

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5890687号  
(P5890687)

(45) 発行日 平成28年3月22日 (2016. 3. 22)

(24) 登録日 平成28年2月26日 (2016. 2. 26)

(51) Int. Cl.

F 1

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 13 (全 62 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2011-552820 (P2011-552820)  
 (86) (22) 出願日 平成23年2月3日 (2011. 2. 3)  
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2011/052258  
 (87) 国際公開番号 W02011/096481  
 (87) 国際公開日 平成23年8月11日 (2011. 8. 11)  
 審査請求日 平成25年8月29日 (2013. 8. 29)  
 (31) 優先権主張番号 特願2010-22125 (P2010-22125)  
 (32) 優先日 平成22年2月3日 (2010. 2. 3)  
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(73) 特許権者 309007911  
 サントリーホールディングス株式会社  
 大阪府大阪市北区堂島浜二丁目1番40号  
 (74) 代理人 100140109  
 弁理士 小野 新次郎  
 (74) 代理人 100075270  
 弁理士 小林 泰  
 (74) 代理人 100096013  
 弁理士 富田 博行  
 (74) 代理人 100092967  
 弁理士 星野 修  
 (74) 代理人 100118902  
 弁理士 山本 修  
 (74) 代理人 100128750  
 弁理士 廣瀬 しのぶ

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 グリセロール-3-リン酸アシル基転移酵素ホモログとその利用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の (a) ~ (g) のいずれかに記載の核酸。

(a) 配列番号 2、配列番号 5 又は配列番号 9 で示されるアミノ酸配列において 1 ~ 80 個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、グリセロール-3-リン酸アシル基転移酵素活性及び／又はグリセロンホスフェートアシル基転移酵素活性を有するタンパク質をコードする塩基配列を含む核酸

(b) 配列番号 1、配列番号 4 又は配列番号 8 からなる塩基配列に対し相補的な塩基配列からなる核酸と 0. 1 × SSC、65 °C の条件下でハイブリダイズし、かつ、グリセロール-3-リン酸アシル基転移酵素活性及び／又はグリセロンホスフェートアシル基転移酵素活性を有するタンパク質をコードする塩基配列を含む核酸

(c) 配列番号 1、配列番号 4 又は配列番号 8 からなる塩基配列と同一性が 90 % 以上の塩基配列からなり、かつ、グリセロール-3-リン酸アシル基転移酵素活性及び／又はグリセロンホスフェートアシル基転移酵素活性を有するタンパク質をコードする塩基配列を含む核酸

(d) 配列番号 2、配列番号 5 又は配列番号 9 からなるアミノ酸配列と同一性が 90 % 以上のアミノ酸配列からなり、かつ、グリセロール-3-リン酸アシル基転移酵素活性及び／又はグリセロンホスフェートアシル基転移酵素活性を有するタンパク質をコードする塩基配列を含む核酸

(e) 配列番号 2、配列番号 5 又は配列番号 9 で示されるアミノ酸配列からなるタンパク

10

20

質をコードする塩基配列に対し相補的な塩基配列からなる核酸と 0.1 × SSC、65℃の条件下でハイブリダイズし、かつ、グリセロール-3-リン酸アシル基転移酵素活性及び／又はグリセロンホスフェートアシル基転移酵素活性を有するタンパク質をコードする塩基配列を含む核酸

(f) 配列番号 7 又は配列番号 12 からなる塩基配列に対し相補的な塩基配列からなる核酸と 0.1 × SSC、65℃の条件下でハイブリダイズし、かつ、グリセロール-3-リン酸アシル基転移酵素活性及び／又はグリセロンホスフェートアシル基転移酵素活性を有するタンパク質をコードするエクソンを有する塩基配列を含む核酸

(g) 配列番号 7 又は配列番号 12 からなる塩基配列と同一性が 90% 以上の塩基配列からなり、かつ、グリセロール-3-リン酸アシル基転移酵素活性及び／又はグリセロンホスフェートアシル基転移酵素活性を有するタンパク質をコードするエクソンを有する塩基配列を含む核酸

10

#### 【請求項 2】

以下の (a) ~ (d) のいずれかである、請求項 1 に記載の核酸。

(a) 配列番号 2、配列番号 5 又は配列番号 9 で示されるアミノ酸配列において 1 ~ 50 個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、グリセロール-3-リン酸アシル基転移酵素活性及び／又はグリセロンホスフェートアシル基転移酵素活性を有するタンパク質をコードする塩基配列を含む核酸

(b) 配列番号 1、配列番号 4 又は配列番号 8 からなる塩基配列と同一性が 95% 以上の塩基配列からなり、かつ、グリセロール-3-リン酸アシル基転移酵素活性及び／又はグリセロンホスフェートアシル基転移酵素活性を有するタンパク質をコードする塩基配列を含む核酸

20

(c) 配列番号 2、配列番号 5 又は配列番号 9 からなるアミノ酸配列と同一性が 95% 以上のアミノ酸配列からなり、かつ、グリセロール-3-リン酸アシル基転移酵素活性及び／又はグリセロンホスフェートアシル基転移酵素活性を有するタンパク質をコードする塩基配列を含む核酸

(d) 配列番号 7 又は配列番号 12 からなる塩基配列と同一性が 95% 以上の塩基配列からなり、かつ、グリセロール-3-リン酸アシル基転移酵素活性及び／又はグリセロンホスフェートアシル基転移酵素活性を有するタンパク質をコードするエクソンを有する塩基配列を含む核酸

30

#### 【請求項 3】

以下の (a) ~ (d) のいずれかに記載の核酸。

(a) 配列番号 1、配列番号 4 又は配列番号 8 で示される塩基配列を含む核酸

(b) 配列番号 2、配列番号 5 又は配列番号 9 で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含む核酸

(c) 配列番号 3、配列番号 6 又は配列番号 11 で示される塩基配列を含む核酸

(d) 配列番号 7 又は配列番号 12 で示される塩基配列を含む核酸

#### 【請求項 4】

以下の (a) ~ (g) のいずれかに記載の核酸。

(a) 配列番号 2、配列番号 5 又は配列番号 9 で示されるアミノ酸配列において 1 ~ 80 個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、以下の i) ないし v) のいずれかの活性を有するタンパク質をコードする塩基配列を含む核酸

40

i) 前記タンパク質を発現させた酵母の脂肪酸組成において、前記タンパク質を発現していない宿主の脂肪酸組成と比較して、パルミチン酸の比率が高く、パルミトレイン酸の比率が低い脂肪酸組成を形成できる活性

ii) 前記タンパク質を発現させた酵母の脂肪酸含有率が、前記タンパク質を発現していない宿主の脂肪酸含有率と比較して高い含有率を達成する活性

iii) 前記タンパク質を発現させた酵母のトリアシルグリセロール (TG) 量が、前記タンパク質を発現していない宿主の TG 量と比較して高い TG 量を達成する活性

iv) 酵母 (*S. cerevisiae*) のグリセロール-3-リン酸アシル基転移酵素欠損 (以下、

50

「G P A T 欠損」と記載する場合もある)を相補する活性

v) 前記タンパク質をコードする核酸を含有する組換えベクターによって形質転換された宿主におけるアラキドン酸の生産量を、前記ベクターで形質転換されていない宿主における生産量よりも高めることができる活性

(b) 配列番号1、配列番号4又は配列番号8からなる塩基配列に対し相補的な塩基配列からなる核酸と0.1×SSC、65℃の条件下でハイブリダイズし、かつ、以下のi)ないしv)のいずれかの活性を有するタンパク質をコードする塩基配列を含む核酸

i) 前記タンパク質を発現させた酵母の脂肪酸組成において、前記タンパク質を発現していない宿主の脂肪酸組成と比較して、パルミチン酸の比率が高く、パルミトレイン酸の比率が低い脂肪酸組成を形成できる活性

ii) 前記タンパク質を発現させた酵母の脂肪酸含有率が、前記タンパク質を発現していない宿主の脂肪酸含有率と比較して高い含有率を達成する活性

iii) 前記タンパク質を発現させた酵母のトリアシルグリセロール(TG)量が、前記タンパク質を発現していない宿主のTG量と比較して高いTG量を達成する活性

iv) 酵母(*S. cerevisiae*)のG P A T 欠損を相補する活性

v) 前記タンパク質をコードする核酸を含有する組換えベクターによって形質転換された宿主におけるアラキドン酸の生産量を、前記ベクターで形質転換されていない宿主における生産量よりも高めることができる活性

(c) 配列番号1、配列番号4又は配列番号8からなる塩基配列と同一性が90%以上の塩基配列からなり、かつ、以下のi)ないしv)のいずれかの活性を有するタンパク質をコードする塩基配列を含む核酸

i) 前記タンパク質を発現させた酵母の脂肪酸組成において、前記タンパク質を発現していない宿主の脂肪酸組成と比較して、パルミチン酸の比率が高く、パルミトレイン酸の比率が低い脂肪酸組成を形成できる活性

ii) 前記タンパク質を発現させた酵母の脂肪酸含有率が、前記タンパク質を発現していない宿主の脂肪酸含有率と比較して高い含有率を達成する活性

iii) 前記タンパク質を発現させた酵母のトリアシルグリセロール(TG)量が、前記タンパク質を発現していない宿主のTG量と比較して高いTG量を達成する活性

iv) 酵母(*S. cerevisiae*)のG P A T 欠損を相補する活性

v) 前記タンパク質をコードする核酸を含有する組換えベクターによって形質転換された宿主におけるアラキドン酸の生産量を、前記ベクターで形質転換されていない宿主における生産量よりも高めることができる活性

(d) 配列番号2、配列番号5又は配列番号9からなるアミノ酸配列と同一性が90%以上のアミノ酸配列からなり、かつ、以下のi)ないしv)のいずれかの活性を有するタンパク質をコードする塩基配列を含む核酸

i) 前記タンパク質を発現させた酵母の脂肪酸組成において、前記タンパク質を発現していない宿主の脂肪酸組成と比較して、パルミチン酸の比率が高く、パルミトレイン酸の比率が低い脂肪酸組成を形成できる活性

ii) 前記タンパク質を発現させた酵母の脂肪酸含有率が、前記タンパク質を発現していない宿主の脂肪酸含有率と比較して高い含有率を達成する活性

iii) 前記タンパク質を発現させた酵母のトリアシルグリセロール(TG)量が、前記タンパク質を発現していない宿主のTG量と比較して高いTG量を達成する活性

iv) 酵母(*S. cerevisiae*)のG P A T 欠損を相補する活性

v) 前記タンパク質をコードする核酸を含有する組換えベクターによって形質転換された宿主におけるアラキドン酸の生産量を、前記ベクターで形質転換されていない宿主における生産量よりも高めることができる活性

(e) 配列番号2、配列番号5又は配列番号9で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列に対し相補的な塩基配列からなる核酸と0.1×SSC、65℃の条件下でハイブリダイズし、かつ、以下のi)ないしv)のいずれかの活性を有するタンパク質をコードする塩基配列を含む核酸

10

20

30

40

50

- i) 前記タンパク質を発現させた酵母の脂肪酸組成において、前記タンパク質を発現していない宿主の脂肪酸組成と比較して、パルミチン酸の比率が高く、パルミトレイン酸の比率が低い脂肪酸組成を形成できる活性
- ii) 前記タンパク質を発現させた酵母の脂肪酸含有率が、前記タンパク質を発現していない宿主の脂肪酸含有率と比較して高い含有率を達成する活性
- iii) 前記タンパク質を発現させた酵母のトリアシルグリセロール (TG) 量が、前記タンパク質を発現していない宿主の TG 量と比較して高い TG 量を達成する活性
- iv) 酵母 (*S. cerevisiae*) の GPAT 欠損を相補する活性
- v) 前記タンパク質をコードする核酸を含有する組換えベクターによって形質転換された宿主におけるアラキドン酸の生産量を、前記ベクターで形質転換されていない宿主における生産量よりも高めることができる活性

10

(f) 配列番号 7 又は配列番号 12 からなる塩基配列に対し相補的な塩基配列からなる核酸と 0.1 × SSC、65 °C の条件下でハイブリダイズし、かつ、以下の i) ないし v) のいずれかの活性を有するタンパク質をコードするエクソンを有する塩基配列を含む核酸

- i) 前記タンパク質を発現させた酵母の脂肪酸組成において、前記タンパク質を発現していない宿主の脂肪酸組成と比較して、パルミチン酸の比率が高く、パルミトレイン酸の比率が低い脂肪酸組成を形成できる活性
- ii) 前記タンパク質を発現させた酵母の脂肪酸含有率が、前記タンパク質を発現していない宿主の脂肪酸含有率と比較して高い含有率を達成する活性
- iii) 前記タンパク質を発現させた酵母のトリアシルグリセロール (TG) 量が、前記タンパク質を発現していない宿主の TG 量と比較して高い TG 量を達成する活性
- iv) 酵母 (*S. cerevisiae*) の GPAT 欠損を相補する活性
- v) 前記タンパク質をコードする核酸を含有する組換えベクターによって形質転換された宿主におけるアラキドン酸の生産量を、前記ベクターで形質転換されていない宿主における生産量よりも高めることができる活性

20

(g) 配列番号 7 又は配列番号 12 からなる塩基配列と同一性が 90 % 以上の塩基配列からなり、かつ、以下の i) ないし v) のいずれかの活性を有するタンパク質をコードするエクソンを有する塩基配列を含む核酸

- i) 前記タンパク質を発現させた酵母の脂肪酸組成において、前記タンパク質を発現していない宿主の脂肪酸組成と比較して、パルミチン酸の比率が高く、パルミトレイン酸の比率が低い脂肪酸組成を形成できる活性
- ii) 前記タンパク質を発現させた酵母の脂肪酸含有率が、前記タンパク質を発現していない宿主の脂肪酸含有率と比較して高い含有率を達成する活性
- iii) 前記タンパク質を発現させた酵母のトリアシルグリセロール (TG) 量が、前記タンパク質を発現していない宿主の TG 量と比較して高い TG 量を達成する活性
- iv) 酵母 (*S. cerevisiae*) の GPAT 欠損を相補する活性
- v) 前記タンパク質をコードする核酸を含有する組換えベクターによって形質転換された宿主におけるアラキドン酸の生産量を、前記ベクターで形質転換されていない宿主における生産量よりも高めることができる活性

30

#### 【請求項 5】

40

以下の (a) ~ (d) のいずれかである、請求項 4 に記載の核酸。

(a) 配列番号 2、配列番号 5 又は配列番号 9 で示されるアミノ酸配列において 1 ~ 50 個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、以下の i) ないし v) のいずれかの活性を有するタンパク質をコードするエクソンを有する塩基配列を含む核酸

- i) 前記タンパク質を発現させた酵母の脂肪酸組成において、前記タンパク質を発現していない宿主の脂肪酸組成と比較して、パルミチン酸の比率が高く、パルミトレイン酸の比率が低い脂肪酸組成を形成できる活性
- ii) 前記タンパク質を発現させた酵母の脂肪酸含有率が、前記タンパク質を発現していない宿主の脂肪酸含有率と比較して高い含有率を達成する活性

50

iii) 前記タンパク質を発現させた酵母のトリアシルグリセロール (TG) 量が、前記タンパク質を発現していない宿主の TG 量と比較して高い TG 量を達成する活性

iv) 酵母 (*S. cerevisiae*) の GPAT 欠損を相補する活性

v) 前記タンパク質をコードする核酸を含有する組換えベクターによって形質転換された宿主におけるアラキドン酸の生産量を、前記ベクターで形質転換されていない宿主における生産量よりも高めることができる活性

(b) 配列番号 1、配列番号 4 又は配列番号 8 からなる塩基配列と同一性が 95% 以上の塩基配列からなり、かつ、以下の i) ないし v) のいずれかの活性を有するタンパク質をコードするエクソンを有する塩基配列を含む核酸

i) 前記タンパク質を発現させた酵母の脂肪酸組成において、前記タンパク質を発現していない宿主の脂肪酸組成と比較して、パルミチン酸の比率が高く、パルミトレイン酸の比率が低い脂肪酸組成を形成できる活性

ii) 前記タンパク質を発現させた酵母の脂肪酸含有率が、前記タンパク質を発現していない宿主の脂肪酸含有率と比較して高い含有率を達成する活性

iii) 前記タンパク質を発現させた酵母のトリアシルグリセロール (TG) 量が、前記タンパク質を発現していない宿主の TG 量と比較して高い TG 量を達成する活性

iv) 酵母 (*S. cerevisiae*) の GPAT 欠損を相補する活性

v) 前記タンパク質をコードする核酸を含有する組換えベクターによって形質転換された宿主におけるアラキドン酸の生産量を、前記ベクターで形質転換されていない宿主における生産量よりも高めることができる活性

(c) 配列番号 2、配列番号 5 又は配列番号 9 からなるアミノ酸配列と同一性が 95% 以上のアミノ酸配列からなり、かつ、以下の i) ないし v) のいずれかの活性を有するタンパク質をコードするエクソンを有する塩基配列を含む核酸

i) 前記タンパク質を発現させた酵母の脂肪酸組成において、前記タンパク質を発現していない宿主の脂肪酸組成と比較して、パルミチン酸の比率が高く、パルミトレイン酸の比率が低い脂肪酸組成を形成できる活性

ii) 前記タンパク質を発現させた酵母の脂肪酸含有率が、前記タンパク質を発現していない宿主の脂肪酸含有率と比較して高い含有率を達成する活性

iii) 前記タンパク質を発現させた酵母のトリアシルグリセロール (TG) 量が、前記タンパク質を発現していない宿主の TG 量と比較して高い TG 量を達成する活性

iv) 酵母 (*S. cerevisiae*) の GPAT 欠損を相補する活性

v) 前記タンパク質をコードする核酸を含有する組換えベクターによって形質転換された宿主におけるアラキドン酸の生産量を、前記ベクターで形質転換されていない宿主における生産量よりも高めることができる活性

(d) 配列番号 7 又は配列番号 12 からなる塩基配列と同一性が 95% 以上の塩基配列からなり、かつ、以下の i) ないし v) のいずれかの活性を有するタンパク質をコードするエクソンを有する塩基配列を含む核酸

i) 前記タンパク質を発現させた酵母の脂肪酸組成において、前記タンパク質を発現していない宿主の脂肪酸組成と比較して、パルミチン酸の比率が高く、パルミトレイン酸の比率が低い脂肪酸組成を形成できる活性

ii) 前記タンパク質を発現させた酵母の脂肪酸含有率が、前記タンパク質を発現していない宿主の脂肪酸含有率と比較して高い含有率を達成する活性

iii) 前記タンパク質を発現させた酵母のトリアシルグリセロール (TG) 量が、前記タンパク質を発現していない宿主の TG 量と比較して高い TG 量を達成する活性

iv) 酵母 (*S. cerevisiae*) の GPAT 欠損を相補する活性

v) 前記タンパク質をコードする核酸を含有する組換えベクターによって形質転換された宿主におけるアラキドン酸の生産量を、前記ベクターで形質転換されていない宿主における生産量よりも高めることができる活性

#### 【請求項 6】

以下の (a) 又は (b) のいずれかに記載のタンパク質。

(a) 配列番号 2、配列番号 5 又は配列番号 9 において 1～80 個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、グリセロール-3-リン酸アシル基転移酵素活性及び／又はグリセロンホスフェートアシル基転移酵素活性を有するタンパク質

(b) 配列番号 2、配列番号 5 又は配列番号 9 からなるアミノ酸配列と同一性が 90% 以上のアミノ酸配列からなるタンパク質であり、かつ、グリセロール-3-リン酸アシル基転移酵素活性及び／又はグリセロンホスフェートアシル基転移酵素活性を有するタンパク質

【請求項 7】

以下の (a) 又は (b) のいずれかに記載のタンパク質。

10

(a) 配列番号 2、配列番号 5 又は配列番号 9 において 1～50 個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、グリセロール-3-リン酸アシル基転移酵素活性及び／又はグリセロンホスフェートアシル基転移酵素活性を有するタンパク質

(b) 配列番号 2、配列番号 5 又は配列番号 9 からなるアミノ酸配列と同一性が 95% 以上のアミノ酸配列からなるタンパク質であり、かつ、グリセロール-3-リン酸アシル基転移酵素活性及び／又はグリセロンホスフェートアシル基転移酵素活性を有するタンパク質

【請求項 8】

以下の (a) 又は (b) のいずれかに記載のタンパク質。

20

(a) 配列番号 2、配列番号 5 又は配列番号 9 において 1～80 個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、以下の i) ないし v) のいずれかの活性を有するタンパク質

i) 前記タンパク質を発現させた酵母の脂肪酸組成において、前記タンパク質を発現していない宿主の脂肪酸組成と比較して、パルミチン酸の比率が高く、パルミトレイン酸の比率が低い脂肪酸組成を形成できる活性

ii) 前記タンパク質を発現させた酵母の脂肪酸含有率が、前記タンパク質を発現していない宿主の脂肪酸含有率と比較して高い含有率を達成する活性

iii) 前記タンパク質を発現させた酵母のトリアシルグリセロール (TG) 量が、前記タンパク質を発現していない宿主の TG 量と比較して高い TG 量を達成する活性

30

iv) 酵母 (*S. cerevisiae*) の GPAT 欠損を相補する活性

v) 前記タンパク質をコードする核酸を含有する組換えベクターによって形質転換された宿主におけるアラキドン酸の生産量を、前記ベクターで形質転換されていない宿主における生産量よりも高めることができる活性

(b) 配列番号 2、配列番号 5 又は配列番号 9 からなるアミノ酸配列と同一性が 90% 以上のアミノ酸配列からなるタンパク質であり、かつ、以下の i) ないし v) のいずれかの活性を有するタンパク質

i) 前記タンパク質を発現させた酵母の脂肪酸組成において、前記タンパク質を発現していない宿主の脂肪酸組成と比較して、パルミチン酸の比率が高く、パルミトレイン酸の比率が低い脂肪酸組成を形成できる活性

40

ii) 前記タンパク質を発現させた酵母の脂肪酸含有率が、前記タンパク質を発現していない宿主の脂肪酸含有率と比較して高い含有率を達成する活性

iii) 前記タンパク質を発現させた酵母のトリアシルグリセロール (TG) 量が、前記タンパク質を発現していない宿主の TG 量と比較して高い TG 量を達成する活性

iv) 酵母 (*S. cerevisiae*) の GPAT 欠損を相補する活性

v) 前記タンパク質をコードする核酸を含有する組換えベクターによって形質転換された宿主におけるアラキドン酸の生産量を、前記ベクターで形質転換されていない宿主における生産量よりも高めることができる活性

【請求項 9】

以下の (a) 又は (b) のいずれかに記載のタンパク質。

50

(a) 配列番号 2、配列番号 5 又は配列番号 9 において 1～50 個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、以下の i)ないし v)のいずれかの活性を有するタンパク質

i) 前記タンパク質を発現させた酵母の脂肪酸組成において、前記タンパク質を発現していない宿主の脂肪酸組成と比較して、パルミチン酸の比率が高く、パルミトレイン酸の比率が低い脂肪酸組成を形成できる活性

ii) 前記タンパク質を発現させた酵母の脂肪酸含有率が、前記タンパク質を発現していない宿主の脂肪酸含有率と比較して高い含有率を達成する活性

iii) 前記タンパク質を発現させた酵母のトリアシルグリセロール (TG) 量が、前記タンパク質を発現していない宿主の TG 量と比較して高い TG 量を達成する活性

iv) 酵母 (*S. cerevisiae*) の GPAT 欠損を相補する活性

v) 前記タンパク質をコードする核酸を含有する組換えベクターによって形質転換された宿主におけるアラキドン酸の生産量を、前記ベクターで形質転換されていない宿主における生産量よりも高めることができる活性

10

(b) 配列番号 2、配列番号 5 又は配列番号 9 からなるアミノ酸配列と同一性が 95% 以上のアミノ酸配列からなるタンパク質であり、かつ、以下の i)ないし v)のいずれかの活性を有するタンパク質

i) 前記タンパク質を発現させた酵母の脂肪酸組成において、前記タンパク質を発現していない宿主の脂肪酸組成と比較して、パルミチン酸の比率が高く、パルミトレイン酸の比率が低い脂肪酸組成を形成できる活性

20

ii) 前記タンパク質を発現させた酵母の脂肪酸含有率が、前記タンパク質を発現していない宿主の脂肪酸含有率と比較して高い含有率を達成する活性

iii) 前記タンパク質を発現させた酵母のトリアシルグリセロール (TG) 量が、前記タンパク質を発現していない宿主の TG 量と比較して高い TG 量を達成する活性

iv) 酵母 (*S. cerevisiae*) の GPAT 欠損を相補する活性

v) 前記タンパク質をコードする核酸を含有する組換えベクターによって形質転換された宿主におけるアラキドン酸の生産量を、前記ベクターで形質転換されていない宿主における生産量よりも高めることができる活性

#### 【請求項 10】

配列番号 2、配列番号 5 又は配列番号 9 で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

30

#### 【請求項 11】

請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の核酸を含有する組換えベクター。

#### 【請求項 12】

請求項 11 に記載の組換えベクターによって形質転換された形質転換体。

#### 【請求項 13】

請求項 12 に記載の形質転換体を培養して得られる培養物から脂肪酸又は脂質を採取することを特徴とする、脂肪酸組成物の製造方法。

#### 【発明の詳細な説明】

#### 【技術分野】

#### 【0001】

40

本発明は、新規なアシル基転移酵素遺伝子とその利用に関する。本発明のアシル基転移酵素遺伝子は、グリセロール-3-リン酸アシル基転移酵素 (GPAT) 遺伝子及び／又はグリセロンホスフェート-O-アシル基転移酵素 (GNPAT) 遺伝子であってよい。

#### 【背景技術】

#### 【0002】

脂肪酸は、リン脂質やトリアシルグリセロール等脂質を構成する重要な成分である。不飽和結合を 2 箇所以上含有する脂肪酸は、高度不飽和脂肪酸 (PUFA) と総称される。具体例としては、アラキドン酸やジホモγ-リノレン酸、エイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸等が知られており、様々な生理活性が報告されている (非特許文献 1)。この高度不飽和脂肪酸のうち、いくつかの種類は、動物が体内で合成することができない。

50

従って、このような高度不飽和脂肪酸については、必須脂肪酸として食物から摂取する必要がある。

#### 【0003】

動物体内において、高度不飽和脂肪酸は多種多様な臓器及び組織に含まれている。例えば、アラキドン酸は動物の副腎腺や肝臓から抽出した脂質から分離される。しかしながら、動物臓器には高度不飽和脂肪酸は少量しか含まれていないため、動物臓器から抽出・分離される高度不飽和脂肪酸だけでは、十分な供給量を得ることができない。そのため、種々の微生物を培養して高度不飽和脂肪酸を獲得する方法が開発されてきた。中でもモルティエラ (*Mortierella*) 属微生物は、アラキドン酸等の高度不飽和脂肪酸含有脂質を効率的に生産する微生物として知られている。また、植物で高度不飽和脂肪酸を生産させる試みもなされている。高度不飽和脂肪酸は、トリアシルグリセロール等の貯蔵脂質を構成し、微生物の菌体内若しくは植物種子中に蓄積されることが知られている。

10

#### 【0004】

貯蔵脂質であるトリアシルグリセロールは、生体内で以下のように生成される。グリセロール-3-リン酸アシル基転移酵素によりグリセロール-3-リン酸にアシル基が転移されてリゾホスファチジン酸が生じる。次に、リゾホスファチジン酸アシル基転移酵素によりリゾホスファチジン酸にアシル基が転移されてホスファチジン酸が生じる。そして、ホスファチジン酸が、ホスファチジン酸ホスファターゼにより脱リン酸化されることによってジアシルグリセロールが生じる。最後に、ジアシルグリセロールアシル基転移酵素によりジアシルグリセロールにアシル基が転移されてトリアシルグリセロールが生じる。

20

#### 【0005】

上記のトリアシルグリセロール生合成経路やリン脂質生合成経路において、グリセロール-3-リン酸のアシル化によりリゾホスファチジン酸 (lysophosphatidic acid) が生成する反応には、グリセロール-3-リン酸アシル基転移酵素 (以下、「G P A T」と記載する場合もある。: EC 2.3.1.15) が介在することが知られている。

#### 【0006】

G P A T 遺伝子の存在はこれまでにいくつかの生物で報告されている。哺乳動物由来の G P A T 遺伝子として、小胞体型 (膜結合型) とミトコンドリア型 (膜結合型) の 2 種類がクローン化されている (非特許文献 2)。また、植物由来の G P A T 遺伝子として小胞体型 (膜結合型)、ミトコンドリア型 (膜結合型) 及び葉緑体型 (遊離型) の 3 種類がクローン化されている (非特許文献 3)。

30

#### 【0007】

真菌である *Saccharomyces cerevisiae* 由来の G P A T 遺伝子として、小胞体型 (膜結合型) の GPT2/GAT1 (YKR067w) と SCT1/GAT2 (YBL011w) の 2 種類がクローン化されており、これらを同時に欠失させると致死であることが知られている。(非特許文献 4)。ここで、GPT2 はパルミチン酸 (16:0) からオレイン酸 (18:1) に至るまで、幅広い範囲の脂肪酸を基質とする活性を有するのに対し、SCT1 はパルミチン酸 (16:0)、パルミトレイン酸 (16:1) といった炭素数 16 の脂肪酸を基質とすることに強い選択性を有することが示されている (非特許文献 4)。

#### 【0008】

上記の他にも多くの生物種から G P A T 遺伝子はクローン化されている。特に、脂質生産菌であるモルティエラ (*Mortierella*) 属微生物由来の G P A T についても以下のような報告がある。

40

#### 【0009】

*Mortierella ramanniana* 由来の G P A T については、小胞体型 G P A T が単離され、これがパルミチン酸 (16:0) よりもオレイン酸 (18:1) を 5.4 倍高い選択性をもってアシルドナーとして利用することが示されている (非特許文献 5)。*Mortierella alpina* (以下、「*M. alpina*」又は「モルティエラ アルピナ」と記載する場合もある) 由来の G P A T については、ミクロソーム画分にグリセロール-3-リン酸アシル基転移酵素活性があることが報告されている (非特許文献 6)。

50

## 【0010】

M. alpinaのミクロソームに存在するGPAT（膜に結合している状態）と種々のアシルCoAをインビトロで反応させると、GPATは、高い活性を維持したまま、オレイン酸（18:1）、リノール酸（18:2）、ジホモγ-リノレン酸（DGLA）（20:3）、アラキドン酸（20:4）といった高度不飽和脂肪酸を広く基質として用いることが示されている（特許文献1）。

## 【0011】

M. alpina (ATCC #16266) からクローニングされたGPAT（以下、本明細書ではMaGPAT1(ATCC #16266) と記載する）を、エイコサペンタエン酸（EPA）まで生合成できるように形質転換されたYarrowia lipolytica内で発現させたところ、総脂肪酸の内、ジホモγ-リノレン酸（DGLA）（20:3）の組成が増加し、オレイン酸（18:1）の組成が減少することが示された。この結果は、より長鎖で不飽和度の高い高度不飽和脂肪酸が選択的に取り込まれていることを示すものである（特許文献2）。

