

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4490039号  
(P4490039)

(45) 発行日 平成22年6月23日(2010.6.23)

(24) 登録日 平成22年4月9日(2010.4.9)

(51) Int.Cl.			F I		
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	Z N A A
A O 1 H	5/00	(2006.01)	A O 1 H	5/00	A
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/00	1 O 3
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C O 7 K	16/40	(2006.01)	C O 7 K	16/40	

請求項の数 17 (全 181 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-558517 (P2002-558517)	(73) 特許権者	501383750
(86) (22) 出願日	平成14年1月18日(2002.1.18)		ビーエーエスエフ プラント サイエンス ゲーエムベーハー
(65) 公表番号	特表2004-530418 (P2004-530418A)		ドイツ連邦共和国 デー-67056 ル ートビヒシャフェン (番地なし)
(43) 公表日	平成16年10月7日(2004.10.7)	(74) 代理人	100091096
(86) 国際出願番号	PCT/EP2002/000462		弁理士 平木 祐輔
(87) 国際公開番号	W02002/057465	(74) 代理人	100118773
(87) 国際公開日	平成14年7月25日(2002.7.25)		弁理士 藤田 節
審査請求日	平成17年1月12日(2005.1.12)	(74) 代理人	100096183
(31) 優先権主張番号	101 02 337.5		弁理士 石井 貞次
(32) 優先日	平成13年1月19日(2001.1.19)	(72) 発明者	ラークル, イエンス スウェーデン国 エス-26831 スヴ アレブ, オンスイエーヴェーゲン 17
(33) 優先権主張国	ドイツ(DE)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 高度不飽和脂肪酸の生産方法、新規な生合成遺伝子、ならびに新規な植物発現構築物

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

2 ~ 5 個の二重結合をもつ高度不飽和 C<sub>18</sub>-、C<sub>20</sub>- または C<sub>22</sub>- 脂肪酸の含量が増大した脂肪酸エステルを生産方法であって、脂肪酸エステルを産生する酵母または植物に、

- a) 配列番号 1 に示す核酸配列からなるポリヌクレオチド；  
 b) 遺伝暗号の縮重のため、配列番号 2 に示すアミノ酸配列を逆翻訳することによって得られる核酸配列からなるポリヌクレオチド；  
 c) ポリペプチドのデサチュラーゼ活性を低減させることなく配列番号 2 に示すアミノ酸配列の全長に対してアミノ酸配列レベルで少なくとも 90% の同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

からなる群より選択される少なくとも 1 つのポリヌクレオチドを導入し、該酵母または植物を生育させて、該酵母または植物内に存在する脂肪酸エステルを単離することを含んでなる、上記方法。

## 【請求項2】

C<sub>18</sub>-、C<sub>20</sub>- または C<sub>22</sub>- 脂肪酸分子が油または脂質の形態で前記酵母または植物から単離される、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項3】

脂肪酸エステルを産生する酵母または植物に、配列番号 1、配列番号 3 および配列番号 9 の核酸配列からなるポリヌクレオチドの組合せを導入する、請求項 1 または 2 に記載の

方法。

【請求項 4】

前記脂肪酸エステルが、その脂肪酸エステル中に 3 個、4 個または 5 個の二重結合をもつ  $C_{18}$  -、 $C_{20}$  - または  $C_{22}$  - 脂肪酸を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

前記脂肪酸エステル中に含まれる高度不飽和脂肪酸を遊離させる、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

デサチュラーゼ活性をもつポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチドであって、

- a) 配列番号 1 に示す核酸配列からなるポリヌクレオチド；
- b) 遺伝暗号の縮重のため、配列番号 2 に示すアミノ酸配列を逆翻訳することによって得られる核酸配列からなるポリヌクレオチド；
- c) ポリペプチドのデサチュラーゼ活性を低減させることなく配列番号 2 に示すアミノ酸配列の全長に対してアミノ酸配列レベルで少なくとも 90% の同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

からなる群より選択される、上記ポリヌクレオチド。

【請求項 7】

請求項 6 に記載のポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド。

【請求項 8】

配列番号 1 に示す配列によりコードされる、請求項 7 に記載のポリペプチド。

【請求項 9】

請求項 6 に記載のポリヌクレオチドを含み、該ポリヌクレオチドが 1 以上の調節シグナルに連結されている、核酸構築物。

【請求項 10】

脂肪酸または脂質代謝の別の生合成遺伝子が前記核酸構築物中に存在する、請求項 9 に記載の核酸構築物。

【請求項 11】

前記核酸構築物中に存在する脂肪酸または脂質代謝の生合成遺伝子が、アシル CoA デヒドロゲナーゼ、アシル ACP [= アシルキャリアータンパク質] デサチュラーゼ、アシル ACP チオエステラーゼ、脂肪酸アシルトランスフェラーゼ、脂肪酸シクターゼ、脂肪酸ヒドロキシラーゼ、アセチル補酵素 A カルボキシラーゼ、アシル補酵素 A オキシダーゼ、脂肪酸デサチュラーゼ、脂肪酸アセチレナーゼ、リポキシゲナーゼ、トリアシルグリセロールリパーゼ、アレンオキシドシクターゼ、ヒドロペルオキシドリナーゼ、または脂肪酸エロンガーゼからなる群より選択される遺伝子である、請求項 9 または 10 に記載の核酸構築物。

【請求項 12】

請求項 6 に記載のポリヌクレオチドまたは請求項 9 に記載の核酸構築物を含有するベクター。

【請求項 13】

請求項 6 に記載の少なくとも 1 つのポリヌクレオチド、請求項 9 に記載の少なくとも 1 つの核酸構築物、または請求項 12 に記載の少なくとも 1 つのベクターを含有する酵母または植物。

【請求項 14】

請求項 6 に記載の機能性のポリヌクレオチド、請求項 9 に記載の機能性の核酸構築物、または請求項 12 に記載の機能性のベクターを含有するトランスジェニック植物。

【請求項 15】

トランスジェニック植物を作製するための請求項 6 に記載のポリヌクレオチドまたは請求項 9 に記載の核酸構築物の使用。

10

20

30

40

50

## 【請求項 16】

請求項 6 に記載のポリヌクレオチドの 1 つによりコードされるポリペプチドと特異的に結合する抗体。

## 【請求項 17】

請求項 6 に記載のポリヌクレオチドの相補配列を含むアンチセンス核酸分子。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、少なくとも 2 個の二重結合をもつ不飽和脂肪酸の生産方法、および/または、少なくとも 2 個の二重結合をもつ高度不飽和脂肪酸の含量が増大したトリグリセリドの生産方法に関する。本発明はさらに、前記方法における、また、不飽和 $C_{18}$ -、 $C_{20}$ -または $C_{22}$ -脂肪酸を含む脂肪酸、油もしくは脂質の含量が増大したトランスジェニック生物（好ましくは、トランスジェニック植物またはトランスジェニック微生物）を作製するための、配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、もしくは配列番号 11 に示す核酸配列の有利な使用に関する。

10

## 【0002】

本発明はさらに、配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、もしくは配列番号 11 に示す核酸配列を有する新規デサチュラーゼ、またはその相同体、誘導体もしくは類似体、および上記遺伝子またはその相同体、誘導体もしくは類似体を含む遺伝子構築物、ならびにそれらを単独でまたは高度不飽和脂肪酸の生合成遺伝子（有利には、配列番号 7 および配列番号 9 に示すもの）と組み合わせて使用することに関する。

20

## 【0003】

さらに、本発明は、単離された核酸配列；該核酸配列を含む発現カセット；少なくとも 1 つの該核酸配列または発現カセットを含むベクターおよびトランスジェニック生物に関する。その上、本発明は、少なくとも 2 個の二重結合をもつ不飽和脂肪酸、および少なくとも 2 個の二重結合をもつ不飽和脂肪酸の含量が増大したトリグリセリドに関する。

## 【0004】

さらに、本発明は、種子特異的発現のための多重発現カセット、ならびに該発現カセットを用いてデサチュラーゼ遺伝子を、単独でまたは配列番号 7 の配列を有する別のデサチュラーゼおよび/または配列番号 9 の配列を有するエロンガーゼ遺伝子またはその相同体、誘導体もしくは類似体と組み合わせて、含むベクターまたは生物に関する。

30

## 【背景技術】

## 【0005】

微生物、動物細胞および植物細胞の天然の代謝過程で生じるいくつかの産物および副産物は、飼料産業、食品産業、化粧品産業、医薬品産業を含めて、様々な産業において利用されている。こうした分子は、まとめて「ファインケミカル」(fine chemicals)と呼ばれているが、例えば脂質および脂肪酸を含み、その代表的な 1 つのクラスが高度不飽和脂肪酸である。脂肪酸およびトリグリセリドは食品産業、動物栄養、化粧品および医薬品の分野で多様な用途を有している。それらが遊離の飽和または不飽和脂肪酸の形をとるのか、あるいは飽和または不飽和脂肪酸の含量が高いトリグリセリドの形をとるのかに応じて、それらは様々な用途に適している。例えば、高度不飽和脂肪酸(PUFA)は、小児用配合物にその栄養価を高める目的で添加される。また、PUFAはヒトの血中コレステロールレベルを下げるように作用し、したがって心臓病の予防に有用である。こうして、それらはいろいろな治療食や薬剤において用いられている。

40

## 【0006】

PUFAの生産に特に適している微生物は、ヤブレッツボカビ属(*Thraustochytria*)またはシゾキトリウム属(*Schizochytria*)の系統のような微生物、海洋性珪藻(*Phaeodactylum tricorutum*)またはクリプトコジニウム属(*Cryptocodium*)のような藻類、スチロニキア属(*Stylonychia*)またはコルピディウム属(*Colpidium*)のような繊毛虫類、糸状菌モルティエラ属(*Mortierella*)、疫病菌エントモフトラ属(*Entomophthora*)またはケカビ属(*Mucor*)

50

のような真菌類である。PUFAをはじめとする一連の望ましい化合物を産生する対象の微生物の突然変異株が、菌株選別によって数多く開発されてきた。しかし、ある種の分子の向上した生産を示す菌株の選択には時間と手間がかかる。

【0007】

代替法として、ファインケミカルは、PUFAを産生するように開発された植物を大規模栽培することにより便利に取得することができる。この目的に特によく適合する植物は、多量の脂質化合物を含有する油脂作物、例えば、アブラナ、キャノーラ、アマニ、ダイズ、ヒマワリ、ルリチシャ、マツヨイグサなどである。しかし、本発明の詳細な説明で述べるように、油または脂質と脂肪酸を含むその他の作物もよく適合する。通常の植物品種改良により、ある範囲の望ましい脂質と脂肪酸、または補因子と酵素を産生する一連の突然変異植物が開発されてきた。しかし、特定の分子の生産が向上している新規植物変種を選択するには時間と労力がかかり、そして高度不飽和 $C_{18}$ -、 $C_{20}$ -脂肪酸および $C_{22}$ -脂肪酸、またはより長い炭素鎖をもつ脂肪酸の場合のように、その化合物が対象の植物中にもともと存在しない場合には実際不可能でさえある。

10

【0008】

不飽和脂肪酸の好ましい性質のため、これまで、不飽和脂肪酸含量を変化させた油を各種生物に生産させるために、脂肪酸やトリグリセリドの合成に関与する遺伝子を利用可能にしようとする努力が続けられてきた。こうして、WO 91/13972およびそのUS対応物は9-デサチュラーゼを開示している。15-デサチュラーゼはWO 93/11245に特許請求されており、また、12-デサチュラーゼはWO 94/11516に特許請求されている。6-デサチュラーゼは、WO 93/06712、US 5,614,393、WO 96/21022およびWO 99/27111に記載されている。さらなるデサチュラーゼは、例えば、EP-A-0 550 162、WO 94/18337、WO 97/30582、WO 97/21340、WO 95/18222、EP-A-0 794 250、Stukeyら、J. Biol. Chem., 265, 1990: 211 44-20149、Wadaら、Nature 347, 1990: 200-203またはHuangら、Lipids 34, 1999: 649-659に記載されている。6-パルミトイルACPデサチュラーゼはWO 96/13591に記載され特許請求されている。しかし、各種のデサチュラーゼの生化学的特徴づけはまだ不十分である。なんとすれば、これらの酵素は膜結合型のタンパク質であるため、単離して特徴づけるのが非常に厄介だからである(McKeonら、Methods in Enzymol. 71, 1981: 12141-12147、Wangら、Plant Physiol. Biochem., 26, 1988: 777-792)。

20

【0009】

酵母では、不飽和脂肪酸への脂肪酸スペクトルのシフトおよび生産性の向上が見出されている(Huangら、Lipids 34, 1999: 649-659、Napierら、Biochem. J., Vol. 330, 1998: 611-614)。しかしながら、トランスジェニック植物で様々なデサチュラーゼを発現させることは望ましい成功を収めなかった。不飽和脂肪酸への脂肪酸スペクトルのシフトが認められたが、トランスジェニック植物の合成能が劇的に低下し、つまり、もとの植物と比べてほんの少量の油しか得られないという問題が持ち上がった。

30

【0010】

酵母も植物も自然界では、アラキドン酸(ARA)、エイコサペンタエン酸(EPA)および/またはドコサヘキサエン酸(DHA)のような、脂肪酸分子中に少なくとも2個の二重結合をもつ高度不飽和 $C_{20}$ -および/または $C_{22}$ -脂肪酸を生産しない。

40

【0011】

このような理由で、不飽和脂肪酸の生合成に関与しかつ工業的規模でのそれらの生産を可能にする酵素をコードする新規遺伝子の必要性が依然として大きい。従来バイオテクノロジーによる高度不飽和脂肪酸の生産方法はどれも、上記脂肪酸を経済上有効な量で生産するものではない。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

本発明の目的は、高度不飽和脂肪酸の合成用の更なる酵素を提供することであり、また、高度不飽和脂肪酸の生産方法においてこれらの酵素を、他の酵素の存在下または不在下

50

で、用いることである。

【課題を解決するための手段】

【0013】

上記目的は、少なくとも2個の二重結合をもつ高度不飽和脂肪酸の含量が増大した脂肪酸エステルの新規生産方法により達成され、この方法は、脂肪酸エステルを産生する生物に、

- a) 配列番号1、配列番号3、配列番号5、または配列番号11に示す配列を有する核酸配列；
  - b) 遺伝暗号の縮重のため、配列番号2、配列番号4、配列番号6、または配列番号12に示すアミノ酸配列を逆翻訳することによって得られる核酸配列；
  - c) 配列番号2、配列番号4、配列番号6、または配列番号12に示すアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードし、かつ該ポリペプチドの酵素作用を実質的に低減させることなくアミノ酸レベルで少なくとも50%の相同性を有する、配列番号1、配列番号3、配列番号5、または配列番号11に示す核酸配列の誘導体；
- からなる群より選択される少なくとも1つの核酸配列を導入し、該生物を生育させて、該生物内に存在する脂肪酸エステルを単離することを含んでなる。

10

【0014】

本発明の方法で用いる核酸配列は、5-、6-または12-デサチュラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする単離された核酸配列である。

【0015】

本発明の方法では、脂肪酸エステル中に少なくとも2個の二重結合をもつ高度不飽和 $C_{18}$ -、 $C_{20}$ -および/または $C_{22}$ -脂肪酸分子を有する脂肪酸エステルを生産することが有利である。これらの脂肪酸分子は3、4または5個の二重結合をもつことが好ましく、そしてアラキドン酸(ARA)、エイコサペンタエン酸(EPA)またはドコサヘキサエン酸(DHA)の合成をもたらすことが有利である。

20

【0016】

高度不飽和 $C_{18}$ -、 $C_{20}$ -および/または $C_{22}$ -脂肪酸分子を有する脂肪酸エステルは、かかる脂肪酸エステルを油または脂質の形で(例えば、スフィンゴ脂質、ホスホグリセリド、脂質、糖脂質、リン脂質、モノアシルグリセリド、ジアシルグリセリド、トリアシルグリセリド、または少なくとも2個の二重結合をもつ高度不飽和脂肪酸を有する他の脂肪酸エステルのような化合物の形で)生産するために使用される生物から単離することができる。

30

【0017】

本発明の方法による生産に適する生物は、原則として、あらゆる原核または真核生物であり、例えば、グラム陽性もしくはグラム陰性細菌、真菌、酵母、藻類、繊毛虫、動物もしくは植物の細胞、動物または植物(例えば、コケ類、双子葉植物、単子葉植物など)がある。本発明の方法では、油を産生する生物に属する生物、すなわち、油の生産に用いられる生物を用いることが有利であり、例えば以下の生物である：クリプトコジニウム属(*Cryptocodium*)、ヤブレツボカビ属(*Thraustochytrium*)、フェオダクチルム属(*Phaeodactylum*)およびモルティエレラ属(*Mortierella*)のような微生物、エントモフトラ属(*Entomophthora*)、ケカビ属(*Mucor*)、その他の藻類や真菌、ならびに動物または植物、特に植物、好ましくは多量の脂質化合物を含む油脂作物、例えば、ダイズ、落花生、アブラナ、キャノーラ、ヒマワリ、ペニバナ、マツヨイグサ、アマニ、ルリチシャ、樹木(ギネアアブラヤシ、ココナッツ)、または穀物、例えば、トウモロコシ、コムギ、ライムギ、オートムギ、ライコムギ、イネ、オオムギ、ワタ、キャッサバ、コショウ、マンジュギク、ナス科植物(例：ジャガイモ、タバコ、ナス、トマト)、ソラマメ属(*Vicia species*)、エンドウ、アルファルファ、低木の植物(コーヒー、カカオ、チャ)、ヤナギ属(*Salix species*)、多年生植物および家畜のかいば作物。特に好ましい本発明に従う植物は油脂作物であり、例えば、ダイズ、落花生、アブラナ、キャノーラ、アマニ、マツヨイグサ、ヒマワリ、ペニバナ、または樹木(ギネアアブラヤシ、ココナッツ)が挙げられる。

40

50

## 【0018】

本発明による方法は、適宜に配列番号7および/または配列番号9に示す配列と共に、配列番号1、3、5、もしくは11に示す本発明のヌクレオチド配列またはその相同体、誘導体もしくは類似体を単独で、または配列番号13~17からの発現構築物の配列と組み合わせるか、適宜に配列番号7および/または9の配列と共に、配列番号1、3、5、もしくは11の配列またはその相同体、誘導体もしくは類似体を含む遺伝子構築物を含有するか、あるいは上記ヌクレオチド配列または遺伝子構築物を含むベクターを含有する、適当なトランスジェニック生物、またはトランスジェニック微生物を生育させるか、あるいはトランスジェニック植物細胞、組織、器官もしくはインタクトな植物を生育させることにより、本発明の核酸分子の発現をもたらす、その結果としてファインケミカルを産生させることを含んでなる。好ましい実施形態において、本方法はさらに、本発明のデサチユラーゼ核酸の発現をもたらす、そのような本発明の核酸配列、遺伝子構築物またはベクターを単独でまたは組合せで含む細胞（細胞はデサチユラーゼ核酸配列で形質転換される）を取得するステップを含む。さらに好ましい実施形態では、本方法はさらに、そのような培養物からファインケミカルを取得するステップを含む。特に好ましい実施形態では、該細胞は織毛虫綱、微生物（例えば、真菌）、植物界（特に、油脂作物）に属するものであり、微生物または油脂作物、例えば、落花生、アブラナ、キャノーラ、アマニ、ダイズ、ペニバナ（アザミ）、ヒマワリ、またはルリチシャが特に好ましい。

10

## 【0019】

トランスジェニック/組換えとは、本発明の目的において、本発明による核酸が生物のゲノム中のその天然の位置に存在しないことを意味するものとして理解されるべきである。ここでは、核酸を同種または異種として発現させることが可能である。しかし、トランスジェニック/組換えはまた、本発明による核酸が生物のゲノム中のその天然の位置に存在するが、該配列が天然の配列に対して改変されており、かつ/または天然の配列の調節配列が改変されていることを意味する。トランスジェニック/組換えは、好ましくは、本発明の核酸をゲノム中のもとの位置ではない位置で発現させることを指し、すなわち、核酸の同種発現、好ましくは、異種発現が存在する。好適なトランスジェニック生物は上記のトランスジェニック植物、好ましくは、油脂作物である。

20

## 【0020】

本発明の方法によって生産された脂肪酸エステル中に含まれる高度不飽和脂肪酸は、例えば、KOHまたはNaOHの水溶液のようなアルカリを用いて、有利にはメタノールやエタノールなどのアルコールの存在下で、処理することにより放出させることができ、そして相分離、続いて酸性化（例えば、 $H_2SO_4$ を用いる）を行うことにより単離することができる。

30

## 【0021】

本発明のさらなる主題は、上記の本発明方法により生産された、脂肪酸分子中に少なくとも2個の二重結合（好ましくは、3、4、5または6個の二重結合）をもつ油、脂質および/または脂肪酸である。本発明の別の主題は、上記の油、脂質および/または脂肪酸を含む組成物、ならびに、飼料、食品、化粧品または医薬品における上記油、脂質および/または脂肪酸あるいは上記組成物の使用である。

40

## 【0022】

本発明のさらなる態様は、微生物による分子の生産をモジュレートする方法に関する。この方法は、細胞に、本発明によるデサチユラーゼ活性またはデサチユラーゼ核酸の発現をモジュレートする物質を単独でまたは組み合わせて接触させて、細胞に関連した活性が該物質の非存在下での該活性と比較して改変されるようにすることを含んでなる。好ましい実施形態では、脂質と脂肪酸、補因子と酵素のための細胞の1もしくは2代謝経路、または細胞膜を介した化合物の輸送が、該微生物による所望のファインケミカルの生産高または生産率を向上させるようにモジュレートされる。デサチユラーゼ活性をモジュレートする物質は、デサチユラーゼ活性またはデサチユラーゼ核酸の発現を刺激する物質、あるいは脂肪酸生合成における中間体として使用できる物質であり得る。デサチユラーゼ活性

50

またはデサチュラーゼ核酸の発現を刺激する物質の例としては、とりわけ、小分子、活性デサチュラーゼおよび細胞に導入されているデサチュラーゼコード化核酸がある。デサチュラーゼ活性またはデサチュラーゼ発現を阻害する物質の例としては、とりわけ、小分子および/またはアンチセンスデサチュラーゼ核酸分子がある。

【0023】

本発明のさらなる態様は、細胞からの所望の化合物の生産高をモジュレートする方法に関し、この方法は、細胞に野生型または変異型デサチュラーゼ遺伝子（別個のプラスミド上に保持されるか、宿主細胞のゲノムに組み込まれる）を導入することを含んでなる。ゲノムへの組み込みの場合には、その組み込みは、ランダムであってもよいし、天然の遺伝子を導入されるコピーで置き換えて該細胞による所望の化合物の生産をモジュレートするよう  
10  
な方法で組換えにより行ってもよいし、あるいは、遺伝子が機能的な発現単位（遺伝子の発現を確実にする少なくとも1つの配列と、機能的に転写された遺伝子のポリアデニル化を確実にする少なくとも1つの配列とを含む）に機能しうる形で連結されるように遺伝子をトランスで用いることにより行ってもよい。

【0024】

好ましい実施形態においては、生産高（収率）が改変される。さらに好ましい実施形態では、所望のファインケミカルが増加する。また、マイナスの影響を及ぼす望ましくない化合物を減少させることも可能である。特に好ましい実施形態では、所望のファインケミカルは脂質または脂肪酸、補因子または酵素である。特に好ましい実施形態では、このファインケミカルは高度不飽和脂肪酸である。より好ましくは、アラキドン酸（ARA）、  
20  
エイコサペンタエン酸（EPA）、またはドコサヘキサエン酸（DHA）から選択される。

【0025】

本発明は、PUFA生合成のデサチュラーゼを同定し単離するのに適しており、また、油、脂肪酸、脂質、脂質から誘導される化合物を改変するために、最も好ましくは高度不飽和脂肪酸を生産するために、使用することができる新規核酸分子を提供する。

【0026】

本発明はさらに、植物において組合せ遺伝子を多重平行して種子特異的に発現させるための多重発現カセットおよび構築物を提供する。

【0027】

クリプトコジニウム属(*Cryptocodinium*)、ヤブレッツボカビ属(*Thraustochytrium*)、フ  
30  
ェオダクチルム属(*Phaeodactylum*)およびモルティエレラ属(*Mortierella*)のような微生物、エントモフトラ属(*Entomophthora*)およびケカビ属(*Mucor*)、その他の藻類や真菌、ならびに植物、特に油脂作物は、本発明による方法に適した生物である。

【0028】

上記微生物および繊毛虫綱、藻類および関連生物（例えば、海洋性珪藻(*Phaeodactylum  
tricornutum*)）を遺伝子操作するためのクローニングベクターおよびクローニング技術  
40  
が、WO 98/01572またはFalciatoreら、1999, *Marine Biotechnology* 1(3):239-251、およびDunahayら、1995, *Genetic transformation of diatoms*, *J. Phycol.* 31:1004-1012 およびそこに引用される文献に記載されている。こうして、上記核酸分子を本発明の方法においてこれらの生物の遺伝子工学的操作による改変に使用して、それらを1種以上のファインケミカルのより良好なまたはより効率的な生産体にする  
50  
ことができる。このファインケミカルの生産または生産効率の向上は、本発明遺伝子の操作の直接的結果により、またはこの操作の間接的結果によりもたらされる。本発明のためのファインケミカルは、少なくとも2個の二重結合をもつ高度不飽和脂肪酸を含む脂肪酸エステル（例えば、スフィンゴ脂質、ホスホグリセリド、脂質、糖脂質、リン脂質、モノアシルグリセリド、ジアシルグリセリド、トリアシルグリセリド、または少なくとも2個の二重結合をもつ高度不飽和脂肪酸を含む他の脂肪酸エステル）として理解される。それらはさらに、ビタミン、例えば、ビタミンE、ビタミンC、ビタミンB2、ビタミンB6、パントラクトン、カロテノイド（例：アスタキサンチン、 $\beta$ -カロテン、ゼアキサンチンなど）のような化合物として理解される。

10

20

30

40

50

## 【0029】

コケ類と藻類は、相当量の高度不飽和脂肪酸、例えば、アラキドン酸(ARA)、および/またはエイコサペンタエン酸(EPA)および/またはドコサヘキサエン酸(DHA)を産生する唯一知られた植物系である。コケ類は膜脂質中にPUFAを含有し、一方藻類、藻類に関連した生物、それに一部の真菌は、トリアシルグリセロール画分中に相当量のPUFAを蓄積する。したがって、トリアシルグリセロール画分中にPUFAを蓄積するこのような株から単離される核酸分子は、宿主、特に上記のような微生物、およびアブラナ、キャノーラ、アマニ、ダイズ、ヒマワリ、ルリチシャといった油脂作物のような植物において、脂質およびPUFA産生系を改変するのに特に適している。それゆえ、それらは本発明の方法において有利に使用することができる。したがって、本発明の核酸は、トリアシルグリセロール蓄積微生物由来の核酸を単離するために、また、対象の生物におけるPUFA前駆体分子の生合成を改変するのに適している、他の生物種においてそのようなDNA配列およびそれによりコードされる酵素を同定するために、使用することができる。

10

## 【0030】

トリアシルグリセロール中にARA、EPA、DHAなどのPUFAを蓄積することができる微生物は、海洋渦鞭毛藻(*Cryptocodinium cohnii*)、ヤブレッツボカビ属(*Thraustochytrium*)およびフェオダクチルム属(*Phaeodactylum*)のような微生物である。ヤブレッツボカビ属(*Thraustochytrium*)は系統発生的にシゾキトリウム属(*Schizochytrium*)とも近縁である。したがって、本発明の核酸を参照してデサチュラーゼを同定できること、例えば、酵素の基質特異性を予測できることは、非常に重要でありうる。さらに、これらの核酸分子は、関連ゲノムをマッピングするための、またはPCRプライマーを誘導するための基準配列としても役立つ。

20

## 【0031】

本発明の核酸分子は、デサチュラーゼと呼ばれるタンパク質をコードしている。これらのデサチュラーゼは、例えば、脂質またはPUFAのような脂肪酸の合成に必要なとされる化合物の代謝(例えば、生合成もしくは分解)に関係する機能を発揮することができ、また、1種以上の脂質/脂肪酸組成物の細胞内または細胞外への膜貫通輸送に参加することができる。

## 【0032】

本発明の核酸配列は、長鎖の高度不飽和脂肪酸(好ましくは、脂肪酸の炭素骨格中に16、18または20個以上の炭素原子を有し、かつ/または炭素鎖中に少なくとも2個の二重結合を有するもの)を生産するのに適したデサチュラーゼをコードしており、本発明の核酸は、5位に、別の場合には6位に、さらに別の場合には12位に、二重結合を導入することができる酵素をコードしている。これらの核酸を用いると、トリアシルグリセロール画分中に多量のPUFAを得ることができる。さらに、別のデサチュラーゼ類も単離されており、これらは、単独でまたは4デサチュラーゼと一緒に、高度不飽和脂肪酸の生産方法に利用することが可能である。本出願において、単数の、すなわち、1種のデサチュラーゼ遺伝子もしくはタンパク質は、複数の、すなわち、2種以上のデサチュラーゼ遺伝子もしくはタンパク質を意味することもあると理解すべきである。

30

## 【0033】

デサチュラーゼを用いた $C_{18}$ -炭素鎖を有するトリエン酸の生産がすでに示されている。しかし、文献に記載のこうした方法では、 $\gamma$ -リノレン酸の生産に関して特許請求されているが、非常に長鎖の高度不飽和脂肪酸( $C_{20}$ -またはそれより長い炭素鎖を有し、トリエン酸またはそれより高い不飽和度の脂肪酸)の生産はこれまで実証されたことがない。

40

## 【0034】

本発明の長鎖PUFAを調製するには、最初に、高度不飽和 $C_{18}$ -脂肪酸をエロンガーゼの酵素活性により2炭素原子以上伸長させる必要がある。1回の伸長サイクル後、この酵素活性は $C_{20}$ -脂肪酸をもたらす。2回、3回および4回の伸長サイクル後には、 $C_{22}$ -、 $C_{24}$ -または $C_{26}$ -脂肪酸をもたらす。各種のデサチュラーゼをコードする本発明に開示した核酸配列は、エロンガーゼと協力して、非常に長鎖の高度不飽和脂肪酸をもたらす。本発明によ

50

るデサチュラーゼの活性は、好ましくは、脂肪酸分子中に少なくとも2個の二重結合（好ましくは、脂肪酸分子中に3、4、5または6個の二重結合）があるC<sub>18</sub>-、C<sub>20</sub>-および/またはC<sub>22</sub>-脂肪酸をもたらす、特に好ましくは、脂肪酸分子中に少なくとも2個の二重結合（好ましくは、脂肪酸分子中に3個、4個または5個の二重結合）があるC<sub>18</sub>-および/またはC<sub>20</sub>-脂肪酸をもたらす。脂肪酸の伸長は、本発明によるデサチュラーゼをエロンガーゼ活性と組み合わせることにより行うことができ、有利な様式では配列番号9によりコードされるエロンガーゼを使用することが可能である。本発明の酵素による伸長反応を行った後、さらなる脱飽和ステップ（例えば、5位での脱飽和）を実施してもよい。WO 00/12720に開示されるようなC<sub>18</sub>-からC<sub>20</sub>-鎖への、またはC<sub>20</sub>-からC<sub>22-24</sub>-鎖への伸長をもたらすような他のエロンガーゼとの組合せを使用してもよく、かつ/または、4位に対して活性を有するデサチュラーゼを有利に用いて高度に脱飽和された脂肪酸を得てもよい。したがって、デサチュラーゼ活性の産物および実施しうる更なる脱飽和の産物は、より高度に脱飽和されたPUFA類、例えば、ジホモ- $\gamma$ -リノレン酸、ドコサジエン酸、アラキドン酸、6-エイコサトリエンジホモ- $\gamma$ -リノレン酸、エイコサペンタエン酸、3-エイコサトリエン酸、3-エイコサテトラエン酸、ドコサペンタエン酸、またはドコサヘキサエン酸をもたらす。本発明による酵素活性の基質は、例えば、タキソール酸、6,9-オクタデカジエン酸、リノール酸、リノレン酸、 $\omega$ -もしくは $\omega$ - $\gamma$ -リノレン酸、またはステアリドン酸であり、さらに、アラキドン酸、エイコサテトラエン酸、ドコサペンタエン酸、エイコサペンタエン酸である。好ましい基質はリノール酸、 $\omega$ - $\gamma$ -リノレン酸および/または $\omega$ - $\gamma$ -リノレン酸であり、さらに、アラキドン酸、エイコサテトラエン酸、ドコサペンタエン酸、エイコサペンタエン酸である。本発明の方法の特に好ましい産物はアラキドン酸、ドコサペンタエン酸、エイコサペンタエン酸である。脂肪酸中に少なくとも2個の二重結合があるC<sub>18</sub>-脂肪酸は、本発明の酵素活性により、遊離脂肪酸の形でまたはエステル（例えば、リン脂質、糖脂質、スフィンゴ脂質、ホスホグリセリド、モノアシルグリセロール、ジアシルグリセロール、またはトリアシルグリセロール）の形で伸長させることができる。

#### 【0035】

ヒトの栄養にとって特に重要なものは共役リノール酸(CLA)である。CLAは、特にC18:2 <sup>9 cis, 11 trans</sup> またはその異性体であるC18:2 <sup>10 trans, 12 cis</sup> のような脂肪酸を意味すると理解すべきである。こうした脂肪酸は、ひとたび体内に取り込まれると、ヒト酵素系により脱飽和または伸長されて健康増進作用に貢献しうる。また、本発明によるデサチュラーゼ（12-デサチュラーゼ）は、分子中に少なくとも2個の二重結合がある共役脂肪酸を脱飽和させることが可能で、そのような健康増進用脂肪酸をヒトの栄養のために利用可能とする。共役脂肪酸のその他の例としては、 $\omega$ -パリナリン酸、プニカ酸、エレオステアリン酸、カレンドリン酸(calendulic acid)がある。

#### 【0036】

植物およびその形質転換体において使用しうるクローニングベクター、例えば、Plant Molecular Biology and Biotechnology (CRC Press, Boca Raton, Florida), chapter 6/7, pp. 71-119 (1993); F.F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, Kung & R. Wu編, Academic Press, 1993, 15-38; B. Jenesら, Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, Kung & R. Wu編, Academic Press, 1993, 128-143; Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991), 205-225) に発表または引用されているクローニングベクターが与えられれば、本発明の核酸を広範囲の植物の組換え改変のために使用して、それらの植物を、PUFAなどの1種以上の脂質誘導産物のより良好な、より効率的な生産体とすることができる。こうしたPUFAなどの脂質誘導産物の改良された生産または生産効率はこの遺伝子操作の直接的作用または間接的作用によってもたらされる。

#### 【0037】

本発明によるデサチュラーゼタンパク質の改変が、その改変されたタンパク質のため、油脂作物または微生物からのファインケミカルの収率、生産および/または生産効率に直

10

20

30

40

50

接的に影響を及ぼしうる一連の作用機構が存在する。デサチュラーゼタンパク質やデサチュラーゼ遺伝子の数または活性、およびデサチュラーゼとエロンガーゼを組み合わせた遺伝子の数または活性を増大させ、その結果として、より多量のこれらの化合物を新規に生産させることができる。なぜなら、デサチュラーゼタンパク質やデサチュラーゼ遺伝子の活性および生合成能は対象の遺伝子の導入前にはこれらの生物に備わっていないからである。同様に、このことは別のデサチュラーゼもしくはエロンガーゼまたは別の脂質代謝の酵素との組合せにも当てはまる。また、種々の分岐配列、すなわち、DNA配列レベルで相違する配列をこの目的に使用することも有利である。また、例えば、種子または油貯蔵組織の成熟度の関数として、異なる時間的遺伝子発現を可能にする遺伝子発現用プロモーターを使用することも有利である。

10

## 【0038】

1種または数種のデサチュラーゼ遺伝子を、単独でまたは細胞中の他の遺伝子と組み合わせ、生物に導入すると、最終産物へ向かう生合成の流れが増大するだけでなく、対応するトリアシルグリセロール組成物も増加するかまたは新規に合成される。同様に、1種以上のファインケミカル（例えば、脂肪酸、極性および中性脂質）の生合成に必要とされる栄養素の輸送に関与する他の遺伝子の数または活性を増大させ、その結果として、細胞または貯蔵コンパートメント内のこれらの前駆体、補因子または中間体の濃度を高めてもよく、こうして、以下で述べるように、細胞のPUFA産生能が増大する。ファインケミカルとしては脂肪酸と脂質それぞれ自体が好ましいが、これらの化合物の生合成に関与する1種以上のデサチュラーゼの活性を最適化したり、その数を増加させたり、あるいはこれらの化合物の分解に関与する1種以上のデサチュラーゼの活性を破壊したりすることで、植物または微生物からの脂肪酸分子および脂質分子の収率、生産および/または生産効率を増加させることができる。

20

## 【0039】

さらに、本発明によるデサチュラーゼ遺伝子の突然変異誘発は、1種以上の望ましいファインケミカルの生産に直接または間接的に影響を及ぼす、改変された活性を示すデサチュラーゼタンパク質をもたらす可能性がある。例えば、本発明によるデサチュラーゼ遺伝子の数または活性を増大させて、細胞の通常の代謝老廃物または副産物（おそらく、目的のファインケミカルの過剰生産のため、それらの量が増加する）を、それらが細胞内で他の分子またはプロセスを破壊する（細胞の生存能を低下させる）前、あるいはファインケミカルの生合成経路を妨害する（それゆえに、目的のファインケミカルの収率、生産もしくは生産効率を低下させる）前に、効率的に排出するようにすることができる。さらに、目的のファインケミカルそれ自体の比較的多い細胞内含量が細胞にとって毒性となることもあり、また、アロステリック調節のような酵素フィードバック機構を妨げることもある。例えば、PUFA経路の下流にある他の酵素または解毒酵素の活性または数を増大させることにより、トリアシルグリセロール画分へのPUFAの配分を増加させ、種子細胞の生存能を高め、ひいては培養下の細胞の良好な発生へ導くか、または目的のファインケミカルを生産する種子をもたらす。あるいはまた、種々の脂質分子および脂肪酸分子が対応する量で産生されるように、本発明によるデサチュラーゼ遺伝子を操作することができる。これは細胞膜の脂質組成に決定的な影響を及ぼし、新たに合成されたPUFAの存在に加えて新規な油をもたらす可能性がある。それぞれのタイプの脂質は異なる物理的特性を示すので、膜の脂質組成の変化は膜の流動性を大きく変更しうる。膜の流動性の変化は膜を経由する分子の輸送および細胞の完全性に影響を与え、これら双方ともファインケミカルの生産に決定的な影響を及ぼす。さらに、植物では、こうした変化が非生物学的および生物学的ストレス状況に対する耐性のような他の形質にも影響を及ぼすことがある。

30

40

## 【0040】

生物学的および非生物学的ストレス耐性は、様々な植物に付与することが望ましい一般的形質であり、そのような植物として、トウモロコシ、コムギ、ライムギ、オートムギ、ライコムギ、イネ、オオムギ、ダイズ、落花生、ワタ、アマニ、アマ、アブラナおよびキャノーラ、キャッサバ、コショウ、ヒマワリおよびセンジュギク、ナス科植物（例：ジャガイ

50

モ、タバコ、ナス、トマト)、ソラマメ属(*Vicia species*)、エンドウ、アルファルファ、低木の植物(コーヒー、カカオ、チャ)、ヤナギ属(*Salix species*)、樹木(ギネアアブラヤシ、ココナツ)、多年生植物および家畜のかいば作物が挙げられる。本発明の別の実施形態として、これらの作物は遺伝子操作のための好適な標的植物でもある。本発明に従う特に好ましい植物は油脂作物であり、例えば、ダイズ、落花生、アブラナ、キャノーラ、ヒマワリ、アマニ、ペニバナ、樹木(ギネアアブラヤシ、ココナツ)、またはトウモロコシ、コムギ、ライムギ、オートムギ、ライコムギ、イネ、オオムギ、アルファルファ、低木の植物(コーヒー、カカオ、チャ)などの作物がある。

#### 【0041】

したがって、本発明の一態様は、1種のデサチュラーゼまたは数種のデサチュラーゼまたはその生物学的に活性な部分をコードするヌクレオチド配列、あるいはデサチュラーゼコード化核酸(例えば、DNAまたはmRNA)を検出もしくは増幅するためのプライマーまたはハイブリダイゼーションプローブとして適する核酸断片を含む、単離された核酸分子(例えば、cDNA)に関する。特に好ましい実施形態では、核酸分子は配列番号1、3、5または11に示したヌクレオチド配列のうちの1つ、またはこれらのヌクレオチド配列の1つのコード領域もしくは相補体を含む。他の特に好ましい実施形態では、本発明の単離された核酸分子は、配列番号1、3、5または11に示したヌクレオチド配列またはその一部とハイブリダイズするヌクレオチド配列、あるいは、これらに対して少なくとも50%の相同性、好ましくは少なくとも約60%の相同性、より好ましくは少なくとも約70%、80%または90%の相同性、より一層好ましくは少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上の相同性を有するヌクレオチド配列を含む。他の好ましい実施形態において、単離された核酸分子は配列番号2、4、6または12に示したアミノ酸配列のうちの1つをコードする。本発明の好適なデサチュラーゼ遺伝子は、本明細書に記載するデサチュラーゼ活性のうちの少なくとも1つをもつことが好ましい。

