパーセンテージ量に対する言及は、別に指定する場合を除き、生物によって産生される総脂肪酸に対する重量比である (例えば、場合によっては、重量比でのパーセンテージは、PUFA PKS系などの酵素複合体によって生成される総脂肪酸に対するものである)。1つの態

30

40

50

様において、植物によって産生される総脂肪酸は、脂肪酸メチルエステル（FAME）調製物のガスクロマトグラフィー（GC）分析によって決定される重量パーセントとして提示されるが、総脂肪酸の決定はこの方法には限定されない。

【0283】

上記のように、これらの植物によって産生される総脂肪酸が、標的PUFAを生成する酵素複合体によって生成される標的PUFA以外の、任意の脂肪酸を約10重量%未満含む（またはそれ以上で含まない）ことは、上記の植物（および/または植物の部分または種子油画分）によって産生される総脂肪酸のさらなる特徴である。好ましくは、標的PUFA以外の、標的PUFAを生成する酵素複合体によって（例えば、標的PUFAを生成する酵素または酵素複合体による植物の遺伝的改変の結果として）生成される任意の脂肪酸は、植物によって産生される総脂肪酸の約9重量%未満、より好ましくは約8重量%未満、より好ましくは約7重量%未満、より好ましくは約6重量%未満、より好ましくは約5重量%未満、より好ましくは約4重量%未満、より好ましくは約3重量%未満、より好ましくは約2重量%未満、より好ましくは約1重量%未満を構成する。

【0284】

もう1つの態様において、標的PUFA以外の、標的PUFAを生成する酵素複合体によって生成される任意の脂肪酸は、植物において標的PUFAを生成する酵素複合体によって生成される総脂肪酸の約10重量%未満を構成し（またはそれ以上で含まない）（すなわち、この測定は、標的PUFAを生成する酵素複合体によって生成されるような総脂肪酸に限定される）、より好ましくは、植物において標的PUFAを生成する酵素複合体によって生成される総脂肪酸の約9重量%未満、より好ましくは約8重量%未満、より好ましくは約7重量%未満、より好ましくは約6重量%未満、より好ましくは約5重量%未満、より好ましくは約4重量%未満、より好ましくは約3重量%未満、より好ましくは約2重量%未満、より好ましくは約1重量%未満、より好ましくは約0.5重量%未満を構成する。

【0285】

この態様のもう本発明の1つの局面において、植物（および/または植物の部分または種子油画分）によって産生される総脂肪酸は、標的PUFA、または野生型植物（遺伝的に改変されていない）に、もしくは指定された遺伝的改変のためのレシピエントとして用いられる親植物に存在するPUFA以外の、18個またはそれ以上の炭素を有するPUFAを、植物によって産生される総脂肪酸の10重量%未満含む（またはそれ以上で含まない）。さらなる局面において、植物（および/または植物の部分または種子油画分）によって産生される総脂肪酸は、標的PUFA、または野生型植物（遺伝的に改変されていない）または指定された遺伝的改変のためのレシピエントとして用いられる親植物に存在するPUFA以外の、18個もしくはそれ以上の炭素を有するPUFAを、植物によって産生される総脂肪酸の9重量%未満、または18個もしくはそれ以上の炭素を有するPUFAを8重量%未満、または18個もしくはそれ以上の炭素を有するPUFAを7重量%未満、または18個もしくはそれ以上の炭素を有するPUFAを6重量%未満、または18個もしくはそれ以上の炭素を有するPUFAを5重量%未満、または18個もしくはそれ以上の炭素を有するPUFAを4重量%未満、または18個もしくはそれ以上の炭素を有するPUFAを3重量%未満、または18個もしくはそれ以上の炭素を有するPUFAを2重量%未満、または18個もしくはそれ以上の炭素を有するPUFAを1重量%未満含む。

【0286】

この態様のもう本発明の1つの局面において、植物（および/または植物の部分または種子油画分）によって産生される総脂肪酸は、標的PUFA、または野生型植物（遺伝的に改変されていない）または指定された遺伝的改変のためのレシピエントとして用いられる親植物に存在するPUFA以外の、20個またはそれ以上の炭素を有するPUFAを、植物によって産生される総脂肪酸の10重量%未満含む（またはそれ以上で含まない）。さらなる局面において、植物（および/または植物の部分または種子油画分）によって産生される総脂肪酸は、標的PUFA、または野生型植物（遺伝的に改変されていない）または指定された遺伝的改変のためのレシピエントとして用いられる親植物に存在するPUFA以外の、20個もしくはは

それ以上の炭素を有するPUFAを、植物によって産生される総脂肪酸の9重量%未満、または20個もしくはそれ以上の炭素を有するPUFAを8重量%未満、または20個もしくはそれ以上の炭素を有するPUFAを7重量%未満、または20個もしくはそれ以上の炭素を有するPUFAを6重量%未満、または20個もしくはそれ以上の炭素を有するPUFAを5重量%未満、または20個もしくはそれ以上の炭素を有するPUFAを4重量%未満、または20個もしくはそれ以上の炭素を有するPUFAを3重量%未満、または20個もしくはそれ以上の炭素を有するPUFAを2重量%未満、または20個もしくはそれ以上の炭素を有するPUFAを1重量%未満含む。

#### 【0287】

1つの態様において、植物（および/または植物の部分または種子油画分）における総脂肪酸は、以下の任意の1つまたは複数から選択される脂肪酸を、植物によって産生される総脂肪酸の約10重量%未満、より好ましくは約9重量%未満、より好ましくは約8重量%未満、より好ましくは約7重量%未満、より好ましくは約6重量%未満、より好ましくは約5重量%未満、より好ましくは約4重量%未満、より好ましくは約3重量%未満、より好ましくは約2重量%未満、より好ましくは約1重量%未満含む： -リノレン酸（GLA；18:3、n-6）；ステアリドン酸（STAまたはSDA；18:4、n-3）；ジホモ- -リノレン酸（DGLAまたはHGLA；20:3、n-6）；アラキドン酸（ARA、C20:4、n-6）；エイコサトリエン酸（ETA；20:3、n-9）およびさまざまな他の脂肪酸、例えば、20:0；20:1（ 5）；20:1（ 11）；20:2（ 8,11）；20:2（ 11,14）；20:3（ 5,11,14）；20:3（ 11,14,17）；ミード酸（20:3； 5,8,11）；または20:4（ 5,1,14,17）など。

#### 【0288】

もう1つの態様において、植物において長鎖PUFAを生成する酵素系によって生成される脂肪酸は、以下から選択される脂肪酸： -リノレン酸（GLA；18:3、n-6）；ステアリドン酸（STAまたはSDA；18:4、n-3）；ジホモ- -リノレン酸（DGLAまたはHGLA；20:3、n-6）；アラキドン酸（ARA、C20:4、n-6）；エイコサトリエン酸（ETA；20:3、n-9）およびさまざまな他の脂肪酸、例えば20:0；20:1（ 5）；20:1（ 11）；20:2（ 8,11）；20:2（ 11,14）；20:3（ 5,11,14）；20:3（ 11,14,17）；ミード酸（20:3； 5,8,11）；または20:4（ 5,1,14,17）などを、植物によって産生される総脂肪酸に占めるパーセンテージとして約10重量%未満含み、より好ましくは、以下から選択される脂肪酸： -リノレン酸（GLA；18:3、n-6）；ステアリドン酸（STAまたはSDA；18:4、n-3）；ジホモ- -リノレン酸（DGLAまたはHGLA；20:3、n-6）；アラキドン酸（ARA、C20:4、n-6）；エイコサトリエン酸（ETA；20:3、n-9）およびさまざまな他の脂肪酸、例えば20:0；20:1（ 5）；20:1（ 11）；20:2（ 8,11）；20:2（ 11,14）；20:3（ 5,11,14）；20:3（ 11,14,17）；ミード酸（20:3； 5,8,11）；または20:4（ 5,1,14,17）などを、約9重量%未満、より好ましくは約8重量%未満、より好ましくは約7重量%未満、より好ましくは約6重量%未満、より好ましくは約5重量%未満、より好ましくは約4重量%未満、より好ましくは約3重量%未満、より好ましくは約2重量%未満、より好ましくは約1重量%未満含む。

#### 【0289】

もう1つの態様において、植物において長鎖PUFAを生成する酵素系によって生成される脂肪酸は、以下のPUFA： -リノレン酸（GLA；18:3、n-6）、18個の炭素および4つの炭素-炭素二重結合を有するPUFA、20個の炭素および3つの炭素-炭素二重結合を有するPUFA、ならびに22個の炭素および2つまたは3つの炭素-炭素二重結合を有するPUFAのすべてを、植物によって産生される総脂肪酸に占めるパーセンテージとして約10重量%未満含み、より好ましくは、以下のPUFA： -リノレン酸（GLA；18:3、n-6）、18個の炭素および4つの炭素-炭素二重結合を有するPUFA、20個の炭素および3つの炭素-炭素二重結合を有するPUFA、ならびに22個の炭素および2つまたは3つの炭素-炭素二重結合を有するPUFAのすべてを、約9重量%未満、より好ましくは約8重量%未満、より好ましくは約7重量%未満、より好ましくは約6重量%未満、より好ましくは約5重量%未満、より好ましくは約4重量%未満、より好ましくは約3重量%未満、より好ましくは約2重量%未満、より好ましくは約1重量%未満含む。

## 【0290】

もう1つの態様において、植物において長鎖PUFAを生成する酵素系によって生成される脂肪酸は、以下のPUFA： -リノレン酸（GLA；18:3、n-6）、18個の炭素および4つの炭素-炭素二重結合を有するPUFA、20個の炭素および3つの炭素-炭素二重結合を有するPUFA、ならびに22個の炭素および2つまたは3つの炭素-炭素二重結合を有するPUFAのそれぞれを、植物によって産生される総脂肪酸に占めるパーセンテージとして約10重量%未満含み、より好ましくは、以下のPUFA： -リノレン酸（GLA；18:3、n-6）、18個の炭素および4つの炭素-炭素二重結合を有するPUFA、20個の炭素および3つの炭素-炭素二重結合を有するPUFA、ならびに22個の炭素および2つまたは3つの炭素-炭素二重結合を有するPUFAのそれぞれを、約9重量%未満、より好ましくは約8重量%未満、より好ましくは約7重量%未満、より好ましくは約6重量%未満、より好ましくは約5重量%未満、より好ましくは約4重量%未満、より好ましくは約3重量%未満、より好ましくは約2重量%未満、より好ましくは約1重量%未満含む。

10

## 【0291】

もう1つの態様において、植物において長鎖PUFAを生成する酵素系によって生成される脂肪酸は、以下のPUFA： -リノレン酸（GLA；18:3、n-6）、18個の炭素および4つの炭素-炭素二重結合を有するPUFA、20個の炭素および3つの炭素-炭素二重結合を有するPUFA、ならびに22個の炭素および2つまたは3つの炭素-炭素二重結合を有するPUFAのうち任意の1つまたは複数を、植物によって産生される総脂肪酸に占めるパーセンテージとして約10重量%未満含み、より好ましくは、以下のPUFA： -リノレン酸（GLA；18:3、n-6）、18個の炭素および4つの炭素-炭素二重結合を有するPUFA、20個の炭素および3つの炭素-炭素二重結合を有するPUFA、ならびに22個の炭素および2つまたは3つの炭素-炭素二重結合を有するPUFAのうち任意の1つまたは複数を、約9重量%未満、より好ましくは約8重量%未満、より好ましくは約7重量%未満、より好ましくは約6重量%未満、より好ましくは約5重量%未満、より好ましくは約4重量%未満、より好ましくは約3重量%未満、より好ましくは約2重量%未満、より好ましくは約1重量%未満含む。

20

## 【0292】

本発明のこの態様の1つの局面において、植物は少なくとも2つの標的PUFAを産生し、植物またはPUFAが蓄積する植物の部分（油糧種子からの油を含む）における総脂肪酸プロファイルは、検出可能な量のこれらのPUFAを含む。この態様において、PUFAは好ましくは、それぞれ少なくとも20炭素型のPUFAであって、しかも少なくとも3つの二重結合を含み、好ましくは少なくとも4つの二重結合、さらにより好ましくは少なくとも5つの二重結合を含む。そのようなPUFAは、最も好ましくは、DHA、DPA<sub>n</sub>-6およびEPAから選択される。1つの局面において、植物はDHAおよびDPA<sub>n</sub>-6を産生し、DHAとDPA<sub>n</sub>-6との比は約1：10～約10：1であり、それらの間の任意の比を含む。1つの態様において、DHAとDPAとの比は約1：1～約3：1であり、もう1つの態様においては約2.5：1である。1つの態様において、植物はDHAおよびEPAを産生する。

30

## 【0293】

もう本発明のこの態様の1つの局面において、植物は図13または図14によって表された総脂肪酸プロファイルを生じる。

40

## 【0294】

本発明はさらに、本明細書に記載した植物によって産生される任意の種子、ならびに本明細書に記載した植物または種子によって産生される任意の油を含む。本発明はまた、本明細書に記載した植物、種子または油を用いて生産される任意の生成物も含む。

## 【0295】

本発明の遺伝的に改変された生物に関する用途

本発明の1つの態様は、本発明の遺伝的に改変された生物（例えば、微生物または植物）（以上に詳述）を育成させること、または培養することによって、所望の生物活性分子（産物または化合物とも称される）を生産するための方法である。好ましくは、生物活性分子はPUFAであり、最も好ましくはLCPUFAである。好ましくは、遺伝的に改変された生物

50

は、遺伝的に改変された微生物または遺伝的に改変された植物である。そのような方法は、本明細書で以前に記載した通りに、および本発明に従って、遺伝的改変を有する微生物または植物をそれぞれ、発酵培地中で培養する段階、または土壌などの適当な環境中で成育させる段階を含む。本発明のPUFA PKS系に関連した遺伝的改変のために好ましい宿主細胞については上述している。

#### 【0296】

本発明の1つの態様は、本発明の遺伝的に改変された微生物（以上に詳述）を培養することによって、所望のPUFAを生産するための方法である。そのような方法は、本明細書で以前に記載した通りに、および本発明に従って、遺伝的改変を有する微生物を、発酵培地中で、PUFAを生産させるのに有効な条件下で培養する段階を含む。適切な、または有効な培地とは、本発明の遺伝的に改変された微生物が、培養された場合に、所望のPUFA産物を産生することができる任意の培地のことを指す。そのような培地は、典型的には、同化可能な炭素、窒素およびリン酸源を含む水性培地である。そのような培地はまた、適切な塩、ミネラル、金属および他の栄養素も含みうる。本発明の任意の微生物は、従来の発酵バイオリアクター内で培養することができる。微生物は、バッチ発酵、流加発酵、細胞リサイクル発酵および連続発酵を非限定的に含む、任意の発酵工程によって培養することができる。本発明によるヤブレッツボカビ科微生物に対する好ましい増殖条件は当技術分野で周知であり、例えば米国特許第5,130,242号、米国特許第5,340,742号および米国特許第5,698,244号に詳細に記載されており、それらの文献のそれぞれはその全体が参照により本明細書に組み入れられる。

#### 【0297】

遺伝的に改変された微生物により産生された所望のPUFAおよび/または他の生物活性分子は、従来の分離および精製手法を用いて発酵培地から回収することができる。例えば、微生物、細胞残屑および他の粒状物質を除去するために発酵培地を濾過または遠心分離して、例えばイオン交換、クロマトグラフィー、抽出、溶媒抽出、相分離、膜分離、電気透析、逆浸透法、蒸留、化学的誘導体化および結晶化などの従来の方法によって、産物を無細胞上清から回収することができる。または、PUFAを生産する微生物、またはその抽出物およびさまざまな画分を、産物からの微生物成分の除去を行わずに用いることもできる。

#### 【0298】

好ましくは、PUFAは、微生物の乾燥重量の約5%を上回る量で、1つの局面においては6%を上回る量で、もう1つの局面においては7%を上回る量で、もう1つの局面においては8%を上回る量で、もう1つの局面においては9%を上回る量で、もう1つの局面においては10%を上回る量で、以下同様に完全な整数のパーセンテージであって、最大で微生物の乾燥重量の90%を上回って（例えば、15%、20%、30%、40%、50%、およびそれらの間の任意のパーセンテージで）産生される。

#### 【0299】

好ましくは、関心対象の生物活性化合物は、遺伝的に改変された微生物によって、微生物の乾燥重量の約0.05%を上回る、好ましくは約0.1%を上回る、より好ましくは約0.25%を上回る、より好ましくは約0.5%を上回る、より好ましくは約0.75%を上回る、より好ましくは約1%を上回る、より好ましくは約2.5%を上回る、より好ましくは約5%を上回る、より好ましくは約10%を上回る、より好ましくは約15%を上回る、およびさらにより好ましくは約20%を上回る量で産生される。脂質化合物については、好ましくは、そのような化合物は、微生物の乾燥重量の約5%を上回る量で産生される。抗生物質またはより少量で合成される化合物のような他の生物活性化合物については、そのような化合物を微生物の乾燥重量で有するような株は、上記の型の新規PKS系を予想通りに含むものとして同定される。いくつかの態様において、特定の生物活性分子（化合物）は、蓄積性というよりも、微生物によって分泌される。したがって、そのような生物活性分子は、一般に培地から回収され、産生された分子の濃度は、微生物およびその培養物のサイズに応じて異なると考えられる。

#### 【0300】

本発明の所望の生物活性化合物の生産のための方法において、遺伝的に改変された植物は、発酵培地で培養されるか、または土壌のような適した培地において生育される。適切または有効な発酵培地は、上記に詳細に論じられている。高等植物のために適した増殖培地には、土壌、砂、根の成長を補助するその他の任意の粒状培地（例えば、パーミキュライト、パーライトなど）または水耕栽培、ならびに適当な光、水および高等植物の増殖を最適化する栄養補給剤を非限定的に含む、植物のための任意の増殖培地が含まれる。本発明の遺伝的に改変された植物は、本発明によるPUFA PKS系および他の異種タンパク質（PUFA PKS系に対するアクセサリータンパク質）の活性を通じて有意な量の所望の産物を産生するように操作されている。化合物は、植物から化合物を抽出する精製工程を通じて回収することができる。1つの好ましい態様において、化合物は植物を収集することによって回収される。この態様において、植物はその自然の状態で消費されてもよく、または消費可能な産物へさらに加工処理されてもよい。

10

#### 【0301】

本発明はさらに、本明細書に記載した任意の生物またはその部分を含む（例えば、微生物およびそれらの調製物もしくは画分、または、植物の部分（例えば、油糧種子）もしくはそれらの調製物もしくは画分）、ならびに本明細書に記載した生物によって産生される任意の油を含む。本発明はまた、本明細書に記載した生物、その部分または油を用いて生産される任意の産物も含む。

#### 【0302】

本発明の1つの態様は、少なくとも1つの脂肪酸を含む産物を改変するための方法であって、産物に対して、生物、その部分、または本発明に従って本明細書に記載したように遺伝的に改変された生物によって産生された油を添加する段階を含む方法に関する（例えば、PUFA PKS系によって遺伝的に改変された植物または微生物は、本明細書に記載したPUFAの産生および/または蓄積の改良のための戦略のいずれかを利用し、本明細書に記載した脂肪酸プロファイルを有する）。本方法によって生産された、または任意の生物、その部分もしくは本明細書に記載した生物からの油を一般に含む産物も、本発明に含まれる。

20

#### 【0303】

好ましくは、産物は、食品、栄養補助食品、医薬製剤、ヒト化動物乳および乳幼児用調合乳からなる群より選択される。適切な医薬製剤には、抗炎症製剤、化学療法薬、活性添加剤、骨粗鬆症治療薬、抗鬱薬、抗痙攣薬、抗ヘリコバクター・ピロリ（*Helicobacter pylori*）薬、神経変性疾患の治療薬、変性肝疾患の治療薬、抗生物質、およびコレステロール低下製剤が非限定的に含まれる。1つの態様において、産物は、以下からなる群より選択される病状を治療するために用いられる：慢性炎症、急性炎症、胃腸障害、癌、悪液質、心臓再狭窄、神経変性疾患、肝臓の変性疾患、血中脂質疾患、骨粗鬆症、骨関節炎、自己免疫疾患、子癇前症、早産、加齢性黄斑症、肺疾患およびペルオキシソーム病。

30

#### 【0304】

適切な食品には、上質なベーカリー製品、パンおよびロールパン、朝食用シリアル、加工および非加工チーズ、香辛料（ケチャップ、マヨネーズなど）、乳製品（ミルク、ヨーグルト）、プリンおよびゼラチンデザート、炭酸飲料、茶、粉末飲料ミックス、加工魚製品、果物飲料、チューインガム、固形型菓子類、冷凍乳製品、加工肉製品、ナッツおよびナッツのスプレッド、パスタ、加工家禽肉製品、肉汁およびソース、ポテトチップスおよび他のチップスまたはクリスプ、チョコレートおよび他の菓子類、スープおよびスープミックス、大豆製品（ミルク、飲料、クリーム、漂白剤）、植物油をベースとするスプレッド、ならびに野菜飲料が非限定的に含まれる。

40

#### 【0305】

##### 一般的な定義および手引き

本発明によれば、単離されたタンパク質とは、その天然の環境から取り出された（すなわち、人為的な操作を受けた）タンパク質またはその断片（ポリペプチドまたはペプチドを含む）のことであり、これには例えば、精製されたタンパク質、部分的に精製されたタンパク質、組換的に産生されたタンパク質、および合成的に生成されたタンパク質が含ま

50

れうる。このため、「単離された」タンパク質は、タンパク質が精製される程度を反映しない。好ましくは、本発明の単離されたタンパク質は、組換え的に産生される。単離されたペプチドは、合成的に（例えば、ペプチド合成などによって化学的に）または組換え的に生産することができる。

#### 【0306】

本明細書で用いる場合、「脂質」という用語は、リン脂質；遊離脂肪酸；脂肪酸エステル；トリアシルグリセロール；ジアシルグリセリド；モノアシルグリセリド；リゾリン脂質；石けん；ホスファチド；ロウ（アルコールと脂肪酸のエステル）；ステロールおよびステロールエステル；カロテノイド；キサントフィル（例えば、オキシカロテノイド）；炭化水素；ならびに当業者に公知であるその他の脂質を含む。「多価不飽和脂肪酸」および「PUFA」という用語は、遊離脂肪酸型だけでなく、TAG型およびPL型などの、その他の型も同様に含む。

10

#### 【0307】

特定の生物由来の特定のタンパク質、または特定の生物に由来する特定のタンパク質に対する言及、例えば「シゾキトリウム属ACoAS」または「シゾキトリウム属に由来するACoAS」などは、シゾキトリウム属由来のACoAS（天然のACoASの相同体を含む）、またはシゾキトリウム属由来の天然のACoASの構造（例えば、配列）に機能に関する知識から別の方法で生産されたACoASのことを指す。言い換えれば、シゾキトリウム属ACoASには、シゾキトリウム属由来の天然のACoASの構造および機能を有する、またはACoASがシゾキトリウム属由来の天然のACoASの生物活性（すなわち、生物活性を有する）相同体であるような、シゾキトリウム属由来の天然のACoASに実質的に類似の構造および機能を有する、任意のACoASが含まれる。このため、シゾキトリウム属ACoASには、精製タンパク質、部分的精製タンパク質、組換えタンパク質、突然変異／改変タンパク質および合成タンパク質が含まれうる。

20

#### 【0308】

本発明によれば、「改変」および「突然変異」という用語は、特に、本明細書に記載したタンパク質またはペプチドの一次アミノ酸配列（または核酸配列）に対する改変／突然変異に関して互換的に用いることができる。「改変」という用語はまた、メチル化、ファルネシル化、カルボキシメチル化、ゲラニルゲラニル化、グリコシル化、リン酸化、アセチル化、ミリスチル化、プレニル化、パルミチン酸化、および／またはアミド化を非限定的に含む、タンパク質またはペプチドに対する翻訳後修飾を記載するために用いることができる。改変にはまた、例えば、別の化合物とのタンパク質またはペプチドの複合体化が含まれうる。そのような改変は、例えば、その改変が天然の、野生型タンパク質またはペプチドで起こる翻訳後修飾とは異なる場合には、突然変異であると考えることができる。