10

## 【0012】

近年、M. alpina (1S-4株) からGPATホモログであるMaGPAT2が単離され、MaGPAT1とは異なる基質特異性を示すことが報告されている（特許文献3）。即ち、酵母で発現させた場合に、MaGPAT1は酵母が生産する脂質中のパルミチン酸の含有比率を増加させるのに対して、MaGPAT2は酵母が生産する脂質中のオレイン酸の含有比率を増加させる。

## 【先行技術文献】

## 【特許文献】

20

## 【0013】

【特許文献1】 国際公開第W02004/087902号パンフレット

【特許文献2】 米国特許出願公開第2006/0094091号明細書

【特許文献3】 国際公開第W02008/156026号パンフレット

## 【非特許文献】

## 【0014】

【非特許文献1】 Lipids, 39, 1147-1161, 2004

【非特許文献2】 Biochimica et Biophysica Acta, 1348, 17-26, 1997

【非特許文献3】 Biochimica et Biophysica Acta, 1348, 10-16, 1997

【非特許文献4】 The Journal of Biological Chemistry, 276 (45), 41710-41716, 2001

30

【非特許文献5】 The Biochemical Journal, 355, 315-322, 2001

【非特許文献6】 Biochemical Society Transactions, 28, 707-709, 2000

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0015】

これまでに報告されているGPAT遺伝子は、宿主細胞に導入して発現させても、その基質特異性により、宿主が産生する脂質組成物は限られていた。宿主細胞に導入する又は発現させることで所望の組成の脂肪酸組成物を産生しうる、新規な遺伝子を同定することが求められている。

## 【0016】

40

本発明の目的は、宿主細胞で発現又は導入することで、目的とする脂肪酸組成の油脂を製造させたり、目的とする脂肪酸の含有量を増加させたり、貯蔵脂質であるトリアシルグリセロール（TG）量を増加させたりできるようなタンパク質及び核酸を提供することである。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0017】

本発明者は、上記課題を解決するために鋭意研究を行った。まず、脂質生産菌Mortierella alpinaのゲノムを解析し、この中から既知のグリセロール-3-リン酸アシル基転移酵素（GPAT）遺伝子と同一性の高い配列を抽出した。さらに、GPATをコードするオープンリーディングフレーム（ORF）全長を取得するため、cDNAライブラリーの

50

スクリーニングあるいはPCRにより全長cDNAをクローニングした。それを酵母等の高増殖能を有する宿主細胞に導入して脂肪酸組成物の産生を試みた発明者は、従来のGPATが発現した宿主が産生する脂肪酸組成物と比較して、異なる脂肪酸組成物を生成させることができる、基質特異性が異なる新規なGPATに関する遺伝子のクローニングに成功し、発明を完成するに至った。すなわち、本発明は以下の通りである。

#### 【0018】

(1) 以下の(a)～(g)のいずれかに記載の核酸。

(a) 配列番号2、配列番号5又は配列番号9で示されるアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、グリセロール-3-リン酸アシル基転移酵素活性及び／又はグリセロンホスフェートアシル基転移酵素活性を有するタンパク質をコードする塩基配列を含む核酸

10

(b) 配列番号1、配列番号4又は配列番号8からなる塩基配列に対し相補的な塩基配列からなる核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、グリセロール-3-リン酸アシル基転移酵素活性及び／又はグリセロンホスフェートアシル基転移酵素活性を有するタンパク質をコードする塩基配列を含む核酸

(c) 配列番号1、配列番号4又は配列番号8からなる塩基配列と同一性が70%以上の塩基配列からなり、かつ、グリセロール-3-リン酸アシル基転移酵素活性及び／又はグリセロンホスフェートアシル基転移酵素活性を有するタンパク質をコードする塩基配列を含む核酸

(d) 配列番号2、配列番号5又は配列番号9からなるアミノ酸配列と同一性が70%以上のアミノ酸配列からなり、かつ、グリセロール-3-リン酸アシル基転移酵素活性及び／又はグリセロンホスフェートアシル基転移酵素活性を有するタンパク質をコードする塩基配列を含む核酸

20

(e) 配列番号2、配列番号5又は配列番号9で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列に対し相補的な塩基配列からなる核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、グリセロール-3-リン酸アシル基転移酵素活性及び／又はグリセロンホスフェートアシル基転移酵素活性を有するタンパク質をコードする塩基配列を含む核酸

(f) 配列番号7又は配列番号12からなる塩基配列に対し相補的な塩基配列からなる核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、グリセロール-3-リン酸アシル基転移酵素活性及び／又はグリセロンホスフェートアシル基転移酵素活性を有するタンパク質をコードするエクソンを有する塩基配列を含む核酸

30

(g) 配列番号7又は配列番号12からなる塩基配列と同一性が70%以上の塩基配列からなり、かつ、グリセロール-3-リン酸アシル基転移酵素活性及び／又はグリセロンホスフェートアシル基転移酵素活性を有するタンパク質をコードするエクソンを有する塩基配列を含む核酸

#### 【0019】

(2) 以下の(a)～(g)のいずれかである、(1)に記載の核酸。

(a) 配列番号2、配列番号5又は配列番号9で示されるアミノ酸配列において1～80個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、グリセロール-3-リン酸アシル基転移酵素活性及び／又はグリセロンホスフェートアシル基転移酵素活性を有するタンパク質をコードする塩基配列を含む核酸

40

(b) 配列番号1、配列番号4又は配列番号8からなる塩基配列に対し相補的な塩基配列からなる核酸と2×SSC、50℃の条件下でハイブリダイズし、かつ、グリセロール-3-リン酸アシル基転移酵素活性及び／又はグリセロンホスフェートアシル基転移酵素活性を有するタンパク質をコードする塩基配列を含む核酸

(c) 配列番号1、配列番号4又は配列番号8からなる塩基配列と同一性が90%以上の塩基配列からなり、かつ、グリセロール-3-リン酸アシル基転移酵素活性及び／又はグリセロンホスフェートアシル基転移酵素活性を有するタンパク質をコードする塩基配列を含む核酸

50

(d) 配列番号 2、配列番号 5 又は配列番号 9 からなるアミノ酸配列と同一性が 90% 以上のアミノ酸配列からなり、かつ、グリセロール-3-リン酸アシル基転移酵素活性及び／又はグリセロンホスフェートアシル基転移酵素活性を有するタンパク質をコードする塩基配列を含む核酸

(e) 配列番号 2、配列番号 5 又は配列番号 9 で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列に対し相補的な塩基配列からなる核酸と 2×SSC、50℃の条件下でハイブリダイズし、かつ、グリセロール-3-リン酸アシル基転移酵素活性及び／又はグリセロンホスフェートアシル基転移酵素活性を有するタンパク質をコードする塩基配列を含む核酸

(f) 配列番号 7 又は配列番号 12 からなる塩基配列に対し相補的な塩基配列からなる核酸と 2×SSC、50℃の条件下でハイブリダイズし、かつ、グリセロール-3-リン酸アシル基転移酵素活性及び／又はグリセロンホスフェートアシル基転移酵素活性を有するタンパク質をコードするエクソンを有する塩基配列を含む核酸

(g) 配列番号 7 又は配列番号 12 からなる塩基配列と同一性が 90% 以上の塩基配列からなり、かつ、グリセロール-3-リン酸アシル基転移酵素活性及び／又はグリセロンホスフェートアシル基転移酵素活性を有するタンパク質をコードするエクソンを有する塩基配列を含む核酸

#### 【0020】

(3) 以下の (a) ~ (d) のいずれかに記載の核酸。

(a) 配列番号 1、配列番号 4 又は配列番号 8 で示される塩基配列若しくはその部分配列を含む核酸

(b) 配列番号 2、配列番号 5 又は配列番号 9 で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列若しくはその部分配列を含む核酸

(c) 配列番号 3、配列番号 6 又は配列番号 11 で示される塩基配列若しくはその部分配列を含む核酸

(d) 配列番号 7 又は配列番号 12 で示される塩基配列若しくはその部分配列を含む核酸

#### 【0021】

(4) 以下の (a) ~ (g) のいずれかに記載の核酸。

(a) 配列番号 2、配列番号 5 又は配列番号 9 で示されるアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、以下の i) ないし v) のいずれかの活性を有するタンパク質をコードする塩基配列を含む核酸

i) 前記タンパク質を発現させた酵母の脂肪酸組成において、前記タンパク質を発現していない宿主の脂肪酸組成と比較して、パルミチン酸の比率が高く、パルミトレイン酸の比率が低い脂肪酸組成を形成できる活性

ii) 前記タンパク質を発現させた酵母の脂肪酸含有率が、前記タンパク質を発現していない宿主の脂肪酸含有率と比較して高い含有率を達成する活性

iii) 前記タンパク質を発現させた酵母のトリアシルグリセロール (TG) 量が、前記タンパク質を発現していない宿主の TG 量と比較して高い TG 量を達成する活性

iv) 酵母 (*S. cerevisiae*) のグリセロール-3-リン酸アシル基転移酵素欠損 (以下、「GPAT 欠損」と記載する場合もある) を相補する活性

v) 前記タンパク質をコードする核酸を含有する組換えベクターによって形質転換された宿主におけるアラキドン酸の生産量を、前記ベクターで形質転換されていない宿主における生産量よりも高めることができる活性

(b) 配列番号 1、配列番号 4 又は配列番号 8 からなる塩基配列に対し相補的な塩基配列からなる核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、以下の i) ないし v) のいずれかの活性を有するタンパク質をコードする塩基配列を含む核酸

i) 前記タンパク質を発現させた酵母の脂肪酸組成において、前記タンパク質を発現していない宿主の脂肪酸組成と比較して、パルミチン酸の比率が高く、パルミトレイン酸の比率が低い脂肪酸組成を形成できる活性

ii) 前記タンパク質を発現させた酵母の脂肪酸含有率が、前記タンパク質を発現していな

10

20

30

40

50

い宿主の脂肪酸含有率と比較して高い含有率を達成する活性

iii) 前記タンパク質を発現させた酵母のトリアシルグリセロール (TG) 量が、前記タンパク質を発現していない宿主のTG量と比較して高いTG量を達成する活性

iv) 酵母 (*S. cerevisiae*) のGPAT欠損を相補する活性

v) 前記タンパク質をコードする核酸を含有する組換えベクターによって形質転換された宿主におけるアラキドン酸の生産量を、前記ベクターで形質転換されていない宿主における生産量よりも高めることができる活性

(c) 配列番号1、配列番号4又は配列番号8からなる塩基配列と同一性が70%以上の塩基配列からなり、かつ、以下のi)ないしv)のいずれかの活性を有するタンパク質をコードする塩基配列を含む核酸

10

i) 前記タンパク質を発現させた酵母の脂肪酸組成において、前記タンパク質を発現していない宿主の脂肪酸組成と比較して、パルミチン酸の比率が高く、パルミトレイン酸の比率が低い脂肪酸組成を形成できる活性

ii) 前記タンパク質を発現させた酵母の脂肪酸含有率が、前記タンパク質を発現していない宿主の脂肪酸含有率と比較して高い含有率を達成する活性

iii) 前記タンパク質を発現させた酵母のトリアシルグリセロール (TG) 量が、前記タンパク質を発現していない宿主のTG量と比較して高いTG量を達成する活性

iv) 酵母 (*S. cerevisiae*) のGPAT欠損を相補する活性

v) 前記タンパク質をコードする核酸を含有する組換えベクターによって形質転換された宿主におけるアラキドン酸の生産量を、前記ベクターで形質転換されていない宿主における生産量よりも高めることができる活性

20

(d) 配列番号2、配列番号5又は配列番号9からなるアミノ酸配列と同一性が70%以上のアミノ酸配列からなり、かつ、以下のi)ないしv)のいずれかの活性を有するタンパク質をコードする塩基配列を含む核酸

i) 前記タンパク質を発現させた酵母の脂肪酸組成において、前記タンパク質を発現していない宿主の脂肪酸組成と比較して、パルミチン酸の比率が高く、パルミトレイン酸の比率が低い脂肪酸組成を形成できる活性

ii) 前記タンパク質を発現させた酵母の脂肪酸含有率が、前記タンパク質を発現していない宿主の脂肪酸含有率と比較して高い含有率を達成する活性

iii) 前記タンパク質を発現させた酵母のトリアシルグリセロール (TG) 量が、前記タンパク質を発現していない宿主のTG量と比較して高いTG量を達成する活性

30

iv) 酵母 (*S. cerevisiae*) のGPAT欠損を相補する活性

v) 前記タンパク質をコードする核酸を含有する組換えベクターによって形質転換された宿主におけるアラキドン酸の生産量を、前記ベクターで形質転換されていない宿主における生産量よりも高めることができる活性

(e) 配列番号2、配列番号5又は配列番号9で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列に対し相補的な塩基配列からなる核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、以下のi)ないしv)のいずれかの活性を有するタンパク質をコードする塩基配列を含む核酸

i) 前記タンパク質を発現させた酵母の脂肪酸組成において、前記タンパク質を発現していない宿主の脂肪酸組成と比較して、パルミチン酸の比率が高く、パルミトレイン酸の比率が低い脂肪酸組成を形成できる活性

40

ii) 前記タンパク質を発現させた酵母の脂肪酸含有率が、前記タンパク質を発現していない宿主の脂肪酸含有率と比較して高い含有率を達成する活性

iii) 前記タンパク質を発現させた酵母のトリアシルグリセロール (TG) 量が、前記タンパク質を発現していない宿主のTG量と比較して高いTG量を達成する活性

iv) 酵母 (*S. cerevisiae*) のGPAT欠損を相補する活性

v) 前記タンパク質をコードする核酸を含有する組換えベクターによって形質転換された宿主におけるアラキドン酸の生産量を、前記ベクターで形質転換されていない宿主における生産量よりも高めることができる活性

50

(f) 配列番号7又は配列番号12からなる塩基配列に対し相補的な塩基配列からなる核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、以下のi)ないしv)のいずれかの活性を有するタンパク質をコードするエクソンを有する塩基配列を含む核酸

i) 前記タンパク質を発現させた酵母の脂肪酸組成において、前記タンパク質を発現していない宿主の脂肪酸組成と比較して、パルミチン酸の比率が高く、パルミトレイン酸の比率が低い脂肪酸組成を形成できる活性

ii) 前記タンパク質を発現させた酵母の脂肪酸含有率が、前記タンパク質を発現していない宿主の脂肪酸含有率と比較して高い含有率を達成する活性

iii) 前記タンパク質を発現させた酵母のトリアシルグリセロール(TG)量が、前記タンパク質を発現していない宿主のTG量と比較して高いTG量を達成する活性

iv) 酵母(*S. cerevisiae*)のGPAT欠損を相補する活性

v) 前記タンパク質をコードする核酸を含有する組換えベクターによって形質転換された宿主におけるアラキドン酸の生産量を、前記ベクターで形質転換されていない宿主における生産量よりも高めることができる活性

10

(g) 配列番号7又は配列番号12からなる塩基配列と同一性が70%以上の塩基配列からなり、かつ、以下のi)ないしv)のいずれかの活性を有するタンパク質をコードするエクソンを有する塩基配列を含む核酸

i) 前記タンパク質を発現させた酵母の脂肪酸組成において、前記タンパク質を発現していない宿主の脂肪酸組成と比較して、パルミチン酸の比率が高く、パルミトレイン酸の比率が低い脂肪酸組成を形成できる活性

20

ii) 前記タンパク質を発現させた酵母の脂肪酸含有率が、前記タンパク質を発現していない宿主の脂肪酸含有率と比較して高い含有率を達成する活性

iii) 前記タンパク質を発現させた酵母のトリアシルグリセロール(TG)量が、前記タンパク質を発現していない宿主のTG量と比較して高いTG量を達成する活性

iv) 酵母(*S. cerevisiae*)のGPAT欠損を相補する活性

v) 前記タンパク質をコードする核酸を含有する組換えベクターによって形質転換された宿主におけるアラキドン酸の生産量を、前記ベクターで形質転換されていない宿主における生産量よりも高めることができる活性

【0022】

(5) 以下の(a)～(g)のいずれかである、(4)に記載の核酸。

30

(a) 配列番号2、配列番号5又は配列番号9で示されるアミノ酸配列において1～80個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、以下のi)ないしv)のいずれかの活性を有するタンパク質をコードするエクソンを有する塩基配列を含む核酸

i) 前記タンパク質を発現させた酵母の脂肪酸組成において、前記タンパク質を発現していない宿主の脂肪酸組成と比較して、パルミチン酸の比率が高く、パルミトレイン酸の比率が低い脂肪酸組成を形成できる活性

ii) 前記タンパク質を発現させた酵母の脂肪酸含有率が、前記タンパク質を発現していない宿主の脂肪酸含有率と比較して高い含有率を達成する活性

iii) 前記タンパク質を発現させた酵母のトリアシルグリセロール(TG)量が、前記タンパク質を発現していない宿主のTG量と比較して高いTG量を達成する活性

40

iv) 酵母(*S. cerevisiae*)のGPAT欠損を相補する活性

v) 前記タンパク質をコードする核酸を含有する組換えベクターによって形質転換された宿主におけるアラキドン酸の生産量を、前記ベクターで形質転換されていない宿主における生産量よりも高めることができる活性

(b) 配列番号1、配列番号4又は配列番号8からなる塩基配列に対し相補的な塩基配列からなる核酸と2×SSC、50℃の条件下でハイブリダイズし、かつ、以下のi)ないしv)のいずれかの活性を有するタンパク質をコードするエクソンを有する塩基配列を含む核酸

i) 前記タンパク質を発現させた酵母の脂肪酸組成において、前記タンパク質を発現して

50

いない宿主の脂肪酸組成と比較して、パルミチン酸の比率が高く、パルミトレイン酸の比率が低い脂肪酸組成を形成できる活性

ii) 前記タンパク質を発現させた酵母の脂肪酸含有率が、前記タンパク質を発現していない宿主の脂肪酸含有率と比較して高い含有率を達成する活性

iii) 前記タンパク質を発現させた酵母のトリアシルグリセロール (TG) 量が、前記タンパク質を発現していない宿主の TG 量と比較して高い TG 量を達成する活性

iv) 酵母 (*S. cerevisiae*) の GPAT 欠損を相補する活性

v) 前記タンパク質をコードする核酸を含有する組換えベクターによって形質転換された宿主におけるアラキドン酸の生産量を、前記ベクターで形質転換されていない宿主における生産量よりも高めることができる活性

10

(c) 配列番号 1、配列番号 4 又は配列番号 8 からなる塩基配列と同一性が 90% 以上の塩基配列からなり、かつ、以下の i) ないし v) のいずれかの活性を有するタンパク質をコードするエクソンを有する塩基配列を含む核酸

i) 前記タンパク質を発現させた酵母の脂肪酸組成において、前記タンパク質を発現していない宿主の脂肪酸組成と比較して、パルミチン酸の比率が高く、パルミトレイン酸の比率が低い脂肪酸組成を形成できる活性

ii) 前記タンパク質を発現させた酵母の脂肪酸含有率が、前記タンパク質を発現していない宿主の脂肪酸含有率と比較して高い含有率を達成する活性

iii) 前記タンパク質を発現させた酵母のトリアシルグリセロール (TG) 量が、前記タンパク質を発現していない宿主の TG 量と比較して高い TG 量を達成する活性

20

iv) 酵母 (*S. cerevisiae*) の GPAT 欠損を相補する活性

v) 前記タンパク質をコードする核酸を含有する組換えベクターによって形質転換された宿主におけるアラキドン酸の生産量を、前記ベクターで形質転換されていない宿主における生産量よりも高めることができる活性

(d) 配列番号 2、配列番号 5 又は配列番号 9 からなるアミノ酸配列と同一性が 90% 以上のアミノ酸配列からなり、かつ、以下の i) ないし v) のいずれかの活性を有するタンパク質をコードするエクソンを有する塩基配列を含む核酸

i) 前記タンパク質を発現させた酵母の脂肪酸組成において、前記タンパク質を発現していない宿主の脂肪酸組成と比較して、パルミチン酸の比率が高く、パルミトレイン酸の比率が低い脂肪酸組成を形成できる活性

30

ii) 前記タンパク質を発現させた酵母の脂肪酸含有率が、前記タンパク質を発現していない宿主の脂肪酸含有率と比較して高い含有率を達成する活性

iii) 前記タンパク質を発現させた酵母のトリアシルグリセロール (TG) 量が、前記タンパク質を発現していない宿主の TG 量と比較して高い TG 量を達成する活性

iv) 酵母 (*S. cerevisiae*) の GPAT 欠損を相補する活性

v) 前記タンパク質をコードする核酸を含有する組換えベクターによって形質転換された宿主におけるアラキドン酸の生産量を、前記ベクターで形質転換されていない宿主における生産量よりも高めることができる活性

(e) 配列番号 2、配列番号 5 又は配列番号 9 で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列に対し相補的な塩基配列からなる核酸と 2 × SSC、50 °C の条件下でハイブリダイズし、かつ、以下の i) ないし v) のいずれかの活性を有するタンパク質をコードするエクソンを有する塩基配列を含む核酸

40

i) 前記タンパク質を発現させた酵母の脂肪酸組成において、前記タンパク質を発現していない宿主の脂肪酸組成と比較して、パルミチン酸の比率が高く、パルミトレイン酸の比率が低い脂肪酸組成を形成できる活性

ii) 前記タンパク質を発現させた酵母の脂肪酸含有率が、前記タンパク質を発現していない宿主の脂肪酸含有率と比較して高い含有率を達成する活性

iii) 前記タンパク質を発現させた酵母のトリアシルグリセロール (TG) 量が、前記タンパク質を発現していない宿主の TG 量と比較して高い TG 量を達成する活性

iv) 酵母 (*S. cerevisiae*) の GPAT 欠損を相補する活性

50

v) 前記タンパク質をコードする核酸を含有する組換えベクターによって形質転換された宿主におけるアラキドン酸の生産量を、前記ベクターで形質転換されていない宿主における生産量よりも高めることができる活性

(f) 配列番号7又は配列番号12からなる塩基配列に対し相補的な塩基配列からなる核酸と2×SSC、50℃の条件下でハイブリダイズし、かつ、以下のi)ないしv)のいずれかの活性を有するタンパク質をコードするエクソンを有する塩基配列を含む核酸

i) 前記タンパク質を発現させた酵母の脂肪酸組成において、前記タンパク質を発現していない宿主の脂肪酸組成と比較して、パルミチン酸の比率が高く、パルミトレイン酸の比率が低い脂肪酸組成を形成できる活性

ii) 前記タンパク質を発現させた酵母の脂肪酸含有率が、前記タンパク質を発現していない宿主の脂肪酸含有率と比較して高い含有率を達成する活性

iii) 前記タンパク質を発現させた酵母のトリアシルグリセロール(TG)量が、前記タンパク質を発現していない宿主のTG量と比較して高いTG量を達成する活性

iv) 酵母(*S. cerevisiae*)のGPAT欠損を相補する活性

v) 前記タンパク質をコードする核酸を含有する組換えベクターによって形質転換された宿主におけるアラキドン酸の生産量を、前記ベクターで形質転換されていない宿主における生産量よりも高めることができる活性

(g) 配列番号7又は配列番号12からなる塩基配列と同一性が90%以上の塩基配列からなり、かつ、以下のi)ないしv)のいずれかの活性を有するタンパク質をコードするエクソンを有する塩基配列を含む核酸

i) 前記タンパク質を発現させた酵母の脂肪酸組成において、前記タンパク質を発現していない宿主の脂肪酸組成と比較して、パルミチン酸の比率が高く、パルミトレイン酸の比率が低い脂肪酸組成を形成できる活性

ii) 前記タンパク質を発現させた酵母の脂肪酸含有率が、前記タンパク質を発現していない宿主の脂肪酸含有率と比較して高い含有率を達成する活性

iii) 前記タンパク質を発現させた酵母のトリアシルグリセロール(TG)量が、前記タンパク質を発現していない宿主のTG量と比較して高いTG量を達成する活性

iv) 酵母(*S. cerevisiae*)のGPAT欠損を相補する活性

v) 前記タンパク質をコードする核酸を含有する組換えベクターによって形質転換された宿主におけるアラキドン酸の生産量を、前記ベクターで形質転換されていない宿主における生産量よりも高めることができる活性

#### 【0023】

(6) 以下の(a)又は(b)のいずれかに記載のタンパク質。

(a) 配列番号2、配列番号5又は配列番号9において1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、グリセロール-3-リン酸アシル基転移酵素活性及び／又はグリセロンホスフェートアシル基転移酵素活性を有するタンパク質

(b) 配列番号2、配列番号5又は配列番号9からなるアミノ酸配列と同一性が70%以上のアミノ酸配列からなるタンパク質であり、かつ、グリセロール-3-リン酸アシル基転移酵素活性及び／又はグリセロンホスフェートアシル基転移酵素活性を有するタンパク質

#### 【0024】

(7) 以下の(a)又は(b)のいずれかに記載のタンパク質。

(a) 配列番号2、配列番号5又は配列番号9において1～80個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、グリセロール-3-リン酸アシル基転移酵素活性及び／又はグリセロンホスフェートアシル基転移酵素活性を有するタンパク質

(b) 配列番号2、配列番号5又は配列番号9からなるアミノ酸配列と同一性が90%以上のアミノ酸配列からなるタンパク質であり、かつ、グリセロール-3-リン酸アシル基転移酵素活性及び／又はグリセロンホスフェートアシル基転移酵素活性を有するタンパク質

質

【0025】

(8) 以下の (a) 又は (b) のいずれかに記載のタンパク質。

(a) 配列番号 2、配列番号 5 又は配列番号 9 において 1 若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、以下の i) ないし v) のいずれかの活性を有するタンパク質

i) 前記タンパク質を発現させた酵母の脂肪酸組成において、前記タンパク質を発現していない宿主の脂肪酸組成と比較して、パルミチン酸の比率が高く、パルミトレイン酸の比率が低い脂肪酸組成を形成できる活性

ii) 前記タンパク質を発現させた酵母の脂肪酸含有率が、前記タンパク質を発現していない宿主の脂肪酸含有率と比較して高い含有率を達成する活性

iii) 前記タンパク質を発現させた酵母のトリアシルグリセロール (TG) 量が、前記タンパク質を発現していない宿主の TG 量と比較して高い TG 量を達成する活性

iv) 酵母 (*S. cerevisiae*) の GPAT 欠損を相補する活性

v) 前記タンパク質をコードする核酸を含有する組換えベクターによって形質転換された宿主におけるアラキドン酸の生産量を、前記ベクターで形質転換されていない宿主における生産量よりも高めることができる活性

(b) 配列番号 2、配列番号 5 又は配列番号 9 からなるアミノ酸配列と同一性が 70 % 以上のアミノ酸配列からなるタンパク質であり、かつ、以下の i) ないし v) のいずれかの活性を有するタンパク質

i) 前記タンパク質を発現させた酵母の脂肪酸組成において、前記タンパク質を発現していない宿主の脂肪酸組成と比較して、パルミチン酸の比率が高く、パルミトレイン酸の比率が低い脂肪酸組成を形成できる活性

ii) 前記タンパク質を発現させた酵母の脂肪酸含有率が、前記タンパク質を発現していない宿主の脂肪酸含有率と比較して高い含有率を達成する活性

iii) 前記タンパク質を発現させた酵母のトリアシルグリセロール (TG) 量が、前記タンパク質を発現していない宿主の TG 量と比較して高い TG 量を達成する活性

iv) 酵母 (*S. cerevisiae*) の GPAT 欠損を相補する活性

v) 前記タンパク質をコードする核酸を含有する組換えベクターによって形質転換された宿主におけるアラキドン酸の生産量を、前記ベクターで形質転換されていない宿主における生産量よりも高めることができる活性

【0026】

(9) 以下の (a) 又は (b) のいずれかに記載のタンパク質。

(a) 配列番号 2、配列番号 5 又は配列番号 9 において 1 ~ 80 個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、以下の i) ないし v) のいずれかの活性を有するタンパク質

i) 前記タンパク質を発現させた酵母の脂肪酸組成において、前記タンパク質を発現していない宿主の脂肪酸組成と比較して、パルミチン酸の比率が高く、パルミトレイン酸の比率が低い脂肪酸組成を形成できる活性

ii) 前記タンパク質を発現させた酵母の脂肪酸含有率が、前記タンパク質を発現していない宿主の脂肪酸含有率と比較して高い含有率を達成する活性

iii) 前記タンパク質を発現させた酵母のトリアシルグリセロール (TG) 量が、前記タンパク質を発現していない宿主の TG 量と比較して高い TG 量を達成する活性

iv) 酵母 (*S. cerevisiae*) の GPAT 欠損を相補する活性

v) 前記タンパク質をコードする核酸を含有する組換えベクターによって形質転換された宿主におけるアラキドン酸の生産量を、前記ベクターで形質転換されていない宿主における生産量よりも高めることができる活性

(b) 配列番号 2、配列番号 5 又は配列番号 9 からなるアミノ酸配列と同一性が 90 % 以上のアミノ酸配列からなるタンパク質であり、かつ、以下の i) ないし v) のいずれかの活性を有するタンパク質

- i) 前記タンパク質を発現させた酵母の脂肪酸組成において、前記タンパク質を発現していない宿主の脂肪酸組成と比較して、パルミチン酸の比率が高く、パルミトレイン酸の比率が低い脂肪酸組成を形成できる活性
- ii) 前記タンパク質を発現させた酵母の脂肪酸含有率が、前記タンパク質を発現していない宿主の脂肪酸含有率と比較して高い含有率を達成する活性
- iii) 前記タンパク質を発現させた酵母のトリアシルグリセロール (TG) 量が、前記タンパク質を発現していない宿主のTG量と比較して高いTG量を達成する活性
- iv) 酵母 (*S. cerevisiae*) のGPAT欠損を相補する活性
- v) 前記タンパク質をコードする核酸を含有する組換えベクターによって形質転換された宿主におけるアラキドン酸の生産量を、前記ベクターで形質転換されていない宿主における生産量よりも高めることができる活性

10

## 【0027】

(10) 配列番号2、配列番号5又は配列番号9で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

## 【0028】

(11) (1)～(5)のいずれか1項に記載の核酸を含有する組換えベクター。

## 【0029】

(12) (11)に記載の組換えベクターによって形質転換された形質転換体。

## 【0030】

(13) (12)に記載の形質転換体を培養して得られる脂肪酸又は脂質を含む脂肪酸組成物。

20

## 【0031】

(14) (12)に記載の形質転換体を培養して得られる培養物から脂肪酸又は脂質を採取することを特徴とする、脂肪酸組成物の製造方法。

## 【0032】

(15) (13)に記載の脂肪酸組成物を含む食品。

## 【発明の効果】

## 【0033】

本発明のGPATは、従来のGPATとは基質特異性が異なり、従来のGPATが発現した宿主が産生する脂肪酸組成物とは組成が異なる脂肪酸組成物を宿主中に産生させることができる。それにより、所望の特性や効果を有する脂質を提供できるため、食品、化粧品、医薬品、石鹸等に適用できるものとして有用である。