#### 【0042】

別の実施形態において、単離された核酸分子はタンパク質またはその一部をコードし、該タンパク質またはその一部は、配列番号2、4、6もしくは12のアミノ酸配列に対して十分な相同性を有するアミノ酸配列を含み、かつデサチュラーゼ活性を保持するものである。好ましくは、該核酸分子によりコードされるタンパク質またはその一部は、植物の細胞膜の合成に必要とされる化合物の代謝に関与するか、または細胞膜を介した分子の輸送に関与する能力を保持する。一つの実施形態において、該核酸分子によりコードされるタンパク質は、配列番号2、4、6もしくは12のアミノ酸配列に対して少なくとも約50%、好ましくは少なくとも約60%、より好ましくは少なくとも約70%、80%または90%、最も好ましくは少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上の相同性を有する。さらに好ましい実施形態においては、該タンパク質は完全長のタンパク質であり、各部分が配列番号2、4、6もしくは12の完全なアミノ酸配列(これは配列番号1、3、5もしくは11に示したオープンリーディングフレームから誘導される)に対して本質的に相同である。

#### 【0043】

他の実施形態において、単離されたデサチュラーゼは、配列番号2、4、6もしくは12のアミノ酸配列の1つに対して少なくとも約50%の相同性を有するアミノ酸配列を含み、かつ微生物または植物細胞における脂肪酸の合成に必要とされる化合物の代謝に関与するか、またはこれらの膜を介した分子の輸送に関与することができる。脱飽和されたC<sub>18</sub>-またはC<sub>20-22</sub>-炭素鎖は少なくとも2つの位置に二重結合があると理解すべきである。

#### 【0044】

別の好ましい実施形態において、単離された核酸分子は、海洋性珪藻(*Phaeodactylum tricorutum*)UTEX646に由来するものであり、配列番号2、4、6もしくは12のアミノ酸配列に対して少なくとも約50%またはそれ以上の相同性を有し、かつ植物の細胞膜の合成に必要とされる化合物の代謝またはこれらの膜を介した分子の輸送に関与する能力を保持するか、あるいはGLA、ALA、ジホモ- -リノレン酸、ARA、EPA、DHAなどのPUFAまたはそれ

10

20

30

40

50

らの前駆体分子をもたらず脱飽和活性の少なくとも1つを有する、生物学的に活性なドメインを含むタンパク質（例えば、デサチュラーゼ融合タンパク質）をコードする。該核酸分子は異種ポリペプチドまたは調節タンパク質をコードする異種核酸配列を含んでいてもよい。

【0045】

別の実施形態において、単離されたデサチュラーゼは、例えば、ストリンジェント条件下で、配列番号1、3、5もしくは11のヌクレオチド配列とハイブリダイズするヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列を含むか、あるいはそれに対して少なくとも約50%、好ましくは少なくとも約60%、より好ましくは少なくとも約70%、80%または90%、最も好ましくは少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上の相同性を有するヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列を含む。また同様に、好ましいデサチュラーゼの形態は本明細書に記載するデサチュラーゼ活性の1つをもつことが好適である。

10

【0046】

別の実施形態において、単離された核酸分子は、長さが少なくとも15、25、50、100、250またはそれ以上のヌクレオチドであって、ストリンジェント条件下で配列番号1、3、5もしくは11のヌクレオチド配列からなる核酸分子とハイブリダイズするものである。単離された核酸分子は、好ましくは、天然に存在する核酸分子に相当する。より好ましくは、単離された核酸分子は、天然に存在するフェオダクチルム属（*Phaeodactylum*）のデサチュラーゼまたはその生物学的に活性な部分をコードする。

20

【0047】

本発明のさらなる実施形態は、配列番号1、3、5または11に示す本発明の核酸の各種生物（例えば、細菌、真菌、酵母、繊毛虫、藻類、または動物もしくは植物細胞のような微生物、あるいは動物または植物）における発現を可能にする発現カセットである。

【0048】

本発明の発現カセット（＝核酸構築物または断片）は、コード配列の宿主細胞における発現を支配する（遺伝子発現を有利に高めるための）1以上の調節シグナルに機能的に連結された、遺伝暗号の結果である配列番号1、3、5もしくは11に示す配列および/またはその機能的もしくは非機能的誘導体を意味する、と理解すべきである。こうした調節配列は遺伝子およびタンパク質の標的発現を可能にすることが意図される。宿主生物に応じて、このことは、例えば、遺伝子が最初に誘導され、その後のみ発現および/または過剰発現されること、あるいは遺伝子が直ちに発現および/または過剰発現されること、を意味する。例えば、これらの調節配列は、インデューサーまたはリプレッサーと結合することにより核酸の発現を調節する配列である。こうした新規の調節配列に加えて、またはこれらの配列の代わりに、実際の構造遺伝子の前にある調節配列の天然の調節がなお存在してもよく、適宜に、その天然の調節を取り除くように遺伝的に改変しておいて、遺伝子発現を増加させてもよい。しかし、遺伝子構築物はより単純な構成のものであってもよく、すなわち、核酸配列またはその誘導体の前に追加の調節配列が一切挿入されず、天然のプロモーターがその調節と共に除去されていなくてもよい。むしろ、天然の調節配列は、調節がもはや起こらないように、かつ/または遺伝子発現が増加するように突然変異させる。これらの改変されたプロモーターは、活性を高めるために、部分-配列（＝本発明の核酸配列の一部を有するプロモーター）の形で、または単独で、天然の遺伝子の前に挿入することができる。さらに、遺伝子構築物は有利には、プロモーターに機能的に連結された、エンハンサー配列として知られる配列を1以上含むことができ、これらは核酸配列の増大した発現を可能にする。追加の有利な配列（例えば、別の調節エレメントやターミネーター）をDNA配列の3'末端に挿入してもよい。5デサチュラーゼ/6デサチュラーゼおよび/または12デサチュラーゼ遺伝子は発現カセット（＝遺伝子構築物）中に1以上のコピー数で存在する。

30

40

【0049】

上述したように、調節配列または因子は、導入した遺伝子の発現にポジティブな効果を

50

及ぼして、その発現を増大させることが好ましい。こうして、調節エレメントの増強は有利には、プロモーターおよび/またはエンハンサーのような強力な転写シグナルを用いることにより、転写レベルで行われる。しかし、増強された翻訳もさらに可能であり、例えば、それはmRNAの安定性を改良することによる。

#### 【0050】

本発明のさらなる態様は、少なくとも1つの本発明による核酸分子を含むベクター（例えば、組換え発現ベクター）、ならびに、これらのベクターが導入されている宿主細胞、特に、微生物、植物細胞、植物組織、植物器官、または完全な植物体に関する。一つの実施形態において、そのような宿主細胞はファインケミカル化合物（特に、PUFA）を蓄えることができ、所望の化合物を単離するために該細胞が回収される。その後、化合物（油、脂質、トリアシルグリセリド、脂肪酸）またはデサチュラーゼが、培地からまたは宿主細胞（植物の場合には、ファインケミカルを含有または貯蔵する細胞、最も好ましくは、種皮、塊茎などの貯蔵組織の細胞、表皮細胞および種子細胞）から単離され得る。

10

#### 【0051】

本発明のさらに別の態様は、遺伝的に改変されたトランスジェニック植物、好ましくはデサチュラーゼ遺伝子が導入されている上記の油脂作物、特に好ましくはアブラナまたはアマニ植物に関する。一つの実施形態においては、アブラナまたはアマニのゲノムが、野生型または変異型デサチュラーゼ配列をコードする本発明の核酸分子をトランスジーンとして導入することにより、改変されている。別の実施形態においては、ドナー生物としてのフェオダクチルム属(*Phaeodactylum*)のゲノム中の内在性デサチュラーゼ遺伝子が、DNA配列を用いた突然変異誘発および検出により機能的に破壊されているか、またはアンチセンス技術を用いて抑制されている。好ましい実施形態においては、アブラナまたはアマニを使って、脂質または脂肪酸（PUFAが特に好適である）のような所望の化合物を生産する。

20

#### 【0052】

さらに別の好ましい実施形態においては、コケであるヒメツリガネゴケ(*Physcomitrella patens*)が本発明に記載の核酸に基づく相同的組換えを用いてデサチュラーゼの機能を実証するために使用される。

#### 【0053】

本発明のさらに別の態様は、単離されたデサチュラーゼ遺伝子またはその一部（例えば、生物学的に活性な部分）に関する。好ましい実施形態では、単離されたデサチュラーゼまたはその一部は、微生物もしくは植物細胞の細胞膜の合成に必要とされる化合物の代謝または細胞膜を介した分子の輸送に関与し得るものである。別の好ましい実施形態では、単離されたデサチュラーゼまたはその一部は、配列番号2、4、6もしくは12のアミノ酸配列に対して十分な相同性を有し、かつ、微生物もしくは植物細胞の細胞膜の合成に必要とされる化合物の代謝または細胞膜を介した分子の輸送に関与する能力を保持するものである。

30

#### 【0054】

本発明はまた、粗製抽出物の形のまたは純粋なタンパク質としてのデサチュラーゼの単離された調製物を提供する。デサチュラーゼポリペプチドまたはその生物学的に活性な部分は、デサチュラーゼ以外の酵素活性（例えば、エロンガーゼ、アシルトランスフェラーゼ、または他の活性）を有する別のポリペプチドと機能的に連結させて融合タンパク質を形成させることができる。この融合タンパク質はデサチュラーゼ単独の活性とは異なる活性をもつことが有利である。他の好ましい実施形態では、この融合タンパク質は、微生物もしくは植物における脂質と脂肪酸、補因子と酵素の合成に必要とされる化合物の代謝、または細胞膜を介した分子の輸送に関与する。特に好ましくは、宿主細胞へのこの融合タンパク質の導入が該細胞による所望の化合物の生産をモジュレートする。好ましい実施形態では、こうした融合タンパク質はまた、4-、5-、6-、8-、15-、17-、または19-デサチュラーゼ活性を単独でまたは組合せで含む。好ましい実施形態は、特に、配列番号7もしくは9、またはその一部、誘導体もしくは相同体の中から選択される遺伝

40

50

子の組合せである。特に好適なものは、配列番号13、14、15、16および17に規定される多重発現カセットに挿入された、配列番号1、3、5または11に示すような完全なタンパク質活性を含み、植物の形質転換および植物内での発現に適する遺伝子の組合せである。

【発明を実施するための最良の形態】

【0055】

本発明は、デサチュラーゼ活性をもつポリペプチドをコードする単離された核酸配列に関し、かかる配列は、

a) 配列番号1、配列番号3、配列番号5、または配列番号11に示す配列を有する核酸配列；

b) 遺伝暗号の縮重のため、配列番号2、配列番号4、配列番号6、または配列番号12に示すアミノ酸配列を逆翻訳することによって得られる核酸配列；

c) 配列番号2、配列番号4、配列番号6、または配列番号12に示すアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードし、かつ該ポリペプチドの酵素作用を実質的に低減させることなくアミノ酸レベルで少なくとも50%の相同性を有する、配列番号1、配列番号3、配列番号5、または配列番号11に示す核酸配列の誘導体；

からなる群より選択される。

【0056】

本発明はさらに、上記の1以上の核酸配列によりコードされる1以上のアミノ酸配列に関する。特定すると、本発明は、配列番号1、配列番号3、配列番号5、または配列番号11に示す配列によりコードされるアミノ酸配列に関する。

【0057】

本発明は、コケであるヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*) における脂質と脂肪酸、PUFA補因子と酵素の代謝、あるいは、膜を介した親油性化合物の輸送に参与するデサチュラーゼ活性を有する核酸およびタンパク質分子を提供する。本発明に従う化合物は、生物、例えば、繊毛虫、真菌、酵母、細菌、藻類などの微生物、および/またはトウモロコシ、コムギ、ライムギ、オートムギ、ライコムギ、イネ、オオムギ、ダイズ、落花生、ワタ、アブラナ、キャノーラおよびカブのようなアブラナ属の種、コショウ、ヒマワリ、ルリヂサ、マツヨイグサおよびマンジュギク、ジャガイモ、タバコ、ナスおよびトマトのようなナス科の植物、ソラマメ属の種、エンドウ、タピオカ、ムラサキウマゴヤシ、低木植物（コーヒー、カカオ、チャ）、ヤナギ属の種、樹木（ギネアアブラヤシ、ココナツ）ならびに、多年生草および飼料穀物などの植物からのファインケミカルの生産を直接修飾する（例えば、脂肪酸生合成タンパク質の過剰発現または最適化が、改変された生物からの脂肪酸の収率、生産および/または生産効率に直接影響を及ぼす場合）か、あるいは、間接的に影響を及ぼすこともでき、間接的影響によっても、所望の化合物の収率、生産および/または生産効率を高めたり、不要な化合物を減少させたりすることができる（例えば、脂質と脂肪酸、補因子と酵素の代謝のモジュレーションによって、細胞内の所望化合物の収率、生産および/または生産効率を改変するか、もしくはその組成を改変して、これにより、1種以上のファインケミカルの生産に影響を与える場合）。以下に本発明の態様について、さらに詳しく説明する。

【0058】

I. ファインケミカルおよびPUFA

「ファインケミカル」という用語は、当技術分野で公知であり、生物によって生産された分子であって、例えば、限定するものではないが、製薬産業、農産業、食品および化粧品産業などの様々な産業界で用いられている分子を包含する。これらの化合物は、脂質、脂肪酸、補因子および酵素など（例えば、*Biotechnology* 第6巻、Rehmら編：VCH Weinheim中のKuninaka, A. (1996) *Nucleotides and related compounds*, pp. 561-612およびそこに引用された参考文献に記載されている）、脂質、飽和および不飽和脂肪酸（例えば、アラキドン酸）、ビタミンおよび補因子（Ullmann's *Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Vol. A27, *Vitamins*, pp. 443-613 (1996) : VCH Weinheimおよびそこに引用された参考文献；ならびに、Ong, A.S., Niki, E., & Packer, L. (1995) *Nutrition, Lipids*

10

20

30

40

50

, Health and Disease Proceedings of the UNESCO/Confederation of Scientific and Technological Associations in Malaysia and the Society for Free Radical Research - Asia, 1994年9月1～3日、マレーシア、ペナンで開催、AOCS Press (1995)、ならびに、Gutcho (1983)により、Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation, ISBN: 0818805086およびそこに引用された参照文献に記載された酵素およびその他のあらゆる化学物質を包含する。特定のファインケミカルの代謝および使用について、以下にさらに詳しく説明する。

【0059】

各種前駆体分子と生合成酵素との組合せにより、膜組成に決定的な影響を与える様々な脂肪酸分子が生産される。PUFAは、トリアシルグリセロールだけではなく、膜脂質にも組み込まれると想定することができる。

10

【0060】

膜合成は、二分子膜の一部としての脂質を含めて、多数の構成要素が関与している十分に特徴づけされたプロセスである。従って、PUFAのような新規の脂肪酸の生産により、細胞または生物内に膜機能の新たな特性を生み出すことができる。

【0061】

細胞膜は、細胞において非常に多くの機能を果たしている。最も重要なのは、膜が、環境から細胞の内容物の境界を定め、これによって、細胞に一体性を賦与することである。膜はまた、有害または不要な化合物の流入に対する、あるいは、所望の化合物の流出に対する障壁としての役割も果たしている。

20

【0062】

膜の関与、および関連する機構についてさらに詳しくは、下記を参照にされたい：Bamberg, E.ら (1993) Charge transport of ion pumps on lipid bilayer membranes, *Q. Rev. Biophys.* 26:1-25; Gennis, R.B. (1989) Pores, Channels and Transporters, in: *Biomembranes, Molecular Structure and Function*, Springer: Heidelberg, pp. 270-322; およびNikaido, H.およびSaier, H. (1992) Transport proteins in bacteria: common themes in their design, *Science* 258:936-942、ならびに、これら参照文献に含まれる引用文献。

【0063】

脂質合成は、2つの部分、すなわち、脂肪酸の合成およびそれらのsn-グリセロール-3-リン酸への結合と、極性ヘッド基 (head group) の付加または修飾とに分けることができる。膜に用いられる通常の脂質としては、リン脂質、糖脂質、スフィンゴ質およびホスホグリセリドが挙げられる。脂肪酸合成は、アセチル-CoAの、アセチル-CoAカルボキシラーゼによるマロニル-CoAへの変換、もしくはアセチルトランスアシルラーゼによるアセチル-ACPへの変換のいずれかで開始する。縮合反応の後、これら2つの生成物分子が一緒になって、アセトアセチル-ACPを形成し、これを縮合、還元および脱水の連続的反応により変換することによって、所望の鎖長を有する飽和脂肪酸分子が得られる。これら分子からの不飽和脂肪酸の生産は、分子状酸素を用いて好氣的に、あるいは、嫌氣的に、のいずれかで、特定のデサチュラーゼにより触媒される (微生物における脂肪酸合成については、F. C. Neidhardtら (1996) *E. coli and Salmonella*. ASM Press: Washington, D.C., pp. 612-636、およびそこに含まれる参照文献; Lengelerら (編) (1999) *Biology of Prokaryotes*. Thieme: Stuttgart, New York、およびそこに含まれる参照文献、ならびに、Magnuson, K.ら (1993) *Microbiological Reviews* 57:522-542、およびそこに含まれる文献を参照されたい)。

30

40

【0064】

PUFA生合成用の前駆体の例として、オレイン酸、リノール酸およびリノレン酸がある。これらのC<sub>18</sub>-炭素脂肪酸は、エイコサ鎖およびドコサ鎖タイプの脂肪酸を得るために、C<sub>20</sub>またはC<sub>22</sub>まで伸長させなければならない。12-デサチュラーゼ、15-デサチュラーゼ、6-デサチュラーゼ、5-および4-デサチュラーゼ活性を有する酵素などの様々なデサチュラーゼは、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸およびドコサヘキサエン酸、なら

50

びに、その他の各種長鎖PUFAへと導くことができ、これらは、抽出した後、食物および飼料、化粧品または医薬品用途の多様な目的に用いることができる。

【 0 0 6 5 】

長鎖PUFAを生産するためには、高度不飽和 $C_{18}$ -または $C_{20}$ -脂肪酸を前述のようにポリ脱飽和させなければならない。本発明に従う核酸配列は、トリアシルグリセロール画分にPUFAを含む微生物である海洋性珪藻(*Phaeodactylum tricorutum*)に由来する機能的に活性なデサチュラーゼを初めてコードするものである。本発明のデサチュラーゼを用いると、二重結合を 5、 6または 12の位置に導入することができる。本発明のデサチュラーゼの活性は、好ましくは、脂肪酸分子中に少なくとも2個、3個、4個または5個の二重結合がある $C_{18}$ -または $C_{20}$ -脂肪酸をもたらし、より好ましくは、脂肪酸分子中に3個、4個または5個の二重結合がある $C_{20}$ -脂肪酸をもたらし、脱飽和は対象の脂肪酸を伸長させる前または後に行うことができる。したがって、デサチュラーゼ活性の産物および実施しうる更なる脱飽和と伸長の産物は、 $C_{20}$ -から $C_{22}$ -脂肪酸の、リノール酸、ドコサジエン酸、ジホモ- -リノレン酸、アラキドン酸、 6-エイコサトリエンジホモ- -リノレン酸、エイコサペンタエン酸、 3-エイコサトリエン酸、 3-エイコサテトラエン酸、ドコサペンタエン酸、またはドコサヘキサエン酸などの脂肪酸へのさらなる伸長を含めて、より高度に脱飽和された好適なPUFA類をもたらし、本発明に従うこの酵素の基質の例として、タキソール酸、6,9-オクタデカジエン酸、オレイン酸、リノール酸、 -リノレン酸、リノレン酸、ピノレン酸、 -リノレン酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸またはステアリドン酸が挙げられる。好ましい基質として、リノール酸、 -リノレン酸および/または -リノレン酸、ジホモ- -リノレン酸もしくはアラキドン酸、エイコサテトラエン酸またはエイコサペンタエン酸が挙げられる。脂肪酸中に少なくとも2個の二重結合がある $C_{18}$ -または $C_{20}$ -脂肪酸は、本発明に従う酵素活性により、遊離脂肪酸の形で、あるいは、リン脂質、糖脂質、スフィンゴ脂質、ホスホグリセリド、モノアシルグリセロール、ジアシルグリセロールまたはトリアシルグリセロールなどのエステルで伸長させることができる。

【 0 0 6 6 】

さらに、脂肪酸は、様々な修飾の場所に輸送された後、トリアシルグリセロール貯蔵脂質に組み込まねばならない。脂質合成におけるもう1つの重要な段階は、例えば、グリセロール脂肪酸アシルトランスフェラーゼによる、極性ヘッド基への脂肪酸の転移である (Frentzen, 1998, *Lipid*, 100 (4-5):161-166を参照)。

【 0 0 6 7 】

植物の脂肪酸生合成、脱飽和、脂質代謝および脂肪化合物の膜輸送、 酸化、脂肪酸の修飾および補因子、トリアシルグリセロール貯蔵およびアセンブリに関する出版物(そこで引用される文献も含む)については、次の論文を参照されたい: Kinney, 1997, *Genetic Engineering*, JK Setlow編, 19:149-166; OhlroggeおよびBrowse, 1995, *Plant Cell* 7:957-970; ShanklinおよびCahoon, 1998, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49:611-641; Voelker, 1996, *Genetic Engineering*, JK Setlow編, 18:111-13; Gerhardt, 1992, *Prog. Lipid R.* 31:397-417; Guhnemann-Schafer & Kindl. 1995, *Biochim. Biophys Acta* 1256:181-186; Kunauら、1995、*Prog. Lipid Res.* 34:267-342; Stymneら、1993, *Biochemistry and Molecular Biology of Membrane and Storage Lipids of Plants*, MurataおよびSuomerville編, Rockville, American Society of Plant Physiologists, 150-158, Murphy & Ross 1998, *Plant Journal.* 13(1):1-16。

【 0 0 6 8 】

ビタミンや、補因子および機能性食品(例えばPUFA)は、細菌などの高等動物以外の生物により容易に合成される分子群であるが、高等動物はもはや合成することができないため、摂取しなければならない分子群、あるいは、高等動物がそれ自身で十分な程度までもはや合成することができないため、補助的に摂取しなければならない分子群を包含する。これら分子を生産することができる生物(例えば、細菌など)における上記分子の生合成については、多かれ少なかれ特性づけられている (Ullmann's Encyclopedia of Industr

10

20

30

40

50

ial Chemistry, "Vitamins", Vol. A27, pp. 443-613, VCH Weinheim, 1996; Michal, G. (1999) Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology, John Wiley & Sons; Ong, A.S., Niki, E., & Packer, L. (1995) "Nutrition, Lipids, Health and Disease" Proceedings of UNESCO/Confederation of Scientific and Technological Associations in Malaysia and the Society for Free Radical Research Asia, 1994年9月1～3日に、マレーシア、ペナンで開催、AOCS Press, Champaign, IL X, 374 pp.)。

#### 【0069】

前記分子は、それ自体が生物活性分子であるか、あるいは、電子担体としてまたは多数の代謝経路における中間体のいずれかとして作用する生物活性物質の前駆体である。上記化合物は、その栄養的価値以外にも、着色剤、酸化防止剤および触媒もしくはその他の処理加工用補助剤として重要な産業上の価値を有する(上記化合物の構造、活性および産業用途についての詳細は、例えば、Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, "Vitamins", Vol. A27, pp. 443-613, VCH Weinheim, 1996を参照のこと)。高度不飽和脂肪酸は、例えば、冠動脈性心疾患、炎症機構、小児の栄養などの場合に、様々な機能および健康促進効果を有する。出版物および参考文献(そこに引用されている文献を含む)については、下記を参照されたい: Simopoulos, 1999, Am. J. Clin. Nutr. 70 (3rd Suppl.):560-569, Takahataら、Biosci. Biotechnol. Biochem, 1998, 62 (11):2079-2085, WillichおよびWinther, 1995, Deutsche Medizinische Wochenschrift 120 (7):229  
以下参照。

#### 【0070】

### II. 本発明のエレメントおよび方法

本発明は、とりわけ、本明細書でデサチュラーゼ核酸およびデサチュラーゼタンパク質分子と称する新規分子の発見に基づくものであり、該分子は、海洋性珪藻(Phaeodactylum tricornutum)における細胞膜および脂質の生産に影響を及ぼし、例えば、これらの膜を介した分子の移動に影響を与える。一実施形態では、デサチュラーゼ分子は、微生物および植物などの生物における細胞膜の合成に必要とされる化合物の代謝に関与したり、あるいは、これら膜を介した分子の輸送に間接的に影響したりする。好ましい実施形態では、膜成分の生産および膜輸送を調節する、本発明に従うデサチュラーゼ分子の活性は、この生物による所望のファインケミカルの生産に影響を与える。特に好ましい実施形態では、本発明に従うデサチュラーゼ分子の活性をモジュレートすることにより、本発明のデサチュラーゼを調節する微生物または植物の代謝経路の収率、生産高および/または生産効率がモジュレートされ、膜を介した化合物の輸送効率が改変され、これによって、微生物および植物による所望のファインケミカルの収率、生産高および/または生産効率を直接的または間接的のいずれかでモジュレートするようにする。

#### 【0071】

「デサチュラーゼ」または「デサチュラーゼポリペプチド」という用語は、脂肪酸の脱飽和に関与するタンパク質を意味する。デサチュラーゼの例として、配列番号1、3、5、もしくは11に示したもの、あるいは、その相同体、誘導体もしくは類似体が挙げられる。「デサチュラーゼ」または「デサチュラーゼ核酸配列」という用語は、デサチュラーゼをコードする核酸配列を意味し、その一部は、コード領域と、さらに対応する5'-および3'-非翻訳配列領域であってもよい。デサチュラーゼ遺伝子の例として、配列番号1、3、5または11に示した配列が挙げられる。生産および生産高という用語は、当業者には公知であり、所定期間内に、所定発酵容量において形成される発酵産物(例えば、所望のファインケミカル)の濃度(例えば、産物のkg/時/リットル)を包含する。生産効率という用語は、特定の生産量を達成するのに要する時間(例えば、細胞が、ファインケミカルの特定の処理量を確立するのに要する時間)を意味する。収率または生成物/炭素収率という用語は、当業者には公知であり、炭素源が生成物(すなわち、ファインケミカル)に変換される効率を意味する。これは、通常、炭素源1kg当たりの生成物のkg数として表される。化合物の収率または生産高が増加すると、得られる分子(すなわち、一定期間にわ

10

20

30

40

50

たる特定量の培養物中に得られる上記化合物の好適な分子)の量が増加する。生合成または生合成経路という用語は、当業者には公知であり、例えば、強力な調節を受ける多段階工程における、中間体からの細胞による化合物(好ましくは、有機化合物)の合成を意味する。異化作用もしくは異化作用経路という用語は、当業者には公知であり、例えば、強力な調節を受ける多段階工程における、細胞による化合物(好ましくは、有機化合物)の異化代謝産物(一般には、比較的小さい複雑な分子)への開裂を意味する。代謝という用語は、当業者には公知であり、生物において起こる生化学反応のすべてを包含する。特定の化合物の代謝(例えば、脂肪酸の代謝)は、従って、この化合物に関係する、細胞内での該化合物の生合成、修飾および異化経路のすべてを包含する。

【0072】

別の実施形態では、デサチュラーゼ分子をコードする本発明の核酸配列は、微生物または植物におけるファインケミカルのような所望の分子の生産をモジュレートすることができる。本発明に従う配列の修飾が、この修飾タンパク質を含む微生物株または植物株からのファインケミカルの収率、生産高および/または生産効率に直接影響を与えうる、一連の作用機構が存在する。細胞内で、または細胞からの、ファインケミカル分子の輸送に関与するデサチュラーゼの数または活性を増加させることにより、膜を介して輸送される上記化合物の量を増加させ、これから、該化合物を容易に取得して、相互に変換することができる。さらに、脂肪酸、トリアシルグリセロールおよび/または脂質は、それ自体が望ましいファインケミカルであり、これら化合物の生合成に関与する本発明の1種以上のデサチュラーゼの活性を最適化するか、もしくはその数を増加するか、あるいは、上記化合物の異化作用に関与する1種以上のデサチュラーゼの活性を妨害することにより、微生物または植物などの生物からの脂肪酸分子および脂質分子の収率、生産高および/または生産効率を高めることができる。

【0073】

本発明に従う核酸配列の突然変異誘発によって、活性が改変されたデサチュラーゼを生じさせることができ、この改変された活性は、微生物または植物からの1種以上の所望のファインケミカルの生産に間接的な影響を与える。例えば、廃棄物の輸送に関与する本発明のデサチュラーゼは、これまでより多くのまたは高い活性を示すことができるため、細胞の正常代謝廃棄物(その量は、所望のファインケミカルの過剰生産のため増加する恐れがある)が、細胞内の分子を損なう(これにより、細胞の生存能力が低下する)前に、あるいは、ファインケミカルの生合成経路を妨害する(これにより、所望のファインケミカルの収率、生産高または生産効率を低下させる)前に、該廃棄物を効率的に輸送することができる。所望のファインケミカル自体の細胞内量が比較的多い場合には、細胞にさらに有毒となる恐れがあるため、上記化合物を細胞から送り出すことができる輸送体の活性または数を増加させることによって、培養物中の細胞の生存能力を高め、ひいては、所望のファインケミカルを生産する培養物中の細胞数を増加させることが可能である。また、本発明のデサチュラーゼは、対応する量の様々な脂質分子および脂肪酸分子が生産されるような方法で、操作することも可能である。これは細胞膜の脂質濃度に大きな影響を与えることがある。脂質は、種類によって、異なる物理的特性を有することから、膜の脂質組成の改変により、膜の流動性を有意に改変することができる。膜流動性の改変は、膜を介した分子の輸送および細胞の完全性に影響を与えることができ、それらの各々が、大規模発酵培養における微生物および植物からのファインケミカルの生産に実質的な影響を及ぼす。植物の膜は、高温および低温、塩分、渇水に対する耐性、ならびに、細菌や真菌のような病原体に対する耐性などの特定の特性を賦与する。従って、膜成分のモジュレーションは、植物が、前述のストレスパラメーターの下で生存する能力に決定的な影響を与え得る。これは、シグナルカスケードの変化を介して、または、改変された膜組成(例えば、Chapman, 1998, Trends in Plant Science, 3(11):419-426を参照)とシグナルカスケード(Wang 1999, Plant Physiology, 120:645-651を参照)を介して直接起こるか、あるいは、WO 95/18222に開示されているように、低温の耐性に影響を与え得る。

【0074】

本発明の単離された核酸配列は、例えば、テキサス大学 (Austin) の藻類コレクションから入手可能な海洋性珪藻 (*Phaeodactylum tricorutum*) UTEX646株のゲノムに存在する。

【0075】

海洋性珪藻 (*Phaeodactylum tricorutum*) cDNAのヌクレオチド配列ならびにデサチュラーゼの推定アミノ酸配列を配列番号1～6および11および12に示す。コンピュータ解析を実施することにより、これらのヌクレオチド配列を、細胞膜成分の代謝に關与するタンパク質をコードする配列、または細胞膜を介した化合物の輸送もしくはPUFA生合成に關与する配列として分類および/または同定した。本発明者らによるデータベースの入力番号 PT001070010RおよびPT001078032Rを有するESTは、配列番号1および3に示した本発明の配列を構成する。EST PT001070010Rの断片の配列が決定され、配列番号5に示される。同様に、クローン PT001078032Rの配列が配列番号1に示される。このクローンには遺伝子名を割り当てた。略語：Pp = ヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*)、Pt = 海洋性珪藻 (*Phaeodactylum tricorutum*)。配列番号5のPT001070010Rは 12-デサチュラーゼに相同な新規遺伝子をコードし、また、PT001078032Rは新規 5-デサチュラーゼをコードする。Pt\_des6は、実施例5aに従って、縮重オリゴヌクレオチドを用いるポリメラーゼ連鎖反応により単離することができる。この方法で得られた断片を単離して海洋性珪藻 (*Phaeodactylum tricorutum*) cDNAライブラリーをスクリーニングし、海洋性珪藻 (*Phaeodactylum tricorutum*) 6-デサチュラーゼのコード領域を得ることができる。こうして単離された遺伝子は、表1においてPt\_des6と命名されており、配列番号3に示される。対応するアミノ酸配列は配列番号1、3および5の遺伝暗号を翻訳することにより得られ、配列番号2、4および6に示される (表1も参照のこと)。12-デサチュラーゼをコードする別の核酸配列も表1に見出せる。これはクローン名 PT001072031Rを有する。

【表1】

表1

	遺伝子名	クローン名	核酸配列番号	ポリペプチド配列番号
Δ5-デサチュラーゼ	Pt_des5	PT001078032R	1	2
Δ6-デサチュラーゼ	Pt_des6	Pt_des6	3	4
Δ12-デサチュラーゼ	Pt_des12	PT001070010R	5	6
Δ6-デサチュラーゼ	Pp_des6	Pp_des6	7	8
Δ6-エロンガーゼ	Pp_PSE1	PP001019019F	9	10
Δ12-デサチュラーゼ	Pt_des12.2	PT001072013R	11	12

【0076】

本発明はまた、配列番号2、4、6または12のアミノ酸配列と本質的に相同のアミノ酸配列を有するタンパク質に關する。本明細書で用いる場合、所定のアミノ酸配列と本質的に相同のアミノ酸配列を有するタンパク質は、所定のアミノ酸配列 (例えば、所定の完全なアミノ酸配列) と少なくとも約50%の相同性を有する。また、所定のアミノ酸配列と本質的に相同のアミノ酸配列を有するタンパク質は、所定のアミノ酸配列と少なくとも約50～60%の相同性、好ましくは、少なくとも約60～70%の相同性、さらに好ましくは、少なくとも約70～80%、80～90%または90～95%、最も好ましくは、少なくとも約96%、97%、98%、99%またはそれ以上の相同性を有するものでよい。

【0077】

本発明のデサチュラーゼ、またはそれらの生物学的に活性な部分もしくは断片は、微生物における膜または貯蔵脂質の合成に必要とされる脂質の代謝に關与しており、また、他の遺伝子 (特に、エロンガーゼ活性をもつもの) と共に、C<sub>18</sub>-またはC<sub>20-22</sub>-PUFAの伸長に必要な活性に寄与しているため、C<sub>18</sub>-、C<sub>20</sub>-、C<sub>22</sub>-またはC<sub>24</sub>-PUFAおよび近縁のPUFAが得られる。これに關連して、本発明のデサチュラーゼは本発明による発現カセット中にエロンガーゼや他のデサチュラーゼと共にクローニングすることができ、これはアグロバクテリウム (*Agrobacterium*) を用いた植物の形質転換に用いることができる。

## 【0078】

本発明の様々な実施形態について以下の項でさらに詳しく説明する。

## 【0079】

## A. 単離された核酸分子

本発明の一実施形態は、PUFA産生微生物から誘導され、脂肪酸中に少なくとも1、2、3または4個の二重結合があるC<sub>18</sub>-またはC<sub>20-22</sub>-脂肪酸を脱飽和する、ポリペプチドをコードする単離された核酸を含んでなる。

## 【0080】

本発明のさらに別の実施形態は、脂肪酸中に少なくとも1、2、3または4個の二重結合があるC<sub>18</sub>-またはC<sub>20</sub>-脂肪酸を脱飽和するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を包含し、

- a) 配列番号1、配列番号3、配列番号5、または配列番号11に示した配列を含む核酸配列、
  - b) 遺伝子コードの縮重に従って、配列番号2、配列番号4、配列番号6または配列番号12に示したアミノ酸配列を逆翻訳することにより得られる核酸配列、または、
  - c) 配列番号2、配列番号4、配列番号6または配列番号12に示したアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする配列番号1、配列番号3、配列番号5または配列番号11に示した核酸配列の誘導体であって、該ポリペプチドの酵素作用を実質的に低下させることなく、アミノ酸レベルで少なくとも50%の相同性を有する該誘導体、
- からなる群より選択される、単離された核酸である。

## 【0081】

本発明に従う前記核酸は、PUFAを合成することができる繊毛虫、真菌、藻類または渦(双)鞭毛虫のような生物、好ましくは、海洋性珪藻フエオダクチルム・トリコルヌーツム(Phaeodactylum tricornutum)、あるいは近縁の生物から誘導される。

## 【0082】

本発明の一実施形態は、デサチュラーゼポリペプチドもしくはその生物学的に活性の部分をコードする単離された核酸分子、ならびに、デサチュラーゼコード核酸(例えば、デサチュラーゼDNA)を同定または増幅するハイブリダイゼーションプローブまたはプライマーとして使用するのに十分な核酸断片に関連する。本明細書で用いられる用語「核酸分子」は、DNA分子(例えば、cDNAまたはゲノムDNA)およびRNA分子(例えば、mRNA)、ならびに、ヌクレオチド類似体により作製されるDNAまたはRNA類似体を包含するものとする。この用語はさらに、コード遺伝子領域の3'および5'末端での非翻訳配列、すなわち、コード領域の5'末端の上流にある少なくとも500、好ましくは200、特に好ましくは100ヌクレオチドの配列と、コード遺伝子領域の3'末端の下流にある少なくとも100、好ましくは50、特に好ましくは20ヌクレオチドの配列とを包含する。核酸分子は、一本鎖または二本鎖のいずれでもよいが、好ましくは、二本鎖DNAである。「単離された」核酸分子とは、天然の核酸源に存在するその他の核酸分子から分離されたものである。「単離された」核酸分子は、好ましくは、この核酸が誘導される生物のゲノムDNA内で、該核酸と本来隣接する配列(例えば、該核酸の5'および3'末端に位置する配列)を一切持っていない。様々な実施形態では、単離されたデサチュラーゼ核酸分子は、例えば、核酸が誘導される細胞(例えば、ヒメツリガネゴケ細胞)のゲノムDNA内で本来隣接する、例えば、約5 kb、4 kb、3 kb、2 kb、1 kb、0.5 kbまたは0.1 kbより小さいヌクレオチド配列を含んでいてもよい。CDNA分子のような「単離された」核酸分子は、それが、組換え法により产生された場合には、他の細胞材料もしくは培地をほとんど含まないか、あるいは、それが化学的に合成されたものであれば、化学的前駆体もしくはその他の化学物質を含まないと考えられる。

## 【0083】

本発明に従う核酸分子、例えば、配列番号1もしくはその部分のヌクレオチド配列を含む核酸配列は、分子生物学の標準的技法、ならびに、本明細書に記載する配列情報を用いて、単離することができる。また、例えば、相同配列、または相同的な保存配列領域も、

アラインメントアルゴリズムを用いてDNAもしくはアミノ酸レベルで同定することができる。例えば、フェオダクチルム・トリコルヌーツム (*Phaeodactylum tricorutum*) cDNA は、完全な配列番号 1、3、5 または 11 もしくはそれらの一部分をハイブリダイゼーションプローブとして用い、標準的ハイブリダイゼーション技法 (例えば、Sambrookら、*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 第 2 版、Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989 に記載されているものなど) により、フェオダクチルム・トリコルヌーツム (*Phaeodactylum tricorutum*) ライブラリーから単離することができる。さらに、配列番号 1、3、5 または 11 の完全配列もしくはそれらの一部分を包含する核酸分子は、ポリメラーゼ連鎖反応により単離することができ、その際、この配列またはその一部分、特に、実施例 5 a のモチーフ周辺の領域、もしくは個々の既定アミノ酸中の同一物の修飾体に基づき作製したオリゴヌクレオチドプライマーを用いる (例えば、配列番号: 1、3、5 または 11 の完全配列もしくはそれらの一部分を包含する核酸分子は、配列番号: 1、3、5 または 11 の同じ配列に基づいて作製しておいたオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、ポリメラーゼ連鎖反応により単離することができる)。例えば、mRNA は細胞から単離することができ (例えば、Chirgwinら (1979) *Biochemistry* 18: 5294-5299 によるグアニジウムチオシアネート抽出法による)、また、cDNA は逆転写酵素 (例えば、メリーランド州ベセスダの Gibco/BRL から入手可能なモロニー-MLV 逆転写酵素、フロリダ州セントピーターズバーグの Seikagaku America, Inc. から入手可能な AMV 逆転写酵素) を用いて作製することができる。ポリメラーゼ連鎖反応を用いた増幅用の合成オリゴヌクレオチドプライマーは、配列番号 1、3、5 または 11 および図 5 a に示した配列の 1 つに基づき、あるいは、配列番号 2、4、6 または 12 に示したアミノ酸配列を用いて、作製することができる。本発明の核酸は、標準的 PCR 増幅法に従い、cDNA を用いて、あるいは、鋳型としてのゲノム DNA および適当なオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、増幅することができる。このようにして増幅した核酸は、適当なベクターにクローニングした後、DNA 配列分析により特性決定することができる。デサチュラーゼヌクレオチド配列に対応するオリゴヌクレオチドは、例えば、自動 DNA 合成装置を用いて、標準的合成方法により作製することができる。

#### 【0084】

配列番号 1、3、5 または 11 に示した cDNA は、デサチュラーゼ (すなわち、「コード領域」) をコードする配列、さらには、5' -非翻訳配列および 3' -非翻訳配列をコードする配列を包含する。この他にも、上記核酸は、配列番号 1、3、5 または 11 に示したうちの 1 配列のコード領域を包含するだけの場合もあるし、あるいは、ゲノム DNA から単離した完全なゲノム断片を含む場合もある。

#### 【0085】

さらに好ましい実施形態では、本発明に従う単離された核酸分子は、配列番号 1、3、5 または 11 に示すヌクレオチド配列のうち 1 配列の相補体である核酸分子、またはその一部分を包含する。配列番号 1、3、5 または 11 に示すヌクレオチド配列の 1 つに相補的な核酸は、それが、配列番号 1、3、5 または 11 に示した配列番号の 1 つとハイブリダイズして、安定な二本鎖を作ることができれば、十分に相補的である。