30

#### 【0309】

本明細書で用いる場合、「相同体」という用語は、天然のタンパク質またはペプチドに対する1つまたは複数の軽微な改変または突然変異によって天然のタンパク質またはペプチド（すなわち、「原型」または「野生型」タンパク質）とは異なるが、天然型の全体的な基本タンパク質および側鎖の構造を維持する（すなわち、相同体が野生型タンパク質と関連していると同等可能であるように）タンパク質またはペプチドを指して用いられる。そのような変化には、1個もしくは数個（例えば、1%またはそれ未満）のアミノ酸側鎖の変化；欠失（例えば、タンパク質もしくはペプチドの短縮型）、挿入および／もしくは置換を含む、1個もしくは数個（例えば、1%またはそれ未満）のアミノ酸の変化；1個もしくは数個（例えば、1%またはそれ未満）の原子の空間的配置の変化；ならびに／または以下を非限定的に含む軽微な誘導体化：メチル化、ファルネシル化、ゲラニルゲラニル化、グリコシル化、カルボキシメチル化、リン酸化、アセチル化、ミリスチル化、プレニル化、パルミチン酸化、および／もしくはアミド化。相同体は、天然のタンパク質またはペプチドと比較して強化した、低下した、または実質的に類似した特性を有することができる。タンパク質の好ましい相同体は、以下に詳細に記載される。相同体は、合成によ

40

50

て生産された相同体、所定のタンパク質もしくはドメインの天然の対立遺伝子変異体、またはその参照配列が由来する生物以外の生物からの相同的配列を含みうることを指摘しておく。

#### 【0310】

保存的置換は典型的には、次の群の内部での置換を含む：グリシンおよびアラニン；バリン、イソロイシンおよびロイシン；アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、およびグルタミン；セリンおよびスレオニン；リジンおよびアルギニン；ならびにフェニルアラニンおよびチロシン。また、置換が、保存された疎水性または親水性に基づいて (Kyte and Doolittle, J. Mol. Biol. 157:105 (1982))、または類似のポリペプチド二次構造をとる能力に基づいて (Chou and Fasman, Adv. Enzymol. 47: 45 (1978))、施されてもよい。

10

#### 【0311】

相同体は、天然の対立遺伝子変異または天然の突然変異の結果であってよい。タンパク質をコードする核酸の天然の対立遺伝子変異体は、そのようなタンパク質をコードするが、例えば、突然変異または組換えにより引き起こされる天然の変異によって、類似するが同一ではない配列を有する遺伝子とゲノム中で本質的に同じ遺伝子座（または座位）に生じる遺伝子である。対立遺伝子変異体は典型的には、それらが比較されている遺伝子によってコードされるタンパク質のものと類似した活性を有するタンパク質をコードする。対立遺伝子変異体の1つのクラスは、同じタンパク質をコードするが、遺伝暗号の縮重性のために異なる核酸配列を有することができる。対立遺伝子変異体はまた、遺伝子の5'または3'非翻訳領域に（例えば、調節制御領域に）変化を含むこともできる。対立遺伝子変異体は当業者に周知である。

20

#### 【0312】

相同体は、単離された天然のタンパク質に対する直接的な改変、直接的なタンパク質合成、または、例えば、ランダムもしくは標的指向的な突然変異誘発をもたらす古典的なもしくは組換えDNA手法を用いてのタンパク質をコードする核酸配列に対する改変を非限定的に含む、タンパク質の作製のための当技術分野で公知の技術を用いて作製することができる。

#### 【0313】

野生型タンパク質と比べて、タンパク質相同体における改変または突然変異は、天然の（野生型）タンパク質と比べて相同体の基礎生物活性を増大させる、減少させる、または実質的に変化させないかのいずれかである。一般に、タンパク質の生物活性または生物作用とは、インビボ（すなわち、そのタンパク質の自然な生理的環境において）またはインビトロ（すなわち、実験室条件下）で測定または観察される、そのタンパク質の天然の型に帰するそのタンパク質によって呈示または遂行される任意の機能を指す。PUFA PKS系およびPUFA PKS系を構成している個々のタンパク質／ドメインの生物活性は、本明細書の他の箇所ならびに参照した特許および出願に詳細に記載されている。ACoASの生物活性には、基質、本発明に関して好ましくはPUFAの遊離脂肪酸（FFA）と結合すること、およびFFAのアシル-CoA PUFAへの変換を触媒することが含まれる。

30

#### 【0314】

相同体などにおけるタンパク質の改変は、結果として、その天然のタンパク質と同じ生物活性を有するタンパク質、またはその天然のタンパク質と比較して減少もしくは増加した生物活性を有するタンパク質を生じうる。タンパク質の発現における減少または活性における減少を生じる改変は、タンパク質の不活性化（完全または部分的な）、ダウンレギュレーション、または低下した作用（または活性）と称しうる。同様に、タンパク質の発現の増加または活性の上昇をもたらす改変は、タンパク質の増幅、過剰産生、活性化、増強、アップレギュレーションまたは増大した作用（または活性）と称することができる。野生型タンパク質の生物活性を有する相同体に対する一般的な言及は、相同体が生物活性のレベルに関してとりわけ、野生型タンパク質と必ずしも同一の生物活性を有することを意味するわけではないことを指摘しておく。むしろ、相同体は野生型タンパク質と同じ生

40

50



物活性を、しかし野生型タンパク質と比べて低下したまたは増加したレベルの活性で遂行することができる。タンパク質の機能ドメインは、生物機能を遂行する能力がある（すなわち、生物活性を有する）ドメイン（すなわち、ドメインはタンパク質の部分でありうる）である。

#### 【0315】

タンパク質を検出する、またはタンパク質の活性を測定する方法には、タンパク質の転写の測定、タンパク質の翻訳の測定、タンパク質の翻訳後修飾の測定、タンパク質の酵素活性の測定、および/またはタンパク質の1つもしくは複数の産物の産生（例えば、PUFAの産生）の測定が非限定的に含まれる。本発明の単離タンパク質（相同体を含む）は必ずしも野生型タンパク質の生物活性を有する必要がないことを指摘しておく。例えば、タンパク質は、例えば、短縮タンパク質、突然変異タンパク質または不活性なタンパク質であってもよい。そのようなタンパク質は、例えばスクリーニングアッセイ法において、または抗体産生などの他の目的に有用である。1つの好ましい態様において、本発明の単離されたタンパク質は、野生型タンパク質のものに類似する（以上で考察したように、必ずしも等価である必要はないが）生物活性を有する。

#### 【0316】

タンパク質発現レベルを測定する方法には一般に、ウェスタンブロット法、イムノブロット法、固相酵素免疫アッセイ（ELISA）法、ラジオイムノアッセイ（RIA）法、免疫沈降法、表面プラズモン共鳴法、化学発光法、蛍光偏光法、リン光、免疫組織化学分析、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型（MALDI-TOF）質量分析法、マイクロサイトメトリー法、マイクロアレイ法、顕微鏡検査、蛍光活性化細胞分取（FACS）法、およびフローサイトメトリー、ならびに酵素活性またはその他のタンパク質パートナーとの相互作用を非限定的に含むタンパク質の特性に基づくアッセイが非限定的に含まれる。結合アッセイ法も当技術分野で周知である。例えば、BIAcore機器を用いて、2つのタンパク質間の複合体の結合定数を測定することができる。複合体の解離定数は、緩衝液がチップを通過する際の時間に対する屈折率の変化をモニターすることによって測定することができる（O'Shannessy et al. Anal. Biochem. 212:457 (1993); Schuster et al., Nature 365:343 (1993)）。あるタンパク質の別のタンパク質との結合を測定するのに適したその他のアッセイ法には、例えば、固相酵素免疫アッセイ（ELISA）およびラジオイムノアッセイ（RIA）などのイムノアッセイ法、または蛍光、UV吸収、円偏光二色性、もしくは核磁気共鳴（NMR）を通じたタンパク質の分光学的もしくは光学的特性の変化のモニタリングによる結合の測定が含まれる。

#### 【0317】

本発明の1つの局面において、本明細書に記載した特定のタンパク質の相同体を含む、本発明に含まれるタンパク質は、参照タンパク質からのアミノ酸配列の少なくとも約100個の連続したアミノ酸を含むアミノ酸配列を含み、ここで相同体のアミノ酸配列は、本明細書に記載したようなタンパク質の生物活性を有する。1つのさらなる局面において、タンパク質のアミノ酸配列は、参照タンパク質のアミノ酸配列の、少なくとも約200個の連続したアミノ酸、より好ましくは少なくとも約300個の連続したアミノ酸、より好ましくは少なくとも約400個の連続したアミノ酸を含み、さらに、完全な整数である任意の刻みを含め（例えば、200、201、202、203など）、最大でタンパク質の完全長に至るまで、500個の連続したアミノ酸またはそれ以上を含むことができる。

#### 【0318】

本発明によれば、本明細書に記載した核酸またはアミノ酸配列に関する「隣接した」または「連続した」という用語は、間断のない配列として連結されていることを意味する。例えば、第1の配列が第2の配列の30個の隣接した（または連続した）アミノ酸を含むとは、その第1の配列が、第2の配列における30個のアミノ酸残基の間断のない配列と100%同一である30個のアミノ酸残基の間断のない配列を含むことを意味する。同様に、第1の配列が第2の配列と「100%の同一性」を有するとは、その第1の配列がヌクレオチドまたはアミノ酸間にギャップを含まずにその第2の配列と正確にマッチすることを意味する。

## 【0319】

典型的には、本明細書に記載したACoASタンパク質のいずれかのような参照タンパク質の相同体は、参照タンパク質のアミノ酸配列に対して（例えば、ACoASタンパク質に対して）、少なくとも約50%同一な、より好ましくは少なくとも約55%同一な、より好ましくは少なくとも約60%同一な、より好ましくは少なくとも約65%同一な、より好ましくは少なくとも約70%同一な、より好ましくは少なくとも約75%同一な、より好ましくは少なくとも約80%同一な、より好ましくは少なくとも約85%同一な、より好ましくは少なくとも約90%同一な、より好ましくは少なくとも約95%同一な、より好ましくは少なくとも約96%同一な、より好ましくは少なくとも約97%同一な、より好ましくは少なくとも約98%同一な、より好ましくは少なくとも約99%同一な（または1パーセント刻みでの、60%~99%の間の任意のパーセンテージ）、アミノ酸配列を有する。相同体は、好ましくは、その由来であるか関連性のあるタンパク質またはドメインの生物活性を有する（すなわち、参照アミノ酸配列を有するタンパク質またはドメイン）。ACoAS相同体に関しては、相同体は、好ましくはACoAS酵素活性を有し、より具体的には、長鎖PUFA遊離脂肪酸（FFA）のアシル-CoAへの変換を触媒する能力を有する。本明細書に記載した他のアクセサリタンパク質に関しては、そのようなタンパク質は、例えば、PLまたはTAGの生成においてPUFA-CoAを基質として利用する生物活性を有する。

10

## 【0320】

本明細書で用いる場合、別に指定する場合を除き、一致度（%）に対する言及は、以下のものを用いて行われる相同性の評価のことを指す：（1）アミノ酸検索についてはblast p、核酸検索についてはblastn、ならびにすべての6個のオープンリーディングフレームにおける核酸検索および翻訳されるアミノ酸の検索についてはblastXをすべて標準デフォルトパラメーターで用いる、BLAST 2.0 Basic BLAST相同性検索、ここでクエリー配列はデフォルトにより低複雑度領域に関してフィルタリングされる（Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaaffer, A.A., Thang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D.J. (1997) "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." Nucleic Acids Res. 25:3389に記載されており、これは参照によりその全体が本明細書に組み入れられる）；（2）BLAST 2アラインメント（下記のパラメーターを用いる）；および/または（3）標準デフォルトパラメーターを用いるPSI-BLAST（位置特異的反復BLAST）。BLAST 2.0 Basic BLASTとBLAST 2の間での標準パラメーターにおけるいくつかの相違のせいで、2つの特定の配列がBLAST 2プログラムを用いて有意な相同性をもつとして認識されたとしても、クエリー配列としてその配列のうちの1つを用いるBLAST 2.0 Basic BLASTにおいて行われた検索では第2の配列を上位マッチにて同定しない場合があることを指摘しておく。さらに、PSI-BLASTは「プロファイル」検索の自動化した使いやすいバージョンを提供しており、配列相同体を探索するための高感度な方法である。このプログラムは、まず、ギャップド（gapped）BLASTデータベース検索を行う。PSI-BLASTプログラムは、位置特異的スコア行列を構成するために戻されたいずれの有意なアラインメントからの情報も使用し、データベース検索の次のラウンドのためにそのクエリー配列を取り替える。このように、これらのプログラムのいずれか1つを使用することによって一致度が決定されうことは理解されるべきである。

20

30

40

## 【0321】

2つの特定の配列は、Tatusova and Madden, "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", FEMS Microbiol Lett. 174:247 (1999)に記載されているように、BLAST 2を用いて互いに整列化することができ、これは参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。BLAST 2配列アラインメントは、その結果生じるアラインメントにギャップの導入（欠失および挿入）を許してその2つの配列間でギャップドBLAST検索（BLAST 2.0）を行うBLAST 2.0アルゴリズムを用いるblastpまたはblastnにおいて行われる。本明細書での明確さを目的として、BLAST 2配列アラインメントは、以下の標準デフォルトパラメーターを用いて行われる。

0 BLOSUM62行列を用いる、blastnに関して：

50

マッチについての報酬 = 1

ミスマッチについてのペナルティ = -2

オープンギャップ (5) および伸長ギャップ (2) ペナルティ

ギャップ $\times$ ドロップオフ (50) 期待 (10) ワードサイズ (11) フィルター (オン)

0 BLOSUM62行列を用いる、blastpに関して:

オープンギャップ (11) および伸長ギャップ (1) ペナルティ

ギャップ $\times$ ドロップオフ (50) 期待 (10) ワードサイズ (3) フィルター (オン)。

#### 【 0 3 2 2 】

本発明の1つの態様において、本発明の単離されたタンパク質またはドメインは、米国特許6,566,583号; Metz et al., Science 293:290-293 (2001); 米国特許出願公開第20020194641号; 米国特許出願公開第20040235127号; 米国特許出願公開第20050100995; および2005年6月10日に提出された米国仮出願第60/689,167号のいずれかに記載されたアミノ酸配列のいずれか、またはそれらの任意の生物活性断片もしくはドメインを含む、またはそれらから本質的になる、またはそれらからなる。これらのタンパク質はPUFA PKS系のタンパク質であり、本明細書に記載したアクセサリタンパク質のいずれかとともに用いることができる。

#### 【 0 3 2 3 】

本発明のもう1つの態様において、本明細書に記載したタンパク質 (例えば、ACoASタンパク質) の生物活性を有するアミノ酸配列には、本明細書に具体的に記載した天然のタンパク質またはポリペプチドと十分に類似するアミノ酸配列であって、天然のタンパク質またはポリペプチドをコードする核酸分子に対して (すなわち、それと) (すなわち、天然のタンパク質またはポリペプチドをコードする核酸鎖の相補物に対して)、中程度、高度または非常に高度なストリンジェンシー条件下でハイブリダイズしうるアミノ酸配列をコードする核酸配列が含まれる。好ましくは、本発明に記載したタンパク質の生物活性を有するアミノ酸配列は、本明細書に記載したアミノ酸配列のいずれかをコードする核酸配列の相補物に対して、中程度、高度または非常に高度なストリンジェンシー条件下でハイブリダイズする核酸配列によってコードされる。相補配列を推定するための方法は当業者に公知である。アミノ酸のシークエンシングおよび核酸配列のシークエンシングの技術は全くエラーがないわけではないため、本明細書に提示した配列は、最善であっても、本発明に含まれるタンパク質の見かけ上の配列を表していることに留意すべきである。

#### 【 0 3 2 4 】

本明細書で用いる場合、ハイブリダイゼーション条件とは、類似した核酸分子を同定するために核酸分子が用いられる標準的なハイブリダイゼーション条件のことを指す。そのような標準的な条件は、例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Labs Press (1989)に開示されている。Sambrookら、同上は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる (特にページ9.31-9.62を参照されたい)。さらに、ヌクレオチドのミスマッチの程度を変えることを可能にするハイブリダイゼーションを達成するための適切なハイブリダイゼーションおよび洗浄の条件を計算する式が、例えば、Meinkoth et al., Anal. Biochem. 138, 267 (1984)に開示されている; Meinkothら、同上は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

#### 【 0 3 2 5 】

より詳細には、中程度のストリンジェンシーのハイブリダイゼーションおよび洗浄の条件とは、本明細書で言及する場合、そのハイブリダイゼーション反応において探索のために用いられる核酸分子と少なくとも約70%の核酸配列同一性を有する核酸分子の単離を可能にする条件 (すなわち、ヌクレオチドの約30%またはそれ未満のミスマッチを許容する条件) のことを指す。高度なストリンジェンシーのハイブリダイゼーションおよび洗浄の条件とは、本明細書で言及する場合、そのハイブリダイゼーション反応において探索のために用いられる核酸分子と少なくとも約80%の核酸配列同一性を有する核酸分子の単離を可能にする条件 (すなわち、ヌクレオチドの約20%またはそれ未満のミスマッチを許容する条件) のことを指す。非常に高度なストリンジェンシーのハイブリダイゼーションおよ

び洗浄の条件とは、本明細書で言及する場合、そのハイブリダイゼーション反応において探索のために用いられる核酸分子と少なくとも約90%の核酸配列同一性を有する核酸分子の単離を可能にする条件（すなわち、ヌクレオチドの約10%またはそれ未満のミスマッチを許容する条件）のことを指す。以上に考察したように、当業者は、これらのヌクレオチドミスマッチの特定のレベルを達成するための適切なハイブリダイゼーションおよび洗浄の条件を計算するために、Meinkothら、同上における式を使用することができる。そのような条件は、DNA:RNAまたはDNA:DNAのハイブリッドのいずれが形成されるかに応じて異なると考えられる。DNA:DNAハイブリッドに関して計算される融解温度は、DNA:RNAハイブリッドに関してよりも10℃低い。個々の態様において、DNA:DNAハイブリッドに関するストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、6X SSC (0.9 M Na<sup>+</sup>) のイオン強度で、約20℃～約35℃の間の温度（低度のストリンジェンシー）、より好ましくは約28℃～約40℃の間の温度（よりストリンジェント）、さらにより好ましくは約35℃～約45℃の間の温度（さらによりストリンジェント）でのハイブリダイゼーションを、適切な洗浄条件とともに含む。個々の態様において、DNA:RNAハイブリッドに関するストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、6X SSC (0.9 M Na<sup>+</sup>) のイオン強度で、約30℃～約45℃の間の温度、より好ましくは約38℃～約50℃の間の温度、さらにより好ましくは約45℃～約55℃の間の温度でのハイブリダイゼーションを、同様にストリンジェントな洗浄条件とともに含む。これらの値は、約100ヌクレオチドよりも大きい分子、0%ホルムアミドおよび約40%のG+C含有量についての融解温度の計算に基づいている。または、T<sub>m</sub>を、Sambrookら、前記、ページ9.31～9.62に示されているように経験的に計算することもできる。一般に、洗浄条件は可能な限りストリンジェントであるべきであり、選択されたハイブリダイゼーション条件に対して適切であるべきである。例えば、ハイブリダイゼーション条件は、特定のハイブリッドの算出T<sub>m</sub>よりも約20℃～約25℃低い、塩および温度条件の組み合わせを含むことができ、洗浄条件は典型的には、その特定のハイブリッドの算出T<sub>m</sub>よりも約12℃～約20℃低い、塩および温度条件の組み合わせを含む。DNA:DNAハイブリッドでの使用に適するハイブリダイゼーション条件の1つの例は、約42℃で6X SSC (50%ホルムアミド) 中での2時間～24時間のハイブリダイゼーション、続いて室温で約2X SSC中での1回またはそれ以上の洗浄を含む洗浄段階、続いてより高い温度およびより低いイオン強度での追加の洗浄（例えば、約37℃で約0.1X～0.5X SSC中での少なくとも1回の洗浄、続いて約68℃で約0.1X～0.5X SSC中での少なくとも1回の洗浄）を含む。

#### 【0326】

本発明のもう1つの態様は、1つまたは複数の融合セグメントと結合された本明細書に記載した任意のタンパク質またはその任意の相同体もしくは断片を含む、融合タンパク質を含む。本発明で用いるのに適した融合セグメントには、以下を行いうるセグメントが非限定的に含まれる：タンパク質の安定性を高める；他の望ましい生物活性を提供する；および/または、タンパク質の精製を補助する（例えば、アフィニティークロマトグラフィーにより）。適した融合セグメントは、所望の機能を有する（例えば、安定性、溶解性、生物活性の増大を付与する；および/または、タンパク質の精製を平易にする）任意のサイズのドメインでありうる。融合セグメントはタンパク質のアミノおよび/またはカルボキシル末端に連結させることができ、所望のタンパク質の直接的な回収を可能とするために切断を受けやすくすることができる。融合タンパク質は、以上に考察したように本発明のタンパク質のカルボキシルおよび/またはアミノ末端のいずれかと結合された融合セグメントを含むタンパク質をコードする融合核酸分子がトランスフェクトされた、組換え細胞の培養によって産生されることが好ましい。

#### 【0327】

本発明の1つの態様において、本発明に記載したアミノ酸配列、ならびにそのような配列の相同体のいずれかを、その所定のアミノ酸配列のC末端および/またはN末端のそれぞれに隣接する、少なくとも1個から最大で約20個までの追加的な異種アミノ酸を伴って作製することができる。その結果生じたタンパク質またはポリペプチドは、所定のアミノ酸配列「から本質的になる」と称することができる。本発明によれば、異種アミノ酸とは、

所定のアミノ酸配列に隣接することが自然下では見いだされない（すなわち、インビボで天然には見いだされない）、または、所定のアミノ酸配列をコードする天然の核酸配列に隣接するヌクレオチドが遺伝子に存在する場合に、仮に天然の配列中のそのようなヌクレオチドが所定のアミノ酸配列の由来である生物に関する標準的なコドン用法を用いて翻訳されたとして、それによつてはコードされないと考えられる、アミノ酸の配列のことである。同様に、「から本質的になる」という語句は、本明細書で核酸配列に言及して用いられる場合、所定のアミノ酸配列をコードする核酸配列の5'末端および/または3'末端のそれぞれに少なくとも1個から最大で約60個までの追加的な異種ヌクレオチドが隣接しうる、所定のアミノ酸配列をコードする核酸配列のことを指す。異種ヌクレオチドは、それが天然の遺伝子に存在する場合に、所定のアミノ酸配列をコードする核酸配列に隣接することが自然下では見いだされない（すなわち、インビボで天然には見いだされない）。

10

**【0328】**

本発明のタンパク質またはドメイン、および/またはその相同体もしくは断片の最小サイズは、1つの局面において、必要な生物活性を有するのに十分な、または抗体の産生のための抗原として、もしくはインビトロアッセイにおける標的として機能を果たするのに十分なサイズである。1つの態様において、本発明のタンパク質は、長さが少なくとも約8アミノ酸（例えば、抗体エピトープ用に、またはアッセイにおいて検出可能なペプチドとして適する）、または長さが少なくとも約25アミノ酸、または長さが少なくとも約50アミノ酸、または長さが少なくとも約100アミノ酸、または長さが少なくとも約150アミノ酸、または長さが少なくとも約200アミノ酸、または長さが少なくとも約250アミノ酸、または長さが少なくとも約300アミノ酸、または長さが少なくとも約350アミノ酸、または長さが少なくとも約400アミノ酸、または長さが少なくとも約450アミノ酸、または長さが少なくとも約500アミノ酸などであり、完全な整数（例えば、8、9、10、...25、26、...500、501、...）である、8アミノ酸から最大で本発明のタンパク質またはドメインの全長までの間の任意の長さまたはそれ以上の長さである。そのようなタンパク質の最大サイズに関しては、タンパク質がタンパク質の一部分、ドメイン、またはその生物活性断片もしくは有用な断片、または完全長のタンパク質またはドメイン、その上、必要に応じて、さらなる配列（例えば、融合タンパク質配列）を含みうるという点で、実用的な限界以外には制限はない。