30

## 【0034】

また、本発明のGPATは脂肪酸や貯蔵脂質の生産能の向上を図ることができるため、微生物や植物中での高度不飽和脂肪酸の生産性を向上させるものとして、好ましい。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0035】

【図1-1】図1-1は、*M. alpina* 1S-4株由来のMaGPAT4のゲノム配列 (配列番号7) とCDS配列 (配列番号3) を比較した図である。

【図1-2】図1-2は、図1-1の続きである。

40

【図1-3】図1-3は、図1-2の続きである。

【図2-1】図2-1は、*M. alpina* 1S-4株由来のMaGPAT4のCDS配列 (配列番号3) 及びそれから導かれる推定アミノ酸配列 (配列番号2) を示した図である。二重下線部は、pfamのアシル基転移酵素 (accession No.PF01553) のモチーフと高い相同性を有するものとしてヒットした領域である。

【図2-2】図2-2は、図2-1の続きである。

【図3-1】図3-1は、*M. alpina* 1S-4株由来のMaGPAT5のゲノム配列 (配列番号12) とCDS配列 (配列番号10) を比較した図である。

【図3-2】図3-2は、図3-1の続きである。

【図4-1】図4-1は、*M. alpina* 1S-4株由来のMaGPAT5のcDNA配列 (配列番号1

50

1) 及びそれから導かれる推定アミノ酸配列 (配列番号 9) を示した図である。

【図 4-2】図 4-2 は、図 4-1 の続きである。

【図 5】図 5 は、*M. alpina* 1S-4 株由来の MaGPAT4 の推定アミノ酸配列 (配列番号 2) と、子囊菌 *Chaetomium globosum* CBS 148.51 由来の推定タンパク質のアミノ酸配列 (配列番号 21; GenBank accession No. XP\_001224211) 及び *E. coli* 由来の GPAT である plsB タンパク質のアミノ酸配列 (配列番号 22; GenBank accession No. BAE78043) を比較した図である。一重下線部は pfam のアシル基転移酵素 (accession No. PF01553) のモチーフと相同性が高い領域。中でも、二重下線部は GPAT ホモログでよく保存されている領域であり、\* はアシル基転移酵素活性に重要なアミノ酸残基、+ は G3P との結合に必要なアミノ酸残基を示す。

10

【図 6-1】図 6-1 は、*M. alpina* 1S-4 株由来の MaGPAT5 の推定アミノ酸配列 (配列番号 9) と、担子菌 *Ustilago maydis* 521 由来の推定タンパク質 UM03369 のアミノ酸配列 (配列番号 23; GenBank accession No. XP\_759516) 並びに、*S. cerevisiae* 由来の GPAT である SCT1 (YBL011W) (配列番号 24) 及び GPT2 (YKR067W) (配列番号 25W) のアミノ酸配列を比較した図である。二重下線部は、GPAT ホモログでよく保存されている領域であり、\* はアシル基転移酵素活性に重要なアミノ酸残基、+ は G3P との結合に必要なアミノ酸残基を示す。

【図 6-2】図 6-2 は、図 6-1 の続きである。

【図 7】図 7 は、ガラクトース誘導型のプロモーターに連結された MaGPAT4-long 又は MaGPAT4 を有するプラスミドで形質転換した酵母について、SG-Trip 培地で培養することにより、ガラクトースで発現誘導させた場合の脂質画分の脂肪酸組成を示すグラフである。

20

【図 8】図 8 は、ガラクトース誘導型のプロモーターに連結された MaGPAT4-long 又は MaGPAT4 を有するプラスミドで形質転換した酵母について、ガラクトースを含まない SC-Trip 培地で培養した場合の総脂肪酸の組成を示すグラフである。

【図 9】図 9 は、GPAT4 を *M. alpina* で過剰発現させた場合の乾燥菌体あたりのアラキドン酸の生産量の経時変化を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0036】

本発明は、*Mortierella* 由来の新規なアシル基転移酵素遺伝子とその利用に関する。本発明のアシル基転移酵素は、グリセロール-3-リン酸をアシル化してリゾホスファチジン酸を生成させる、及び／又は、グリセロンホスフェートの水酸基にアシル基を転移させる、ことを特徴とするアシル基転移酵素であってよい。

30

【0037】

本発明のアシル基転移酵素は、グリセロール-3-リン酸及び／又はグリセロンホスフェートにアシル基を転移させる反応を触媒する酵素である。本発明の酵素のアシル基受容体は、通常、グリセロール-3-リン酸及び／又はグリセロンホスフェートであるが、これらに限定されない。

【0038】

したがって本発明のアシル基転移酵素は、グリセロール-3-リン酸アシル基転移酵素 (GPAT) 及び／又はグリセロンホスフェート O-アシル基転移酵素 (GNPAT) としての活性を有し得る。しかしながら、本明細書においては本発明の酵素について、実際に有する活性の如何に問わず、便宜的に「グリセロール-3-リン酸アシル基転移酵素」又は「GPAT」と記載する場合もある。

40

【0039】

本発明のグリセロール-3-リン酸アシル基転移酵素をコードする核酸

本発明のグリセロール-3-リン酸アシル基転移酵素 (GPAT) には、MaGPAT4、MaGPAT4-long、及び MaGPAT5 が含まれる。MaGPAT4、MaGPAT4-long、及び MaGPAT5 をコードする cDNA、CDS、ORF 及び推定アミノ酸配列の対応関係を以下の表 1 に整理して記載した。

50

【 0 0 4 0 】

【表 1】

|               | MaGPAT4 |                  |                           | MaGPAT4-long |                  |
|---------------|---------|------------------|---------------------------|--------------|------------------|
|               | 配列番号    | 配列番号 3 の<br>該当領域 | MaGPAT4-long と<br>の関係     | 配列番号         | 配列番号 6 の<br>該当領域 |
| CDS<br>(cDNA) | 配列番号 3  | *****            | 配列番号 6 の<br>第 169-2646 番目 | 配列番号 6       | *****            |
| ORF           | 配列番号 1  | 第 1-2475 番目      | 配列番号 4 の<br>第 169-2643 番目 | 配列番号 4       | 第 1-2643 番目      |
| アミノ酸<br>配列    | 配列番号 2  | *****            | 配列番号 5 の<br>第 57-881 番目   | 配列番号 5       | *****            |

10

|            | MaGPAT5 |                   |
|------------|---------|-------------------|
|            | 配列番号    | 配列番号 11 の<br>該当領域 |
| cDNA       | 配列番号 11 | *****             |
| CDS        | 配列番号 10 | 第 225-2591 番目     |
| ORF        | 配列番号 8  | 第 225-2588 番目     |
| アミノ酸<br>配列 | 配列番号 9  | *****             |

20

【 0 0 4 1 】

本発明のMaGPAT4に関連する配列として、MaGPAT4のアミノ酸配列である配列番号 2、並びに、MaGPAT4のORFの領域を示す配列である配列番号 1、及びそのCDS又はcDNAの領域を示す配列である配列番号 3 があげられる。このうち、配列番号 1 は配列番号 3 の第 1 - 2 4 7 5 番目の塩基配列に相当する。本発明のMaGPAT4-longに関連する配列として、MaGPAT4-longのアミノ酸配列である配列番号 5、並びに、MaGPAT4-longのORFの領域を示す配列である配列番号 4、及びそのCDS又はcDNAの領域を示す配列である配列番号 6 があげられる。このうち、配列番号 4 は配列番号 6 の第 1 - 2 6 4 3 番目の塩基配列に相当する。ここで、上述の表において示したように、MaGPAT4のアミノ酸配列及び塩基配列は、それぞれMaGPAT4-longのアミノ酸配列及び塩基配列の一部を構成している。また、本発明のMaGPAT4及びMaGPAT4-longをコードするゲノム配列として配列番号 7 があげられる。MaGPAT4をコードする場合、配列番号 7 のゲノム配列は、エクソン 10 個とイントロン 9 個からなっており、エクソン領域は配列番号 7 の第 5 9 6 ~ 7 4 4 番目、第 8 5 0 ~ 9 2 4 番目、第 1 3 0 2 ~ 1 3 9 6 番目、第 1 4 8 0 ~ 1 7 2 6 番目、第 1 8 5 4 ~ 2 2 7 9 番目、第 2 3 7 0 ~ 2 6 3 2 番目、第 2 7 2 4 ~ 3 2 9 9 番目、第 3 3 9 0 ~ 3 4 7 1 番目、第 3 5 7 5 ~ 4 0 2 4 番目、第 4 1 3 3 ~ 4 2 4 8 番目である。あるいは、MaGPAT4-longをコードする場合、配列番号 7 のゲノム配列は、エクソン 10 個とイントロン 9 個からなっており、エクソン領域は配列番号 7 の第 4 2 8 ~ 7 4 4 番目、第 8 5 0 ~ 9 2 4 番目、第 1 3 0 2 ~ 1 3 9 6 番目、第 1 4 8 0 ~ 1 7 2 6 番目、第 1 8 5 4 ~ 2 2 7 9 番目、第 2 3 7 0 ~ 2 6 3 2 番目、第 2 7 2 4 ~ 3 2 9 9 番目、第 3 3 9 0 ~ 3 4 7 1 番目、第 3 5 7 5 ~ 4 0 2 4 番目、第 4 1 3 3 ~ 4 2 4 8 番目である。

30

40

【 0 0 4 2 】

本発明のMaGPAT5に関連する配列として、MaGPAT5のアミノ酸配列である配列番号 9、並びに、MaGPAT5のORFの領域を示す配列である配列番号 8、そのCDSの領域を示す配

50

列である配列番号10、及びそのcDNAの塩基配列である配列番号11があげられる。このうち、配列番号10は配列番号11の第225-2591番目の塩基配列に相当し、配列番号8は配列番号11の第225-2588番目の塩基配列及び配列番号10の1-2364番目の塩基配列に相当する。また、本発明のMaGPAT5をコードするゲノム配列として配列番号12があげられる。配列番号12のゲノム配列は、エクソン3個とイントロン2個からなっており、エクソン領域は配列番号12の第1-302番目、第457-1676番目、第1754-2598番目である。

#### 【0043】

本発明の核酸とは、一本鎖及び二本鎖のDNAのほか、そのRNA相補体も含み、天然由来のものであっても、人工的に作製したものであってもよい。DNAには、例えば、ゲノムDNAや、前記ゲノムDNAに対応するcDNA、化学的に合成されたDNA、PCRにより増幅されたDNA、及びそれらの組み合わせや、DNAとRNAのハイブリッドがあげられるがこれらに限定されない。

10

#### 【0044】

本発明の核酸の好ましい態様としては、(a)配列番号1、配列番号4、若しくは配列番号8で示される塩基配列を含む核酸、(b)配列番号2、配列番号5、若しくは配列番号9で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含む核酸、(c)配列番号3、配列番号6、若しくは配列番号11で示される塩基配列を含む核酸、又は(d)配列番号7若しくは配列番号12で示される塩基配列を含む核酸等があげられる。

#### 【0045】

20

上記塩基配列を得るためには、GPAT活性を有する生物のESTやゲノムDNAの塩基配列データから、既知のGPAT活性を有するタンパク質と相同性のあるタンパク質をコードする塩基配列を探索することもできる。GPAT活性を有する生物としては、脂質生産菌が好ましく、脂質生産菌としては*M. alpina*があげられるが、これに限定されない。

#### 【0046】

EST解析を行う場合には、まず、cDNAライブラリーを作製する。cDNAライブラリーの作製方法については、『Molecular Cloning, A Laboratory Manual 3rd ed.』(Cold Spring Harbor Press (2001))を参照することができる。また、市販のcDNAライブラリー作製キットを用いてもよい。本発明に適するcDNAライブラリーの作製方法としては、例えば以下のような方法があげられる。すなわち、脂質生産菌である*M. alpina*の適当な株を適当な培地に植菌し、適当な期間前培養する。この前培養に適する培養条件としては、例えば、培地組成としては、1.8%グルコース、1%酵母エキス、pH6.0があげられ、培養期間は3-4日間、培養温度は28℃である条件があげられる。その後、前培養物を適当な条件にて本培養に供する。本培養に適する培地組成としては、例えば、1.8%グルコース、1%大豆粉、0.1%オリーブ油、0.01%アデカノール、0.3% $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.1% $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 、0.05% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.05% $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、pH6.0があげられる。本培養に適する培養条件としては、例えば、300rpm、1vvm、26℃で8日間通気攪拌培養する条件があげられる。培養期間中に適当量のグルコースを添加してもよい。本培養中に適時培養物を採取し、そこから菌体を回収して、全RNAを調製する。全RNAの調製には、塩酸グアニジン/CsCl法等の公知の方法を用いることができる。得られた全RNAから市販のキットを用いてpoly(A)<sup>+</sup>RNAを精製することができる。さらに、市販のキットを用いてcDNAライブラリーを作製することができる。その後、作製したcDNAライブラリーの任意のクローンの塩基配列を、ベクター上にインサート部分の塩基配列を決定できるように設計されたプライマーを用いて決定し、ESTを得ることができる。例えば、ZAP-cDNA GigapackIII Gold Cloning Kit (STRATAGENE)でcDNAライブラリーを作製した場合は、ディレクショナルクローニングを行うことができる。

30

40

#### 【0047】

ゲノムDNAを解析する場合は、GPAT活性を有する生物の細胞を培養し、当該細胞

50

からゲノムDNAを調製する。得られたゲノムDNAの塩基配列を決定し、決定した塩基配列をアセンブリした。最終的に得られたスーパーコンティグの配列から、既知のG P A T活性を有するタンパク質のアミノ酸配列と相同性のあるアミノ酸配列をコードする配列を探索する。このようなアミノ酸配列をコードするものとしてヒットしたスーパーコンティグの配列からプライマーを作製し、上述したc DNAライブラリーを鋳型としてP C Rを行い、得られたDNA断片をプラスミドに組み込み、クローン化する。クローン化されたプラスミドを鋳型として、上述のプライマーを用いてP C Rを行うことによりプローブを作製する。作製したプローブを用いてc DNAライブラリーをスクリーニングする。

#### 【0048】

本発明のMaGPAT4及びMaGPAT5の推定アミノ酸配列を、GenBankに登録されているアミノ酸配列に対してBLASTpプログラムで相同性検索を行った。MaGPAT4に対して同一性の高かったアミノ酸配列は、子囊菌Chaetomium globosum CBS 148.51由来の推定タンパク質のアミノ酸配列（GenBank accession No. XP\_001224221）であり、同一性は39.3%である。また、MaGPAT4はヒト由来のグリセロンホスフェート　　Oーアシル基転移酵素（G N P A T；GenBank accession No. AAH00450）とも相同性があり、アミノ酸同一性は22.6%である。さらに、MaGPAT4は、大腸菌（E. coli）由来のG P A TであるplsBタンパク質（GenBank accession No. BAE78043）とのアミノ酸同一性は、17.6%である。一方、MaGPAT5に対して同一性の高かったアミノ酸配列は、担子菌Ustilago maydis 521由来の推定タンパク質のアミノ酸配列（GenBank accession No. XP\_759516）であり、同一性は15.4%である。

#### 【0049】

本発明はまた、上記配列番号1、配列番号4又は配列番号8で示される塩基配列（「本発明の塩基配列」と記載する場合もある）、並びに、配列番号2、配列番号5又は配列番号9で示されるアミノ酸配列（「本発明のアミノ酸配列」と記載する場合もある）からなるタンパク質をコードする塩基配列を含む核酸と同等の機能を有する核酸を含む。「同等の機能を有する」とは、本発明の塩基配列がコードするタンパク質及び本発明のアミノ酸配列からなるタンパク質が、グリセロールー3ーリン酸アシル基転移酵素（G P A T）活性及び／又はグリセロンホスフェート　　Oーアシル基転移酵素（G N P A T）活性を有することを意味する。また、「同等の機能を有する」とは、本発明の塩基配列がコードするタンパク質、又は本発明のアミノ酸配列からなるタンパク質が発現している宿主の脂肪酸組成において、以下：

- i) 前記タンパク質を発現させた酵母の脂肪酸組成において、前記タンパク質を発現していない宿主の脂肪酸組成と比較して、パルミチン酸の比率が高く、パルミトレイン酸の比率が低い脂肪酸組成を形成できる活性；
  - ii) 前記タンパク質を発現させた酵母の脂肪酸含有率が、前記タンパク質を発現していない宿主の脂肪酸含有率と比較して高い含有率を達成する活性；
  - iii) 前記タンパク質を発現させた酵母のトリアシルグリセロール（T G）量が、前記タンパク質を発現していない宿主のT G量と比較して高いT G量を達成する活性；
  - iv) 酵母（*S. cerevisiae*）のグリセロールー3ーリン酸アシル基転移酵素欠損（G P A T欠損）を相補する活性、好ましくは前記G P A T欠損は、酵母のS C T 1遺伝子及びG P T 2遺伝子両方の欠損によるものである；及び／又は
  - v) 前記タンパク質をコードする核酸を含有する組換えベクターによって形質転換された宿主におけるアラキドン酸の生産量を、前記ベクターで形質転換されていない宿主における生産量よりも高めることができる活性
- のいずれかの活性を有することを意味してもよい。

#### 【0050】

このような本発明の核酸と同等の機能を有する核酸としては、以下の（a）～（g）のいずれかに記載の塩基配列を含む核酸があげられる。なお、以下に挙げる塩基配列の記載において、「本発明の上記活性」とは、上記の「G P A T活性、G N P A T活性、上記i）ないしv）の活性から選択されるいずれか1以上の活性」を意味する。

## 【0051】

(a) 配列番号2、配列番号5又は配列番号9で示されるアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、本発明の上記活性を有するタンパク質をコードする塩基配列を含む核酸

本発明の核酸に含まれる塩基配列は、配列番号2、配列番号5又は配列番号9で示されるアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、本発明の上記活性を有するタンパク質をコードする塩基配列を含む。

## 【0052】

具体的には、

(i) 配列番号2、配列番号5又は配列番号9に示すアミノ酸配列のうち1個又は複数個（好ましくは1個又は数個（例えば、1～250個、1～200個、1～150個、1～100個、1～80個、1～75個、1～50個、1～30個、1～25個、1～20個、1～15個、さらに好ましくは10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1個））のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、

(ii) 配列番号2、配列番号5又は配列番号9に示すアミノ酸配列のうち1個又は複数個（好ましくは1個又は数個（例えば、1～250個、1～200個、1～150個、1～100個、1～80個、1～75個、1～50個、1～30個、1～25個、1～20個、1～15個、さらに好ましくは10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1個））のアミノ酸が他のアミノ酸で置換したアミノ酸配列、

(iii) 配列番号2、配列番号5又は配列番号9に示すアミノ酸配列において1個又は複数個（好ましくは1個又は数個（例えば、1～250個、1～200個、1～150個、1～100個、1～80個、1～75個、1～50個、1～30個、1～25個、1～20個、1～15個、さらに好ましくは10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1個））の他のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列、又は

(iv) 上記(i)～(iii)を組み合わせたアミノ酸配列からなるタンパク質であって、かつ、本発明の上記活性を有するタンパク質をコードする塩基配列である。

## 【0053】

上記のうち、置換は、好ましくは保存的置換である。保存的置換とは、特定のアミノ酸残基を類似の物理化学的特徴を有する残基で置き換えることであるが、もとの配列の構造に関する特徴を実質的に変化させなければいかなる置換であってもよく、例えば、置換アミノ酸が、もとの配列に存在するらせんを破壊したり、もとの配列を特徴付ける他の種類の二次構造を破壊したりしなければいかなる置換であってもよい。

## 【0054】

保存的置換は、一般的には、生物学的合成系や化学的ペプチド合成で導入されるが、好ましくは、化学的ペプチド合成による。この場合、置換基には、非天然アミノ酸残基が含まれていてもよく、ペプチド模倣体や、アミノ酸配列のうち、置換されていない領域が逆転している逆転型又は同領域が反転している反転型も含まれる。

## 【0055】

以下に、アミノ酸残基を置換可能な残基ごとに分類して例示するが、置換可能なアミノ酸残基は以下に記載されているものに限定されるものではない。

A群：ロイシン、イソロイシン、ノルロイシン、バリン、ノルバリン、アラニン、2-アミノブタン酸、メチオニン、O-メチルセリン、t-ブチルグリシン、t-ブチルアラニン及びシクロヘキシルアラニン

B群：アスパラギン酸、グルタミン酸、イソアスパラギン酸、イソグルタミン酸、2-アミノアジピン酸及び2-アミノスベリン酸

C群：アスパラギン及びグルタミン

D群：リジン、アルギニン、オルニチン、2, 4-ジアミノブタン酸及び2, 3-ジアミノプロピオン酸

E群：プロリン、3-ヒドロキシプロリン及び4-ヒドロキシプロリン

F群：セリン、スレオニン及びホモセリン

G群：フェニルアラニン及びチロシン

【0056】

非保存的置換の場合は、上記種類のうち、ある1つのメンバーと他の種類のメンバーとを交換することができるが、この場合は、本発明のタンパク質の生物学的機能を保持するために、アミノ酸のヒドロパシー指数（ヒドロパシーアミノ酸指数）を考慮することが好ましい（Kyteら, J. Mol. Biol., 157:105-131 (1982)）。

【0057】

また、非保存的置換の場合は、親水性に基づいてアミノ酸の置換を行うことができる。

【0058】

保存的置換及び非保存的置換いずれにおいても、配列番号2における316番目、319番目、及び351番目のアミノ酸に相当するアミノ酸残基は、それぞれ、グリシン、セリン、及びプロリンであることが望ましい。配列番号9については、430番目、432番目、及び465番目のアミノ酸に相当するアミノ酸残基は、それぞれ、グリシン、セリン、及びプロリンであることが望ましい。

【0059】

本明細書及び図面において、塩基やアミノ酸及びその略語は、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature に従うか、又は、例えば、Immunology--A Synthesis（第2版, E.S. Golub及びD.R. Gren監修, Sinauer Associates, マサチューセッツ州サンダーランド(1991)）等に記載されているような、当業界で慣用されている略語に基づく。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示す。

【0060】

D-アミノ酸等の上記のアミノ酸の立体異性体、 $\alpha$ ,  $\alpha$ -二置換アミノ酸等の非天然アミノ酸、N-アルキルアミノ酸、乳酸、及びその他の非慣用的なアミノ酸もまた、本発明のタンパク質を構成する要素となりうる。

【0061】

なお、本明細書で用いるタンパク質の表記法は、標準的用法及び当業界で慣用されている表記法に基づき、左方向はアミノ末端方向であり、そして右方向はカルボキシ末端方向である。

【0062】

同様に、一般的には、特に言及しない限り、一本鎖ポリヌクレオチド配列の左端は5'端であり、二本鎖ポリヌクレオチド配列の左方向を5'方向とする。

【0063】

当業者であれば、当業界で公知の技術を用いて、本明細書に記載したタンパク質の適当な変異体を設計し、作製することができる。例えば、本発明のタンパク質の生物学的活性にさほど重要でないと考えられる領域をターゲティングすることにより、本発明のタンパク質の生物学的活性を損なうことなくその構造を変化させることができるタンパク質分子中の適切な領域を同定することができる。また、類似のタンパク質間で保存されている分子の残基及び領域を同定することもできる。さらに、本発明のタンパク質の生物学的活性又は構造に重要と考えられる領域中に、生物学的活性を損なわず、かつ、タンパク質のポリペプチド構造に悪影響を与えずに、保存的アミノ酸置換を導入することもできる。

【0064】

当業者であれば、本発明のタンパク質の生物学的活性又は構造に重要であり、同タンパク質のペプチドと類似するペプチドの残基を同定し、この2つのペプチドのアミノ酸残基を比較して、本発明のタンパク質と類似するタンパク質のどの残基が、生物学的活性又は構造に重要なアミノ酸残基に対応するアミノ酸残基であるかを予測する、いわゆる、構造-機能研究を行うことができる。さらに、このように予測したアミノ酸残基の化学的に類似のアミノ酸置換を選択することにより、本発明のタンパク質の生物学的活性が保持されている変異体を選択することもできる。また、当業者であれば、本タンパク質の変異体の三次元構造及びアミノ酸配列を解析することもできる。さらに、得られた解析結果から、タンパク質の三次元構造に関する、アミノ酸残基のアラインメントを予測することもでき

10

20

30

40

50

る。タンパク質表面上にあると予測されるアミノ酸残基は、他の分子との重要な相互作用に  
関与する可能性があるが、当業者であれば、上記したような解析結果に基づいて、この  
ようなタンパク質表面上にあると予測されるアミノ酸残基を変化させないような変異体  
を作製することができる。さらに、当業者であれば、本発明のタンパク質を構成する各々の  
アミノ酸残基のうち、一つのアミノ酸残基のみを置換するような変異体を作製することも  
できる。このような変異体を公知のアッセイ方法によりスクリーニングし、個々の変異体  
の情報を収集することができる。それにより、ある特定のアミノ酸残基が置換された変異  
体の生物学的活性が、本発明のタンパク質の生物学的活性に比して低下する場合、そのよ  
うな生物学的活性を呈さない場合、又は、本タンパク質の生物学的活性を阻害するよう  
な不適切な活性を生じるような場合を比較することにより、本発明のタンパク質を構成す  
る個々のアミノ酸残基の有用性を評価することができる。また、当業者であれば、このよ  
うな日常的な実験から収集した情報に基づいて、単独で、又は他の突然変異と組み合わせて  
、本発明のタンパク質の変異体としては望ましくないアミノ酸置換を容易に解析すること  
ができる。

10

**【0065】**

上記したように、配列番号2、配列番号5又は配列番号9で表されるアミノ酸配列にお  
いて1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる  
タンパク質は、『Molecular Cloning, A Laboratory Manual 3rd ed.』(Cold Spring Har  
bor Press (2001))、『Current Protocols in Molecular Biology』(John Wiley & Sons  
(1987-1997)、Kunkel (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488-92、Kunkel (1988)  
Method. Enzymol. 85: 2763-6等に記載の部位特異的変異誘発法等の方法に従って調製す  
ることができる。このようなアミノ酸の欠失、置換若しくは付加等の変異がなされた変異  
体の作製は、例えば、Kunkel法やGapped duplex法等の公知手法により、部位特異的突然  
変異誘発法を利用した変異導入用キット、例えばQuikChange™ Site-Directed Mutagenes  
is Kit (ストラタジーン社製)、GeneTailor™ Site-Directed Mutagenesis System (イ  
ンビトロジェン社製)、TaKaRa Site-Directed Mutagenesis System (Mutan-K、Mutan-Su  
per Express Km等：タカラバイオ社製)等を用いて行うことができる。

20

**【0066】**

なお、タンパク質のアミノ酸配列に、その活性を保持しつつ1若しくは複数個のアミノ  
酸の欠失、置換、若しくは付加を導入する方法としては、上記の部位特異的変異誘発の他  
にも、遺伝子を変異源で処理する方法、及び遺伝子を選択的に開裂して選択されたヌクレ  
オチドを除去、置換若しくは付加した後に連結する方法があげられる。

30

**【0067】**

本発明の核酸に含まれる塩基配列は、好ましくは、配列番号2、配列番号5又は配列番  
号9に示されるアミノ酸配列において1～80個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加さ  
れたアミノ酸配列からなり、かつ、G P A T活性及び／又はG N P A T活性を有するタン  
パク質をコードする塩基配列である。

**【0068】**

また、本発明の核酸に含まれる塩基配列には、好ましくは、配列番号2、配列番号5又  
は配列番号9において1～80個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配  
列からなり、かつ、本発明の上記活性を有するタンパク質をコードする塩基配列も含まれ  
る。

40

**【0069】**

本発明のタンパク質におけるアミノ酸の変異又は修飾の数、あるいは変異又は修飾の部  
位は、本発明の上記活性が保持される限り制限はない。

**【0070】**

本発明のタンパク質のG P A T活性をはじめ、本発明の上記活性は、公知の方法を用い  
て測定することが可能である。例えば、以下の文献：Biochem. J., 355, 315-322, 2001  
を参照することができる。

**【0071】**

50

例えば、本発明の「G P A T 活性」は以下の通り測定してもよい。本発明のG P A T を発現させた酵母から、J. Bacteriology, 173, 2026-2034(1991)に記載の方法等によりミクロソーム画分を調製する。そして、反応液である、0.44mM グリセロール-3-リン酸、0.36mM アシル-CoA、0.5mM DTT、1mg/ml BSA、2mM MgCl<sub>2</sub>、50mM Tris-HCl (pH 7.5) に上記ミクロソーム画分を添加し、28℃で適当な時間反応させ、クロロホルム：メタノールを添加して反応を停止させた後、脂質の抽出を行い、得られた脂質を薄層クロマトグラフィー等により分画し、生成したリゾホスファチジン酸量を定量することができる。

#### 【0072】

また、本発明の上記 i)、ii) 又は v) に示した活性は、例えば以下のようにして、本発明のタンパク質を発現させた宿主細胞（例えば、酵母、*M. alpina*）の脂肪酸組成又は脂肪酸含有率を測定することにより測定してもよい。本発明の脂肪酸組成物の製造方法により得られた凍結乾燥した菌体に、適当な比率で調整したクロロホルム：メタノールを添加して攪拌した後、適当な時間、加熱処理をする。さらに遠心分離により菌体を分離して、溶媒を回収することを数回繰り返す。その後、適当な方法を用いて脂質を乾固させてから、クロロホルム等の溶媒を添加して脂質を溶解する。この試料を適当量分取して、塩酸メタノール法により菌体の脂肪酸をメチルエステルに誘導した後に、ヘキサンで抽出し、ヘキサンを留去してから、ガスクロマトグラフィーで分析を行う。

#### 【0073】

本発明の上記 iii) に示した活性は、例えば以下のようにして、本発明のタンパク質を発現させた酵母のトリアシルグリセロール (TG) 量を測定することにより測定してもよい。上記のように脂質を菌体から抽出・回収した後、例えば薄層クロマトグラフィー (TLC) を行って分画し、TG画分を回収する。そして、塩酸メタノール法により、回収したTG画分についてTGを構成する脂肪酸をメチルエステルに誘導した後に、ヘキサンで抽出し、ヘキサンを留去してから、ガスクロマトグラフィーで定量する。