#### 【0086】

配列番号 1、3、5 または 11 の配列を有する新規デサチュラーゼ核酸配列の相同体とは、例えば、配列番号 1、3、5 または 11 に示したヌクレオチド配列の 1 つと、少なくとも約 50 ~ 60%、好ましくは少なくとも約 60 ~ 70%、さらに好ましくは少なくとも約 70 ~ 80%、約 80 ~ 90% または 90 ~ 95%、またさらに好ましくは少なくとも約 95%、96%、97%、98%、99% 以上の相同性を有する対立遺伝子変異体、あるいは、その相同体、誘導體または類似体もしくは一部分を意味する。さらに好ましい実施形態では、本発明の単離された核酸分子は、ストリンジェントな条件下で、配列番号 1、3、5 または 11 に示すヌクレオチド配列もしくはその一部分の 1 つとハイブリダイズするヌクレオチド配列を包含する。対立遺伝子変異体は、特に、配列番号 1、3、5 または 11 に示した配列からおよび/または該配列へのヌクレオチドの欠失、挿入または置換によって得ることができる機能的変異体

10

20

30

40

50

を包含するが、ここでは、合成して得られたタンパク質の酵素活性が1個以上の遺伝子の挿入のために有利に保持されることを目的とする。デサチュラーゼの酵素活性を保持するタンパク質とは、配列番号2、4、6または12によりコードされたタンパク質と比較して、本来の酵素活性の少なくとも10%、好ましくは20%、特に好ましくは30%、さらに好ましくは40%を有するタンパク質を意味する。このような活性を有するデサチュラーゼは、酵素活性が実質的に低下していないデサチュラーゼである。

また、配列番号1、3、5または11の相同体とは、例えば、コードおよび非コードDNA配列の細菌、真菌および植物の相同体、トランケート型配列、一本鎖DNAまたはRNAも意味する。

#### 【0087】

配列番号1、3、5または11の相同体はまた、例えば、プロモーター変異体のような誘導体も意味する。前記ヌクレオチド配列の上流にあるプロモーターは、1以上のヌクレオチド置換、挿入および/または欠失により修飾することができるが、その際、プロモーターの機能性または活性は妨害されない。さらに、プロモーターの活性を、その配列の改変により増加するか、あるいは、さらに活性の高いプロモーター(異種生物由来のものでよい)によってこれらのプロモーターを完全に置換することも可能である。

#### 【0088】

さらに、本発明の核酸分子は、配列番号1、3、5または11に示した1配列のコード領域の部分、例えば、プローブまたはプライマーとして用いることができる断片、またはデサチュラーゼの生物学的に活性なセグメントをコードする断片を包含する場合もある。フェオダクチルム・トリコルヌーツム(Phaeodactylum tricornutum)デサチュラーゼ遺伝子のクローニングから決定されるヌクレオチド配列によって、プローブおよびプライマーの作製が可能になり、これらは、他の細胞タイプおよび生物におけるデサチュラーゼ相同体ならびに、他の微小藻類または関連種由来のデサチュラーゼ相同体を同定および/またはクローニングするために設計される。プローブ/プライマーは、通常、本質的に精製されたオリゴヌクレオチドを包含する。オリゴヌクレオチドは、通常、配列番号1、3、5または11に示したうちの1配列のセンス鎖、あるいは、配列番号1、3、5または11の1配列のアンチセンス鎖の少なくとも約12、好ましくは約16、さらに好ましくは25、40、50または75個の連続したヌクレオチドと、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列領域、またはその相同体、誘導体および類似体、もしくはそれらの天然の突然変異体を包含する。配列番号1、3、5または11のヌクレオチド配列に基づくプライマーをPCR反応で用いることにより、デサチュラーゼ相同体をクローニングすることができる。デサチュラーゼヌクレオチド配列に基づくプローブを用いて、同一または同種タンパク質をコードする転写産物もしくはゲノム配列を検出することができる。好ましい実施形態では、上記プローブは、さらに、そこに結合した標識基、例えば、放射性同位体、蛍光化合物、酵素または酵素補因子も包含する。これらのプローブは、例えば、細胞サンプル中のデサチュラーゼコード核酸の量を測定することにより、例えば、デサチュラーゼmRNAレベルを測定することにより、デサチュラーゼを誤って発現する細胞を同定するための、あるいは、ゲノムデサチュラーゼ遺伝子が突然変異を起こしているかまたは欠失されているかを決定するための、ゲノムマーカー用の試験キットの一部として用いることができる。

#### 【0089】

一実施形態では、本発明の核酸分子は、タンパク質もしくはその一部分が微生物または植物内で細胞膜の合成に必要な化合物の代謝またはこれら膜を介した分子の輸送に与する能力を保持するのに十分な、配列番号2、4、6または12のアミノ酸配列との相同性を有するアミノ酸配列を含む上記タンパク質もしくはその一部分をコードする。本明細書で用いる用語「十分な相同性」は、そのアミノ酸配列が配列番号2のアミノ酸配列と同一であるかまたは同等である最小数のアミノ酸残基(例えば、配列番号2の配列の1つに含まれるアミノ酸残基のような、類似した側鎖を有するアミノ酸残基)を有し、これによって、微生物もしくは植物内で細胞膜の合成に必要な化合物の代謝またはこれらの膜を介した

10

20

30

40

50

分子の輸送に関与できるタンパク質またはその一部分に係する。本明細書に記載するように、膜成分のこれら代謝経路または膜輸送系のタンパク質成分は、ファインケミカルの生産および分泌に役立つことができる。これら活性の例も本明細書に記載する。従って、「デサチュラーゼの機能」は、1以上のファインケミカルの収率、生産および/または生産効率に直接的もしくは間接的に貢献している。この触媒活性のデサチュラーゼ基質特異性の例を表5および6に示す。

#### 【0090】

さらに別の実施形態では、本発明に従う核酸分子の誘導体は、配列番号2の完全アミノ酸配列と、少なくとも約50~60%、少なくとも好ましくは約60~70%、さらに好ましくは少なくとも約70~80%、80~90%、90~95%、最も好ましくは少なくとも約96%、97%、98%、99%以上の相同性を有するタンパク質をコードする。アミノ酸配列の相同性は、プログラムPileUp (J. Mol. Evolution, . 25, 351-360, 1987, Higginsら、CABIOS, 5, 1989:151-153) またはBESTFITもしくはGAP (Henikoff, S.およびHenikoff, J. G. (1922) Amino acid substitution matrices from protein blocks. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-10919) を用いて、全配列領域にわたって決定することができる。

10

#### 【0091】

本発明のデサチュラーゼ核酸分子によってコードされるタンパク質部分は、好ましくはいくつかのデサチュラーゼのうちの1つの生物学的に活性な部分である。本明細書で用いる用語「デサチュラーゼの生物学的に活性な部分」とは、微生物または植物における細胞膜の合成に必要な化合物の代謝、またはこれらの膜を介した分子の輸送に関与することができるか、あるいは表5および6に記載した活性を有する、デサチュラーゼのセグメント、例えば、ドメイン/モチーフを包含するものとする。酵素活性のアッセイを実施することにより、デサチュラーゼまたはその生物学的に活性な部分が、微生物または植物における細胞膜の合成に必要な化合物の代謝、またはこれらの膜を介した分子の輸送に関与できるか否かを決定することができる。これらのアッセイ方法は、実施例の項の実施例8で詳しく説明するが、当業者には公知である。

20

#### 【0092】

デサチュラーゼの生物学的に活性なセグメントをコードするその他の核酸断片は、配列番号1、3、5または11に示した上記配列のうち1配列の一部を単離し、デサチュラーゼまたはペプチドのコード化セグメントを発現させた(例えば、in vitroでの組換え発現による)後、デサチュラーゼまたはペプチドのコード化部分の活性を確認することにより作製することができる。

30

#### 【0093】

さらに、本発明は、遺伝子コードの縮重によって、配列番号1、3、5または11に示すヌクレオチド配列(およびその部分)の1つとは異なり、配列番号1、3、5または11に示すヌクレオチド配列によってコードされた1配列と同じデサチュラーゼをコードする核酸分子を包含する。別の実施形態では、本発明に従う単離された核酸分子は、配列番号2、4、6または12に示したアミノ酸配列を含むタンパク質をコードするヌクレオチド配列を有する。別の実施形態では、本発明に従う核酸分子は、配列番号2、4、6または12のアミノ酸配列(配列番号1、3、5または11に示すオープンリーディングフレームによってコードされる)と本質的に相同であり、かつ、通常の方法により同定および単離することができる全長デサチュラーゼタンパク質をコードする。

40

#### 【0094】

配列番号1、3、5または11に示したデサチュラーゼヌクレオチド配列以外にも、当業者であれば、DNA配列多型が存在することを認識するだろう。これは、集団(例えば、フェオダクチルム・トリコルヌーツム(Phaeodactylum tricornutum)集団)内のデサチュラーゼのアミノ酸配列を変化させる。デサチュラーゼ遺伝子におけるこれらの遺伝的多型は、自然突然変異により、集団内の個体間に存在しうる。本明細書で用いる用語「遺伝子」および「組換え遺伝子」は、デサチュラーゼ、好ましくは、フェオダクチルム・トリコルヌーツム(Phaeodactylum tricornutum)デサチュラーゼをコードするオープンリーデ

50

ィングフレームを有する核酸分子を意味する。これらの自然突然変異体は、通常、デサチュラーゼ遺伝子のヌクレオチド配列に1～5%の分散を生じさせる。これらヌクレオチド変異、ならびに、その結果起こったデサチュラーゼ中のアミノ酸多型はすべて、自然突然変異の結果であり、デサチュラーゼの機能活性を改変せず、これらも本発明の範囲に含まれるものとする。

【0095】

フェオダクチルム・トリコルヌーツム (Phaeodactylum tricornutum) cDNAの自然突然変異体および非フェオダクチルム・トリコルヌーツム (Phaeodactylum tricornutum) 相同体、誘導体および類似体に対応する核酸分子は、本明細書に開示したフェオダクチルム・トリコルヌーツム (Phaeodactylum tricornutum) デサチュラーゼ核酸とのその相同性のために、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で標準的ハイブリダイゼーション法に従って、ハイブリダイゼーションプローブとしてフェオダクチルム・トリコルヌーツム (Phaeodactylum tricornutum) cDNAもしくはその一部分を用いて、単離することができる。別の実施形態では、本発明に従う単離された核酸分子は、15ヌクレオチドの最小長さを有し、ストリンジェントな条件下で配列番号1、3、5または11のヌクレオチド配列を含む核酸分子とハイブリダイズする。

【0096】

別の実施形態では、核酸は、25、50、100、250以上のヌクレオチドの最小長さを有する。本明細書で用いる用語「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする」とは、互いに少なくとも60%の相同性を有するヌクレオチド配列が、通常、互いにハイブリダイズしたままの状態に残っているハイブリダイゼーションおよび洗浄条件を表すものとする。このような条件は、好ましくは互いに少なくとも約65%、さらに好ましくは約70%、さらにまた好ましくは少なくとも75%以上の相同性を有する配列が、通常、互いにハイブリダイズされたままの状態に残っているような条件である。これらのストリンジェントな条件は、当業者には公知であり、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989)、6.3.1-6.3.6にみいだすことができる。限定するものではないが、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の好ましい例は、約45 で、6×塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム (=SSC) 中でハイブリダイズさせた後、50～65 で、0.2×SSC、0.1% SDS中で1回以上洗浄する段階からなる。当業者には、これらのハイブリダイゼーション条件が、核酸の種類に応じて、また、例えば、有機溶剤が存在する場合には、バッファの温度と濃度に関して違ってくることは公知である。例えば、温度は、「標準的ハイブリダイゼーション条件」下で、核酸の種類によって、0.1～5×SSC (pH 7.2) の水性バッファ中、42～58 の範囲で変動する。有機溶剤 (例えば、50%ホルムアミド) が前記バッファ中に存在する場合には、標準条件下での温度は約42 である。DNA:DNAハイブリッドのハイブリダイゼーション条件は、好ましくは、例えば、0.1×SSCおよび20～45 (好ましくは、30～45) である。DNA:RNAハイブリッドのハイブリダイゼーション条件は、好ましくは0.1×SSCおよび30～55 (好ましくは、45～55) である。これらのハイブリダイゼーション温度は、例えば、長さが約100 bp (=塩基対) で、ホルムアミドの非存在下でG+C含有率が50%の核酸について決定されたものである。当業者であれば、既述の文献、もしくは下記文献などの文献を参照にして、必要なハイブリダイゼーション条件をどのようにして決定できるかがわかるであろう: Sambrookら、"Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, 1989; HamesおよびHiggins (編) 1985, "Nucleic Acids Hybridization: A Practical Approach", IRL Press at Oxford University Press、オックスフォード; Brown (編) 1991, "Essential Molecular Biology: A Practical Approach", IRL Press at Oxford University Press、オックスフォード。

【0097】

好ましくは、ストリンジェントな条件下で配列番号1、3、5または11の配列とハイブリダイズする本発明の単離された核酸分子は、天然に存在する核酸分子に対応する。本明細書で用いる「天然に存在する」核酸分子とは、天然に存在するヌクレオチド配列 (例え

10

20

30

40

50

ば、天然タンパク質をコードするもの)を有するRNAまたはDNA分子を意味する。一実施形態では、核酸は、天然に存在するフェオダクチルム・トリコルヌーツム (*Phaeodactylum tricornutum* デサチュラーゼ) をコードする。

【0098】

集団に存在し得るデサチュラーゼ配列の天然に存在する変異体の他に、当業者であれば、さらに、突然変異による変化を、配列番号1、3、5または11のヌクレオチド配列に導入することにより、デサチュラーゼタンパク質の機能性に悪影響を与えることなく、コードされたデサチュラーゼのアミノ酸配列に変化を起こすことができることがわかるであろう。例えば、「非必須」アミノ酸残基上にアミノ酸置換を起こすヌクレオチド置換を、配列番号2、4、6または12の配列に生じさせることができる。「非必須」アミノ酸残基は、デサチュラーゼの活性を改変することなく、すなわち、ほとんど低下させずに、デサチュラーゼ(配列番号2、4、6または12)のうちの1つの野生型配列において改変することができる残基であるのに対し、「必須」アミノ酸残基は、デサチュラーゼ活性に必要である。しかし、その他のアミノ酸残基(例えば、デサチュラーゼ活性を有するドメインに、保存されていないもの、または半保存しかされていないもの)は、上記活性に必須ではないと考えられることから、デサチュラーゼ活性を変えずに、改変することができるであろう。

10

【0099】

従って、本発明のさらに別の態様は、デサチュラーゼ活性に必須ではない、改変されたアミノ酸残基を含むデサチュラーゼをコードする核酸分子に関する。これらのデサチュラーゼは、アミノ酸配列に関して、配列番号2、4、6または12の配列とは異なるが、本明細書に記載したデサチュラーゼ活性の少なくとも1つは保持している。一実施形態では、単離された核酸分子は、タンパク質をコードするヌクレオチド配列を包含し、該タンパク質は、配列番号2、4、6または12のアミノ酸配列と少なくとも約50%の同一性を有するアミノ酸配列を包含し、かつ、フェオダクチルム・トリコルヌーツムトリコルヌーツム (*Phaeodactylum tricornutum*) における細胞膜の合成に必要な化合物の代謝、もしくはこれらの膜を介した分子の輸送に参与することができる。上記核酸分子によりコードされるタンパク質は、好ましくは、配列番号2、4、6または12の配列の1つと少なくとも約50~60%の同一性を有し、さらに好ましくは、配列番号2、4、6または12の配列の1つと少なくとも約60~70%の同一性を有し、さらにまた好ましくは、配列番号2、4、6または12の配列の1つと少なくとも約70~80%、80~90%、90~95%の同一性を有し、最も好ましくは、配列番号2、4、6または12の配列の1つと少なくとも約96%、97%、98%もしくは99%の同一性を有する。

20

30

【0100】

2つのアミノ酸配列(例えば、配列番号2、4、6または12の配列の1つと、それらの突然変異した形態のうちの1つ)間または2つの核酸間の同一性%を決定するためには、最適な比較(例えば、一方のタンパク質または核酸の配列にギャップを導入することにより、他方のタンパク質または核酸との最適なアラインメントを達成するなど)が可能なように、両配列を重ねて表記する。次に、対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置に存在するアミノ酸残基またはヌクレオチドを比較する。一方の配列(例えば、配列番号: 2、4、6または12の配列の1つ)内の位置に、他方の配列(例えば、配列番号2、4、6または12から選択された配列の突然変異した形態)内の対応する位置と同じアミノ酸残基またはヌクレオチドが存在する場合、該分子は、この位置で相同である(すなわち、本明細書で用いるアミノ酸または核酸「同一性」は、アミノ酸または核酸「同一性」に相当する)。両配列間の同一性%は、両配列が共有する同一位置の数の関数である(すなわち、同一性% = 同一位置の数 / 位置の総数 × 100)。従って、同一性および同一性という2つの用語は、類義語であると考えべきである。

40

【0101】

配列番号2、4、6または12のタンパク質配列と相同であるデサチュラーゼをコードする、単離された核酸分子は、配列番号1、3、5または11のヌクレオチド配列に1以上の

50

ヌクレオチド置換、付加または欠失を導入し、これにより、1以上のアミノ酸置換、付加または欠失を、コードされたタンパク質に導入させて、作製することができる。突然変異は、部位特異的突然変異誘発およびPCR媒介突然変異誘発のような標準的技法により、配列番号1、3、5または11の配列の1つに導入することができる。保存的アミノ酸置換は、1つ以上の推定上の非必須アミノ酸残基で生じさせるのが好ましい。「保存的アミノ酸置換」では、上記アミノ酸残基を、類似側鎖を有するアミノ酸残基に交換する。類似側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、専門分野において定義されている。これらのファミリーは、塩基性側鎖（例えば、リシン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、 $\beta$ -分枝側鎖（例えば、トリオニン、バリン、イソロイシン）および芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を有するアミノ酸を包含する。従って、デサチュラーゼにおける推定上の非必須アミノ酸残基は、同じ側鎖ファミリーからの別のアミノ酸残基に交換するのが好ましい。これ以外にも、別の実施形態では、例えば、飽和突然変異誘発により、デサチュラーゼコード配列の全部または部分にわたって、ランダムに突然変異を導入した後、得られた突然変異体を、前記デサチュラーゼ活性についてスクリーニングすることによって、デサチュラーゼ活性を保持する突然変異体を同定することができる。配列番号1、3、5または11の配列の1つに突然変異誘発を起こした後、コードされたタンパク質を組換えにより発現させ、例えば、本明細書に記載するアッセイ（実施例の節を参照）を用いて、該タンパク質の活性を決定することができる。

#### 【0102】

前記デサチュラーゼをコードする核酸分子の他に、本発明のさらに別の態様は、本発明の核酸配列に対して「アンチセンス」である、単離された核酸分子に関する。「アンチセンス」核酸分子は、タンパク質をコードする「センス」核酸に相補的なヌクレオチド配列、例えば、二本鎖cDNA分子のコード鎖に相補的な、あるいは、mRNA配列に相補的なヌクレオチド配列を包含する。従って、アンチセンス核酸は、水素結合を介してセンス核酸に結合することができる。このアンチセンス核酸は、完全なデサチュラーゼコード鎖、またはその一部分だけに相補的であってもよい。一実施形態では、アンチセンス核酸分子は、デサチュラーゼをコードするヌクレオチド配列のコード鎖の「コード領域」に対して、「アンチセンス」である。「コード領域」という用語は、アミノ酸残基に翻訳されるコドンを包含するヌクレオチド配列の領域（例えば、停止コドンで開始および終結する全コード領域、すなわち、停止コドン直前の最後のコドン）を意味する。さらに別の実施形態では、アンチセンス核酸分子は、デサチュラーゼをコードするヌクレオチド配列のコード鎖の「非コード領域」に対して「アンチセンス」である。「非コード領域」という用語は、コード領域と隣接し、かつ、アミノ酸に翻訳されない5'および3'配列（従って、5'-および3'-非翻訳配列とも呼ばれる）を意味する。

#### 【0103】

上記コード鎖の、本明細書に開示したデサチュラーゼコード配列（例えば、配列番号1、3、5または11に示した配列）を仮定すれば、本発明のアンチセンス核酸は、ワトソン-クリック塩基対合の法則に従って設計することができる。アンチセンス核酸分子は、デサチュラーゼmRNAのコード領域の全部に相補的であってもよいが、デサチュラーゼmRNAのコード領域または非コード領域の一部分だけに「アンチセンス」であるオリゴヌクレオチドの方が好ましい。例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、デサチュラーゼmRNAの翻訳始点周辺の領域に相補的である。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、長さが、例えば、約5、10、15、20、25、30、35、40、45または50以上のヌクレオチドを有するものとする。本発明のアンチセンス核酸は、化学的合成および酵素の結合反応を用いて、当業者には公知の方法により構築することができる。例えば、アンチセンス核酸（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド）は、天然のヌクレオチドまたは様々な修飾ヌ

10

20

30

40

50

クレオチドを用いて、化学的に合成することができる。修飾ヌクレオチドは、分子の生物学的安定性を高める、あるいは、アンチセンス核酸とセンス核酸との間に形成された二重らせんの物理的安定性を高めるものであり、例えば、ホスホロチオエート誘導体や、アクリジン-置換ヌクレオチドを用いることができる。アンチセンス核酸を生成するのに用いることができる修飾ヌクレオチドの例としては、中でも、下記のを挙げる事ができる：5-フルオロウラシル、5-プロモウラシル、5-クロロウラシル、5-ヨードウラシル、ヒポキサチン、キサントシン、4-アセチルシトシン、5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、*-D*-ガラクトシルクエオシン、イオシン、N6-イソペンテニルアデニン、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N6-アデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル、*-D*-マンノシルクエオシン、5'-メトキシカルボキシメチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N6-イソペンチルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸(v)、ワイプトキソシン、プソイドウラシル、クエオシン、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、メチルウラシル-5-オキシアセテート、ウラシル-5-オキシ酢酸(v)、5-メチル-2-チオウラシル、3-(3-アミノ-3-N-2-カルボキシプロピル)ウラシル、(acp3)*w*および2,6-ジアミノプリン。あるいは、核酸をアンチセンス配向にサブクローニングした発現ベクターを用いて、アンチセンス核酸を生物学的に産生させることができる(すなわち、導入した核酸により転写されるRNAは、目的とする標的核酸に対してアンチセンス配向にあり、これについては、以下の項でさらに詳しく説明する)。

#### 【0104】

本発明のアンチセンス核酸分子は、通常、細胞に投与するか、または*in situ*で産生することにより、これら分子が、デサチュラーゼをコードする細胞mRNAおよび/またはゲノムDNAとハイブリダイズするかまたは結合し、その結果、例えば、転写および/または翻訳を阻害することにより、当該タンパク質の発現を阻害するようにする。ハイブリダイゼーションは、安定な二重らせんを形成する通常のヌクレオチドの相補性により、あるいは、例えば、DNA二重らせんと結合するアンチセンス核酸分子の場合には、二重らせんの大きな間隙内での特異的相互作用によって行われる。例えば、上記アンチセンス核酸分子をペプチドまたは抗体に結合させ、それらの各々を細胞表面受容体または抗原に結合させることにより、該分子が、受容体または選択された細胞表面で発現する抗原と特異的に結合するように、該アンチセンス分子を修飾することもできる。また、本明細書に記載するベクターを用いて、上記細胞にアンチセンス核酸分子を与えることも可能である。上記アンチセンス分子の十分な細胞内濃度を達成するためには、該アンチセンス核酸分子が、強力な原核性、ウイルス性または真核性プロモーター(植物プロモーターを含む)の制御下にあるベクター構築物が好ましい。

#### 【0105】

さらに別の実施形態では、本発明のアンチセンス核酸分子は アノマー核酸分子である。アノマー核酸分子は、相補的RNAと特異的な二本鎖ハイブリッドを形成するが、その鎖は、通常の ユニットとは対照的に、互いに平行である(Gaultierら(1987) *Nucleic Acids Res.* 15:6625-6641)。さらに、アンチセンス核酸分子は、2'-*o*-メチルリボヌクレオチド(Inoueら(1987) *Nucleic Acids Res.* 15:6131-6148)またはキメラRNA-DNA類似体(Inoueら(1987) *FEBS Lett.* 215:327-330)を包含し得る。

#### 【0106】

さらに別の実施形態では、本発明のアンチセンス核酸はリボザイムである。リボザイムは、それに対し相補的な領域を有する一本鎖核酸(mRNAなど)を切断することができるリボヌクレアーゼ活性を有する触媒性RNA分子である。従って、リボザイム、例えば、ハンマーヘッド型リボザイム(HaselhoffおよびGerlach(1988) *Nature* 334:585-591)をデサチュラーゼmRNA転写物の触媒切断に用いて、デサチュラーゼmRNAの翻訳を阻害すること

ができる。デサチュラーゼをコードする核酸に対する特異性を有するリボザイムは、配列番号1、3、5または11に開示したデサチュラーゼcDNAの1つのヌクレオチド配列に基づいて(すなわち、または本発明に教示する方法に従って単離される異種配列に基づいて)設計することができる。例えば、テトラヒメナ-L-19-IVS RNAの誘導体を構築することができ、その際、活性部位のヌクレオチド配列は、デサチュラーゼをコードするmRNAにおいて切断しようとするヌクレオチド配列と相補的である。例えば、Cechら、米国特許第4,987,071号およびCechら、米国特許第5,116,742号を参照されたい。この他に、デサチュラーゼmRNAを用いて、RNA分子のプールの中から、特異的リボヌクレアーゼ活性を有する触媒性RNAを選択することができる。例えば、Bartel, D.およびSzostak, J.W. (1993) *Science* 261:1411-1418を参照。

10

## 【0107】

この他に、デサチュラーゼヌクレオチド配列の調節領域(例えば、デサチュラーゼプロモーターおよび/またはエンハンサー)に相補的なヌクレオチド配列を指令して、三重らせん構造を形成させ、これによって、標的細胞におけるデサチュラーゼ遺伝子の転写を阻害させることにより、デサチュラーゼ遺伝子発現を阻害することができる。概要については、Helene, C. (1991) *Anticancer Drug Res.* 6(6) 569-84; Helene, C.ら (1992) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 660:27-36; およびMaher, L.J. (1992) *Bioassays* 14(12):807-815を参照。

## 【0108】

## B. 遺伝子構築物(=核酸構築物、核酸断片または発現カセット)

本発明に従う発現カセットは、遺伝コードの結果である配列番号1、配列番号3、配列番号5または配列番号11に示す配列、および/またはそれらの機能的もしくは非機能的誘導体を意味するものとし、これらは、遺伝子発現を高めるために1以上の調節シグナルに機能的に連結されているのが好ましく、かつ、宿主細胞におけるコード配列の発現を制御するのが好ましい。これらの調節配列は、遺伝子の標的発現およびタンパク質発現を可能にすることを意図する。宿主生物に応じて、これは、例えば、遺伝子が誘導後にのみ発現および/または過剰発現されること、あるいは、直ちに発現および/または過剰発現されることを意味すると考えられる。例えば、これらの調節配列は、誘発剤またはリプレッサーが結合する配列の形態をしており、これによって、核酸の発現を調節する。これらの新規の調節配列に加えて、あるいは、これらの配列に代わって、これらの配列の天然の調節が実際の構造遺伝子の前に存在してもよく、また、必要に応じて、遺伝子的に改変しておくことにより、天然の調節を排除し、遺伝子の発現を高めておいてもよい。しかし、遺伝子構築物は、これより単純な構造をしていてもよい。すなわち、核酸配列またはその誘導体の前に追加の調節シグナルが一切挿入されておらず、かつ、天然プロモーターがその調節と共に除去されていない。これに代わり、天然の調節配列に突然変異を起こして、調節がこれ以上起こらないように、かつ/または遺伝子発現が増加するようにする。これらの修飾されたプロモーターは、天然遺伝子の前に単独で部分配列の形態(=本発明の核酸配列の部分を含むプロモーター)に配置することにより、活性を高めることもできる。さらに、遺伝子構築物は、プロモーターに機能的に連結したエンハンサー配列として知られる1以上のものを含んでいれば有利であり、これらは、核酸の発現増加を可能にする。また、DNA配列の3'末端に、別の有利な配列、例えば、別の調節エレメントまたはターミネーターなどを挿入することも可能である。5-デサチュラーゼ/6-デサチュラーゼおよび/または12-デサチュラーゼ遺伝子は、発現カセット(=遺伝子構築物)において1以上のコピーで存在することができる。

20

30

40

## 【0109】

本発明では、調節配列または因子は、前述したように、導入した遺伝子の発現にプラスの効果をもつ、すなわち、該発現を増加することができる。調節エレメントの増強は、プロモーターおよび/またはエンハンサーなどの強力な転写シグナルを用いることにより、転写レベルで起こすのが有利である。加えて、例えば、mRNAの安定性を高めることにより、翻訳を増強することもできる。

50

## 【0110】

本発明のさらに別の実施形態は、配列番号1、3、5、7、9または11に示した配列で、かつ、配列番号2、4、6、8、10または12に従うポリペプチドをコードする1以上の該配列を含む1以上の遺伝子構築物である。配列番号1、3、5、7および11がデサチュラーゼから誘導されるのに対し、配列番号9は、エロンガーゼをコードする。デサチュラーゼは、5、6または12位置で二重結合を導入する酵素をコードし、その際、基質は、1、2、3または4つの二重結合を有する。配列番号9に示す配列は、脂肪酸を2炭素原子以上伸長させる酵素活性、あるいは、1以上の調節シグナルに機能的に連結して、有利に遺伝子発現を高める相同体、誘導體または類似体をコードする。これら調節配列の例として、インデューサーまたはリプレッサーが結合し、これによって、核酸の発現を調節する配列がある。これら新規の調節配列以外にも、実際の構造遺伝子の前に、これらの配列の天然調節がまだ存在する可能性もあり、必要であれば、遺伝子的に改変され、天然調節が排除され、遺伝子の発現が増強されるようにする。しかし、遺伝子構築物は、これより単純な構造を有するものであってもよい。すなわち、配列番号1、3、5または11の配列またはその相同体の前には、追加調節シグナルを挿入していないため、その調節を有する天然プロモーターは欠失されていない。これに代わり、天然調節配列を突然変異させることにより、調節がそれ以上起きないようにし、遺伝子発現を増強する。有利なことに、上記遺伝子構築物はさらに、プロモーターに機能的に連結され、核酸配列の発現を高めることができる1以上のいわゆるエンハンサー配列を包含してもよい。また、DNA配列、例えば、さらに別の調節エレメントまたはターミネーターの3'末端で、有利な配列を挿入することも可能である。デサチュラーゼ遺伝子およびエロンガーゼ遺伝子は、遺伝子構築物中に1以上のコピーで存在することができる。これらは、1つの遺伝子構築物または2以上の遺伝子構築物中に存在してもよい。この(またはこれらの)遺伝子構築物は、宿主生物において一緒に発現させることができる。このことから、遺伝子構築物は、1以上のベクターに挿入することができ、また、遊離形態で細胞に存在したり、あるいは、ゲノムに挿入することもできる。さらなる遺伝子が上記遺伝子構築物に存在する場合には、生物にさらなる遺伝子を挿入するのが有利である。

## 【0111】

上記新規の方法に有利な調節配列は、例えば、下記のようなプロモーター：cos、tac、trp、tet、trp-tet、lpp、lac、lpp-lac、lacI<sup>q</sup>、T7、T5、T3、gal、trc、ara、SP6、 $-P_R$ または $-P_L$ プロモーターに存在し、グラム陰性菌で用いるのが有利である。さらに有利な調節配列は、例えば、下記のプロモーターに存在する：グラム陽性プロモーターamyおよびSPO2；酵母もしくは真菌プロモーターADC1、MF、AC、P-60、CYC1、GAPDH、TEF、rp28、ADH；または植物プロモーターCaMV 35S [ Franckら、Cell 21 (1980) 285-294 ]、RP1 [ Wardら、Plant. Mol. Biol. 22 (1993) ]、SSU、OCS、lib4、usp、STLS1、B33、nos、または、ユビキチンもしくはファセオリンプロモーター。本発明では、下記のような誘導プロモーターも有利である：例えば、EP-A-0 388 186 (ベンジルスルホンアミド誘導性)、Plant J. 2, 1992:397-404 (Gatzら、テトラサイクリン - 誘導性)、EP-A-0 335 528 (アブシジン酸誘導性)またはWO 93/21334 (エタノールまたはシクロヘキセノール誘導性)に記載されている各種プロモーター。その他の適切な植物プロモーターは、細胞質ゾルのFBPアーゼまたはジャガイモST-LSIプロモーター (Stockhausら、EMBO J. 8, 1989, 2445)、ダイズ (Glycine max) ホスホリボシルピロホスフェートアミドトランスフェラーゼプロモーター (GenBank登録番号U87999)または、EP-A-0 249 676に記載されたノード特異的プロモーター。特に有利なプロモーターは、脂肪酸生合成に關与する組織で発現を可能にするプロモーターである。非常に有利なものは、実施例に従うUSPプロモーターのような種子特異的プロモーター、ならびに、LEB4 (Baeumleinら、Plant J., 1992, 2(2):233-239)、DC3 (Thomas, Plant Cell 1996, 263:359-368)、ファセオリンまたはナピンプロモーターなど、その他のプロモーターである。さらに有利なプロモーターは、単子葉植物または双子葉植物に用いることができる種子特異的プロモーターであり、米国特許第5,608,152号 (アブラナナピンプロモーター)、WO 98/45461 (シロイヌナズナオレオシ

10

20

30

40

50

ンプロモーター)、米国特許第5,504,200号(インゲンマメファセオリンプロモーター)、WO 91/13980(アブラナ属Bce4-プロモーター)、Baeumleinら、Plant J., 1992, 2(2): 233-239(マメ科由来のLeB4プロモーター)に記載されているが、これらのプロモーターは、双子葉植物に適している。下記のプロモーターは、例えば、単子葉植物に適している: オオムギlpt-2またはlpt-1プロモーター(WO 95/15389およびWO 95/23230)、オオムギホルデインプロモーター、ならびに、WO 99/16890に記載されたその他の適したプロモーター。

#### 【0112】

原則として、新規の方法には、前記のような調節配列を有するすべての天然プロモーターを使用することができる。また、さらに、合成プロモーターを用いることも可能であり、有利である。

10

#### 【0113】

前述のように、遺伝子構築物は、生物に導入しようとする別の遺伝子も包含することができる。酵素活性を有するために、1以上の生合成経路遺伝子の調節に關与するインデューサー、リプレッサーまたは酵素の遺伝子のような調節遺伝子を宿主生物に導入し、そこで発現させることが可能であり、しかも有利である。これらの遺伝子は、異種または同種いずれの供給源に由来するものでよい。さらに、核酸構築物または遺伝子構築物は、脂肪酸または脂質代謝の生合成遺伝子を含んでいるのが有利であり、あるいは、これらの遺伝子は、1以上の別の核酸構築物上に存在してもよい。脂肪酸または脂質代謝の生合成遺伝子は、下記のものからなる群より選択される遺伝子であれば有利である: アシルCoAデヒドロゲナーゼ、アシルACP [=アシルキャリアータンパク質] デサチュラーゼ、アシルACPチオエステラーゼ、脂肪酸アシルトランスフェラーゼ、脂肪酸シクターゼ、脂肪酸ヒドロキシラーゼ、アセチル補酵素Aカルボキシラーゼ、アシル補酵素Aオキシダーゼ、脂肪酸デサチュラーゼ、脂肪酸アセチレナーゼ、リボキシゲナーゼ、トリアシルグリセロールリパーゼ、アレンオキシドシクターゼ、ヒドロペルオキシドリアーゼまたは脂肪酸エロンガーゼ、もしくはこれらの組合せ。

20

#### 【0114】

存在するその他の遺伝子を発現させるために、遺伝子構築物は、発現を増強する3'-および/または5'-末端調節配列をさらに包含するのが有利であり、これらは、選択した宿主生物および遺伝子の機能に応じて、最適な発現のために選択される。前述のように、これらの調節配列は、遺伝子およびタンパク質発現の特異的発現を可能にすることを意図するものである。宿主生物によって、これは、例えば、遺伝子が誘導後に初めて発現または過剰発現するか、あるいは、直ちに発現および/または過剰発現することを意味する場合もある。

30

#### 【0115】

さらに、調節配列または調節因子は、好ましくは、導入された遺伝子の発現に有利な作用を及ぼし、これによって発現を増強することができる。このように、プロモーターおよび/またはエンハンサーのような強力な転写シグナルを用いて、調節エレメントを転写レベルで有利に増強することが可能である。しかし、例えば、mRNA安定性を高めることにより、翻訳を増強することも可能である。

40

#### 【0116】

### C. 組換え発現ベクターおよび宿主細胞

本発明のさらに別の態様は、デサチュラーゼ(またはその一部)だけをコードする核酸、または、本発明の核酸が単独で存在するか、またはデサチュラーゼもしくはエロンガーゼなどの脂肪酸または脂質代謝の生合成遺伝子と一緒に存在する、項Bに記載した核酸構築物を含む、ベクター、好ましくは発現ベクターに關する。本明細書で用いられる用語「ベクター」とは、別の核酸に結合し、これを輸送することができる核酸分子を意味する。ベクターのタイプとして、「プラスミド」があり、これは、環状の二本鎖DNAループの形態をしており、そこに、別のDNAセグメントを連結することができる。ベクターのさらに別のタイプは、ウイルスベクターであり、別のDNAセグメントを該ウイルスゲノムに連

50

結することができる。特定のベクターは、それらが導入された宿主細胞中で自律複製が可能である（例えば、細菌複製起点を有する細菌ベクター、ならびに、エピソード性哺乳動物ベクター）。その他のベクター（例えば、非エピソード性哺乳動物ベクター）は、宿主細胞への導入時に、宿主細胞のゲノムに組み込むことにより、宿主ゲノムと一緒に複製される。加えて、特定のベクターは、それらが機能的に連結される遺伝子の発現を制御することができる。本明細書では、このようなベクターを「発現ベクター」と呼ぶ。通常、組換えDNA技法に適した発現ベクターは、プラスミドの形態をしている。本明細書では、「プラスミド」および「ベクター」は、置き換え可能に用いる場合もある。というのは、プラスミドは、ベクターの形態で最も頻繁に用いられるものであるからである。しかし、本発明は、同様の機能を有するウイルスベクター（例えば、複製能欠損レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ近縁ウイルス）のような他の形態の発現ベクターも包含するものとする。さらに、用語「ベクター」は、ファージ、ウイルス、例えばSV40、CMV、パキユロウイルス、アデノウイルス、トランスポゾン、ISエレメント、ファスミド、ファージミド、コスミド、線状または環状DNAなどの、当業者には公知のその他のベクターを包含するものとする。

#### 【0117】

本発明の組換え発現ベクターは、宿主細胞において核酸を発現するのに適した形態をした、本発明の核酸、または本発明の遺伝子構築物を包含する。すなわち、上記組換え発現ベクターは、発現に用いようとする宿主細胞に基づいて選択され、発現させようとする核酸配列に機能的に連結した1以上の調節配列を包含する。組換え発現ベクターにおいて、「機能的に連結した」とは、目的とするヌクレオチド配列が、調節配列に結合し、これによって、ヌクレオチド配列の発現が可能になり、相互に結合することにより、両配列が、それぞれに特有とみなされる推定機能を果たすようにすることを意味する（例えば、ベクターを宿主細胞に導入する場合には、*in vitro*転写/翻訳系または宿主細胞において機能を果たす）。用語「調節配列」は、プロモーター、エンハンサーおよびその他の発現制御エレメント（例えば、ポリアデニル化シグナル）を包含するものとする。これらの調節配列は、例えば、Goeddel: Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press、カリフォルニア州サンディエゴ（1990）に記載されている。また、下記文献も参照されたい: GruberおよびCrosby、Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, CRC Press, Boca Raton, Florida編: GlickおよびThompson、第7章、89-108（その中の参照文献も含む）。調節配列は、多種の宿主細胞におけるヌクレオチド配列の構成的発現を制御するもの、ならびに、特定の条件下で、特定の宿主細胞でしか、ヌクレオチド配列の直接発現を制御しないものを包含する。当業者であれば、発現ベクターの設計は、形質転換しようとする宿主細胞の選択、所望のタンパク質を発現させる範囲などの因子によって違ってくることがわかるだろう。本発明の発現ベクターを宿主細胞に導入することにより、本明細書に記載した核酸（例えば、デサチュラーゼ、変異型デサチュラーゼ、融合タンパク質など）によりコードされる、融合タンパク質もしくは融合ペプチドなどのタンパク質またはペプチドを生産することができる。

#### 【0118】

本発明の組換え発現ベクターは、原核または真核生物細胞においてデサチュラーゼおよびエロンガーゼを発現させるために設計することができる。例えば、デサチュラーゼ遺伝子は、*C. グルタミンウム* (*C. glutamicum*) のような細菌細胞、昆虫細胞（パキユロウイルス発現ベクターを用いる）、酵母およびその他の真菌細胞 (Romanos, M. A.ら、(1992) "Foreign gene expression in yeast: a review", *Yeast* 8:423-488; van den Hondel, C.A.M.J.J.ら (1991) "Heterologous gene expression in filamentous fungi": *More Gene Manipulations in Fungi*, J.W. Bennet & L.L. Lasure編, pp. 396-428: Academic Press: San Diego; および van den Hondel, C.A.M.J.J. および Punt, P. J. (1991) "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi": *Applied Molecular Genetics of Fungi*, Peberdy, J.F.ら、編, pp. 1-28, Cambridge University Press: ケンブリッジ)、藻類 (Falciatoreら、1999、*Marine Biotechnology*, 1, 3:239-251