20

**【0329】**

本発明のもう1つの態様は、本明細書に記載したタンパク質のいずれかの相同体または断片を含め、そのようなタンパク質のいずれかをコードする核酸配列、ならびにそれらに対して完全に相補的である核酸配列を含む、それらから本質的になる、またはそれらからなる、単離された核酸分子に関する。本発明によれば、単離された核酸分子とは、その天然の環境から取り出された（すなわち、人為的な操作を受けた）核酸分子のことであり、その天然の環境はその核酸分子が自然下で見いだされるゲノムまたは染色体である。このため、「単離された」とは、核酸分子が精製される程度を必ずしも反映するとは限らず、その核酸分子が自然下で見いだされるゲノム全体または染色体全体をその分子が含まないことを示している。単離された核酸分子は遺伝子を含みうる。遺伝子を含む単離された核酸分子は、そのような遺伝子を含む染色体の断片ではなく、むしろ、その遺伝子に関連するコード領域および制御領域を含むが、核酸分子がコアPUFA PKSをコードする場合、本明細書に記載したPUFA PKS系の他のタンパク質をコードする他の遺伝子を除き、同じ染色体上に天然に見いだされる追加的な遺伝子を含まない。単離された核酸分子はまた、自然下ではその特定の核酸配列に通常は隣接していない追加的な核酸（すなわち、異種配列）に隣接されている（すなわち、その配列の5'末端および/または3'末端で）特定の核酸配列も含みうる。単離された核酸分子には、DNA、RNA（例えば、mRNA）、またはDNAもしくはRNAのいずれかの誘導體（例えば、cDNA）が含まれうる。「核酸分子」という語句は主として物質的な核酸分子のことを指し、「核酸配列」という語句は主として核酸分子上のヌクレオチドの配列のことを指すが、この2つの語句は、タンパク質またはタンパク質のドメインをコードする能力がある核酸分子または核酸配列については特に、互換的に用いるこ

30

40

50

とができる。

【0330】

好ましくは、本発明の単離された核酸分子は、組換えDNA技術（例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）増幅、クローニング）または化学的合成を用いて生産される。単離された核酸分子には、天然の核酸分子、ならびに天然の対立遺伝子変異体、および改変が所望の効果（例えば、タンパク質の活性を保つ、改善する、または低下させる）を与えるような様式でヌクレオチドが挿入、欠失、置換および／または反転されている改変された核酸分子を非限定的に含む、その相同体が含まれる。タンパク質の相同体（例えば、核酸相同体によってコードされるタンパク質）は、以上で詳細に考察されている。

【0331】

核酸分子相同体は、当業者に公知のいくつかの方法を用いて作製することができる（例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Labs Press, (1989)を参照）。例えば、核酸分子は、部位指定突然変異誘発、突然変異を誘導するための核酸分子の化学処理、核酸断片の制限酵素切断、核酸断片の連結、核酸配列の選択された領域のPCR増幅および／または突然変異誘発、オリゴヌクレオチド混合物の合成、および核酸分子の混合物を「構築する」ための混合群の連結、ならびにそれらの組み合わせといった、古典的な突然変異誘発法および組換えDNA手法を非限定的に含む、さまざまな技術を用いて改変することができる。核酸分子相同体は、核酸によってコードされるタンパク質の機能のスクリーニングによって、および／または野生型遺伝子とのハイブリダイゼーションによって、改変された核酸の混合物から選択することができる。

【0332】

本発明の核酸分子の最小サイズは、本発明の核酸分子の相補配列と（例えば、中程度、高度または非常に高度なストリンジェンシー条件下で）安定的なハイブリッドを形成するプローブもしくはオリゴヌクレオチドプライマーを形成するのに十分なサイズである、または本発明によるタンパク質の生物活性を有するアミノ酸配列をコードするのに十分なサイズのものである。このため、そのようなタンパク質をコードする核酸分子のサイズは、核酸組成および核酸分子と相補配列との間の相同度または一致度（percent homology or identity）、ならびにハイブリダイゼーション条件それ自体（例えば、温度、塩濃度およびホルムアミド濃度）に依存する。オリゴヌクレオチドプライマーまたはプローブとして用いられる核酸分子の最小サイズは、典型的には、核酸分子がGCリッチである場合には少なくとも約12～約15ヌクレオチドの長さであり、それらがATリッチである場合には少なくとも約15～約18塩基の長さである。本発明の核酸分子の最大サイズに関しては、核酸分子が、タンパク質の生物活性断片または完全長タンパク質をコードするのに十分な配列を含みうるという点で、実用的な限界以外には制限はない。

【0333】

本発明のもう1つの態様は、組換えベクター、および本明細書に記載したタンパク質のいずれかの生物活性を有するタンパク質またはペプチドをコードする核酸配列を含む、組換え核酸分子を含む。そのような核酸配列は以上に詳細に記載されている。本発明によれば、組換えベクターは、選択した核酸配列を操作するため、およびそのような核酸配列を宿主細胞に導入するためのツールとして用いられる、操作された（すなわち、人工的に作製された）核酸分子である。組換えベクターはこのため、組換え細胞を形成させるために選択した核酸配列を発現させること、および／または宿主細胞に送達することなどによって、選択した核酸配列のクローニング、シーおよび／または別の方法による操作に用いるのに適している。そのようなベクターは、典型的には、クローニングまたは送達しようとする核酸配列に隣接することが天然には見いだされない核酸配列である異種核酸配列を含むが、ベクターはまた、本発明の核酸分子に隣接して天然に見いだされる、または本発明のその核酸分子の発現のために有用である調節性核酸配列（例えば、プロモーター、非翻訳領域）も含みうる（以下で詳細に考察する）。ベクターは、RNAまたはDNAのいずれ、原核生物性または真核生物性のいずれであってもよく、典型的にはプラスミドである。ベクターは、染色体外要素（例えば、プラスミド）として維持されうる、またはそれは組換え

生物（例えば、微生物または植物）の染色体に組み込まれうる。ベクター全体が宿主細胞内のしかるべき所に留まることもでき、または、ある特定の条件下では、プラスミドDNAが除去されて本発明の核酸分子が残るようにすることもできる。組み込まれた核酸分子は、染色体のプロモーター制御下、ネイティブ性もしくはプラスミド性のプロモーター制御下、または複数のプロモーターの組み合わせの制御下におかれうる。核酸分子の単一または複数のコピーを染色体に組み込むことができる。本発明の組換えベクターは少なくとも1つの選択マーカーを含みうる。

#### 【0334】

1つの態様において、本発明の組換え核酸分子において用いられる組換えベクターは、発現ベクターである。本明細書で用いる場合、「発現ベクター」という語句は、コードされる産物（例えば、関心対象のタンパク質）の産生のために適したベクターを指して用いられる。この態様において、産生させようとする産物（例えば、PUFA PKSドメインまたはタンパク質）をコードする核酸配列は、組換え核酸分子を産生するための組換えベクターに挿入される。産生させようとするタンパク質をコードする核酸配列は、その核酸配列を、組換え宿主細胞内での核酸配列の転写および翻訳を可能にするベクター中の制御配列と機能的に連結させる様式で、ベクターに挿入される。

10

#### 【0335】

もう1つの態様において、本発明の組換え核酸分子において用いられる組換えベクターは、ターゲティングベクターである。本明細書で用いる場合、「ターゲティングベクター」という語句は、特定の核酸分子を組換え宿主細胞に送達するために用いられるベクターを指して用いられ、ここで核酸分子は、宿主細胞または微生物内で内因性遺伝子または遺伝子の一部分を欠失させる、不活性化させる、または置換するために用いられる（すなわち、標的化された遺伝子破壊またはロックアウト技術のために用いられる）。そのようなベクターは、「ロックアウト」ベクターとしても当該技術分野で公知であると思われる。この態様の1つの局面において、ベクターの一部分、しかしより典型的にはベクターに挿入された核酸分子（すなわち、インサート）は、宿主細胞における標的遺伝子（すなわち、欠失または不活性化させるためにターゲティングを受ける遺伝子）の核酸配列と相同性を示す核酸配列を有する。ベクターインサートの核酸配列は、標的遺伝子と会合して標的遺伝子およびインサートが相同組換えを行い、それによって、内因性標的遺伝子が欠失、不活性化、減弱化（すなわち、内因性標的遺伝子の少なくとも一部分が突然変異または欠失することにより）または置換されるように設計されている。内因性シゾキトリウム属遺伝子を、例えば組換え遺伝子と置換させるためのこの種の組換えベクターの使用は、本発明者らによって以前に記載されており、ヤブレッツボカビ科生物の遺伝的形質転換のための一般的な技術は、2003年9月4日に公開された米国特許出願公開第20030166207号として公開済みの、米国特許出願第10/124,807号に詳細に記載されている。植物に対する遺伝的形質転換技術は当該技術分野で周知である。

20

30

#### 【0336】

典型的には、組換え核酸分子は、1つまたは複数の発現制御配列に機能的に連結された本発明の少なくとも1つの核酸分子を含む。本明細書で用いる場合、「組換え分子」または「組換え核酸分子」という語句は主として、発現制御配列に機能的に連結された核酸分子または核酸配列を指すが、そのような核酸分子が本明細書で考察した組換え分子である場合には、「核酸分子」という語句と互換的に用いることができる。本発明によれば、「機能的に連結された」という語句は、分子が宿主細胞にトランスフェクトされた（すなわち、形質転換された、形質導入された、トランスフェクトされた、結合された、または導かれた）場合に発現されうるような様式で、核酸分子を発現制御配列（例えば、転写制御配列および/または翻訳制御配列）に連結することを指す。転写制御配列は、転写の開始、伸長または終結を制御する配列である。特に重要な転写制御配列は、プロモーター、エンハンサー、オペレーターおよびリプレッサー配列のように転写開始を制御するものである。適した転写制御配列は、組換え核酸分子が導入される宿主細胞または生物において機能しうる任意の転写制御配列を含む。

40

50

## 【0337】

本発明の組換え核酸分子はまた、翻訳調節配列、複製起点といったさらなる制御配列、および組換え細胞と適合性のある他の制御配列も含みうる。1つの態様において、本発明の組換え分子は、宿主細胞染色体に組み込まれるものも含めて、発現されるタンパク質がそのタンパク質を産生する細胞から分泌されることを可能にする分泌シグナル（すなわち、シグナルセグメント核酸配列）も含む。適したシグナルセグメントは、発現されるタンパク質に天然に付随するシグナルセグメント、または本発明によるタンパク質の分泌を指令しうる任意の異種シグナルセグメントを含む。もう1つの態様において、本発明の組換え分子は、発現されるタンパク質が宿主細胞の膜に送達されて挿入されることを可能にするリーダー配列を含む。適したリーダー配列は、タンパク質に天然に付随するリーダー配列、または細胞膜へのタンパク質の送達および挿入を指令しうる任意の異種リーダー配列を含む。

10

## 【0338】

本発明の1つまたは複数の組換え分子を用いて、本発明のコードされる産物（例えば、A CoAS）を産生させることができる。1つの態様において、コードされる産物は、タンパク質を産生させるのに効果的な条件下で、本明細書に記載したような核酸分子を発現させることによって産生される。コードされるタンパク質を産生させるのに好ましい方法は、宿主細胞に1つまたは複数の組換え分子をトランスフェクトして、組換え細胞を形成させることによる。トランスフェクトするのに適した宿主細胞には、トランスフェクトされうる任意の細菌、真菌（例えば、酵母）、原生生物、微小藻類、藻類、昆虫、植物または動物の細胞が非限定的に含まれる。本発明の1つの態様において、好ましい宿主細胞は植物宿主細胞である。宿主細胞は、非トランスフェクト細胞または少なくとも1つの他の組換え核酸分子によってすでにトランスフェクトされた細胞のいずれかでありうる。

20

## 【0339】

本発明によれば、「トランスフェクション」という用語は、外因性核酸分子（すなわち、組換え核酸分子）を細胞に挿入しうる任意の方法を指して用いられる。「形質転換」という用語は、そのような用語が藻類、細菌および酵母などの微生物細胞への、または植物細胞への核酸分子の導入を指して用いられる場合、「トランスフェクション」という用語と互換的に用いることができる。微生物系および植物系では、「形質転換」という用語は、微生物または植物による外因性核酸の獲得に起因する遺伝性変化を記載するために用いられ、「トランスフェクション」という用語と本質的に同義である。しかし、動物細胞では、形質転換はもう1つの意味を獲得しており、それは例えば、癌化した後の培養下の細胞の増殖特性の変化を指すことができる。このため、混乱を避けるために、「トランスフェクション」という用語は、動物細胞への外因性核酸の導入に関して用いられることが好ましく、「トランスフェクション」という用語は、この用語が細胞への外因性核酸の導入に関係する限りにおいて、動物細胞のトランスフェクション、および微生物細胞または植物細胞の形質転換を全般的に含むように本明細書において用いられるものとする。したがって、トランスフェクションの手法には、形質転換、粒子射入、拡散、能動輸送、槽内超音波処理（bath sonication）、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、リポフェクション、吸着、感染およびプロトプラスト融合が非限定的に含まれる。

30

40

## 【0340】

当業者は、組換えDNA技術の使用が、例えば、宿主細胞内の核酸分子のコピー数、そのような核酸分子が転写される効率、その結果として生じる転写物が翻訳される効率、および翻訳後の改変の効率を操作することによって、トランスフェクトされた核酸分子の発現の制御を改善しうることを理解すると考えられる。さらに、ネイティブ性のプロモーターに比べて発現レベルを向上させるために、プロモーター配列を遺伝的に操作することも考えられる。核酸分子の発現を制御するために有用な組換え手法には、1つまたは複数の宿主細胞染色体への核酸分子の組み込み、プラスミドへのベクター安定性配列の付加、転写制御シグナル（例えば、プロモーター、オペレーター、エンハンサー）の置換または改変、翻訳制御シグナル（例えば、リボソーム結合部位、シャイン-ダルガノ配列）の置換ま

50



たは改変、宿主細胞のコドン用法に対応させるための核酸分子の改変、および転写物を不安定化する配列の除去が非限定的に含まれる。

【0341】

生物活性分子を作製するために有用な多くの遺伝的改変は、本開示を考慮すれば、当業者には明らかであると考えられ、さまざまな他の改変が本明細書において以前に考察されている。本発明は、所望の生物活性分子の産生をもたらす、本明細書に記載したPUFA PKS系に関連する任意の遺伝的改変を想定している。

【0342】

本発明による生物活性分子には、生物活性を有し、かつPUFA PKS系によって生成される任意の分子（化合物、産物など）が含まれる。そのような生物活性分子には、多価不飽和脂肪酸（PUFA）、化学療法薬、活性添加剤、骨粗鬆症治療薬、抗鬱薬、抗痙攣薬、抗ヘリコバクター-ピロリ薬、神経変性疾患の治療薬、変性肝疾患の治療薬、抗生物質、およびコレステロール低下製剤が非限定的に含まれる。本発明のPUFA PKS系の1つの利点は、シス配置にある炭素-炭素二重結合を導入し、分子が3炭素毎に二重結合を含んでいる、そのような系の能力である。この能力を利用して、種々の化合物を産生させることができる。

10

【0343】

本明細書で参照したそれぞれの刊行物、特許または特許出願は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0344】

20

以下の例は、例証のために提供されており、本発明の範囲を限定することは意図していない。

【0345】

実施例

実施例に対する一般的序論．PUFAシンターゼをコードする遺伝子が、海洋細菌およびヤブレッツボカビ科生物の種において同定された。これらの遺伝子セットのいくつかは大腸菌において発現されており、適切なPPTアーゼを供給した場合には、そのような酵素のPUFA生成物がそれらの細胞内に蓄積しうる。しかし、本発明者らが知る限りでは、これらの酵素からのPUFAの放出の方法は以前に記載されていない。放出機構は、異種宿主生物におけるPUFAシンターゼ系の発現に関して意味がある。それはまた、その系を通じての炭素の流れ、および異種またはネイティブ性の宿主生物に蓄積するPUFAの最終的な量を調節することを目的とする取り組みに対する指示も与えることができる。ここで本発明者らは、シゾキトリウム属PUFAシンターゼ（および、理論に拘束されるわけではないが、可能性としては、すべてのヤブレッツボカビ科PUFA PKS系を含む、すべての真核生物PUFAシンターゼ系）の生成物が、遊離脂肪酸であること、および遊離脂肪酸の放出が酵素複合体それ自体と不可分であることを示す。さらに、シゾキトリウム属において、PUFA FFAは、リン脂質（PL）およびトリアシルグリセロール（TAG）に組み込まれる前に、エステル化されてCoAとなる。下記の実施例に記載したデータは、異種宿主生物における発現のため、ならびにネイティブ性の宿主生物におけるPUFA蓄積の改変のための戦略を示している。

30

【0346】

40

実施例1

本実施例は、生化学的検討のためのシゾキトリウム属FASノックアウト株の作出を説明している。

【0347】

シゾキトリウム属は、短鎖飽和脂肪酸の産生の原因となるFAS酵素をコードする単一の比較的大きな遺伝子を含む（米国特許出願公開第20050191679 A1に記載）。シゾキトリウム属FASノックアウト（FASKO）構築物を、米国特許第7,001,772号に記載された手順に従って作製した。FAS Orfの大部分を含むゲノムDNAのほぼ10.0kBのEcoRV断片（推定されるATG開始コドンの約728bp下流から終止コドンの約680bp下流まで）を、Stratagene bluescriptベクター（pBSK）中の、マルチクローニング領域のEcoRV部位にクローニングした。ク

50

ローニングしたシゾキトリウム属DNAから、ほぼ3.5kBの内部BglIII断片を除去し、Zeocin耐性カセットを含むpTubZeo11-2からのほぼ1.1kBのBamHI断片で置換した（米国特許第7,001,772号、前記を参照）。このプラスミド（pJK878）を、粒子射入により、シゾキトリウム属の細胞壁欠損株（Ac66と表記）に導入した。Zeocinを含み、パルミチン酸を追加した培地上へのプレートイングによって形質転換株をまず選択した。パルミチン酸を追加していないプレート上での増殖不能性に関する二次選択を利用して、FASゲノム領域の一部分がZeocin耐性カセットによって置き換えられたダブルクロスオーバーイベントの可能性のあるものを同定した。PCRおよびサザンブロット分析を用いて、形質転換株の1つ（FAS-K0と表記）が、期待されるゲノム構造を有することを確認した。この株を、500uMパルミチン酸を追加した培地中で増殖させることによって維持した。同様の戦略、すなわち、シゾキトリウム属PUFAシンターゼのサブユニットをコードする遺伝子の1つへのZeocin耐性カセットの挿入を、シゾキトリウム属Ac66株においてその酵素を不活性化させるために用いた。この場合には、培地に500uM DHAを追加する。これらの株の全細胞および無細胞抽出物を、以後の生化学的検討に用いた（下記の実施例を参照）。

【0348】

#### 実施例2

下記の実施例は、シゾキトリウム属Ac66、ならびにシゾキトリウム属Ac66に由来するPUFAシンターゼK0株およびFAS-K0株の無細胞抽出物の調製のための一般的なプロトコルを説明している。

【0349】

シゾキトリウム属の細胞壁欠損株からの無細胞ホモジネート（CFH）の調製のためのプロトコルの一例は以下の通りである。細胞をA50-3培地中で増殖させ、続いてM2B培地中に希釈した。K0株を増殖させるために用いた培地には適切な脂肪酸を追加した。細胞をM2B培地中でOD600nmがほぼ2.5超かつほぼ5未満となるまで増殖させた。50mLの培地中の細胞を、50mLプラスチックチューブ中での遠心（卓上遠心機 ほぼ1200rpm×4分）によって収集した。上清をデカントし、細胞を5mLの緩衝液A（100mMリン酸pH 7.2、10%（w/v）グリセロール、1mM EDTAおよび2mM DTT）中に再懸濁させて、前と同じく遠心した。上清を廃棄し、細胞を氷冷した5mLの緩衝液A中に再懸濁させた。この懸濁液を、氷上でチューブを用いて1.5分間にわたり超音波処理した（マイクロチップ付きUltrasonic Processor Model GE130、Pulserは2秒、電力設定ほぼ1ワット）。細胞がすべて破壊されたことを確かめるために試料を顕微鏡で検査した。CFHをキャップ付きの0.5mLのPCRチューブに200uLの部分ずつ分注し、液体N<sub>2</sub>中に沈めることによって凍結させた。試料は必要になるまで-74で保存した。

【0350】

#### 実施例3

本実施例は、インビトロでのFASおよびPUFAシンターゼの活性アッセイに関する一般的な条件を説明している。

【0351】

FAS活性およびPUFAシンターゼ活性の両方についてのインビトロ活性アッセイに関するプロトコルの一例は以下の通りである。最終容積100uL中に、混合酵素調製物および緩衝液A（これらの2つの成分の容積 = 90uL） + 以下の成分を混液（10uL中）として添加して、括弧内に示した最終濃度を得た：マロニル-CoA（50uM 非放射性およびマロニル-2-<sup>14</sup>C-CoAの混合物、放射性標識の最終濃度は0.65  $\mu$ Ci/mLである）、NADH（1mM）、NADPH（1mM）およびアセチル-CoA（10uM）。これらの成分および追加成分は個々の実験の要求条件に応じて調整しうる。アッセイ反応は室温（21℃）の水浴中にてガラス製チューブ内で行う。インキュベーション時間は実験の要求条件に依存する。反応は、作業プロトコルに応じて2つの方法の一方によって停止させる。酸性法を用いる脂肪酸の脂肪酸メチルエステル（FAME）への変換に関しては、FAME試薬を添加することによって反応を停止させる（以下参照）。誘導体化を伴わない脂質の抽出に関しては、125uLのイソプロパノール：酢酸（4：1 v/v）の添加によって反応を停止させる（以下参照）。

## 【0352】

酸性FAMEプロトコール：メタノール + 50 $\mu$ Lトルエン中の4% HCl 2.0mLを添加することによって反応を停止させ、ガラス製チューブをテフロンライン付きキャップで密閉して、100℃で1時間加熱する。室温に冷却し、1.0mLのヘキサンおよび0.5mLの水を添加し、ボルテックス処理した後に放置して分離させる。所望であれば、液体シンチレーション計数法（LSC）のために一部分を取り出す。ほぼ600 $\mu$ Lの有機相を新たなチューブに移し、N<sub>2</sub>中で溶媒を除去する。残留物を50 $\mu$ Lのヘキサン中に溶解させ、シリカゲル60 A TLCプレート（ヘキサン：ジエチルエーテル：酢酸70：30：2で展開）、または10% AgNO<sub>3</sub> / 90% アセトニトリル（使用前に100℃で30分間活性化）中に浸漬させたシリカゲルGプレート（w/ヘキサン：ジエチルエーテル / 酢酸70：20：2で展開）のいずれかに対して滴下する。プレートを風乾させ、ホスフォイメージング技術を用いて放射性領域を検出する。

10

## 【0353】

HIPプロトコール 誘導体化されなかった脂質の抽出：以上に示したように、125 $\mu$ Lのイソプロパノール：酢酸（4：1 v/v）を添加することによって反応を停止させ、続いて2mLのヘキサン：イソプロパノール（3：2、v/v）を添加し、ボルテックス処理の後に1mLの6.7%（w/v）硫酸ナトリウムを添加して再びボルテックス処理する。放置して相を分離させる。所望であれば、LSCのために有機（上方の）相の一部分を取り出し、続いて残り（ほぼ1.0mL）を新たなチューブに移す。N<sub>2</sub>ガスで溶媒を除去し、残留物を50 $\mu$ Lのヘキサン中に溶解させる。シリカゲル60 A TLCプレートに試料を滴下して、ヘキサン：ジエチルエーテル：酢酸（70：30：2）で展開する。プレートを風乾させ、ホスフォイメージング技術を用いて放射性領域を検出する。