#### 【0074】

本発明の上記 iv) に示した活性は、例えば以下のようにして、導入した本発明のタンパク質が酵母 (*S. cerevisiae*) のG P A T 欠損を相補できるか否かを確認することにより測定してもよい。酵母では、G P A T 活性を担う遺伝子としてSCT1とGPT2が知られており、これらを同時に欠失させると致死であることが知られている。すなわち、SCT1遺伝子及びGPT2遺伝子が欠失した酵母は、通常は生育できないが、これらの遺伝子と同等の働きをする遺伝子、すなわちG P A T 活性を有するタンパク質を発現させた場合、相補され、生育することが可能になる。ここで、本発明のG P A T について、酵母のG P A T 欠損が相補されたことを確認する方法としては、酵母のSCT1遺伝子及びGPT2遺伝子が欠損した株において、本発明のG P A T 遺伝子が発現させた場合、当該酵母のG P A T 活性が回復されたことを確認する方法であれば、いかなる方法でもよい。例えば、以下の実施例8でも具体的に説明しているように、Δgpt2ホモ接合2倍体酵母において、SCT1遺伝子の対立遺伝子の1つのみを欠損させた異型接合株を作製し、続いて当該異型接合株に本発明のG P A T 遺伝子の発現カセットをSCT1が載っている染色体とは別の染色体上に1つ挿入した株、あるいは、当該異型接合株に本発明のG P A T 遺伝子の発現カセットを有するプラスミド型ベクターを挿入した株、を作製する。当該菌株を孢子形成培地上に塗布し、子嚢孢子を形成させる。得られた菌体を、ランダム孢子分析、あるいは四分分子分析により、孢子由来の1倍体株を得ることができる。このようにして得られた1倍体酵母の遺伝子型を調べ、本来生育できないΔgpt2Δsct1株において、本発明のG P A T 遺伝子の発現カセットが存在する場合にのみ生育できることが確認できれば、本発明のG P A T が酵母中でG P A T 活性を相補できたと判断できる。

#### 【0075】

(b) 配列番号1、配列番号4又は配列番号8からなる塩基配列に対し相補的な塩基配列からなる核酸とストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつ、本発明の上記活性を有するタンパク質をコードする塩基配列を含む核酸

本発明の核酸に含まれる塩基配列は、配列番号1、配列番号4又は配列番号8からなる塩基配列に対し相補的な塩基配列からなる核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、本発明の上記活性を有するタンパク質をコードする塩基配列を含む。

#### 【0076】

上記塩基配列は、当業者に公知の方法で適当な断片を用いてプローブを作製し、このプローブを用いてコロニーハイブリダイゼーション、プラークハイブリダイゼーション、サザンブロット等の公知のハイブリダイゼーション法により、cDNAライブラリー及びゲノムライブラリー等から得ることができる。

#### 【0077】

ハイブリダイゼーション法の詳細な手順については、『Molecular Cloning, A Laboratory Manual 3rd ed.』(Cold Spring Harbor Press (2001); 特にSection 6-7)、『Current Protocols in Molecular Biology』(John Wiley & Sons (1987-1997); 特にSection 6.3-6.4)、『DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach 2nd ed.』(Oxford University (1995); ハイブリダイゼーション条件については特にSection 2.10)等を参照することができる。

#### 【0078】

ハイブリダイゼーション条件の強さは、主としてハイブリダイゼーション条件、より好ましくは、ハイブリダイゼーション条件及び洗浄条件によって決定される。本明細書における「ストリンジェントな条件」には、中程度又は高度にストリンジェントな条件が含まれる。

#### 【0079】

具体的には、中程度にストリンジェントな条件としては、例えばハイブリダイゼーション条件として、 $1 \times \text{SSC}$ ～ $6 \times \text{SSC}$ 、 $42^\circ\text{C}$ ～ $55^\circ\text{C}$ の条件、より好ましくは、 $1 \times \text{SSC}$ ～ $3 \times \text{SSC}$ 、 $45^\circ\text{C}$ ～ $50^\circ\text{C}$ の条件、最も好ましくは、 $2 \times \text{SSC}$ 、 $50^\circ\text{C}$ の条件があげられる。ハイブリダイゼーション溶液中に、例えば、約50%のホルムアミドを含む場合には、上記温度よりも5ないし $15^\circ\text{C}$ 低い温度を採用する。洗浄条件としては、 $0.5 \times \text{SSC}$ ～ $6 \times \text{SSC}$ 、 $40^\circ\text{C}$ ～ $60^\circ\text{C}$ があげられる。ハイブリダイゼーション及び洗浄時には、一般に、0.05%～0.2%、好ましくは約0.1% SDSを加えてもよい。

#### 【0080】

高度にストリンジェント（ハイストリンジェント）な条件としては、中程度にストリンジェントな条件よりも高い温度及び／又は低い塩濃度でのハイブリダイゼーション及び／又は洗浄を含む。例えば、ハイブリダイゼーション条件として、 $0.1 \times \text{SSC}$ ～ $2 \times \text{SSC}$ 、 $55^\circ\text{C}$ ～ $65^\circ\text{C}$ の条件、より好ましくは、 $0.1 \times \text{SSC}$ ～ $1 \times \text{SSC}$ 、 $60^\circ\text{C}$ ～ $65^\circ\text{C}$ の条件、最も好ましくは、 $0.2 \times \text{SSC}$ 、 $63^\circ\text{C}$ の条件があげられる。洗浄条件として、 $0.2 \times \text{SSC}$ ～ $2 \times \text{SSC}$ 、 $50^\circ\text{C}$ ～ $68^\circ\text{C}$ 、より好ましくは、 $0.2 \times \text{SSC}$ 、 $60^\circ\text{C}$ ～ $65^\circ\text{C}$ があげられる。

#### 【0081】

特に本発明に用いられるハイブリダイゼーション条件としては、例えば、 $5 \times \text{SSC}$ 、1% SDS、50mM Tris-HCl (pH 7.5) 及び50%ホルムアミド中 $42^\circ\text{C}$ の条件でプレハイブリダイゼーションを行った後、プローブを添加して一晩 $42^\circ\text{C}$ に保ってハイブリッド形成させ、その後、 $0.2 \times \text{SSC}$ 、0.1% SDS中、 $65^\circ\text{C}$ で20分間の洗浄を3回行うという条件があげられるが、これらに限定されない。

#### 【0082】

また、プローブに放射性物質を使用しない市販のハイブリダイゼーションキットを使用することもできる。具体的には、DIG核酸検出キット（ロシュ・ダイアグノスティクス社）、ECL direct labeling & detection system (Amersham社製)を使用したハイブリダイゼーション等があげられる。

#### 【0083】

本発明に含まれる塩基配列としては、好ましくは、配列番号1、配列番号4又は配列番

10

20

30

40

50

号8からなる塩基配列に対し相補的な塩基配列からなる核酸と2×SSC、50℃の条件下でハイブリダイズし、かつ、GPAT活性及び／又はGNPAT活性を有するタンパク質をコードする塩基配列があげられる。

【0084】

(c) 配列番号1、配列番号4又は配列番号8からなる塩基配列と同一性が70%以上の塩基配列からなり、かつ、本発明の上記活性を有するタンパク質をコードする塩基配列を含む核酸

本発明の核酸に含まれる塩基配列は、配列番号1、配列番号4又は配列番号8に示される塩基配列に対して少なくとも70%以上の同一性を有する塩基配列からなり、かつ、本発明の上記活性を有するタンパク質をコードする塩基配列を含む。

10

【0085】

好ましくは、配列番号1、配列番号4又は配列番号8に示される塩基配列に対して少なくとも75%以上、さらに好ましくは80%以上（例えば、85%以上、より一層好ましくは90%以上、さらには95%、98%又は99%以上）の同一性を有する塩基配列を含む核酸であって、かつ、本発明の上記活性を有するタンパク質をコードする塩基配列があげられる。

【0086】

2つの塩基配列の同一性%は、視覚的検査や数学的計算により決定することができるが、コンピュータープログラムを使用して2つの核酸の配列情報を比較することにより決定するのが好ましい。配列比較コンピュータープログラムとしては、例えば、米国国立医学ライブラリーのウェブサイト：<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bls.html>から利用できるBLASTNプログラム(Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-10)：バージョン2.2.7、又はWU-BLAST2.0アルゴリズム等があげられる。WU-BLAST2.0についての標準的なデフォルトパラメーターの設定は、以下のインターネットサイト：<http://blast.wustl.edu>に記載されているものを用いることができる。

20

【0087】

(d) 配列番号2、配列番号5又は配列番号9からなるアミノ酸配列と同一性が70%以上のアミノ酸配列をコードし、かつ、本発明の上記活性を有するタンパク質をコードする塩基配列を含む核酸

本発明の核酸に含まれる塩基配列は、配列番号2、配列番号5又は配列番号9からなるアミノ酸配列と同一性が70%以上のアミノ酸配列をコードし、かつ、本発明の上記活性を有するタンパク質をコードする塩基配列を含む。本発明の核酸がコードするタンパク質は、本発明の上記活性を有するタンパク質と同等の機能を有する限り、MaGPAT4、MaGPAT4-long、又はMaGPAT5のアミノ酸配列と同一性のあるタンパク質でもよい。

30

【0088】

具体的には、配列番号2、配列番号5又は配列番号9で示されるアミノ酸配列と75%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは85%、さらに好ましくは90%（例えば、95%、さらには、98%）以上の同一性を有するアミノ酸配列等があげられる。

【0089】

本発明の核酸に含まれる塩基配列は、好ましくは、配列番号2、配列番号5又は配列番号9からなるアミノ酸配列と同一性が90%以上のアミノ酸配列をコードし、かつ、本発明の上記活性を有するタンパク質をコードする塩基配列である。さらに好ましくは、配列番号2、配列番号5又は配列番号9からなるアミノ酸配列と同一性が95%以上のアミノ酸配列をコードし、かつ、本発明の上記活性を有するタンパク質をコードする塩基配列である。

40

【0090】

2つのアミノ酸配列の同一性パーセントは、視覚的検査及び数学的計算によって決定することができる。また、コンピュータープログラムを用いて同一性パーセントを決定することもできる。そのようなコンピュータープログラムとしては、例えば、BLAST、FASTA (Altschulら、J. Mol. Biol., 215:403-410 (1990))、及びClustalW等があげられる。

50

特に、BLASTプログラムによる同一性検索の各種条件（パラメーター）は、Altschulら(Nucl. Acids. Res., 25, p.3389-3402, 1997)に記載されたもので、米国バイオテクノロジー情報センター（NCBI）やDNA Data Bank of Japan (DDBJ) のウェブサイトから公的に入手することができる（BLASTマニュアル、Altschulら NCB/NLM/NIH Bethesda, MD 20894; Altschulら）。また、遺伝情報処理ソフトウェアGENETYX Ver.7（ゼネティックス）、DINASIS Pro（日立ソフト）、Vector NTI(Infomax)等のプログラムを用いて決定することもできる。

#### 【0091】

複数のアミノ酸配列を並列させる特定のアラインメントスキームは、配列のうち、特定の短い領域のマッチングをも示すことができるため、用いた配列の全長配列間に有意な関係がない場合であっても、そのような領域において、特定の配列同一性が非常に高い領域を検出することもできる。さらに、BLASTアルゴリズムは、BLOSUM62アミノ酸スコア付けマトリックスを用いることができるが、選択パラメーターとしては、以下のものを用いることができる：（A）低い組成複雑性を有するクエリー配列のセグメント（Wootton及びFederhenのSEGプログラム（Computers and Chemistry, 1993）により決定される；Wootton及びFederhen, 1996「配列データベースにおける組成編重領域の解析（Analysis of compositionally biased regions in sequence databases）」Methods Enzymol., 266: 544-71も参照されたい）、又は、短周期性の内部リピートからなるセグメント（Claverie及びStates（Computers and Chemistry, 1993）のXNUプログラムにより決定される）をマスクするためのフィルターを含むこと、及び（B）データベース配列に対する適合を報告するための統計学的有意性の閾値、又はEスコア（Karlin及びAltschul, 1990）の統計学的モデルにしたがって、単に偶然により見出される適合の期待確率；ある適合に起因する統計学的有意差がEスコア閾値より大きい場合、この適合は報告されない。

#### 【0092】

（e）配列番号2、配列番号5又は配列番号9で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列に対し相補的な塩基配列からなる核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、本発明の上記活性を有するタンパク質をコードする塩基配列を含む核酸

本発明の核酸に含まれる塩基配列は、配列番号2、配列番号5又は配列番号9で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列に対し相補的な塩基配列からなる核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、本発明の上記活性を有するタンパク質をコードする塩基配列を含む。

#### 【0093】

配列番号2、配列番号5又は配列番号9で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質及びハイブリダイズの条件は上記のとおりである。本発明の核酸に含まれる塩基配列としては、配列番号2、配列番号5又は配列番号9で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列に対し相補的な塩基配列からなる核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、本発明の上記活性を有するタンパク質をコードする塩基配列があげられる。

#### 【0094】

（f）配列番号7又は配列番号12からなる塩基配列に対し相補的な塩基配列からなる核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、本発明の上記活性を有するタンパク質をコードするエクソンを有する塩基配列を含む核酸

配列番号7又は配列番号12からなる塩基配列は、それぞれ本発明のMaGPAT4（及びMaGPAT4-long）又はMaGPAT5をコードするゲノムDNA配列である。

#### 【0095】

本発明の核酸に含まれる塩基配列は、配列番号7又は配列番号12からなる塩基配列に対し相補的な塩基配列からなる核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、本発明の上記活性を有するタンパク質をコードするエクソンを有する塩基配列を含む。

。

## 【0096】

上記塩基配列は、当業者に公知の方法で適当な断片を用いてプローブを作製し、このプローブを用いて、コロニーハイブリダイゼーション、ブランクハイブリダイゼーション、サザンブロット等の公知のハイブリダイゼーション法により、ゲノムライブラリー等から得ることができる。ハイブリダイズの条件は、上記の通りである。

## 【0097】

(g) 配列番号7又は配列番号12からなる塩基配列と同一性が70%以上の塩基配列からなり、かつ、本発明の上記活性を有するタンパク質をコードするエクソンを有する塩基配列を含む核酸

本発明の核酸に含まれる塩基配列は、配列番号7又は配列番号12からなる塩基配列に対して少なくとも70%以上の同一性を有する塩基配列からなり、かつ、本発明の上記活性を有するタンパク質をコードする塩基配列を含む。好ましくは、配列番号7又は配列番号12に示される塩基配列に対して少なくとも75%以上、さらに好ましくは80%以上（例えば、85%以上、より一層好ましくは、90%以上、さらには95%、98%又は99%以上）の同一性を有する塩基配列を含み、かつ、本発明の上記活性を有するタンパク質をコードするエクソンを有する塩基配列が挙げられる。2つの塩基配列の同一性%は、上述したように決定することができる。

10

## 【0098】

また、配列番号7のゲノムDNA配列は、エクソン10個とイントロン9個からなり、エクソン領域は配列番号7の第428～744番目又は第596～744番目、第850～924番目、第1302～1396番目、第1480～1726番目、第1854～2279番目、第2370～2632番目、第2724～3299番目、第3390～3471番目、第3575～4024番目、及び第4133～4248番目である。そして、配列番号12のゲノムDNA配列は、エクソン3個とイントロン2個からなり、エクソン領域は配列番号12の第1～302番目、第457～1676番目、及び第1754～2598番目である。

20

## 【0099】

別の態様において、本発明の核酸に含まれる塩基配列は、配列番号7又は配列番号12に示されるゲノムDNA配列において、イントロン領域の塩基配列が配列番号7又は配列番号12に示される配列に対して100%同一であり、そして、エクソン領域の塩基配列が配列番号7又は配列番号12に示される配列に対して少なくとも70%以上、好ましくは75%以上、さらに好ましくは80%以上（例えば、85%以上、より一層好ましくは90%以上、さらには95%以上、98%以上、99%以上）の同一性を有する塩基配列を含み、かつ、本発明の上記活性を有するタンパク質をコードするエクソンを有する塩基配列が挙げられる。

30

## 【0100】

また別の態様において、本発明の核酸に含まれる塩基配列は、配列番号7又は配列番号12に示されるゲノムDNA配列において、エクソン領域の塩基配列が配列番号7又は配列番号12に示される配列に対して100%同一であり、そして、イントロン領域の塩基配列が配列番号7又は配列番号12に示される配列に対して少なくとも70%以上、好ましくは75%以上、さらに好ましくは80%以上（例えば、85%以上、より一層好ましくは90%以上、さらには95%以上、98%以上、99%以上）の同一性を有する塩基配列を含み、かつ、スプライシングによりイントロン領域が脱離可能であり、それによりエクソン領域が連結して本発明の上記活性を有するタンパク質をコードする塩基配列、が挙げられる。

40

## 【0101】

さらに別の態様において、本発明の核酸に含まれる塩基配列は、配列番号7又は配列番号12に示されるゲノムDNA配列において、イントロン領域の塩基配列が配列番号7又は配列番号12に示される配列に対して少なくとも70%以上、好ましくは75%以上、さらに好ましくは80%以上（例えば、85%以上、より一層好ましくは90%以上、さ

50

らには95%以上、98%以上、99%以上)の同一性を有する塩基配列を含み、そして、エクソン領域の塩基配列が配列番号7又は配列番号12に示される配列に対して少なくとも70%以上、好ましくは75%以上、さらに好ましくは80%以上(例えば、85%以上、より一層好ましくは90%以上、さらには95%以上、98%以上、99%以上)の同一性を有する塩基配列を含み、かつ、スプライシングによりイントロン領域が脱離可能であり、それにより連結したエクソン領域が本発明の上記活性を有するタンパク質をコードする、塩基配列が挙げられる。

#### 【0102】

2つの塩基配列の同一性%は、上述した方法により決定することができる。

#### 【0103】

また、本発明の核酸には、配列番号1、配列番号4又は配列番号8からなる塩基配列において1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、かつ、本発明の上記活性を有するタンパク質をコードする塩基配列を含む核酸も含まれる。具体的には、

(i) 配列番号1、配列番号4又は配列番号8に示す塩基配列のうち1個又は複数個(好ましくは1個又は数個(例えば、1~720個、1~600個、1~500個、1~400個、1~300個、1~250個、1~200個、1~150個、1~100個、1~50個、1~30個、1~25個、1~20個、1~15個、さらに好ましくは10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1個))の塩基が欠失した塩基配列、

(ii) 配列番号1、配列番号4又は配列番号8に示す塩基配列のうち1個又は複数個(好ましくは1個又は数個(例えば、1~720個、1~600個、1~500個、1~400個、1~300個、1~250個、1~200個、1~150個、1~100個、1~50個、1~30個、1~25個、1~20個、1~15個、さらに好ましくは10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1個))の塩基が他の塩基で置換された塩基配列、

(iii) 配列番号1、配列番号4又は配列番号8に示す塩基配列において1個又は複数個(好ましくは1個又は数個(例えば、1~720個、1~600個、1~500個、1~400個、1~300個、1~250個、1~200個、1~150個、1~100個、1~50個、1~30個、1~25個、1~20個、1~15個、さらに好ましくは10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は1個))の他の塩基が付加された塩基配列、又は

(iv) 上記(i)~(iii)を組み合わせた塩基配列であって、かつ、本発明の上記活性を有するタンパク質をコードしている塩基配列を含む核酸を用いることもできる。

#### 【0104】

本発明の核酸の好ましい態様としては、以下の(a)~(d)のいずれかに記載の塩基配列のフラグメントを含む核酸も含まれる。

(a) 配列番号1、配列番号4又は配列番号8で示される塩基配列

(b) 配列番号2、配列番号5又は配列番号9で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列

(c) 配列番号3、配列番号6又は配列番号11で示される塩基配列

(d) 配列番号7又は配列番号12で示される塩基配列

#### 【0105】

(a) 配列番号1、配列番号4又は配列番号8で示される塩基配列、(b) 配列番号2、配列番号5又は配列番号9で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列、(c) 配列番号3、配列番号6又は配列番号11で示される塩基配列については、表1に記載したとおりである。また、配列番号7又は配列番号12で示される塩基配列についても上述の通りである。上記配列のフラグメントとは、上記塩基配列に含まれるORF、CDS、生物学的活性を有する領域、以下に記載するようなプライマーとして用いた領域、プローブとなりうる領域が含まれ、天然由来のものであっても、人工的に作製したものであってもよい。

#### 【0106】

また、本発明の核酸には以下の核酸も含まれる。

## 【0107】

(1) 以下の(a)～(g)のいずれかに記載の核酸。

(a) 配列番号2、配列番号5又は配列番号9で示されるアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含む核酸

(b) 配列番号1、配列番号4又は配列番号8からなる塩基配列に対し相補的な塩基配列からなる核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸

(c) 配列番号1、配列番号4又は配列番号8からなる塩基配列と同一性が70%以上の塩基配列を含む核酸

(d) 配列番号2、配列番号5又は配列番号9からなるアミノ酸配列と同一性が70%以上のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含む核酸 10

(e) 配列番号2、配列番号5又は配列番号9で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列に対し相補的な塩基配列からなる核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸、

(f) 配列番号7又は配列番号12からなる塩基配列に対し相補的な塩基配列からなる核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸

(g) 配列番号7又は配列番号12からなる塩基配列と同一性が70%以上の塩基配列を含む核酸

## 【0108】

(2) 以下の(a)～(g)のいずれかである、(1)に記載の核酸。 20

(a) 配列番号2、配列番号5又は配列番号9で示されるアミノ酸配列において1～80個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含む核酸

(b) 配列番号1、配列番号4又は配列番号8からなる塩基配列に対し相補的な塩基配列からなる核酸と2×SSC、50℃の条件下でハイブリダイズする核酸

(c) 配列番号1、配列番号4又は配列番号8からなる塩基配列と同一性が90%以上の塩基配列を含む核酸

(d) 配列番号2、配列番号5又は配列番号9からなるアミノ酸配列と同一性が90%以上のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含む核酸

(e) 配列番号2、配列番号5又は配列番号9で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列に対し相補的な塩基配列からなる核酸と2×SSC、50℃の条件下でハイブリダイズする核酸 30

(f) 配列番号7又は配列番号12からなる塩基配列に対し相補的な塩基配列からなる核酸と2×SSC、50℃の条件下でハイブリダイズする核酸

(g) 配列番号7又は配列番号12からなる塩基配列と同一性が90%以上の塩基配列を含む核酸

## 【0109】

本発明のグリセロール-3-リン酸アシル基転移酵素

本発明のタンパク質は、配列番号2、配列番号5又は配列番号9で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質及び前記タンパク質と同等の機能を有するタンパク質を含み、天然由来のものであっても、人工的に作製したものであってもよい。配列番号2、配列番号5又は配列番号9で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質については、上記のとおりである。「同等の機能を有するタンパク質」とは、上記『本発明のグリセロール-3-リン酸アシル基転移酵素をコードする核酸』の項で説明したとおり、「本発明の上記活性」を有するタンパク質を意味する。 40

## 【0110】

本発明において、配列番号2、配列番号5又は配列番号9で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質と同等の機能を有するタンパク質としては、以下の(a)又は(b)のいずれかに記載のタンパク質があげられる。

(a) 配列番号2、配列番号5又は配列番号9において1若しくは複数個のアミノ酸が欠 50

失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、本発明の上記活性を有するタンパク質

(b) 配列番号2、配列番号5又は配列番号9からなるアミノ酸配列と同一性が70%以上のアミノ酸配列からなるタンパク質であり、かつ、本発明の上記活性を有するタンパク質

#### 【0111】

上記のうち、配列番号2、配列番号5若しくは配列番号9において1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列、又は、配列番号2、配列番号5若しくは配列番号9からなるアミノ酸配列と同一性が70%以上のアミノ酸配列については、上記『本発明のグリセロール-3-リン酸アシル基転移酵素をコードする核酸』の項で説明したとおりである。また、上記「本発明の上記活性を有するタンパク質」には、配列番号1、配列番号4若しくは配列番号8の塩基配列を含む核酸によってコードされるタンパク質の変異体、又は、配列番号2、配列番号5若しくは配列番号9に示されるアミノ酸配列において1個又は複数個のアミノ酸が置換、欠失若しくは付加等の多くの種類の修飾により変異したタンパク質、あるいはアミノ酸側鎖等が修飾されている修飾タンパク質、他のタンパク質との融合タンパク質であって、かつ、GPAT活性、GNPAT活性及び/若しくは、上記『本発明のグリセロール-3-リン酸アシル基転移酵素をコードする核酸』の項に記載したi)の活性、又は上記ii)の活性を有するタンパク質も含まれる。

#### 【0112】

また、本発明のタンパク質は、人工的に作製したものであってもよく、その場合は、Fmoc法（フルオレニルメチルオキシカルボニル法）、tBoc法（t-ブチルオキシカルボニル法）等の化学合成法によっても製造することができる。また、アドバンスドケムテック社製、パーキンエルマー社製、ファルマシア社製、プロテインテクノロジーインストゥルメント社製、シンセセルベガ社製、パーセプティブ社製、島津製作所社製等のペプチド合成機を利用して化学合成することもできる。

#### 【0113】

また、本発明のタンパク質には、以下のタンパク質も含まれる。

#### 【0114】

(1) 以下の(a)又は(b)のいずれかに記載のタンパク質。

(a) 配列番号2、配列番号5又は配列番号9において1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号2、配列番号5又は配列番号9からなるアミノ酸配列と同一性が70%以上のアミノ酸配列からなるタンパク質

#### 【0115】

(2) 以下の(a)又は(b)のいずれかである、(1)に記載のタンパク質。

(a) 配列番号2、配列番号5又は配列番号9において1～80個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号2、配列番号5又は配列番号9からなるアミノ酸配列と同一性が90%以上のアミノ酸配列からなるタンパク質

#### 【0116】

##### 本発明の核酸のクローニング

本発明のGPATの核酸は、例えば、適切なプローブを用いてcDNAライブラリーからスクリーニングすることにより、クローニングすることができる。また、適切なプライマーを用いてPCR反応により増幅し、適切なベクターに連結することによりクローニングすることができる。さらに、別のベクターにサブクローニングすることもできる。

#### 【0117】

例えば、pBlue-Script<sup>TM</sup>SK(+) (Stratagene)、pGEM-T (Promega)、pAmp(TM: Gibco-BRL)、p-Direct (Clontech)、pCR2.1-TOP0(Invitrogene)等の市販のプラスミドベクターを用いることができる。また、PCR反応で増幅する場合、プライマーは、上記の配列番号

3、6又は11等に示される塩基配列のいずれの部分も用いることができる。例えば、後述する実施例に記載のプライマーを用いることができる。そして、*M. alpina* 菌体から調製したcDNAに、上記プライマー及びDNAポリメラーゼ等を作用させてPCR反応を行う。上記方法は、『Molecular Cloning, A Laboratory Manual 3rd ed.』(Cold Spring Harbor Press (2001))等に従い、当業者であれば容易に行うことができるが、本発明のPCR反応の条件としては、例えば以下の条件があげられる。

変性温度：90～95℃

アニーリング温度：40～60℃

伸長温度：60～75℃

サイクル数：10回以上

10

#### 【0118】

得られたPCR産物の精製には公知の方法を用いることができる。例えば、GENECLEAN(フナコシ)、QIAquick PCR purification Kits(QIAGEN)、ExoSAP-IT (GEヘルスケアバイオサイエンス)等のキットを用いる方法、DEAE-セルロース濾紙を用いる方法、透析チューブを用いる方法等がある。アガロースゲルを用いる場合には、アガロースゲル電気泳動を行い、塩基配列断片をアガロースゲルより切り出して、GENECLEAN(フナコシ)、QIAquick Gel extraction Kits(QIAGEN)、フリーズ&スクイーズ法等により精製することができる。

#### 【0119】

クローニングした核酸の塩基配列は、塩基配列シーケンサーを用いて決定することができる。

20

#### 【0120】

##### G P A T発現用ベクター構築及び形質転換体の作成

本発明はまた、本発明のG P A Tをコードする核酸を含有する組換えベクターを提供する。本発明は、さらに、上記組換えベクターによって形質転換された形質転換体も提供する。

#### 【0121】

このような組換えベクター及び形質転換体は以下のようにして得ることができる。すなわち、本発明のG P A Tをコードする核酸を有するプラスミドを制限酵素を用いて消化する。用いる制限酵素としては、例えば、EcoRI、KpnI、BamHI及びSalI等があげられるが、これらに限定されない。なお、末端をT4ポリメラーゼ処理することにより平滑化してもよい。消化後のDNA断片をアガロースゲル電気泳動により精製する。このDNA断片を、発現用ベクターに公知の方法を用いて組み込むことにより、G P A T発現用ベクターを得ることができる。この発現ベクターを宿主に導入して形質転換体を作製し、目的とするタンパク質の発現に供する。

30

#### 【0122】

このとき、発現ベクター及び宿主は、目的とするタンパク質を発現できるものであれば特に限定されず、例えば、宿主として、真菌や細菌、植物、動物若しくはそれらの細胞等があげられる。真菌として、脂質生産菌である*M. alpina*等の糸状菌、サッカロミセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)等の酵母等があげられる。また細菌として、大腸菌(*Escherichia coli*)やバチルス・ズブチリス(*Bacillus subtilis*)等があげられる。さらに植物としては、ナタネ、ダイズ、ワタ、ベニバナ、アマ等の油糧植物があげられる。

40

#### 【0123】

脂質生産菌としては、例えば、MYCOTAXON, Vol. XLIV, NO. 2, pp. 257-265 (1992)に記載されている菌株を使用することができ、具体的には、モルティエレラ (*Mortierella*) 属に属する微生物、例えば、モルティエレラ・エロンガタ (*Mortierella elongata*) IF08570、モルティエレラ・エキシグア (*Mortierella exigua*) IF08571、モルティエレラ・ヒグロフィラ (*Mortierella hygrophila*) IF05941、モルティエレラ・アルピナ (*Mortierella alpina*) IF08568、ATCC16266、ATCC32221、ATCC42430、CBS 219.35、CBS224.37、CBS250.5

50

3、CBS343.66、CBS527.72、CBS528.72、CBS529.72、CBS608.70、CBS754.68等のモルティエラ亜属 (subgenus *Mortierella*) に属する微生物、又はモルティエラ・イザベリナ (*Mortierella isabellina*) CBS194.28、IFO6336、IFO7824、IFO7873、IFO7874、IFO8286、IFO8308、IFO7884、モルティエラ・ナナ (*Mortierella nana*) IFO8190、モルティエラ・ラマニアナ (*Mortierella ramanniana*) IFO5426、IFO8186、CBS112.08、CBS212.72、IFO7825、IFO8184、IFO8185、IFO8287、モルティエラ・ヴィナセア (*Mortierella vinacea*) CBS236.82等のマイクロムコール亜属 (subgenus *Micromucor*) に属する微生物等があげられる。とりわけ、モルティエラ・アルピナ (*Mortierella alpina*) が好ましい。

#### 【0124】

10

真菌類を宿主として用いる場合は、本発明の核酸が宿主中で自立複製可能であるか、若しくは当該菌の染色体上に挿入され得る構造であることが好ましい。それと同時に、プロモーター、ターミネーターを含む構成であることが好ましい。宿主として *M. alpina* を使用する場合、発現ベクターとして、例えば、pD4、pDuraSC、pDura5等があげられる。プロモーターとしては、宿主中で発現できるものであればいかなるプロモーターを用いてもよく、例えば、histonH4.1遺伝子プロモーター、GAPDH (グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ) 遺伝子プロモーター、TEF (Translation elongation factor) 遺伝子プロモーターといった *M. alpina* に由来するプロモーターが用いられる。