10

20

30

40

50

)、下記タイプの繊毛虫：全毛亜綱 (Holotrichia)、周毛亜綱 (Peritrichia)、旋毛亜綱 (Spirotrichia)、吸滴虫綱 (Suctorina)、テトラヒメナ属 (Tetrahymena)、ゾウリムシ属 (Paramecium)、コルピディウム属 (Colpidium)、グラウコマ属 (Glaucocystis)、フクロミズケムシ属 (Platyophrya)、ポトマカス (Potomacoccus)、シュードコニレンバス属 (Pseudocohnilembus)、ユープロテス属 (Euprotes)、エンゲルマニエラ属 (Engelmanniella) およびアンフィシエラ目 (Stychotrichia)、特に、スティロニキア・レムネ (*Stylonychia lemnae*) 属の繊毛虫、多細胞植物の細胞 (Schmidt, R. および Willmitzer, L. (1988) "High efficiency *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Rabidopsis thaliana* leaf and cotyledon explants" *Plant Cell Rep.*: 583-586; *Plant Molecular Biology and Biotechnology*, C Press, Boca Raton, Florida, 第6/7章, p. 71-119 (1993); F.F. White, B. Jenessら、Techniques for Gene Transfer: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, Kung および R. Wu 編, Academic Press (1993)、128-43; Potrykus, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* 42 (1991)、205-225 (およびその中の参考文献) を参照) の細胞または哺乳動物細胞において、ベクターを用い、WO 98/01572 に記載されているような形質転換方法に従って、発現させることができる。適した宿主細胞については、Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, カリフォルニア州サンディエゴ (1990) にさらに詳しく記載されている。この他に、例えば、T7 プロモーター調節配列および T7 ポリメラーゼを用いて、組換え発現ベクターを *in vitro* で転写および翻訳させることもできる。

10

20

## 【0119】

原核生物においては、通常、融合タンパク質または非融合タンパク質の発現を制御する構成または誘導プロモーターを含むベクターを用いて、タンパク質を発現させる。融合ベクターは、一連のアミノ酸を、そこにコードされているタンパク質に、通常は組換えタンパク質のアミノ末端に付加するが、C末端で付加することもあれば、タンパク質中の適した領域内に融合することもある。これらの融合ベクターは、3つの働き、すなわち、1) 組換えタンパク質の発現を増強すること；2) 組換えタンパク質の溶解性を高めること；3) アフィニティー精製におけるリガンドとして作用することにより、組換えタンパク質の精製を容易にすること、を有する。融合発現ベクターの場合には、タンパク質加水分解による切断部位は、融合単位と組換えタンパク質が連結された部位で、導入されることが多く、これにより、組換えタンパク質を融合タンパク質の精製後に融合単位から分離することができる。これら酵素とそれに対応する認識配列は、第Xa因子、トロンピンおよびエンテロキナーゼを包含する。

30

## 【0120】

典型的な融合発現ベクターとしては、中でも、pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith, D. B. および Johnson, K. S. (1988) *Gene* 67:31-40)、pMAL (New England Biolabs、マサチューセッツ州バーリー) および pRIT5 (Pharmacia、ニュージャージー州ピスカタウェイ) が挙げられ、これらのベクターでは、グルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST)、マルトース-E-結合タンパク質またはプロテインAが、組換え標的タンパク質に融合される。一実施形態では、デサチュラーゼコード配列をpGEX発現ベクターにクローニングすることにより、融合タンパク質をコードするベクターを作製する。ここで、該融合タンパク質は、N末端からC末端で、GST-トロンピン切断部位-X-タンパク質を包含する。融合タンパク質は、グルタチオン-アガロース樹脂を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる。GSTと融合していない組換えデサチュラーゼは、トロンピンを用いて融合タンパク質を切断することによって得ることができる。

40

## 【0121】

好適な誘導非融合大腸菌発現ベクターの例として、中でも、pTrc (Amannら (1988) *Gene* 69: 301-315) および pET 11d (Studierら、*Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, カリフォルニア州サンディエゴ (1990) 60-89) が挙げられる。pTrcベクターの標的遺伝子発現は、ハイブリッド *trp-lac* 融合プロモーターか

50

らの宿主RNAポリメラーゼによる転写に基づいて起こる。pET 11dベクターからの標的遺伝子発現は、T7-gn10-lac融合プロモーターからの転写に基づき、この転写は、共発現したウイルスRNAポリメラーゼ (T7 gn1) によって媒介される。上記ウイルスポリメラーゼは、lacUV 5プロモーターの転写制御下でT7 gn1遺伝子を保有する常在性プロファージによって、宿主株BL21 (DE3) またはHMS174 (DE3) により提供される。

#### 【 0 1 2 2 】

原核生物での使用に適したその他のベクターは、当業者には公知であり、このようなベクターは、例えば、下記のものに存在する：大腸菌pLG338、pACYC184、pBR322のようなpBRシリーズ、pUC18またはpUC19のようなpUCシリーズ、M113mpシリーズ、pKC30、pRep4、pHS1、pHS2、pPLc236、pMBL24、pLG200、pUR290、pIN-III<sup>113</sup>-B1、gt11またはpBdCl；ストレプトミセス属pIJ101、pIJ364、pIJ702またはpIJ361；パチルス属pUB110、pC194またはpBD214、コリネバクテリウム属pSA77またはpAJ667。組換えタンパク質の発現を最大限にする戦略は、組換えタンパク質をタンパク質分解により切断する能力が破壊されている宿主細菌においてタンパク質を発現させるというものである (Gottesman, S., Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press、カリフォルニア州サンディエゴ (1990) 119-128)。さらに別の戦略によれば、発現ベクターに挿入しようとする核酸の核酸配列を改変することにより、各アミノ酸の個々のコドンが、*C. glutamicum* (*C. glutamicum*) のように、発現のために選択した細菌で優先的に用いられるようにする (Wadaら (1992) Nucleic Acids Res. 20:2111-2118)。本発明のこれらの核酸配列の改変は、標準的DNA合成方法により実施される。

#### 【 0 1 2 3 】

さらに別の実施形態では、デサチュラーゼ発現ベクターは酵母発現ベクターである。酵母菌サッカロミセス・セレビシエ (*S. cerevisiae*) における発現のためのベクターの例として、pYeデサチュラーゼc1 (Baldariら (1987) Embo J.6:229-234)、pMFa (KurjanおよびHerskowitz (1982) Cell 30:933-943)、pJRY88 (Schultzら (1987) Gene 54:113-123) およびpYES2 (Invitrogen Corporation、カリフォルニア州サンディエゴ) が挙げられる。糸状菌のようなその他の真菌で用いるのに適したベクターを構築するためのベクターおよび方法として、下記に詳しく記載されたものが挙げられる：van den Hondel, C.A.M. J.J.およびPunt, P.J. (1991) "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi: Applied Molecular Genetics of fungi, J.F. Peberdyら編、pp. 1-28, Cambridge University Press: ケンブリッジ、もしくは: More Gene Manipulations in Fungi [J.W. Bennet & L.L. Lasure編、pp. 396-428: Academic Press: サンディエゴ]。さらに適した酵母ベクターとして、例えば、pAG-1、YE6、YEp13またはpEMBLyE23が挙げられる。

#### 【 0 1 2 4 】

上記以外に、本発明のデサチュラーゼは、バキュロウイルス発現ベクターを用いて、昆虫細胞で発現させてもよい。培養した昆虫細胞 (例えば、Sf9細胞) においてタンパク質を発現させるために使用可能なバキュロウイルスベクターとしては、pAcシリーズ (Smithら (1983) Mol. Cell Biol. 3:2156-2165) およびpVLシリーズ (LucklowおよびSummers (1989) Virology 170:31-39) が挙げられる。

#### 【 0 1 2 5 】

前記ベクターは、考えられる好適なベクターのほんの一部を挙げたものにすぎない。その他のプラスミドは、当業者には公知であり、例えば、下記に記載されている: Cloning Vectors (Pouwels, P.H.ら編、Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985, ISBN 0 44 4 904018)。

#### 【 0 1 2 6 】

さらに別の実施形態では、本発明の核酸は、哺乳動物発現ベクターを用いて、哺乳動物細胞において発現させる。本発明を目的として用いられる哺乳動物は、ヒト以外のあらゆる哺乳動物と理解すべきである。哺乳動物発現ベクターの例として、pCDM8 (Seed, B. (1987) Nature 329:840) およびpMT2PC (Kaufmanら (1987) EMBO J. 6:187-195) が挙げら

10

20

30

40

50

れる。哺乳動物細胞に用いる場合には、発現ベクターの制御機能は、ウイルス調節エレメントにより賦与されることが多い。通常用いられるプロモーターは、例えば、ポリオーマ、アデノウイルス2、サイトメガロウイルスおよびシミアンウイルス40に由来するものである。原核および真核生物細胞に適したその他の発現系は、下記の文献中にみいだすことができる：Sambrook, J., Fritsch, E.F.およびManiatis, T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第2版の第16および17章、Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, ニューヨーク州、1989)。

【0127】

別の実施形態では、組換え哺乳動物発現ベクターは、好ましくは特定の細胞型において、核酸の発現を制御することができる(例えば、組織特異的調節エレメントを用いて核酸を発現する)。組織特異的調節エレメントは、当業者には公知である。好適な組織特異的プロモーターの非限定的な例として、中でも、下記のもの挙げられる：アルブミン(albumen)プロモーター(肝特異的；Pinkertら(1987) *Gene Dev.* 1:268-277)、リンパ球特異的プロモーター(CalameおよびEaton(1988) *Adv. Immunol.* 43:235-275)、特に、T-細胞受容体のプロモーター(WinotoおよびBaltimore(1989) *EMBO J.* 8:729-733)およびイムノグロビン(Banerjiら(1983) *Cell* 33:729-740；QueenおよびBaltimore(1983) *Cell* 33:741-748)、ニューロン特異的プロモーター(例えば、神経フィラメントプロモーター；ByrneおよびRuddle(1989) *PNAS* 86:5473-5477)、膵特異的プロモーター(Edlundら(1985) *Science* 230:912-916)および哺乳動物特異的プロモーター(例えば、乳清プロモーター；米国特許第4,873,316号および欧州特許出願第264,166号)。また、発生調節プロモーター、例えば、マウスhoxプロモーター(KesselおよびGruss(1990) *Science* 249:374-379)およびフェトプロテインプロモーター(CampesおよびTilghman(1989) *Genes Dev.* 3:537-546)も含まれる。

【0128】

さらに別の実施形態では、本発明のデサチュラーゼは、単細胞植物細胞(藻類など)(Falciatoreら、1999、*Marine Biotechnology* 1(3):239-251およびそこで引用される参考文献を参照)、ならびに、それより高等の植物(例えば、穀物のような種子植物)由来の植物細胞において発現させることができる。植物発現ベクターの例として、下記の文献に詳しく記載されているものが挙げられる：Becker, D., Kemper, E., Schell, J.およびMasterson, R.(1992) "New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left border", *Plant Mol. Biol.* 20:1195-1197；ならびに、Bevan, M.W.(1984) "Binary Agrobacterium vectors for plant transformation", *Nucl. Acids Res.* 12:8711-8721；*Vectors for Gene Transfer in Higher Plants: Transgenic Plants*, 第1巻、Engineering and Utilization、KungおよびR. Wu編、Academic Press, 1993, pp. 15-38。

【0129】

植物発現カセットは、好ましくは、植物細胞における遺伝子発現を制御することができ、かつ、機能的に連結された調節配列を含み、これによって、各配列は、転写終結、例えば、ポリアデニル化シグナルなどの機能を果たすことができる。好ましいポリアデニル化シグナルは、オクトピンシンターゼ(Gielenら、*EMBO J.* 3(1984)835以下参照)またはその機能的同等物として知られるTiプラスミドpTiACH5の遺伝子3のようなアグロバクテリウムツメファシエンスト-DNAから誘導されたものであるが、その他、植物において機能的に活性なターミネーターもすべて適している。

【0130】

非常に多くの場合、植物遺伝子発現は、転写レベルに限定されないことから、植物発現カセットは、翻訳エンハンサー、例えば、オーバードライブ配列のような機能的に連結された別の配列を含むのが好ましい。このオーバードライブ配列は、5'-非翻訳タバコモザイクウイルスリーダー配列を含み、この配列が、タンパク質/RNA比を高める(Gallieら、1987、*Nucl. Acids Research* 15:8693-8711)。

【0131】

10

20

30

40

50

植物遺伝子発現は、適したプロモーターに機能的に連結させて、このプロモーターが、細胞または組織特異的に、適正なタイミングで、遺伝子発現をもたらすようにしなければならない。好ましいプロモーターは、構成的発現を起こすもの (Benfeyら、EMBO J. 8 (1989) 2195-2202) であり、例えば、35S CaMV (Franckら、Cell 21 (1980) 285-294)、19S CaMV (米国特許第5,352,605号およびWO 84/02913も参照) のような植物ウイルスから誘導されるもの、または、米国特許第4,962,028号に記載されているRubisco小サブユニットプロモーターのような植物プロモーターがある。

#### 【0132】

植物遺伝子発現カセットにおける機能的連結のために用いるのに好ましいその他の配列は、ターゲティング配列であり、これは、遺伝子産物を、その対応する細胞小器官 (詳しくは、Kermode、Crit. Rev. Plant Sci. 15, 4 (1996) 285-423およびそこに引用された参照文献を参照)、例えば、液胞、核や、アミロプラスト、葉緑体および有色体のようなあらゆる種類の色素体、細胞外空間、ミトコンドリア、小胞体、エライオプラスト、ペロキシソームおよびその他の植物細胞小器官へとターゲティングするのに必要である。

10

#### 【0133】

植物遺伝子発現はまた、化学的に誘導可能なプロモーター (詳しくは、Gatz 1997, Ann u. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 48:89-108を参照) を介して促進することも可能である。遺伝子発現が、タイミングに関して特異的に起こるようにしたい場合には、化学的に誘導可能なプロモーターが特に適している。このようなプロモーターの例として、サリチル酸誘導プロモーター (WO 95/19443)、テトラサイクリン - 誘導プロモーター (Gatzら (1992) Plant J. 2, 397-404) およびエタノール誘導性プロモーターが挙げられる。

20

#### 【0134】

その他の適したプロモーターは、生物または非生物学的ストレス条件に応答するプロモーター、例えば、病原体誘導性PRP1遺伝子プロモーター (Wardら、Plant. Mol. Biol. 22 (1993) 361-366)、熱誘導性トマトhsp80プロモーター (米国特許第5,187,267号)、低温誘導性ジャガイモ アミラーゼプロモーター (WO 96/12814) または損傷誘導性pinIIプロモーター (EP-A-0 375 091) である。

#### 【0135】

特に好ましいプロモーターは、脂質および油生合成が行われる組織および器官において、内乳細胞のような種子細胞において、そして発育中の胚の細胞において、遺伝子発現を引き起こすものである。好適なプロモーターとして、下記を挙げることができる：アブラナナピン (napin) 遺伝子プロモーター (米国特許第5,608,152号)、ビシア・ファバ (Vicia faba) USPプロモーター (Baeumleinら、Mol Gen Genet, 1991, 225(3) : 459-67)、シロイヌナズナオレオシンプロモーター (WO 98/45461)、インゲンマメファセオリンプロモーター (米国特許第5,504,200号)、アブラナBce4プロモーター (WO 91/13980) またはレグミンB4プロモーター (LeB4; Baeumleinら、1992、Plant Journal, 2(2) : 233-9)、ならびに、トウモロコシ、オオムギ、コムギ、ライムギ、コメなどの単子葉植物に種子特異的発現を起こすプロモーター。特に好適なプロモーターとして、オオムギIpt2もしくはIpt1遺伝子プロモーター (WO 95/15389およびWO 95/23230)、または、WO 99/16890に記載されたプロモーター (オオムギホルデン遺伝子、コメグルテリン遺伝子、コメオリジン (oryzin) 遺伝子、コメプロラミン遺伝子、コムギグリアジン遺伝子、コムギグルテリン遺伝子、トウモロコシゼイン遺伝子、オートムギグルテリン遺伝子、モロコシカジン遺伝子、およびライムギセカリン遺伝子に由来するプロモーター) がある。

30

40

#### 【0136】

本発明に従うデサチュラーゼの、単独でのまたは他のデサチュラーゼもしくはエロンガーゼと組み合わせた、多重平行 (multiparallel) 発現が特に望ましい。このような発現カセットの導入は、複数の個別発現構築物の同時形質転換、または1つの構築物に対し複数の発現カセットを組み合わせることにより、実施することができる。また、複数のベクターを各々、複数の発現カセットで形質転換した後、宿主細胞に導入してもよい。

50

## 【 0 1 3 7 】

また、色素体特異的発現を起こすプロモーターも特に適している。というのは、色素体は、脂質生合成の前駆体、およびいくつかの最終産物が合成される細胞小器官だからである。ウイルスRNAポリメラーゼプロモーターのような好適なプロモーターは、WO 95/16783 およびWO 97/06250に、また、シロイヌナズナcI<sub>p</sub>Pプロモーターについては、WO 99/46394 に記載されている。

## 【 0 1 3 8 】

本発明はさらに、アンチセンス配向で発現ベクターにクローニングした、本発明のDNA分子を包含する組換え発現ベクターを提供する。すなわち、上記DNA分子を調節配列に機能的に連結することにより、デサチュラーゼmRNAに対して「アンチセンス」のRNA分子の発現（DNA分子の転写により発現される）が可能になる。調節配列は、アンチセンス配向でクローニングされた核酸に機能的に連結され、かつ、多数の細胞型においてアンチセンスRNA分子の連続的発現を制御するもの、例えば、ウイルスプロモーターおよび/またはエンハンサーから選択するか、あるいは、アンチセンスRNAの構成的、組織特異的もしくは細胞型特異的発現を制御する調節配列を選択することができる。アンチセンス発現ベクターは、アンチセンス核酸が、非常に効果的な調節領域の制御下で生産される、組換えプラスミド、ファージミドまたは弱毒化ウイルスの形態で存在することができ、該領域の活性は、ベクターが導入された細胞型により決定することができる。アンチセンス遺伝子を用いた遺伝子発現の調節について詳しくは、Weintraub, H.ら、Antisense-RNA as a molecular tool for genetic analysis, Reviews - Trends in Genetics、第1巻(1) 1986を参照されたい。

## 【 0 1 3 9 】

本発明のさらに別の態様は、本発明の組換え発現ベクターが導入された宿主細胞に関する。「宿主細胞」および「組換え宿主細胞」という用語は、本明細書では置き換え可能に用いる。もちろん、これらの用語は、特定の標的細胞だけを指すのではなく、この細胞の子孫または潜在的子孫も意味する。特定の改変は、突然変異または環境影響により、後の世代で起こる可能性もあるため、この子孫は、必ずしも母細胞と同じわけではないが、本明細書で用いる用語が意味する範囲に含まれる。

## 【 0 1 4 0 】

組換え体またはトランスジーンという用語、例えば、組換え発現ベクターまたは組換え宿主もしくは宿主細胞とは、本発明の目的に従い、本発明の核酸および/または、該核酸の5' および3' 位置におけるそれらの天然調節配列が、その自然環境にない、すなわち、もともとの生物における配列の位置が改変されたか、あるいは、核酸配列および/または調節配列が、生物内で突然変異を起こした、もしくは本発明の核酸配列が、もともとの生物以外の生物、またはその調節配列に転移されたことを意味すると理解されたい。自然環境とは、核酸配列が天然に存在する生物における位置を意味すると理解されたい。

## 【 0 1 4 1 】

宿主細胞は、原核または真核生物いずれの細胞でもよい。例えば、デサチュラーゼは、C. グルタミンウム (C. glutamicum) のような細菌細胞、昆虫細胞、真菌細胞または哺乳動物細胞（例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO) またはCOS細胞など）、藻類、繊毛虫、植物細胞、真菌またはC. グルタミンウム (C. glutamicum) のようなその他の微生物において発現させることができる。その他の好適な宿主細胞は、当業者には公知である。

## 【 0 1 4 2 】

ベクターDNAは、通常の形質転換またはトランスフェクション方法により、原核または真核生物細胞に導入することができる。本明細書で用いる「形質転換」および「トランスフェクション」、「接合」および「形質導入」は、宿主細胞に外来核酸（例えば、DNA）を導入するための、当業者には公知の多数の方法を包含し、例えば、リン酸カルシウムまたは塩化カルシウム共沈殿、DEAE - デキストラン媒介トランスフェクション、リポフェクション、自然受容能、化学的媒介導入、エレクトロポレーションまたは粒子ボンバードメ

ントなどが挙げられる。植物細胞を含む、宿主細胞の形質転換またはトランスフェクションに適した方法は、下記の文献にみいだすことができる：Sambrookら（Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor、ニューヨーク州、1989）およびその他の研究室テキスト、例えば、Methods in Molecular Biology, 1995、第44巻、Agrobacterium protocols、GartlandおよびDavey編、Humana Press、ニュージャージー州トトワ。

#### 【0143】

哺乳動物細胞の安定トランスフェクションについては、用いられる発現ベクターおよびトランスフェクション方法によっては、少数の細胞しか、外来DNAをそのゲノムに組み込めないことが知られている。これらの組込み体（integrants）を同定および選択するためには、通常、選択マーカーをコードする遺伝子（例えば、抗生物質に対する耐性）を、目的とする遺伝子と一緒に宿主細胞に導入する。好ましい選択マーカーは、G418、ヒグロマイシンおよびメトトレキセートのような薬剤に耐性を賦与するもの、あるいは、植物では、グリホセート（glyphosate）またはグルホシネート（glufosinate）のような除草剤に対する耐性を賦与するものを包含する。さらに好適なマーカーは、例えば、ガラクトシダーゼ、ura3またはilv2のような糖またはアミノ酸の生合成経路に関与する遺伝子をコードするマーカーである。ルシフェラーゼ、gfpまたはその他の蛍光遺伝子などの遺伝子をコードするマーカーも適している。これらのマーカーは、これらの遺伝子が機能的ではない突然変異体で用いることができる。何故なら、上記遺伝子は、例えば、通常の方法によって、欠失されているからである。さらに、選択マーカーをコードする核酸をコードするマーカーを、デサチュラーゼをコードするのと同じベクター上で宿主細胞に導入する、あるいは、別のベクター上で導入することもできる。導入した核酸により安定してトランスフェクションされた細胞は、例えば、薬剤選択（例えば、選択マーカーを組み込んだ細胞は生存するのに対し、他の細胞は死滅する）によって同定することができる。

#### 【0144】

相同的な組換え微生物を生産するためには、デサチュラーゼ遺伝子の少なくとも1セグメントを含むベクターを産生する。尚、この遺伝子に、欠失、付加または置換を導入することにより、デサチュラーゼ遺伝子を修飾する、例えば、該遺伝子を機能的に破壊しておく。このデサチュラーゼ遺伝子は、好ましくは、フェオダクチルム・トリコルヌーツム（*Phaeodactylum tricornutum*）デサチュラーゼ遺伝子であるが、その他の生物、哺乳動物、真菌もしくは昆虫細胞由来の相同体または類似体も用いることもできる。好ましい実施形態では、相同的組換え時に、内在性デサチュラーゼ遺伝子が機能的に破壊されるようにベクター（すなわち、機能タンパク質をそれ以上コードしない：ノックアウトベクターともよばれる）を設計する。これ以外にも、相同的組換え時に、内在性デサチュラーゼ遺伝子が突然変異する、あるいは、改変されるものの、依然として機能タンパク質をコードする（例えば、上流調節領域を改変することにより、内在性デサチュラーゼの発現を改変する）ように、ベクターを設計することもできる。相同的組換えによって点突然変異を発生させるためには、キメラ形成法としても知られ、Cole-Straussら、1999、Nucleic Acids Research 27(5) : 1323-1330およびKmiec, Gene Therapy, 1999, American Scientist, 87(3) : 240-247に記載されているDNA-RNAハイブリッドを用いることもできる。

#### 【0145】

相同的組換え用のベクターでは、デサチュラーゼ遺伝子の改変セグメントには、デサチュラーゼ遺伝子の別の核酸が、その5'および3'末端に隣接しているため、ベクター上に存在する外因性デサチュラーゼ遺伝子と、微生物または植物中の内在性デサチュラーゼ遺伝子との間で、相同的組換えが可能である。隣接する別のデサチュラーゼ核酸は、内在性遺伝子との相同的組換えを達成するのに十分な長さを有する。通常、数百塩基対からキロベースの隣接DNA（5'および3'末端の両方で）が、ベクター上に存在する（相同的組換えのためのベクターについては、例えば、Thomas, K. R.およびCapecchi, M. R. (1987) Cell 51:503を、また、cDNAに基づくヒメツリガネゴケ（*Physcomitrella patens*）における組換えに関しては、Streppら、1998、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95(8) : 4368-4373

10

20

30

40

50

を参照)。上記ベクターは、微生物または植物細胞に導入し(例えば、ポリエチレングリコール媒介DNAにより行う)、次に、導入されたデサチュラーゼ遺伝子が、内在性デサチュラーゼ遺伝子との相長的組換えを受けた細胞を、当業者には公知の方法を用いて選択する。

#### 【0146】

別の実施形態では、導入された遺伝子の調節発現を可能にする選択された系を含む、微生物などの組換え生物を産生することができる。lacオペロンの制御下に置かれたベクターへのデサチュラーゼ遺伝子の組込みにより、例えば、IPTGの存在下でのみデサチュラーゼ遺伝子の発現が可能となる。これらの調節系は、当業者には公知である。

#### 【0147】

培養もしくは野生のいずれかで生育する、原核または真核宿主細胞などの、本発明の宿主細胞を用いて、デサチュラーゼを生産する(すなわち、発現させる)ことができる。植物では、エレクトロポレーションまたはアグロバクテリウム媒介遺伝子導入により、発育中の花にDNAを直接導入することからなる、さらに別の方法を用いることができる。従って、本発明はさらに、本発明の宿主細胞を用いてデサチュラーゼを生産する方法を提供する。一実施形態では、この方法は、本発明の宿主細胞(そこに、デサチュラーゼをコードする組換え発現ベクターが導入されているか、または、そのゲノムに、野生型もしくは改変型デサチュラーゼが導入されている)を適当な培地で生育し、デサチュラーゼを生産することからなる。さらに別の実施形態では、この方法は、培地または宿主細胞からデサチュラーゼを単離することを包含する。

#### 【0148】

本発明の核酸を取り込むのに一般的に適した宿主細胞、本発明の遺伝子産物、または本発明のベクターは、いずれの原核または真核生物であってもよい。有利に用いられる宿主生物は、細菌、真菌、酵母などの生物、動物細胞または植物細胞である。さらに有利な生物は、動物、あるいは、好ましくは、植物またはそれらの一部分である。真菌、酵母または植物を用いるのが好ましいが、特に、多量の脂質化合物を含有する油穀物などの植物、例えば、アブラナ、マツヨイグサ、キャノーラ、ラッカセイ、アマニ、ダイズ、ペニバナ、ヒマワリ、ルリヂサ;あるいは、トウモロコシ、コムギ、ライムギ、オートムギ、ライコムギ、コメ、オオムギ、ワタ、キャッサバ、コショウ、マンジュギクなどの植物;ジャガイモ、タバコ、ナスおよびトマトなどのナス科植物;ソラマメ属種、エンドウ、ムラサキウマヤゴシ、低木(コーヒー、カカオ、茶)、ヤナギ属種、樹木(ギネアアブラヤシ、ココナツ)ならびに、多年生草および飼料穀物が非常に好ましい。本発明において、特に好ましい植物は、ダイズ、ラッカセイ、アブラナ、キャノーラ、アマニ、マツヨイグサ、ヒマワリ、ペニバナ、樹木(ギネアアブラヤシ、ココナツ)などの油穀物である。

#### 【0149】

#### D. 単離されたデサチュラーゼ

本発明のさらに別の態様は、単離されたデサチュラーゼおよびその生物学的に活性な部分に関する。「単離された」または「精製された」タンパク質またはその生物学的に活性な部分とは、組換えDNA方法により生産された場合には細胞材料を本質的に含まず、また、化学的に合成された場合には化学的前駆体またはその他の化学物質を本質的に含まない。「細胞材料を本質的に含まない」という用語は、タンパク質が、それが天然にもしくは組換えにより生産される細胞の細胞成分から分離されたデサチュラーゼ調製物を意味する。一実施形態では、用語「細胞材料を本質的に含まない」は、非デサチュラーゼ(本明細書では、「汚染タンパク質」とも呼ぶ)の含有率が、約30%(乾量に基づく)より少ない、さらに好ましくは約20%より少ない、さらにまた好ましくは約10%より少ない、最も好ましくは約5%より少ないデサチュラーゼ調製物を意味する。デサチュラーゼまたはその生物学的に活性な部分が、組換え方法によって生産される場合には、これも、培養培地をほとんど含まない、すなわち、培養培地の量が、タンパク質調製物の量の約20%より少ない、さらに好ましくは約10%より少ない、最も好ましくは約5%より少ない。用語「化学的前駆体またはその他の化学物質を本質的に含まない」とは、タンパク質が、その合成に

10

20

30

40

50

関与する化学的前駆体またはその他の化学物質から分離されたデサチュラーゼ調製物を意味する。一実施形態では、用語「化学的前駆体またはその他の化学物質を本質的に含まない」とは、化学的前駆体または非デサチュラーゼ化学物質の含有率が、約30%（乾量に基づく）より少ない、さらに好ましくは約20%より少ない、さらにまた好ましくは約10%より少ない、最も好ましくは約5%より少ないデサチュラーゼ調製物を意味する。好ましい実施形態では、単離されたタンパク質またはその生物学的に活性な部分は、デサチュラーゼが由来する同じ生物からの汚染タンパク質を一切呈示しない。これらのタンパク質は、ヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*) もしくは前述の微生物：例えば、大腸菌、枯草菌、*C. グルタミンウム* (*C. glutamicum*) などの細菌、モルチェセラのような真菌、サッカロミセス属のような酵母、あるいは、コルピジウム (*Colpidium*) のような繊毛虫もしくはフェオダクチルム (*Phaeodactylum*) のような藻類において、通常、組換え発現により生産される。

#### 【0150】

本発明の単離されたデサチュラーゼまたはその一部分は、フェオダクチルム・トリコルヌーツム (*Phaeodactylum tricornutum*) における細胞膜の合成に必要な化合物の代謝、あるいは、これら膜を介した分子の輸送にも関与している可能性がある。好ましい実施形態では、上記タンパク質またはその一部分は、これらが、フェオダクチルム・トリコルヌーツム (*Phaeodactylum tricornutum*) における細胞膜の合成に必要な化合物の代謝、あるいは、これら膜を介した分子の輸送に関与する能力を保持する上で、配列番号2、4、6または12のアミノ酸配列と十分な相同性を有するアミノ酸配列を含む。上記タンパク質の一部分は、好ましくは、本明細書に記載されている生物学的に活性な部分である。さらに好ましい実施形態では、本発明のデサチュラーゼは、配列番号2、4、6または12に示すアミノ酸配列の1つを有する。さらに好ましい実施形態では、上記デサチュラーゼは、例えば、ストリンジェントな条件下で、配列番号1、3、5または11のヌクレオチド配列とハイブリダイズするヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列を有する。さらに別の好ましい実施形態では、上記デサチュラーゼは、配列番号2、4、6または18のアミノ酸配列の1つと、少なくとも約50~60%、好ましくは少なくとも約60~70%、より好ましくは少なくとも約70~80%、80~90%、90%~95%、さらに好ましくは少なくとも約96%、97%、98%、99%以上の相同性を有するヌクレオチド配列によりコードされたアミノ酸配列を有する。また、本発明の好ましいデサチュラーゼは、本明細書に記載したデサチュラーゼ活性の少なくとも1つを有するのが好ましい。例えば、本発明の好ましいデサチュラーゼは、例えば、ストリンジェントな条件下で、配列番号1、3、5または11のヌクレオチド配列とハイブリダイズし、かつ、フェオダクチルム・トリコルヌーツム (*Phaeodactylum tricornutum*) における細胞膜の合成に必要な化合物の代謝、あるいは、これら膜を介した分子の輸送に関与すると共に、1、2、3または4つの二重結合と、 $C_{18}$ 、 $C_{20}$ または $C_{22}$ の鎖長を有する脂肪酸に二重結合を導入することができるヌクレオチド配列によりコードされたアミノ酸配列を含む。

#### 【0151】

別の実施形態では、デサチュラーゼは、配列番号2、4または6のアミノ酸配列と本質的に相同であり、配列番号2、4または6の配列のうち1配列のタンパク質の機能的活性を保持するが、それらのアミノ酸配列は、前記の第I項で詳しく記載したように、自然突然変異または突然変異誘発によって異なる。さらに別の実施形態では、上記デサチュラーゼは、従って、配列番号2、4または6の完全アミノ酸配列と、少なくとも約50~60%、好ましくは少なくとも約60~70%、さらに好ましくは少なくとも約70~80%、80~90%、90%~95%、最も好ましくは少なくとも約96%、97%、98%、99%以上の相同性を有し、かつ、本明細書に記載したデサチュラーゼ活性の少なくとも1つを有するアミノ酸配列を含むタンパク質である。別の実施形態では、本発明は、配列番号2、4または6の完全アミノ酸配列と本質的に相同的な、完全なフェオダクチルム・トリコルヌーツム (*Phaeodactylum tricornutum*) タンパク質に関する。

#### 【0152】

デサチュラーゼの生物学的に活性な部分とは、デサチュラーゼのアミノ酸配列、例えば、配列番号2、4または6に示すアミノ酸配列から誘導されたアミノ酸配列、あるいは、デサチュラーゼと相同的なタンパク質のアミノ酸配列を含むペプチドを意味する。尚、上記ペプチドは、アミノ酸が、全長デサチュラーゼまたはデサチュラーゼと相同の全長タンパク質より少なく、かつ、デサチュラーゼの少なくとも1つの活性を有する。生物学的に活性な部分（ペプチド、例えば、長さが、例えば、5、10、15、20、30、35、36、37、38、39、40、50、100以上のアミノ酸を有するペプチド）は、通常、デサチュラーゼの少なくとも1つの活性を有するドメインまたはモチーフを包含する。さらに、これ以外にも、上記タンパク質のその他の領域が欠失した、生物学的に活性な他の部分を、組換え方法により産生し、前記活性の1以上に関して実験することができる。デサチュラーゼの生物学的に活性な部分は、好ましくは、生物学的活性を有する1以上の選択されたドメイン/モチーフまたはそれらの一部分を包含する。

10

**【0153】**

デサチュラーゼは、組換えDNA方法により生産されるのが好ましい。例えば、タンパク質をコードする核酸分子を発現ベクターにクローニングした（前記のように行う）後、発現ベクターを宿主細胞に導入し（前記のように行う）、デサチュラーゼを宿主細胞で発現させる。次に、適切な精製スキームにより、タンパク質精製の標準的方法を用いて、その細胞からデサチュラーゼを単離することができる。組換え発現の別の方法として、ペプチド合成の標準的方法により、デサチュラーゼ、デサチュラーゼポリペプチドまたはデサチュラーゼペプチドを化学的に合成することができる。さらに、例えば、本発明のデサチュラーゼまたはその断片を用いて、標準的技法により作製することができる抗デサチュラーゼ抗体を用いて、天然デサチュラーゼを細胞（例えば、内皮細胞）から単離することができる。

20

**【0154】**

本発明は、キメラデサチュラーゼタンパク質またはデサチュラーゼ融合タンパク質も提供する。本明細書で用いる「キメラデサチュラーゼタンパク質」または「デサチュラーゼ融合タンパク質」とは、非デサチュラーゼポリペプチドと機能的に結合されたデサチュラーゼポリペプチドを包含する。「デサチュラーゼポリペプチド」とは、デサチュラーゼに対応するアミノ酸配列を有するポリペプチドを意味するのに対し、「非デサチュラーゼポリペプチド」は、デサチュラーゼと本質的に相同的でないタンパク質（例えば、デサチュラーゼとは異なり、かつ、同じまたは別の生物に由来するタンパク質）に対応するアミノ酸配列を有するポリペプチドを意味する。融合タンパク質の範囲内で、「機能的に結合された」という用語は、デサチュラーゼポリペプチドと非デサチュラーゼポリペプチドが、互いに融合し、これによって、両配列が、使用した配列に特有とみなされる推定機能を果たす、という意味であることを理解すべきである。非デサチュラーゼポリペプチドは、デサチュラーゼポリペプチドのN末端またはC末端に融合することができる。一実施形態では、融合タンパク質は、例えば、デサチュラーゼ配列がGST配列のC末端に融合したEST-デサチュラーゼ融合タンパク質である。これらの融合タンパク質は、組換えデサチュラーゼの精製を促進することができる。さらに別の実施形態では、融合タンパク質は、異種シグナル配列（N末端）を有するデサチュラーゼである。特定の宿主細胞（例えば、哺乳動物細胞）では、異種シグナル配列を用いることにより、デサチュラーゼの発現および/または分泌を高めることができる。

30

40

**【0155】**

本発明のキメラデサチュラーゼタンパク質またはデサチュラーゼ融合タンパク質は標準的組換えDNA法により生産される。例えば、様々なポリペプチド配列をコードするDNA断片は、通常的方法を用いて、フレーム内で互いに連結させる。このような技法には、例えば、平滑末端または突出末端を用いた連結、制限酵素切断による適切な末端の賦与、付着末端の充填、必要に応じて、アルカリホスファターゼを用いた処理による不要な連結の除去、ならびに、酵素連結などがある。さらに別の実施形態では、融合遺伝子は、DNA合成装置などの通常的方法により、合成することができる。この他にも、アンカープライマーを

50

用いて、遺伝子断片のPCR増幅を実施することができる。このアンカープライマーは、連続する遺伝子断片の間に、相補的突出部を形成した後、これを互いにハイブリダイズさせ、再増幅することにより、キメラ遺伝子配列を産生する（例えば、Current Protocols in Molecular Biology、Ausubelら編、John Wiley & Sons：1992を参照）。さらに、融合単位（例えば、GSTポリペプチド）をすでにコードする多数の発現ベクターが市販されている。デサチュラーゼをコードする核酸をこのような発現ベクターにクローニングすることにより、融合単位をフレーム内でデサチュラーゼタンパク質に連結させることができる。

#### 【0156】

デサチュラーゼ相同体は、突然変異誘発、例えば、特異的 point 突然変異、あるいは、デサチュラーゼの切断により産生することができる。本明細書で用いる用語「相同体」とは、  
10 デサチュラーゼ活性のアゴニストまたはアンタゴニストとして作用するデサチュラーゼの変異型を意味する。デサチュラーゼアゴニストは、デサチュラーゼと同じ活性、もしくはデサチュラーゼの生物学的活性のいくつかを本質的に保持することができる。デサチュラーゼアンタゴニストは、例えば、デサチュラーゼなどの細胞膜成分の代謝カスケードの上流または下流エレメントとの競合的結合により、あるいは、細胞膜を介した化合物の輸送を媒介するデサチュラーゼと結合し、これによってトランスポレーションを阻害することにより、天然に存在するデサチュラーゼ形態の1以上の活性を阻害することができる。別の実施形態では、デサチュラーゼ相同体は、デサチュラーゼアゴニストまたはデサチュラーゼアンタゴニスト活性に関して、デサチュラーゼの突然変異体、例えば、トランケート  
20 型突然変異体のコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングすることにより、同定することができる。一実施形態では、コンビナトリアル突然変異誘発により核酸レベルでデサチュラーゼ変異体の多様性ライブラリーを産生した後、これを多様性遺伝子ライブラリーによりコードする。デサチュラーゼ変異型の多様性ライブラリーは、例えば、合成オリゴヌクレオチドの混合物を遺伝子配列に酵素連結することにより、潜在的デサチュラーゼ配列の縮重セットを個々のポリペプチドとして、あるいは、このデサチュラーゼ配列セットを含むさらに大きな融合タンパク質のセット（例えば、ファージディスプレイのための）として、発現させることができる。縮重オリゴヌクレオチド配列から潜在的デサチュラーゼ相同体のライブラリーを産生するのに用いることができる多数の方法がある。縮重遺伝子配列の化学的合成をDNA合成装置において実施した後、合成遺伝子を、適した発現ベクターに連結することができる。遺伝子の縮重セットを用いることにより、潜在的デサチュラーゼ配列の所望のセットをコードする全配列を混合物中に提供することができる。縮重オリゴヌクレオチドの合成方法は、当業者には公知である（例えば、Narang, S.A. (1983) Tetrahedron 39:3; Itakuraら (1984) Annu. Rev. Biochem. 53:323; Itakuraら (1984) Science 198:1056; Ikeら (1983) Nucleic Acids Res. 11:477を参照）。

#### 【0157】

さらに、デサチュラーゼ断片のライブラリーを用いて、デサチュラーゼ断片の多様性集団を産生し、デサチュラーゼの相同体のスクリーニングおよび後の選択に使用することができる。一実施形態では、二本鎖の切断が、1分子につき約1回しか発生しない条件下で、ヌクレアーゼでデサチュラーゼコード配列の二本鎖PCR断片を処理し、二本鎖DNAを変性し、二本鎖DNA（二本鎖切断を有する様々な産物のセンス/アンチセンス対を包含する）  
40 の形成で、上記DNAを再生し、新しく形成された二重らせんから、S1ヌクレアーゼでの処理により一本鎖部分を除去した後、得られた断片ライブラリーを発現ベクターと連結することにより、コード配列の断片のライブラリーを産生することができる。この方法を用いて、様々な大きさのデサチュラーゼのN末端、C末端および内部断片をコードする発現ライブラリーを誘導することができる。