20

## 【0354】

## 実施例4

下記の実施例は、FAS活性およびPUFAシンターゼ活性に関するインビトロアッセイの結果を説明している。

## 【0355】

シゾキトリウム属Ac66ならびにシゾキトリウム属Ac66に由来するPUFAシンターゼKO株およびFAS-KO株のCFHを調製し、酸性FAMEおよび銀TLCプロトコールを用いて、上記の通りにFAS活性およびPUFAシンターゼ活性に関してアッセイした。図1はそれらのアッセイの結果を示している。TLCプレートの画像上に印が表示されたバンドは、FAMEに取り込まれた放射能を表している（標準物質との共移動ならびにHPLC分離によって実証された）。レーン1および2は、Ac66親株からの抽出物を用いて得られたプロファイルを示している。FAS（14:0および16:0 FAME）およびPUFAシンターゼ（DHAおよびDPA n-6）の両方の生成物がこれらのレーンに観察される。PUFAシンターゼ酵素を不活性化させた場合に得られたプロファイルはレーン3および4に示されている。この場合には、DHAおよびDPA n-6 FAMEは存在しない。FASを不活性化させた場合に得られたプロファイルはレーン5および6に示されている。この場合には、FASに由来する脂肪酸、すなわち14:0および16:0ならびにそれらの脂肪酸の誘導体は見られない。このデータは、このFAS-KO株ではFAS活性が高度に、または完全に損なわれていることを示している。このFAS-KO株を、シゾキトリウム属のPUFA合成および蓄積経路のさらなる特徴づけのために用いた。

30

40

## 【0356】

## 実施例5

下記の実施例は、シゾキトリウム属におけるPUFA合成のさらなる特徴づけを説明しており、シゾキトリウム属PUFAシンターゼの初期生成物が遊離脂肪酸（FFA）であるという証拠を提供している。

## 【0357】

酸性法を用いるインビトロアッセイ反応生成物のFAMEへの変換は、マロニル-CoAから脂肪酸部分への放射能の取り込みを決定するには有用であるが、その誘導体化の前のそれらの脂肪酸の分子形態は示さない。図2は、上記のHIPプロトコール（すなわち、変換of脂肪酸族アシル部分のメチルエステルへの変換を伴わない）を用いて脂質を抽出し、続いて順相

50

TLCを用いて分離させた、FAS-KO株のインビトロアッセイの経時的推移の結果を示している。TAGおよび遊離脂肪酸(FFA)標準物質が移動したプレート上の位置が左に示されている。このTLCシステムでは、鎖の長さおよび不飽和度が異なるFFAは十分には分離されない。しかし、利用した株はFAS活性をほとんどまたは全く有しないため、この区域におけるFFAはPUFAシンターゼ系に由来する可能性が高い。このことを裏づけるさらなる証拠が図3に示されている。ここでは、インビトロアッセイ中のFFAバンドにおける放射性標識の出現がNADPHの添加に依存することが示されている。これとは対照的に、NADHは反応を支援しない。還元剤としてのNADPHに対するこの厳密な依存性は、シュワネラSCRC2738由来のPUFAシンターゼの特徴でもある(Metz et al., Science 293:290-293 (2001)の図2C)。図2および3の両方に、FFAバンドよりも幾分早く移動する放射性標識バンドが認められる(「不明」と表示)。このバンドの出現は還元剤の添加に依存しないため(NADHまたはNADPH レーン5、図3)、それはPUFAシンターゼ活性と関連しない可能性が高い。さらに、このバンドは、PUFAシンターゼを不活性化させた株の同様の分析でも検出可能であった(非提示データ)。図2および3におけるデータは、シゾキトリウム属PUFAシンターゼの初期生成物がFFAであることを示唆する。生成物をFFAとして放出するFAS系(哺乳動物FASなど)において、それらのFFAは続いて、PLまたはTAGに組み込まれる前にエステル化されてCoAとなる。FFAの活性化は、ATPおよび $Mg^{+2}$ を必要とする反応においてアシル-CoAシンターゼによって行われる。インビトロ反応の経時的推移における後期のTAG画分中でのある程度の放射能の出現は、シゾキトリウム属におけるそのような経路と合致すると考えられる(試料中の残留ATPのため)。この概念についてさらに検証した(以下参照)。

【0358】

#### 実施例6

下記の実施例は、シゾキトリウム属のPUFA蓄積経路におけるアシル-CoAシンターゼ反応の関与を裏づける証拠を提供している。

【0359】

シゾキトリウム属FAS-KOからの試料中のインビトロアッセイ産物に対するATP(2.5mM)および $Mg^{+2}$ (10mM)の添加の影響が図4に示されている。試料を標準的な反応混合物中に10分間インキュベートし、続いてATPおよび $Mg^{+2}$ を添加した。反応を、ATPおよび $Mg^{+2}$ の添加後のさまざまな時点(すなわち、0=添加せず、10秒および30秒、ならびに1分、3分、10分および30分)で停止させた。経時的推移の間に、FFAバンドに伴う放射性標識が減少し、TAGバンドに伴う放射性標識が増加することが見てとれる。「不明」と表示されたバンドに伴う放射性標識はATPの添加によって影響されなかった。これらのデータは、標識FFAのTAG画分への移動に対する、ATPを要する反応の関与と合致する。

【0360】

トリアシンCは、長鎖PUFAを活性化するアシル-CoAシンターゼの特異的阻害薬として特徴づけられている(Knoll et al., 1995)。FAS-KO試料のインビトロアッセイ中の産物プロファイルに対するトリアシンCの影響を調べた。試料を、さまざまな濃度のトリアシンC(0、25、100または200 $\mu$ M)を含む標準的な混液中で10分間インキュベートし、続いてATPおよび $Mg^{+2}$ を添加した。反応をさらに20分間進行させた後に停止させ、HPLCを用いて脂質を抽出してTLCにより分離した。その結果は図5に示されている。比較的高い濃度でのトリアシンCの添加は、FFAバンドからの放射性標識の損失をブロックした。これらの結果は、この経路におけるアシル-CoAシンターゼの関与と合致する。

【0361】

#### 実施例7

下記の実施例は、シゾキトリウム属Orf A、OrfBss(OrfB<sup>+</sup>)、OrfCおよびネンジュモ属HetIを発現する大腸菌からの抽出物のインビトロアッセイを説明している。

【0362】

上記の実施例に示されたデータは、シゾキトリウム属におけるPUFAが、TAGおよびPLに組み込まれる前に遊離脂肪酸の形態に変換されることを示している。PUFAの遊離脂肪酸としての放出を示すデータは、本明細書で提示するPUFAシンターゼ酵素の不可欠な部分であ

る。シゾキトリウム属のネイティブ性Orf A (SEQ ID NO: 1によって表される核酸配列)、OrfBss (OrfB\*とも表記される; SEQ ID NO: 37によって表される核酸配列) およびネイティブ性OrfC (SEQ ID NO: 5によって表される核酸配列) を、米国特許出願公開第20050100995、前記に記載された通りに、人工的なオペロンとしてpETベクター中にクローニングし、大腸菌において発現させた。HetIはpACYCをベースとするベクター中にクローニングして、同じそれらの細胞において発現させた。細胞をO.D. がほぼ1になるまで増殖させて、T7ポリメラーゼの産生を誘導するためにIPTGを添加した(最終濃度1mM)。誘導のおよそ4時間後に、細胞を収集し、緩衝液Aで洗浄して、フレンチプレス用セルに2回通すことによって破碎した。ホモジネートのアリコートを取り分け、残りを遠心(5k x g x 5分間)して上清1 (S1) を得た。再度アリコートを取り分け、材料の残りを100,000 x gで1時間遠心して、高速ペレット (P2) 画分および高速上清 (S2) 画分を得た。ペレット画分を緩衝液A中に再懸濁させて、遠心管に元々入っていた容積にした。これらの画分のすべてを、酸性FAME / 銀相TLC作業、または脂質のHIP抽出後の順相TLC上での分離を用いる、上記の一般的な方法を用いてアッセイした。図6はそれらのアッセイの結果を示している。

#### 【0363】

酸性FAME分析(図6A)は、インビトロアッセイの産物がDHAおよびDPA n-6であることを示している。最も活性が高い画分はホモジネートであり、S1およびP2画分では活性はるかに低かった。S2画分では極めて低い活性しか検出されなかった。CFH画分およびS1画分においてさえ、FAS系の生成物が極めてわずかし検出されなかったことは興味深い(図6A中に16:0と表示された矢印によって示されている)。これは、T7系を用いた場合のPUFAシンターゼ酵素成分の発現が高レベルであることに起因する可能性が高い。これに対して、シュワネラ属由来のEPAシンターゼをコードするコスミドを含む大腸菌からの抽出物(CFHおよびS1)に対して同様のアッセイを行った場合には、TLCプレート上の放射能の大半はFAS生成物に伴った(Metz et al., Science 293:290-293 (2001)、図2B)。また、内因性大腸菌FAS系はいくつかの個別の可溶性タンパク質から構成され、FAS活性は高速遠心後に上清画分に残る(Metz et al., Science 293:290-293 (2001)、図2B)。これに対して、図6Aに示されたPUFAシンターゼ活性は、高速遠心後にペレット画分に分配された。

#### 【0364】

図6Bにおけるデータは、TLCによる分離の前に、脂質生成物を(FAMESに変換するのではなく)HIPで単に抽出した点を除いて、図6Aで用いたのと同じ大腸菌株の試料のアッセイの結果を示している。CFH(図の左側)およびP2(右側)という2つの画分を用いた。アッセイに用いる抽出物の量は、2つのケースでおよそ同量の放射能が脂質中に取り込まれるように調整した。同じく示されているのは、アッセイ混液の還元剤成分(NADHおよび/またはNADPH)を以下のように変化させた場合の結果である: レーン1 NADPHのみ、レーン2 NADPHのみ、レーン3 NADHおよびNADPHの両方、ならびにレーン4 いずれかの成分を含む貯蔵溶液の代わりに水を添加した。図6Bにおけるデータは、TLCプレート上を移動する放射性標識の大部分が遊離脂肪酸の標準物質と共移動することを示している。また、主要(FFA)バンドの出現もアッセイ混液に対するNADPHの添加に依存する。NADPHに対する要求性、およびこれらの画分(特にP2画分)における著しいFAS活性の欠如は、FFAがPUFAシンターゼ酵素の生成物であることを示している。大腸菌のこの株では、シゾキトリウム属由来の3つの酵素(Orf A、BおよびCをコードする)のみを(HetIとともに)発現させたため、このデータはシンターゼからのPUFAの放出がその酵素に固有の特性であって、別のチオエステラーゼ酵素によるのではないことを示している。

#### 【0365】

その重要な局面を上記の実施例で提示してきたさまざまなデータは、シゾキトリウム属におけるPUFAの合成および蓄積の以下の特徴を示している。DPA n-6およびDHAの両方の原因となるPUFAシンターゼは、米国特許6,566,583号、Metz et al., Science 293:290-293 (2001)、米国特許出願公開第20020194641号およびPCT公開第WO 2006/135866号に記載されているように、Orf A、BおよびCによってコードされる。サブユニットAのACPドメインは内因性PPTアーゼによって活性化される。合成反応は、マロニル-CoAを炭素源として(ア

10

20

30

40

50

セチル-CoAが必要なことも必要でないこともある)、NADPHを還元剤として用いる。PUFA生成物はFFAとして酵素から放出され、この放出は酵素自体の固有の特徴である。これらのFFAは、1つまたは複数の内因性アシル-CoAシンターゼによって触媒されるATP依存的な反応でエステル化されてCoAとなる。続いてPUFA-CoAはPLおよびTAG合成酵素の基質としての役を果たす。

【0366】

#### 実施例8

下記の実施例は、パン酵母における、シゾキトリウム属PUFAシンターゼ(sOrf A、sOrf Bおよびネイティブ性OrfC、以下を参照)をコードする遺伝子の、HetIを伴っての発現を示している。

【0367】

シゾキトリウム属PUFAシンターゼ遺伝子およびHetIを、Invitrogenから入手した材料を用いて酵母において発現させた。サッカロミセス-セレピシエのINVsc1株を、以下の形質転換ベクターとともに用いた:pYESLeu(sOrfA、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:2をコードする)、pYES3/CT(sOrfB、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:4をコードする)、pYES2/CT(OrfC、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6をコードする)およびpYESHis(HetI、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34をコードする)。ベクターのいくつかは、特定のクローニング要求条件に適合するように改変した。個々の実験に応じて適切な選択培地を用いた。それぞれの場合に、GAL1プロモーターの後ろに遺伝子をクローニングし、洗浄した細胞を、Invitrogenによって与えられた指針に従ってガラクトースを含む培地中に再懸濁させることによって発現を誘導した。細胞を30で増殖させ、誘導培地に移してから指定時間後に収集した(遠心により)。細胞ペレットを凍結乾燥させ、酸性メタノールを用いてFAMEを調製し、ヘキサン中に抽出して、GCによって分析した。

【0368】

予備的実験により、ネイティブ型のOrfA(SEQ ID NO:1)および幾分改変されたネイティブ型のOrfB(OrfB<sup>+</sup>、SEQ ID NO:37)の酵母における発現は、予想されるサイズのタンパク質の産生をもたらさないことが示された(正しいmRNAも同じく検出されなかった)。これに対して、ネイティブ型のOrfC(SEQ ID NO:5)を発現させた細胞では、予想されるサイズのタンパク質が検出された。Orf AおよびBをコードする遺伝子を、それらのコドン用法が酵母によって忍容されるものとより調和するように再合成した(再合成はBlue Heron, Inc.によって行われた)。これらの合成遺伝子は本明細書においてsOrfA(SEQ ID NO:35)およびsOrfB(SEQ ID NO:36)として示されている。酵母におけるこれらの遺伝子の発現は、Orf AおよびBにそれぞれ対応する、予想されるサイズのタンパク質の蓄積をもたらした。

【0369】

図7は、シゾキトリウム属PUFAシンターゼ系(sOrfA、sOrfB、OrfCおよびHetI)を発現する酵母細胞からの脂肪酸プロファイルと、対照細胞(sOrfA遺伝子を欠く)から得られたものとの被殻を示している。細胞は誘導のほぼ20時間後に収集した。完全なPUFAシンターゼ系を発現する株のプロファイルに2つの新規FAMEピークが出現したことが見てとれる。これらの2つのピークは、基準となる標準物質との溶出時間の比較およびその後のMS分析により、DPA n-6およびDHAと同定された。本発明者らによるシゾキトリウム属PUFAシンターゼの特徴づけによって予測された通り、DHAおよびDPA n-6以外に、他の新規ピークはプロファイル中に認められなかった。

【0370】

図8は、PUFA FAMEを含む、図7のGCクロマトグラムの領域を示している。対照細胞およびPUFAシンターゼを発現する細胞の両方が、DHA FAME付近で溶出するピークを含む。これはC26:0 FAMEと同定され、(参考文献によれば)スフィンゴ脂質に由来する。これはDHAピークの近くで溶出するものの、分離は十分であり、このためDHAの定量には干渉しない。DPA n-6ピークは、FAMEプロファイルにおいて他の内因性酵母脂質とは隔たっている。この特定の例において、シゾキトリウム属PUFAシンターゼ系を発現する細胞は、2.4%のDHA

10

20

30

40

50

および2.0%のDPAn-6（総FAMEに占めるパーセンテージとして）を蓄積した。DHAとDPA n-6の合計＝細胞において測定された脂肪酸の4.4%。細胞において観察されたDHAとDPA n-6との比はほぼ1.2：1であった。

#### 【0371】

酵母におけるシゾキトリウム属PUFAシンターゼの発現を示している、以上に提示した結果は、以前の出願において提唱された経路、ならびに酵母において、そして同じく植物においても期待しうる脂肪酸プロファイルの変更に關する予測に対する裏づけを提供する。

#### 【0372】

#### 実施例9

下記の実施例は、特定のアシル-CoAシンターゼとの共発現によって、シゾキトリウム属PUFAシンターゼを発現する酵母におけるPUFAの蓄積を増加させることを説明している。

#### 【0373】

本発明者らは、シゾキトリウム属では、そのPUFAシンターゼのFFA生成物が、内因性アシル-CoAシンターゼ（ACoASs）によってアシル-CoAに効率的に変換されることを示している（上記の実施例を参照）。ESTデータベースの検討により、本発明者らは、PUFAの対応するアシル-CoAへの変換に關与する可能性のある、ACoASと推定される9つのものを同定した。

#### 【0374】

手短に述べると、本発明者らは、さまざまなcDNAライブラリーから摘出されたコロニーから単離されたほぼ20,000種のプラスミドから得られた配列からなるシゾキトリウム属ESTデータベースを、ACoAS活性が知られている（または疑われる）タンパク質に対する相同性を示すようなESTに関して検討した。本発明者らは、VectorNTIプログラムであるContig Expressを用いて、これらを複数のコンティグにアセンブルし（2つまたはそれ以上の部分的に重複する配列が得られた場合）、これらを個々の配列情報の質に基づいて編集した。この取り組みの結果を以下にまとめる。PUFAシンターゼの生成物を対応するアシル-CoAへと効率的に変換しうるACoAS酵素と関連づけられる候補である、8つの異なるコンティグおよび1つのシングレット（部分的に重複する配列がデータベース中になく）が同定された。このESTデータセットをガイドとして用いて、各候補に關する完全なコード領域配列を入手し、さまざまな標準的な方法（例えば、ゲノムDNAのサブクローンおよびゲノムDNAに由来するPCR産物のシーケンシング）を用いて検証した。

#### 【0375】

シゾキトリウム属アシル-CoAシンターゼ（ACS）のコード配列および推定される翻訳物：

1. 長さ＝2004ヌクレオチド（終止コドンを含めず）（SEQ ID NO：82）。これは668アミノ酸（SEQ ID NO：83）、73.5kDaのタンパク質をコードすると予想される。このタンパク質配列は、既知のACSに対して良好な相同性を有する。最良のBlastマッチは、DHAとの高い活性を有することが特徴づけられて示されているタラシオシラ-シュードナナのACS（TplacA、アクセッション番号：AAW58006）に対してである（Tonon et al., Plant Physiology. 2005 May;138(1):402-8）。SEQ ID NO：83のC末端の3つのアミノ酸は以下である：SKL  
ペルオキシソームに対するタンパク質のターゲティングと関連するモチーフ。このC末端モチーフは、上述したタラシオシラ-シュードナナのACSにも存在する。

#### 【0376】

2. ScACS-2（ScACoAS-2またはACS-2とも表記される）：長さ＝2340（終止コドンを含めず）ヌクレオチド（SEQ ID NO：84）。これは780アミノ酸（SEQ ID NO：85）、84.7kDaのタンパク質をコードすると予想される。ヒトでの例であるリピドシン（Lipidosin）およびBubble Gumを含む既知のACSに対して、推定されるタンパク質の大部分にわたって良好な相同性がみられる。

#### 【0377】

3. ScACS-3（ScACoAS-3またはACS-3とも表記される）：長さ＝2526（終止コドンを含めず）ヌクレオチド（SEQ ID NO：86）。これは842アミノ酸（SEQ ID NO：87）、90.6kDaの

タンパク質をコードすると予想される。Bubble Gum型のACSタンパク質に対して、推定されるタンパク質の大部分（特に中央のほぼ700アミノ酸）にわたって良好な相同性がみられる。

【 0 3 7 8 】

4. ScACS-4 ( ScACoAS-4またはACS-4とも表記される ) : 長さ = 2037 ( 終止コドンを含めず ) ヌクレオチド ( SEQ ID NO : 88 )。これは679アミノ酸 ( SEQ ID NO : 89 ) で74.7kDaのタンパク質をコードすると予想される。ヒトおよび他の哺乳動物由来の例を含む既知のACSタンパク質に対して、推定されるタンパク質の大部分にわたって良好な相同性がみられる。

【 0 3 7 9 】

5. ScACS-5 ( ScACoAS-5またはACS-5とも表記される ) : 長さ = 1734ヌクレオチド ( 終止コドンを含めず ) ( SEQ ID NO : 90 )。これは578アミノ酸 ( SEQ ID NO : 91 )、63.1kDaのタンパク質をコードすると予想される。既知のACSタンパク質に対して、タンパク質の大部分にわたって良好な相同性がみられる。最良のBlastマッチは細菌ACSに対してである。SEQ ID NO : 91のC末端の3つのアミノ酸は以下である : SKL ペルオキシソームに対するタンパク質のターゲティングと関連するモチーフ。

【 0 3 8 0 】

6. ScACS-6 ( ScACoAS-6またはACS-6とも表記される ) : 長さ = 1806 ( 終止コドンを含めず ) ヌクレオチド ( SEQ ID NO : 92 )。これは602アミノ酸 ( SEQ ID NO : 93 )、66.0kDaのタンパク質をコードすると予想される。既知のACSタンパク質に対して、タンパク質の大部分にわたって良好な相同性がみられる。最良のBlastマッチは細菌ACSに対してである。SEQ ID NO : 93のC末端の3つのアミノ酸は以下である : SKL ペルオキシソームに対するタンパク質のターゲティングと関連するモチーフ。

【 0 3 8 1 】

7. ScACS-7 ( ScACoAS-7またはACS-7とも表記される ) : 長さ = 1920 ( 終止コドンを含めず ) ヌクレオチド ( SEQ ID NO : 94 )。これは640アミノ酸のタンパク質 ( SEQ ID NO : 95 )、70.4kDaをコードすると予想される。タンパク質の大部分にわたって、既知のACSタンパク質と良好な相同性がみられる。最良のBlastマッチは細菌ACSに対してである。

【 0 3 8 2 】

8. ScACS-8 ( ScACoAS-8またはACS-8とも表記される ) : 長さ = 1893 ( 終止コドンを含めず ) ヌクレオチド ( SEQ ID NO : 96 )。これは631アミノ酸 ( SEQ ID NO : 97 )、70.7kDaのタンパク質をコードすると予想される。最良のBlastマッチは、同じくACoAS活性を有する可能性のある脂肪酸輸送体タンパク質ファミリーのメンバーに対してである。

【 0 3 8 3 】

9. ScACS-9 ( ScACoAS-9またはACS-9とも表記される ) : 長さ = 2950 ( 終止コドンを含めず ) ヌクレオチド ( SEQ ID NO : 98 )。これは766アミノ酸 ( SEQ ID NO : 99 )、84.1kDaのタンパク質をコードすると予想される。タンパク質の大部分にわたって、既知のACSタンパク質と良好な相同性がみられる。最良のBlastマッチは動物ACSに対してである。

【 0 3 8 4 】

本発明者らは、PUFAシンターゼの異種宿主に存在する酵素は新規な（その生物にとって）PUFA遊離脂肪酸（FFA）を効率的には処理できないと思われ、適切なACoASの共発現がその宿主におけるPUFAの蓄積をもたらすのではないかと考えた。上記のシゾキトリウム属の候補ACoASの2つ（ScACS1、SEQ ID NO : 82 / 83およびScACS-2、SEQ ID NO : 84 / 85）を、シゾキトリウム属PUFAシンターゼ系（例えば、sOrfA、sOrfBおよびnOrfC、ならびにHetI）をコードする遺伝子を含む酵母において個々に発現させた。

【 0 3 8 5 】

より具体的には、上記の実施例に記載した酵母発現系を、第5のACoAS遺伝子の導入に適応させるために（すなわち、この酵母は、シゾキトリウム属PUFAシンターゼ系のOrf A、BおよびC、ならびにPPTアーゼ（ネンジュモ属由来のHetI）も含んでいた）、4つのベクターを用いて改変した。2つの遺伝子を内部にクローニングしうる酵母発現ベクター（pES