#### 【0125】

*M. alpina* 等の糸状菌への組換えベクターの導入方法としては、例えば、エレクトロポレーション法、スフェロプラスト法、パーティクルデリバリー法、及び核内へのDNAの直接マイクロインジェクション等があげられる。栄養要求性のホスト株を用いる場合は、その栄養素を欠いた選択培地上で生育する株を選択することで、形質転換株を取得することができる。また、形質転換に薬剤耐性マーカー遺伝子を用いる場合には、その薬剤を含む選択培地にて培養を行い、薬剤耐性を示す細胞コロニーを得ることができる。

20

#### 【0126】

酵母を宿主として用いる場合は、発現ベクターとして、例えば、pYE22m等があげられる。また、pYES (Invitrogen)、pESC (STRATAGENE) 等の市販の酵母発現用ベクターを、用いてもよい。また本発明に適する宿主としては、*Saccharomyces cerevisiae* EH13-15株 (trp1, MAT $\alpha$ ) 等があげられるがこれらに限定されない。プロモーターとしては、例えば、GAPDHプロモーター、gal1プロモーター、gal10プロモーター等の酵母等に由来するプロモーターが用いられる。

30

#### 【0127】

酵母への組換えベクターの導入方法としては、例えば、酢酸リチウム法、エレクトロポレーション法、スフェロプラスト法、デキストラン仲介トランスフェクション、リン酸カルシウム沈殿、ポリブレン仲介トランスフェクション、プロトプラスト融合、リボソーム中のポリヌクレオチド (単数又は複数) の被包、及び核内へのDNAの直接マイクロインジェクション等があげられる。

#### 【0128】

大腸菌等の細菌を宿主として用いる場合は、発現ベクターとしては、例えばファルマシア社のpGEX、pUC18等があげられる。プロモーターとしては、例えば、trpプロモーター、lacプロモーター、PLプロモーター、PRプロモーター等の大腸菌やファージ等に由来するプロモーターが用いられる。細菌への組換えベクターの導入方法としては、例えばエレクトロポレーション法や塩化カルシウム法を用いることができる。

40

#### 【0129】

##### 本発明の脂肪酸組成物の製造方法

本発明は、上記形質転換体から、脂肪酸組成物を製造する方法を提供する。すなわち、上記形質転換体を培養して得られる培養物から脂肪酸組成物を製造する方法である。脂肪酸組成物は、1又はそれ以上の脂肪酸の集合体を含む組成物である。ここで、脂肪酸は遊離脂肪酸であってもよく、トリグリセリドやリン脂質等の脂肪酸を含む脂質として存在し

50

ていてもよい。本発明の脂肪酸組成物は、具体的には、以下の方法で製造することができる。しかし、本製造方法に関しては、当該方法に限られず、一般的な公知の他の方法を用いて行うこともできる。

#### 【0130】

G P A Tを発現させた生物の培養に用いる培地は、適当なpH及び浸透圧を有し、各宿主の増殖に必要な栄養素、微量成分、血清や抗生物質等の生物材料を含んでいる培養液（培地）であれば、いかなる培養液も用いる。例えば、酵母を形質転換してG P A Tを発現させた場合は、SC-Trp培地、YPD培地、YPD5培地等を用いることができるが、これらに限定されない。具体的な培地の組成としてSC-Trp培地を例示する：1 lあたり、Yeast nitrogen base w/o amino acids (DIFCO) 6.7 g、グルコース20 g、アミノ酸パウダー（アデニン硫酸塩1.25 g、アルギニン0.6 g、アスパラギン酸3 g、グルタミン酸3 g、ヒスチジン0.6 g、ロイシン1.8 g、リジン0.9 g、メチオニン0.6 g、フェニルアラニン1.5 g、セリン11.25 g、チロシン0.9 g、バリン4.5 g、スレオニン6 g、ウラシル0.6 gを混合したもの）1.3 g。

#### 【0131】

培養条件は、宿主の増殖に適し、かつ生成した酵素が安定に保たれるのに適当な条件であればいかなる条件でもよいが、具体的には、嫌気度、培養時間、温度、湿度、静置培養又は振盪培養等の個々の条件を調節することができる。培養方法は、同一条件での培養（1段階培養）でもよく、2以上の異なる培養条件を用いる、いわゆる2段階培養若しくは3段階培養でもよいが、大量培養をする場合には、培養効率がよい2段階培養等が好ましい。

#### 【0132】

宿主として酵母を用いて2段階培養を行う場合、本発明の脂肪酸組成物の製造方法は以下のように行うことができる。前培養として、形質転換体のコロニーを、上記のSC-Trp培地等に植菌して、30℃で2日間振盪培養を行う。その後、本培養として、YPD5（2%酵母エキス、1%ポリペプトン、5%グルコース）培地10 mlに前培養液を500 µl添加し、30℃で2日間振盪培養を行う。

#### 【0133】

##### 本発明の脂肪酸組成物

本発明はまた、本発明のG P A Tが発現している細胞における1又はそれ以上の脂肪酸の集合体である脂肪酸組成物を提供する。好ましくは、本発明のG P A Tが発現している形質転換体を培養して得られる脂肪酸組成物である。脂肪酸は、遊離脂肪酸であってもよく、トリグリセリド、リン脂質等の脂肪酸を含む脂質の形で存在していてもよい。

#### 【0134】

本発明の脂肪酸組成物に含まれる脂肪酸としては、長鎖炭水化物の鎖状あるいは分岐状のモノカルボン酸をいい、例えば、ミリスチン酸（テトラデカン酸）(14:0)、ミリストレイン酸（テトラデセン酸）(14:1)、パルミチン酸（ヘキサデカン酸）(16:0)、パルミトレイン酸（9-ヘキサデセン酸）(16:1)、ステアリン酸（オクタデカン酸）(18:0)、オレイン酸（cis-9-オクタデセン酸）(18:1(9))、パクセン酸（11-オクタデセン酸）(18:1(11))、リノール酸（cis, cis-9,12 オクタデカジエン酸）(18:2(9,12))、α-リノレン酸（9,12,15-オクタデカントリエン酸）(18:3(9,12,15))、γ-リノレン酸（6,9,12-オクタデカントリエン酸）(18:3(6,9,12))、ステアリドン酸（6,9,12,15-オクタデカンテトラエン酸）(18:4(6,9,12,15))、アラキジン酸（イコサン酸）(20:0)、(8,11-イコサジエン酸）(20:2(8,11))、ミード酸（5,8,11-イコサトリエン酸）(20:3(5,8,11))、ジホモγ-リノレン酸（8,11,14-イコサトリエン酸）(20:3(8,11,14))、アラキドン酸（5,8,11,14-イコサテトラエン酸）(20:4(5,8,11,14))、エイコサテトラエン酸（8,11,14,17-イコサテトラエン酸）(20:4(8,11,14,17))、エイコサペンタエン酸（5,8,11,14,17-イコサペンタエン酸）(20:5(5,8,11,14,17))、ベヘン酸（ドコサン酸）(22:0)、(7,10,13,16-ドコサテトラエン酸）(22:4(7,10,13,16))、(7,10,13,16,19-ドコサペンタエン酸）(22:5(7,10,13,16,19))、(4,7,10,13,16-ドコサペンタエン酸）(22:5(4,7,10,13,16))、(4,

7,10,13,16,19-ドコサヘキサエン酸) (22:6(4,7,10,13,16,19))、リグノセリン酸 (テトラドコサン酸) (24:0)、ネルボン酸 (cis-15-テトラドコサン酸) (24:1)、セロチン酸 (ヘキサドコサン酸) (26:0)、等があげられるが、これらに限定されない。なお、上記物質名はIUPAC生化学命名法で定義された慣用名であり、組織名及び、炭素数と二重結合の位置を示す数値を、カッコ内に記載した。

#### 【0135】

本発明の脂肪酸組成物は、上記の脂肪酸のうち、1 またそれ以上の脂肪酸の組み合わせであれば、いかなる数のいかなる種類の脂肪酸からなる組成物でもよい。

#### 【0136】

本発明の脂肪酸組成物の組成を測定するには、本明細書中の「本発明のグリセロール-3-リン酸アシル基転移酵素をコードする核酸」の項目で記載した、脂肪酸組成又は脂肪酸含有率の測定方法を利用することができる。

10

#### 【0137】

##### 本発明の脂肪酸組成物を含む食品等

また、本発明は、上記脂肪酸組成物を含む食品を提供する。本発明の脂肪酸組成物は、常法に従って、例えば、油脂を含む食品、工業原料（化粧品、医薬（例えば、皮膚外用薬）、石鹸等の原料）の製造等の用途に使用することができる。化粧品（組成物）又は医薬（組成物）の剤型としては、溶液状、ペースト状、ゲル状、固体状、粉末状等任意の剤型をあげることができるが、これらに限定されない。また、食品の形態としては、カプセル等の医薬製剤の形態、又はタンパク質、糖類、脂肪、微量元素、ビタミン類、乳化剤、香料等に本発明の脂肪酸組成物が配合された自然流動食、半消化態栄養食、及び成分栄養食、ドリンク剤、経腸栄養剤等の加工形態があげられる。

20

#### 【0138】

さらに、本発明の食品の例としては、栄養補助食品、健康食品、機能性食品、幼児用食品、乳児用調製乳、未熟児用調製乳、老人用食品等があげられるが、これらに限定されない。本明細書においては、食品とは、固体、流動体、及び液体、並びにそれらの混合物であって、摂食可能なものの総称をいう。

#### 【0139】

栄養補助食品とは、特定の栄養成分が強化されている食品をいう。健康食品とは、健康的な又は健康によいとされる食品をいい、栄養補助食品、自然食品、ダイエット食品等が含まれる。機能性食品とは、体の調節機能を果たす栄養成分を補給するための食品をいい、特定保健用食品と同義である。幼児用食品とは、約6歳までの子供に与えるための食品をいう。老人用食品とは、無処理の食品と比較して消化及び吸収が容易であるように処理された食品をいう。乳児用調製乳とは、約1歳までの子供に与えるための調製乳をいう。未熟児用調製乳とは、未熟児が生後約6ヶ月になるまで与えるための調製乳をいう。

30

#### 【0140】

これらの食品としては、肉、魚、ナッツ等の天然食品（油脂で処理したもの）；中華料理、ラーメン、スープ等の調理時に油脂を加える食品；天ぷら、フライ、油揚げ、チャーハン、ドーナッツ、かりん糖等の熱媒体として油脂を用いた食品；バター、マーガリン、マヨネーズ、ドレッシング、チョコレート、即席ラーメン、キャラメル、ビスケット、クッキー、ケーキ、アイスクリーム等の油脂食品又は加工時に油脂を加えた加工食品；おかき、ハードビスケット、あんパン等の加工仕上げ時に油脂を噴霧又は塗布した食品等をあげることができる。しかしながら、本発明の食品は、油脂を含む食品に限定されるわけではなく、例えば、パン、麺類、ごはん、菓子類（キャンデー、チューインガム、グミ、錠菓、和菓子）、豆腐及びその加工品等の農産食品；清酒、薬用酒、みりん、食酢、醤油、みそ等の発酵食品；ヨーグルト、ハム、ベーコン、ソーセージ等の畜産食品；かまぼこ、揚げ天、はんぺん等の水産食品；果汁飲料、清涼飲料、スポーツ飲料、アルコール飲料、茶等があげられる。

40

#### 【0141】

本発明のG P A Tをコードする核酸又はG P A Tタンパク質を用いた菌株の評価・選択

50

## 方法

本発明はまた、本発明のG P A Tをコードする核酸又はG P A Tタンパク質を用いて、脂質生産菌の評価や選択を行う方法を提供する。具体的には以下のとおりである。

### 【0142】

#### (1) 評価方法

本発明の一態様として、本発明のG P A Tをコードする核酸又はG P A Tタンパク質を用いて、脂質生産菌の評価を行う方法があげられる。本発明の上記評価方法としては、まず、本発明の塩基配列に基づいて設計したプライマー又はプローブを用いて、被検菌株である脂質生産菌株の本発明の上記活性について評価する方法があげられる。このような評価方法の一般的手法は公知であり、例えば、国際特許出願パンフレットW001/040514号、特開平8-205900号公報などに記載されている。以下、この評価方法について簡単に説明する。

10

### 【0143】

まず、被検菌株のゲノムを調製する。調製方法は、Hereford法や酢酸カリウム法など、いかなる公知の方法をも用いることができる（例えば、Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press, p130 (1990)参照）。

### 【0144】

本発明の塩基配列、好ましくは、配列番号1、配列番号4又は配列番号8に基づいてプライマー又はプローブを設計する。上記プライマー又はプローブは本発明の塩基配列のいずれの部分をも用いることができ、またその設計は公知の手法を用いて行うことができる。プライマーとして用いるポリヌクレオチドの塩基数は、通常、10塩基以上であり、15～25塩基であることが好ましい。また、挟み込む部分の塩基数は、通常、300～2000塩基が適当である。

20

### 【0145】

上記で作製したプライマー又はプローブを用いて、上記被検菌株のゲノム中に本発明の塩基配列と特異的な配列が存在するか否かを調べる。本発明の塩基配列と特異的な配列の検出は、公知の手法を用いて行うことができる。例えば、本発明の塩基配列に特異的な配列の一部又は全部を含むポリヌクレオチド又は上記塩基配列に対して相補的な塩基配列を含むポリヌクレオチドを一つのプライマーとして用い、もう一方のプライマーとしてこの配列よりも上流あるいは下流の配列の一部又は全部を含むポリヌクレオチド、又は上記塩基配列に対して相補的な塩基配列を含むポリヌクレオチドを用いて、例えば、PCR法等によって被検菌株の核酸を増幅し、増幅物の有無、増幅物の分子量の大きさなどを測定することができる。

30

### 【0146】

本発明の方法に適するPCR法の反応条件は、特に限定されないが、例えば、以下の条件があげられる。

変性温度：90～95℃

アニーリング温度：40～60℃

伸長温度：60～75℃、

サイクル数：10回以上

40

などの条件である。得られた反応生成物はアガロースゲルなどを用いた電気泳動法等により分離して、増幅産物の分子量を測定することができる。これにより、増幅産物の分子量が本発明の塩基配列と特異的な領域に相当する核酸分子を含む大きさか否かを確認することにより、被検菌株の本発明の上記活性を予測又は評価することができる。また、上記増幅産物の塩基配列を上記方法等で解析することによって、さらに本発明の上記活性をより正確に予測又は評価することができる。なお、本発明の上記活性の評価方法は、上記のとおりである。

### 【0147】

また、本発明の上記評価方法としては、被検菌株を培養し、配列番号1又は配列番号6等の本発明の塩基配列がコードするG P A Tの発現量を測定することによって、被検菌株

50

の本発明の上記活性を評価することもできる。なお、G P A Tの発現量は、被検菌株を適当な条件で培養し、G P A Tのm R N A又はタンパク質を定量することにより測定できる。m R N A又はタンパク質の定量は、公知の手法を用いて行うことができる。m R N Aの定量は、例えば、ノーザンハイブリダイゼーションや定量的R T - P C Rによって、タンパク質の定量は、例えば、ウエスタンブロッティングによって行うことができる(Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons 1994-2003)。

#### 【0148】

##### (2) 選択方法

本発明の他の態様として、本発明のG P A Tをコードする核酸又はG P A Tタンパク質を用いて、脂質生産菌の選択を行う方法があげられる。本発明の上記選択方法としては、被検菌株を培養し、配列番号1、配列番号4又は配列番号8等の本発明の塩基配列がコードするG P A Tの発現量を測定して、目的とする発現量の菌株を選択することにより、所望の活性を有する菌株を選択することができる。また、基準となる菌株を設定し、この基準菌株と被検菌株を各々培養し、各菌株の前記発現量を測定し、基準菌株と被検菌株の発現量を比較して、所望の菌株を選択することもできる。具体的には、例えば、基準菌株及び被検菌株を適当な条件で培養し、各菌株の発現量を測定し、基準菌株よりも被検菌株の方が高発現、又は低発現である被検菌株を選択することにより、所望の活性を有する菌株を選択することができる。所望の活性には、上記のように、G P A Tの発現量及びG P A Tが産生する脂肪酸組成物の組成を測定する方法があげられる。

#### 【0149】

また、本発明の上記選択方法としては、被検菌株を培養して、本発明の上記活性が高いか若しくは低い菌株を選択することにより、所望の活性を有する被検菌株を選択することもできる。所望の活性には、上記のように、G P A Tの発現量及びG P A Tが産生する脂肪酸組成物の組成を測定する方法があげられる。

#### 【0150】

被検菌株又は基準菌株としては、例えば、上記の本発明のベクターを導入した菌株、上記本発明の核酸の発現が抑制された菌株、突然変異処理が施された菌株、自然変異した菌株などを用いることができるがこれらに限定されない。なお、本発明の上記活性は、例えば本明細書中の「本発明のグリセロール-3-リン酸アシル基転移酵素をコードする核酸」の項目で記載した方法によって測定することが可能である。突然変異処理としては、例えば、紫外線照射や放射線照射などの物理的方法、E M S (エチルメタンスルホネート)、N-メチル-N-ニトロソグアニジンなどの薬剤処理による化学的方法などがあげられる(例えば、大嶋泰治編著、生物化学実験法39 酵母分子遺伝学実験法、p.67-75、学会出版センターなど参照)が、これらに限定されない。

#### 【0151】

なお、本発明の基準菌株、被検菌株として用いる菌株としては、上記の脂質生産菌又は酵母等があげられるが、これらに限定されない。具体的には、基準菌株、被検菌株は、異なる属や種に属するいかなる菌株を組み合わせてもよく、被検菌株は1又はそれ以上の菌株を同時に用いてもよい。

#### 【0152】

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明は実施例に限定されるものではない。

#### 【実施例】

#### 【0153】

##### 実施例1： モルティエレラ アルピナのゲノム解析

M. alpina 1S-4株を100mlのGY2：1培地(2%グルコース、1%酵母エキス pH6.0)に植菌し、28℃で2日間振とう培養した。濾過により菌体を集菌し、DNeasy (QIAGEN)を用いてゲノムDNAを調製した。

#### 【0154】

上記ゲノムDNAの塩基配列を、Roche 454 GS FLX Standardを用いて決定した。その

際、フラグメントライブラリーの塩基配列決定を2ラン分、メイトペアライブラリーの塩基配列決定を3ラン分を行った。得られた塩基配列をアセンブリすることにより、300個のスーパーコンティグが得られた。

#### 【0155】

##### 実施例2： cDNAの合成とcDNAライブラリーの作製

M. alpina 1S-4株を4mlの培地（2%グルコース、1%酵母エキス、pH6.0）に植菌し、4日間28℃で培養した。菌体をろ過により回収し、RNeasy plant kit (QIAGEN) を用いてRNAを抽出した。スーパースクリプトファーストストランドシステムfor RT-PCR (インビトロジェン) によりcDNAを合成した。また、Oligotex-dT30<Super>mRNA Purification Kit (タカラバイオ) を用いて、トータルRNAからpoly(A)<sup>+</sup>RNAの精製を行った。cDNAライブラリーを、ZAP-cDNA GigapackIII Gold Cloning Kit (STRATAGENE) を用いて作製した。

10

#### 【0156】

##### 実施例3： GPATホモログの探索

まず、大腸菌 (Escherichia coli) 由来のGPATであるp1sBのアミノ酸配列 (GenBank accession No. BAE78043) を、M. alpina 1S-4株のゲノム塩基配列に対し、tblastnにより検索した結果、配列番号7を含むスーパーコンティグがヒットした。一方、酵母 (S. cerevisiae) 由来のGPATであるSCT1 (YBL011W) 又はGPT2 (YKR067W) のアミノ酸配列を、M. alpina 1S-4株のゲノム塩基配列に対し、tblastnにより検索した結果、配列番号12、配列番号13、配列番号14、又は配列番号15を含むスーパーコンティグがヒットした。

20

#### 【0157】

配列番号13はMaGPAT1のゲノム配列、配列番号15はMaGPAT2のゲノム配列 (WO2008/156026) であった。配列番号14は、本発明者らが先に別途同定していたMaGPAT3のゲノム配列であった (本願出願時未公開)。

#### 【0158】

配列番号7と配列番号12に係る遺伝子は新規のものであると考えられた。配列番号7に係る遺伝子をMaGPAT4、配列番号12に係る遺伝子をMaGPAT5と命名した。

#### 【0159】

##### 実施例4： MaGPAT4及びMaGPAT5のクローニング

30

#### 【0160】

##### (1) MaGPAT4のcDNAのクローニング

MaGPAT4のcDNAをクローン化するために、以下のプライマーを作製した。

#### 【0161】

配列番号4を含むスーパーコンティグの塩基配列をBLAST解析し、既知のGPATホモログと比較したところ、配列番号4の4246-4248番目のTAAが終止コドンであると考えられた。一方、開始コドンは、既知のホモログとの比較からでは推定するのが難しかった。そこで、5'-RACE法により、cDNAの5'端のクローン化を試みた。すなわち、Gene Racer Kit (インビトロジェン) を用いて、プライマーGPAT4-S: 5'-CAAGGATGTTGTTGATGAGGAAGCGAAG-3' (配列番号16)

40

を5'遺伝子特異的プライマーとして、上記プライマーより5'上流のcDNAのクローン化を試みた。その結果、得られた配列は、配列番号3の93番目-595番目の塩基配列を含んでいた。しかしながら、開始コドンと考えられる配列がないことと、他のGPATホモログとの比較から、得られた配列もMaGPAT4の開始コドンを含まない可能性が考えられた。そこで、ゲノム配列である配列番号7と配列番号3の93番目-595番目の配列を比較し、一致する領域の5'上流を詳細に調べたところ、ゲノム配列上のMaGPAT4をコードすると考えられるフレーム上に最初に出現する終止コドンより下流に、開始コドンとなりうるATGが、596-598番目と428-430番目の2箇所見つかった。まず、596-598番目のATGを開始コドンとして、MaGPAT4のCDSをクローン化す

50

るために、以下のプライマーを作製した。

プライマー S a c I - G P A T 4 - 1 : 5' - GAGCTCATGCCCATCGTTCCAGCTCAGC - 3' (配列番号 17)

プライマー S a l - G P A T 4 - 2 : 5' - GTCGACTTATAATTTTCGGGGCGCCATCGC - 3' (配列番号 18)

#### 【0162】

cDNA を鋳型、プライマー S a c I - G P A T 4 - 1 とプライマー S a l - G P A T 4 - 2 の組み合わせで、ExTaq (タカラバイオ) を用いて、94℃ 2分、(94℃ 1分、55℃ 1分、72℃ 1分) 30 サイクルの PCR 反応を行った。増幅された約 2.5 kbp の DNA 断片を TOPO-TA クローニングキット (Invitrogen) を使ってクローン化し、インサート部分の塩基配列を決定し、配列番号 3 の塩基配列を有するプラスミドを pCR-MaGPAT4 とした。MaGPAT4 をコードしている CDS の塩基配列を配列番号 3、ORF の塩基配列を配列番号 1、これらの塩基配列から導かれる MaGPAT4 のアミノ酸配列を配列番号 2 に示した。

10

#### 【0163】

一方、428-430 番目の ATG を開始コドンとした場合を、MaGPAT4-long と表記する。MaGPAT4-long をコードしている CDS の塩基配列を配列番号 6、ORF の塩基配列を配列番号 4、これらの塩基配列から導かれる MaGPAT4-long のアミノ酸配列を配列番号 5 として示した。

#### 【0164】

20

#### (2) MaGPAT5 の cDNA のクローン化

MaGPAT5 の cDNA をクローン化するために、以下のプライマーを作製した。

プライマー G P A T 5 - 1 F : 5' - TTCCCTGAAGGCGTATCGAGCGACGATT - 3' (配列番号 19)

プライマー G P A T 5 - 3 R : 5' - CAAATGTTGACAGCAGCCAGAACG - 3' (配列番号 20)

#### 【0165】

上記のとおり作製したライブラリーを鋳型、プライマー G P A T 5 - 1 F とプライマー G P A T 5 - 3 R の組み合わせで ExTaq (タカラバイオ) を用いて、94℃ 2分、(94℃ 1分、55℃ 1分、72℃ 1分) 30 サイクルの PCR 反応を行った。得られた約 0.9 kbp の DNA 断片を、TOPO-TA クローニングキット (Invitrogen) を使ってクローン化し、インサート部分の塩基配列を決定した。配列番号 8 の 1503-2385 番目の塩基配列を有するプラスミドを pCR-MaGPAT5-P とした。

30

#### 【0166】

次に、このプラスミドを鋳型として、上記プライマーを用いて PCR によりプローブを作製した。反応には、ExTaq (タカラバイオ) を用いたが、添付の dNTP ミックスの代わりに PCR ラベリングミックス (ロシュ・ダイアグノス社) を用いて、増幅される DNA をジゴキシゲニン (DIG) ラベルしたプローブを作製し、MaGPAT5 プローブとした。これらのプローブを用いて、cDNA ライブラリーをスクリーニングした。

#### 【0167】

40

ハイブリダイゼーションの条件は、次のとおりである。

バッファー：5x SSC、1% SDS、50mM Tris-HCl (pH 7.5)、50%ホルムアミド；

温度：42℃ (一晚)；

洗浄条件：0.2x SSC、0.1% SDS 溶液中 (65℃) で、20分間×3回；

#### 【0168】

検出は、DIG 核酸検出キット (ロシュ・ダイアグノス社) を用いて行った。スクリーニングによって得られたファージクローンから、in vivo エキシジョンにより、プラスミドを切り出し、各プラスミド DNA を得た。MaGPAT5 プローブでスクリーニングして得られたプラスミドのうち、最もインサート長の長いものは、配列番号 11 の塩基配列を含ん

50

でおり、プラスミドpB-MaGPAT5と名づけた。配列番号11の塩基配列中のORF検索を行った。その結果、配列番号11の225-227番目を開始コドン、2589-2591番目を終止コドンとするCDSが存在した。この配列より導かれるアミノ酸配列のblastp検索の結果などから、このCDSがMaGPAT5をコードしていると考えられた。MaGPAT5をコードする遺伝子のCDSを配列番号10、ORFを配列番号8、これらの塩基配列から導かれるMaGPAT5のアミノ酸配列を配列番号9に示した。

【0169】

### (3) 配列解析

MaGPAT4遺伝子のゲノム配列（配列番号7）とCDS配列（配列番号3）を比較したところ、本遺伝子のゲノム配列は、エクソン10つ、イントロン9つからなり、825個のアミノ酸残基からなるタンパク質をコードしていると考えられた（図1及び図2）。一方、MaGPAT5遺伝子のゲノム配列（配列番号12）とCDS配列（配列番号10）を比較したところ、本遺伝子のゲノム配列は、エクソン3つ、イントロン2つからなり、788個のアミノ酸残基からなるタンパク質をコードしていると考えられた（図3、図4）。

【0170】

MaGPAT4、MaGPAT5と既知のモルティエレラ アルピナ由来のGPATホモログとを比較した。CDS配列とCDS配列から導かれるアミノ酸配列の同一性を表2及び表3にそれぞれ示した。

【0171】

【表2】

表2：モルティエレラ由来のGPATホモログ CDSの同一性（%）

|         | MaGPAT1 | MaGPAT2 | MaGPAT3 | MaGPAT4 | MaGPAT5 |
|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| MaGPAT1 | -       | 42.4    | 73.2    | 44.9    | 44.5    |
| MaGPAT2 |         | -       | 38.7    | 39.9    | 39.0    |
| MaGPAT3 |         |         | -       | 45.1    | 45.5    |
| MaGPAT4 |         |         |         | -       | 44.0    |
| MaGPAT5 |         |         |         |         | -       |

【0172】

【表3】

表3：モルティエレラ由来のGPATホモログ アミノ酸配列の同一性（%）

|         | MaGPAT1 | MaGPAT2 | MaGPAT3 | MaGPAT4 | MaGPAT5 |
|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| MaGPAT1 | -       | 16.0    | 83.7    | 13.1    | 18.7    |
| MaGPAT2 |         | -       | 14.4    | 13.8    | 11.6    |
| MaGPAT3 |         |         | -       | 13.5    | 18.0    |
| MaGPAT4 |         |         |         | -       | 11.3    |
| MaGPAT5 |         |         |         |         | -       |

【0173】

MaGPAT4の推定アミノ酸配列（配列番号2）をGenBank nrに登録されているアミノ酸配列に対してBLASTpにて相同性解析を行ったところ、この配列に対して最もE-valueの低かった、すなわち同一性の高かったアミノ酸配列は、子囊菌Chaetomium globosum CBS 148.51由来の推定タンパク質のアミノ酸配列（GenBank accession No. XP\_001224211）であり、同一性は39.3%であった。また、動物由来のGlyceronephosphate O-acyltransferase (GNPAT) とも相同性があり、ヒト由来のGNPAT（GenBank accession No. AAH00450）とは同一性が22.6%であった。さらに、大腸菌E.coli由来のGPATであるp1sBタンパク質とのアミノ酸配列（GenBank accession No. BAE78043）の同一性は、17.6%であった。MaGPAT4とこれらのアミノ酸配列とのアライメントを図5に示した。

## 【0174】

一方、MaGPAT5の推定アミノ酸配列（配列番号9）をGenBank nrに登録されているアミノ酸配列に対してBLASTpにて相同性解析を行ったところ、この配列に対して最もE-valueの低かった、すなわち同一性の高かったアミノ酸配列は、担子菌*Ustilago maydis* 521由来の推定タンパク質UM03369のアミノ酸配列（GenBank accession No. XP\_759516）であり、同一性は15.4%であった。MaGPAT5とこれらのアミノ酸配列とのアライメントを図6に示した。

## 【0175】

MaGPAT4、MaGPAT5ともに、アシル基転移酵素で保存されている領域が保存されており、特にアシル基転移酵素活性に重要であると考えられている\*印で示したグリシン残基（G）とプロリン残基（P）が保存されていた。さらに、G3Pとの結合に重要であると考えられている+印で示したセリン残基（S）も保存されていた（図5及び図6）。

10

## 【0176】

実施例5： MaGPAT4の機能解析

## 【0177】

（1）MaGPAT4の酵母用発現ベクターの構築

酵母発現用ベクターpYE22m（Biosci. Biotech. Biochem., 59, 1221-1228, 1995）を制限酵素EcoRIとSalIで消化したDNA断片と、プラスミドpCR-MaGPAT4を制限酵素EcoRIと制限酵素SalIで消化し、得られた約2.1kbpのDNA断片をligation high（TOYOBO）で連結し、プラスミドpYE-MaGPAT4を構築した。