#### 【0158】

点突然変異または切断により産生されたコンビナトリアルライブラリー中の遺伝子産物をスクリーニングする技法、ならびに、選択した特性を有する遺伝子産物のcDNAライブラリーをスクリーニングする技法は、当業者には多数知られている。これらの技法は、デサチュラーゼ相同体のコンビナトリアル突然変異誘発により産生した遺伝子ライブラリーの  
50

高速スクリーニングに適応させることができる。ハイスループット分析に付することができる、大きな遺伝子ライブラリーをスクリーニングするのに、最もよく用いられる技法は、通常、遺伝子ライブラリーを複製可能な発現ベクターにクローニングし、得られたベクターライブラリーで適切な細胞を形質転換した後、所望の活性の検出により、産物が検出された遺伝子をコードするベクターの単離を容易にする条件下で、コンビナトリアル遺伝子を発現することを含んでなる。逐次全体突然変異誘発 (REM: recursive ensemble mutagenesis)、すなわち、ライブラリーにおける機能的突然変異体の頻度を増加させる新規の技法を、スクリーニングアッセイと組み合わせる用いることにより、デサチュラーゼ相同体を同定することができる (ArkinおよびYourvan (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 7811-7815; Delgraveら (1993) Protein Engineering 6 (3): 327-331)。

10

## 【0159】

酵素、またはそれらをコードする遺伝子の触媒特性を修飾するのに知られている、別の技法は、遺伝子シャッフリング (例えば、Stemmer, PNAS 1994, 91: 10747-10751, WO 97/20078またはWO 98/13487を参照) であり、これは、遺伝子断片の組合せであり、その際、この新しい組合せを、誤ったポリメラーゼ連鎖反応により変異させ、これにより、検定しようとする高い配列多様性を生み出すことができる。しかし、このような手法を用いるための必要条件は、得られた遺伝子多様性を、機能性について試験するのに適したスクリーニング系である。

## 【0160】

PUFA依存性酵素活性を同定するスクリーニング方法は、特に、デサチュラーゼ活性をスクリーニングするための必要条件である。PUFAに対する特異性を有するデサチュラーゼ活性については、毒性代謝物 (ここでは、サリチル酸またはサリチル酸誘導体) の存在下でアラキドン酸の毒性をケカビ属 (Mucor) 種に用いて、これを、公知の形質転換方法 (Eroshinら, Mikrobiologiya, Vol. 65, No. 1, 1996, pp. 31-36) により、所望の遺伝子構築物で形質転換することにより、増殖に基づく一次スクリーニングを実施することができる。こうして得られたクローンを、ガスクロマトグラフィーおよび質量分析法により、脂質成分について分析し、出発材料および産物の種類および量を同定することができる。

20

## 【0161】

さらに別の実施形態では、細胞に基づくアッセイを用いて、当業者には公知のさらに別の方法により、多様性デサチュラーゼライブラリーを分析することも可能である。

30

## 【0162】

E. 本発明に従う使用およびプロセス/方法

本明細書に記載する核酸分子、タンパク質、タンパク質相同体、融合タンパク質、プライマー、ベクターおよび宿主細胞は、以下に挙げる方法の1つ以上に用いることができる: フェオダクチルム (Phaeodactylum) および関連する生物の同定、フェオダクチルム・トリコルヌーツム (Phaeodactylum tricornutum) と関連する生物のゲノムマッピング、目的とするフェオダクチルム・トリコルヌーツム (Phaeodactylum tricornutum) 配列の同定および局在化、進化研究、当該機能に必要なデサチュラーゼタンパク質領域の決定、デサチュラーゼ活性のモジュレーション; 1以上の細胞膜成分の代謝のモジュレーション; 1以上の化合物の膜透過輸送のモジュレーション、ならびに、ファインケミカルのような所望の化合物の細胞による生産のモジュレーション。本発明のデサチュラーゼ核酸分子は、多様な用途を有する。上記デサチュラーゼ核酸分子はまず、フェオダクチルム・トリコルヌーツム (Phaeodactylum tricornutum) またはこれらに近縁の系統として、生物を同定するのに用いることができる。また、上記核酸分子を用いて、微生物の混合集団におけるフェオダクチルム・トリコルヌーツム (Phaeodactylum tricornutum) もしくはこれらの近縁系統の存在を同定することができる。本発明は、一連のフェオダクチルム・トリコルヌーツム (Phaeodactylum tricornutum) 遺伝子の核酸配列を提供する。この生物の存在または非存在は、ストリンジェントな条件下で、微生物の均質または混合集団の培養物の抽出ゲノムDNAをスクリーニングすることにより、決定することができ、その際、上記生物に特有のフェオダクチルム・トリコルヌーツム (Phaeodactylum tricornutum) 遺

40

50

伝子の領域、またはこの遺伝子の一部の領域を覆うプローブを用いる。高度不飽和酸の商業的生産のためには、フェオダクチルム・トリコルヌーツム (*Phaeodactylum tricor nutum*) 自体が用いられており、さらには、特に、得られたPUFAをトリアシルグリセロール画分に組み込もうとする場合、フェオダクチルム・トリコルヌーツム (*Phaeodactylum tricornutum*) は、PUFAの生産に、また他の生物においても適している。

#### 【0163】

さらに、本発明の核酸およびタンパク質分子は、ゲノムの特定領域についてのマーカーとして働くことができる。これら分子は、ゲノムをマッピングするのに適しているだけではなく、フェオダクチルム・トリコルヌーツム (*Phaeodactylum tricor nutum*) タンパク質の機能研究にも適している。フェオダクチルム・トリコルヌーツム (*Phaeodactylum tricornutum*) の特定のDNA結合タンパク質が結合するゲノム領域を同定するためには、例えば、フェオダクチルム・トリコルヌーツム (*Phaeodactylum tricor nutum*) ゲノムを断片化した後、得られた断片をDNA結合タンパク質と一緒にインキュベートすることができる。このタンパク質と結合するものは、さらに、本発明の核酸分子、好ましくは、容易に検出可能なマーカーを用いて、スクリーニングすることができる。このような核酸分子とゲノム断片との結合により、フェオダクチルム・トリコルヌーツム (*Phaeodactylum tricor nutum*) のゲノムマップでの断片の局在化が可能になり、これを様々な酵素で繰り返し実施すれば、タンパク質が結合する核酸配列の迅速な決定が容易に行なわれる。さらに、本発明の核酸分子は、これら核酸分子が、関連する真菌または藻類におけるゲノムマップの構築用のマーカーとして働くのに、近縁種の配列と十分な相同性を有することができる。

#### 【0164】

本発明のデサチュラーゼ核酸分子は、進化研究、ならびに、タンパク質構造の研究にも適している。本発明の分子が関与する代謝および輸送工程は、多数の原核および真核生物細胞によって使用されている。近縁にある生物の進化度は、本発明の核酸分子の配列と、他の生物由来の類似酵素をコードする配列とを比較することにより決定することができる。従って、このような比較により、配列領域が保存されているもの、保存されていないものの決定が可能になり、酵素機能に必須のタンパク質の領域を決定する上で役立つと思われる。このタイプの決定は、タンパク質工学研究に有用であり、タンパク質が、その機能を欠失せずに、どの程度の突然変異誘発を許容できるのかを知る手がかりを提供することになるだろう。

#### 【0165】

本発明のデサチュラーゼ核酸分子の操作により、野生型デサチュラーゼに対して、機能が異なるデサチュラーゼの生産が可能になる。これらタンパク質の効力または活性を高める；これらを通常より多数、細胞に存在させる；あるいは、それらの効力または活性を低下させることが可能である。「効力または活性が高められる」とは、例えば、上記酵素が、本来の酵素より、高い選択性および/または活性、好ましくは、少なくとも10%高い活性、特に好ましくは、少なくとも20%高い活性、極めて好ましくは、少なくとも30%高い活性を有することを意味する。

#### 【0166】

本発明のデサチュラーゼの修飾が、このような修飾タンパク質を含むファインケミカルの収率、生産および/または生産効率に直接影響を与え得る一連の機構が存在する。ラージスケールでの繊毛虫、藻類または真菌の培養物からのファインケミカルの取得は、細胞が所望の化合物を分泌する場合、有意に改善される。なぜならば、これらの化合物は、培養培地から容易に単離することができるからである（培養細胞のバイオマスからの抽出とは対照的に）。あるいは、細胞が、一種の濃縮機構を備えた特別の細胞小器官中に *in vivo* で化合物を貯蔵する場合には、精製を改善することができる。デサチュラーゼを発現する植物では、輸送が増加すると、植物組織および植物器官内での分布が改善されると考えられる。細胞からファインケミカルを膜外へ輸送する輸送体分子の数または活性が増加すると、生産されるファインケミカル（細胞外培地に存在する）の量を増加させることができ、従って、回収および精製を容易にし、また、植物の場合には、分布がより効率的にな

る。対照的に、1以上のファインケミカルの効率的な過剰生産のためには、好適な生合成経路用の補因子、前駆体分子および中間体量の増加が必要である。炭素源（すなわち、糖）、窒素源（すなわち、アミノ酸、アンモニウム塩）、リン酸塩および硫黄などの栄養素の膜内への輸送に関与する輸送体タンパク質の数および/または活性が増加すると、生合成工程で利用可能な栄養素のあらゆる制限事項が排除されるため、ファインケミカルの生産を改善することができる。PUFAのような脂肪酸や、PUFAを含む脂質は、それ自体が望ましいファインケミカルである。これら化合物の生合成に関与する本発明の1以上のデサチュラーゼの活性を最適化する、またはその数を増加する、あるいは、これら化合物の異化作用に関与する1以上のデサチュラーゼの活性を破壊することにより、繊毛虫、藻類、植物、真菌、酵母またはその他の微生物における脂肪酸および脂質分子の収率、生産および/または生産効率を改善することができる。

10

**【0167】**

同様に、本発明に従う1以上のデサチュラーゼ遺伝子の操作によっても、活性が修飾されたデサチュラーゼが得られ、この修飾された活性は、藻類、植物、繊毛虫または真菌に由来する1以上の所望のファインケミカルの生産に間接的に影響を与える。正常な生化学代謝工程により、例えば、多数の老廃物（例えば、過酸化水素およびその他の反応性酸素種）が生産され、これら老廃物は、上記代謝工程を活発に破壊しうる（例えば、パーオキシナイトライトは、チロシン側鎖を硝化し、これによって、活性中心にチロシンを含むいくつかの酵素を不活性化することが知られている（Groves, J.T. (1999) *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3 (2) ; 226-235)）。これらの老廃物は、通常排泄されるが、ラージスケールでの発酵生産に用いられる細胞は、1以上のファインケミカルの過剰生産のために最適化されていることから、野生型細胞が通常生産するより、多くの老廃物を生産する。老廃物分子の細胞外への輸送に関与する本発明の1以上のデサチュラーゼの活性を最適化することにより、細胞の生存能力を改善すると同時に、効率的な代謝活性を維持することが可能になる。また、所望のファインケミカルが細胞内に多量に存在すると、実際に細胞に対して有毒となる恐れがあるため、該細胞がこれら化合物を分泌する能力を高めることにより、細胞の生存能力を改善することができる。

20

**【0168】**

さらに、本発明のデサチュラーゼを操作して、様々な脂質および脂肪酸分子の相対量を改変することもできる。このことにより、細胞膜の脂質組成に決定的な影響を及ぼしうる。脂質は種類に応じて、それぞれ異なる物理的特性を有するため、膜の脂質組成の改変は、膜の流動性を有意に改変することができる。膜の流動性における変化は、膜を介した分子の輸送に影響を与え、これによって、既に説明したように、老廃物や、生産されたファインケミカルの膜外への輸送、または必要な栄養素の膜内への輸送を改変することができる。このような膜の流動性の変化はまた、細胞統合性にも決定的な影響を及ぼし、比較的弱い膜を有する細胞は、非生物性および生物性ストレス状態を被りやすくなり、これによって、細胞は損傷もしくは死滅することもある。膜合成用の脂肪酸および脂質の生産に関与し、得られた膜が、ファインケミカルの生産に用いられる培養物を占める環境状態を被りやすい膜組成になるようなデサチュラーゼの場合には、このデサチュラーゼを操作することによって、より多くの細胞が、生存および増殖できるようにしなければならない。生産細胞の数が多いほど、培養物からのファインケミカルの収率、生産または生産効率が高くなるはずである。

30

40

**【0169】**

ファインケミカルの収率を高くすることを目的とする、デサチュラーゼに対する上記突然変異誘発戦略は、制限的と解釈すべきではなく、これら戦略の変種は、当業者には容易に明らかである。これら機構を用いて、かつ、本明細書に開示した機構を補助的に使用し、本発明の核酸およびタンパク質分子を用いて、突然変異したデサチュラーゼ核酸分子およびタンパク質分子を発現する、藻類、繊毛虫、植物、動物、真菌もしくは、*C. glutamicum* (*C. glutamicum*) などその他の微生物を産生し、これにより、所望の化合物の収率、生産および/または生産効率を高くすることができる。この所望の化合物は、藻類、繊

50

毛虫、植物、動物、真菌または細菌由来のあらゆる天然産物でよく、生合成経路の最終産物、ならびに、天然に存在する代謝経路の中間体、さらには、これら細胞の代謝では天然に存在しないが、本発明の細胞により生産される分子も包含される。

【0170】

本発明のさらに別の実施形態は、PUFAの生産方法であり、この方法は、脂肪酸分子中に少なくとも2個の二重結合がある $C_{18}$ -、 $C_{20}$ -または $C_{22}$ -脂肪酸を2炭素原子以上伸長させるポリペプチドをコードする、本発明の核酸、本発明の遺伝子構築物、または本発明のベクターを含有する生物を、PUFAが該生物において産生される条件下で培養することを含んでなる。この方法により生産したPUFAは、これらが成長する培養物、または野生のいずれかに由来する生物を採取し、採取した材料を有機溶剤で破壊および/または抽出することにより、単離することができる。脂質、リン脂質、スフィンゴ脂質、糖脂質、トリアシルグリセロールおよび/またはPUFAをより高い含量で含む遊離脂肪酸を含有する油を、この溶剤から単離することができる。PUFAをより高い含量で含む遊離脂肪酸は、脂質、リン脂質、スフィンゴ脂質、糖脂質およびトリアシルグリセロールの塩基性または酸性加水分解により単離することができる。より高いPUFA含量とは、本発明のデサチュラーゼをコードする追加核酸を含まないもとの生物と比較して、PUFAが少なくとも5%、好ましくは、10%、特に好ましくは、20%、極めて好ましくは、40%多いことを意味する。

10

【0171】

この方法により生産されるPUFAは、好ましくは、脂肪酸分子中に少なくとも2個の二重結合、好ましくは、3、4個、さらにはエロンガーゼおよび4-デサチュラーゼと組み合わせ、5または6個の二重結合を有する、 $C_{18}$ -、または $C_{20-22}$ -脂肪酸分子である。これらの $C_{18}$ -、または $C_{20-22}$ -脂肪酸分子は、油、脂質または遊離脂肪酸の形態で、生物から単離することができる。好適な生物の例は、前述の通りである。好ましい生物は、トランスジェニック植物である。

20

【0172】

本発明の実施形態は、前記方法により調製された油、脂質もしくは脂肪酸またはそれらの画分であり、特に好ましくは、PUFAを含み、かつ、トランスジェニック植物に由来する油、脂質または脂肪酸組成物である。

【0173】

本発明のさらに別の実施形態は、飼料、食物、化粧品または医薬品における上記油、脂質または脂肪酸組成物の使用である。

30

【0174】

本発明はさらに、デサチュラーゼのアンタゴニストまたはアゴニストを同定する方法であって、

- a) 本発明のポリペプチドを発現する細胞に候補物質を接触させ；
  - b) デサチュラーゼ活性を試験し；
  - c) そのデサチュラーゼ活性を、候補物質の非存在下での標準活性と比較する、
- ことを含んでなり、その際、標準より高いデサチュラーゼ活性は、その候補物質がアゴニストであることを示し、標準活性より低いデサチュラーゼ活性は、候補物質がアンタゴニストであることを示す、上記方法に関する。

40

【0175】

前記候補物質は、化学的に合成される、または微生物によって生産される物質でよく、例えば、植物、動物もしくは微生物の、例えば、細胞抽出物に存在するものでよい。さらに、前記物質は当業者には公知であるが、デサチュラーゼの活性を増加または逆転させることは知られていないであろう。反応混合物は、無細胞抽出物でもよいし、細胞または細胞培養物を含んでいてもよい。好適な方法は、当業者には公知であり、例えば、Alberts, Molecular Biology of the cell、第3版(1994)の例えば、第17章に概要が記載されている。前記物質は、例えば、反応混合物もしくは培養培地に添加することが、または、細胞に注入することが、あるいは、植物に噴霧することができる。

【0176】

50

本発明の方法により、活性な物質を含むサンプルが同定された場合には、もともとのサンプルから該物質を直接単離する、または、例えば、それが多数の異なる成分から構成されているときは、サンプルを様々なグループに分けて、1サンプル当たりの異なる物質の数を減らした後、もともとのサンプルのこのような「サブセット」を用いて、本発明の方法を繰り返す。サンプルの複雑さに応じて、上記段階を複数回繰り返すが、本発明の方法により同定されるサンプルが、少数の物質または1種の物質しか含まなくなるまで、繰り返すのが好ましい。好ましくは、本発明の方法により同定される物質、またはその誘導体をさらに配合することにより、それらを、植物栽培または植物細胞もしくは組織培養における使用に適したものにす。

【0177】

本発明の方法により同定および試験することができる物質として、下記のもので挙げられる：発現ライブラリー、例えば、cDNA発現ライブラリー、ペプチド、タンパク質、核酸、抗体、小さい有機物質、ホルモン、PNAなど (Milner, Nature Medicin 1 (1995)、879-880; Hupp, Cell. 83 (1995)、237-245; Gibbs, Cell. 79 (1994)、193-198およびそこで引用された文献)。これらの物質は、公知の阻害剤またはアクチベーターの機能的誘導体もしくは類似体であってもよい。化学的誘導体もしくは類似体を生産する方法は、当業者には公知である。従来の方法を用いて、既述の誘導体もしくは類似体を試験することができる。さらに、コンピュータ援用設計またはペプチド模擬物を用いて、好適な誘導体もしくは類似体を生産することも可能である。本発明の方法に用いられる細胞または組織は、前記実施形態で説明したように、本発明の宿主細胞、植物細胞または植物組織であるのが好ましい。

【0178】

従って、本発明はまた、前述した本発明の方法により同定された物質にも関する。この物質は、例えば、本発明のデサチュラーゼの相同体である。デサチュラーゼの相同体は、例えば、デサチュラーゼの点突然変異または欠失により、産生することができる。ここで用いる用語「相同体」とは、デサチュラーゼ活性に対するアゴニストまたはアンタゴニストとして働くデサチュラーゼの変異形態を意味する。アゴニストは、デサチュラーゼの生物学的活性と実質的に同じもの、もしくはその一部分を有していてもよい。デサチュラーゼのアンタゴニストは、天然に存在するデサチュラーゼの形態をした1以上の活性を阻害し、例えば、脂肪酸合成の代謝経路の下流または上流メンバー (デサチュラーゼを含む) と競合的に結合する、あるいは、デサチュラーゼと結合して、該活性を低減または阻害することができる。

【0179】

さらに、本発明はまた、抗体またはそのフラグメントに関し、この抗体またはそのフラグメントは、本明細書に記載したように、本発明のデサチュラーゼの活性を阻害する。

【0180】

本発明の一態様において、本発明は、本発明の前記アゴニストもしくはアンタゴニストを特異的に認識する、またはこれと結合する抗体に関する。

【0181】

さらに別の態様は、本発明の方法により同定された上記抗体、停止、またはアンチセンス分子を含む組成物に関する。

【0182】

本発明のさらに別の実施形態は、本発明の核酸、本発明の遺伝子構築物、本発明のアミノ酸配列、本発明のアンチセンス核酸分子、本発明の抗体および/または組成物、本発明の方法により産生されたアンタゴニストもしくはアゴニスト、および/または、本発明の油、脂質および/もしくは脂肪酸、あるいはそれらの画分を含む、キットに関する。このキットはまた、本発明の宿主細胞、生物もしくは植物、またはそれらの部分、採取することができる本発明の植物部分、または増殖物質、あるいは、本発明のアンタゴニストまたはアゴニストを含んでもよい。本発明のキットの成分は、例えば、バッファーもしくはその他の溶液と一緒に、またはそこに導入して、適当な容器に充填することができる。1以

10

20

30

40

50

上の前記成分を同一の容器に充填してもよい。さらに、あるいは、上記に代わり、1以上の前記成分を固体表面、例えば、ニトロセルロースフィルター、ガラスプレート、チップ、ナイロン膜またはマイクロプレート上に吸収させてもよい。このキットは、本明細書に記載した方法および実施形態のすべてに用いることができ、例えば、宿主細胞、トランスジェニック植物の生産、相同的配列の検出、アンタゴニストまたはアゴニストの同定などに用いることができる。さらに、このキットは、上記用途の1つに関し、該キットの使用方法についての指示を含んでいてもよい。

#### 【0183】

以下に示す実施例により、本発明をさらに詳しく説明するが、これらを制限的なものと解釈するべきではない。本明細書に引用する参考文献、特許出願、特許および公開特許出願のすべての内容は、本明細書に参照として組み込むものとする。

#### 【実施例】

#### 【0184】

##### 実施例1： 一般的方法

##### a) 一般的クローニング方法

例えば、制限切断、アガロースゲル電気泳動、DNA断片の精製、ニトロセルロースおよびナイロン膜への核酸の転写、DNA断片の連結、大腸菌および酵母細胞の形質転換、細菌の培養、ならびに、組換えDNAの配列分析などのクローニング方法は、Sambrookら(1989)(Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6)またはKaiser, MichaelisおよびMitchell(1994) "Methods in Yeast Genetics" (Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-451-3)に記載されているように実施した。クロレラ(*Chlorella*) またフェオダクチルム(*Phaeodactylum*)などの藻類の形質転換および培養は、El-Sheekh(1999)、*Biologia Plantarum* 42:209-216; Aptら(1996) *Molecular and General Genetics* 252(5): 872-9によって記載されているように実施する。

#### 【0185】

##### b) 化学物質

本明細書に特に記載のない限り、用いられる化学物質は、Fluka (Neu-Ulm)、Merck (Darmstadt)、Roth (Karlsruhe)、Serva (Heidelberg) およびSigma (Deisenhofen) から、分析グレードの品質のものを取得した。溶液は、Milli-Q水システム水精製ユニット (Millipore, Eschborn) から得た発熱物質を含まない純粋な水(本書では以後H<sub>2</sub>Oと称する)を用いて、調製した。制限エンドヌクレアーゼ、DNA修飾酵素および分子生物学キットは、AGS (Heidelberg)、Amersham (Braunschweig)、Biometra (Gottingen)、Boehringer (Mannheim)、Genomed (Bad Oeynhausen)、New England Biolabs (Schwalbach/Taunus)、Novagen (Madison, Wisconsin, USA)、Perkin-Elmer (Weiterstadt)、Pharmacia (Freiburg)、Qiagen (Hilden) およびStratagene (Amsterdam, the Netherlands) から取得した。特に記載のない限り、これらは、製造者の指示に従って使用した。

#### 【0186】

##### c) 細胞材料

本発明に従う単離された核酸は、フェオダクチルム・トリコルヌーツム (*Phaeodactylum tricornerutum*) UTEX646株のゲノムに存在するものであるが、このゲノムは、テキサス大学(オースチン)の藻類コレクションから入手可能である。

#### 【0187】

フェオダクチルム・トリコルヌーツム (*Phaeodactylum tricornerutum*) を、22 および35マイクロアインシュタイン (microEinstein) (1平方メートルおよび1秒当たりの1マイクロモルの光子に相当する) の14:10時間の明/暗光周期で、ガラス管において25 で培養し、そこに、底部から空気を通過させた。

#### 【0188】

フェオダクチルム・トリコルヌーツム (*Phaeodactylum tricornerutum*) に用いた培養培地は、Guillard, R.R.L. の10%有機媒質を補充したf/2培養培地であった(1975: *Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates*: Smith, W.L. およびChanley, M

10

20

30

40

50

.H. (編) Culture of marine Invertebrate animals, NY Plenum Press, pp. 29-60)。

これは、下記を含む：

995.5 mlの(人工)海水、

1 mlの $\text{NaNO}_3$  (75 g / l)、1 mlの $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (5 g / l)、1 mlの微量金属溶液、

1 mlのTris / Cl (pH 8.0)、0.5 mlのf / 2ビタミン溶液、

微量金属溶液： $\text{Na}_2\text{EDTA}$  (4.36 g / l)、 $\text{FeCl}_3$  (3.15 g / l)、

主要微量金属： $\text{CuSO}_4$  (10 g / l)、 $\text{ZnSO}_4$  (22 g / l)、 $\text{CoCl}_2$  (10 g / l)、 $\text{MnCl}_2$  (18 g / l)、 $\text{NaMoO}_4$  (6.3 g / l)、

f / 2ビタミン溶液：ピオチン：10 mg / l、チアミン200 mg / l、ビタミンB12 0.1 mg / l、

有機媒質：酢酸ナトリウム (1 g / l)、グルコース (6 g / l)、コハク酸ナトリウム (3 g / l)、バクト - トリプトン (4 g / l)、酵母エキス (2 g / l)

【0189】

実施例2：ハイブリダイゼーション実験用のフェオダクチルム・トリコルヌーツム (Phaeodactylum tricorutum) UTEX646からの全DNAの単離

全DNAの単離に関する詳細は、新鮮重量が1グラムの植物材料の調製 (work-up) を参照されたい。

【0190】

CTABバッファー：2% (w/v) 臭化N-アセチル-N,N,N-トリメチルアンモニウム (CTAB) ; 100 mM Tris-HCl、pH 8.0 ; 1.4 M NaCl ; 20 mM EDTA。

N-ラウリルサルコシンバッファー：10% (w/v) N-ラウリルサルコシン ; 100 mM Tris-HCl、pH 8.0 ; 20 mM EDTA。

【0191】

フェオダクチルム・トリコルヌーツム (Phaeodactylum tricorutum) 細胞材料を、乳鉢内の液体窒素下において粉碎することにより、微粉を取得し、これを2mlエッペンドルフ容器に移した。次に、凍結植物材料を1mlの分解バッファー層 (1ml CTABバッファー、100 ml N-ラウリルサルコシンバッファー、20 ml メルカプトエタノールおよび10 ml プロテイナーゼK溶液、10 mg/ml) に浸し、連続的に振盪しながら、60 で1時間インキュベートした。得られたホモジネートを2つのエッペンドルフ容器 (2ml) に分配し、等量のクロロホルム / イソアミルアルコール (24 : 1) を用いて、振盪しながら2回抽出した。相分離のために、それぞれについて、8,000 x gおよびRT (= 室温 = 約23 ) で、遠心分離を15分実施した。次に、氷冷イソプロパノールを用いて、DNAを - 70 で30分沈殿させた。沈殿したDNAを4 および10,000 gで30分沈降させた後、180 mlのTEバッファー中で再懸濁させた (Sambrookら、1989、Cold Spring Harbor Laboratory Press : ISBN 0-87969-309-6)。さらに精製するため、DNAをNaCl (1.2 M最終濃度) で処理した後、2倍量の無水エタノールを用いて、- 70 で30分再度沈殿させた。70%濃度のエタノールを用いた洗浄段階の後、DNAを乾燥させてから、50 mlの $\text{H}_2\text{O}$  + RNase (50 mg/ml最終濃度) 中に入れた。DNAを4 で一晩溶解させた後、RNase切断を37 で1時間実施した。こうして得られたDNAを4 で保存した。

【0192】

実施例3：植物およびフェオダクチルム・トリコルヌーツム (Phaeodactylum tricorutum) からの全RNAおよびポリ(A)<sup>+</sup>RNAの単離

Logemannら (1987, Anal. Biochem. 163, 21) により記載された方法で、全RNAをアマニおよびアブラナなどの植物から単離した。コケからの全RNAを原系体組織からGTC法を利用して取得した (Reskiら、1994、Mol. Gen. Genet., 244 : 352-359)。

【0193】

フェオダクチルム・トリコルヌーツム (Phaeodactylum tricorutum) からのRNAの単離：

藻類の凍結サンプル (- 70 ) を液体窒素下の氷冷乳鉢中で粉碎することにより微粉を取得する。2容量の均質化培地 (12.024 gのソルビトール、40.0 ml の1M Tris-HCl、PH 9 (0.2 M) ; 12.0 mlの5 M NaCl (0.3 M)、8.0 mlの250 mM EDTA、761.0 mgの EGTA、40

10

20

30

40

50

.0 mlの10% SDSをH<sub>2</sub>Oと一緒に、200 mlになるまで調製し、pHを8.5にする)と、0.2%メルカプトエタノールを含む4容量のフェノールとを十分に混合しながら、40~50 で、上記凍結細胞粉末に添加する。次に、2容量のクロロホルムを添加し、混合物を15分激しく攪拌した。得られた混合物を10,000 gで10分遠心分離した後、フェノール/クロロホルム(2容量)、次に、クロロホルムを用いて、水相を抽出する。

#### 【0194】

こうして得られた水相の全量を、1/20容量の4 M酢酸ナトリウム(pH 6)と1容量の(氷冷)イソプロパノールで処理した後、核酸を-20 で沈降させる。混合物を10,000 gで30分遠心分離し、上清を吸入により除去する。この後、70%濃度のEtOHでの洗浄段階と、もう1回の遠心分離段階が続く。沈殿物をトリスホウ酸バッファー(80 mM トリスホウ酸バッファー、10 mM EDTA、pH 7.0)中に溶解させる。次に、上清を1/3容量の8 M LiClで処理し、混合した後、4 で30分インキュベートする。遠心分離の後、沈殿物を70%濃度のエタノールで洗浄し、遠心分離に付してから、沈殿物を、RNaseを含まない水に溶解させる。

10

#### 【0195】

ポリ(A)<sup>+</sup>RNAは、Dyna Beads(登録商標)(Dynal, Oslo, Norway)を用いて、製造者のプロトコルにある指示に従って単離する。

#### 【0196】

RNAまたはポリ(A)<sup>+</sup>RNA濃度を決定した後、1/10容量の3 M酢酸ナトリウム(pH 4.6)と2容量のエタノールを添加することにより、RNAを沈降させ、-70 で保存する。

20

#### 【0197】

分析のために、ホルムアルデヒドを含有する1.5%濃度アガロースゲル中で、20 µg部のRNAを分離し、ナイロン膜(Hybond, Amersham)に転写する。Amasino((1986) Anal. Biochem. 152, 304)の記載に従い、特定の転写物を検出する。

#### 【0198】

#### 実施例4: cDNAライブラリーの構築

フェオダクチルム・トリコルヌーツム(Phaeodactylum tricornutum)からcDNAライブラリーを構築するために、マウス白血病ウイルス逆転写酵素(Roche, Mannheim, Germany)と、オリゴ-d(T)プライマーを用いて、第1鎖合成を実施すると同時に、DNAポリメラーゼI、すなわち、クレノウ酵素と一緒にインキュベートした後、RNase Hを用いて、12 で2時間、16 で1時間および22 で1時間切断することにより、第2鎖合成を実施した。65 でのインキュベーション(10分)により、反応を停止した後、氷に移した。37 で(30分)、T4 DNAポリメラーゼ(Roche, Mannheim)を用いて、二本鎖DNA分子を平滑末端にした。フェノール/クロロホルム、およびSephadex G50スピнкаラムを用いた抽出により、ヌクレオチドを除去した。T4 DNAリガーゼ(Roche、12 、一晚)を用いて、EcoRI/XhoIアダプター(Pharmacia, Freiburg, Germany)をcDNA末端に連結した後、XhoIで再切断し、ポリヌクレオチドキナーゼ(Roche、37 、30分)を用いたインキュベーションによりリン酸化した。この混合物を低融点アガロースゲル上で分離に付した。300を超える塩基対からなるDNA分子をゲルから溶離し、フェノールで抽出し、Elutip Dカラム(SchleicherおよびSchull, Dassel, Germany)で濃縮させ、ベクターアームに連結した後、ギガパックゴールド(Gigapack Gold)キット(Stratagene, Amsterdam, the Netherlands)を用いて、製造者の材料を使用し、かつ、製造者の指示に従い、-ZAP-発現ファージにパッケージングした。

30

40

#### 【0199】

#### 実施例5: DNA配列決定およびコンピュータ解析

実施例4に記載したcDNAライブラリーを用いて、標準的方法、特に、ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit(Perkin-Elmer, Weiterstadt, Germany)を用いた連鎖終止反応法により、DNAの配列決定を実施した。cDNAライブラリーからプラスミドを調製した後、in vivo大量除去に続き、寒天プレート上でのDH10Bの再形質転換により、個々のランダムクローンの配列決定を実施した(材料およびプロトコルにつ

50

いての詳細：Stratagene, Amsterdam, the Netherlands)。Qiagen DNA調製ロボット (Qiagen, Hilden) を用いて、製造者のプロトコルに従い、アンピシリンを補充したルリア (Luria) 培地 (Sambrookら (1989) (Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-879 69-309-6) を参照) 中で一晩生育した大腸菌培養物から、プラスミドDNAを調製した。下記のヌクレオチド配列を有する配列決定用プライマーを用いた：

5' -CAGGAAACAGCTATGACC-3'

5' -CTAAAGGGAACAAAAGCTG-3'

5' -TGTAACGACGGCCAGT-3'

配列をプロセッシングし、Bio-Max (Munich, Germany) から市販されているEST-MAX標準ソフトウェアパッケージを用いて、記録した。比較アルゴリズムを利用し、配列番号 8 に示した検索用配列を用いて、相同遺伝子を検索し、BLASTプログラム (Altschulら (1997) "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402) を使用した。フェオダクチルム・トリコルヌーツム (*Phaeodactylum patens*) の検索用配列と相同性を有するフェオダクチルム・トリコルヌーツム (*Phaeodactylum tricornutum*) からの 2 配列をさらに詳しく分析した。

【 0 2 0 0 】

実施例 5a: 変性オリゴヌクレオチドを用いたポリメラーゼ連鎖反応によるフェオダクチルム・トリコルヌーツム (*Phaeodactylum tricornutum*) デサチュラーゼの単離

公開されたデサチュラーゼにより、5-および 6-デサチュラーゼに特有のモチーフを同定することができる。考えられる変異を有するオリゴヌクレオチド配列を以下に示す。オリゴヌクレオチド配列の下に、塩基組合せを誘導することができるアミノ酸を一文字表記で示す。例えば、A/Gとは、対応するアミノ酸から誘導される塩基トリプレットは、AAAまたはAAGのいずれかであると考えられるため、単位 (unit) を合成したとき、AまたはGのいずれかが、この位置でオリゴヌクレオチドにランダムに組み込まれていることを意味する。上記DNA配列は、この位置での塩基を決定することにより、遺伝コードによる 3 または 4 個の異なる塩基が可能になれば、イノシン (i) を含む可能性がある。以下の配列およびプライマーを用いることができる：

10

20

## 5'-フォワードプライマー

F1a: TGG TGG AA A/G TGG AAI CA T/C AA  
 F1b: TGG TGG AA A/G TGG ACi CA T/C AA  
 F1a: W W K W N/T H K/N  
 F1b: W W K W K H K/N

F2a: Gi TGG AA A/G GAI A/C Ai CA T/C AA  
 F2b: Gi TGG AA A/G TTG A/C Ai CA T/C AA  
 F2a: G/W W K E/D K/Q/N H K/N  
 F2b: G/W W K W K/Q/N H K/N

10

F3a: T A/T i TTG AAI A/C A A/G C/A G/A i CA  
 F3b: T A/T i TTG AAI A/C A A/G CAi CA  
 F3a: W W K/N H/N R/Q H  
 F3b: Y W K/N H/N R/Q H

F4a: GTi TGG A A/T G/A GA A/G CA A/G CA  
 F4b: GTi TGG A A/T G/A A/T A T/C CA A/G CA  
 F4a: V W K/M E Q H  
 F4b: V W K/M N/Y Q H

F5a1: CA T/C TA T/C TGG AA A/G AA T/C CA G C  
 F5a1: CA T/C TA T/C TGG AA A/G AA T/C CA A C

20

F5a1: H Y W K N Q H/Q  
 F6a: TTG TTG AAI A/C A A/G AA i CA T/C AA

F6a: W W K/N H/N K/N H K/N

3'-リバースプライマー

R1b:	GG	A/G	AA	iAG	G/A	TG	G/A	TG	T/C	TC		
R1b:	GG	A/G	AA	iAA	G/A	TG	G/A	TG	T/C	TC		
R1a:	P		F	L		H		H		E		
R1b:	P		F	F		H		H		E		
R2a1:	AA	iAG	A/G	TG	A/G	TG	iA	C/T	iA/G	T/C	TG	
R2a2:	AA	T/C	AA	A/G	TG	A/G	TG	iA	C/T	iA/G	T/C	TG
R2a1:	F		L		H		H	V/I		V/A	Q	
R3a1:	AT	iTG	iGG	A/G	AA	iAA	A/G	TG	A/G	TG		
R3a2:	AT	A/G	TT	iGG	A/G	AA	iAA	A/G	TG	A/G	TG	
R3a3:	AT	iTG	iGG	A/G	AA	iAG	A/G	TG	A/G	TG		
R3a4:	AT	A/G	TT	iGG	A/G	AA	iAG	A/G	TG	A/G	TG	
R3a1:	I/M	H/Q		P	F		F		H		H	
R3a2:	I/M	N		P	F		L		H		H	
R4a1:		CT	iGG	A/G	AA	iA	A/G	A/G	TG	A/G	TG	
R4a2:		GA	iGG	A/G	AA	iA	A/G	A/G	TG	A/G	TG	
R4a3:		GT	iGG	A/G	AA	iA	A/G	A/G	TG	A/G	TG	
R4a1:	=	T/R/S	P	F		F/L		H		H		
R5a1:	AA	iAA	A/G	TG	A/G	TG	T/C	TC	T/A/G	AT	T/C	TG
R5a2:	AA	iAG	A/G	TG	A/G	TG	T/C	TC	T/A/G	AT	T/C	TG
R5a1:	F	F		H		H		E		I		Q
R5a2:	F	L		H		H		E		I		Q
R6a1:	T	iGG	iA	A/G	iAA	A/G	TG	A/G	TG	iAC		
R6a1:	T	iGG	iA	A/G	iAG	A/G	TG	A/G	TG	iAC		
R6a1:	T/N		P	L		F/L		H		H	V	

【0201】

多様な変異の可能性があるため、多数の誘導オリゴヌクレオチドが可能であるが、驚いたことに、示したオリゴヌクレオチドは、デサチュレートを単離するのに特に適していることがわかった。

【0202】

プライマーは、あらゆる組合せでポリメラーゼ連鎖反応に用いることができる。下記の条件を考慮して、個々の組合せにより、デサチュラーゼ断片を単離することができた：PCR反応については、各ケースで、10 nMolのプライマーと、in vivo切除により得られた10 ngのプラスミドライブラリーを用いた。製造者（Stratagene）のプロトコルに従い、ファージライブラリーからプラスミドライブラリーを単離することができた。Pfu DNAポリメラーゼ（Stratagene）を用いて、サーモサイクラー（Biometra）においてPCR反応を実施した。その際の温度プログラムは次の通りである：96 で3分の後に、96 で30秒、55 で30秒、72 で1分を35サイクル。55 での第1段階の後、アニーリング温度をそれぞれ、3 ずつ段階的に下げ、第5サイクル以後は、アニーリング温度を40 に維持した。最後に、72 で10分のサイクルを1回実施し、4 まで冷却することにより、反応を停止させた。

【0203】

プライマーの組合せF6aおよびR4a2は、本文中に下線をつけて示し、これらを利用してデサチュラーゼ断片の単離を達成することができた。配列決定により、得られた断片を確認した。その結果、該断片は、Genbank登録番号T36617のストレプトミセス・コエリコロール（*Streptomyces coelicolor*）デサチュラーゼとの相同性を示した。相同性は、BLASTPプログラムを援用して取得した。アラインメントを図4に示す。34%の同一性と、43%の

相同性が明らかになった。ハイブリダイゼーション実験における実施例7に示すように、本発明に従い、DNA断片を用いて、標準的条件下で全長遺伝子を単離した。

【0204】

このようにして単離されたDNA配列のコード領域を、ポリペプチド配列への遺伝コードを翻訳することにより取得した。配列番号3は、前記方法により単離した、長さが1434塩基対の配列を示す。この配列は、位置1～3に開始コドンを、また、位置1432～1434に停止コドンを有し、長さが477アミノ酸のポリペプチドに該配列を翻訳することができた。WO 98/46763に記載されている遺伝子配列とのアラインメントから、同一ではないが、相同である87アミノ酸をコードするフェオダクチルム・トリコルヌーツム (*Phaeodactylum tricornutum*) 断片は、すでに記載されていたことがわかった。しかし、WO 98/46763は、完全な、機能的に活性なデサチュラーゼも、位置または基質特異性のいずれも開示していない。これはまた、特定の機能を示さずに、モルティエレラ・アルピナ (*Mortierella alpina*) 由来の5-および6-デサチュラーゼの両方との相同性が報告されていることから、明らかである。これに対し、本発明の配列は、機能的に活性な6-アシル脂質デサチュラーゼをコードする。

10

【0205】

実施例6：フェオダクチルム・トリコルヌーツム (*Phaeodactylum tricornutum*) デサチュラーゼをコードするDNA配列の同定

TBLASTN検索アルゴリズム援用の配列アラインメントには、ヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*) 由来の6-アシル脂質デサチュラーゼPp\_des6 AJ222980 (NCBI Genbank登録番号) の全長配列 (表1を参照) およびモルティエレラ・アルピナ (*Mortierella alpina*) AF110509 (AF110509 NCBI Genbank登録番号) 由来の12-アシル脂質デサチュラーゼ配列を用いた。