10

20

30

40

50



Cベクター)をStratageneから入手した。これらのベクターは上記のpYESベクターと類似しており、それとの適合性がある。2つの遺伝子、ネイティブ性OrfC (nOrfC、SEQ ID NO : 5) およびHetI (SEQ ID NO : 33) を1つのpESCベクター中にクローニングし、一方、sOrfA (SEQ ID NO : 35、sOrfB (SEQ ID NO : 36) および第5の遺伝子 (ScACS-1 (SEQ ID NO : 82) またはScACS-2 (SEQ ID NO : 84) ) をpYESベクター中にクローニングした。この4つのベクターを酵母に導入し、上記のようにガラクトースを含む培地中に細胞を再懸濁させることによって遺伝子を誘導した。細胞を30 で増殖させ、誘導の18時間後に収集した。これらの細胞のFAME分析の概略を表1に示している。対照細胞は4つのベクターはすべて含むが、Orf Aをコードする遺伝子は欠いていた。ScACOASのいずれか1つの共発現は、DHAおよびDPA n-6の蓄積の増加をもたらした (対照細胞における量のおよそ2倍)。このことは、異種宿主におけるPUFAシンターゼの生成物の蓄積を、それらの生成物の利用に関してより効率的と思われる酵素の共発現によって増加させることができることの裏づけを提供する。

10

【 0 3 8 6 】

(表 1)

30°C、18時間の誘導	対照 (PUFA遺伝子)	ScACS-1	ScACS-2
脂肪酸	FAME (面積%)	FAME (面積%)	FAME (面積%)
C14:0*	1.7	1.8	2.0
C14:1	0.5	0.5	0.6
C15:0	0.5	0.5	0.5
C16:0*	17.1	16.5	15.5
C16:1*	40.7	38.8	38.5
C18:0*	4.7	4.3	4.2
C18:1 N9*	23.8	22.4	21.9
C18:1 N7	1.3	1.0	1.0
C24:0	0.1	0.1	0.1
C22:5 N6	1.3	2.5	3.1
C26:0	1.7	1.6	1.6
C22:6 N3*	2.0	3.8	3.9
DHA+DPAn-6	3.3	6.3	7.0

20

30

【 0 3 8 7 】

それに続く実験において、ScACS-3、ScACS-5、ScACS-6およびScACS-8についても、上記と同様の方法を用いて、シゾキトリウム属PUFAシンターゼ系 (例えば、sOrfA、sOrfBおよびnOrfC、ならびにHetI) をコードする遺伝子を含む酵母において検討した。ScACS-3、ScACS-5またはScACS-8のそれぞれの発現はすべて、アシル-CoAシンターゼ遺伝子の添加の非存在下と比較して、酵母におけるDHA産生の増加をもたらした (非提示データ)。

【 0 3 8 8 】

以上に示したように、ScACS-8は、同じくACS活性を有する可能性のある脂肪酸輸送体タンパク質ファミリーのメンバーに対する相同性を有する。これらのタンパク質は、原形質膜に付随して、細胞内への遊離脂肪酸の輸入を促進し、さらにそれらをアシル-CoA誘導体にも変換すると考えられている。このファミリーの酵素は、生成物を遊離脂肪酸として放出するPUFAシンターゼ系を、植物のプラスチド細胞において発現させた場合に特別な有用性を有する可能性がある。プラスチドの外包膜は原形質膜に由来すると考えられており、原形質膜を標的とするタンパク質 (ScACS-8など) はプラスチド外包膜に対してもターゲティングされる可能性がある。もしそうであれば、これらの脂肪酸輸送タンパク質 (ScACS-8など) は、PUFAシンターゼの遊離脂肪酸生成物のプラスチドからの輸出を促進し、さらにそれらをアシル-CoA誘導体に変換する可能性がある。このアシル-CoAシンターゼを、シゾキトリウム属PUFA PKS系を発現する植物に与えるための実験を以下に述べる。

40

50

## 【0389】

## 実施例10

下記の実施例は、FAS経路を阻害するセルレニンの存在下での増殖により、シゾキトリウム属PUFAシンターゼを、ScACoAS-1を伴わずに、または伴って発現する酵母におけるPUFAのレベルが上昇することを実証している。

## 【0390】

PUFAシンターゼおよびFASは両方とも、その脂肪酸生成物の合成のための炭素源としてマロニル-CoAを利用する。さらに、両方の系からのアシル-CoA型の脂肪酸は、PLおよびTAGを合成する酵素に対する基質としての役を果たしうる。以上に考察したように、PUFAシンターゼおよびFASの両方が1つの生物に存在する場合には、FAS系のダウンレギュレーションまたは阻害がPUFAの蓄積に有利に働くことが期待される。セルレニンは、脂肪酸合成の縮合反応の十分に研究された阻害薬である。以前の研究は、PUFAシンターゼが、セルレニンによる阻害に対して、FAS系よりも相対的に影響を受けにくいことを示している。

## 【0391】

本発明者らは、FAS活性の低下の概念のモデルとして、実施例8に記載した酵母の株の脂肪酸プロファイルに対するセルレニンの効果を調べた。アシルCoA-シンターゼをも含む、実施例9に記載した酵母についても、2つの戦略の効果がPUFA産生を相加的または相乗的に増加させるか否かを明らかにするために、この系でさらに調べた。

## 【0392】

初期の実験により、最大の効果（すなわち、総脂肪酸プロファイルに占めるパーセンテージとしてのPUFAの増加）は、濃度4uMのセルレニンで得られることが示された。セルレニンは、ガラクトース誘導培地への移行の4時間後に添加した。細胞を誘導培地への移行の19時間後に収集し、凍結乾燥させ、FAMESを調製して、GCによって分析した。

## 【0393】

試験した酵母株は以下であった：

- ・株5.5は、上記の実施例8に記載したように、PUFAシンターゼ遺伝子（sOrfA、sOrfB、OrfCおよびHet1）を含んだ；および
- ・株5.6は、上記の実施例9に記載したように、株5.5のPUFAシンターゼ遺伝子セットに加えて、ScACoAS-1（SEQ ID NO：82）も含んだ。

## 【0394】

表2を参照すると、「0 Cer」はセルレニンを添加しなかったことを表しており、「4uM Cer」は、誘導培地への移行の4時間後に培地を4uMセルレニンにしたことを表している）。PUFA産生に対するFAS経路の阻害の影響を評価するために、それぞれの株をセルレニンの存在下および非存在下における脂肪酸産生に関して評価した。表2は、GCプロファイル中に検出された主要な脂肪酸を示している（図11も参照）。値は検出された総脂肪酸に占めるパーセンテージとして与えられている。シゾキトリウム属PUFA PKS系の生成物であるDHAおよびDPAn-6は、プロファイル中に存在するただ2つのPUFAであった。DHA + DPAn-6の合計も表2に示されている。図9および10は、酵母によって産生されたDHA（図9）またはDHAおよびDPAn-6の量（図10；白のバーはDHAである；黒のバーはDHA + DPAn-6である）を、総FAMEに占めるパーセンテージとして図示している。

## 【0395】

PUFAシンターゼ遺伝子を有しない酵母細胞は、検出可能なPUFAを全く生じなかった。この実験での酵母におけるPUFAシンターゼ系の発現は1.2% DHAの蓄積をもたらした。ScACoA-1遺伝子（SEQ ID NO：82）を含めることで、DHAレベルは4.1%に上昇した。4uMセルレニン（FAS系の阻害）の存在下における、PUFAシンターゼ系のみを有する細胞の増殖は、DHAレベルを3.7%に上昇させた。PUFAシンターゼ遺伝子およびScACoAS-1遺伝子の両方を発現する細胞を4uMセルレニン中で増殖させたところ（すなわち、アシル-CoAシンターゼの複合発現およびFAS系の阻害）、DHAレベルは総脂肪酸の8.2%に上昇した。試料のすべてにおいて、DPAn-6蓄積の対応する増加がみられた。試料中のDHA + DPAn-6の合計も表2に示されており、最大の量（総脂肪酸の14.5%）は4uMセルレニン中で増殖させた株5.6に

において存在した。ACoAシンターゼ遺伝子を発現させることと、セルレニンの存在下で増殖させることの効果は相加的であることが見てとれる。これらのデータは、異種宿主におけるPUFAの蓄積を増加させるために本明細書で提唱した本発明を裏づけるものである。

【0396】

(表2)

脂肪酸	5.5株 0 Cer	5.5株 4uM Cer	5.6株 0 Cer	5.6株 4 uM Cer
C14:0	1.5	0.0	1.7	0.0
C16:0	17.5	4.9	17.5	6.1
C16:1	43.4	38.4	41.7	34.8
C18:0	5.8	3.8	5.3	4.5
C18:1 N9	26.2	40.4	23.7	35.3
C18:1 N7	0.9	0.8	0.0	0.6
C22:5 N6	0.9	2.9	2.8	6.3
C26:0	2.0	2.9	1.9	2.4
C22:6 N3	1.3	3.7	4.1	8.2
DHA+DPA N6	2.1	6.6	6.9	14.5

10

【0397】

#### 実施例11

下記の実施例は、異種宿主におけるPUFAの産生および/または蓄積を増加させるのに用いるための、さらなるアクセサリタンパク質または標的の同定を説明している。

20

【0398】

シゾキトリウム属に存在する酵素は、PUFAシンターゼのアシル-CoA型の生成物を効率的に利用して、リン脂質(PL)およびトリアシルグリセロール(TAG)分子を合成する。しかし、異種宿主に存在する酵素は、そのようなPUFA-CoAが典型的にはそれらの生物に遭遇しないと思われるため、これらの反応を同程度の効率では遂行できないと思われる。例えば、そのような異種宿主における、さまざまなPUFAシンターゼのアシル-CoA生成物(例えば、DHA-CoA、DPA n-6-CoA、EPA-CoAまたはその他)をPLまたはTAG分子に効率的に組み込むPLまたはTAG合成酵素の発現は、それらの生成物が蓄積する能力の増大をもたらす可能性がある。この点に関して、シゾキトリウム属、またはPUFAシンターゼ経路を介してPUFAを産生する他の生物は、そのような酵素をコードする遺伝子の優れた供給源として役立つと考えられる。したがって、本発明者らは、PLまたはTAGの生成においてPUFA-CoAを基質として利用するいくつかのアシルトランスフェラーゼタンパク質(例えば、3-グリセロール-リン酸アシルトランスフェラーゼ(GPAT)、リゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼ(LPAAT)およびジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ(DAGAT))、またはPLもしくはTAGにおけるPUFAの富化をもたらす他のアシルトランスフェラーゼ(例えば、リン脂質:ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ(PDAT))の使用を提唱する。そのようないくつかのアシルトランスフェラーゼの同定について以下に述べる。少数の候補が酵母で調べられており、植物でも調べられる。

30

【0399】

#### DAGAT酵素

本発明者らは、シゾキトリウム属ESTデータベースを、DAGAT活性が知られている(または疑われる)タンパク質に対する相同性を示すようなESTに関して検討した。本発明者らは、PUFA PKS系とともに用いるための可能性のあるDAGAT酵素として3つの候補を同定しており、その1つを以下に説明するが、これはシゾキトリウム属におけるTAG分子への遊離脂肪酸の蓄積に関与することが示されている。

40

【0400】

シゾキトリウム属DAGAT(DAGAT-1またはScDAGAT-1とも称される)コード領域の長さ=1518ヌクレオチド(終止コドンを含めず)(SEQ ID NO:100)。これは506アミノ酸(SEQ ID NO:101)、57.4kDaのタンパク質をコードすると予想される。タンパク質の3分の2

50

にわたって（ほぼアミノ酸170から始まってC末端まで続く）、DAGAT 2B型酵素として同定されたタンパク質との良好な相同性がみられる。タンパク質配列の最初の3分の1（アミノ酸1から170まで）のBlast解析ではいずれのタンパク質とも有意な相同性は判明せず、Pfamマッチは全く検出されなかった。

#### 【0401】

シゾキトリウム属におけるFASに関して実施例1で上述したロックアウト技術を用いて、本発明者らは、B73-8と表記されるシゾキトリウム属の株におけるDAGAT遺伝子（SEQ ID NO: 100を含む）を同様にロックアウトした。図13に示されているように、シゾキトリウム属におけるDAGAT遺伝子の不活性化は、TAGにおける脂肪酸の蓄積を有意に阻害した。具体的には、DAGATの不活性化は、mg FAME / gm biomassのおよそ80%の減少、およびTAGの90%の減少をもたらした。このことから、本発明者らは、このDAGATがシゾキトリウム属におけるTAG合成の原因となる主な酵素であると結論づけた。

10

#### 【0402】

このため、本明細書に記載したPUFA PKS系を発現する宿主（例えば、酵母、植物）におけるこの核酸分子の発現は、PLまたはTAGへの遊離脂肪酸の蓄積を増加させることが予想される。トランスジェニック植物においてこの遺伝子を発現させる代表的な実験を以下に述べる。

#### 【0403】

##### LPAAT酵素

本発明者らはまた、シゾキトリウム属ESTデータベースを、LPAAT活性が知られている（または疑われる）タンパク質に対する相同性を示すようなESTに関しても検討した。本発明者らは、上記のように、これらを複数のコンティグにアセンブルし（2つまたはそれ以上の部分的に重複する配列が得られた場合）、これらを個々の配列情報の質に基づいて編集した。この取り組みの結果を以下にまとめる。LPAAT活性と関連づけられる特に優れた候補である、3つの異なるコンティグおよび1つのシングレット（部分的に重複する配列がデータベース中にない）が同定された。これらの配列によってコードされる酵素は、推定されるLPAAT活性と関係するがそれとは異なる活性を有しうることが確認された。4つのケースのすべてにおいて、Orfと推定されるもの（開始コドンおよび終止コドンを含む）が同定された。さらにデータが得られるに伴って、内因性開始コドンの同定を含め、正確な配列の表現は変わりうると認識される。

20

30

#### 【0404】

##### ESTデータベースの解析によって同定されたシゾキトリウム属LPAATの候補

1. ScLPAAT-1コンティグ：長さ = 1478ヌクレオチド（SEQ ID NO: 102）。これは927ntの完全長Orfを含むように思われる（終止コドンを含む、ScLPAAT-1 CDS、SEQ ID NO: 103）。CDSの翻訳物（SEQ ID NO: 104）を用いたBlast検索は、既知および推定的なアシルトランスフェラーゼタンパク質に対して、コードされるタンパク質の大部分にわたって良好な相同性がみられることを示している。最良のマッチは、アラビドプシス由来のタンパク質に対してである。Pfam解析により、PlsC（1-アシル-sn-グリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼ、すなわちLPAAT）ファミリーと関連する大きな保存的中心ドメインが示されている。

40

#### 【0405】

2. ScLPAAT-2コンティグ：長さ = 2112ヌクレオチド（SEQ ID NO: 105）。これは1140ntの完全長Orfを含むように思われる（終止コドンを含む、ScLPAAT-2 CDS、SEQ ID NO: 106）。CDSの翻訳物（SEQ ID NO: 107）を用いたBlast検索は、既知および推定的なアシルトランスフェラーゼタンパク質に対して、コードされるタンパク質の大部分にわたって良好な相同性がみられることを示している。最良のマッチは、アラビドプシス由来のタンパク質に対してである。Pfam解析により、PlsC（1-アシル-sn-グリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼ、すなわちLPAAT）ファミリーと関連する大きな保存的中心ドメインが示されている。

#### 【0406】

50

3. ScLPAAT-3コンティグ：長さ = 1862ヌクレオチド (SEQ ID NO : 108)。これは1323ntの完全長Orfを含むように思われる (終止コドンを含む、ScLPAAT-3 CDS、SEQ ID NO : 109)。CDSの翻訳物 (SEQ ID NO : 110) を用いたBlast検索は、既知および推定的なアシルトランスフェラーゼに対して、コードされるタンパク質の中央部にわたって良好な相同性がみられることを示している。最良のマッチは、哺乳動物由来のタンパク質に対してである。Pfam解析により、PlsC (1-アシル-sn-グリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼ、すなわちLPAAT) ファミリーと関連する大きな保存的中心ドメインが示されている。

【 0 4 0 7 】

4. ScLPAAT-4シングレット：長さ = 794ヌクレオチド (SEQ ID NO : 111)。これは756ntの完全長Orfを含むように思われる (終止コドンを含む、ScLPAAT-4 CDS、SEQ ID NO : 112)。CDSの翻訳物 (SEQ ID NO : 113) を用いたBlast検索は、既知および推定的なアシルトランスフェラーゼタンパク質に対して、コードされるタンパク質のほとんどにわたって良好な相同性がみられることを示している。最良のマッチは、鳥類および哺乳動物由来のタンパク質に対してである。Pfam解析により、PlsC (1-アシル-sn-グリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼ、すなわちLPAAT) ファミリーと関連する大きな保存的中心ドメインが示されている。

【 0 4 0 8 】

ScLPAAT-1はクローニングされ、酵母および植物において発現されている。

【 0 4 0 9 】

その他のDAGATまたはLPAAT酵素

本発明者らはまた、クリプテコディニウム-コーニイのESTデータベースを、DAGATまたはLPAAT活性活性が知られている (または疑われる) タンパク質に対する相同性を示すようなESTに関しても検討した。この取り組みの結果を以下にまとめる。

【 0 4 1 0 】

A) ESTデータベースの解析によって同定されたクリプテコディニウム-コーニイDAGATの候補：

1. CA5 PTA.838.C：長さ = 817ヌクレオチド (SEQ ID NO : 114)。PCT公開第WO 2004/087902号に記載されているクリプテコディニウムのアシルトランスフェラーゼ配列に対して、この配列の最後の274ヌクレオチドにわたって良好な相同性がみられる。

2. CA5 PTA.131.C1：長さ = 850ヌクレオチド (SEQ ID NO : 115)。

3. CA12 cot10 003a h10：長さ = 663ヌクレオチド (SEQ ID NO : 116)

4. CA12 cot10 001a h02：長さ = 807ヌクレオチド (SEQ ID NO : 117)

5. CA12 cot10 005b g12：長さ = 765ヌクレオチド (SEQ ID NO : 118)

6. CA12 cot50 005c d07：長さ = 782ヌクレオチド (SEQ ID NO : 119)

【 0 4 1 1 】

B) ESTデータベースの解析によって同定されたクリプテコディニウム-コーニイLPAATの候補：

1. CA12 cot10 003a e11：長さ = 793ヌクレオチド (SEQ ID NO : 120)

2. CA12 PTA.739.C1：長さ = 744ヌクレオチド (SEQ ID NO : 121)

【 0 4 1 2 】

本実施例に記載された核酸分子の任意の1つまたは複数を、生物、特にPUFA PKS系を発現する生物におけるPUFA蓄積をさらに強化するために、本明細書に記載した遺伝的に改変された生物 (例えば、植物または微生物) のいずれかを作製することを含む、任意の宿主細胞を形質転換するために用いることができる。これらの酵素はまた、古典的または標準的な脂肪酸シンターゼ経路によってPUFAを産生する宿主生物において発現させた場合にも有用性を有する可能性がある。そのような構築物は、PUFA PKS系とともに単独で、または本明細書に記載したような宿主生物におけるPUFA産生および蓄積の強化のための他の戦略と組み合わせて用いることができる (例えば、アシル-CoAシンターゼの発現とともに、またはFAS経路の阻害とともに)。PCT公開第WO 2004/087902号に記載されているそのほかのアシルトランスフェラーゼ配列も本明細書において有用な可能性があり、参照により本

10

20

30

40

50

明細書に組み入れられる。

【0413】

#### 実施例12

下記の実施例は、アラビドプシスにおける、シゾキトリウム属PUFAシンターゼをコードする遺伝子(OrfA、OrfB<sup>+</sup>およびOrfC)のHetIを伴っての発現、ならびに検出可能な中間体または副生成物が実質的に存在しない標的PUFA、DHAおよびDPAn-6の産生を説明している。

【0414】

シゾキトリウム属OrfA (SEQ ID NO: 1によって表されるヌクレオチド配列)、OrfB<sup>+</sup> (SEQ ID NO: 37によって表されるヌクレオチド配列) およびOrfC (SEQ ID NO: 5によって表されるヌクレオチド配列) を、HetI (SEQ ID NO: 33によって表されるヌクレオチド配列) とともに、植物への遺伝子の導入のための適切なバイナリーベクター中にクローニングした(別個に、または1つの超構築物(superconstruct)上に4つの遺伝子すべてを含むさまざまな組み合わせで)。そのような構築物およびベクターの例は、以下(3つの発現構築物) および実施例13(1つの4127に関する「超構築物」)に記載されている。

【0415】

#### 5720の構築: Orf B<sup>+</sup> (プラスチド性発現)

Orf B<sup>+</sup> (SEQ ID NO: 4をコードする) を、flax lininプロモーター/ターミネーター(米国特許第6,777,591号)の制御下にある発現カセット中に制限クローニングした。lininプロモーターは種子発生中に導入遺伝子の特異的な時間的および組織特異的な発現を制御する。シゾキトリウム属Orf B<sup>+</sup>のすぐ上流かつインフレームには、プラスチドに対するOrf B<sup>+</sup>のターゲティングのための、アブラナのアシル-ACPチオエステラーゼ由来のプラスチドターゲティング配列(PT-シグナルペプチド)があった。この植物バイナリーベクターはまた、陽性選択用の左および右の境界配列(Haldrup et al., 1998, Plant Mol. Biol. 37:287-296)の間のパセリ(Petroselinum crispum)由来のコビキチンプロモーター/ターミネーター(Kawalleck et al., 1993, Plant Mol. Bio., 21:673-684)によって作動される既存の大腸菌ホスホマンノースイソメラーゼ遺伝子(Miles and Guest, 1984, Gene 32: 41-48)も含んでいた。

【0416】

#### 4107の構築: HetIおよびOrf C (プラスチド性発現)

シゾキトリウム属Orf C (SEQ ID NO: 5によって表されるヌクレオチド配列) を、HetI (SEQ ID NO: 33によって表されるヌクレオチド配列) とともに、flax lininプロモーター/ターミネーター(米国特許第6,777,591号)の制御下にある発現カセット中にクローニングした。lininプロモーターは種子発生中に導入遺伝子の特異的な時間的および組織特異的な発現を制御する。シゾキトリウム属Orf CおよびHetIのすぐ上流かつインフレームには、プラスチドに対するPUFAシンターゼおよびPPTアーゼのターゲティングのための、アブラナのアシル-ACPチオエステラーゼ由来のプラスチドターゲティング配列(PT-シグナルペプチド)があった。続いて、両方のプラスチドを、左および右の境界配列の間のパセリ由来のコビキチンプロモーター/ターミネーター(Kawalleck et al., 1993, Plant Mol. Bio., 21:673-684)によって作動される、宿主植物にホスフィノトリシン耐性を付与するpat遺伝子(Wohlleben et al., 1988, Gene 70:25-37)を含む、1つの植物バイナリーベクター中に集成させた。

【0417】

#### 4757の構築: Orf A (プラスチド性発現)

シゾキトリウム属Orf A (SEQ ID NO: 1によって表されるヌクレオチド配列) を、flax lininプロモーター/ターミネーター(米国特許第6,777,591号)の制御下にある発現カセット中にクローニングした。lininプロモーターは種子発生中に導入遺伝子の特異的な時間的および組織特異的な発現を制御する。シゾキトリウム属Orf Aすぐ上流かつインフレームには、プラスチドに対するPUFAシンターゼおよびPPTアーゼのターゲティングのための、アブラナのアシル-ACPチオエステラーゼ由来のプラスチドターゲティング配列(PT-

シグナルペプチド)があった。この発現カセットは、左および右の境界配列の間のMASプロモーター/ターミネーターによって作動される、宿主植物にカナマイシン耐性を付与するnptII遺伝子を含む植物バイナリーベクターの内部に含まれた。

#### 【0418】

1つの例では、導入遺伝子を3つの別々の発現カセット中にクローニングした：上記の通りの、5720と命名された構築物(OrfB<sup>\*</sup>を含み、SEQ ID NO:4をコードする)、4107と命名された構築物(OrfCを含み、SEQ ID NO:6をコードする、かつHetIを含み、SEQ ID NO:34をコードする)および4757と命名された構築物(OrfAを含み、SEQ ID NO:2を含む)。各構築物において遺伝子をクローニングした。タンパク質をプラスチドに向かわせるためには、アブラナのアシル-ACPチオエステラーゼに由来するプラスチドターゲティング配列をコードする追加的な5'配列を、Orf A、B<sup>\*</sup>、CおよびHetIのすぐ上流に配置した。コードされるターゲティングペプチドのアミノ酸配列は以下である。