20

## 【0178】

また、比較のために、MaGPAT1、MaGPAT2及びMaGPAT3についても、酵母用発現ベクターを構築した。MaGPAT1及びMaGPAT2の酵母用発現ベクターについては、WO2008/156026に記載されるように構築し、それぞれpYE-MaGPAT1及びpYE-MaGPAT2とした。MaGPAT3の酵母用発現ベクターについては、以下のように調製した。MaGPAT1（ATCC #16266）のアミノ酸配列をクエリーとして、上記の実施例1のようにして得られた*M. alpina* 1S-4株のゲノム塩基配列に対し、tblastnにより検索した結果、MaGPAT1と相同性を有する遺伝子が得られ、これをMaGPAT3と命名した（本願出願時未公開）。以下のプライマー：  
Eco-MaGPAT3-F：5'-GAATTCATGGGTCTCCAGATCTATGACTTCGTCTC-3'（配列番号26）  
Sal-MaGPAT3-R：5'-GTCGACTTATGCCTCCTTAGACTTGACTGCATCC-3'（配列番号27）  
を作成し、上記の実施例2に記載のcDNAを鋳型として、これらのプライマーでKOD-Plus-（東洋紡）を用いてPCRをしたところ、約2.2kbpのDNA断片が増幅された。これをZero Blunt TOPO PCRクローニングキット（インビトロジェン）を用いてクローン化し、得られたプラスミドをpCR-MaGPAT3とした。プラスミドpCR-MaGPAT3を制限酵素EcoRIとSalIで消化して得られた約2.3kbpのDNA断片を、酵母発現用ベクターpYE22mのEcoRI、SalIサイトに挿入し、プラスミドpYE-MaGPAT3を得た。

30

## 【0179】

（2）形質転換株の取得

プラスミドpYE22m、pYE-MaGPAT4、pYE-MaGPAT1、pYE-MaGPAT2、pYE-MaGPAT3をそれぞれ用いて酢酸リチウム法により、酵母*S. cerevisiae* EH13-15株（trp1, MAT $\alpha$ ）（Appl. Microbiol. Biotechnol., 30, 515-520, 1989）を形質転換した。形質転換株は、SC-Trp（1lあたり、Yeast nitrogen base w/o amino acids（DIFCO）6.7g、グルコース20g、アミノ酸パウダー（アデニン硫酸塩1.25g、アルギニン0.6g、アスパラギン酸3g、グルタミン酸3g、ヒスチジン0.6g、ロイシン1.8g、リジン0.9g、メチオニン0.6g、フェニルアラニン1.5g、セリン11.25g、チロシン0.9g、バリン4.5g、スレオニン6g、ウラシル0.6gを混合したもの）1.3g）寒天培地（2%アガー）上で生育するものとして選抜した。

40

## 【0180】

（3）酵母の培養

プラスミドpYE22mを用いて形質転換して得られた任意の2株をC-1株、C-2株とし

50

、またプラスミドpYE-MaGPAT4を用いて形質転換して得られた任意の2株をMaGPAT4-1株、MaGPAT4-2株として、以下の培養実験に供した。また、比較のために、プラスミドpYE-MaGPAT1を用いて形質転換して得られた任意の2株をMaGPAT1-1株、MaGPAT1-2株とし、プラスミドpYE-MaGPAT2を用いて形質転換して得られた任意の2株をMaGPAT2-1株、MaGPAT2-2株とし、及びプラスミドpYE-MaGPAT3を用いて形質転換して得られた任意の2株をMaGPAT3-1株、MaGPAT3-2株として、MaGPAT4-1株及びMaGPAT4-2株と同様に以下の培養実験に供した。

#### 【0181】

前培養として、SC-Trp培地10mlに酵母をプレートから1白金耳植菌し、30℃で1日間振とう培養を行った。本培養は、SC-Trp培地又はYPD（酵母エキス2%、ポリペプトン1%、グルコース2%）培地10mlに前培養液を500μl添加し、30℃で2日間振とう培養を行った。

#### 【0182】

##### （4）菌体の脂肪酸分析

酵母の培養液を遠心分離することにより、菌体を回収した。10mlの滅菌水で洗浄し、遠心分離により再び菌体を回収し、凍結乾燥した。凍結乾燥菌体にクロロホルム：メタノール（2：1）を4ml添加し、激しく攪拌した後、70℃で1時間処理した。遠心分離により菌体を分離し、溶媒を回収した。残った菌体に再度クロロホルム：メタノール（2：1）を4ml添加し、同様に溶媒を回収した。スピードバックで脂質を乾固したのち、2mlのクロロホルムを添加して脂質を溶解した。この試料のうち、200μlを分取し、塩酸メタノール法により菌体の脂肪酸をメチルエステルに誘導した後、ヘキサンで抽出、ヘキサンを留去し、ガスクロマトグラフィーにより分析を行った。結果を表4、表5、表6及び表7に示す。

#### 【0183】

##### 【表4】

表4：菌体内脂肪酸組成（%）（培地：YPD）

|        | C-1   | C-2   | MaGPAT4-1 | MaGPAT4-2 | MaGPAT2-1 | MaGPAT2-2 |
|--------|-------|-------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 16:0   | 4.91  | 4.69  | 14.13     | 12.24     | 3.57      | 3.82      |
| 16:1   | 41.52 | 40.66 | 24.42     | 29.42     | 38.02     | 34.34     |
| 18:0   | 4.17  | 4.29  | 6.02      | 5.88      | 4.98      | 4.62      |
| 18:1   | 45.77 | 46.10 | 51.53     | 49.16     | 49.63     | 52.63     |
| others | 3.63  | 4.26  | 3.91      | 3.31      | 3.81      | 4.59      |

|        | C-1   | C-2   | MaGPAT1-1 | MaGPAT1-2 | MaGPAT3-1 | MaGPAT3-2 |
|--------|-------|-------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 16:0   | 4.40  | 4.37  | 5.04      | 4.88      | 6.41      | 6.23      |
| 16:1   | 40.07 | 39.83 | 39.03     | 38.48     | 38.15     | 38.15     |
| 18:0   | 3.99  | 3.85  | 4.32      | 4.42      | 4.75      | 4.84      |
| 18:1   | 48.73 | 49.05 | 48.96     | 49.68     | 47.99     | 48.29     |
| others | 2.80  | 2.89  | 2.65      | 2.54      | 2.70      | 2.49      |

#### 【0184】

【表 5】

表 5 : 菌体内脂肪酸組成 (%) (培地 : SD-Trp)

|        | C-1   | C-2   | MaGPAT4-1 | MaGPAT4-2 | MaGPAT2-1 | MaGPAT2-2 |
|--------|-------|-------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 16:0   | 7.22  | 7.51  | 19.94     | 21.97     | 7.19      | 7.08      |
| 16:1   | 36.71 | 36.49 | 16.18     | 17.41     | 32.66     | 33.02     |
| 18:0   | 5.87  | 5.98  | 11.66     | 7.03      | 6.41      | 6.67      |
| 18:1   | 45.90 | 46.17 | 47.86     | 48.43     | 49.25     | 49.15     |
| others | 4.29  | 3.85  | 4.35      | 5.17      | 4.48      | 4.09      |

10

【0185】

【表 6】

表 6 :

菌体内脂肪酸含有率 (%)

| C-1  | C-2  | MaGPAT4-1 | MaGPAT4-2 | MaGPAT2-1 | MaGPAT2-2 |
|------|------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 2.89 | 2.88 | 5.32      | 5.73      | 2.95      | 4.30      |

(培地 : YPD)

20

【0186】

【表 7】

表 7 :

菌体内脂肪酸含有率 (%)

| C-1  | C-2  | MaGPAT4-1 | MaGPAT4-2 | MaGPAT2-1 | MaGPAT2-2 |
|------|------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 5.36 | 4.86 | 9.04      | 11.63     | 5.93      | 5.89      |

(培地 : SD-Trp)

【0187】

表 4 及び表 5 に示したとおり、MaGPAT4 を高発現させた株の菌体内の脂質を構成する脂肪酸組成は、ベクターのみを導入したコントロール株と比較して、パルミチン酸 (16:0) の比率が上昇し、パルミトレイン酸 (16:1) の比率が低下していた。この傾向は、モルティエラ アルピナ由来の他の G P A T である MaGPAT1、MaGPAT2、及び MaGPAT3 を用いた場合の傾向とは異なる。したがって、本発明の MaGPAT4 は他のモルティエラ アルピナ由来の G P A T とは異なる基質特異性を有している。

30

【0188】

また、表 6 及び表 7 に示したとおり、菌体内の脂肪酸含有率は、MaGPAT4 を高発現させた株では、コントロール株に比べておよそ 2 倍に上昇していた。

【0189】

実施例 6 : MaGPAT4-long 及び MaGPAT4 の機能解析

40

【0190】

(1) ガラクトース誘導型発現ベクターの構築

MaGPAT4-long 又は MaGPAT4 をガラクトースで発現誘導させるために、以下のとおり、ガラクトース誘導型のプロモーターを持つプラスミドを構築した。

【0191】

実施例 2 で調製した c D N A を鋳型として、プライマー Not-MaGPAT4-F1 とプライマー Bam-MaGPAT4-R、又はプライマー Not-MaGPAT4-F2 とプライマー Bam-MaGPAT4-R の組み合わせで、ExTaq (タカラバイオ) を用いて、94℃ 2 分、(94℃ 1 分、55℃ 1 分、72℃ 1 分) 30 サイクルの P C R 反応を行った。増幅された約 2.7 k b p 又は約 2.5 k b p の D N A 断片を TOPO-TA クローニングキット (Invitrogen) を使ってクローン化

50

し、それぞれ、配列番号6のGPAT4-longのCDS配列、又は、配列番号3のGPAT4のCDS配列を有することを確認し、それぞれプラスミドpCR-MaGPAT4-long-1又はプラスミドpCR-MaGPAT4-1とした。ベクターpESC-TRP（ストラタジーン）を、制限酵素NotIとBglIIで消化して得られた約6.5kbpのDNA断片と、プラスミドpCR-MaGPAT4-long-1又はプラスミドpCR-MaGPAT4-1を制限酵素NotIとBamHIで消化して得られた約2.7kbp又は2.5kbpのDNA断片を、ligation high（TOYOBO）を用いて連結し、プラスミドpESC-T-MaGPAT4-long又はプラスミドpESC-T-MaGPAT4を得た。

プライマー Not-MaGPAT4-F1： 5' -GCGGCCGCATGACAACCGGCGACAGTACCG- 3'（配列番号28）

プライマー Not-MaGPAT4-F2： 5' -GCGGCCGCATGCCCATCGTTCCAGCTCAG- 3'（配列番号29）

プライマー Bam-MaGPAT4-R： 5' -GGATCCTTATAATTTCTGGGGCGCCATCG- 3'（配列番号30）

#### 【0192】

##### （2）形質転換株の取得

pESC-TRP、pESC-T-MaGPAT4-long、pESC-T-MaGPAT4をそれぞれ用いて酢酸リチウム法により、酵母*S. cerevisiae* EH13-15株を形質転換した。形質転換株は、SC-Trp寒天培地上で生育するものとして選抜した。

#### 【0193】

##### （3）酵母の培養

各プラスミドで形質転換して得られた任意の4株ずつを、前培養として、SD-Trp液体培地10mlにそれぞれ植菌し、30℃で1日間、振とう培養した。本培養として、得られた前培養液のうち1mlを、それぞれSG-Trp（1lあたり、Yeast nitrogen base w/o amino acids（DIFCO）6.7g、ガラクトース20g、アミノ酸パウダー（アデニン硫酸塩1.25g、アルギニン0.6g、アスパラギン酸3g、グルタミン酸3g、ヒスチジン0.6g、ロイシン1.8g、リジン0.9g、メチオニン0.6g、フェニルアラニン1.5g、セリン11.25g、チロシン0.9g、バリン4.5g、スレオニン6g、ウラシル0.6gを混合したもの）1.3g）液体培地10mlに、各株2本ずつ植菌し、30℃で2日間振とう培養し、MaGPAT4-long又はMaGPAT4の発現を誘導した。

#### 【0194】

##### （4）脂質分析

酵母の培養液を遠心分離することにより、菌体を回収した。10mlの滅菌水で洗浄し、遠心分離により再び菌体を回収し、凍結乾燥した。各株の1本の菌体の脂肪酸を塩酸メタノール法によりメチルエステルに誘導し、ガスクロマトグラフィーにより、菌体内に含まれる総脂肪酸を分析した（表8）。

#### 【0195】

一方、各株の残りの1本の菌体から、以下のとおり、脂質を抽出した。すなわち、1mlのクロロホルム：メタノール（2：1）とガラスビーズを加え、ビーズビーターにて菌体を破碎したあと、遠心分離して上清を回収した。残った菌体にさらに1mlのクロロホルム：メタノール（2：1）を加え、同様にして、上清を回収することを繰り返し、総量4mlのクロロホルム：メタノール（2：1）で脂質を回収した。スピードバックを使って、溶媒を留去し、残渣を少量のクロロホルムに溶かした。シリカゲル60プレート（メルク）、展開溶媒ヘキサン：ジエチルエーテル：酢酸 70：30：1の条件で薄層クロマトグラフィーを行い、脂質を分画した。プリムリン溶液を噴霧し、紫外線を照射することにより脂質を検出した。トリアシルグリセロール（TG）画分、遊離脂肪酸（FFA）画分、ジアシルグリセロール（DG）画分とリン脂質（PL）画分をそれぞれかきとって試験管に集め、塩酸メタノール法により脂肪酸をメチルエステルに誘導し、ガスクロマトグラフィーにより、脂肪酸分析を行った（表9、図7）。

#### 【0196】

以下に、各遺伝子導入株の分析結果を示す。ベクターであるpESC-TRP導入株をコントロ

10

20

30

40

50

ールとした。

【0197】

【表8】

表8： 菌体内の総脂肪酸量 (SG-Trp 培養)

| control       | MaGPAT4-long  | MaGPAT4        |
|---------------|---------------|----------------|
| 147.12 ± 6.18 | 254.58 ± 6.16 | 290.08 ± 19.67 |

平均±SD

【0198】

10

【表9】

表9： 脂質画分の脂肪酸量 (SG-Trp 培養)

|     | control      | MaGPAT4-long  | MaGPAT4        |
|-----|--------------|---------------|----------------|
| FFA | 5.12 ± 1.26  | 8.53 ± 1.37   | 13.96 ± 2.80   |
| TG  | 43.18 ± 2.76 | 122.55 ± 4.40 | 149.74 ± 16.81 |
| DG  | 4.75 ± 0.38  | 10.78 ± 0.28  | 22.08 ± 5.15   |
| PL  | 87.09 ± 2.49 | 96.03 ± 2.88  | 103.88 ± 8.02  |

平均±SD

20

【0199】

総脂肪酸量は、コントロールと比べて、MaGPAT4-long又はMaGPAT4を発現させた株では、それぞれ、1.7倍、2.0倍に増加した（表8）。

【0200】

PLの量は、MaGPAT4-long、MaGPAT4を発現させた株でも、コントロールに対して、それぞれ1.1倍、1.2倍と、差がほとんどなかった。一方、TG量は、MaGPAT4-long又はMaGPAT4を発現させた株では、コントロールに比べてMaGPAT4-long、MaGPAT4を発現させた株で、2.8倍、3.5倍と、大きく増加していた。すなわち、MaGPAT4-long又はMaGPAT4を発現させることで、脂肪酸の生合成を活性化し、貯蔵脂質であるTGの生産性を高めることができた。さらに、DGやFFAも、MaGPAT4-long、MaGPAT4を発現させた株ではコントロールに比べて増加していた（表9）。

30

【0201】

各脂質画分の脂肪酸組成を図7に示した。FFA画分の組成は、コントロールとMaGPAT4-long又はMaGPAT4を発現させた株でほとんど差がなかった。これに対し、そのほかの画分では、MaGPAT4-long又はMaGPAT4を発現させた株では、飽和脂肪酸が増加し、不飽和脂肪酸が減少する傾向があり、特に16:0（パルミチン酸）が増加し、16:1（パルミトレイン酸）が減少していた。

【0202】

なお、本培養として、SG-Trp液体培地の代わりに、SC-Trp液体培地を使用した場合についても検討した。SC-Trp液体培地はガラクトースを含まないため、この培地を使用して本培養を行う場合は、形質転換により導入したMaGPAT4-long又はMaGPAT4の発現は誘導されない。SC-Trp液体培地を使用した実験では、菌体の総脂肪酸の量、組成とも、コントロールとMaGPAT4-long、MaGPAT4導入株間で、差は認められなかった（表10、図8）。このことから、MaGPAT4-long又はMaGPAT4の発現がガラクトースにより誘導された結果、SG-Trp培地においては、菌体内の脂肪酸が増加したといえる。

40

【0203】

## 【表 10】

表 10： 菌体内の総脂肪酸量 (SC-Trp 培養)

|            | control       | GPAT4-long    | GPAT4         |
|------------|---------------|---------------|---------------|
| mg/L broth | 153.26 ± 3.05 | 150.98 ± 6.48 | 156.35 ± 8.06 |

## 【0204】

実施例 7： 酵母 *S.cerevisiae*  $\Delta sct1$ 、 $\Delta gpt2$  相補実験

酵母 *S.cerevisiae* では、GPAT 活性を担う遺伝子として SCT1 と GPT2 が知られており、これらを同時に欠失させると致死であることが知られている。モルティエラ アルピナ 由来の MaGPAT4、MaGPAT4-long の産物が GPAT 活性を有するかどうかを確認するため、 $\Delta sct1$ 、 $\Delta gpt2$  の相補実験をおこなった。表 11 に、以下のとおり作製した株の遺伝子型をまとめた。

## 【0205】

## 【表 11】

| strain         |         |                                                                                                                                     |
|----------------|---------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| YSC1021-663938 | diploid | $\Delta gpt2$ :KanMX/ $\Delta gpt2$ :KanMX, <i>ura3/ura3</i> , <i>leu2/leu2</i> , MET15/met15, LYS2/lys2                            |
| GP-1           | diploid | $\Delta gpt2$ :KanMX/ $\Delta gpt2$ :KanMX, SCT1/ $\Delta sct1$ :LEU2, <i>ura3/ura3</i> , <i>leu2/leu2</i> , MET15/met15, LYS2/lys2 |

## 【0206】

## (1) GP-1 株の作製

Yeast knock out strain collection (オープンバイオシステムズ) の  $\Delta gpt2$  ホモ接合 2 倍体酵母 (カタログ No. YSC1021-663938) の SCT1 遺伝子を以下のとおり破壊した。まず、*S.cerevisiae* S288C 株の菌体から、Gen とるくん (酵母用) (タカラバイオ) を用いて DNA を抽出した。これを鋳型として、プライマー Xba1-Des-SCT1-F: 5' -TCTAGAATGCCTGCACCAAACTCAC-3' (配列番号 31) とプライマー Xba1-Des-SCT1-R: 5' -TCTAGACCACAAGGTGATCAGGAAGA-3' (配列番号 32) で、KOD-Plus- (東洋紡) を用いて PCR をし、SCT1 遺伝子の部分配列を増幅した。増幅された約 1.3 kbp の DNA 断片を、Zero Blunt TOPO PCR クローニングキット (インビトロジェン) を用いてクローン化し、得られたプラスミドを pCR-SCT1P とした。続いて、プラスミド YE p13 を制限酵素 SalI と XhoI で消化して得られた LEU2 遺伝子の CDS を含む約 2.2 kbp の DNA 断片と、プラスミド pCR-SCT1P を SalI で消化して得られた約 4.4 kbp の DNA 断片を、ligation high (東洋紡) により連結し、SCT1 遺伝子に対して LEU2 遺伝子が逆向きに挿入されたプラスミドを pCR- $\Delta sct1$ :LEU2 とした。これを制限酵素 XbaI で消化し、上記  $\Delta gpt2$  ホモ接合 2 倍体酵母を酢酸リチウム法により形質転換して、SD-Leu (1 L あたり、Yeast nitrogen base w/o amino acids (DIFCO) 6.7 g、グルコース 20 g、アミノ酸パウダー (アデニン硫酸塩 1.25 g、アルギニン 0.6 g、アスパラギン酸 3 g、グルタミン酸 3 g、ヒスチジン 0.6 g、リジン 0.9 g、メチオニン 0.6 g、フェニルアラニン 1.5 g、セリン 11.25 g、チロシン 0.9 g、バリン 4.5 g、スレオニン 6 g、トリプトファン 1.2 g、ウラシル 0.6 g を混合したもの) 1.3 g) 寒天培地 (2% アガー) で生育できるものを選抜した。得られた形質転換株の菌体から上述の方法で DNA を抽出した。(a) プライマー SCT1outORF-F: 5' -AGTGTAGGAAGCCCGGAATT-3' (配列番号 33) とプライマー SCT1inORF-R: 5' -GCGTAGATCCAACAGACTAC-3' (配列番号 34) (0.5 kbp)、(b) プライマー SCT1outORF-F とプライマー LEU2inORF-F: 5' -TTGCCTCTTCCAAGAGCACA-3' (配列番号 35) (1.2 kbp

）の組み合わせでPCRを行うことで遺伝子型を確認、すなわち、SCT1/Δsct1:LEU2であることを確認し、GP-1株とした。

#### 【0207】

##### （2）URA3をマーカーとするガラクトース誘導型発現ベクターの構築

ベクターpESC-URA(ストラタジーン)を、制限酵素NotIとBglIIで消化して得られた約6.6 kbpのDNA断片と、プラスミドpCR-MaGPAT4-long-1又はプラスミドpCR-MaGPAT4-1を制限酵素NotIとBamHIで消化して得られた約2.7 kbp又は2.5 kbpのDNA断片を、ligation high (TOYOBO)を用いて連結し、プラスミドpESC-U-MaGPAT4-long又はプラスミドpESC-U-MaGPAT4を得た。

#### 【0208】

##### （3）形質転換株の取得

pESC-URA、pESC-U-MaGPAT4-long又はpESC-U-MaGPAT4をそれぞれ用いて酢酸リチウム法により、酵母GP-1株を形質転換した。形質転換株は、SC-Ura（1Lあたり、Yeast nitrogen base w/o amino acids (DIFCO) 6.7 g、グルコース20 g、アミノ酸パウダー（アデニン硫酸塩1.25 g、アルギニン0.6 g、アスパラギン酸3 g、グルタミン酸3 g、ヒスチジン0.6 g、リジン0.9 g、メチオニン0.6 g、フェニルアラニン1.5 g、セリン11.25 g、チロシン0.9 g、バリン4.5 g、スレオニン6 g、トリプトファン1.2 g、ロイシン1.8 gを混合したもの）1.3 g）寒天培地（2%アガー）で生育できるものを選抜した。pESC-URAで形質転換して得られた株を、C-D株、pESC-U-MaGPAT4-long、pESC-U-MaGPAT4で形質転換して得られた株を、それぞれMaGPAT4-long-D株、MaGPAT4-D株とした。

#### 【0209】

##### （4）孢子形成と四分子分析

C-D株とMaGPAT4-long-D株、MaGPAT4-D株をそれぞれYPD寒天培地に塗布し、30℃で1日間培養した。生育した菌体を、孢子形成用寒天培地（0.5%酢酸カリウム、2%アガー）に塗布し、20℃で7日間培養した。得られた菌体を適量掻きとって、100 μlのザイモリアーゼ溶液（0.125 mg/ml ザイモリアーゼ100 T、1M ソルビトール、40 mM リン酸カリウムバッファー（pH 6.8））に懸濁し、室温で30分間インキュベートしたあとチューブを水中に移した。顕微鏡下で、子嚢胞子が形成されていることを確認した後、YPG a1（酵母エキス2%、ペプトン1%、ガラクトース2%）寒天培地上でマイクロマニピュレーションにより4個の子嚢胞子を分離し、30℃で2日間インキュベートし、それぞれの孢子に由来するコロニーを得た。

#### 【0210】

得られた孢子クローンを、SG-Ura（1Lあたり、Yeast nitrogen base w/o amino acids (DIFCO) 6.7 g、ガラクトース20 g、アミノ酸パウダー（アデニン硫酸塩1.25 g、アルギニン0.6 g、アスパラギン酸3 g、グルタミン酸3 g、ヒスチジン0.6 g、リジン0.9 g、メチオニン0.6 g、フェニルアラニン1.5 g、セリン11.25 g、チロシン0.9 g、バリン4.5 g、スレオニン6 g、トリプトファン1.2 g、ロイシン1.8 gを混合したもの）1.3 g）寒天培地（2%アガー）、及びSG-Leu（1Lあたり、Yeast nitrogen base w/o amino acids (DIFCO) 6.7 g、ガラクトース20 g、アミノ酸パウダー（アデニン硫酸塩1.25 g、アルギニン0.6 g、アスパラギン酸3 g、グルタミン酸3 g、ヒスチジン0.6 g、リジン0.9 g、メチオニン0.6 g、フェニルアラニン1.5 g、セリン11.25 g、チロシン0.9 g、バリン4.5 g、スレオニン6 g、トリプトファン1.2 g、ウラシル0.6 gを混合したもの）1.3 g）寒天培地（2%アガー）にレプリカし、30℃で3日間インキュベートして、ウラシル要求性とロイシン要求性を調べた。ウラシル要求性を示す場合、導入したプラスミドが脱落したものと考えられたので、以下の解析からは除いた。

#### 【0211】

C-D株から分離した4個の子嚢胞子のうち、YPG a1寒天培地上で生育できたものは、いずれも2個で、すべての株がロイシン要求性であった。一方、MaGPAT4-long-D株とMa

10

20

30

40

50

GPAT4-D株から分離した4個の子嚢胞子は、いずれも4個ともY P G a l 寒天培地上で生育できた。ロイシン要求性を調べたところ、ロイシン要求性株とロイシン非要求性株がそれぞれ2個ずつであった。

#### 【0212】

得られた株の遺伝子型を調べるため、菌体より上述のとおりDNAを抽出し、(a) プライマー-SCT1outORF-Fとプライマー-SCT1inORF-R、(b) プライマー-SCT1outORF-Fとプライマー-LEU2in ORF-Fの組み合わせでPCRを行った。その結果、ロイシン非要求性株では(a)ではPCRによる増幅がみられず(b)では増幅がみられたことから、これらの株は $\Delta s c t 1 : L E U 2$ アレルを有する株であることが確認できた。また、ロイシン要求性株では(a)ではPCRによる増幅がみられ(b)では増幅がみられなかったことから、これらの株はSCT1アレルを有する株であることが確認できた。

10

#### 【0213】

さらに、MaGPAT4-long-D株とMaGPAT4-D株から分離した4個の子嚢胞子由来の株をY P D寒天培地上に塗布すると、生育のよい株と著しく生育の悪い株がそれぞれ2個ずつであり、生育の悪い株は $\Delta s c t 1 : L E U 2$ アレルを有するロイシン非要求性株と一致していた。

#### 【0214】

これらのことから、酵母のGPAT活性を担う2つの遺伝子を破壊した $\Delta s c t 1$ 、 $\Delta g p t 2$ 株は致死であるが、MaGPAT4-longあるいはMaGPAT4を発現させることで、生育が可能になることが確認できた。すなわち、MaGPAT4-longタンパク質及びMaGPAT4タンパク質はGPAT活性を有することが強く示唆された。

20

#### 【0215】

実施例8： モルティエレラ アルピナにおけるGPAT4の過剰発現

#### 【0216】

##### (1) M. alpina用発現ベクターの構築

GPAT4をM.alpinaで発現させるために、以下のとおり、ベクターを構築した。

#### 【0217】

まず、ベクターpUC18を制限酵素EcoRIとHindIIIで消化し、オリゴDNA MCS-for-pUC18-F2とMCS-for-pUC18-R2をアニーリングさせたアダプターを挿入し、プラスミドpUC18-RF2を構築した。

30

MCS-for-pUC18-F2：5' -AATTCATAAGAATGCGGCCGCTAAACTATTCTAGACTAGGTCGACGGCGCGCCA-3' (配列番号36)

MCS-for-pUC18-R2：5' -AGCTTGGCGCGCCGTCGACCTAGTCTAGAATAGTTTAGCGGCCGCATTCTTATG-3' (配列番号37)

#### 【0218】

M.alpinaのゲノムを鋳型として、プライマーNot1-GAPDHt-FとプライマーEcoRI-Asc1-GAPDHt-Rを使って、KOD-plus- (TOYOBO) を用いたPCRで増幅した約0.5 kbpのDNA断片を、Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit (インビトロジェン) にてクローン化した。インサート部分の塩基配列を確認したあと、制限酵素NotIとEcoRIで消化して得られた約0.9 kbpのDNA断片をプラスミドpUC18-RF2のNotI、EcoRIサイトに挿入し、プラスミドpDG-1を構築した。

40

プライマー Not1-GAPDHt-F：5' -AGCGGCCGCATAGGGGAGATCGAACC-3' (配列番号38)

プライマー EcoRI-Asc1-GAPDHt-R：5' -AGAATTCGGCGCGCCATGCACGGGTCCTTCTCA-3' (配列番号39)

#### 【0219】

M.alpinaのゲノムを鋳型として、プライマーURA5g-F1とプライマーURA5g-R1を使って、KOD-plus- (TOYOBO) を用いたPCRで増幅したDNA断片を、Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit (インビトロジェン) にてクローン化した。インサート部分の塩基配列を確認したあと、制限酵素SalIで消化して得られた約2 kbpのDNA断片をプラスミドpDG-1のSalIサイトに挿入し、URA5遺伝子の5'側がベクターのEcoRI側になる向きで挿入された

50

ものをプラスミドpDuraGとした。

プライマー URA5g-F1: 5' -gtcgaccatgacaagtttgc- 3' (配列番号40)

プライマー URA5g-R1: 5' -GTCGACTGGAAGACGAGCACG- 3' (配列番号41)

#### 【0220】

続いて、*M.alpina*のゲノムを鋳型プライマーhisHp+URA5-FとプライマーhisHp+MGt-Fを使って、KOD-plus- (TOYOBO)を用いたPCRで増幅した約1.0 kbpのDNA断片と、pDuraGを鋳型として、プライマーpDuraSC-GAPt-FとプライマーURA5gDNA-Fを使って、KOD-plus- (TOYOBO)を用いたPCRで増幅した約5.3 kbpのDNA断片を、In-Fusion (登録商標) Advantage PCR Cloning Kit (タカラバイオ)を使って連結し、プラスミドpDura-RhGを得た。

10

プライマー hisHp+URA5-F: 5' -GGCAAACCTTGTTCATGAAGCGAAAGAGAGATTATGAAAACAAGC- 3' (配列番号42)

プライマー hisHp+MGt-F: 5' -CACTCCCTTTTCTTAATTGTTGAGAGAGTGTGGGTGAGAGT- 3' (配列番号43)

プライマー pDuraSC-GAPt-F: 5' -TAAGAAAAGGGAGTGAATCGCATAGGG- 3' (配列番号44)

プライマー URA5gDNA-F: 5' -CATGACAAGTTTGCCAAGATGCG- 3' (配列番号45)

#### 【0221】

プラスミドpDura-RhGを鋳型として、プライマーpDuraSC-GAPt-FとプライマーpDurahG-hisp-Rを使って、KOD-plus- (TOYOBO)を用いたPCRで約6.3 kbpのDNA断片を増幅した。

20

プライマー pDurahG-hisp-R: 5' -ATTGTTGAGAGAGTGTGGGTGAGAGTG- 3' (配列番号46)

#### 【0222】

プラスミドpCR-MaGPAT4-1を鋳型として、プライマー MaGPAT4+hisp-Fとプライマー MaGPAT4+MGt-Rを使って、KOD-plus- (TOYOBO)を用いたPCRで約2.5 kbpのDNA断片を増幅した。