20

【0206】

ヒメツリガネゴケおよびモルティエレラ由来の検索用配列との相同性が低かったことから、候補遺伝子の中でも、EST配列PT0010070010R、PT001072031RおよびPT001078032Rをまず標的遺伝子とみなした。図1、2および2aは、みいだされた2つのEST配列の結果を示す。みいだされた配列は、配列番号1 (遺伝子名: Pt\_des5、発明者のデータベースNo. PT001078032R)、配列番号5 (遺伝子名: Pt\_des12、発明者のデータベースNo. PT0010070010R) および配列番号11 (遺伝子名: Pt\_des12.2、発明者のデータベースNo. PT001072031R) の本発明に従う核酸の部分である。文字は、同一のアミノ酸を示すのに対し、+の記号は、化学的に類似したアミノ酸を表している。本発明に従ってみいだされた配列すべての同一性および相同性については、表2に概要を示す。

30

【0207】

デサチュラーゼは、シトクロムb5ドメインを有することがあるが、これは、デサチュラーゼをコードしない他の遺伝子でも起こる。従って、シトクロムb5ドメインは、遺伝子機能が違っていても、高い相同性を示す。弱い保存領域内で、デサチュラーゼだけを推定候補遺伝子として同定することができ、酵素活性および酵素機能の位置特異性について試験しなければならない。例えば、デサチュラーゼのような様々なヒドロキシラーゼ、アセチレナーゼおよびエポキシゲナーゼは、ヒスチジンボックスモチーフも示すことから、実験によって特定の機能を証明しなければならないが、二重結合の確認でしか、デサチュラーゼの酵素活性および位置特異性を証明することはできない。驚いたことに、本発明の6-および5-デサチュラーゼは、特に好適な基質特異性を有し、かつ、ヒメツリガネゴケ6-エロンガーゼと組み合わせ、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸およびドコサヘキサ酸のような高度不飽和脂肪酸を生産するのに用いる上で特に適していることがわかった。

40

【0208】

クローンPT001078032R由来の全cDNA断片の配列決定により、長さが1652塩基対の配列であることが明らかにされた。この配列は、配列番号2に示す469アミノ酸のポリペプチドをコードする。この配列は、塩基対位置115～117に開始コドンを、また、塩基対位置1522

50

~1524に停止コドンを含む配列番号1の遺伝コードを翻訳することにより取得した。このクローンは、図3の配列アラインメントからわかるように、完全なデサチュラーゼポリペプチドを含む。線は、同一のアミノ酸を示し、また、コロンおよび点は、化学的に交換可能な、すなわち、化学的に同等のアミノ酸を表す。アラインメントは、Henikoff & Henikoff's BLOSUM62置換マトリックス((1992) Amino acid substitution matrices from protein blocks. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-10919)を用いて実施した。用いたパラメーターは次の通りである：ギャップ加重が8；平均マッチが2.912、長さ加重が2、平均ミスマッチが-2.003。図6および図7に、みいだされた配列を有するMA\_des12ポリペプチド配列のアラインメントを示す。

【0209】

クローンPT0010070010R由来の全cDNA断片の配列決定により、長さが1651塩基対の、配列番号5に示す配列であることが明らかにされ、塩基対位置67~69に開始コドンを、また、塩基対位置1552~1554に停止コドンを有する。本発明のポリペプチド配列を配列番号6に示す。

【0210】

クローンPT0010072031Rから同定された全cDNA断片の配列決定により、長さが1526塩基対の配列であることが明らかにされ、この配列は、塩基対位置92~94に開始コドンを、また、塩基対位置1400~1402に停止コドンを有する配列番号11に示す。本発明のポリペプチド配列を配列番号12に示す。

【0211】

表2は、本発明のデサチュラーゼ同士の、ならびに、ヒメツリガネゴケ(*Physcomitrella patens*)およびモルティエレラ・アルピナ(*Mortierella alpina*)デサチュラーゼとの、同一性および相同性を示す。データは、ソフトウェア: Wisconsin Package Version 10.0 (Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisc., USA)のサブプログラムとして、以下に示す所与のパラメーターに従い、ベストフィット(Bestfit)プログラムを援用して得られた。Henikoff, S.およびHenikoff, J.G. (1992). Amino acid substitution matrices from protein blocks. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-10919。

【0212】

さらに、図5はヒメツリガネゴケ 6-アシル脂質デサチュラーゼとクローンPt\_des6のポリペプチド配列とのアラインメントを示す。

【表2】

表2

相同性/同一性 (%)	検索用配列 Pp_des6	検索用配列 Ma_des12
Pt_des5	34.92/26.37	n. d.
Pt_des6	50.69/41.06	n. d.
Pt_des12	n. d.	48.58/38.92
Pt_des12.2	n. d.	48.37/41.60

n. d. = 測定せず

【0213】

アルゴリズムTBLASTN 2.0.10 (Alschulら、1997, " Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs ", Nucleic Acids Res.25:3389-3402)を用いて、最も高い配列相同性を有する配列を局部データベースアラインメントにより同定した。結果を以下の表2Aに示す。

## 【表 2 A】

表 2 A: 配列番号 2、4、6 または 12 に示す本発明のポリペプチドと最も高い  
相同性または同一性を有する相同体

相同性／同一性 (%)	検索用配列 PT001070010R	検索用配列 PT001072031R	検索用配列 PT001078032R	検索用配列 PT_des6
L26296: Fad2 A. thaliana	50% / 37%	n. d.	n. d.	n. d.
U86072 Petroselinum crispum Fad2	n. d.	51/40	n. d.	n. d.
AL358652 L. major 推定 デサチュラーゼ	n. d.	n. d.	45/30	n. d.
AB020032 M. alpina Δ6 デサチュラーゼ	n. d.	n. d.	n. d.	53/38

10

## 【 0 2 1 4 】

## 実施例 7: ハイブリダイゼーションによる遺伝子の同定

遺伝子配列を用いて、cDNA またはゲノムライブラリーから、相同または異種遺伝子を同定することができる。

20

## 【 0 2 1 5 】

相同遺伝子（すなわち、相同的または相同体である全長 cDNA クローン）は、例えば、cDNA ライブラリーを用いた核酸ハイブリダイゼーションにより単離することができる。尚、この方法を用いて、特に、配列番号 3 に示す配列の、機能的に活性な全長遺伝子を単離することができる。目的とする遺伝子の頻度に応じて、100,000 から 1,000,000 組換えバクテリオファージを培養し、ナイロン膜に移す。アルカリによる変性の後、例えば、UV 架橋により DNA を膜の上に固定化する。高度にストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションを実施する。イオン強度が 1 M NaCl、温度 68 °C の水溶液中でハイブリダイゼーションおよび洗浄段階を実施する。例えば、放射性 ( $^{32}\text{P}$ -) ニック転写を用いた標識付け (High Prime, Roche、ドイツ、マンハイム) により、ハイブリダイゼーションプローブを産生した。オートラジオグラフィーによりシグナルを検出した。

30

## 【 0 2 1 6 】

低ストリンジェンシーハイブリダイゼーションおよび洗浄条件を用いて、前記方法と同様に、近縁ではあるが、同一ではない、部分的に相同または異種の遺伝子を同定できる。水性ハイブリダイゼーションのために、イオン強度を通常 1 M NaCl に維持し、温度を 68 °C から 42 °C へと徐々に下げた。

## 【 0 2 1 7 】

例えば、10~20 アミノ酸の個々のドメインに関する相同性しか示さない遺伝子配列の単離は、合成、放射性同位元素標識オリゴヌクレオチドプローブを用いて、実施することができる。放射性同位元素標識オリゴヌクレオチドは、T4 ポリヌクレオチドキナーゼで、2 つの相補的オリゴヌクレオチドの 5' 末端をリン酸化することにより、産生する。相補的オリゴヌクレオチドをハイブリダイズし、互いに連結することにより、コンカテマーを産生する。二本鎖コンカテマーを例えば、ニック転写により、放射性同位元素標識する。ハイブリダイゼーションは、通常、オリゴヌクレオチド高濃縮物を用いて、低ストリンジェンシー条件下で実施する。

40

## 【 0 2 1 8 】

オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション溶液:

6 × SSC

0.01 M リン酸ナトリウム

50

1 mM EDTA (pH 8)

5% SDS

100 µg/ml 変性サケ精子DNA

0.1% 低脂肪粉ミルク

【0219】

ハイブリダイゼーションの間、温度を、計算されたオリゴヌクレオチド温度より5~10低い温度または室温（特に記載のない限り、すべての実験で、室温=23前後）まで段階的に下げた後、洗浄段階およびオートラジオグラフィーを実施する。洗浄は、極めて低いストリンジェンシーで実施され、例えば、4×SSCを用いて、3回実施する。さらに詳しくは、下記に記載されている：Sambrook, J.ら（1989）“Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, Cold Spring Harbor Laboratory Press、もしくはAusubel, F.M.ら（1994）“Current Protocols in Molecular Biology”, John Wiley & Sons.

10

【0220】

実施例8：抗体を用いた発現ライブラリーのスクリーニングによる標的遺伝子の同定

cDNA配列を用いて（例えば、Qiagen QIAexpress pQE系）、例えば、大腸菌において、組換えタンパク質を産生する。次に、通常、Ni-NTAアフィニティークロマトグラフィー（Qiagen）により、組換えタンパク質をアフィニティー精製する。そして、組換えタンパク質を用いて、例えば、ウサギを免疫する標準的技法に従い、特定の抗体を誘導する。次に、Guらにより、（1994）BioTechniques 17:257-262に記載されているように、組換え抗原で予め脱飽和させたNi-NTAカラムを用いて、抗体をアフィニティー精製する。得られた抗体を用いて、免疫スクリーニングにより、発現cDNAライブラリーをスクリーニングできる（Sambrook, J.ら（1989）, “Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, Cold Spring Harbor Laboratory Press、もしくはAusubel, F.M.ら（1994）“Current Protocols in Molecular Biology”, John Wiley & Sons）。

20

【0221】

実施例9：アグロバクテリウムの形質転換

アグロバクテリウム媒介による植物形質転換は、例えば、アグロバクテリウム・ツメファシエンス株GV3101-(pMP90-) (KonczおよびSchell, Mol. Gen. Genet. 204 (1986) 838-396) またはLBA4404- (Clontech) もしくはC58C1 pGV2260 (Delblaereら、1984, Nucl. Acids Res. 13, 4777-4788) を用いて、達成することができる。形質転換は、標準的方法（Delblaereら、1984, 同上）を用いて達成することができる。

30

【0222】

実施例10：植物形質転換

アグロバクテリウム媒介による植物形質転換は、標準的形質転換方法および再生方法を用いて、実施することができる。（Gelvin, Stanton B., Schilperoort, Robert A., Plant Molecular Biology Manual, 第2版、Dordrecht: Kluwer Academic Publ., 1995, Sect., Ringbuc Zentrale Signatur: BT11-P ISBN 0-7923-2731-4; Glick, Bernard R., Thompson, Jhon E., Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, Boca Raton: CRC Press, 1993, 360 pp., ISBN 0-8493-5164-2）。

40

【0223】

例えば、子葉または胚軸形質転換（Moloneyら、Plant Cell Report 8 (1989) 238-242; De Blockら、Plant Physiol. 91 (1989) 694-701) により、アブラナを形質転換することができる。アグロバクテリウムおよび植物の選択のための抗生物質の使用は、形質転換に用いるバイナリーベクターおよびアグロバクテリウム株に応じて違ってくる。アブラナの選択は、通常、選択植物マーカーとしてカナマイシンを用いて実施する。

【0224】

アマニ（Linum usitatissimum）におけるアグロバクテリウム媒介による遺伝子導入は、例えば、Mlynarovaら（1994）Plant Cell Report 13:282-285により記載された技法を用いて、実施することができる。

【0225】

50

ダイズの形質転換は、例えば、EP-A-0 0424 047 (Pioneer Hi-Bred International) またはEP-A-0 0397 687、米国特許第5,376,543号、米国特許第5,169,770号(トレド大学)に記載された技法を用いて、実施することができる。

【0226】

粒子ボンバードメント、ポリエチレン-グリコール媒介DNA取込みを用いた、あるいは、シリコンカーボネートファイバー技法による植物形質転換については、例えば、FreelingおよびWalbot (“The maize handbook” (1993) ISBN 3-540-97826-7, Springer Verlag New York)により記載されている。

【0227】

実施例11: 植物形質転換用のプラスミド

植物形質転換には、pBinAR (HofgenおよびWillmitzer, Plant Science 66 (1990) 221-230) またはpGPTV (Beckerら、1992, Plant Mol. Biol. 20:1195-1197) のようなバイナリーベクター、もしくはそれらの誘導体を用いることができる。バイナリーベクターは、センスまたはアンチセンス配向のcDNAをT-DNAに連結することにより構築することができる。cDNAの5'側の植物プロモーターは、cDNA転写を活性化する。ポリアデニル化配列は、cDNAの3'側に位置する。バイナリーベクターは、様々なマーカー遺伝子を含むことができる。特に、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼにより媒介されるカナマイシン耐性をコードするnptIIマーカー遺伝子は、アセトラクテートシンターゼ遺伝子(略語: AHA SまたはALS)の除草剤抵抗形態と交換することができる。ALS遺伝子は、Ottら、J. Mol. Biol. 1996, 263:359-360に記載されている。v-ATPアーゼ-c1プロモーターをプラスミドp Bin19またはpGPTVにクローン化してから、これをALSコード領域の前にクローニングすることにより、マーカー遺伝子発現に利用することができる。前記プロモーターは、ベータブルガリス (Beta vulgaris) 由来の1153塩基対断片に対応する (Plant Mol. Biol., 1999, 39:463-475)。選択のための代謝拮抗物質として、イマズエタピル(imazethapyr)またはスルホニル尿素などのスルホニル尿素およびイミダゾリノンのいずれを用いてもよい。

【0228】

組織特異的発現は、組織特異的プロモーターを用いて達成することができる。例えば、種子特異的発現は、cDNAの5'側のDC3もしくはLeB4またはUSPプロモーターあるいはファセオリンプロモーターのクローニングにより達成することができる。その他のどんな種子特異的プロモーターエレメントを用いてもよく、例えば、ナピンまたはアルセリンプロモーターが挙げられる (Goossensら、1999, Plant Phys. 120(4):1095-1103およびGerhardtら、2000, Biochimica et Biophysica Acta 1490(1-2):87-98)。インタクトな植物における構成的発現には、CaMV-35Sプロモーターまたはv-ATPase C1プロモーターを用いることができる。

【0229】

特に、デサチュラーゼおよびエロンガーゼをコードする遺伝子は、複数の発現カセットを構築し、植物における代謝経路を模擬することにより、バイナリーベクターに逐次クローニングすることができる。

【0230】

発現カセット内で、発現させようとするタンパク質は、例えば、色素体、ミトコンドリアまたは小胞体用のシグナルペプチドを用いて、細胞小器官にターゲティングすることができる (Kermode, Crit. Rev. Plant Sci. 15, 4 (1996) 285-423)。シグナルペプチドをcDNAとインフレームで5'側にクローニングすることにより、融合タンパク質の細胞下局在を達成する。

【0231】

多重発現カセットの例を以下に挙げる。

【0232】

1) プロモーター-ターミネーターカセット

発現カセットは、プロモーターおよびターミネーターのような、少なくとも2つの機能

10

20

30

40

50

単位から構成される。これ以外に、ターゲッティング配列、遺伝子のコード領域またはその部分など、さらなる所望の遺伝子をプロモーターとターミネーターの間に挿入することができる。発現カセットを構築するために、ポリメラーゼ連鎖反応を用いて、プロモーターおよびターミネーター（USPプロモーター：Baemleinら、Mol. Gen. Genet., 1991, 225 (3):459-67）；OCSターミネーター：Gielenら、EMBO J. 3(1984)835以下参照）を単離した後、合成オリゴヌクレオチドに基づくフランキング配列を用いて、所望のようにテラーメードする。

【 0 2 3 3 】

用いることができるオリゴヌクレオチドの例として、下記のものがある：

USP1 前方：CCGGAATTCGGCGCGCCGAGCTCCTCGAGCAAATTTACACATTGCCA

10

USP2 前方：CCGGAATTCGGCGCGCCGAGCTCCTCGAGCAAATTTACACATTGCCA

USP3 前方：CCGGAATTCGGCGCGCCGAGCTCCTCGAGCAAATTTACACATTGCCA

USP1 後方：AAAAGTGCAGGCGGCCGCCACCGCGGTGGGCTGGCTATGAAGAAATT

USP2 後方：CGCGGATCCGCTGGCTATGAAGAAATT

USP3 後方：TCCCCGGGATCGATGCCGGCAGATCTGCTGGCTATGAAGAAATT

OCS1 前方：AAAAGTGCAGTCTAGAAGGCCTCCTGCTTTAATGAGATAT

OCS2 前方：CGCGGATCCGATATCGGGCCCCGCTAGCGTTAACCTGCTTTAATGAGATAT

OCS3 前方：TCCCCGGGCCATGGCCTGCTTTAATGAGATAT

OCS1 前方：CCCAAGCTTGGCGCGCCGAGCTCGAATTCGTCGACGGACAATCAGTAAATTGA

OCS2 後方：CCCAAGCTTGGCGCGCCGAGCTCGAATTCGTCGACGGACAATCAGTAAATTGA

20

OCS3 後方：CCCAAGCTTGGCGCGCCGAGCTCGTCGACGGACAATCAGTAAATTGA

【 0 2 3 4 】

上記方法は、当業者には公知であり、概要は文献に記載されている。

【 0 2 3 5 】

第1段階では、プロモーターおよびターミネーターをPCRにより増幅する。次に、ターミネーターを受容プラスミドにクローニングし、第2段階で、プロモーターをターミネーターの前に挿入する。これにより、担体プラスミド上に発現カセットが形成される。プラスミドpUT1、pUT2およびpUT3は、プラスミドpUC19に基づいて作製される。

【 0 2 3 6 】

構築物は、本発明に従い、配列番号13、14および15に示す。pUC19に基づき、これらは、USPプロモーターとOCSターミネーターを含む。これらのプラスミドに基づき構築物pUT12を作製するために、SalI/ScaIでpUT1を切断し、XhoI/ScaIでpUT2を切断する。発現カセット中の断片を連結し、大腸菌XLI blue MRFに形質転換する。アンピシリン耐性コロニーを単離した後、DNAを調製し、2つの発現カセットを含むクローンを制限分析により同定する。適合性末端のXhoI/ScaI連結により、発現カセット間の2つの切断部位XhoIとScaIが排除された。これにより、プラスミドpUT12が得られるが、これを配列番号16に示す。次に、pUT12をSalI/ScaIで、また、pUT3をXhoI/ScaIで再度切断する。発現カセットを含む断片を連結して大腸菌XLI blue MRFに形質転換する。アンピシリン耐性コロニーを単離した後、DNAを調製し、3つの発現カセットを含むクローンを制限分析により同定する。このようにして、所望のDNAの挿入に用いることができる多重発現カセットのセットが形成され、これを表3に記載するが、さらに追加の発現カセットを組み込むことも可能である。

30

40

【 0 2 3 7 】

上記発現カセットは以下のエレメントを含む：

【表 3】

表 3

pUC19 誘導体	USPプロモーター 用の切断部位	多重クローニング 切断部位	OCSターミネーター の後の切断部位
pUT1	EcoRI/AscI/SacI/ XhoI	BstXI/NotI/PstI/XbaI/ StuI	SalI/EcoRI/SacI/ AscI/HindIII
pUT2	EcoRI/AscI/SacI/ XhoI	BamHI/EcoRV/ApaI/NheI/ HpaI	SalI/EcoRI/SacI/ AscI/HindIII
pUT3	EcoRI/AscI/ SacI/XhoI	BglII/NaeI/ ClaI/SmaI/NcoI	SalI/SacI/ AscI/HindIII
pUT12 二重発現 カセット	EcoRI/AscI/SacI/ XhoI	BstXI/NotI/PstI/XbaI/ StuI および BamHI/EcoRV/ApaI/NheI/ HpaI	SalI/EcoRI/SacI/ AscI/HindIII
pUT123 三重発現 カセット	EcoRI/AscI/SacI/ XhoI	1. BstXI/NotI/PstI/XbaI/ StuI および 2. BamHI/EcoRV/ApaI/NheI/ HpaI および 3. BglII/NaeI/ClaI/SmaI/ NcoI	SalI/SacI/AscI/ HindIII

10

20

## 【 0 2 3 8 】

さらに、前述し、かつ表 4 に詳細を示すように、下記のものを用いて、追加の多重発現カセットを作製し、種子特異的遺伝子発現に用いることができる：

- i) USPプロモーター、または
- ii) LeB4プロモーターの3'側の約700塩基対断片、または
- iii) DC3プロモーター。

30

## 【 0 2 3 9 】

DC3プロモーターは、Thomas, Plant Cell 1996, 263:359-368に記載されており、領域-117~+27から構成されているにすぎない。そのため、該プロモーターは、知られている最も小さい種子特異的プロモーターの1つとなっている。発現カセットは、同じプロモーターを数コピーで含んでもよいし、あるいは、3種の異なるプロモーターにより構築されてもよい。

## 【表4】

表4： 多重発現カセット

pUC19 誘導体のプラスミド名	各プロモーターの前の切断部位	多重クローニング切断部位	OCSターミネーターの後の切断部位
pUT1 (USP-OCS1を含むpUC19)	EcoRI/AscI/SacI/XhoI	(1) BstXI/NotI/PstI/XbaI/StuI	SalI/EcoRI/SacI/AscI/HindIII
pDCT (DC3-OCSを含むpUC19)	EcoRI/AscI/SacI/XhoI	(2) BamHI/EcoRV/ApaI/NheI/HpaI	SalI/EcoRI/SacI/AscI/HindIII
pLeBT (LeB4 (700)-OCSを含むpUC19-)	EcoRI/AscI/SacI/XhoI	(3) BglIII/NaeI/ClaI/SmaI/NcoI	SalI/SacI/AscI/HindIII
pUD12 (USP-OCS1およびDC3-OCSを含むpUC19)	EcoRI/AscI/SacI/XhoI	(1) BstXI/NotI/PstI/XbaI/StuI および (2) BamHI/EcoRV/ApaI/NheI/HpaI	SalI/EcoRI/SacI/AscI/HindIII
pUDL123 三重発現カセット (USP/DC3およびLeB4-700を含むpUC19)	EcoRI/AscI/SacI/XhoI	(1) BstXI/NotI/PstI/XbaI/StuIおよび (2) BamHI/(EcoRV*)/ApaI/NheI/HpaI および (3) BglIII/NaeI/ClaI/SmaI/NcoI	SalI/SacI/AscI/HindIII

\* LeB4 プロモーターの700塩基対断片 (LeB4-700) におけるEcoRV 切断部位

## 【0240】

これ以外にも、多重遺伝子構築物のプロモーターを同様に作製することができ、その際、下記のものを用いる：

- LeB4プロモーターの2.7 kb断片、または
- ファセオリンプロモーター、または
- 構成v-ATPase c1プロモーター。

## 【0241】

例えば、ナピンプロモーターまたはアルセリン-5プロモーターなど、種子特異的多重発現カセットを構築するのに特に好適なプロモーターを用いることが望ましい。

## 【0242】

II) 植物発現カセットにおけるPUFA遺伝子発現を目的とする、プロモーターおよびターミネーターを受け、かつ、所望の遺伝子配列と組み合わせて構成されるpUC19誘導体またはpGPTV誘導体での発現構築物の作製

AscIを用いて、AscI切断部位を介して、表3のpUC19誘導体からベクターpGPTV+AscIに多重発現カセットを直接挿入することができ(IIIを参照)、これらのカセットは、標的遺伝子の挿入に利用可能である。当該遺伝子構築物(pBUT1は配列番号20に、pBUT2は配列番号21に、pBUT3は配列番号22に、pBUT12は配列番号23に、また、pBUT123は配列番号24に示す)は、本発明に従い、キットの形態で利用可能である。これに代わり、遺伝子配列を、pUC19に基づく発現カセットに挿入し、AscI断片の形態でpGPTV+AscIに挿入することもできる。

## 【0243】

pUT12の場合には、BstXIおよびXbaIを介して 6-エロンガーゼPp\_PSE1をまず第1カセ

10

20

30

40

50

ットに挿入する。次に、BamHI/NaeIを介してコケ 6-デサチュラーゼ (Pp\_des6) を第2カセットに挿入する。これにより、構築物pUT-EDが得られる。プラスミドpUT-ED由来のAscI断片をAscI切断ベクターpGPTV+AscIに挿入した後、挿入断片の配向を制限分析または配列決定により決定する。これにより、プラスミドpB-DHGLAが得られるが、その完全配列を配列番号25に示す。ヒメツリガネゴケ 6-エロンガーゼのコード領域を配列番号26に示し、ヒメツリガネゴケ 6-デサチュラーゼのコード領域を配列番号27に示す。

【0244】

pUT123の場合には、BstXIおよびXbaIを介して 6-エロンガーゼPp\_PSE1をまず第1カセットに挿入する。次に、BamHI/NaeIを介してコケ 6-デサチュラーゼ (Pp\_des6) を第2カセットに挿入し、最後に、BgIIIを介してフェオダクチルム (Paheodactylum) 5-デサチュラーゼ (Pt\_des5) を第3カセットに挿入する。この三重構築物は、pARA1と称する。配列特異的な制限切断部位を考慮して、表5に示すように、これ以外に、pARA2、pARA3およびpARA4と称する発現カセットを作製することができる。

【0245】

プラスミドpARA1由来のAscI断片をAscI切断ベクターpGPTV+AscIに挿入した後、挿入断片の配向を制限分析または配列決定により決定する。これにより得られたプラスミドpBARA1の完全配列を配列番号28に示す。ヒメツリガネゴケ 6-エロンガーゼのコード領域を配列番号29に、ヒメツリガネゴケ 6-デサチュラーゼのコード領域を配列番号30に、また、フェオダクチルム・トリコルヌーツム (Paheodactylum tricornutum) 5-デサチュラーゼのコード領域を配列番号31にそれぞれ示す。

【表5】

表5： デサチュラーゼおよびエロンガーゼの組合せ

	遺伝子 プラスミド	Δ6-デサチュラーゼ	Δ5-デサチュラーゼ	Δ6-エロンガーゼ
1	PUT-ED	Pp_des6	—	Pp_PSE1
2	pARA1	Pt_des6	Pt_des5	Pp_PSE1
3	pARA2	Pt_des6	Ce_des5	Pp_PSE1
4	pARA3	Pt_des6	Ce_des5	Pp_PSE1
5	pARA4	Ce_des6	Ce_des5	Ce_PSE1
6	PBDHGLA	Pt_des6	—	Pp_PSE1
7	PBARA1	Pt_des6	Pt_des5	Pp_PSE1

プラスミド1～5はpUC誘導体であり、プラスミド6～7はバイナリー植物形質転換ベクターである。

Pp = ヒメツリガネゴケ (Physcomitrella patens)

Pt = フェオダクチルム・トリコルヌーツム (Paheodactylum tricornutum)

Pp\_PSE1は、配列番号9の配列に対応する。

PSE = PUFA特異的 6-エロンガーゼ

Ce\_des5 = セノラブディティス・エレガンス (Caenorhabditis elegans) 5-デサチュラーゼ (Genbank登録番号AF078796)

Ce\_des6 = セノラブディティス・エレガンス (Caenorhabditis elegans) 6-デサチュラーゼ (Genbank登録番号AF031477、塩基11-1342)

Ce\_PSE1 = セノラブディティス・エレガンス (Caenorhabditis elegans) 6-エロンガーゼ (Genbank登録番号AF244356、塩基1-867)

【0246】

さらなるデサチュラーゼまたはエロンガーゼ遺伝子配列、例えば、Genbank登録番号AF231981、NM 013402、AF206662、AF268031、AF226273、AF110510またはAF110509などを、前記タイプの発現カセットに挿入することもできる。

## 【0247】

III) アグロバクテリウム・ツメファシエンスの形質転換および植物の形質転換を目的とする、ベクターへの発現カセットの転移

AscIを用いて、pUC19に記載したものに基づくキメラ遺伝子構築物をバイナリーベクター-pGPTVに挿入することができる。このために、AscI切断部位により多重クローニング配列を伸長する。そのためには、2つの二本鎖オリゴヌクレオチドとしてポリリンカーを新しく合成し、別のAscI DNA配列を挿入する。EcoRIおよびHindIIIを用いて、オリゴヌクレオチドをベクター-pGPTVに挿入する。これにより、プラスミドpGPTV+AscIが得られる。必要なクローニング方法は、当業者には公知であり、実施例1に記載されるとおりである。

## 【0248】

実施例12: in vivo突然変異誘発

微生物のin vivo突然変異誘発は、大腸菌またはその他の微生物(例えば、バチルス属、もしくはサッカロミセス・セレビスエのような酵母)を用いて、プラスミドDNA(またはその他のベクターDNA)を継代し、そこで、それらの遺伝情報の全体性を保持する能力を破壊することにより、実施することができる。通常の変異株は、DNA修復系の遺伝子に突然変異を有する(例えば、mutHLS、mutD、mutTなど;参照として、Rupp, W.D. (1996) DNA repair mechanism: Escherichia coli and Salmonella, pp. 2277-2294, ASM: ワシントン参照)。これらの株は、当業者には公知である。これらの株の使用については、例えば、Greener, A.およびCallahan, M. (1994) Strategies 7: 32-34に説明されている。突然変異したDNA分子は、微生物を選択および試験した後、植物に転移するのが好ましい。本明細書の実施例の節にある様々な実施例に従って、トランスジェニック植物を産生する。

## 【0249】

実施例13: 形質転換した生物における組換え遺伝子産物の発現の研究

形質転換した宿主生物における組換え遺伝子産物の活性を、転写および/または翻訳レベルで測定した。

## 【0250】

遺伝子の転写量(これは、遺伝子産物の翻訳に使用可能なRNAの量を意味する)を決定するのに適した方法は、以下に記載するようなノーザンプロットを実施することである(参照として、Ausubelら(1988) Current Protocols in Molecular Biology, Wiley: ニューヨーク、または前記の実施例の項を参照)。その際、プライマーは、目的とする遺伝子と結合して、検出可能な標識(通常、放射能または化学発光)で標識されるように設計されており、これにより、生物の培養物の全RNAを抽出し、ゲル上で分離し、安定マトリックスに移行させた後、このプローブと一緒にインキュベートする。上記プローブの結合および結合範囲が、上記遺伝子のmRNAの存在および量を示す。この情報から、形質転換した遺伝子の転写度がわかる。全細胞RNAは、細胞、組織または器官から、多数の方法によって調製することができ、これら方法のすべては、当業者には公知であり、例えば、Borman, E.R.ら(1992, Mol. Microbiol. 6: 317-326)の方法がある。

## 【0251】

ノーザンハイブリダイゼーション:

RNAハイブリダイゼーションのために、Amasino(1986, Anal. Biochem. 152, 304)により記載されるようにホルムアルデヒドを用いて、1.25%強度アガロースゲルにおけるゲル電気泳動により、20 μgの全RNAまたは1 μgのポリ(A)<sup>+</sup>-RNAを分離し、10×SSCを用いた毛管吸引により、正に荷電したナイロン膜(Hybond N<sup>+</sup>, Amersham、フランスウィック)に移行させ、紫外線で固定化した後、ハイブリダイゼーションバッファー(10%硫酸デキストランw/v、1 M NaCl、1% SDS、100 mg ニシン精子DNA)を用いて、68 °Cで3時間、プレハイブリダイズした。DNAプローブは、<sup>32</sup>P-dCTP(Amersham、ドイツ、フランスウィック)を用いて、プレハイブリダイゼーション段階中に、ハイプライム(Highprime) DNA標識キット(Roche、ドイツ、マンハイム)で標識しておいた。標識したDNAプローブを同じバッファー中に68 °Cで一晩添加した後、ハイブリダイゼーションを実施した。68 °Cで、

10

20

30

40

50

2 × SSCを用いて15分を2回、1 × SSC、1 % SDSを用いて30分を2回の洗浄段階を実施した。密封されたフィルターを - 70 で1 ~ 14日の間露光させた。

【 0 2 5 2 】

ウェスタンブロット (例えば、Ausubelら (1988) *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley : ニューヨークを参照) のような標準的方法を用いて、このmRNAにより翻訳されたタンパク質の存在または相対量を調べることができる。この方法では、全細胞タンパク質を抽出し、ゲル電気泳動により分離し、ニトロセルロースのようなマトリックスに移した後、所望のタンパク質と特異的に結合する抗体のようなプローブと一緒にインキュベートする。このプローブには、通常、容易に検出が可能な化学発光または比色分析標識を施す。観察された標識の存在および量は、細胞に存在する所望の突然変異タンパク質の存在および量を示す。

10

【 0 2 5 3 】

実施例14 : 所望の産物の生産に及ぼす組換えタンパク質の影響の分析

植物、真菌、藻類、織毛虫における、または所望の化合物 (脂肪酸など) の生産に対する遺伝子改変の影響は、適した条件 (前述したものなど) 下で、改変微生物または改変植物を生育させ、所望の産物 (すなわち、脂質または脂肪酸) の生産増加について培地および/または細胞成分を分析することにより、決定することができる。これらの分析方法は、当業者には公知であり、分光法、薄層クロマトグラフィー、各種染色方法、酵素および微生物学的方法、ならびに、高性能液体クロマトグラフィーのような分析クロマトグラフィーが挙げられる (例えば、Ullman, *Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Vol. A2, pp. 89-90およびpp. 443-613, VCH Weinheim (1985) ; Fallon, A.ら (1987) "Applications of HPLC in Biochemistry" : *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 17 ; Rehmら (1993) *Biotechnology*, 第3巻、第III章、"Product recovery and purification", pp. 469-714, VCH Weinheim ; Belter, P.A.ら (1988) *Bioseparations : downstream processing for Biotechnology*, John Wiley and Sons ; Kennedy, J.F., ならびに、Cabral, J.M.S. (1992) *Recovery processes for biological Materials*, John Wiley and Sons ; Shaeiwitz, J.A.およびHenry, J.D. (1988) *Biochemical Separations : Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Vol. B3 ; 第11章、pp. 1-27, VCH Weinheim ; ならびに、Dechow, F.J. (1989) *Separation and purification techniques in biotechnology*, Noyes Publications)。

20

30

【 0 2 5 4 】

前記の方法の他に、Cahoonら (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (22) : 12935-12940、ならびに、Browseら (1986) *Analytic Biochemistry* 152:141-145に記載されているように、植物材料から植物脂質を抽出する。定量および定性脂質または脂肪酸分析については、下記に記載されている : Christie, William W., *Advances in Lipid Methodology*, Ayr/スコットランド : Oily Press (Oily Press Lipid Library ; 2) ; Christie, William W., *Gas Chromatography and Lipids. A Practical Guide - Ayr*, スコットランド : Oily Press, 1989, Repr. 1992, IX, 307 S. (Oily Press Lipid Library ; 1) ; "Progress in Lipid Research, Oxford : Pergamon Press, 1 (1952) -16 (1977) 題名 : Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids CODEN.

40

【 0 2 5 5 】

発酵の最終産物を測定する以外に、所望の化合物を生産するのに用いられる代謝経路の他の成分 (中間体および副産物など) を分析することにより、化合物の全体生産効率を決定することも可能である。分析方法としては、培地の栄養素量 (例えば、糖、炭化水素、窒素源、リン酸イオンおよびその他のイオン) の測定、バイオマス濃度および成長測定、生合成経路の通常代謝物の生産の分析、ならびに、発酵中に発生したガスの測定などが挙げられる。これら測定の標準的方法については、下記に記載されている : *Applied Microbial Physiology ; A Practical Approach*, P.M. Rhodes およびP.F. Stanbury編、IRL Press, S. 103-129 ; 131-163および165-192 (ISBN : 0199635773) ならびに、そこに引用されている参考文献。

50

## 【0256】

一例は、脂肪酸の分析である（略語：FAME、脂肪酸メチルエステル；GC-MS、気液クロマトグラフィー／質量分析法；TAG、トリアシルグリセロール；TLC、薄層クロマトグラフィー）。

## 【0257】

脂肪酸産物の存在の明白な検出は、標準的分析方法：GC、GC-MSまたはTLCにより、組換え生物を分析することにより、達成することができ、これらの方法は、Christieにより、またその引用参考文献に、幾度も記載されている（1997：Advances on Lipid Methodology、第4版：Christie, Oily Press, Dundee, 119-169；1998, gas chromatography/mass spectrometry methods, Lipide 33:343-353）。

10

## 【0258】

分析しようとする材料は、音波破碎、ガラスミルでの磨砕、液体窒素および粉碎、あるいは、その他の適用可能な方法により破碎することができる。破碎後、材料を遠心分離しなければならない。沈降物を蒸留水中に再懸濁させ、100 で10分加熱し、氷冷して再遠心分離させた後、2%ジメトキシプロパンを含むメタノール中の0.5 M硫酸において90 で1時間抽出する。これにより、加水分解された油および脂質化合物が得られ、これは、メチル基転移脂質をもたらす。これらの脂肪酸メチルエステルを石油エーテルで抽出し、最終的に、毛管カラム（Chrompack, WCOT Fused Silica, CP-Wax-52 CB, 25 μm, 0.32 mm）を用いて、170 から240 まで20分の温度勾配および240 で5分のGC分析を実施する。得られた脂肪酸メチルエステルの正体は、市販されている標準溶液（すなわち、Sigma）を用いて、決定しなければならない。

20

## 【0259】

使用できる標準溶液がない脂肪酸については、誘導体化の後、GC/MS分析を実施することにより、その正体を証明しなければならない。例えば、三重結合を有する脂肪酸の局在化は、4,4-ジメトキシオキサゾリン誘導体（Christie, 1998, 前記参照）を用いた誘導体化の後GC/MSにより証明しなければならない。

## 【0260】

異種微生物系における発現構築物株、生育条件およびプラスミド

大腸菌株XL1 Blue MRF<sup>+</sup> kan (Stratagene) を用いて、新規のヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*) デサチュラーゼであるpPDesaturase 1 をサブクローニングする。この遺伝子を機能的に発現するため、サッカロミセス・セレピシエ菌株 INVSc 1 (Invitrogen Co.) を用いた。ルリア-ベルティニプロス (LB, Duchefa, オランダ、ハールレム) において、大腸菌を37 で培養する。必要であれば、アンピシリン (100 mg/リットル) を添加し、1.5%の寒天 (w/v) を添加して、固体LB培地を得る。サッカロミセス・セレピシエ菌を、YPG培地、またはウラシルを含まない完全最少培地 (CMdum; Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K., Albright, L.B., Coen, D.M. および Varki, A. (1995) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, ニューヨーク) のいずれかにおいて、2% (w/v) のラフィノースまたはグルコースのいずれかと一緒に、30 で増殖させる。固体培地を得るために、2% (w/v) のBacto (商標) 寒天 (Difco) を添加する。発現をクローニングするのに用いるプラスミドは、pUC18 (Pharmacia) および pYES2 (Invitrogen Co.) である。

30

40

## 【0261】

実施例16： PUFA特異的フェオダクチルム・トリコルヌーツム (*Paheodactylum tricorutum*) デサチュラーゼのクローニングおよび発現

酵母における発現のために、配列番号1、3、5または11からのフェオダクチルム・トリコルヌーツム (*Paheodactylum tricorutum*) cDNAクローン、あるいは、配列番号7または9からの配列、もしくはその他の所望の配列を、2つのオリゴヌクレオチドを用いたポリメラーゼ連鎖反応によって、コード領域だけが増幅するようにまず改変した。ここで、効率的な翻訳のために、開始コドンの共通配列が保持されるよう注意した。このため、

50

塩基配列ATAまたはAAAのいずれかをを選択し、ATGの前の配列に挿入した (Kozak, M. (1986) Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes, Cell 44, 283-292)。さらに制限切断部位をこの共通トリプレットの前に導入したが、この制限切断部位は、断片をクローニングすることになっており、かつ微生物または植物において遺伝子発現を起こさせるために用いることになっている標的ベクターの切断部位と適合性でなければならない。

【0262】

サーモサイクラー (Biometra) 中で、鋳型としてプラスミドDNAを用いて、Pfu DNA (Stratagene) ポリメラーゼおよび下記の温度プログラムで、PCR反応を実施した：96 で3分、次に、96 で30秒、55 で30秒および72 で2分を30サイクル、そして72 で10分を1サイクルの後、4 で停止。アニーリング温度は、選択したオリゴヌクレオチドによって変化させた。DNAのキ口塩基対あたり約1分の合成時間を想定することができる。例えば、マグネシウムイオン、塩、DNAポリメラーゼなど、PCRに影響を与えるその他のパラメーターは当業者には公知であり、必要に応じて変動しうる。

10

【0263】

適正サイズの増幅DNA断片をアガロースTBEゲル電気泳動により確認した。QIAquickゲル抽出キット (QIAGEN) を用いて、増幅DNAをゲルから抽出した後、シュアクローン連結キット (Sure Clone Ligation Kit) (Pharmacia) を用いて、脱リン酸化ベクター-pUC18のSmaI制限部位に連結して、pUC誘導体を作製した。大腸菌XL1 Blue MRF' kanの形質転換の後、アンピシリン耐性形質転換体に対してDNAミニプレップ (Riggs, M.G.およびMcLachlan, A. (1986) A simplified screening procedure for large numbers of plasmid mini-preparation. BioTechniques 4, 310-313) を実施し、陽性クローンをBamHI制限分析により同定した。ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer, Weiterstadt) を用いた再配列決定により、クローン化PCR産物の配列を確認した。