MLKLSCNVTNHLHTFSFFSDSSLFIPVNRRTLAVS (SEQ ID NO:81)

このペプチドをコードするヌクレオチド配列を、各PUFAシンターゼOrfの開始メチオニンコドン、ならびにHetIの人工的に作製した開始コドン(ATG)に対してインフレームで配置した。PUFAシンターゼの局在を植物細胞の細胞質に対してターゲティングさせる他の構築物では、Orfの5'末端に追加的なタンパク質コード配列を付け加えなかった。

#### 【0419】

アラビドプシスへの遺伝子の導入のためには標準的な方法を用いた(Clough et al., 1998, Plant J. 16:735-743に記載されたような、適切なベクターを含むアグロバクテリウム株の懸濁液中への花の浸漬)。方法の詳細は以下の実施例13で述べる。それらの植物から得られた種子を選択培地上にプレーティングして出芽させた。成長した植物の一部は成熟まで至らせ、種子をPUFA含量に関して分析した。PUFA含量に基づき、それらの種子の一部は次世代へと進ませた。それらの植物から得られたプールした種子を脂肪酸含量に関して分析した。これらのトランスジェニック植物から期待される標的PUFAは、植物を形質転換するために用いた遺伝子の由来であるシゾキトリウム属PUFA PKS系によって生成される主PUFAであるドコサヘキサエン酸(DHA)およびドコサペンタエン酸(DPAn-6)であった。

#### 【0420】

例示的なトランスジェニック植物系統の1つにおける1つの例示的な脂肪酸分析の結果は図13に示されている。図13の上のパネルは、プールした種子試料から調製したFAMEのGC分離およびFID検出によって表された、野生型アラビドプシス種子の典型的な脂肪酸プロファイルを示している。主たる脂肪酸は以下である：16:0、18:0、16:1、18:1、20:1、20:2および22:1。野生型種子からの試料中にはDHAもDPA n-6も存在しない。

#### 【0421】

図13の下のパネルは、上記の通りに、いずれもプラスチドを標的とする3つの別々の発現カセット(5720、4107および4757)から導入した、シゾキトリウム属PUFAシンターゼ遺伝子およびHetI遺伝子を発現する例示的なトランスジェニックアラビドプシス系統(263系統)の1つからプールした種子試料の脂肪酸プロファイルを示している。263系統の脂肪酸プロファイルを参照すると、トランスジェニック植物種子からのプロファイル中には、野生型種子からのプロファイル中には存在しない2つのFAMEピークが容易に観察される。これらの2つのピークの溶出パターンは、基準となるDHAおよびDPAn-6(標準物質としてシゾキトリウム属の油から調製したFAME、ならびにNuCheck Prepから購入したDHA標準物質を使用)の溶出と正確に一致した。この特定の例において、DHAピークは算出された総FAMEの0.8%に相当し、一方、DPA n-6ピークは1.7%に相当した。新規PUFAの合計は総FAMEの2.5%であった。

#### 【0422】

他のトランスジェニック植物系統を用いた実験でも同様の結果が得られた。例えば、263系統と同じ構築物および同じ様式を用いて形質転換された、269と命名された別のトラン

スジェニック系統は、算出された総FAMEのおよそ0.75%のDHA、および算出された総FAMEの1.41%のDPA<sub>n</sub>-6を産生した（非提示データ）。

【0423】

さらに、上記と同じ核酸分子を用いて作製された複数の他のトランスジェニックアラビドプシス植物も、それらがPUFA PKS遺伝子およびHetI PPTアーゼを提供する構築物を、別々の構築物、組み合わせた構築物または単一の超構築物のいずれを用いて作製されたかにかかわらず、標的PUFAを産生した（以下の実施例13に示されているデータ）。

【0424】

加えて、PUFA PKS遺伝子をサイトゾルにターゲティングさせたトランスジェニック植物はすべて、標的PUFAを発現した（詳細データは非提示）。例えば、上記の3つの別々の発現カセット（プラスチドターゲティング配列を伴わない）上にて導入されたシゾキトリウム属PUFA PKS + HetIをサイトゾル中で発現する植物系統は、総FAMEに占めるパーセンテージとしておよそ0.45%のDHAおよびおよそ0.8%のDPAを産生した。もう1つの例において、単一の超構築物（以下の実施例13に記載されたものと同様）上にて導入されたシゾキトリウム属PUFA PKS + HetIをサイトゾル中で発現する植物系統は、総FAMEに占めるパーセンテージとしておよそ0.2~0.3%のDHAおよびおよそ0.5%のDPAを産生した。

【0425】

図13に示された種子脂肪酸プロファイルにおけるDHAおよびDPA<sub>n</sub>-6の出現（および、その一部について上述した他のトランスジェニック系統でも観察されたように）は、導入されたシゾキトリウム属PUFAシンターゼ系が植物細胞内で発現された場合に機能すること、およびタンパク質をプラスチドに対してターゲティングさせることを実証している。加えて、本発明者らは、タンパク質をサイトゾル、またはプラスチドおよびサイトゾルの両方に対してターゲティングさせて、PUFAを産生させることもできることを確認した。他の宿主（例えば、大腸菌および酵母）における生化学的データおよび異種発現データから予想されたように、トランスジェニック植物からの種子のプロファイル中に検出された新規脂肪酸はDHAおよびDPA<sub>n</sub>-6のみであり（すなわち、脂肪酸プロファイルはPUFA生成酵素系に起因する混入性の中間体および副生成物を実質的に含まない）、このことは植物におけるPUFAの産生のための標準的な経路の酵素を上回るPUFA PKS系の利点をさらに例証している。

【0426】

実施例13(a)~13(j)

以下の実施例は、植物におけるPUFAの産生および/または蓄積を増加させるための、本明細書に記載したさまざまな戦略（戦略の組み合わせを含む）の使用を説明している。

【0427】

具体的には、以下の実施例は、単独での、またはPUFAの産生および蓄積を強化するための他のアクセサリタンパク質および/もしくは遺伝的改変戦略と組み合わせたの、アラビドプシス種子における、シゾキトリウム属PUFAシンターゼ（nOrfA、Orf B<sup>\*</sup>およびnOrfC）をコードする遺伝子の、HetIを伴っての発現を説明している。具体的には、シゾキトリウム属PUFAシンターゼおよびHetIを単独で、または以下と組み合わせて植物において発現させた：（1）アシル-CoAシンターゼ（ACS）をコードする遺伝子、または（2）内因性FAS活性を阻害することを意図した遺伝要素。さらに、シゾキトリウム属PUFAシンターゼおよびHetIと、ACS遺伝子、および内因性FAS活性を阻害することを意図した遺伝要素の発現との併用の一例も示されている。最後に、単独での、または1つもしくは複数のアシル-CoAシンターゼ、および内因性FAS活性を阻害することを意図した遺伝要素の発現との組み合わせでの、DAGATおよび/またはLPAATを含むアシルトランスフェラーゼの発現の例も以下に説明している。ここで概要を示した戦略は、植物において、以前の実施例で記載した概念の任意のものを実行しうることを例証している。

【0428】

実施例13(a)~13(j)に関する材料および方法

（1）構築物



構築物4127の構築：PT-シグナルペプチド:nORFA、PT-シグナルペプチド:nORFB<sup>\*</sup>、PT-シグナルペプチド:HetI、PT-シグナルペプチド:nORFC（シゾキトリウム属PUFAシンターゼとHetIとの、プラスチドを標的とする発現）

シゾキトリウム属のネイティブ性OrfA（nOrfA、SEQ ID NO：1によって表される、SEQ ID NO：2をコードする）、合成（再合成された）OrfB<sup>\*</sup>（OrfB<sup>\*</sup>、SEQ ID NO：37によって表され、SEQ ID NO：4をコードする）およびネイティブ性OrfC（nOrfC、SEQ ID NO：5によって表され、SEQ ID NO：6をコードする）を、ネンジュモ属由来のHetI（SEQ ID NO：33によって表され、SEQ ID NO：34をコードする）とともに、flax lininプロモーター/ターミネーター（プロモーター/ターミネーターに関しては米国特許第6,777,591号を参照）の制御下にある発現カセット中にクローニングした。lininプロモーターは種子発生中に導入遺伝子の特異的な時間的および組織特異的な発現を制御する。シゾキトリウム属OrfA、B<sup>\*</sup>、CおよびHetIのすぐ上流かつインフレームには、プラスチドに対するPUFAシンターゼおよびPPTアーゼのターゲティングのための、実施例12にも記載した、アブラナのアシル-ACPチオエステラーゼ（本明細書においてはPT-シグナルペプチドと称し、そのアミノ酸配列はSEQ ID NO：81によって表される）由来のプラスチドターゲティング配列があった。続いて、4つの発現カセットすべてを、左および右の境界配列の間のパセリ由来のユビキチンプロモーター/ターミネーター（Kawalleck et al., 1993, Plant Mol. Bio., 21:673-684）によって作動される、宿主植物にホスフィトリシン耐性を付与するpat遺伝子（Wohlleben et al., 1988, Gene 70:25-37）を含む、1つの植物バイナリーベクター中に集成させた。

【0429】

5723の構築：ACS-1（サイトゾル性発現）

アシル-CoAシンテターゼの発現のために、シゾキトリウム属ACS-1の核酸配列（SEQ ID NO：82、SEQ ID NO：83をコードする）を発現させるための別の植物バイナリーベクターを構築した。適切な制限部位が5'および3'末端に人工的に作製されたACS-1をサブクローニングして、配列を決定した。続いてACS-1を、陽性選択用の左および右の境界配列（Haldrup et al., 1998, Plant Mol. Biol. 37:287-296）の間のパセリ由来のユビキチンプロモーター/ターミネーター（Kawalleck et al., 1993, Plant Mol. Bio., 21:673-684）によって作動される大腸菌ホスホマンノースイソメラーゼ遺伝子（Miles and Guest, 1984, Gene 32:+ 41-48）を含む植物バイナリーベクター中の、flax lininプロモーター/ターミネーター（米国特許第6,777,591号）の制御下にある発現カセット中に制限クローニングした。

【0430】

同様の構築物を、本明細書においてそれぞれACS-2（SEQ ID NO：84 / 85）およびACS-8（SEQ ID NO：96 / 97）、5724および5730と称するアシル-CoAシンテターゼの発現のためにも作製した。1つの局面においては、以下に述べるように、アシル-CoAシンテターゼ配列を、DAGAT（SEQ ID NO：100 / 101）および / またはLPAAT（SEQ ID NO：102 / 103 / 104）をコードする核酸分子と組み合わせた。

【0431】

5727の構築：CHSAイントロンによるKAS II RNAi（イントロンによるKAS II RNAiのサイトゾル性発現）

FASの障害のために、KAS IIの発現を減弱させるための別の植物バイナリーベクターを構築した。この場合には、At1g74960座位によってコードされる、核にコードされるKAS II転写物（Carlsson et al., 2002, Plant J. 29:761-770）の499bp領域を、ペチュニアのカルコンシンターゼA（CHSA）遺伝子（McGinnis et al., 2005, Methods in Enzymology 392:1-24; Koes et al., 1989, Gene 81: 245-257）に由来する介在性イントロンによるRNA干渉（RNAi）の標的とした。CHSAイントロンによるKAS II RNAi（SEQ ID NO：122によって表される）を、陽性選択用の左および右の境界配列（Haldrup et al., 1998, Plant Mol. Biol. 37:287-296）の間のパセリ由来のユビキチンプロモーター/ターミネーター（Kawalleck et al., 1993, Plant Mol. Bio., 21:673-684）によって作動される大腸菌

ホスホマンノースイソメラーゼ遺伝子 (Miles and Guest, 1984, Gene 32: 41-48) を含む植物バイナリーベクター中の、lininプロモーター/ターミネーター (米国特許第6,777,591号) の間の植物バイナリーベクター中にクローニングした。

【0432】

5729の構築 : KAS IIIアンチセンスRNA (KAS IIIアンチセンスRNAのサイトゾル性発現)

FASの障害のために、KAS IIIの発現を減弱させるための別の植物バイナリーベクターを構築した。この場合には、At1g62640座位によってコードされる、核にコードされる転写物に由来する1210bpアンチセンスのKAS III配列 (Yamada et al., 2002, GenBankアクセッションAY091275) を標的とした。KAS IIIアンチセンス配列 (本明細書でSEQ ID NO : 125によって表される) を、陽性選択用の左および右の境界配列 (Haldrup et al., 1998, Plant Mol. Biol. 37:287-296) の間のパセリ由来のユビキチンプロモーター/ターミネーター (Kawalleck et al., 1993, Plant Mol. Bio., 21:673-684) によって作動されるホスホマンノースイソメラーゼ遺伝子 (Miles and Guest, 1984, Gene 32: 41-48) を含む植物バイナリーベクター中の、lininプロモーター/ターミネーター (米国特許第6,777,591号) の間の植物バイナリーベクター中にクローニングした。

【0433】

5731の構築 : ACS-1、およびイントロンによるKAS II RNAi (サイトゾル性発現)

FASの障害と組み合わせたアシル-CoAシンテターゼの発現のために、KAS IIの発現を減弱させるため、およびシゾキトリウム属ACS-1の核酸配列 (SEQ ID NO : 82、SEQ ID NO : 83をコードする) を発現させるための別の植物バイナリーベクターを構築した。この構築物に関しては、ACS-1およびイントロンによるKAS II RNAiの二重発現カセットを、陽性選択用の左および右の境界配列 (Haldrup et al., 1998, Plant Mol. Biol. 37:287-296) の間のパセリ由来のユビキチンプロモーター/ターミネーター (Kawalleck et al., 1993, Plant Mol. Bio., 21:673-684) によって作動される大腸菌ホスホマンノースイソメラーゼ遺伝子 (Miles and Guest, 1984, Gene 32: 41-48) を含む植物バイナリーベクター中にてflax lininプロモーター/ターミネーター (米国特許第6,777,591号) の制御下で発現させた。

【0434】

5732の構築 : ACS-1およびアンチセンスKAS II (サイトゾル性発現)

FASの障害と組み合わせたアシル-CoAシンテターゼの発現のために、KAS IIの発現を減弱させるため、およびシゾキトリウム属ACS-1の核酸配列 (SEQ ID NO : 82、SEQ ID NO : 83をコードする) を発現させるための別の植物バイナリーベクターを構築した。この構築物に関しては、ACS-1およびKAS IIアンチセンス (KAS IIアンチセンス配列は本明細書でSEQ ID NO : 123によって表されている) の二重発現カセットを、陽性選択用の左および右の境界配列 (Haldrup et al., 1998, Plant Mol. Biol. 37:287-296) の間のパセリ由来のユビキチンプロモーター/ターミネーター (Kawalleck et al., 1993, Plant Mol. Bio., 21:673-684) によって作動される大腸菌ホスホマンノースイソメラーゼ遺伝子 (Miles and Guest, 1984, Gene 32: 41-48) を含む植物バイナリーベクター中にてflax lininプロモーター/ターミネーター (米国特許第6,777,591号) の制御下で発現させた。

【0435】

5733の構築 : ACS-1およびKAS III RNAi (サイトゾル性発現)

FASの障害と組み合わせたアシル-CoAシンテターゼの発現のために、KAS IIIの発現を減弱させるため、およびシゾキトリウム属ACS-1の核酸配列 (SEQ ID NO : 82、SEQ ID NO : 83をコードする) を発現させるための別の植物バイナリーベクターを構築した。この構築物に関しては、ACS-1およびKAS III RNAi (KAS III RNAi配列は本明細書でSEQ ID NO : 124によって表されている) の二重発現カセットを、陽性選択用の左および右の境界配列 (Haldrup et al., 1998, Plant Mol. Biol. 37:287-296) の間のパセリ由来のユビキチンプロモーター/ターミネーター (Kawalleck et al., 1993, Plant Mol. Bio., 21:673-684) によって作動される大腸菌ホスホマンノースイソメラーゼ遺伝子 (Miles and Guest, 1984, Gene 32: 41-48) を含む植物バイナリーベクター中にてflax lininプロモーター/

ターミネーター（米国特許第6,777,591号）の制御下で発現させた。

【0436】

5734の構築：ACS-1およびKAS IIIアンチセンスRNA（サイトゾル性発現）

FASの阻害と組み合わせたアシル-CoAシンテターゼの発現のために、KAS IIIの発現を減弱させるため、およびシゾキトリウム属ACS-1の核酸配列（SEQ ID NO：82、SEQ ID NO：83をコードする）を発現させるための別の植物バイナリーベクターを構築した。この構築物に関しては、ACS-1およびKAS IIIアンチセンスの二重発現カセットを、陽性選択用の左および右の境界配列（Haldrup et al., 1998, Plant Mol. Biol. 37:287-296）の間のパセリ由来のコピキチンプロモーター/ターミネーター（Kawalleck et al., 1993, Plant Mol. Bio., 21:673-684）によって作動される大腸菌ホスホマンノースイソメラーゼ遺伝子（Miles and Guest, 1984, Gene 32: 41-48）を含む植物バイナリーベクター中にてflax lininプロモーター/ターミネーター（米国特許第6,777,591号）の制御下で発現させた。

10

【0437】

4793の構築：DAGAT

DAGATの発現のために、シゾキトリウム属DAGAT-1の核酸配列（SEQ ID NO：100、SEQ ID NO：101をコードする）を発現させるための別の植物バイナリーベクターを構築した。シゾキトリウム属DAGAT（SEQ ID NO：100によって表されるヌクレオチド配列）を、flax lininプロモーター/ターミネーター（米国特許第6,777,591号）の制御下にある発現カセット中にクローニングした。。lininプロモーターは種子発生中に導入遺伝子の特異的な時間的および組織特異的な発現を制御する。この発現カセットは、左および右の境界配列の間のMASプロモーター/ターミネーターによって作動される、宿主植物にカナマイシン耐性を付与するnptII遺伝子を含む植物バイナリーベクターの内部に含まれた。

20

【0438】

4794の構築：DAGATおよびACS-8

DAGATおよびアシル-CoAシンテターゼの発現のために、以下を発現させるための別の植物バイナリーベクターを構築した：（1）シゾキトリウム属DAGATの核酸配列（SEQ ID NO：100、SEQ ID NO：101をコードする）および（2）シゾキトリウム属ACS-8の核酸配列（SEQ ID NO：96、SEQ ID NO：97をコードする）。この構築物に関しては、ACS-8およびDAGATの二重発現カセットを、陽性選択用の左および右の境界配列の間のMASプロモーター/ターミネーターによって作動される、宿主植物にカナマイシン耐性を付与するnptII遺伝子を含む植物バイナリーベクター中にてflax lininプロモーター/ターミネーター（米国特許第6,777,591号）の制御下で発現させた。

30

【0439】

4795の構築：LPAATおよびDAGAT

LPAATおよびDAGATの発現のために、以下を発現させるための別の植物バイナリーベクターを構築した：（1）シゾキトリウム属LPAATの核酸配列（SEQ ID NO：103、SEQ ID NO：104をコードする）および（2）シゾキトリウム属DAGAT-1の核酸配列（SEQ ID NO：100、SEQ ID NO：101をコードする）。この構築物に関しては、LPAATおよびDAGATの二重発現カセットを、陽性選択用の左および右の境界配列の間のMASプロモーター/ターミネーターによって作動される、宿主植物にカナマイシン耐性を付与するnptII遺伝子を含む植物バイナリーベクター中にてflax lininプロモーター/ターミネーター（米国特許第6,777,591号）の制御下で発現させた。

40

【0440】

4796の構築：ACS-8、LPAATおよびDAGAT

アシル-CoAシンテターゼ、LPAATおよびDAGATの発現のために、以下を発現させるための別の植物バイナリーベクターを構築した：（1）シゾキトリウム属LPAATの核酸配列（SEQ ID NO：103、SEQ ID NO：8104をコードする）、（2）シゾキトリウム属DAGAT-1の核酸配列（SEQ ID NO：100、SEQ ID NO：101をコードする）および（3）シゾキトリウム属ACS-8の核酸配列（SEQ ID NO：96、SEQ ID NO：97をコードする）。この構築物に関しては、AC

50

S-8、LPAATおよびDAGATの三重発現カセットを、陽性選択用の左および右の境界配列の間のMASプロモーター/ターミネーターによって作動される、宿主植物にカナマイシン耐性を付与するnptII遺伝子を含む植物バイナリーベクター中にてflax lininプロモーター/ターミネーター（米国特許第6,777,591号）の制御下で発現させた。

【0441】

## (2) アラビドプシスの形質転換

すべての植物バイナリーベクターの完全性が、診断用制限消化および配列解析によって確かめられた。続いて、単離されたプラスミドを用いて、エレクトロポレーション（25  $\mu$ F、2.5kV、200 ）によるコンピテントアグロバクテリウム株EH101（Hood et al., 1986, J. Bacteriol. 144:732-743）の形質転換を行った。組換えアグロバクテリウムをAB-スぺクチノマイシン/カナマイシン（20x AB塩、2Mグルコース、0.25mg/ml FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O、1M MgSO<sub>4</sub>、1M CaCl<sub>2</sub>）上にプレーティングし、単一のコロニーを5mlのAB-スぺクチノマイシン/カナマイシンブロスへの接種に用いた。これらの培養物を28 で一晩増殖させた。続いて、4127プラスミドを含む組換えアグロバクテリウムを用いて、花浸漬法（clough et al., 1998, Plant J. 16: 735-743）による野生型C24シロイヌナズナ植物の形質転換を行った。これらの植物から得られた種子をホスフィノトリシンの存在下で選択培地上にプレーティングして出芽させた。陽性と同定された実生を土壌に移して成熟に至らせ、その後種子をPUFA含量に関して分析した。

【0442】

他のプラスミド（5723、5724、5730、5727、5729、5731、5732、5733、5734、4793、4794、4795、および/または4796）を含む組換えアグロバクテリウムに関しては、トランスジェニック4127-系統150のシロイヌナズナ植物を花浸漬法（clough et al., 1998, Plant J. 16:735-743）によって再び形質転換した。これらの植物から得られた種子を、適宜、二重選択のためのホスフィノトリシンおよびマンノースの存在下、または三重選択のためのホスフィノトリシン、マンノースおよびカナマイシンまたはホスフィノトリシンおよびカナマイシンの存在下で選択培地上にプレーティングして出芽させた。陽性と同定された実生を土壌に移して成熟に至らせ、その後種子をPUFA含量に関して分析した。

【0443】

## 実施例13a

本実施例は、シゾキトリウム属PUFAシンターゼ（OrfA、OrfB<sup>\*</sup>およびOrfC）をHetIとともに超構築物（4127）上で発現するトランスジェニックシロイヌナズナ種子におけるDHAおよびDPA<sub>n</sub>-6の産生を説明する。

【0444】

シゾキトリウム属PUFAシンターゼ（OrfA、OrfB<sup>\*</sup>およびOrfC）をHetIとともに発現する（構築物4127）アラビドプシス植物からプールした種子のGC-FAME分析により、その脂肪酸内容物における標的PUFA、DHA<sub>n</sub>-3およびDPA<sub>n</sub>-6の顕著なレベルが判明した。表3に示されているように、特定の1つの系統（4127-系統150）は、0.6%のDHA<sub>n</sub>-3および0.7%のDPA<sub>n</sub>-6を呈し、シゾキトリウム属型PUFA含量は合計1.3%であった。予想された通り、野生型（C24）バックグラウンドからの対照種子は、DHA<sub>n</sub>-3およびDPA<sub>n</sub>-6をいずれも検出可能なレベルで含まなかった。SDS-PAGEおよびウエスタンブロット法によって行った4127-系統150のその後の発現解析により、組換え種子が、正しくプラスミドに対してターゲティングされたOrfA、OrfB<sup>\*</sup>、OrfCおよびHetIを発現したことが判明した（非提示データ）。さらに、この表現型はT2世代の分析からT4世代の分析までを通じて安定であり、それらは本明細書に記載したさまざまな戦略（戦略の組み合わせを含む）を植物におけるPUFAの産生および/または蓄積の増加に関して評価する時にDHAおよびシゾキトリウム属PUFAのレベルを判定するための陽性対照として利用された。