プライマー MaGPAT4+hisp-F: 5' -CACTCTCTCAACAATATGACAACCGGCGACAGTACCGC- 3' (配列番号47)

プライマー MaGPAT4+MGt-R: 5' -CACTCCCTTTTCTTATTATAATTTTCGGGGCGCCATCGC- 3' (配列番号48)

30

得られた2.5 kbp断片を、上記6.3 kbpのDNA断片と、In-Fusion (登録商標) Advantage PCR Cloning Kit (タカラバイオ)を使って連結し、プラスミドpDuraRhG-GPAT4を得た。

#### 【0223】

##### (2) *M.alpina*形質転換株の取得

特許文献(WO2005/019437、発明の名称:「脂質生産菌の育種方法」)に記載の方法にしたがって*M.alpina* 1S-4株より誘導したウラシル要求性株Δura-3を宿主としてパーティクルデリバリー法で、プラスミドpDuraRhG-GPAT4を用いて、それぞれ形質転換を行った。形質転換株の選択には、SC寒天培地(Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids and Ammonium Sulfate (Difco) 0.5%、硫酸アンモニウム0.17%、グルコース2%、アデニン0.002%、チロシン0.003%、メチオニン0.0001%、アルギニン0.0002%、ヒスチジン0.0002%、リジン0.0004%、トリプトファン0.0004%、スレオニン0.0005%、イソロイシン0.0006%、ロイシン0.0006%、フェニルアラニン0.0006%、寒天2%)を用いた。

40

#### 【0224】

##### (3) 形質転換*M.alpina*の評価

得られた形質転換株を、GY培地4mlに植菌し、28℃で2日間振とう培養を行った。菌体をろ過により回収し、RNeasy plant kit (QIAGEN)を用いてRNAを抽出した。スーパースク립トファーストストランドシステム for RT-PCR (インビトロジェン)によ

50

り c D N A を合成した。導入したコンストラクトからの各遺伝子の発現を確認するため、以下のプライマーの組み合わせでRT-PCRを行った。

プライマー GPAT4-RT1：5' -gagtgccttcacgcaggcacC- 3' (配列番号 49)

プライマー GPAT4-RT2：5' -TCCTTCACTGTCAACCTCGATCAC- 3' (配列番号 50)

#### 【0225】

過剰発現を確認できた株のうち、1株について、GY培地（グルコース2%、酵母エキス1%）10mlに植菌し、28℃、300rpmで3日間振とう培養した。これをGY培地500ml（2L坂口フラスコ）に全量移し、28℃、120rpmで振とう培養した。ここから3日後、7日後、10日後、12日後にそれぞれ5ml、10mlずつ分取し、濾過した。菌体を120℃で乾燥させ、塩酸メタノール法により、脂肪酸をメチルエステルに誘導し、ガスクロマトグラフィーにより、脂肪酸分析を行った。乾燥菌体あたりのアラキドン酸生産量の経時変化を調べた。なお、形質転換の宿主であるΔura-3株をコントロールとした。結果を図9に示す。

10

#### 【0226】

GPAT4をM.alpinaで過剰発現させた場合、菌体あたりのアラキドン酸（AA）量が、コントロールに比べて増加していた。

#### 【配列表フリーテキスト】

#### 【0227】

配列番号16：プライマー GPAT4-S

配列番号17：プライマーSacI-GPAT4-1

20

配列番号18：プライマー Sal-GPAT4-2

配列番号19：プライマー GPAT5-1F

配列番号20：プライマー GPAT5-3R

配列番号26：プライマー Eco-MaGPAT3-F

配列番号27：プライマー Sal-MaGPAT3-R

配列番号28：プライマーNot-MaGPAT4-F1

配列番号29：プライマーNot-MaGPAT4-F2

配列番号30：プライマーBam-MaGPAT4-R

配列番号31：プライマーXba1-Des-SCT1-F

配列番号32：プライマーXba1-Des-SCT1-R

30

配列番号33：プライマーSCT1outORF-F

配列番号34：プライマーSCT1inORF-R

配列番号35：プライマーLEU2inORF-F

配列番号36：オリゴDNAMCS-for-pUC18-F2

配列番号37：オリゴDNAMCS-for-pUC18-R2

配列番号38：プライマーNot1-GAPDht-F

配列番号39：プライマーEcoR1-Asc1-GAPDht-R

配列番号40：プライマー URA5g-F1

配列番号41：プライマー URA5g-R1

配列番号42：プライマーhisHp+URA5-F

40

配列番号43：プライマーhisHp+MGt-F

配列番号44：プライマーpDuraSC-GAPt-F

配列番号45：プライマー URA5gDNA-F

配列番号46：プライマーpDurahG-hisp-R

配列番号47：プライマーMaGPAT4+hisp-F

配列番号48：プライマーMaGPAT4+MGt-R

配列番号49：プライマー GPAT4-RT1

配列番号50：プライマー GPAT4-RT2

## 【图 2-2】

1401 CACCTCTCTGAGGGCGCTGCACAGACCGTAACTTACTACACAGCTGGCGATTGAGACGATCTGGAGCATACATGGATCTACTCCAGAAATCCGAT  
· T · T · G · S · R · L · L · K · T · D · F · I · Y · N · P · G · F · C · I · E · S · N · L · E · H · T · L · D · Y · L · K · K · S · N ·

1501 GTGATCGGTTGCAGCATGAAGTATGTGGCACTCTCTGATCGACGACGAGCGCGCAAGCAACTACTGCTTTATTTGTTCTCTCTGGCCCT  
V · I · E · Y · D · S · E · C · Y · G · V · L · S · D · A · E · R · S · K · G · R · E · N · Y · T · D · F · C · T · T · C · C · T · L · L · W · P · F ·

1601 TGTGTGAGACATACGGCTCCGACGGCTGTCTGCTTATACCGCTGATTCCGACCGCAGAGGCTGACTCAGCGCTTGGACAGCAAGGAGAGGCTCAGGT  
· V · E · T · Y · M · L · A · A · V · S · L · Y · T · L · I · P · T · A · K · E · L · T · Q · Q · L · D · S · N · G · E · P · Q · V ·

1701 TCACCTGGTTGAGGAGCGCGCTGTTCATGAGAGACGCAAACTTCGCGAAGACGCTTACTACAGGAGGACCTCTCTACTTTGAGTCTGTCAACATG  
· H · W · V · E · R · V · F · M · E · K · T · Q · M · F · C · K · T · L · Y · G · G · D · L · S · Y · F · E · S · N · W ·

1801 GAGCGCTCCAGAAAGTGTTTAATCTGCTGCGGATATGCGCATCTTATCATCAGGAGGACCCCAACATGCCAGGAGAGCAAAAGTGTCTCTCCACC  
E · T · L · N · K · A · G · A · T · C · T · G · C · T · D · D · Y · G · I · L · M · K · R · P · T · N · A · K · E · K · T · V · A · L · P ·

1901 CTGATTTATTCGACGCGAGTGTGACGGTCATGTCTATTCGACGCGCGACCTTTGGATATGTCGCACATATCCGACAGCTTCAGAGTGAGGCGAA  
· D · F · M · P · S · R · G · A · D · G · H · V · I · A · S · C · A · L · M · W · V · E · H · I · G · T · F · R · E · G · K ·

2001 GAATGTGTGTGATACCGCACAATTTCTCCGCTGCTCGGGTTTCGAGAGCTGCGGAGCGCTCAGCTCGGTTAAGTACCTTGCCTCAATCCG  
· N · R · R · D · N · A · T · V · S · S · R · V · L · R · F · A · E · V · V · A · N · A · P · V · K · W · V · P · L · N · P ·

2101 GCACGCCAAAGGACAGCGATGCGGCCGCCCAATATATA  
A · P · K · R · T · G · D · A · P · K · L ·

【图 4-2】

2801 GTCCGACGACGACCACTGATGACCCCAAGCATCTGGCTGGCTGTTATTCATATGCTGGCGGCTATTGCTCTGGCAGCATCTGGCTGGCTTCTGT  
V R D A Q L T A N P S I L A A L V F I L P A L L V L F L S L L T

2101 TACCCGGGACCTTGCTCTTCGGACCTTGCTGACTTTGGCTCTGGCTGGCGGCAAGGACGAGGACGCGCATCTGGCTTCAGTCTATCTCC  
- P G T L L F G P V L G L L A S W A A K Q K G Q Q M A L F Q S Y L T

2201 AGTTGACATGGCTCTGGCGGACATGTATGATCGGATCGAGMAGATCTGCTTGGCTGTATGCGGCTCTGCTATTATCTGGAGCGCAACATGCTC  
- V S R M P G R D V I A T M K I V V S S L A L M P V C F I L D A T L T

2301 ACGATCTACGACACCATTTGGGAGCACTCGAGGAGTACTGCATCTAGTGGCTCTAGTGGCTCTGGCGTCTGCAACATTGTGATATTTTCAACG  
T I L A H M E A L Q E Y T M G R L V A F L L S T V F I P T M

2401 TGGGCTATGCTAGGCTCTGGCTGGGATGGCAATCTTGATCGAATGACATATGATATGGCTGGAGCTCTGGGAGGACATGACAGATGA  
- A Y G T V L W L E M Q I D L K M Q I Y V M K L C G G N A E T A

2501 GCCTCGGACAGAGATCTTCTCGAGAGATGATCGACTCTCTCAAGAGTGGGCGCATAGAGGCTTTGATGATCGGCTATATTGAGCAAGCTTC  
- R M R Q D L V L M D A L V E M G R R V F D V S G Y Y

2601 ATGTATTAAGCATTTGGCCGATTTCTCTCAAAAAGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

| Cultivation time (days) | GPAT4 AA production (mg/dry mycelia) | control AA production (mg/dry mycelia) |
|-------------------------|--------------------------------------|----------------------------------------|
| 3                       | 35                                   | 25                                     |
| 6                       | 42                                   | 30                                     |
| 9                       | 65                                   | 38                                     |
| 12                      | 90                                   | 35                                     |

## 【図 1 - 1】

|        |                                                                                                      |                                                                                                      |
|--------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| genome | 1                                                                                                    | 100                                                                                                  |
| CDS    | GTTGACATAGTCTTTTGGTAGCAGTAGCATTGTTGTAGTTTCTTACTCAACGGACAGCAGCAGCAGCAGCGCCGAGGTAAAGCGGTGGATCCCATAG    |                                                                                                      |
| genome | 101                                                                                                  | 200                                                                                                  |
| CDS    | AGACTCTTTTGCCTCGTCTCACTGTCGCTCTCCACAGAAAAACATTTTATTTCTTTCCCGCATTTTTTCTTCTTTTTCTGCCTCTCTTGT           |                                                                                                      |
| genome | 201                                                                                                  | 300                                                                                                  |
| CDS    | CTCTCTCCCTAAGCACCACCTAACCCGCTCTATCGCCCAACCACTTCAACTCAGCACCTCAGGAGCCTGCCAACCAACGTTGCAAGAAGGAAAAA      |                                                                                                      |
| genome | 301                                                                                                  | 400                                                                                                  |
| CDS    | AGTACAGCGCATCTTGTAGTCCAGCGGAGCAGTGAAAAACCTCTCCATTCCGACCTAACAGATCAGCAGTCTGATCAGCTAGTTGCCCCACAGTT      |                                                                                                      |
| genome | 401                                                                                                  | 500                                                                                                  |
| CDS    | ATTGCATCACCTTTCAACCAGTCCACATGACAACCGGCGACAGTACCGCTGCTGACGGTAGCAGCAGCAGTAGCAGCAACAACAGCACAACATTGCCA   |                                                                                                      |
| genome | 501                                                                                                  | 600                                                                                                  |
| CDS    | GTA TAGTAACGGCAAGGCTGCTCCCACTCCAAAGGGGATCACCGCTCTGTAGTCCAGTTTGAATTGAAGCCTCTCAAGAATGTTATGCC           | ATGCC                                                                                                |
| genome | 601                                                                                                  | 700                                                                                                  |
| CDS    | CATCGTTCCAGCTCAGCAAGTCGACTCCTCCTCGTCCCTCCCTCTGGTGAATCTAGCCGTTGATTCCAGTTTGGGCGAAGGAGTGCATTTCGGGTGAT   | CATCGTTCCAGCTCAGCAAGTCGACTCCTCCTCGTCCCTCCCTCTGGTGAATCTAGCCGTTGATTCCAGTTTGGGCGAAGGAGTGCATTTCGGGTGAT   |
| genome | 701                                                                                                  | 800                                                                                                  |
| CDS    | GGACACGTTGTCGACAATGACGAGTCCGGCGTGGAGAACATTAGGCAAGTTCAAATTGAATATTCCAGCGGCTATGAACGAGTTTGGATGCTTGTAGT   | GGACACGTTGTCGACAATGACGAGTCCGGCGTGGAGAACATTAGGCAAGTTCAAATTGAATATTCCAGCGGCTATGAACGAGTTTGGATGCTTGTAGT   |
| genome | 801                                                                                                  | 900                                                                                                  |
| CDS    | TTTGATTAACACGAACCTTTCGCTCTTGTATTGTTGTTATCAATGCAGCAAAAAGCACGCAGGACGAATTAGAGAAGATCCGGTCGGCTTCGTGGTGCA  | CAAAAAGCACGCAGGACGAATTAGAGAAGATCCGGTCGGCTTCGTGGTGCA                                                  |
| genome | 901                                                                                                  | 1000                                                                                                 |
| CDS    | GACTGCAGCTTTCTATCAGGGCAGGGTACGTTCAATATCTGACATCACTGCTTTAGTGAGCCGCAGAGGAAAGCACTTCTTAACGACAACCTGCAGCTGG | GACTGCAGCTTTCTATCAGGGCAGGGTACGTTCAATATCTGACATCACTGCTTTAGTGAGCCGCAGAGGAAAGCACTTCTTAACGACAACCTGCAGCTGG |
| genome | 1001                                                                                                 | 1100                                                                                                 |
| CDS    | ATCGGTCGGTACCTCCTGCTCAACGAGCTATCAGCCCTTCTCCGCGCCATTGTGAGGGTGATTTGTCTCATACCAGGAACAGCAGAAGAAAAAGAGGAA  |                                                                                                      |
| genome | 1101                                                                                                 | 1200                                                                                                 |
| CDS    | TCGTGTTCAAAAGCATCGCTTCGGGGTTCGCTCAGCTCGGTCTCTGATTGCTCCCTGGAAGTCTCCCTTCTGCAAACTGTCACTCTCCACGTTCT      |                                                                                                      |
| genome | 1201                                                                                                 | 1300                                                                                                 |
| CDS    | CCTTTTTTTTTTTTTTTTACTATCTCCATCCCTGCCTCTCGTCATGCTTGAGCTGAATAATGCTAAATTCTATCCGATATCGTCTTTGCTTTTT       |                                                                                                      |
| genome | 1301                                                                                                 | 1400                                                                                                 |
| CDS    | AGGGTTGGAGAAGCTACAGCAACTATGTTGGAACGCGCATTTTACGAAGGCTTCTCTGCAACCTTCAAGGAGCGAATTCTCGCCAGTTCAAAAGGTAA   | GGGTTGGAGAAGCTACAGCAACTATGTTGGAACGCGCATTTTACGAAGGCTTCTCTGCAACCTTCAAGGAGCGAATTCTCGCCAGTTCAAAAG        |
| genome | 1401                                                                                                 | 1500                                                                                                 |
| CDS    | CACAAGATAGGGTCTGTCTGTACTTCAACAGATTTCGTCAAAATGGCATGATCTAACGAACCTACCTTGACCTCTAGTGAATGATCTCATCAAGGAC    | TGAATGATCTCATCAAGGAC                                                                                 |

## 【図 1 - 2】

|        |                                                                                                     |      |
|--------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
|        | 1501                                                                                                | 1600 |
| genome | ATGGCCAACAAGCAGTTGGATGTCTGATCAAGCAAAGACAAGATGCGTATGACGCAGAGAGGACTGCAATGCAGGAAAAAGAAGCTCAAGCCCAAAG   |      |
| CDS    | ATGGCCAACAAGCAGTTGGATGTCTGATCAAGCAAAGACAAGATGCGTATGACGCAGAGAGGACTGCAATGCAGGAAAAAGAAGCTCAAGCCCAAAG   |      |
|        | 1601                                                                                                | 1700 |
| genome | TTGGAATCCTTCGCCCAGAAGATATCGAGGCTCGTCGCAAAACATTAGAAGCCGAGCTTGTTCGGTGGCAAAGTCAAATATCGACAACTTGTGTTGTA  |      |
| CDS    | TTGGAATCCTTCGCCCAGAAGATATCGAGGCTCGTCGCAAAACATTAGAAGCCGAGCTTGTTCGGTGGCAAAGTCAAATATCGACAACTTGTGTTGTA  |      |
|        | 1701                                                                                                | 1800 |
| genome | TATGAACAGTATGAAATTCATCAGGTATGGACCAACACGAGAATAACGCAGCGTGAAGTGAACAGTGTGCAGAGAGGGATGGCGAGATATATTTGTT   |      |
| CDS    | TATGAACAGTATGAAATTCATCAGGT-----                                                                     |      |
|        | 1801                                                                                                | 1900 |
| genome | GTTTGTAGACACCAGATGTTAACAACCTTCTCCTTGGCTGATGTGTTAGGTTCTTCGCCTTCCTCATCAACAACATCCTTGTGAGAATGTACCATCAA  |      |
| CDS    | -----TCTTCGCCTTCCTCATCAACAACATCCTTGTGAGAATGTACCATCAA                                                |      |
|        | 1901                                                                                                | 2000 |
| genome | GGAATTCACATCAAGGAGTCCGAGTCTTGGAGCTGCGGAGGATAGCTGAGTACTGCGCAGAGAAAAAGTATTCGATGGTGGTGTGCCATGCCACAAGT  |      |
| CDS    | GGAATTCACATCAAGGAGTCCGAGTCTTGGAGCTGCGGAGGATAGCTGAGTACTGCGCAGAGAAAAAGTATTCGATGGTGGTGTGCCATGCCACAAGT  |      |
|        | 2001                                                                                                | 2100 |
| genome | CACACATCGACTACCTCGTCTCGTACATTTTCTTCGCATGGGATTAGCTTTACCTCACATTGCTGCTGGCGATAACCTGGACATGCCATTGTTCGG    |      |
| CDS    | CACACATCGACTACCTCGTCTCGTACATTTTCTTCGCATGGGATTAGCTTTACCTCACATTGCTGCTGGCGATAACCTGGACATGCCATTGTTCGG    |      |
|        | 2101                                                                                                | 2200 |
| genome | AAAGGCACTCAAAGGAGCAGGCGCTTCTTCATTCGCGCTTCTTGGGCTGACGATCAACTTTACACCAGCATTGTTCAGGAATATGTTCAGGAGCTTTTG |      |
| CDS    | AAAGGCACTCAAAGGAGCAGGCGCTTCTTCATTCGCGCTTCTTGGGCTGACGATCAACTTTACACCAGCATTGTTCAGGAATATGTTCAGGAGCTTTTG |      |
|        | 2201                                                                                                | 2300 |
| genome | CAGGGAGGATACAATATCGAGTGCTTCATCGAGGGCACCGAAGCAGAACTTTTGGCACCAGCTGGGAGTTTCGTTACAGCTTTGGTCT            |      |
| CDS    | CAGGGAGGATACAATATCGAGTGCTTCATCGAGGGCACCGAAGCAGAACTTTTGGCACCAGCTGGGAG-----                           |      |
|        | 2301                                                                                                | 2400 |
| genome | TGTTTTGCTACTGGGCACGCTGGCGATCTTTGGGTATTAACCTTCACACCAATCCACCTTTACTAGTCTTAAAGATTATCATGGATGCTATGCTTTC   |      |
| CDS    | -----TCTTAAAGATTATCATGGATGCTATGCTTTC                                                                |      |
|        | 2401                                                                                                | 2500 |
| genome | GAACCGCATCCAAGACTGCTACATCGTGCCCATCTCTATCGGTTATGACAAGGTCATCGAAACCGAGACTTATATCAATGAGCTTCTCGGAATCCCAAG |      |
| CDS    | GAACCGCATCCAAGACTGCTACATCGTGCCCATCTCTATCGGTTATGACAAGGTCATCGAAACCGAGACTTATATCAATGAGCTTCTCGGAATCCCAAG |      |
|        | 2501                                                                                                | 2600 |
| genome | GAAAAGGAGAGTTTGTGGGTGTTATTACGAATTCGAGGCTGCTCCAGCTCAAGATGGGCCGATTGATGTCCGATTGCAAAGCCGTACAGTTTGCGAA   |      |
| CDS    | GAAAAGGAGAGTTTGTGGGTGTTATTACGAATTCGAGGCTGCTCCAGCTCAAGATGGGCCGATTGATGTCCGATTGCAAAGCCGTACAGTTTGCGAA   |      |
|        | 2601                                                                                                | 2700 |
| genome | ACTTTATGAATCATGAGATCGAGCGCAGAGAGTAAGCAGAACCTGTGTTTGTGTGCAAGACGTTTTCAAAGTGGAGAGGAATTATGTTGACCCAGGG   |      |
| CDS    | ACTTTATGAATCATGAGATCGAGCGCAGAGAG-----                                                               |      |
|        | 2701                                                                                                | 2800 |
| genome | CTATTTGTTTTTCTGCATTAGGATCATCAATAAGCGGGAAGACACCGATAGTGTGGCGAAATCTCAGCTGCTAAAGGCATTGGGCTACAAGGTCTTGGC |      |
| CDS    | -----ATCATCAATAAGCGGGAAGACACCGATAGTGTGGCGAAATCTCAGCTGCTAAAGGCATTGGGCTACAAGGTCTTGGC                  |      |
|        | 2801                                                                                                | 2900 |
| genome | AGACATCAACTCGGTCTCTGTAGTAATGCCACGCGCTCTGTGGTACTGTATCCTTACACTCCGAGGACGAGGTGTTGGCCGTAAAGCTGATCCGT     |      |
| CDS    | AGACATCAACTCGGTCTCTGTAGTAATGCCACGCGCTCTGTGGTACTGTATCCTTACACTCCGAGGACGAGGTGTTGGCCGTAAAGCTGATCCGT     |      |

## 【図 1 - 3】

|        |                                                                                                      |      |
|--------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
|        | 2901                                                                                                 | 3000 |
| genome | CGTGTGAGTGGCTGAAGCGCGAGATTCTTTCCAAGGGTGGTCGCGTTGCCAACTTTAGCGGGATGGAAGTGGCGAGGTTGTAGATCGAGCATTGGGCG   |      |
| CDS    | CGTGTGAGTGGCTGAAGCGCGAGATTCTTTCCAAGGGTGGTCGCGTTGCCAACTTTAGCGGGATGGAAGTGGCGAGGTTGTAGATCGAGCATTGGGCG   |      |
|        | 3001                                                                                                 | 3100 |
| genome | TTCTTAAGGACCTTGTCGCGCTGCAGAAGAATTTGCTCGAGCCCGTCTTCTATGCGGTCAAGCGCTTCGAGCTTTCGTTCTACAGGAATCAGCTCATCCA |      |
| CDS    | TTCTTAAGGACCTTGTCGCGCTGCAGAAGAATTTGCTCGAGCCCGTCTTCTATGCGGTCAAGCGCTTCGAGCTTTCGTTCTACAGGAATCAGCTCATCCA |      |
|        | 3101                                                                                                 | 3200 |
| genome | CCTCTTTGTCATGAGGCCATCATCGCCGTGACGATGTACACCCGCATCAAGATTGGTGGCGCAAGTCTACACAACACATTAGTCAGAATGAGCTGCTG   |      |
| CDS    | CCTCTTTGTCATGAGGCCATCATCGCCGTGACGATGTACACCCGCATCAAGATTGGTGGCGCAAGTCTACACAACACATTAGTCAGAATGAGCTGCTG   |      |
|        | 3201                                                                                                 | 3300 |
| genome | AACGAGGTACCTTCTGAGCCGCTGCTCAAGACCGACTTTATCTACAACCCTGGCGATATTGAGAGTAAGTGGAGCATACATTGGATTACCTCAAGG     |      |
| CDS    | AACGAGGTACCTTCTGAGCCGCTGCTCAAGACCGACTTTATCTACAACCCTGGCGATATTGAGAGTAAGTGGAGCATACATTGGATTACCTCAAG-     |      |
|        | 3301                                                                                                 | 3400 |
| genome | TGAGTTATCTCGCACAGGAATAAGGGACAGCTGCAATTGCTGAAAGTAGACCTGAGCGCAACGGTCTAACATTATCGTTCTTTTCTAGAAATCCAATGT  |      |
| CDS    | -----AAATCCAATGT                                                                                     |      |
|        | 3401                                                                                                 | 3500 |
| genome | GATCGAGGTTGACAGTGAAGGATATGTCGGACTCTCTGATGCTGAACGCAGCAAGGGCCGAGAGAAGTATGCTAATGGGCTATTCTATTGTACTCACTA  |      |
| CDS    | GATCGAGGTTGACAGTGAAGGATATGTCGGACTCTCTGATGCTGAACGCAGCAAGGGCCGAGAGAAGTATG-----                         |      |
|        | 3501                                                                                                 | 3600 |
| genome | CAGACGTGATGTGCATGTTGTATCGGCCGAGAAAGTCGTTTCTGACTGAACCTCTCATTTTATCATTACTCTAGACTTTTATTGTTTCTGCTCTGGCCC  |      |
| CDS    | -----ACTTTTATTGTTTCTGCTCTGGCCC                                                                       |      |
|        | 3601                                                                                                 | 3700 |
| genome | TTCGTGGAGACATACTGGCTCGCAGCCGTGTCCTGTATACCTGATTCCACCGCCAAAGAGTTGACTCAGCAGTTGGACAGCAACGGAGAGCCTCAGG    |      |
| CDS    | TTCGTGGAGACATACTGGCTCGCAGCCGTGTCCTGTATACCTGATTCCACCGCCAAAGAGTTGACTCAGCAGTTGGACAGCAACGGAGAGCCTCAGG    |      |
|        | 3701                                                                                                 | 3800 |
| genome | TTCAGTGGGTTGAGGAGCCGCTGTTTCATGGAGAAGACGCAATGTTTCGGAAGACGCTTTACTACCAGGGAGACCTCTCCTACTTTGAGTCTGTCAACAT |      |
| CDS    | TTCAGTGGGTTGAGGAGCCGCTGTTTCATGGAGAAGACGCAATGTTTCGGAAGACGCTTTACTACCAGGGAGACCTCTCCTACTTTGAGTCTGTCAACAT |      |
|        | 3801                                                                                                 | 3900 |
| genome | GGAGACGCTCAAGAATGGTTTTAATCGTCTGTGCGATTATGGCATCCTTATGATGAAGCGACCCACCAATGCCAAGGAGAAGACAAAGGTTGCTCTCCAC |      |
| CDS    | GGAGACGCTCAAGAATGGTTTTAATCGTCTGTGCGATTATGGCATCCTTATGATGAAGCGACCCACCAATGCCAAGGAGAAGACAAAGGTTGCTCTCCAC |      |
|        | 3901                                                                                                 | 4000 |
| genome | CCTGATTTTATGCCAAGCCGAGGTGCTGACGGTCATGTCATTGCCAGCGCGCACTTTGGGATATGGTCGAACATATCGGCACGTTTCAGACGTGAAGGCA |      |
| CDS    | CCTGATTTTATGCCAAGCCGAGGTGCTGACGGTCATGTCATTGCCAGCGCGCACTTTGGGATATGGTCGAACATATCGGCACGTTTCAGACGTGAAGGCA |      |
|        | 4001                                                                                                 | 4100 |
| genome | AGAATCGTCGTGATAACGCCACAGGTAAGGAACATGTGCTTGACATTGCTCGAAACGAAATTTGTTGCTCTGTATGCTTTGTACCAGGGGTTACTAATG  |      |
| CDS    | AGAATCGTCGTGATAACGCCACAG-----                                                                        |      |
|        | 4101                                                                                                 | 4200 |
| genome | GCTTGTGCTCTTGCTTACACTTTCCAACCTAGTTTCTCCCGTGTCTGCGGTTTCAGAGGTCGTCGGAACGCTCCAGCTCCGGTTAAGGTACCCCTTG    |      |
| CDS    | -----TTTCTCCCGTGTCTGCGGTTTCAGAGGTCGTCGGAACGCTCCAGCTCCGGTTAAGGTACCCCTTG                               |      |
|        | 4201                                                                                                 | 4248 |
| genome | CCCAATCCGGCACCCAAAAGGACAGGCGATGGCGCCCCGAAATTATAA                                                     |      |
| CDS    | CCCAATCCGGCACCCAAAAGGACAGGCGATGGCGCCCCGAAATTATAA                                                     |      |

## 【図 3 - 1】

|        |                                                                                                      |      |
|--------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| genome | 1                                                                                                    | 100  |
| CDS    | ATGGAAGGAGACGAGTACGGCTGCTTTGGCCAGAAAGATCCCTGGTCTCTACAGCTTCATCAAACCTCTTGCAGGACGCTTTTCACATCTCTTCA      |      |
| genome | 101                                                                                                  | 200  |
| CDS    | GGGATTACGACGCTTTTCATACCCAGTTTGTTCACAGGACGAACCATTGCTAGTTATCTCCAACCATGGCAACTACCTTCTGGATGGCCTCGCCTTGT   |      |
| genome | 201                                                                                                  | 300  |
| CDS    | GGCCACCTTTCCAGGCCAGATCTCCTTTTGTATGGCACAGCCCAATTTCAAGACTGCAATTGGTGGCATCGCCAGGAAGATTGGTGCATTCCAGTACTG  |      |
| genome | 301                                                                                                  | 400  |
| CDS    | AGGCAAGTCTTTGAAAAACCACAAAATACAGAGCGAAATAGTGACCATAGGCTCGACATATGGGGTGGCGTGATCTGCGCATCTGTCTTTTCGTC AAC  |      |
| genome | 401                                                                                                  | 500  |
| CDS    | CTTTTGTCTTGGCCACTTGCTGACCCTGTGATTATGCTCTTTGTCCAATCTATAGACACAGGACGCGCCAGATATGACGGTGCAGTATGGTCACAA     |      |
| genome | 501                                                                                                  | 600  |
| CDS    | TCCGCTCAGGATGGCAACTCAGTCCTCGGTGAGGGGATTGGCAAGCAGCTGACTTTGGGCGTACTGTCTATATCGAGTGTGGGACGTTCCAGGACGCTGG |      |
| genome | 601                                                                                                  | 700  |
| CDS    | CAGGGACAATCGCGTCACGCAATGTTATGGCGTGGTCACTGCGATCGTCAGTGACAACGAGGTGTTGTTCAAGGCTCCCGGTTGAAATGGATTCCCGCA  |      |
| genome | 701                                                                                                  | 800  |
| CDS    | TCCTTGACATCGGAACGCGACATTGCCTATATCAAATCGCGAAAGATTGTTCCGCATGGGTCACTCAAGATCAGAGTGGAACTGGCAACACCTGGGTCG  |      |
| genome | 801                                                                                                  | 900  |
| CDS    | CAATCAATGAGGCGCTTAAAGCACAGGAGCAGCAGAAATGGCTCGTTGGCAAGCAGCGCAACGGGGACGATCGGCAAGTTGTTTCAAGATATTTTC     |      |
| genome | 901                                                                                                  | 1000 |
| CDS    | AAAGTCGCGGATGCAGACGCAAGATCAGATGATGTGCAATTTGGCCGAGAATGGGTATTCGGAGCAGATATCCCGGGTCTTGACCGCTCCAGCCAAC    |      |
| genome | 1001                                                                                                 | 1100 |
| CDS    | TTTACACAACCTGAGACTACACCACTACTCAAAAAGGCGCGCTCGTCAAACAGCTCCAGTCATCTATATACAGTACCAAGCGCGCAGACTCGAAGC     |      |
| genome | 1101                                                                                                 | 1200 |
| CDS    | CGAGGCTTTTCATATACTCTACCACTCACAGCACAATGCAAGTGGCCGATGCCGACAACGACGAGACGACGCGCCCTGCAATGGACTTAGGAACGC     |      |
| genome | 1201                                                                                                 | 1300 |
| CDS    | GCAAGGCGGACACAACCCGCTGGAACCAATGGCGTTGTCAATGGAGGCGCATCCACATCCATGAGCCACGAAGCACTCCATTGACCTCCCTACACTT    |      |
| genome | 1301                                                                                                 | 1400 |
| CDS    | CACAGCTCCACATCGGCGGTGTACACTTCCCTCGCGACCTGCCCTTCCAGTTCTCACACCAATCGACCATCTGTGATCTACGAGAGCGTCTGGA       |      |
| genome | 1401                                                                                                 | 1500 |
| CDS    | AGAACTTTGAGGATGGTCGACCGTTGCTGTATTCCCTGAAGGCGTATCGAGGACGATTATCACTTGCTCGACTTCAAATATGGCTGCACCATCATGGT   |      |