20

【0264】

5アシル脂質デサチュラーゼ、Pt\_des5

プライマー1 GAG CTC ACA TAA TGG CTC CGG ATG CGG ATA AGC

プライマー2 CTC GAG TTA CGC CCG TCC GGT CAA GGG

シュアクローン連結キット (Sure Clone Ligation Kit) (Pharmacia) を用いて、PCR断片 (1428 bp) をpUC18にクローニングし、挿入した断片をSacI/XhoIで消化した後、その断片を、好適な制限切断部位を用いてpYES2またはpYES6に挿入した。

30

【0265】

6アシル脂質デサチュラーゼ、Pt\_des6

プライマー3 GGA TCC ACA TAA TGG GCA AAG GAG GGG ACG CTC GGG

プライマー4 CTC GAG TTA CAT GGC GGG TCC ATC GGG

シュアクローン連結キット (Sure Clone Ligation Kit) (Pharmacia) を用いて、PCR断片 (1451 bp) をpUC18にクローニングし、挿入した断片をBamHI/XhoIで消化した後、その断片を好適な制限切断部位を用いてpYES2またはpYES6に挿入した。

40

【0266】

12アシル脂質デサチュラーゼ、Pt\_des12

プライマー5 GGA TCC ACA TAA TGG TTC GCT TTT CAA CAG CC

プライマー6 CTC GAG TTA TTC GCT CGA TAA TTT GC

12アシル脂質デサチュラーゼ、Pt\_des12.2

プライマー7 GGA TCC ACA TAA TGG GTA AGG GAG GTC AAC G

プライマー8 CTC GAG TCA TGC GGC TTT GTT TCG C

シュアクローン連結キット (Sure Clone Ligation Kit) (Pharmacia) を用いて、PCR断片 (1505 bp) をpUC18にクローニングし、挿入した断片をBamHI/XhoIで消化した後、その断片を、好適な制限切断部位を用いてpYES2またはpYES6に挿入した。

50

【0267】

プラスミドDNAをまず制限酵素で切断することにより、プライマー配列の導入される切断部位とマッチさせ、得られた断片を脱リン酸化酵母/大腸菌シャトルベクター-pYES2またはpYES6の適合性制限部位に連結し、pYES誘導体を作製した。大腸菌の形質転換および形質転換体からのDNAミニプレップに続き、ベクターにおけるDNA断片の配向を、好適な制限切断または配列決定により確認した。1つのクローンを用いて、Nucleobond(登録商標) AX 500プラスミドDNA抽出キット(Macherey-Nagel, Düringen)によるDNAマキシプレップ(maxipreparation)を実施した。

#### 【0268】

PEG/酢酸リチウムプロトコル(Ausubelら、1995)を用いて、サッカロミセス・セレピシエINVSc1をpYES誘導体およびpYESブランクベクターで形質転換した。2%グルコースを含むCMdum-寒天プレート上での選択後、さらなる培養および機能発現のためにpYES誘導体形質転換体と1つのpYES2形質転換体を選択した。pYES6誘導体については、プラスチックを代謝拮抗物質として用いた。pYES2およびpYES6に基づく共発現の場合には、最少培地上のプラスチックを用いて、選択を実施した。

#### 【0269】

酵母におけるデサチュラーゼ活性の機能的発現

前培養:

2%(w/v)ラフィノースを含む、20 mlのCMdumドロップアウト(dropout)ウラシル液体培地にトランスジェニック酵母クローン(pYES2)を接種し、600 nm(OD<sub>600</sub>)での光学濃度が1.5~2に達するまで、30および200 rpmで3日間培養した。pYES6をベクターとして用いた場合には、代謝拮抗物質としてのプラスチックに関する選択をさらに行なった。

#### 【0270】

主培養:

発現のために、2%ラフィノースと1%(v/v)Tergitol NP-40を含む20 mlのCMdumドロップアウト(dropout)ウラシル液体培地に、脂肪酸基質を補充して、最終濃度を0.003%(w/v)とした。この培地に、上記の前培養物を0.05のOD<sub>600</sub>まで接種した。2%(w/v)ガラクトースを用いて、0.2のOD<sub>600</sub>で16時間発現を誘導し、その直後に、該培養物を0.8~1.2のOD<sub>600</sub>で回収した。

#### 【0271】

脂肪酸分析:

脂肪酸全体を酵母培養物から抽出し、ガスクロマトグラフィーにより分析した。このため、5 mlの培養物の細胞を遠心分離(1,000 x g、10分、4℃)により回収し、100 mM NaHCO<sub>3</sub>、pH 8.0で1回洗浄して、残留培地および脂肪酸を除去した。脂肪酸メチルエステル(FAME)を調製するために、細胞沈降物を、1 Mメタノール性H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>および2%(v/v)ジメトキシプロパンで、80℃にて1時間処理した。このFAMEを2 mlの石油エーテルで2回抽出し、100 mM NaHCO<sub>3</sub>、pH 8.0で1回洗浄し、蒸留水で1回洗浄した後、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で乾燥した。アルゴン流の下で、有機溶剤を蒸発させ、上記FAMEを50 μlの石油エーテルに溶解させた。フレイムイオン化検出器を備えたヒューレットパッカード6850ガスクロマトグラフ内のZEBRON ZB Wax毛管カラム(30 m、0.32 mm、0.25 μm; Phenomenex)上で、上記サンプルを分離した。オープン温度は、20℃/分の昇温速度で、70℃(1分間保持する)から200℃まで、次に、5℃/分の速度で、250℃(5分間保持する)まで、最後に、5℃/分の速度で、260℃までプログラムした。窒素をキャリアーガス(70℃で4.5 ml/分)として用いた。脂肪酸は、FAME標準物(SIGMA)の保持時間との比較により同定した。

#### 【0272】

発現分析

添加して取り込まれた脂肪酸基質の割合を決定することにより、デサチュラーゼ反応の量および質を表6および表7および表8に従って記録した。

#### 【0273】

酵母におけるフェオダクチルム・トリコルヌーツム(Paheodactylum tricornutum) 6

10

20

30

40

50

-アシル脂質デサチュラーゼの発現の結果：

【表 6】

表 6

脂肪酸	pYES2	一緒に供給したpYES2-Ptd6			
		-	+18:2	+18:3	
16:0	13.3	18.9	28.4	16.7	
16:1Δ9	45.4	44.7	12.5	16.9	
16:2Δ6,9	-	4.3	-	-	
18:0	4.9	6.3	10.4	9.1	10
18:1Δ9	36.4	24.1	6.8	11.8	
18:2Δ6,9	-	1.8	-	-	
18:2Δ9,12	-	-	33.4	-	
18:3Δ6,12,15	-	-	4.9	-	
18:3Δ9,12,15	-	-	-	43.1	
18:4Δ6,9,12,15	-	-	-	2.3	

データは、対応するシス脂肪酸のモル%を示す。

【 0 2 7 4】

酵母におけるフェオダクチルム・トリコルヌーツム (Phaeodactylum tricornutum) 5 20

-アシル脂質デサチュラーゼの発現の結果：

【表 7】

表 7

脂肪酸	pYES2		一緒に供給した pYES_Ptd5 構築物							
	ブランク	対照	18:2	18:3	20:1 Δ8	-20:1 Δ11	20:2 Δ11,14	20:3 Ω3	20:3 Ω6	
16:0Δ	16.9	20.4	27.7	24.4	16.2	21	17.6	19.5	22.8	30
16:1Δ9	44.7	44.1	13.2	9.6	37.4	39.4	38.3	36.9	30.7	
18:0	6.1	6.9	10.54	9.8	4.7	7.9	6.3	6.8	8.2	
18:1 Δ9	31.72	28.1	8.77	6	15	26	29.5	25.6	21.1	
18:2 Δ5,9	0.17	0	0	0	0	0.09	0.21	0.09	9	
18:2 Δ9,12	-	39.7	-	-	-	-	-	-	-	
18:3 Δ9,12,15	-	49.9	-	-	-	-	-	-	-	
20:1 Δ8	-	-	-	25.5	-	-	-	-	-	
20:1 Δ11	-	-	-	-	5.41	-	-	-	-	
20:2 Δ5,11	-	-	-	-	0.21	-	-	-	-	
20:2 Δ11,14	-	-	-	-	-	6.48	-	-	-	40
20:3 Δ5,11,14	-	-	-	-	-	0.76	-	-	-	
20:3 Δ11,14,17	-	-	-	-	-	-	-	9.83	-	
20:3 Δ8,11,14	-	-	-	-	-	-	-	-	13.69	
20:4 Δ5,11,14,17	-	-	-	-	-	-	-	1.16	-	
20:4 Δ5,8,11,14	-	-	-	-	-	-	-	-	3.08	

データは、対応するシス脂肪酸のモル%脂肪酸を示す。

【 0 2 7 5】

その他の供給実験から、C18:1 9は、C18:2 9,11またはC18:3 9,12,15もしくはC20:1 8脂肪酸の存在下では脱飽和されないのに対し、C18:1は、C20:1 11、C20:2 1 50

1,14およびC20:3 8,11,14の存在下でも脱飽和されることが明らかになった。また、C20:3 8,11,14の存在下では脱飽和が起こらなかった。

【0276】

プラスチックを含む完全培地でフェオダクチルム・トリコルヌーツム (*Phaeodactylum tricornutum*) 5-デサチュラーゼを発現させるために、プロテアーゼ欠損酵母株C13BY S86 (Kunze l. ら、*Biochemica et Biophysica Acta* (1999) 1410:287-298) を用いた場合、5-デサチュラーゼの基質としてのC20:4 8,11,14,17は20%の変換率を与え、これは、C20:3 8,11,14と同様によく変換されたことがわかった。これに代わり、栄養要求性マーカー *leu2*、*ura3* または *his* を遺伝子発現に用いてもよい。

【0277】

これ以外に、フェオダクチルム 5-デサチュラーゼおよびヒメツリガネゴケ 6-エロンガーゼの共発現実験では、使用した株は、UTL7A (Warnechkeら、*J. Biol. Chem.* (1999) 274(19):13048-13059) であり、5-デサチュラーゼは、約10%のC20:3 8,11,14をC20:4 5,8,11,14に変換した。

【0278】

非常に多様なその他の脂肪酸 (例えば、リノール酸、C20:3 5,11,14-脂肪酸、 $\Delta$ -または  $\Delta$ -リノレン酸、ステアリドン酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸など) を単独で、または組み合わせて用いた供給実験を実施して、これらのデサチュラーゼの基質選択性をさらに詳細に確認することができる。

【表8】

表8: 発現ベクターpYES2およびpYES6に基づく酵母における、*Phaeodactylum tricornutum*  $\Delta$ 5-アシル脂質デサチュラーゼおよびコケ  $\Delta$ 6-エロンガーゼの共発現の結果

	pYES2-E1 $\alpha$		pYES2-E1 $\alpha$ およびpYES6-Ptd5	
	+18:3	+18:4	+18:3	+18:4
16:0	15.0	14.8	15.6	15.1
16:1 $\Delta$ 9	27.7	29.2	27.5	29.0
18:0	5.6	6.3	5.7	6.4
18:1 $\Delta$ 9	17.1	30.8	27.4	31.6
18:3 $\Delta$ 6,9,12	7.60	-	7.8	-
18:4 $\Delta$ 6,9,12,15	-	6.71	-	6.4
20:3 $\Delta$ 8,11,14	15.92	-	13.55	-
20:4 $\Delta$ 5,8,11,14	-	-	1.31	-
20:4 $\Delta$ 8,11,14,17	-	11.4	-	10.31
20:5 $\Delta$ 5,8,11,14,17	-	-	-	0.53

【0279】

基質変換から、使用したフェオダクチルム 5-デサチュラーゼおよびヒメツリガネゴケ 6-エロンガーゼは、本発明の配列を用いて、基質活性に関して、特に、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸を生産する基質特異性に関して、適していることが明らかにされた。

【0280】

標準物のDMOX誘導体の断片化パターンおよび質量スペクトル、ならびに、表6、7および8に示し、かつGCにより確認した脂肪酸のピーク画分は、比較すると、同じ結果を示していることから、単純なGC検出ではわからない二重結合のそれぞれの位置が確認される。

【0281】

実施例17: 形質転換生物からの所望の産物の精製

当業者には公知の各種方法により、植物材料または真菌、藻類、繊毛虫、動物細胞、ま

10

20

30

40

50

たは前記培養物の上清から、所望の産物を回収することができる。所望の産物が細胞から分泌されない場合には、低速遠心分離により、培養物から細胞を回収し、機械力または音波破碎などの標準的技法により、細胞を溶解させることができる。植物の器官を他の組織または他の器官から機械的に分離することができる。ホモゲナイズの後、遠心分離により、細胞破壊屑を除去し、可溶性タンパク質を含む上清画分を残して、所望の化合物をさらに精製する。産物が所望の細胞から分泌される場合には、低速遠心分離により、培養物から細胞を除去し、上清画分を残して、さらなる精製を実施する。

【0282】

各精製方法から得た上清画分は、適当な樹脂を含むクロマトグラフィーに付す。所望の分子は、クロマトグラフィー樹脂に残るのに対し、サンプル中の不純物の多くは残らないか、あるいは、樹脂上に不純物は残るが、サンプルは残らないかのいずれかである。これらのクロマトグラフィー段階は、必要に応じ、同じまたは他のクロマトグラフィー樹脂のいずれかを用いて、繰り返すことができる。当業者であれば、好適なクロマトグラフィー樹脂の選択や、精製しようとする特定の分子の最も効果的な使用について、熟知している。精製された産物は、ろ過または限外ろ過により濃縮し、産物の安定性が最も高い温度で保存することができる。

10

【0283】

非常に多様な精製方法が当業者には知られており、前述した精製方法は、制限を意図するものではない。これらの精製方法は、例えば、Bailey, J.E.およびOllis, D.F., *Biochemical Engineering Fundamentals*, McGraw-Hill: ニューヨーク (1986) に記載されている。

20

【0284】

単離した化合物の正体(素性)および純度は、当業者には公知の標準的技法により決定することができる。このような技法として、高性能液体クロマトグラフィー(HPLC)、分光法、染色法、薄層クロマトグラフィー、特に薄層クロマトグラフィーおよびフレームイオン化検出法(IATROSCAN, Itaron, 日本国東京)、NIR、酵素アッセイまたは微生物試験法が挙げられる。これらの分析方法については、下記を参照されたい: Patekら(1994) *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 133-140; Malakhovaら(1996) *Biotekhnologiya* 11: 27-32; ならびに、Schmidtら(1998) *Bioprocess Engineer.* 19: 67-70. *Ulmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* (1996) Vol. A27, VCH Weinheim, pp. 89-90, pp. 521-540, pp. 540-547, pp. 559-566, pp. 575-581およびpp.581-587; Michal, G (1999) *Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology*, John Wiley and Sons; Fallon, A.ら(1987) *Applications of HPLC in Biochemistry: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 17.

30

【0285】

均等物

当業者であれば、通常の実験を行うだけで、本明細書中にこれまで述べてきた本発明の特定の使用形態についての多数の均等物を認識しているか、あるいは、確かめることができる。これらの均等物は、本発明の特許請求の範囲に含まれるものである。

【図面の簡単な説明】

40

【0286】

【図1】 Pp\_des6のコード領域(上列)とPT001078032RのEST配列(下列)とのポリペプチドアラインメントを示す。

【図2】 Ma\_des12のコード領域(上の配列)とPT0010070010Rとのポリペプチドアラインメントを示す。

【図2a】 Ma\_des12のコード領域(上の配列)とPT001072031Rとのポリペプチドアラインメントを示す。

【図3】 フェオダクチルム(Paeodactylum) デサチュラーゼ断片をコードするプライマー対F6aおよびR4a2のPCR産物のコード領域(上列)とストレプトミセス・コエリコロール(*Streptomyces coelicolor*) 配列T36617(下列)とのポリペプチドアラインメントを示す。

50

【図4】Pp\_des6のコード領域（上列）とPt\_des6（下列）とを比較したポリペプチドアラインメントを示す。

【図5】Pp\_des6のコード領域（上列）とPt\_des5（下列）とを比較したポリペプチドアラインメントを示す。

【図6】モルティエレラ・アルピナ 12-デサチュラーゼ（Ma\_des12）のコード領域（上列）と相同フェオダクチルム・トリコルヌーツム配列（Pt\_des12）（下列）とのポリペプチドアラインメントを示す。

【図7】モルティエレラ・アルピナ 12-デサチュラーゼ（Ma\_des12）のコード領域（上列）とフェオダクチルム・トリコルヌーツムクロンPT001072031R（Pt\_des12.2）（下列）とのポリペプチドアラインメントを示す。

【配列表】

## SEQUENZPROTOKOLL

<110> BASF Plant Science GmbH

<120> Verfahren zur Herstellung mehrfach ungesättigter  
Fettsäuren, neue Biosynthesegene sowie neue pflanzliche  
Expressionskonstrukte

<130> 2000\_873

<140> 2000\_873

<141> 2000-12-22

<160> 31

10

<170> PatentIn Vers. 2.0

<210> 1

<211> 1652

<212> DNA

<213> Phaeodactylum tricornutum

<220>

<221> CDS

<222> (115)..(1524)

<400> 1

gacccaacaa acccaacaat cccaacaatc ccatacaacag gaattggggtt tcgttgagtc 60

20

aataattgct agaatccaaa cagacagaca.gagaccaacc gcatacatta caga atg 117  
Met  
1

gct ccg gat gcg gat aag ctt cga caa cgc cag acg act gcg gta gcg 165  
Ala Pro Asp Ala Asp Lys Leu Arg Gln Arg Gln Thr Thr Ala Val Ala  
5 10 15

aag cac aat gct gct acc ata tcg acg cag gaa cgc ctt tgc agt ctg 213  
Lys His Asn Ala Ala Thr Ile Ser Thr Gln Glu Arg Leu Cys Ser Leu  
20 25 30

tct tcg ctc aaa ggc gaa gaa gtc tgc atc gac gga atc atc tat gac 261  
Ser Ser Leu Lys Gly Glu Glu Val Cys Ile Asp Gly Ile Ile Tyr Asp  
35 40 45

30

ctc caa tca ttc gat cat ccc ggg ggt gaa acg atc aaa atg ttt ggt 309  
Leu Gln Ser Phe Asp His Pro Gly Gly Glu Thr Ile Lys Met Phe Gly  
50 55 60 65

ggc aac gat gtc act gta cag tac aag atg att cac ccg tac cat acc 357  
Gly Asn Asp Val Thr Val Gln Tyr Lys Met Ile His Pro Tyr His Thr  
70 75 80

gag aag cat ttg gaa aag atg aag cgt gtc ggc aag gtg acg gat ttc 405  
Glu Lys His Leu Glu Lys Met Lys Arg Val Gly Lys Val Thr Asp Phe  
85 90 95

gtc tgc gag tac aag ttc gat acc gaa ttt gaa cgc gaa atc aaa cga 453

40



gaa tcg ctc gcg ctg gcg gtc ctg ttt tcg ttg tgc cac aat ttc gaa 1173  
 Glu Ser Leu Ala Leu Ala Val Leu Phe Ser Leu Ser His Asn Phe Glu  
 340 345 350

tcc gcg gat cgc gat ccg acc gcc cca ctg aaa aag acg gga gaa cca 1221  
 Ser Ala Asp Arg Asp Pro Thr Ala Pro Leu Lys Lys Thr Gly Glu Pro  
 355 360 365

gtc gac tgg ttc aag aca cag gtc gaa act tcc tgc act tac ggt gga 1269  
 Val Asp Trp Phe Lys Thr Gln Val Glu Thr Ser Cys Thr Tyr Gly Gly  
 370 375 380 385

ttc ctt tcc ggt tgc ttc acg gga ggt ctc aac ttt cag gtt gaa cac 1317  
 Phe Leu Ser Gly Cys Phe Thr Gly Gly Leu Asn Phe Gln Val Glu His  
 390 395 400

cac ttg ttc cca cgc atg agc agc gct tgg tat ccc tac att gcc ccc 1365  
 His Leu Phe Pro Arg Met Ser Ser Ala Trp Tyr Pro Tyr Ile Ala Pro  
 405 410 415

aag gtc cgc gaa att tgc gcc aaa cac ggc gtc cac tac gcc tac tac 1413  
 Lys Val Arg Glu Ile Cys Ala Lys His Gly Val His Tyr Ala Tyr Tyr  
 420 425 430

ccg tgg atc cac caa aac ttt ctc tcc acc gtc cgc tac atg cac gcg 1461  
 Pro Trp Ile His Gln Asn Phe Leu Ser Thr Val Arg Tyr Met His Ala  
 435 440 445

gcc ggg acc ggt gcc aac tgg cgc cag atg gcc aga gaa aat ccc ttg 1509  
 Ala Gly Thr Gly Ala Asn Trp Arg Gln Met Ala Arg Glu Asn Pro Leu  
 450 455 460 465

acc gga cgg gcg taa aagtacacga caccgacaaa ggtggcgtat ggtgatctct 1564  
 Thr Gly Arg Ala  
 470

agaaaaacaga catagcctac tggaaatatc gacgtccaaa caabaatittt aaagactatt 1624

tttctgcgta aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1652

<210> 2  
 <211> 469  
 <212> PRT  
 <213> *Phaeodactylum tricornutum*

<400> 2  
 Met Ala Pro Asp Ala Asp Lys Leu Arg Gln Arg Gln Thr Thr Ala Val  
 1 5 10 15  
 Ala Lys His Asn Ala Ala Thr Ile Ser Thr Gln Glu Arg Leu Cys Ser  
 20 25 30  
 Leu Ser Ser Leu Lys Gly Glu Glu Val Cys Ile Asp Gly Ile Ile Tyr  
 35 40 45

Asp Leu Gln Ser Phe Asp His Pro Gly Gly Glu Thr Ile Lys Met Phe

10

20

30

40

50			55			60									
Gly	Gly	Asn	Asp	Val	Thr	Val	Gln	Tyr	Lys	Met	Ile	His	Pro	Tyr	His
65					70					75					80
Thr	Glu	Lys	His	Leu	Glu	Lys	Met	Lys	Arg	Val	Gly	Lys	Val	Thr	Asp
			85						90					95	
Phe	Val	Cys	Glu	Tyr	Lys	Phe	Asp	Thr	Glu	Phe	Glu	Arg	Glu	Ile	Lys
			100					105						110	
Arg	Glu	Val	Phe	Lys	Ile	Val	Arg	Arg	Gly	Lys	Asp	Phe	Gly	Thr	Leu
		115						120					125		
Gly	Trp	Phe	Phe	Arg	Ala	Phe	Cys	Tyr	Ile	Ala	Ile	Phe	Phe	Tyr	Leu
	130														
Gln	Tyr	His	Trp	Val	Thr	Thr	Gly	Thr	Ser	Trp	Leu	Leu	Ala	Val	Ala
					150						155				160
Tyr	Gly	Ile	Ser	Gln	Ala	Met	Ile	Gly	Met	Asn	Val	Gln	His	Asp	Ala
					165					170					175
Asn	His	Gly	Ala	Thr	Ser	Lys	Arg	Pro	Trp	Val	Asn	Asp	Met	Leu	Gly
			180											190	
Leu	Gly	Ala	Asp	Phe	Ile	Gly	Gly	Ser	Lys	Trp	Leu	Trp	Gln	Glu	Gln
		195													
His	Trp	Thr	His	His	Ala	Tyr	Thr	Asn	His	Ala	Glu	Met	Asp	Pro	Asp
		210						215						220	
Ser	Phe	Gly	Ala	Glu	Pro	Met	Leu	Leu	Phe	Asn	Asp	Tyr	Pro	Leu	Asp
							230								240
His	Pro	Ala	Arg	Thr	Trp	Leu	His	Arg	Phe	Gln	Ala	Phe	Phe	Tyr	Met
										250					255
Pro	Val	Leu	Ala	Gly	Tyr	Trp	Leu	Ser	Ala	Val	Phe	Asn	Pro	Gln	Ile
Leu	Asp	Leu	Gln	Gln	Arg	Gly	Ala	Leu	Ser	Val	Gly	Ile	Arg	Leu	Asp
Asn	Ala	Phe	Ile	His	Ser	Arg	Arg	Lys	Tyr	Ala	Val	Phe	Trp	Arg	Ala
Val	Tyr	Ile	Ala	Val	Asn	Val	Ile	Ala	Pro	Phe	Tyr	Thr	Asn	Ser	Gly
Leu	Glu	Trp	Ser	Trp	Arg	Val	Phe	Gly	Asn	Ile	Met	Leu	Met	Gly	Val
Ala	Glu	Ser	Leu	Ala	Leu	Ala	Val	Leu	Phe	Ser	Leu	Ser	His	Asn	Phe
Glu	Ser	Ala	Asp	Arg	Asp	Pro	Thr	Ala	Pro	Leu	Lys	Lys	Thr	Gly	Glu

10

20

30

40

Pro Val Asp Trp Phe Lys Thr Gln Val Glu Thr Ser Cys Thr Tyr Gly  
 370 375 380

Gly Phe Leu Ser Gly Cys Phe Thr Gly Gly Leu Asn Phe Gln Val Glu  
 385 390 395 400

His His Leu Phe Pro Arg Met Ser Ser Ala Trp Tyr Pro Tyr Ile Ala  
 405 410 415

Pro Lys Val Arg Glu Ile Cys Ala Lys His Gly Val His Tyr Ala Tyr  
 420 425 430

Tyr Pro Trp Ile His Gln Asn Phe Leu Ser Thr Val Arg Tyr Met His  
 435 440 445

Ala Ala Gly Thr Gly Ala Asn Trp Arg Gln Met Ala Arg Glu Asn Pro  
 450 455 460

Leu Thr Gly Arg Ala  
 465

10

<210> 3  
 <211> 1434  
 <212> DNA  
 <213> Phaeodactylum tricornutum

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1434)

20

<400> 3  
 atg ggc aaa gga ggg gac gct cgg gcc tcg aag ggc tca acg gcg gct 48  
 Met Gly Lys Gly Gly Asp Ala Arg Ala Ser Lys Gly Ser Thr Ala Ala  
 1 5 10 15

cgc aag atc agt tgg cag gaa gtc aag acc cac gcg tct ccg gag gac 96  
 Arg Lys Ile Ser Trp Gln Glu Val Lys Thr His Ala Ser Pro Glu Asp  
 20 25 30

gcc tgg atc att cac tcc aat aag gtc tac gac gtg tcc aac tgg cac 144  
 Ala Trp Ile Ile His Ser Asn Lys Val Tyr Asp Val Ser Asn Trp His  
 35 40 45

gaa cat ccc gga ggc gcc gtc att ttc acg cac gcc ggt gac gac atg 192  
 Glu His Pro Gly Gly Ala Val Ile Phe Thr His Ala Gly Asp Asp Met  
 50 55 60

acg gac att ttc gct gcc ttt cac gca ccc gga tcg cag tcg ctc atg 240  
 Thr Asp Ile Phe Ala Ala Phe His Ala Pro Gly Ser Gln Ser Leu Met  
 65 70 75 80

aag aag ttc tac att ggc gaa ttg ctc ccg gaa acc acc ggc aag gag 288  
 Lys Lys Phe Tyr Ile Gly Glu Leu Leu Pro Glu Thr Thr Gly Lys Glu  
 85 90 95

ccg cag caa atc gcc ttt gaa aag ggc tac cgc gat ctg cgc tcc aaa 336

30

40

Pro	Gln	Gln	Ile	Ala	Phe	Glu	Lys	Gly	Tyr	Arg	Asp	Leu	Arg	Ser	Lys		
			100					105					110				
ctc	atc	atg	atg	ggc	atg	ttc	aag	tcc	aac	aag	tgg	ttc	tac	gtc	tac		384
Leu	Ile	Met	Met	Gly	Met	Phe	Lys	Ser	Asn	Lys	Trp	Phe	Tyr	Val	Tyr		
		115					120					125					
aag	tgc	ctc	agc	aac	atg	gcc	att	tgg	gcc	gcc	gcc	tgt	gct	ctc	gtc		432
Lys	Cys	Leu	Ser	Asn	Met	Ala	Ile	Trp	Ala	Ala	Ala	Cys	Ala	Leu	Val		
	130					135					140						
ttt	tac	tgc	gac	cgc	ttc	tgg	gta	cac	ctg	gcc	agc	gcc	gtc	atg	ctg		480
Phe	Tyr	Ser	Asp	Arg	Phe	Trp	Val	His	Leu	Ala	Ser	Ala	Val	Met	Leu		
145					150					155					160		
gga	aca	ttc	ttt	cag	cag	tgc	gga	tgg	ttg	gca	cac	gac	ttt	ctg	cac		528
Gly	Thr	Phe	Phe	Gln	Gln	Ser	Gly	Trp	Leu	Ala	His	Asp	Phe	Leu	His		
				165					170					175			
cac	cag	gtc	ttc	acc	aag	cgc	aag	cac	ggg	gat	ctc	gga	gga	ctc	ttt		576
His	Gln	Val	Phe	Thr	Lys	Arg	Lys	His	Gly	Asp	Leu	Gly	Gly	Leu	Phe		
			180					185						190			
tgg	ggg	aac	ctc	atg	cag	ggt	tac	tcc	gta	cag	tgg	tgg	aaa	aac	aag		624
Trp	Gly	Asn	Leu	Met	Gln	Gly	Tyr	Ser	Val	Gln	Trp	Trp	Lys	Asn	Lys		
		195					200						205				
cac	aac	gga	cac	cac	gcc	gtc	ccc	aac	ctc	cac	tgc	tcc	tcc	gca	gtc		672
His	Asn	Gly	His	His	Ala	Val	Pro	Asn	Leu	His	Cys	Ser	Ser	Ala	Val		
		210				215						220					
gcg	caa	gat	ggg	gac	ccg	gac	atc	gat	acc	atg	ccc	ctt	ctc	gcc	tgg		720
Ala	Gln	Asp	Gly	Asp	Pro	Asp	Ile	Asp	Thr	Met	Pro	Leu	Leu	Ala	Trp		
225					230					235					240		
tcc	gtc	cag	caa	gcc	cag	tct	tac	cgg	gaa	ctc	caa	gcc	gac	gga	aag		768
Ser	Val	Gln	Gln	Ala	Gln	Ser	Tyr	Arg	Glu	Leu	Gln	Ala	Asp	Gly	Lys		
				245					250					255			
gat	tgc	ggt	ttg	gtc	aag	ttc	atg	atc	cgt	aac	caa	tcc	tac	ttt	tac		816
Asp	Ser	Gly	Leu	Val	Lys	Phe	Met	Ile	Arg	Asn	Gln	Ser	Tyr	Phe	Tyr		
			260					265						270			
ttt	ccc	atc	ttg	ttg	ctc	gcc	cgc	ctg	tgc	tgg	ttg	aac	gag	tcc	ttc		864
Phe	Pro	Ile	Leu	Leu	Leu	Ala	Arg	Leu	Ser	Trp	Leu	Asn	Glu	Ser	Phe		
		275					280						285				
aag	tgc	gcc	ttt	ggg	ctt	gga	gct	gcg	tgc	gag	aac	gct	gct	ctc	gaa		912
Lys	Cys	Ala	Phe	Gly	Leu	Gly	Ala	Ala	Ser	Glu	Asn	Ala	Ala	Leu	Glu		
		290				295					300						
ctc	aag	gcc	aag	ggt	ctt	cag	tac	ccc	ctt	ttg	gaa	aag	gct	ggc	atc		960
Leu	Lys	Ala	Lys	Gly	Leu	Gln	Tyr	Pro	Leu	Leu	Glu	Lys	Ala	Gly	Ile		
305					310						315				320		
ctg	ctg	cac	tac	gct	tgg	atg	ctt	aca	ggt	tgc	tcc	ggc	ttt	gga	cgc		1008
Leu	Leu	His	Tyr	Ala	Trp	Met	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Phe	Gly	Arg		
				325					330					335			

10

20

30

40

ttc tcg ttc gcg tac acc gca ttt tac ttt cta acc gcg acc gcg tcc 1056  
 Phe Ser Phe Ala Tyr Thr Ala Phe Tyr Phe Leu Thr Ala Thr Ala Ser  
                   340                                  345                                  350

tgt gga ttc ttg ctc gcc att gtc ttt ggc ctc ggc cac aac ggc atg 1104  
 Cys Gly Phe Leu Leu Ala Ile Val Phe Gly Leu Gly His Asn Gly Met  
                   355                                  360                                  365

gcc acc tac aat gcc gac gcc cgt ccg gac ttc tgg aag ctc caa gtc 1152  
 Ala Thr Tyr Asn Ala Asp Ala Arg Pro Asp Phe Trp Lys Leu Gln Val  
                   370                                  375                                  380

acc acg act cgc aac gtc acg ggc gga cac ggt ttc ccc caa gcc ttt 1200  
 Thr Thr Thr Arg Asn Val Thr Gly Gly His Gly Phe Pro Gln Ala Phe  
 385                                  390                                  395                                  400

10

gtc gac tgg ttc tgt ggt ggc ctc cag tac caa gtc gac cac cac tta 1248  
 Val Asp Trp Phe Cys Gly Gly Leu Gln Tyr Gln Val Asp His His Leu  
                                   405                                  410                                  415

ttc ccc agc ctg ccc cga cac aat ctg gcc aag aca cac gca ctg gtc 1296  
 Phe Pro Ser Leu Pro Arg His Asn Leu Ala Lys Thr His Ala Leu Val  
                                   420                                  425                                  430

gaa tcg ttc tgc aag gag tgg ggt gtc cag tac cac gaa gcc gac ctt 1344  
 Glu Ser Phe Cys Lys Glu Trp Gly Val Gln Tyr His Glu Ala Asp Leu  
                   435                                  440                                  445

gtg gac ggg acc atg gaa gtc ttg cac cat ttg ggc agc gtg gcc gcc 1392  
 Val Asp Gly Thr Met Glu Val Leu His His Leu Gly Ser Val Ala Gly  
                   450                                  455                                  460

20

gaa ttc gtc gtg gat ttc gta cgc gat gga ccc gcc atg taa 1434  
 Glu Phe Val Val Asp Phe Val Arg Asp Gly Pro Ala Met  
 465                                  470                                  475

<210> 4  
 <211> 477  
 <212> PRT  
 <213> Phaeodactylum tricornutum

<400> 4  
 Met Gly Lys Gly Gly Asp Ala Arg Ala Ser Lys Gly Ser Thr Ala Ala  
   1                                  5                                  10                                  15

30

Arg Lys Ile Ser Trp Gln Glu Val Lys Thr His Ala Ser Pro Glu Asp  
                   20                                  25                                  30

Ala Trp Ile Ile His Ser Asn Lys Val Tyr Asp Val Ser Asn Trp His  
                   35                                  40                                  45

Glu His Pro Gly Gly Ala Val Ile Phe Thr His Ala Gly Asp Asp Met  
                   50                                  55                                  60

Thr Asp Ile Phe Ala Ala Phe His Ala Pro Gly Ser Gln Ser Leu Met  
                   65                                  70                                  75                                  80

40

Lys Lys Phe Tyr Ile Gly Glu Leu Leu Pro Glu Thr Thr Gly Lys Glu  
85 90 95

Pro Gln Gln Ile Ala Phe Glu Lys Gly Tyr Arg Asp Leu Arg Ser Lys  
100 105 110

Leu Ile Met Met Gly Met Phe Lys Ser Asn Lys Trp Phe Tyr Val Tyr  
115 120 125

Lys Cys Leu Ser Asn Met Ala Ile Trp Ala Ala Ala Cys Ala Leu Val  
130 135 140

Phe Tyr Ser Asp Arg Phe Trp Val His Leu Ala Ser Ala Val Met Leu  
145 150 155 160

Gly Thr Phe Phe Gln Gln Ser Gly Trp Leu Ala His Asp Phe Leu His  
165 170 175

His Gln Val Phe Thr Lys Arg Lys His Gly Asp Leu Gly Gly Leu Phe  
180 185 190

Trp Gly Asn Leu Met Gln Gly Tyr Ser Val Gln Trp Trp Lys Asn Lys  
195 200 205

His Asn Gly His His Ala Val Pro Asn Leu His Cys Ser Ser Ala Val  
210 215 220

Ala Gln Asp Gly Asp Pro Asp Ile Asp Thr Met Pro Leu Leu Ala Trp  
225 230 235 240

Ser Val Gln Gln Ala Gln Ser Tyr Arg Glu Leu Gln Ala Asp Gly Lys  
245 250 255

Asp Ser Gly Leu Val Lys Phe Met Ile Arg Asn Gln Ser Tyr Phe Tyr  
260 265 270

Phe Pro Ile Leu Leu Leu Ala Arg Leu Ser Trp Leu Asn Glu Ser Phe  
275 280 285

Lys Cys Ala Phe Gly Leu Gly Ala Ala Ser Glu Asn Ala Ala Leu Glu  
290 295 300

Leu Lys Ala Lys Gly Leu Gln Tyr Pro Leu Leu Glu Lys Ala Gly Ile  
305 310 315 320

Leu Leu His Tyr Ala Trp Met Leu Thr Val Ser Ser Gly Phe Gly Arg  
325 330 335

Phe Ser Phe Ala Tyr Thr Ala Phe Tyr Phe Leu Thr Ala Thr Ala Ser  
340 345 350

Cys Gly Phe Leu Leu Ala Ile Val Phe Gly Leu Gly His Asn Gly Met  
355 360 365

Ala Thr Tyr Asn Ala Asp Ala Arg Pro Asp Phe Trp Lys Leu Gln Val  
370 375 380

10

20

30

Thr Thr Thr Arg Asn Val Thr Gly Gly His Gly Phe Pro Gln Ala Phe  
 385 390 395 400

Val Asp Trp Phe Cys Gly Gly Leu Gln Tyr Gln Val Asp His His Leu  
 405 410 415

Phe Pro Ser Leu Pro Arg His Asn Leu Ala Lys Thr His Ala Leu Val  
 420 425 430

Glu Ser Phe Cys Lys Glu Trp Gly Val Gln Tyr His Glu Ala Asp Leu  
 435 440 445

Val Asp Gly Thr Met Glu Val Leu His His Leu Gly Ser Val Ala Gly  
 450 455 460

Glu Phe Val Val Asp Phe Val Arg Asp Gly Pro Ala Met  
 465 470 475

10

<210> 5  
 <211> 1651  
 <212> DNA  
 <213> Phaeodactylum tricornutum

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (67)..(1554)

20

<400> 5  
 gaagaaggaa catataaaag taagccatct cctcgccacc atctaaagac ctaatatcta 60

ctcgtc atg gtt cgc ttt tca aca gcc gct cta ctt tct ctg tcg aca 108  
 Met Val Arg Phe Ser Thr Ala Ala Leu Leu Ser Leu Ser Thr  
 1 5 10

ttg aca act tca tgt att ggt gcc ttc cag ctg tct tcg cca gca caa 156  
 Leu Thr Thr Ser Cys Ile Gly Ala Phe Gln Leu Ser Ser Pro Ala Gln  
 15 20 25 30

ctt ccg aca agt agg ctt cgt cgg cat acg aac acg gcg ccg ctt tcg 204  
 Leu Pro Thr Ser Arg Leu Arg Arg His Thr Asn Thr Ala Pro Leu Ser  
 35 40 45

30

gcc gtg gcc gtc gac tcc ggt tct tcc gat ccg gcc ttg gta ggc aac 252  
 Ala Val Ala Val Asp Ser Gly Ser Ser Asp Pro Ala Leu Val Gly Asn  
 50 55 60

ctc ccc ctt ccc aac aac aat gat aat gag gac aag aac cgt aga atg 300  
 Leu Pro Leu Pro Asn Asn Asn Asp Asn Glu Asp Lys Asn Arg Arg Met  
 65 70 75

cca atg atg gac ttg aaa ggt att gct ctg tct ggt ctc aaa ggg caa 348  
 Pro Met Met Asp Leu Lys Gly Ile Ala Leu Ser Gly Leu Lys Gly Gln  
 80 85 90

gct ctt tcc gtc cga gcg gaa gat ttt cct cag gcg aaa gac ttg cgt 396  
 Ala Leu Ser Val Arg Ala Glu Asp Phe Pro Gln Ala Lys Asp Leu Arg  
 95 100 105 110