【0445】

（表3）ホスフィノトリシン陽性植物から選択したT2およびT4のプールした種子集団における、シゾキトリウム属PUFAシンターゼをHetIとともに発現する（プラスミドにターゲティングされて）トランスジェニック種子と比較した、成熟した野生型アラビドプシス種

子におけるDHAおよびDPAのレベル。% DHA<sub>n-3</sub>および% DPA<sub>n-6</sub>は、算出された総FAMEのGC分離およびFID検出に続いて決定した。

戦略	遺伝子型	系統	世代	表現型		
				%DHA (C22:6 n-3)	%DPA (C22:5 n-6)	%DHA + DPA
陰性対照	野生型 (プールした種子)	C24 生態型	N/A	0	0	0
PUFA シンターゼ +HetI	OrfA, OrfB*, OrfC, HetI (プールした種子)	4127-系統 150	T2	0.6	0.7	1.3
			T4	0.6	0.6	1.2

10

#### 【0446】

##### 実施例13b

本実施例は、シゾキトリウム属PUFAシンターゼ (OrfA、OrfB\* およびOrf C) をHetIとともに (4127)、シゾキトリウム属ScACS-1遺伝子 (5723) またはScACS-2遺伝子 (5724) と組み合わせて発現するトランスジェニックシロイヌナズナ種子におけるDHA<sub>n-3</sub>およびDPA<sub>n-6</sub>の産生を説明する。

#### 【0447】

4127-系統150に由来する植物 (実施例13参照a) を、上記のようなアグロバクテリウムを介した形質転換によるScACS-1構築物 (5723) またはScACS-2構築物 (5724) の導入のために用いた。ホスフィノトリシンおよびマンノースの両方の存在下での組換え植物の選択の後に、種子を収集し、プールした種子から調製したFAMESのGC分離およびFID検出によって脂肪酸プロファイルに関して分析した。

20

#### 【0448】

1つの例として、シゾキトリウム属PKSをHetIとともにACS-1と組み合わせて発現する特定の1つの系統 (4127 / 5723-系統514) は、1.5%のDHAおよび0.9%のDPA<sub>n-6</sub>を呈し、総脂肪酸プロファイルにおけるシゾキトリウム属PUFA含量は合計で2.4%であった (表4)。これはDHA<sub>n-3</sub>含量に関して4127-系統150陽性対照に比して2.5倍の増加に相当した。同様の結果は、シゾキトリウム属PKSをHetIとともにACS-2と組み合わせて発現する系統 (4127 / 5724-系統552) でも観察され、これは陽性対照と比較してDHA<sub>n-3</sub>含量の1.8倍の増加を示した。さらに、DHAとDPAとの比に関しては、4127-系統150のT2世代におけるおよそ0.85 : 1.0またはT4世代における1.0 : 1.0から、ACS-1系統における1.7 : 1.0およびACS-2系統における1.2 : 1.0への推移が観察された。分析したすべてのトランスジェニック種子において、プロファイル中に検出された新規脂肪酸はDHA n-3またはDPA n-6のみであった。

30

#### 【0449】

(表4) プールした種子における、シゾキトリウム属PUFAシンターゼをHetI (プラスチドにターゲティングされた) 発現ならびにシゾキトリウム属ACS-1またはACS-2の発現と組み合わせたトランスジェニック種子と比較した、成熟した野生型、およびシゾキトリウム属PUFAシンターゼをHetIとともに発現する (プラスチドにターゲティングされて) トランスジェニックアラビドプシス種子における、DHA<sub>n-3</sub>およびDPA<sub>n-6</sub>のレベル。% DHA<sub>n-3</sub>および% DPA<sub>n-6</sub>は、算出された総FAMEのGC分離およびFID検出に続いて決定した。

40

戦略	遺伝子型	系統	世代	表現型		
				%DHA (C22:6 n-3)	%DPA (C22:5 n-6)	%DHA + DPA
陰性対照	野生型 (プールした種子)	C24 生態型	N/A	0	0	0
陽性対照	OrfA, OrfB*, OrfC, HetI (プールした種子)	4127-系統 150	T2	0.6	0.7	1.3
			T4	0.6	0.6	1.2
アシルCoAS 発現	OrfA, OrfB*, OrfC, HetI, ACS-1 (プールした種子)	4127/5723 -系統514	T4/T2	1.5	0.9	2.4
	OrfA, OrfB*, OrfC, HetI, ACS-2 (プールした種子)	4127/5724 -系統552		1.1	0.9	2.0

10

## 【0450】

## 実施例13c

本実施例は、シゾキトリウム属PUFAシンターゼ (OrfA、OrfB\*およびOrfC) をHetIとともに発現する、RNA干渉 (RNAi) を用いたKAS IIの減弱化を通じてのFASの阻害と組み合わせたトランスジェニックシロイヌナズナ種子におけるDHAおよびDPA n-6の産生を説明する。

20

## 【0451】

4127-系統150に由来する植物を、上記のようなアグロバクテリウムを介した形質転換による、イントロンによるKAS II RNAi (構築物5727) の導入のために用いた。ホスフィノトリシンおよびマンノースの両方の存在下での組換え植物の選択の後に、種子を収集し、プールした種子から調製したFAMESのGC分離およびFID検出によって脂肪酸プロファイルに関して分析した。

## 【0452】

1つの例として、特定の1つの系統 (4127 / 5727-系統1097) は、1.3%のDHA n-3および1.2%のDPA n-6を呈し、総脂肪酸プロファイルにおけるシゾキトリウム属PUFA含量は合計で2.5%であった (表5)。これはDHA含量に関して4127-系統150陽性対照に比して2.1倍を上回る増加に相当した。引き続いて、4127 / 5727-系統1097からの個々の種子を算出された総FAMEに関するGC分離およびFID検出に関して個別に分析した。

30

## 【0453】

この分析の後に、この集団内の種子が最大で2.0%のDHA n-3および1.6%のDPA n-6を呈し、総脂肪酸プロファイルにおけるシゾキトリウム属PUFA含量は合計で3.6%であることが観察された (表5)。これは、4127-系統150陽性対照に比して、DHA含量に関しては3.3倍の増加、シゾキトリウム属PUFA含量に関しては3倍の増加に相当する。さらに、DHAとDPAとの比に関しては、4127-系統150のT2世代における0.85 : 1.0またはT4世代における1.0 : 1.0から、FAS阻害系統における1.25 : 1.0またはそれ以上への推移が観察された。分析したすべてのトランスジェニック種子において、プロファイル中に検出された新規脂肪酸はDHA n-3またはDPA n-6のみであった。%DHA n-3、%DPA n-6および合計% (DHA + DPA) に関して、個々の種子での平均はプールした試料と一致し、この集団内での差異は同時形質転換された種子における組換え4127および5727座位の分離に起因するとされた。分析したすべてのトランスジェニック種子において、プロファイル中に検出された新規脂肪酸はDHA n-3またはDPA n-6のみであった。

40

## 【0454】

(表5) プールした種子および個々の種子における、シゾキトリウム属PUFAシンターゼをHetI (プラスチドにターゲティングされた) 発現およびKAS II減弱化と組み合わせたト

50

ランスジェニック種子と比較した、成熟した野生型、およびシゾキトリウム属PUFAシンターゼをHetIとともに発現する（プラスチドにターゲティングされて）トランスジェニックアラビドプシス種子における、DHAおよびDPAのレベル。% DHA<sub>n-3</sub>および% DPA<sub>n-6</sub>は、算出された総FAMEのGC分離およびFID検出に続いて決定した。

戦略	遺伝子型	系統	世代	表現型		
				%DHA (C22:6 n-3)	%DPA (C22:5 n-6)	%DHA + DPA
陰性対照	野生型 (プールした種子)	C24 生態型	N/A	0	0	0
陽性対照	OrfA, OrfB*, OrfC, HetI (プールした種子)	4127-系統 150	T2	0.6	0.7	1.3
			T4	0.6	0.6	1.2
FAS 阻害	OrfA, OrfB*, OrfC, HetI, イントロンに よるKASIII RNAi (プールした種子)	4127/5727 -系統1097	T4/T2	1.3	1.2	2.5
		1097-7		0.7	0.7	1.4
		1097-9		0.7	0.8	1.5
		1097-2		0.9	0.9	1.8
		1097-5		1.0	0.9	1.9
		1097-6		1.0	1.1	2.1
		1097-1		1.2	1.3	2.5
		1097-8		1.3	1.3	2.6
		1097-4		1.4	0.8	2.2
		1097-10		1.4	1.2	2.6
		1097-3		2.0	1.6	3.6
	単一の 種子の 平均		T4/T2	1.2	1.0	2.2

#### 【 0 4 5 5 】

##### 実施例13d

本実施例は、シゾキトリウム属PUFAシンターゼ（OrfA、OrfB\*およびOrfC）をHetIとともに発現する、アンチセンスRNAを用いたKAS IIIの減弱化を通じてのFASの阻害と組み合わせたトランスジェニックシロイヌナズナ種子におけるDHAおよびDPA<sub>n-6</sub>の産生を説明する。

#### 【 0 4 5 6 】

4127-系統150に由来する植物を、上記のようなアグロバクテリウムを介した形質転換によるKAS IIIアンチセンス構築物（構築物5129）の導入のために用いた。ホスフィノトリシンおよびマンノースの両方の存在下での組換え植物の選択の後に、種子を収集し、プールした種子から調製したFAMESのGC分離およびFID検出によって脂肪酸プロファイルに関して分析した。

#### 【 0 4 5 7 】

1つの例として、特定の1つの系統（4127 / 5729-系統1087）は、1.7%のDHA<sub>n-3</sub>および1.2%のDPA<sub>n-6</sub>を呈し、総脂肪酸プロファイルにおけるシゾキトリウム属PUFA含量は合計で2.9%であった（表6）。これはDHA含量に関して4127-系統150陽性対照に比して2.8倍の増加に相当した。

#### 【 0 4 5 8 】

引き続き、4127 / 5729-系統1087からの個々の種子を、算出された総FAMEに関するGC分離およびFID検出に関して個別に分析した。この分析の後に、この集団内の種子が最大で2.4%のDHA<sub>n-3</sub>および1.8%のDPA<sub>n-6</sub>を呈し、総脂肪酸プロファイルにおけるシゾキトリ

ウム属PUFA含量は合計で4.2%であることが観察された(表6)。これは、4127-系統150陽性対照に比して、DHA含量に関しては4倍の増加、シゾキトリウム属PUFA含量に関しては3.2倍の増加に相当すると考えられる。さらに、DHAとDPAとの比に関しては、4127-系統150のT2世代における0.85:1.0またはT4世代における1.0:1.0から、FAS阻害系統における1.33:1.0またはそれ以上への推移が観察された。%DHA n-3、%DPA n-6および合計%(DHA + DPA)に関して、個々の種子での平均はプールした試料と一致し、この集団内での差異は同時形質転換された種子における組換え4127および5729座位の分離に起因するとされた。大腸菌および酵母において観察された以前の生化学的データおよび異種発現データから予想された通り、分析したすべてのトランスジェニック種子において、プロフィール中に検出された新規脂肪酸はDHA n-3またはDPA n-6のみであった。種子試料1087-7の分析に関して得られたGC-FAMEクロマトグラムは参照のために図14に示されている。

#### 【0459】

(表6) プールした種子および個々の種子における、シゾキトリウム属PUFAシンターゼをHetI(プラスチドにターゲティングされた)発現およびKAS III減弱化と組み合わせたトランスジェニック種子と比較した、成熟した野生型、およびシゾキトリウム属PUFAシンターゼをHetIとともに発現する(プラスチドにターゲティングされて)トランスジェニックアラビドプシス種子における、DHAおよびDPAのレベル。% DHA n-3および% DPA n-6は、算出された総FAMEのGC分離およびFID検出に続いて決定した。

戦略	遺伝子型	系統	世代	表現型		
				%DHA (C22:6 n-3)	%DPA (C22:5 n-6)	%DHA + DPA
陰性対照	野生型 (プールした種子)	C24 生態型	N/A	0	0	0
陽性対照	OrfA, OrfB*, OrfC, HetI (プールした種子)	4127-系統 150	T2	0.6	0.7	1.3
			T4	0.6	0.6	1.2
FAS 阻害	OrfA, OrfB*, OrfC, HetI, KASIII アンチセンス RNA (プールした種子)	4127/5729 -系統1087	T4/T2	1.7	1.2	2.9
				0.9	1.0	1.9
				1.0	1.1	2.1
				1.1	0.9	2.0
				1.2	0.6	1.8
				1.3	1.1	2.4
				1.4	1.5	2.9
				1.7	1.1	2.8
				1.8	1.6	3.4
				2.0	1.6	3.6
				2.4	1.8	4.2
	単一の 種子の 平均		T4/T2	1.5	1.2	2.7

#### 【0460】

##### 実施例13e

本実施例は、シゾキトリウム属PUFAシンターゼ(OrfA, OrfB\*およびOrfC)をHetIとともに発現する、ScACS-1遺伝子の発現およびアンチセンスRNAを用いたKAS IIIの減弱化を通じてのFASの阻害と組み合わせたトランスジェニックシロイヌナズナ種子におけるDHAおよびDPA n-6の産生を説明する。



## 【 0 4 6 1 】

4127-系統150に由来する植物を、上記のようなアグロバクテリウムを介した形質転換による、構築物5731を用いたScACS-1 + KAS II RNAiの導入のために用いた。ホスフィノトリシンおよびマンノースの両方の存在下での組換え植物の選択の後に、種子を収集し、プールした種子から調製したFAMESのGC分離およびFID検出によって脂肪酸プロファイルに関して分析した。

## 【 0 4 6 2 】

1つの例として、特定の1つの系統（4127 / 5731-系統1366）は、1.9%のDHAおよび1.9%のDPA n-6を呈し、総脂肪酸プロファイルにおけるシゾキトリウム属PUFA含量は合計で3.8%であった（表7）。これは、それぞれ実施例13bおよび13c（表4および5）に記載したようなプールした種子集団からのDHA含量と比較した場合、4127-系統150陽性対照に比して3.2倍の増加に相当し、4127 / 5723-系統514で観察されたようなACS-1戦略のみとの比較では1.3倍の増加、4127 / 5727-系統1097で観察されたようなKAS II RNAi減弱化戦略のみとの比較では1.5倍の増加に相当した。

## 【 0 4 6 3 】

この集団内の個々の種子では、プールした種子の間での4127および5731座位の分離の反映として、より高いレベルのDHA含量が観察されると期待される。大腸菌および酵母において観察された以前の生化学的データおよび異種発現データから予想された通り、分析したすべてのトランスジェニック種子において、プロファイル中に検出された新規脂肪酸はDHA n-3またはDPA n-6のみであった。プールした種子試料4127 / 5731-1366系統の分析に関して得られたGC-FAMEクロマトグラムは参照のために図15に示されている。

## 【 0 4 6 4 】

（表7）プールした種子における、シゾキトリウム属PUFAシンターゼをHetI（プラスチドにターゲティングされた）ならびにシゾキトリウム属ACS-1の発現およびFASの阻害と組み合わせたトランスジェニック種子と比較した、成熟した野生型、およびシゾキトリウム属PUFAシンターゼをHetIとともに発現する（プラスチドにターゲティングされて）トランスジェニックアラビドプシス種子における、DHAn-3およびDPAn-6のレベル。% DHAn-3および% DPAn-6は、算出された総FAMEのGC分離およびFID検出に続いて決定した。

戦略	遺伝子型	系統	世代	表現型		
				%DHA (C22:6 n-3)	%DPA (C22:5 n-6)	%DHA + DPA
陰性対照	野生型 (プールした種子)	C24 生態型	N/A	0	0	0
陽性対照	OrfA, OrfB*, OrfC, HetI (プールした種子)	4127-系統 150	T2	0.6	0.7	1.3
			T4	0.6	0.6	1.2
アシルCoAS 発現および FAS 阻害	OrfA, OrfB*, OrfC, HetI, ACS-1, KASII RNAi (プールした種子)	4127/5731 -系統 1366	T4/T2	1.9	1.9	3.8

## 【 0 4 6 5 】

## 実施例13f

本実施例は、シゾキトリウム属PUFAシンターゼ（OrfA、OrfB\*およびOrfC）をHetIとともに発現する、シゾキトリウム属LPAATの発現と組み合わせたトランスジェニックシロイヌナズナ種子におけるDHAおよびDPAn-6の産生を説明する。

## 【 0 4 6 6 】

4127-系統150に由来する植物を、上記のようなアグロバクテリウムを介した形質転換によるLPAAT構築物（5725）の導入のために用いた。ホスフィノトリシンおよびマンノースの両方の存在下での組換え植物の選択の後に、種子を収集し、プールした種子から調製し

たFAMESのGC分離およびFID検出によって脂肪酸プロファイルに関して分析する。

【0467】

これらの植物からの種子は標的PUFA (DHAおよびDPA<sub>n</sub>-6) を産生すると期待される。また、DHAおよび/またはDPA<sub>n</sub>-6産生のレベルも、LPAAT構築物を加えていないPUFA PKS発現性植物と比較して増加することが期待される。

【0468】

#### 実施例13g

本実施例は、シゾキトリウム属PUFAシンターゼ (OrfA、OrfB<sup>+</sup>およびOrfC) をHetIとともに発現する、シゾキトリウム属DAGATおよびACS-1の発現、ならびにRNAiを用いたKAS II減弱化またはアンチセンスを用いたKAS IIIの減弱化を通じてのFASの阻害と組み合わせた

10

トランスジェニックシロイヌナズナ種子におけるDHAおよびDPA<sub>n</sub>-6の産生を説明する。

【0469】

5731 (ACS-1の発現とKAS II RNAiによるFASの阻害との組み合わせ) に由来する植物を、上記のようなアグロバクテリウムを介した形質転換によるDAGAT構築物 (4793) の導入のために用いた。同様の植物を、5734バックグラウンド (ACS-1の発現とKAS IIIアンチセンスによるFASの阻害との組み合わせ) に対しても作製した。ホスフィノトリシンおよびマンノースの両方の存在下での組換え植物の選択の後に、種子を収集し、プールした種子から調製したFAMESのGC分離およびFID検出によって脂肪酸プロファイルに関して分析する。

【0470】

20

これらの植物からの種子は標的PUFA (DHAおよびDPA<sub>n</sub>-6) を産生すると期待される。また、DHAおよび/またはDPA<sub>n</sub>-6産生のレベルも、DAGAT構築物およびFASの阻害を加えていないPUFA PKS発現性植物と比較して増加することが期待される。

【0471】

#### 実施例13h

本実施例は、シゾキトリウム属PUFAシンターゼ (OrfA、OrfB<sup>+</sup>およびOrfC) をHetIとともに発現する、シゾキトリウム属DAGATおよびACS-8の発現と組み合わせ、さらにシゾキトリウム属ACS-1の発現、およびRNAiを用いたKAS II減弱化またはアンチセンスを用いたKAS IIIの減弱化を通じてのFASの阻害と組み合わせたトランスジェニックシロイヌナズナ種子におけるDHAおよびDPA<sub>n</sub>-6の産生を説明する。

30

【0472】

5731 (ACS-1の発現とKAS II RNAiによるFASの阻害との組み合わせ) に由来する植物を、上記のようなアグロバクテリウムを介した形質転換によるDAGAT / ACS-8構築物 (4794) の導入のために用いた。同様の植物を、5734バックグラウンド (ACS-1の発現とKAS IIIアンチセンスによるFASの阻害との組み合わせ) に対しても作製した。ホスフィノトリシンおよびマンノースの両方の存在下での組換え植物の選択の後に、種子を収集し、プールした種子から調製したFAMESのGC分離およびFID検出によって脂肪酸プロファイルに関して分析する。

【0473】

これらの植物からの種子は標的PUFA (DHAおよびDPA<sub>n</sub>-6) を産生すると期待される。また、DHAおよび/またはDPA<sub>n</sub>-6産生のレベルも、DAGAT / ACS-8構築物、ACS-1構築物およびFASの阻害を加えていないPUFA PKS発現性植物と比較して増加することが期待される。

40

【0474】

#### 実施例13i

本実施例は、シゾキトリウム属PUFAシンターゼ (OrfA、OrfB<sup>+</sup>およびOrfC) をHetIとともに発現する、シゾキトリウム属LPAATおよびシゾキトリウム属DAGATの発現と組み合わせ、さらにシゾキトリウム属ACS-1の発現、およびRNAiを用いたKAS II減弱化またはアンチセンスを用いたKAS IIIの減弱化を通じてのFASの阻害と組み合わせたトランスジェニックシロイヌナズナ種子におけるDHAおよびDPA<sub>n</sub>-6の産生を説明する。

【0475】

50

5731 (ACS-1の発現とKAS II RNAiによるFASの阻害との組み合わせ)に由来する植物を、上記のようなアグロバクテリウムを介した形質転換によるDAGAT / LPAAT構築物 (4795)の導入のために用いた。同様の植物を、5734バックグラウンド (ACS-1の発現とKAS IIIアンチセンスによるFASの阻害との組み合わせ)に対しても作製した。ホスフィノトリシンおよびマンノースの両方の存在下での組換え植物の選択の後に、種子を収集し、プールした種子から調製したFAMESのGC分離およびFID検出によって脂肪酸プロファイルに関して分析する。

#### 【0476】

これらの植物からの種子は標的PUFA (DHAおよびDPA<sub>n</sub>-6)を産生すると期待される。また、DHAおよび/またはDPA<sub>n</sub>-6産生のレベルも、DAGAT / LPAAT構築物、ACS-1構築物およびFASの阻害を加えていないPUFA PKS発現性植物と比較して増加することが期待される。

#### 【0477】

##### 実施例13j

本実施例は、シゾキトリウム属PUFAシンターゼ (OrfA、OrfB<sup>+</sup>およびOrfC)をHetIとともに発現する、シゾキトリウム属LPAATおよびシゾキトリウム属DAGAT、およびシゾキトリウム属ACS-8の発現と組み合わせ、さらにシゾキトリウム属ACS-1の発現、およびRNAiを用いたKAS II減弱化またはアンチセンスを用いたKAS IIIの減弱化を通じてのFASの阻害と組み合わせたトランスジェニックシロイヌナズナ種子におけるDHAおよびDPA<sub>n</sub>-6の産生を説明する。

#### 【0478】

5731 (ACS-1の発現とKAS II RNAiによるFASの阻害との組み合わせ)に由来する植物を、上記のようなアグロバクテリウムを介した形質転換によるDAGAT / LPAAT / ACS-8構築物 (4796)の導入のために用いた。同様の植物を、5734バックグラウンド (ACS-1の発現とKAS IIIアンチセンスによるFASの阻害との組み合わせ)に対しても作製した。ホスフィノトリシンおよびマンノースの両方の存在下での組換え植物の選択の後に、種子を収集し、プールした種子から調製したFAMESのGC分離およびFID検出によって脂肪酸プロファイルに関して分析する。

#### 【0479】

これらの植物からの種子は標的PUFA (DHAおよびDPA<sub>n</sub>-6)を産生すると期待される。また、DHAおよび/またはDPA<sub>n</sub>-6産生のレベルも、DAGAT / LPAAT / ACS-8構築物、ACS-1構築物およびFASの阻害を加えていないPUFA PKS発現性植物と比較して増加することが期待される。

#### 【0480】

2006年3月15日に提出された米国仮出願第60/784,616号および米国仮出願第60/783,205号のそれぞれのすべての開示内容は、参照により本明細書に組み入れられる。

#### 【0481】

本発明のさまざまな態様を詳細に記載してきたが、それらの態様の変更および適合化が当業者に想起されるであろうことは明らかである。しかしながら、そのような変更および適合化は本発明の範囲内にあることが明示的に理解されるべきである。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0482】

【図1】シゾキトリウムAc66株ならびにその株に由来するPUFA-S K0およびFAS K0変異株の無細胞ホモジネートのインビトロ活性アッセイのホスフォイメージ (phosphor image) 分析を示しているデジタル画像である。