## 【図 3 - 2】

|        |                                                                                                        |      |
|--------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
|        | 1501                                                                                                   | 1600 |
| genome | TCTTGGATACCTGGCTCAGCATCGCTCTAAGACTCTAAGGATTATACCATGCGGACTGAACCTCTTTAATCGCCATCGATTTGATCCCGGTTCTACGCC    |      |
| CDS    | TCTTGGATACCTGGCTCAGCATCGCTCTAAGACTCTAAGGATTATACCATGCGGACTGAACCTCTTTAATCGCCATCGATTTGATCCCGGTTCTACGCC    |      |
|        | 1601                                                                                                   | 1700 |
| genome | GACTACTCCCATCCGCTCACCGTCCCGACCACCTTGAGAGATGTATCGCGAAGGAGGAGAAGCCAAGAAGCAAGTAAGGAAGACCAAACTGCCTCC       |      |
| CDS    | GACTACTCCCATCCGCTCACCGTCCCGACCACCTTGAGAGATGTATCGCGAAGGAGGAGAAGCCAAGAAGCAAG-----                        |      |
|        | 1701                                                                                                   | 1800 |
| genome | CTCACATATCGCAGTCTGTGCAAGTTTTCTCACATATCTCTTTTCTCTTACCTGTACTGAGCTTCTGCAGATGATTCACTCGGCTGTGGAGGGGCTG      |      |
| CDS    | -----CCTGTACTGAGCTTCTGCAGATGATTCACTCGGCTGTGGAGGGGCTG                                                   |      |
|        | 1801                                                                                                   | 1900 |
| genome | ACTCTTAACGCACCAAACTACGACGAGCTGCGACTTTACAAGGCAACGCGACGACTCTACAGCACTGGGAAGAAGCTTACCGTGCCACAGAAATGGAGC    |      |
| CDS    | ACTCTTAACGCACCAAACTACGACGAGCTGCGACTTTACAAGGCAACGCGACGACTCTACAGCACTGGGAAGAAGCTTACCGTGCCACAGAAATGGAGC    |      |
|        | 1901                                                                                                   | 2000 |
| genome | TAACCTCGCCGTTTTGCGAAAGGTTATCAAAATCTGGTCATGACGCCGAGCATGGCTGCATTGAAACGCGACATTGATGCTTATGACAAGCATCTCTCCAG  |      |
| CDS    | TAACCTCGCCGTTTTGCGAAAGGTTATCAAAATCTGGTCATGACGCCGAGCATGGCTGCATTGAAACGCGACATTGATGCTTATGACAAGCATCTCTCCAG  |      |
|        | 2001                                                                                                   | 2100 |
| genome | CAGCGGCTCCGAGACGCACAACCTGACCGCAAACCAAGCATTCTGGCTGCCCTTGATTATTCATATTGCCCGCGTTATTCCTCTTGCCAGTGCTGTTCTCTG |      |
| CDS    | CAGCGGCTCCGAGACGCACAACCTGACCGCAAACCAAGCATTCTGGCTGCCCTTGATTATTCATATTGCCCGCGTTATTCCTCTTGCCAGTGCTGTTCTCTG |      |
|        | 2101                                                                                                   | 2200 |
| genome | CTTTCGTTACCCGGGACGTTGCTCTTCGGACCTGTTGGACTTTTGGCGTCGTGGCGGCAAGCAGAAAGGACAGCAGGCCATGCTTGCCCTTCAGTCTT     |      |
| CDS    | CTTTCGTTACCCGGGACGTTGCTCTTCGGACCTGTTGGACTTTTGGCGTCGTGGCGGCAAGCAGAAAGGACAGCAGGCCATGCTTGCCCTTCAGTCTT     |      |
|        | 2201                                                                                                   | 2300 |
| genome | ATCTCCAGTTTCACGTTGGCTGGCCGAGATGTATCGCCACCTGGAAGATCGTGGTGTCTTGGCGTTGATGCCCGTCTGCTTTATCTGGACGCAAC        |      |
| CDS    | ATCTCCAGTTTCACGTTGGCTGGCCGAGATGTATCGCCACCTGGAAGATCGTGGTGTCTTGGCGTTGATGCCCGTCTGCTTTATCTGGACGCAAC        |      |
|        | 2301                                                                                                   | 2400 |
| genome | ACTGCTCAGGATCCTAGCACACCATGGGAAGCACTGCAGGAGTACTGGACTATGGTCTGTAGTTGCGTTCTGGCTGCTGTCAACATTTGTGATTTT       |      |
| CDS    | ACTGCTCAGGATCCTAGCACACCATGGGAAGCACTGCAGGAGTACTGGACTATGGTCTGTAGTTGCGTTCTGGCTGCTGTCAACATTTGTGATTTT       |      |
|        | 2401                                                                                                   | 2500 |
| genome | CCAACGATGGCGTATGGTACGGTCTGGCTTTGGGAGTGGCAGATTGATTTGAAGATGCAGATCTATGTATGGTGGTGAAGCTCTGCCGAGGCAATGCAG    |      |
| CDS    | CCAACGATGGCGTATGGTACGGTCTGGCTTTGGGAGTGGCAGATTGATTTGAAGATGCAGATCTATGTATGGTGGTGAAGCTCTGCCGAGGCAATGCAG    |      |
|        | 2501                                                                                                   | 2598 |
| genome | AGATGAAGCGCTGGAGACAGGATCTTGTGAGAGAATGGATGCACCTTGTCGAAAGGATGGCGGTAGAAGGGTGTTTGATGTATCGGCTATTATTGA       |      |
| CDS    | AGATGAAGCGCTGGAGACAGGATCTTGTGAGAGAATGGATGCACCTTGTCGAAAGGATGGCGGTAGAAGGGTGTTTGATGTATCGGCTATTATTGA       |      |

【図 5】

|              |       |                                                                                                        |  |     |
|--------------|-------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|-----|
|              |       | 1                                                                                                      |  | 100 |
| MaGPAT4      | (1)   | -----MPIVPAQQVDSSCPPSGESSPLIPSLGEGVHSGHGHVNDDESG---                                                    |  |     |
| XP_001224211 | (1)   | -----MAPDDRHSAPDLRI LGDRI TLQSGFVEPEHTGEG-                                                             |  |     |
| BAE78043     | (1)   | MSGWPRIYYKLLNPLSILVKSKSIPADPAPELGLDTSRPI MYVLPYNSKADLLTLRAQCLAHDLPDLEPLEIDGTLPRYVFIHCGPRIFTYYTPKEE     |  |     |
|              |       | 101                                                                                                    |  | 200 |
| MaGPAT4      | (46)  | VENITKKHAGRIREDP--VGFEVQTAIFYQGTGWSYSNYYGTRILYEGFSATFKERILASSKVNDLIKDMANKQLDVLIKQRQDAYDAERTANAGKKNF    |  |     |
| XP_001224211 | (37)  | KEEALMKNMARFRSEP--LRFLREVSLYVSGTGWRAYDNVIGQPIFYSGFSEHIKTEMMSATLLQTKIAQLADMRAVEEEK-----EGLNGSDS--       |  |     |
| BAE78043     | (101) | SIKLFHDYLDLHRSNPNLDVQMPVYSVMFGRAPGREKGEVNPPLRMLNIGVQKFFAVLWLGRDSFVRFPSPSVSLRRMADEHG- TDKTIAQKLARVARMHF |  |     |
|              |       | 201                                                                                                    |  | 300 |
| MaGPAT4      | (144) | K-PKVRLLRPED-----IEARRKTLAEELVAVAKSNIDKLVCDMNSMKFIRFFAFLINNILVRMYHQGHIES-----EFLRLRIAEYCKEKKY          |  |     |
| XP_001224211 | (125) | ---DLAAKKAR-----RRALVQNLQEAELKADNMICKFDSKPFIRGAYYLVTLQLLHAYHQGHYSSE-----EVLRLRSVAEEAARKKQ              |  |     |
| BAE78043     | (199) | ARQLAAVGPRLPARQDLFNKLLASRAIAKAVEDEARSKKISHEKAQQNAIALMEEIAANFSYEMI LTDRILGFTWNRLYQGINVHNAERVQLAHQGH     |  |     |
|              |       | 301                                                                                                    |  | 400 |
| MaGPAT4      | (229) | SMVVLPCHKSHIDYLVVSYIFFRMGLALPHIAAGDNDMPIVKALKGAGAFFIRSWADDQLYTSIVQEVQELLEGGYNI ECFIEGTRSRGTGLPPK       |  |     |
| XP_001224211 | (204) | SIIFLPCHRSVDYVSLQLLCYRLGLALPVVAGDNLNFPVVGSLQHAGAMYIRRSFGDDQLYSTLVQTYIDVMLQGGYNLECFIEGGRSRGTGLPPK       |  |     |
| BAE78043     | (299) | ELVYVPCHRSHMDYLLSYLVYHQGLVPPHIAAGINLFWPAGPIFRRLGAFIRRTFKGNKLYSTVFREYLGELFSRGYSVEYFVEGGRSRGTGLDPPK      |  |     |
|              |       |                                                                                                        |  | * + |
|              |       | 401                                                                                                    |  | 500 |
| MaGPAT4      | (329) | LVVKKIIMDAMSNRIQDCYIVPISIGYDKVIETETYNELLGIPKEKESLWGVITN-SRLQKMGRIIDVFAKYSIRNFNMHEIERE-----IIN          |  |     |
| XP_001224211 | (304) | FQIINFVLDSLSGRVEDAIIICPVSTQYDKVIETEGYVTELLGVPPKKENLADFLTGGSSILSLRLGRVDVRFHEPWSLRGFI DEQLSRLSKMPSAINVD  |  |     |
| BAE78043     | (399) | TGTLSMTIQAMRGGTRPITLIPYIGYEHVMEVGTAKELRQATKEKESLPQMLRGLSKLRNLGQ--YINFGEMPLMTYLNQHVDPDWR-----ESID       |  |     |
|              |       |                                                                                                        |  | *   |
|              |       | 501                                                                                                    |  | 600 |
| MaGPAT4      | (422) | KREOTDSVAKSQLKALGYKVLADINSVSVMPALTIGTVLTLRGRGVGRNELIRRVWLKREILSK-CGRVANFSGMETGEVDRAICVL-KDLVALQ        |  |     |
| XP_001224211 | (404) | WRDMKNQMLRQKLLRTLGYKVLADINAVSVMPALTIGTVLTLRGRGVGRNELIRRVWLKREILSK-CGRVAHFGNAPLSDYVQRGLDVLGKDLGVV       |  |     |
| BAE78043     | (492) | PIEAVRPAWLTPTVNNIAADLMVRINNAGAANAMNLCCIALASRQSLTREQTEQLNICYLDMRNPYSTDSTVPSASASELIDHALQMN-KFEVEKD       |  |     |
|              |       | 601                                                                                                    |  | 700 |
| MaGPAT4      | (520) | KNLEPVFYAVKRFELSFYRNQLILFVHEAIIIVTMYTRIKIGGAKSTQHTSQNELNEITFLSRLKTDFIYNPGDIESNLEHTLDYKKSNNVIEVDS       |  |     |
| XP_001224211 | (503) | EGLPEPTYAYVDRFQLSFYRNMTIHLFISETLVATLYTKVKGGGSPISQDIPYRDSQQLFSSLFRCFEIYSGEGLATNLERTLLGLEADNVILLER       |  |     |
| BAE78043     | (591) | TIGDIILPREQAVLMTYIRNNIAHMLVLPSLMAAIVTQHR-----HISRDVMEHNVLYPMLKAELFLRWD--RDEIPDVIDAAN----EMQR           |  |     |
|              |       | 701                                                                                                    |  | 800 |
| MaGPAT4      | (620) | EG----YVGLSDAERSKGRNDFYCFLLWPFEVETYNLAIVSLYTLIPTAKELTQQLDSNGEPQVHWVEERVMEKTQMFGKTYYYQGDLSYFESVNME      |  |     |
| XP_001224211 | (603) | DEEGNITKVGLSGAERAAGRENDFYCFLLWPFEIASWLAIVSLMGLVP-----PAG--QKDDIIVQVSKAQDSAQLLKTLYHQGDLSYFAVNKE         |  |     |
| BAE78043     | (676) | QG----LITQDDELHINPAHSRTLQLAAGARETLQRYAITFWLLSAN-----PSINRGTLKESRTVAQRISVLHGINAPEFFDKA                  |  |     |
|              |       | 801                                                                                                    |  | 900 |
| MaGPAT4      | (715) | TLKNGFNRLCDYGLMMKRPTNAKEKTKVALHPDFMPS-RGADGHVIAAGALNDMVEHIGTFRR-EGKNRRDNATVSSRVLRAEVVANAPAPVKVPLPN     |  |     |
| XP_001224211 | (693) | TLKNSYQRFAGEGIIQVVKSKDTRIIPPLRIAPEWRRGRDKETGELLPAQLWDFTKIASRR-EGKNRRDGATVSSRVLRLTNELGRKLFEEAVEGET      |  |     |
| BAE78043     | (755) | VFSSLVTLTRDEGYISDSG-----DAEPAETMKVYQLAELITSIVRLTIESATQGG                                               |  |     |
|              |       | 901                                                                                                    |  | 944 |
| MaGPAT4      | (813) | PAPKRTGCGAPKL-----                                                                                     |  |     |
| XP_001224211 | (792) | CKGCKGCKGAAPARLSSSEDRSLSRVREQRKRKLERRAHL                                                               |  |     |
| BAE78043     | (808) | -----                                                                                                  |  |     |

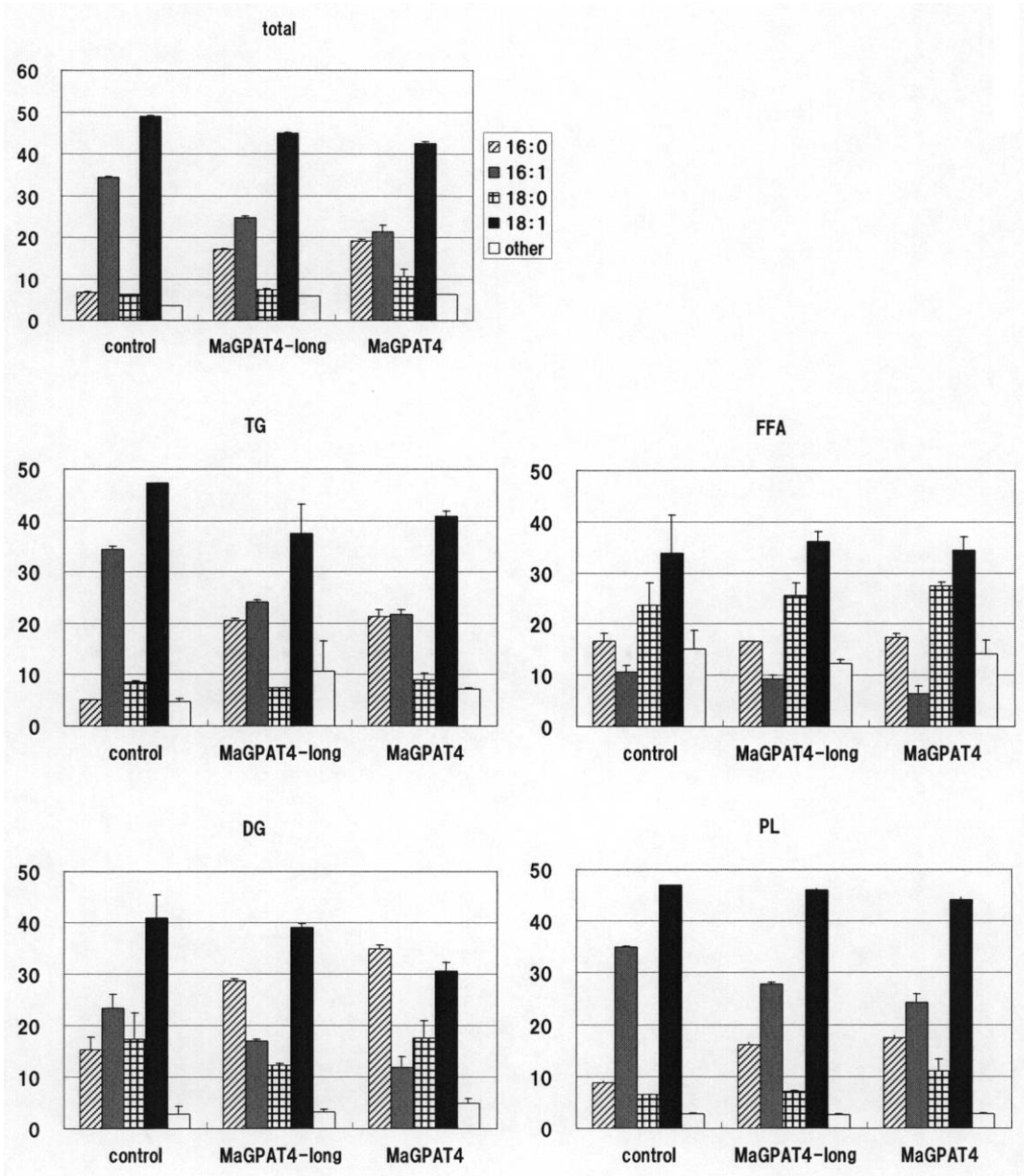
【図 6 - 1】

|         |                                                                                                       |      |
|---------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
|         | 1                                                                                                     | 100  |
| MaGPAT5 | MEGDVAVPALARKIPGLYSFIKLLCRTLFIHFFRDYDAFTQFVQDEPLLVISNHGNYLLDGLALLATFPGQISFLMAQPNFKTAIGGIARKIGAIPLVL   |      |
| UM03369 | MTGTSNLPAASSQDSAVITLSSPSEAHLSASHPSAAASSTASQHPPTIDTHPTRLSSNDPLKKHPNTAIAKGTAAEVGSKQKEFQRRQHLSTSKP       |      |
| ScSCT1  | -----                                                                                                 |      |
| ScGPT2  | -----                                                                                                 |      |
|         | 101                                                                                                   | 200  |
| MaGPAT5 | RPQDAARYDYGASMTIAQDGNVGLGQIGKQLTLDGTVYIECGTFQDAGDRNRVTQCYGVVSAIVSDNEVLFKAPGLKWIIPASLTSEDDIAYIKSRKIVR  |      |
| UM03369 | IPYARQGDSPRLVLVKDFDRLLR-----SLPIPLHHIVPTIVARFICRVFRSQNIMASNIADFIAFFWRIIINLFFREIRPRSSWRIPR             |      |
| ScSCT1  | -----MPAPKLTEKFASSKSTQK-----TTNYSSIEAKSVKTSADQAYIYQEP-SATKKILYSIATWLLYNIFHCFFREIRGRGSFKVPQ            |      |
| ScGPT2  | -----MSAPAADHNAKP-----IPHPVQASRRYKNSYNGFVYN-----IHTWLYDVSVLFNILETIFFREIKVGRAYNVPE                     |      |
|         | 201                                                                                                   | 300  |
| MaGPAT5 | HGSLKIRYERGNWVGINEALKAQEQNNGSLASSATGTIGKIVHKIFKSPDADARSDDVHLAENGYSGADIPGSLTAPANFHTTETPTLKKARS-SN      |      |
| UM03369 | EG-PVIFVAAPHNQFLDPLLLAS-----EVRRASGRRAVLAIEKSIKRRFVGAAARIMQSIPIVARAADSAGKAGKYISLHPSGDPILLIQGHG----    |      |
| ScSCT1  | QG-PVIFVAAPHANQFVDPVILMG-----EVKKSNNRRVSLIAESSLKQPPIGFLASFFMAIGVVRPQDNKPAEGTIRVDPDQYKRVIGHD----       |      |
| ScGPT2  | VGVPTILVCAPHANQFIDPALVMSQTRLLKTSAGKSRSRMPCEVTAESSFKKRFISFFGHAMGGIPVPRIQDNLKPVDENLEIYAPDLKNHPEIKGRSK   |      |
|         | 301                                                                                                   | 400  |
| MaGPAT5 | SSSHPIYTPKRADSARNLSSYSTHSTNAVADANDDETTRPANGLRNAQGGHNPAGTNGVVNGGASTSMSPRSTPLTSPTLHSSTSAVSHFSPRCPF      |      |
| UM03369 | -----TAFKSQLQLKGQIMLPKACGHATVEVEVISDTELKIKKEFKDPRALDMLRGKVPQPEPTKSDKKPSK-----SSSSKALEKVAADLFENQGCY    |      |
| ScSCT1  | -----THFLTDCMPKGLIGLPKSMGFG-EIQSIESDTSLLRKEFKMA-----KPEIKTALLTGTTY                                    |      |
| ScGPT2  | NPQTTPVNFETKRFSAKSLGLPDYLSNA-QIKEIPDDETIISSPFRTS-----KSKVVELLTNGTNF                                   |      |
|         | 401                                                                                                   | 500  |
| MaGPAT5 | QFSHPIDHSVIYESYWKNFEDGRTVAVFPEGVSDDYHLLDFYIGCTINVLGYLAQHRSKTLRIIPCGLNFFNRHFRSRFYADYSHLTVPDHLVEMYR     |      |
| UM03369 | SCLPFVDQTMQYAKIYDKLAEGGCLGIFPEGGSHDRDOLLPLKAGVIMALGAMSANRDLNVRIVPVGLSYFHPHKFRSAVVEFGAPIDVPRQLVGQFD    |      |
| ScSCT1  | KYAAKVDQSCVYHRYFEHLAHNNCIGIFPEGGSHDRTNLLPLKAGVIMALGCMOKHPDVNVKIVPCGMNYFHPHKFRSAVVEFGDPIEIPKELVAKYH    |      |
| ScGPT2  | KYAEKIDNTETFSYFDHLHTKGCYGFIFPEGGSHDRPSLLPIKAGVIMALGAVAADPTMKVAVVPCGLHYFHRNKFRSAVLEYGEPVVDGKYGEMYK     |      |
|         | * +                                                                                                   | *    |
|         | 501                                                                                                   | 600  |
| MaGPAT5 | EGGEAKKQACTELLQMIHSAVEGLTLNAPNYDEIRLYKATRRLYST--GKKITVPQKLELTRFAKGYQNLVMTFSMAALKRDIADYDKHSSSGVRDAQ    |      |
| UM03369 | EGGEGKRKAVGQMMDIVYDGLKGVTLRAPDYETLMVYQAGRRLYRA-PGQSLSGQTVALNRKFIIMCYLQFKDEPRVVKIRDEVLYRNKKLYAGLRDHQ   |      |
| ScSCT1  | NPETN-RDAVKELLDITSKGLQSVYTVCSDYETLMVVQTIIRRLYMTQFSTKLPLPLIVEMNRRMVKGIEFYRNDPKIADITKDIMAYNAALRHYNLPDHL |      |
| ScGPT2  | DSP---RETYSKLLKKITNSLFSVTENAPDYDTLMVIQAARLYQP-VKVRPLPAIVEINRRLLFGYSKFDDPRIIHLKKLVYDYNRKIDSVGLKDHQ     |      |
|         | 601                                                                                                   | 700  |
| MaGPAT5 | LTANPSILAALVFIILPALFLLPVLELLSLPGTLFFGPVGLLASWAAKQGGQAMLAFAQSYLPVSRWPGRDVIATWKIVVSLALMPVCFILDAITLT     |      |
| UM03369 | VERATRAGWRSLG---LLAYRLGLLGLWGLALPGAVLNSPIILAKIISHKKAKEALASQ---VKVAGRDVLATWKLVSGLGVAIILYSFYAAIAT       |      |
| ScSCT1  | VEEAKVNFAKNLG---LVFFRSIGLCILFSLAMPGITMFSPVILAKRISQEKARTALSKST---VKIKANDVIATWKLIGMGFAPLLIYFWSVIT       |      |
| ScGPT2  | VMQLKTTKLEALRCFVTIIVRLIKFSVFAISLPGSILFTRIFICRVYSEKKAKEGLKKSLS---VKIKGTLLATWKLIVALLAPILYVTYSILLI       |      |
|         | 701                                                                                                   | 800  |
| MaGPAT5 | ILAHHWEALQEYWTMGRVAFWLLSTFVIFPTMAITGVWLWEWQIDLMQIYVWWWKLCGGN---AEMKRWQDLVERMDALVERMGRRVFDVSGYY-       |      |
| UM03369 | YLAHRLELSPRTRALMP---LY-TLIVLPTMSYALKFAEVGIDIIYKSLPPLFISLIPGNHKVILDLQQTRTKISADMHALIDELAPQVWEDFAENRM    |      |
| ScSCT1  | YYLRHKPWNKIYVFSG-----SYISCVIVTYSALIVGDI GMDGFKSLRPLVLSLTSP--KGLQKLQKDRRLAERIIEVVNNFGSELFPDFDSAAL      |      |
| ScGPT2  | ILARKQHCRYIWPVSNNAFIQFVY-FYALVFVTTYSSLTGEIGVDFKSLRPLFVSIYVPG-KKIEEIQTTKKNLSLELTAVCNLDGLVPFDYDKLAT     |      |
|         | 801                                                                                                   | 900  |
| MaGPAT5 | -----                                                                                                 |      |
| UM03369 | LPSASAPPTSPREALVWKDKKQSSSAASDALSHPLQWMDERLFGWGRRRHSSTRSLTAEIKHLRSPSLTRGSAKDENSVDDEEDGARFEGEGDGLDD     |      |
| ScSCT1  | REEFDVIDE-----EEEDRKTSELN-----RRKMLRKQIKRQEKDSSSPIISQRDNHDAIEHNNQSDGVSLVNSDNLNLSN                     |      |
| ScGPT2  | EIFSKRDGY-----DVSSDAESSIS-----RMSVQSRS-----RSSS-----IHSIGSLASNALSRVNSRGLTD                            |      |
|         | 901                                                                                                   | 1000 |
| MaGPAT5 | -----                                                                                                 |      |
| UM03369 | VSEGSSEFIESGEEDEGDYEAVFMSLNPQNLNGLRNGGLSPGTPGSGRRSRTHSRSRSGSRGSI GGVASGETFAEKNRNSQDLRALMREGGAMSPPT    |      |
| ScSCT1  | ILPFSSTFH-----RKSESLASTSVAPSSSEFEVENEILE-----                                                         |      |
| ScGPT2  | IPIFSDAKQ-----GQWKS-----EGETSEDEDEFDE-----                                                            |      |

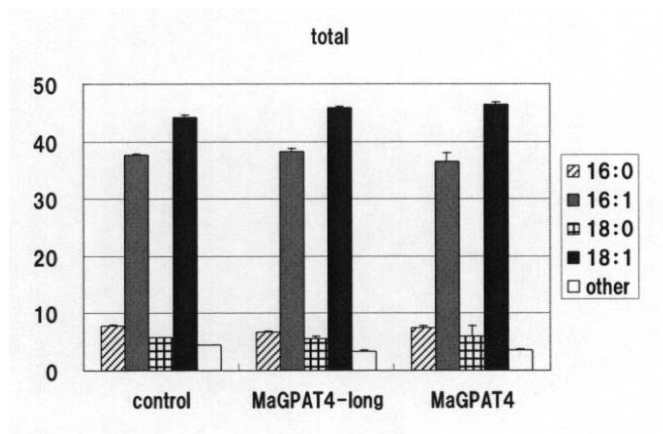
【図 6 - 2】

|         |                                                                                                    |  |      |
|---------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|--|------|
|         | 1001                                                                                               |  | 1100 |
| MaGPAT5 | -----                                                                                              |  |      |
| UM03369 | TRSSGILEGAGSKQSSRTSALPASLITTNISGNDGENGASKASNTSRNRTHSLSEDVHVSELKNAGPAKKLPFSAASQAFEMQHEASGGQAGYRPKLE |  |      |
| ScSCT1  | -----EKNGLASKIAQAVLNKRIGEN-----TAREEEEEEEEEEEEEEEEEEGKEGDA-----                                    |  |      |
| ScGPT2  | -----KNPAIVQTARSSDLNKENSRL-----TNISSKIASLVRQKREHEKKE-----                                          |  |      |
|         | 1101                                                                                               |  | 1143 |
| MaGPAT5 | -----                                                                                              |  |      |
| UM03369 | NMQSAENTPPATPKHEDKKVLTSSASSVPTDSNDLDGKDDGKAQ                                                       |  |      |
| ScSCT1  | -----                                                                                              |  |      |
| ScGPT2  | -----                                                                                              |  |      |

【図 7】



【図 8】



【配列表】

0005890687000001.app

---

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
C 1 2 N 5/10 (2006.01) C 1 2 N 5/10  
C 1 2 P 7/64 (2006.01) C 1 2 P 7/64

(72)発明者 落合 美佐  
大阪府三島郡島本町若山台 1-1-1 サントリー研究センター内

審査官 松田 芳子

(56)参考文献 国際公開第 2008/156026 (WO, A1)  
国際公開第 2006/052824 (WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
C 1 2 N 15/09  
C 1 2 P 7/64  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)  
CAplus/WPIDS/BIOSIS (STN)  
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq  
UniProt/GeneSeq