【図2】シゾキトリウムFAS-K0株におけるインビトロ活性アッセイの順相TLC分離物のホスフォイメージ分析を示しているデジタル画像である。反応物は表示した時間にわたり泳動させた。

【図3】シゾキトリウムFAS-K0株のインビトロ活性アッセイの順相TLC分離物のホスフォイメージ分析を示しているデジタル画像である。標準的なアッセイ成分を用いたが、NADH、NADPHおよびアセチル-CoA成分については変化させた (レーン1 NADH / NADPH / アセチル-CoA)。レーン2 NADH / NADPH / アセチル-CoA / FAS K0変異株。レーン3 NADH / NADPH / アセチル-CoA / PUFA-S K0変異株。レーン4 NADH / NADPH / アセチル-CoA / PUFA-S K0変異株 / FAS K0変異株。レーン5 NADH / NADPH / アセチル-CoA / PUFA-S K0変異株 / FAS K0変異株 / PUFA-S K0変異株。

10

20

30

40

50

ル-CoA、レーン2 NADPH / アセチル-CoA、レーン3 NADH / アセチル-CoA、レーン4 NADH / NADPH、レーン5 なし)。

【図4】シゾキトリウムFAS-KO株のインビトロ活性アッセイの順相TLC分離物のホスフォイメージ分析を示しているデジタル画像である。反応物を10分間泳動させ、続いてATPおよびMg+2を添加した。反応は下欄に表示した時点で停止させた(“ = 秒、‘ = 分)。

【図5】シゾキトリウムFAS-KO株のインビトロ活性アッセイの順相TLC分離物のホスフォイメージ分析を示しているデジタル画像である。反応物を10分間泳動させて、ATPおよびMg+2を添加し(試料1を除く)、インキュベーションをさらに20分間続けた(レーン3 2uLのDMSO、レーン4 4uLのDMSO、レーン5 25uMのトリアシンC、レーン6 100uMのトリアシンC、レーン7 200uMのトリアシンC)。

10

【図6】図6Aは、シゾキトリウム属のOrfA、OrfB<sup>\*</sup>、OrfCおよびHetIを発現する大腸菌のFAME分析を示しているデジタル画像である。ホモジネート中の標的PUFA、高速ペレット画分(P2)、上清画分(S1)および高速上清画分(S2)が示されている。図6Bは、TLCによる分離の前に、脂質生成物を(FAMESに変換するのではなく)HPLCで単に抽出した点を除いて、図6Aで用いたのと同じ大腸菌株の試料のアッセイの結果を示しているデジタル画像である。

【図7】対照酵母、ならびにシゾキトリウム属のOrfsA、OrfsB、OrfCおよびHetIを発現する酵母のFAMEプロファイルである。

【図8】標的PUFAの産生を例証するために拡大した、図1からの酵母に関するFAMEプロファイルである。

20

【図9】シゾキトリウム属のPUFAシンターゼ(sOrfA、sOrfB、OrfC)およびHetIを単独で、またはアシルCoAシンターゼの発現を伴って発現する酵母のDHAプロファイル(総FAMEに占めるパーセンテージとして)に対する、FAS活性の阻害の影響を示しているグラフである。

【図10】シゾキトリウム属のPUFAシンターゼ(sOrfA、sOrfB、OrfC)およびHetIを単独で、またはアシルCoAシンターゼの発現を伴って発現する酵母のDHAおよびDPA<sub>n</sub>6プロファイル(総FAMEに占めるパーセンテージとして)に対する、FAS活性の阻害の影響を示しているグラフである。

【図11】酵母におけるDHAおよびDPA<sub>n</sub>6の産生に対する、FAS活性の阻害(セルレニンによる)、シゾキトリウム属のPUFAシンターゼ(sOrfA、sOrfB、OrfC)およびHetIの発現、ならびにアシルCoAシンターゼの発現の複合的影響を示しているFAMEプロファイルである。

30

【図12】DAGAT遺伝子がノックアウトされたシゾキトリウム属による脂質プロファイルである。

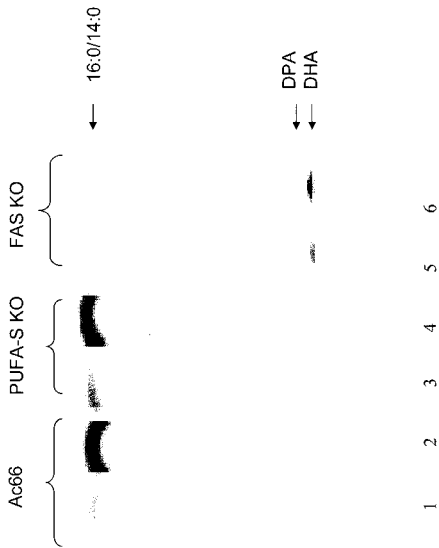
【図13】野生型シロイヌナズナ(Arabidopsis)、ならびにシゾキトリウム属のOrfA、OrfB<sup>\*</sup>、OrfCおよびHetIを種子発生中に発現するシロイヌナズナ263系統(プラスチドにターゲティング)のFAMEプロファイルである。

【図14】種子発生中にプラスチドにターゲティングされたシゾキトリウム属のOrfsA、OrfsB<sup>\*</sup>、OrfCおよびHetIを発現し、併せてFAS阻害(KASIIIアンチセンス)を伴う1087-7系統(プラスチドにターゲティング)からのシロイヌナズナ種子のFAMEプロファイルである。

40

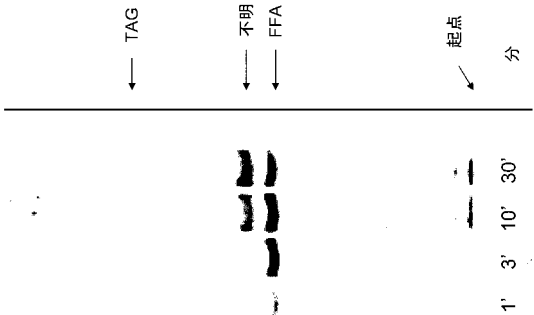
【図15】種子発生中にプラスチドにターゲティングされたシゾキトリウム属のOrfsA、OrfsB<sup>\*</sup>、OrfCおよびHetIを発現し、併せてFAS阻害(KASIII RNAi)およびACS-1を伴う1366系統からプールのシロイヌナズナ種子のFAMEプロファイルである。

【図 1】



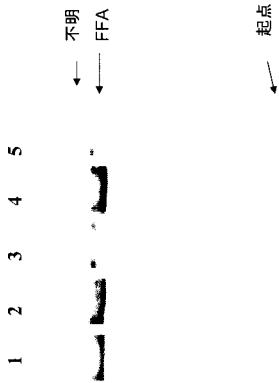
シゾキトリウムAc66株ならびにその株に由来するPUFA-S KOおよびFAS KO変異株の無細胞ホモジネートのインピトロ活性アッセイのホスフオイメージ解析。アッセイ物は30分間泳動させた。FAMEを調製し、酸性プロトコールを用いて抽出して、銀錯体TLCにより分離した。

【図 2】



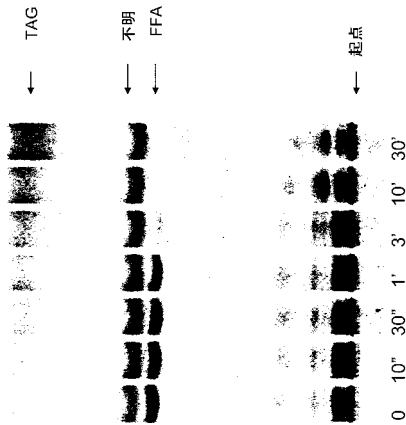
FAS-KO株におけるインピトロ活性アッセイの順相TLC分離物のホスフオイメージ解析。反応物を表示した時間にわたり泳動させ、HIPプロトコールを用いて脂質を抽出した。

【図 3】



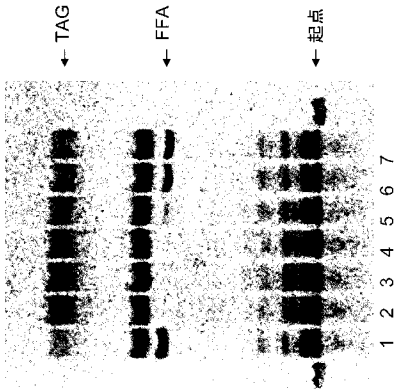
FAS-KO株のインピトロ活性アッセイの順相TLC分離物のホスフオイメージ解析。標準的なアッセイ成分を用いたが、NADH、NADPHおよびアセチル-CoA成分については変化させた。これらの成分に含まれるのは以下の通りである：レーン1 - NADH/NADPH/アセチル-CoA、レーン2 - NADH/NADPH/アセチル-CoA、レーン3 - NADH/NADPH/アセチル-CoA、レーン4 - NADH/NADPH、レーン5 - なし。

【図 4】



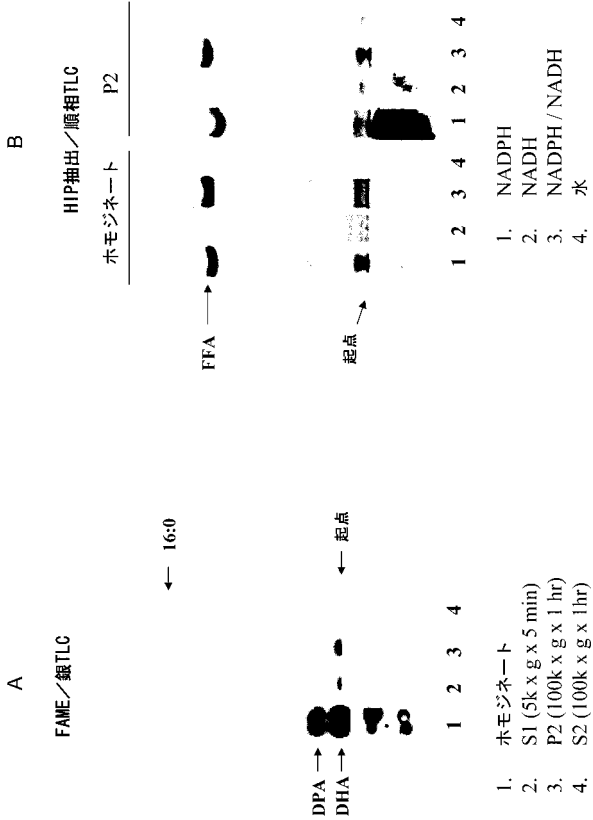
FAS-KO株のインピトロ活性アッセイの順相TLC分離物のホスフオイメージ解析。反応物を10分間泳動させ、続いてATPおよびMg<sup>2+</sup>を添加した。反応は下欄に表示した時点で停止させ（＝1秒、1分、3分、10分）、HIPプロトコールを用いて脂質を抽出した。

【図 5】

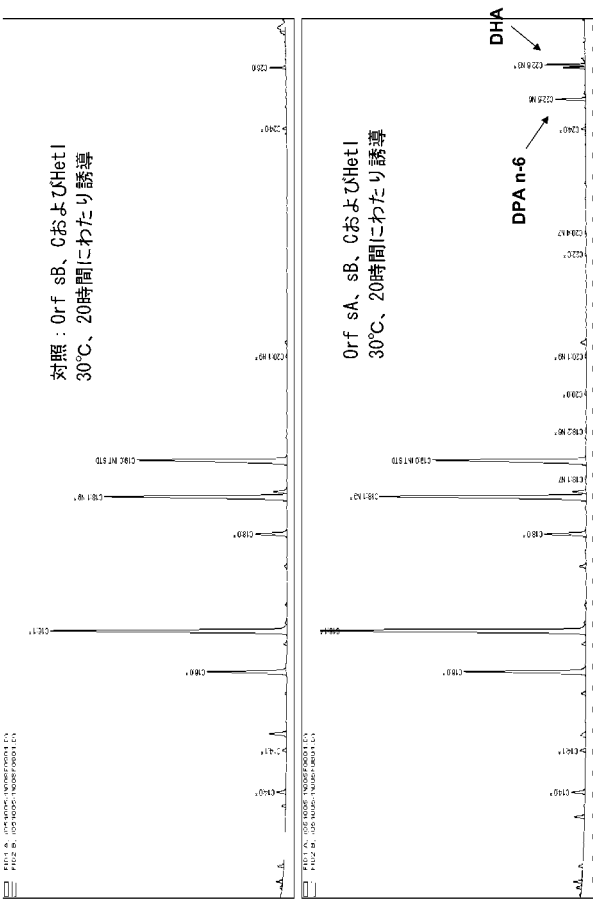


FAS-K0株のインビトロ活性アッセイの順相TLC分離物のホスホイメージ分析。反応物を10分間泳動させて、ATP およびMg+2を添加し（試料1を除く）、インキュベーションをさらに20分間続けた。加えて、以下の試料は以下を含む：レーン3 - 2μLのDMSO、レーン4 - 4μLのDMSO、レーン5 - 25μMのトリアシンG、レーン6 - 100μMのトリアシンG、レーン7 - 200μMのトリアシンG。トリアシンGはDMSO中の濃縮溶液から添加した。反応を停止させ、HIPプロトコルを用いて脂質を抽出した。

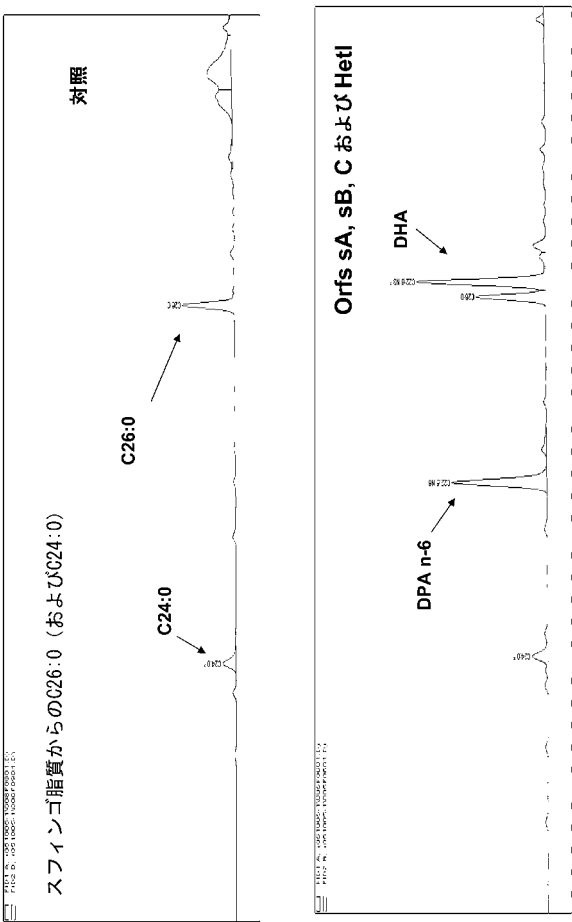
【図 6】



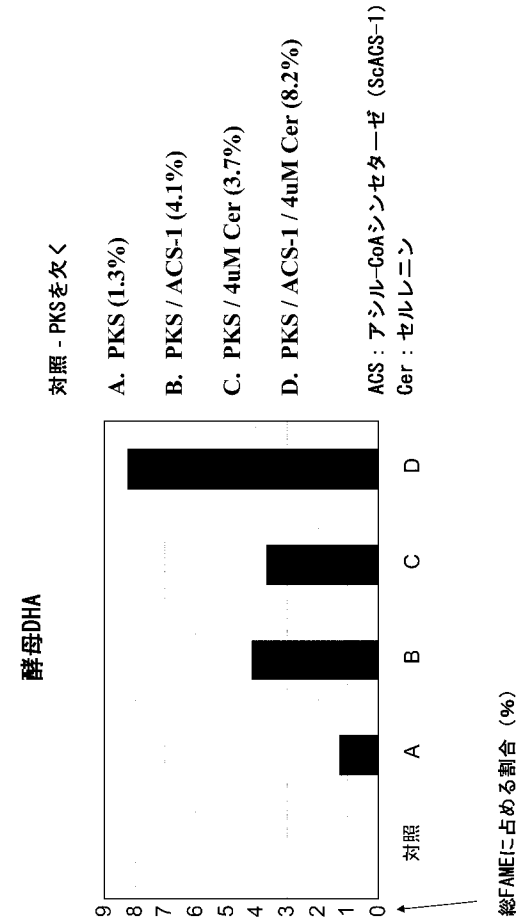
【図 7】



【図 8】



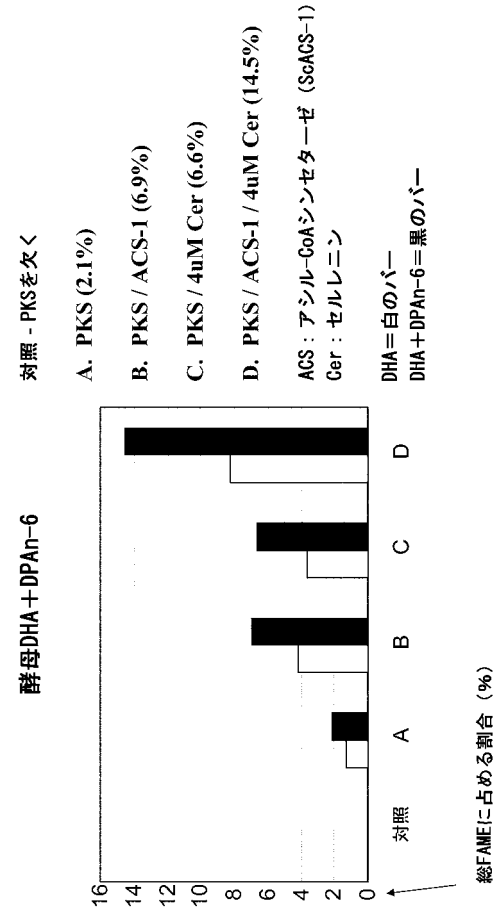
【図 9】



【図 11】



【図 10】



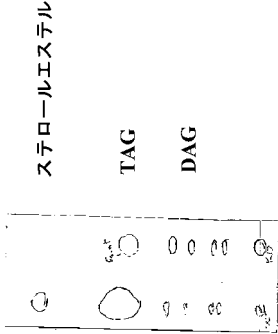
【図 12】

脂質クラスのプロフィール

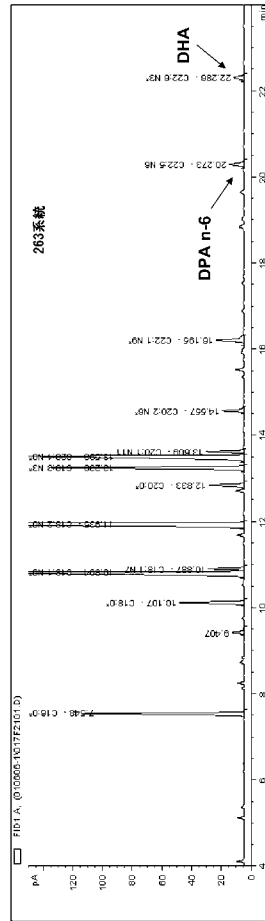
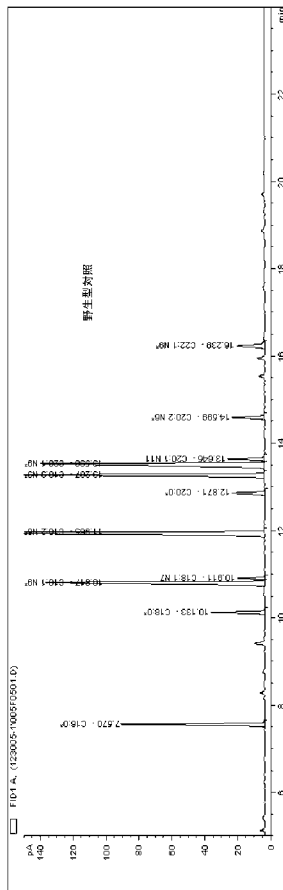
脂質ID	WT	KO
脂肪酸、例えば スクアレン	野生型 20883	DAGAT1 KO E73-8
ステロールエステル	ND	7.8
トリグリセリド	2.6	ND
FFA	56.5	4.0
ジグリセリド	ND	0.8
リン脂質	2.2	6.8
総回収率	17.7	42.3
バーセントとして報告 = (特定の脂質クラスの重量 / 総回収率) × 100	79.0	61.7

ND = 検出されず、検出限界以下

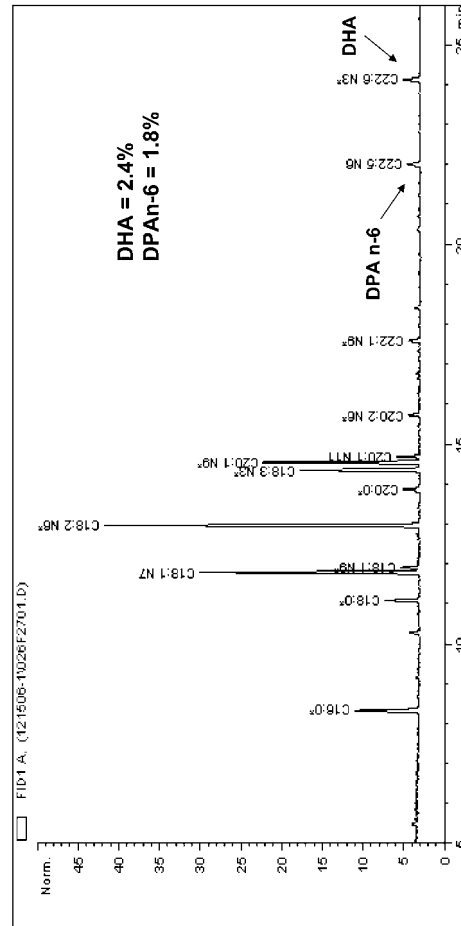
TLC / ヨード染色 - 脂質抽出物



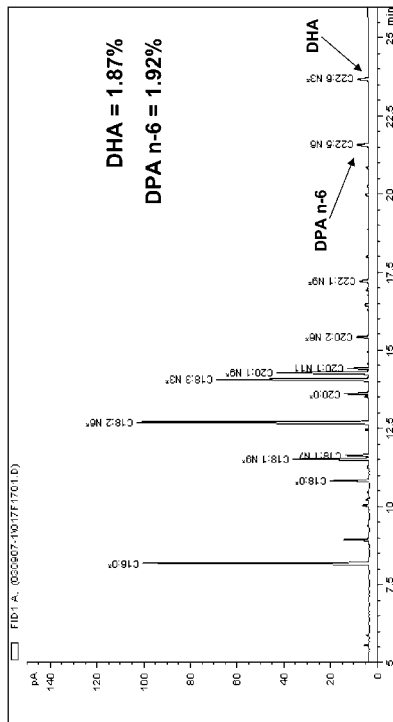
【図 13】



【図 14】



【図 15】





## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
<b>C 1 2 N</b>	<b>5/10</b>	<b>(2006.01)</b>
<b>A 0 1 H</b>	<b>5/00</b>	<b>(2006.01)</b>
<b>A 0 1 K</b>	<b>67/027</b>	<b>(2006.01)</b>
<b>C 1 2 P</b>	<b>7/64</b>	<b>(2006.01)</b>

C 1 2 N	5/00	1 0 1
A 0 1 H	5/00	A
A 0 1 K	67/027	
C 1 2 P	7/64	

(74)代理人 100148699  
弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048  
弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506  
弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100130845  
弁理士 渡邊 伸一

(74)代理人 100114340  
弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889  
弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072  
弁理士 川本 和弥

(72)発明者 メッズ ジェイムズ ジー .  
アメリカ合衆国 コロラド州 ロングモント イースト 第16 アベニュー 542

(72)発明者 クーネル ジェリー エム .  
アメリカ合衆国 コロラド州 ロングモント ノース 第63 ストリート 6469

(72)発明者 リップマイア ジェイムズ ケーシー  
アメリカ合衆国 メリーランド州 コロンビア レースゲイト ラン 5364

審査官 名和 大輔

(56)参考文献 Plant Physiol.,2005,138(1),p.402-8

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0  
C A p l u s / B I O S I S / M E D L I N E ( S T N )  
W P I