40

gcc gtc att ccg aaa gat tgc ttc gaa ccc gac acg gcc aaa tcg ttg	444	
Ala Val Ile Pro Lys Asp Cys Phe Glu Pro Asp Thr Ala Lys Ser Leu		
115 120 125		
gga tat ctt tcc gtt tca act atg ggg aca att ctc tgc tcc gtc gtc	492	
Gly Tyr Leu Ser Val Ser Thr Met Gly Thr Ile Leu Cys Ser Val Val		
130 135 140		
ggc gcg aac ctc ctt agt gtg ctc gat ccc tcc aat cca tta acc tgg	540	
Gly Ala Asn Leu Leu Ser Val Leu Asp Pro Ser Asn Pro Leu Thr Trp		
145 150 155		
cct ctc tgg gcg gcc tac ggt gcc gtc acg ggg acg gtc gcc atg ggg	588	10
Pro Leu Trp Ala Ala Tyr Gly Ala Val Thr Gly Thr Val Ala Met Gly		
160 165 170		
ctt tgg gtg ctg gcc cac gaa tgc gga cac ggc gcc ttt tcc aaa aac	636	
Leu Trp Val Leu Ala His Glu Cys Gly His Gly Ala Phe Ser Lys Asn		
175 180 185 190		
cga tcc ctc cag gat gcc gtg ggg tac att atc cat tcc atc atg ctg	684	
Arg Ser Leu Gln Asp Ala Val Gly Tyr Ile Ile His Ser Ile Met Leu		
195 200 205		
gtg cca tac ttt agt tgg cag cga tgc cat gcc gtg cat cac cag tat	732	
Val Pro Tyr Phe Ser Trp Gln Arg Ser His Ala Val His His Gln Tyr		
210 215 220		
acc aat cat atg gaa ctg ggg gaa aca cac gtt cct gat cga gcc gat	780	20
Thr Asn His Met Glu Leu Gly Glu Thr His Val Pro Asp Arg Ala Asp		
225 230 235		
aag gag ggc gag aag agc ctg gcg ctc cgc cag ttc atg ctg gat tcc	828	
Lys Glu Gly Glu Lys Ser Leu Ala Leu Arg Gln Phe Met Leu Asp Ser		
240 245 250		
ttt ggt aaa gac aag ggc atg aaa gca tac gga ggc ctc cag tgc ttt	876	
Phe Gly Lys Asp Lys Gly Met Lys Ala Tyr Gly Gly Leu Gln Ser Phe		
255 260 265 270		
ttg cat ctc atc gtg gga tgg cca gcc tac ctc ctg atc ggt gcg acc	924	30
Leu His Leu Ile Val Gly Trp Pro Ala Tyr Leu Leu Ile Gly Ala Thr		
275 280 285		
ggt gga ccc gac cgt ggt atg acc aac cat ttt tat ccc aac cct ttg	972	
Gly Gly Pro Asp Arg Gly Met Thr Asn His Phe Tyr Pro Asn Pro Leu		
290 295 300		
tcg acg cca aca cag ccc aag aaa gaa ctt ttc cct ggg aac tgg aaa	1020	
Ser Thr Pro Thr Gln Pro Lys Lys Glu Leu Phe Pro Gly Asn Trp Lys		
305 310 315		
gaa aag gtc tac cag tca gat att gga atc gcc gcc gtt gtc ggc gcc	1068	
Glu Lys Val Tyr Gln Ser Asp Ile Gly Ile Ala Ala Val Val Gly Ala		
320 325 330		
ctc att gct tgg acc gcc act tgc ggt cta gcc ccc gtc atg gcc ttg	1116	40

Leu Ile Ala Trp Thr Ala Thr Ser Gly Leu Ala Pro Val Met Ala Leu  
 335 340 345 350

tac ggt ggt ccc ttg atc gtc att aat gcc tgg ctg gta ctg tac acg 1164  
 Tyr Gly Gly Pro Leu Ile Val Ile Asn Ala Trp Leu Val Leu Tyr Thr  
 355 360 365

tgg ttg caa cat aca gat acc gat gtt ccg cac ttt tcc tcc gac aac 1212  
 Trp Leu Gln His Thr Asp Thr Asp Val Pro His Phe Ser Ser Asp Asn  
 370 375 380

cac aac ttt gtc aag ggc gca ctg cat acg atc gat cgt ccc tac gac 1260  
 His Asn Phe Val Lys Gly Ala Leu His Thr Ile Asp Arg Pro Tyr Asp 10  
 385 390 395

aaa ctt gat ccc tgg gga atc ata gac ttt ctg cac cac aag att gga 1308  
 Lys Leu Asp Pro Trp Gly Ile Ile Asp Phe Leu His His Lys Ile Gly  
 400 405 410

aca acg cat gtg gca cac cat ttt gac agt act atc ccc cac tat aag 1356  
 Thr Thr His Val Ala His His Phe Asp Ser Thr Ile Pro His Tyr Lys  
 415 420 425 430

gct cag att gct acc gat gcc atc aaa gcc aag ttt cca gaa gtg tac 1404  
 Ala Gln Ile Ala Thr Asp Ala Ile Lys Ala Lys Phe Pro Glu Val Tyr  
 435 440 445

ctc tat gac ccg aca cca att cca caa gcc atg tgg cgc gtc gcc aag 1452 20  
 Leu Tyr Asp Pro Thr Pro Ile Pro Gln Ala Met Trp Arg Val Ala Lys  
 450 455 460

gga tgt act gca gta gag caa cgc ggt gac gcc tgg gtg tgg aaa aac 1500  
 Gly Cys Thr Ala Val Glu Gln Arg Gly Asp Ala Trp Val Trp Lys Asn  
 465 470 475

gaa gga ata gaa gat ttg gtg gaa cat cgt caa agc aaa tta tcg agc 1548  
 Glu Gly Ile Glu Asp Leu Val Glu His Arg Gln Ser Lys Leu Ser Ser  
 480 485 490

gaa taa agcaacatat cgctttatgg aagaacaaac gtccattgtg taaaaccctg 1604  
 Glu  
 495 30

ataatttcaa tattgtgttt tgttttaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 1651

<210> 6  
 <211> 495  
 <212> PRT  
 <213> Phaeodactylum tricornutum

<400> 6  
 Met Val Arg Phe Ser Thr Ala Ala Leu Leu Ser Leu Ser Thr Leu Thr  
 1 5 10 15

Thr Ser Cys Ile Gly Ala Phe Gln Leu Ser Ser Pro Ala Gln Leu Pro  
 20 25 30 40

Thr Ser Arg Leu Arg Arg His Thr Asn Thr Ala Pro Leu Ser Ala Val  
35 40 45

Ala Val Asp Ser Gly Ser Ser Asp Pro Ala Leu Val Gly Asn Leu Pro  
50 55 60

Leu Pro Asn Asn Asn Asp Asn Glu Asp Lys Asn Arg Arg Met Pro Met  
65 70 75 80

Met Asp Leu Lys Gly Ile Ala Leu Ser Gly Leu Lys Gly Gln Ala Leu  
85 90 95

Ser Val Arg Ala Glu Asp Phe Pro Gln Ala Lys Asp Leu Arg Ala Val  
100 105 110

Ile Pro Lys Asp Cys Phe Glu Pro Asp Thr Ala Lys Ser Leu Gly Tyr  
115 120 125

Leu Ser Val Ser Thr Met Gly Thr Ile Leu Cys Ser Val Val Gly Ala  
130 135 140

Asn Leu Leu Ser Val Leu Asp Pro Ser Asn Pro Leu Thr Trp Pro Leu  
145 150 155 160

Trp Ala Ala Tyr Gly Ala Val Thr Gly Thr Val Ala Met Gly Leu Trp  
165 170 175

Val Leu Ala His Glu Cys Gly His Gly Ala Phe Ser Lys Asn Arg Ser  
180 185 190

Leu Gln Asp Ala Val Gly Tyr Ile Ile His Ser Ile Met Leu Val Pro  
195 200 205

Tyr Phe Ser Trp Gln Arg Ser His Ala Val His His Gln Tyr Thr Asn  
210 215 220

His Met Glu Leu Gly Glu Thr His Val Pro Asp Arg Ala Asp Lys Glu  
225 230 235 240

Gly Glu Lys Ser Leu Ala Leu Arg Gln Phe Met Leu Asp Ser Phe Gly  
245 250 255

Lys Asp Lys Gly Met Lys Ala Tyr Gly Gly Leu Gln Ser Phe Leu His  
260 265 270

Leu Ile Val Gly Trp Pro Ala Tyr Leu Leu Ile Gly Ala Thr Gly Gly  
275 280 285

Pro Asp Arg Gly Met Thr Asn His Phe Tyr Pro Asn Pro Leu Ser Thr  
290 295 300

Pro Thr Gln Pro Lys Lys Glu Leu Phe Pro Gly Asn Trp Lys Glu Lys  
305 310 315 320

Val Tyr Gln Ser Asp Ile Gly Ile Ala Ala Val Val Gly Ala Leu Ile  
325 330 335

Ala Trp Thr Ala Thr Ser Gly Leu Ala Pro Val Met Ala Leu Tyr Gly

10

20

30

40

340 345 350

Gly Pro Leu Ile Val Ile Asn Ala Trp Leu Val Leu Tyr Thr Trp Leu  
 355 360 365

Gln His Thr Asp Thr Asp Val Pro His Phe Ser Ser Asp Asn His Asn  
 370 375 380

Phe Val Lys Gly Ala Leu His Thr Ile Asp Arg Pro Tyr Asp Lys Leu  
 385 390 395 400

Asp Pro Trp Gly Ile Ile Asp Phe Leu His His Lys Ile Gly Thr Thr  
 405 410 415

His Val Ala His His Phe Asp Ser Thr Ile Pro His Tyr Lys Ala Gln  
 420 425 430

Ile Ala Thr Asp Ala Ile Lys Ala Lys Phe Pro Glu Val Tyr Leu Tyr  
 435 440 445

Asp Pro Thr Pro Ile Pro Gln Ala Met Trp Arg Val Ala Lys Gly Cys  
 450 455 460

Thr Ala Val Glu Gln Arg Gly Asp Ala Trp Val Trp Lys Asn Glu Gly  
 465 470 475 480

Ile Glu Asp Leu Val Glu His Arg Gln Ser Lys Leu Ser Ser Glu  
 485 490 495

10

20

<210> 7  
 <211> 1578  
 <212> DNA  
 <213> Physcomitrella patens

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1578)

<400> 7  
 atg gta ttc gcg ggc ggt gga ctt cag cag ggc tct ctc gaa gaa aac 48  
 Met Val Phe Ala Gly Gly Gly Leu Gln Gln Gly Ser Leu Glu Glu Asn  
 1 5 10 15 30

atc gac gtc gag cac att gcc agt atg tct ctc ttc agc gac ttc ttc 96  
 Ile Asp Val Glu His Ile Ala Ser Met Ser Leu Phe Ser Asp Phe Phe  
 20 25 30

agt tat gtg tct tca act gtt ggt tcg tgg agc gta cac agt ata caa 144  
 Ser Tyr Val Ser Ser Thr Val Gly Ser Trp Ser Val His Ser Ile Gln  
 35 40 45

cct ttg aag cgc ctg acg agt aag aag cgt gtt tcg gaa agc gct gcc 192  
 Pro Leu Lys Arg Leu Thr Ser Lys Lys Arg Val Ser Glu Ser Ala Ala  
 50 55 60

gtg caa tgt ata tca gct gaa gtt cag aga aat tcg agt acc cag gga 240  
 Val Gln Cys Ile Ser Ala Glu Val Gln Arg Asn Ser Ser Thr Gln Gly

30

40

65	70	75	80	
act gcg gag gca ctc gca gaa tca gtc gtg aag ccc acg aga cga agg				288
Thr Ala Glu Ala Leu Ala Glu Ser Val Val Lys Pro Thr Arg Arg Arg	85	90	95	
tca tct cag tgg aag aag tcg aca cac ccc cta tca gaa gta gca gta				336
Ser Ser Gln Trp Lys Lys Ser Thr His Pro Leu Ser Glu Val Ala Val	100	105	110	
cac aac aag cca agc gat tgc tgg att gtt gta aaa aac aag gtg tat				384
His Asn Lys Pro Ser Asp Cys Trp Ile Val Val Lys Asn Lys Val Tyr	115	120	125	
gat gtt tcc aat ttt gcg gac gag cat ccc gga gga tca gtt att agt				432
Asp Val Ser Asn Phe Ala Asp Glu His Pro Gly Gly Ser Val Ile Ser	130	135	140	
act tat ttt gga cga gac ggc aca gat gtt ttc tct agt ttt cat gca				480
Thr Tyr Phe Gly Arg Asp Gly Thr Asp Val Phe Ser Ser Phe His Ala	145	150	155	160
gct tct aca tgg aaa att ctt caa gac ttt tac att ggt gac gtg gag				528
Ala Ser Thr Trp Lys Ile Leu Gln Asp Phe Tyr Ile Gly Asp Val Glu	165	170	175	
agg gtg gag ccg act cca gag ctg ctg aaa gat ttc cga gaa atg aga				576
Arg Val Glu Pro Thr Pro Glu Leu Leu Lys Asp Phe Arg Glu Met Arg	180	185	190	
gct ctt ttc ctg agg gag caa ctt ttc aaa agt tcg aaa ttg tac tat				624
Ala Leu Phe Leu Arg Glu Gln Leu Phe Lys Ser Ser Lys Leu Tyr Tyr	195	200	205	
gtt atg aag ctg ctc acg aat gtt gct att ttt gct gcg agc att gca				672
Val Met Lys Leu Leu Thr Asn Val Ala Ile Phe Ala Ala Ser Ile Ala	210	215	220	
ata ata tgt tgg agc aag act att tca gcg gtt ttg gct tca gct tgt				720
Ile Ile Cys Trp Ser Lys Thr Ile Ser Ala Val Leu Ala Ser Ala Cys	225	230	235	240
atg atg gct ctg tgt ttc caa cag tgc gga tgg cta tcc cat gat ttt				768
Met Met Ala Leu Cys Phe Gln Gln Cys Gly Trp Leu Ser His Asp Phe	245	250	255	
ctc cac aat cag gtg ttt gag aca cgc tgg ctt aat gaa gtt gtc ggg				816
Leu His Asn Gln Val Phe Glu Thr Arg Trp Leu Asn Glu Val Val Gly	260	265	270	
tat gtg atc ggc aac gcc gtt ctg ggg ttt agt aca ggg tgg tgg aag				864
Tyr Val Ile Gly Asn Ala Val Leu Gly Phe Ser Thr Gly Trp Trp Lys	275	280	285	
gag aag cat aac ctt cat cat gct gct cca aat gaa tgc gat cag act				912
Glu Lys His Asn Leu His His Ala Ala Pro Asn Glu Cys Asp Gln Thr	290	295	300	

10

20

30

40

tac caa cca att gat gaa gat att gat act ctc ccc ctc att gcc tgg	960	
Tyr Gln Pro Ile Asp Glu Asp Ile Asp Thr Leu Pro Leu Ile Ala Trp		
305	310	315 320
agc aag gac ata ctg gcc aca gtt gag aat aag aca ttc ttg cga atc	1008	
Ser Lys Asp Ile Leu Ala Thr Val Glu Asn Lys Thr Phe Leu Arg Ile		
	325	330 335
ctc caa tac cag cat ctg ttc ttc atg ggt ctg tta ttt ttc gcc cgt	1056	
Leu Gln Tyr Gln His Leu Phe Phe Met Gly Leu Leu Phe Phe Ala Arg		
	340	345 350
ggc agt tgg ctc ttt tgg agc tgg aga tat acc tct aca gca gtg ctc	1104	
Gly Ser Trp Leu Phe Trp Ser Trp Arg Tyr Thr Ser Thr Ala Val Leu		10
	355	360 365
tca cct gtc gac agg ttg ttg gag aag gga act gtt ctg ttt cac tac	1152	
Ser Pro Val Asp Arg Leu Leu Glu Lys Gly Thr Val Leu Phe His Tyr		
	370	375 380
ttt tgg ttc gtc ggg aca gcg tgc tat ctt ctc cct ggt tgg aag cca	1200	
Phe Trp Phe Val Gly Thr Ala Cys Tyr Leu Leu Pro Gly Trp Lys Pro		
	385	390 395 400
tta gta tgg atg gcg gtg act gag ctc atg tcc gcc atg ctg ctg gcc	1248	
Leu Val Trp Met Ala Val Thr Glu Leu Met Ser Gly Met Leu Leu Gly		
	405	410 415
ttt gta ttt gta ctt agc cac aat ggg atg gag gtt tat aat tcg tct	1296	
Phe Val Phe Val Leu Ser His Asn Gly Met Glu Val Tyr Asn Ser Ser		20
	420	425 430
aaa gaa ttc gtg agt gca cag atc gta tcc aca cgg gat atc aaa gga	1344	
Lys Glu Phe Val Ser Ala Gln Ile Val Ser Thr Arg Asp Ile Lys Gly		
	435	440 445
aac ata ttc aac gac tgg ttc act ggt ggc ctt aac agg caa ata gag	1392	
Asn Ile Phe Asn Asp Trp Phe Thr Gly Gly Leu Asn Arg Gln Ile Glu		
	450	455 460
cat cat ctt ttc cca aca atg ccc agg cat aat tta aac aaa ata gca	1440	
His His Leu Phe Pro Thr Met Pro Arg His Asn Leu Asn Lys Ile Ala		
	465	470 475 480
cct aga gtg gag gtg ttc tgt aag aaa cac ggt ctg gtg tac gaa gac	1488	
Pro Arg Val Glu Val Phe Cys Lys Lys His Gly Leu Val Tyr Glu Asp		
	485	490 495
gta tct att gct acc ggc act tgc aag gtt ttg aaa gca ttg aag gaa	1536	
Val Ser Ile Ala Thr Gly Thr Cys Lys Val Leu Lys Ala Leu Lys Glu		
	500	505 510
gtc gcg gag gct gcg gca gag cag cat gct acc acc agt taa	1578	
Val Ala Glu Ala Ala Ala Glu Gln His Ala Thr Thr Ser		
	515	520 525



Glu Lys His Asn Leu His His Ala Ala Pro Asn Glu Cys Asp Gln Thr  
 290 295 300  
 Tyr Gln Pro Ile Asp Glu Asp Ile Asp Thr Leu Pro Leu Ile Ala Trp  
 305 310 315 320  
 Ser Lys Asp Ile Leu Ala Thr Val Glu Asn Lys Thr Phe Leu Arg Ile  
 325 330 335  
 Leu Gln Tyr Gln His Leu Phe Phe Met Gly Leu Leu Phe Phe Ala Arg  
 340 345 350  
 Gly Ser Trp Leu Phe Trp Ser Trp Arg Tyr Thr Ser Thr Ala Val Leu  
 355 360 365  
 Ser Pro Val Asp Arg Leu Leu Glu Lys Gly Thr Val Leu Phe His Tyr  
 370 375 380  
 Phe Trp Phe Val Gly Thr Ala Cys Tyr Leu Leu Pro Gly Trp Lys Pro  
 385 390 395 400  
 Leu Val Trp Met Ala Val Thr Glu Leu Met Ser Gly Met Leu Leu Gly  
 405 410 415  
 Phe Val Phe Val Leu Ser His Asn Gly Met Glu Val Tyr Asn Ser Ser  
 420 425 430  
 Lys Glu Phe Val Ser Ala Gln Ile Val Ser Thr Arg Asp Ile Lys Gly  
 435 440 445  
 Asn Ile Phe Asn Asp Trp Phe Thr Gly Gly Leu Asn Arg Gln Ile Glu  
 450 455 460  
 His His Leu Phe Pro Thr Met Pro Arg His Asn Leu Asn Lys Ile Ala  
 465 470 475 480  
 Pro Arg Val Glu Val Phe Cys Lys Lys His Gly Leu Val Tyr Glu Asp  
 485 490 495  
 Val Ser Ile Ala Thr Gly Thr Cys Lys Val Leu Lys Ala Leu Lys Glu  
 500 505 510  
 Val Ala Glu Ala Ala Ala Glu Gln His Ala Thr Thr Ser  
 515 520 525

10

20

30

<210> 9  
 <211> 873  
 <212> DNA  
 <213> *Physcomitrella patens*

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(873)

40

<400> 9  
 atg gag gtc gtg gag aga ttc tac ggt gag ttg gat ggg aag gtc tcg 48

Met	Glu	Val	Val	Glu	Arg	Phe	Tyr	Gly	Glu	Leu	Asp	Gly	Lys	Val	Ser		
1				5					10					15			
cag	ggc	gtg	aat	gca	ttg	ctg	ggc	agt	ttt	ggg	gtg	gag	ttg	acg	gat	96	
Gln	Gly	Val	Asn	Ala	Leu	Leu	Gly	Ser	Phe	Gly	Val	Glu	Leu	Thr	Asp		
			20					25					30				
acg	ccc	act	acc	aaa	ggc	ttg	ccc	ctc	gtt	gac	agt	ccc	aca	ccc	atc	144	
Thr	Pro	Thr	Thr	Lys	Gly	Leu	Pro	Leu	Val	Asp	Ser	Pro	Thr	Pro	Ile		
			35				40					45					
gtc	ctc	ggc	ggt	tct	gta	tac	ttg	act	att	gtc	att	gga	ggg	ctt	ttg	192	
Val	Leu	Gly	Val	Ser	Val	Tyr	Leu	Thr	Ile	Val	Ile	Gly	Gly	Leu	Leu		10
	50					55				60							
tgg	ata	aag	gcc	agg	gat	ctg	aaa	ccg	cgc	gcc	tcg	gag	cca	ttt	ttg	240	
Trp	Ile	Lys	Ala	Arg	Asp	Leu	Lys	Pro	Arg	Ala	Ser	Glu	Pro	Phe	Leu		
65					70				75						80		
ctc	caa	gct	ttg	gtg	ctt	gtg	cac	aac	ctg	ttc	tgt	ttt	gcg	ctc	agt	288	
Leu	Gln	Ala	Leu	Val	Leu	Val	His	Asn	Leu	Phe	Cys	Phe	Ala	Leu	Ser		
				85				90						95			
ctg	tat	atg	tgc	gtg	ggc	atc	gct	tat	cag	gct	att	acc	tgg	cgg	tac	336	
Leu	Tyr	Met	Cys	Val	Gly	Ile	Ala	Tyr	Gln	Ala	Ile	Thr	Trp	Arg	Tyr		
			100					105					110				
tct	ctc	tgg	ggc	aat	gca	tac	aat	cct	aaa	cat	aaa	gag	atg	gcg	att	384	
Ser	Leu	Trp	Gly	Asn	Ala	Tyr	Asn	Pro	Lys	His	Lys	Glu	Met	Ala	Ile		20
		115					120					125					
ctg	gta	tac	ttg	ttc	tac	atg	tct	aag	tac	gtg	gaa	ttc	atg	gat	acc	432	
Leu	Val	Tyr	Leu	Phe	Tyr	Met	Ser	Lys	Tyr	Val	Glu	Phe	Met	Asp	Thr		
	130					135				140							
gtt	atc	atg	ata	ctg	aag	cgc	agc	acc	agg	caa	ata	agc	ttc	ctc	cac	480	
Val	Ile	Met	Ile	Leu	Lys	Arg	Ser	Thr	Arg	Gln	Ile	Ser	Phe	Leu	His		
145					150					155					160		
gtt	tat	cat	cat	tct	tca	att	tcc	ctc	att	tgg	tgg	gct	att	gct	cat	528	
Val	Tyr	His	His	Ser	Ile	Ser	Leu	Ile	Trp	Trp	Ala	Ile	Ala	His			
				165				170						175			
cac	gct	cct	ggc	ggc	gaa	gca	tat	tgg	tct	gcg	gct	ctg	aac	tca	gga	576	
His	Ala	Pro	Gly	Gly	Glu	Ala	Tyr	Trp	Ser	Ala	Ala	Leu	Asn	Ser	Gly		
			180					185					190				
gtg	cat	ggt	ctc	atg	tat	gcg	tat	tac	ttc	ttg	gct	gcc	tgc	ctt	cga	624	
Val	His	Val	Leu	Met	Tyr	Ala	Tyr	Tyr	Phe	Leu	Ala	Ala	Cys	Leu	Arg		
			195				200					205					
agt	agc	cca	aag	tta	aaa	aat	aag	tac	ctt	ctt	tgg	ggc	agg	tac	ttg	672	
Ser	Ser	Pro	Lys	Leu	Lys	Asn	Lys	Tyr	Leu	Phe	Trp	Gly	Arg	Tyr	Leu		
	210					215					220						
aca	caa	ttc	caa	atg	ttc	cag	ttt	atg	ctg	aac	tta	gtg	cag	gct	tac	720	
Thr	Gln	Phe	Gln	Met	Phe	Gln	Phe	Met	Leu	Asn	Leu	Val	Gln	Ala	Tyr		40
225					230					235					240		



180 185 190

Val His Val Leu Met Tyr Ala Tyr Tyr Phe Leu Ala Ala Cys Leu Arg  
 195 200 205

Ser Ser Pro Lys Leu Lys Asn Lys Tyr Leu Phe Trp Gly Arg Tyr Leu  
 210 215 220

Thr Gln Phe Gln Met Phe Gln Phe Met Leu Asn Leu Val Gln Ala Tyr  
 225 230 235 240

Tyr Asp Met Lys Thr Asn Ala Pro Tyr Pro Gln Trp Leu Ile Lys Ile  
 245 250 255

Leu Phe Tyr Tyr Met Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Gly Asn Phe Tyr  
 260 265 270

Val Gln Lys Tyr Ile Lys Pro Ser Asp Gly Lys Gln Lys Gly Ala Lys  
 275 280 285

Thr Glu  
 290

10

<210> 11  
 <211> 1526  
 <212> DNA  
 <213> Phaeodactylum tricornutum

20

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (92)..(1402)

<400> 11  
 gcttccggtta gcgtcccata gtttggtaca cttggctgtg aaacgaatac gttcttggtc 60  
 tacttactac aacgaagcaa ccaccagcag c atg ggt aag gga ggt caa cga 112  
 Met Gly Lys Gly Gly Gln Arg  
 1 5

gct gta gct ccc aag agt gcc acc agc tct act ggc agt gct acc ctt 160  
 Ala Val Ala Pro Lys Ser Ala Thr Ser Ser Thr Gly Ser Ala Thr Leu  
 10 15 20

30

agc caa agc aag gaa cag gta tgg act tcg tcg tac aac cct ctg gcg 208  
 Ser Gln Ser Lys Glu Gln Val Trp Thr Ser Ser Tyr Asn Pro Leu Ala  
 25 30 35

aag gat tcc ccg gag ctg cca acc aaa ggc caa atc aag gcc gtc att 256  
 Lys Asp Ser Pro Glu Leu Pro Thr Lys Gly Gln Ile Lys Ala Val Ile  
 40 45 50 55

ccg aag gaa tgt ttc caa cgc tca gcc ttt tgg tct acc ttc tac ctg 304  
 Pro Lys Glu Cys Phe Gln Arg Ser Ala Phe Trp Ser Thr Phe Tyr Leu  
 60 65 70

atg cgc gat ctc gcc atg gct gcc gcc ttt tgc tac gga acc tca cag 352  
 Met Arg Asp Leu Ala Met Ala Ala Ala Phe Cys Tyr Gly Thr Ser Gln

40

75					80					85							
gtc	ctc	tcc	acc	gac	ctt	ccc	caa	gac	gcc	acg	ctc	att	ctg	ccc	tgg	400	
Val	Leu	Ser	Thr	Asp	Leu	Pro	Gln	Asp	Ala	Thr	Leu	Ile	Leu	Pro	Trp		
		90					95					100					
gct	ctc	ggc	tgg	ggc	gtc	tac	gcc	ttt	tgg	atg	gga	acc	att	ctc	acc	448	
Ala	Leu	Gly	Trp	Gly	Val	Tyr	Ala	Phe	Trp	Met	Gly	Thr	Ile	Leu	Thr		
	105					110					115						
ggg	cct	tgg	gta	gtt	gcg	cac	gaa	tgt	gga	cac	ggc	gct	tac	tcc	gac	496	
Gly	Pro	Trp	Val	Val	Ala	His	Glu	Cys	Gly	His	Gly	Ala	Tyr	Ser	Asp		
120					125					130					135		
tcc	cag	acg	ttc	aat	gac	gtg	gtc	ggc	ttt	atc	gtc	cac	caa	gct	ttg	544	10
Ser	Gln	Thr	Phe	Asn	Asp	Val	Val	Gly	Phe	Ile	Val	His	Gln	Ala	Leu		
			140					145						150			
ctc	gtc	ccc	tac	ttt	gcc	tgg	cag	tac	acc	cac	gcg	aaa	cac	cac	cgt	592	
Leu	Val	Pro	Tyr	Phe	Ala	Trp	Gln	Tyr	Thr	His	Ala	Lys	His	His	Arg		
			155				160						165				
cga	acc	aac	cat	ctg	gtg	gac	ggc	gag	tcc	cac	gtc	cct	tct	acc	gcc	640	
Arg	Thr	Asn	His	Leu	Val	Asp	Gly	Glu	Ser	His	Val	Pro	Ser	Thr	Ala		
		170					175					180					
aag	gat	aac	ggc	ctc	ggg	cgg	cac	aac	gag	cga	aac	tcc	ttc	tac	gcc	688	
Lys	Asp	Asn	Gly	Leu	Gly	Pro	His	Asn	Glu	Arg	Asn	Ser	Phe	Tyr	Ala		
	185					190					195					20	
gcg	tgg	cac	gag	gcc	atg	gga	gac	ggc	gcc	ttt	gcc	gtc	ttt	caa	gtc	736	
Ala	Trp	His	Glu	Ala	Met	Gly	Asp	Gly	Ala	Phe	Ala	Val	Phe	Gln	Val		
200					205					210					215		
tgg	tcg	cac	ttg	ttc	gtc	ggc	tgg	cct	ctc	tac	ttg	gcc	ggt	ctg	gcc	784	
Trp	Ser	His	Leu	Phe	Val	Gly	Trp	Pro	Leu	Tyr	Leu	Ala	Gly	Leu	Ala		
			220						225					230			
agt	acc	gga	aag	ctt	gcg	cac	gaa	ggt	tgg	tgg	ctg	gaa	gaa	cgg	aac	832	
Ser	Thr	Gly	Lys	Leu	Ala	His	Glu	Gly	Trp	Trp	Leu	Glu	Glu	Arg	Asn		
		235						240					245				
gcg	att	gcg	gat	cac	ttt	cga	ccc	agc	tct	ccc	atg	ttc	ccc	gcc	aag	880	30
Ala	Ile	Ala	Asp	His	Phe	Arg	Pro	Ser	Ser	Pro	Met	Phe	Pro	Ala	Lys		
		250					255					260					
atc	cgt	gcc	aag	att	gcc	ctt	tcc	agc	gcg	acg	gaa	ctc	gcc	gtg	ctc	928	
Ile	Arg	Ala	Lys	Ile	Ala	Leu	Ser	Ser	Ala	Thr	Glu	Leu	Ala	Val	Leu		
	265					270					275						
gct	gga	ctc	ttg	tat	gtc	ggt	aca	cag	gtc	gga	cac	ctt	ccc	gtc	ctg	976	
Ala	Gly	Leu	Leu	Tyr	Val	Gly	Thr	Gln	Val	Gly	His	Leu	Pro	Val	Leu		
280					285					290					295		
ctg	tgg	tac	tgg	gga	cgg	tac	acc	ttt	gtc	aac	gct	tgg	ctt	gta	ctc	1024	
Leu	Trp	Tyr	Trp	Gly	Pro	Tyr	Thr	Phe	Val	Asn	Ala	Trp	Leu	Val	Leu		
				300					305					310		40	

tac acg tgg ctg cag cat acg gac ccg tcc atc ccg cac tac ggt gaa 1072  
Tyr Thr Trp Leu Gln His Thr Asp Pro Ser Ile Pro His Tyr Gly Glu  
315 320 325

ggc gag tgg acc tgg gtc aag ggc gcg dtc tct acc att gat cga gac 1120  
Gly Glu Trp Thr Trp Val Lys Gly Ala Leu Ser Thr Ile Asp Arg Asp  
330 335 340

tac ggc atc ttc gat ttc ttt cac cac acc atc ggt tcc acg cac gtg 1168  
Tyr Gly Ile Phe Asp Phe Phe His His Thr Ile Gly Ser Thr His Val  
345 350 355

gta cac cat ttg ttc cac gaa atg ccc tgg tac aat gcc ggc att gcc 1216  
Val His His Leu Phe His Glu Met Pro Trp Tyr Asn Ala Gly Ile Ala  
360 365 370 375

acg caa aag gtc aag gaa ttt ttg gaa ccc cag ggc ttg tac aat tac 1264  
Thr Gln Lys Val Lys Glu Phe Leu Glu Pro Gln Gly Leu Tyr Asn Tyr  
380 385 390

gat ccg acc ccc tgg tac aag gcc atg tgg cgc att gcc cgg acc tgt 1312  
Asp Pro Thr Pro Trp Tyr Lys Ala Met Trp Arg Ile Ala Arg Thr Cys  
395 400 405

cac tat gtg gag tca aac gag ggt gtg cag tat ttc aag agt atg gaa 1360  
His Tyr Val Glu Ser Asn Glu Gly Val Gln Tyr Phe Lys Ser Met Glu  
410 415 420

aac gtg ccg ctg act aag gat gtg cga aac aaa gcc gca tga 1402  
Asn Val Pro Leu Thr Lys Asp Val Arg Asn Lys Ala Ala  
425 430 435

gaaaaagtgc caccgacgca taattttaca atcctaccaa caagaccaac attatatggt 1462

tttcgcttaa aagatagttt tttctaccat ctgtgtagtc ggcacaaaaa aaaaaaaaaa 1522

aaaa 1526

10

20

<210> 12  
<211> 436  
<212> PRT  
<213> Phaeodactylum tricornutum

30

<400> 12  
Met Gly Lys Gly Gly Gln Arg Ala Val Ala Pro Lys Ser Ala Thr Ser  
1 5 10 15  
Ser Thr Gly Ser Ala Thr Leu Ser Gln Ser Lys Glu Gln Val Trp Thr  
20 25 30  
Ser Ser Tyr Asn Pro Leu Ala Lys Asp Ser Pro Glu Leu Pro Thr Lys  
35 40 45  
Gly Gln Ile Lys Ala Val Ile Pro Lys Glu Cys Phe Gln Arg Ser Ala  
50 55 60  
Phe Trp Ser Thr Phe Tyr Leu Met Arg Asp Leu Ala Met Ala Ala Ala

40



Pro Gln Gly Leu Tyr Asn Tyr Asp Pro Thr Pro Trp Tyr Lys Ala Met  
 385 390 395 400

Trp Arg Ile Ala Arg Thr Cys His Tyr Val Glu Ser Asn Glu Gly Val  
 405 410 415

Gln Tyr Phe Lys Ser Met Glu Asn Val Pro Leu Thr Lys Asp Val Arg  
 420 425 430

Asn Lys Ala Ala  
 435

<210> 13  
 <211> 3598  
 <212> DNA  
 <213> Unknown

10

<220>  
 <223> Sequenz stellt eine pflanzliche  
 Promotor-Terminator-Expressionskassette in Vektor  
 pUC19 dar

<400> 13  
 tcgcgcgttt cggatgatgac ggtgaaaacc tetgacacat gcagctcccg gagacgggtca 60  
 cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg 120  
 ttggcgggtg tcggggctgg cbtaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc 180  
 accatatgcg gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcaggcgcc 240  
 attcgccatt caggctgccc aactgttggg aagggcgatc ggtgcggggc tcttcgctat 300  
 tacgccagct ggcgaaaggg ggatgtgctg caaggcgatt aagttgggta acgccagggt 360  
 tttcccagtc acgacggttc aaaaagcagc ccagtgcaatt cggcgcgccc agctcctcga 420  
 gcaaatttac acattgccac caaacgtcta aacccttgta atttgtttt gtcttactat 480  
 gtgtgttatg tatttgattc gcgataaatt tttatatttg gtactaaaatt tataaacacct 540  
 tttatgctaa cgtttgcaa cacttagcaa tttgcaagtt gattaattga ttctaaatta 600  
 ttttctctt ctaaatacat atactaatca actggaaatg taaatatttg ctaaatattc 660  
 tactatagga gaattaaagt gagtgaatat ggtaccacaa ggtttgaga ttaattgtt 720  
 gcaatgctgc atggatggca tatabaccaa acattcaata attcttgagg ataataatgg 780  
 taccacacaa gatttgaggt gcatgaacgt cacgtggaca aaaggttag taatttttca 840  
 agacaacaat gttaccacac acaagttttg aggtgcatgc atggatgccc tgtggaaagt 900  
 ttaaaaatat tttgaaatg atttgcattg aagccatgtg taaaaccatg acatccactt 960  
 ggaggatgca ataatgaaga aaactacaaa tttacatgca actagtattg catgtagtct 1020

20

30

40

atataatgag gattttgcaa tactttcatt catacacact cactaagttt tacacgatta 1080  
taattttcttc atagccagcc caccgcggtg ggcggccgcc tgcagtctag aaggcctcct 1140  
gctttaatga gatatgcgag acgcctatga tcgcatgata tttgctttca attctgttgt 1200  
gcacgttgta aaaaacctga gcatgctgtag ctcagatcct tacgcgctgt ttcggttcat 1260  
tctaataaat atatcaccgg ttactatcgt atttttatga ataataatcct ccgtrcaatt 1320  
tactgattgt ccgctgcacga attcagagctc ggcgcccaa gcttggcgta atcatggcca 1380  
tagctgtttc ctgtgtgaaa ttgttatccg ctcacaattc cacacaacat acgagccgga 1440  
agcataaagt gtaaagcctg gggtgccctaa tgagtgcgct aactcacatt aattgcgctg 1500  
cgctcactgc ccgctttcca gtcgggaaac ctgtcgtgcc agctgcatta atgaatggc 1560  
caacgcgctg ggagagggcg tttgcgtatt gggcgctctt ccgcttctc gctcactgac 1620  
tcgctgcgct cggctgttcg gctgcggcga gcggtatcag ctcactcaa ggcggtaata 1680  
cggttatcca cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaa aggccagcaa 1740  
aaggccagga accgtaaaaa gcccgcgttg ctggcgtttt tccataggct ccgccccct 1800  
gacgagcadc aaaaaatcg acgctcaagt cagaggtggc gaaaccgcac aggactataa 1860  
agataccagg cgtttcccc tggaagctcc ctcgtgcgct ctcctgttcc gaccctgccg 1920  
cttaccggat accgttccgc ctttctcctc tggggaagcg tggcgctttc tcatagctca 1980  
cgctgtaggt atctcagttc ggtgtaggtc gttcgtcca agctgggctg tgtgcacgaa 2040  
cccccgctc agcccgaccg ctgcgcctta tccggtaact atcgtcttga gtccaaccgc 2100  
gtaagacacg acttatcgcc actggcagca gccactggta acaggattag cagagcgagg 2160  
tatgtaggcg gtgctacaga gttcttgaag tgggtggccta actacggcta cactagaagg 2220  
acagtatttg gtatctgcgc tctgctgaag ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc 2280  
tcttgatccg gcaaaaaaac caccgctggt agcgggtggt tttttgtttg caagcagcag 2340  
attacgcgca gaaaaaaagg atctcaagaa gatcctttga tctttctac ggggtctgac 2400  
gctcagtgga acgaaaactc acgttaaggg attttggta tgagattatc aaaaaggatc 2460  
ttcacctaga tccttttaaa ttaaaaatga agttttaaat caatctaaag tatatatgag 2520  
taaaacttgg ctgacagtta ccaatgctta atcagtgagg cacctatctc agcgatctgt 2580  
ctatttcggt catccatagt tgctgactc ccgctcgtgt agataactac gatacgggag 2640  
ggcttaccat ctggccccag tgctgcaatg ataccgcgag acccagctc accggctcca 2700  
gatttatcag caataaacca gccagccgga agggccgagc gcagaagtgg tcctgcaact 2760

10

20

30

40

ttatccgct ccattccagtc tattaartgt tgccgggaag cttagagtaag tagttcgcca 2820  
 gttaaatagtt tgcgcaacgt tgttgccatt gctacaggca tcgtgggtgc acgctcgtcg 2880  
 tttggtatgg ctccattcag ctccggttcc caacgatcaa ggcgagttac atgatcccc 2940  
 atgttggtgca aaaaagcggg tagctccttc ggtcctccga tcgttggtcag aagtaagttg 3000  
 gccgcagtgt tatcactcat ggttatggca gcactgcata attctcttac tgtcatgcca 3060  
 tcogtaagat gcttttctgt gactgggtgag tactcaacca agtcattctg agaatagtgt 3120  
 atgcggcgac cgagttgctc ttgcccggcg tcaatacggg ataataccgc gccacatagc 3180  
 agaactttaa aagtgtcat cattggaaaa cgttcttogg ggcgaaaact ctcaaggatc 3240  
 ttaccgctgt tgagatccag ttogatgtaa cccactogtg caccacaactg atcttcagca 3300  
 tcttttactt tcaccagcgt ttctgggtga gcaaaaacag gaaggcaaaa tgccgcaaaa 3360  
 aagggaaataa gggcgacacg gaaatgttga ataactatc tcttctttt tcaatattat 3420  
 tgaagcattc atcaggggta ttgtctcatg agcggataca tatttgaatg tatttagaaa 3480  
 aataaacaaa taggggttcc ggcacattt cccgaaaag tgccacctga cgtctaagaa 3540  
 accattatta tcatgacatt aacctataaa aataggcgta tcacgaggcc ctttcgtc 3598

10

<210> 14  
 <211> 3590  
 <212> DNA  
 <213> Unknown

20

<220>  
 <223> Sequenz stellt eine pflanzliche  
 Promotor-Terminator-Expressionskassette in Vektor  
 pUC19 dar

<400> 14  
 tcgcgcgttt cggatgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacgggtca 60  
 cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg 120  
 ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc 180  
 accatatgcg gttgaaata ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcaggcgcc 240  
 attcgccatt caggctgcgc aactgttggg aagggcgatc ggtgcggggc tcttcgctat 300  
 tacgccagct ggcgaaaagg ggatgtgctg caaggcgatt aagttgggta acgccagggt 360  
 tttccagtc acgacgttgt aaaacgacgg ccagtgaatt cggcgcgccg agctcctcga 420  
 gcaaatctac acattgccac taaacgtcta aacccttcta atttggtttt gttttactat 480  
 gtgtgttatg tatttgatgt gcgataaatt tttatatttg gtactaaatt tataacacct 540

30

40

tttatgctaa cgtttgccaa cacttagcaa tttgcaagtt gattaattga ttctaaatta 600  
 tttttgtctt ctaatacat atactaatca actggaaatg taaatatttg ctaatatctc 660  
 tactatagga gaactaaagt gagtgaatat ggtaccacaa ggtttgaga ttttaattgtt 720  
 gcaatgctgc atggatggca tatacaccia acattcaata attcttgagg ataataatgg 780  
 taccacacaa gatttgaggt gcatgaacgt cacgtggaca aaagggttag taatttttca 840  
 agacaacaat gttaccacac acaagttttg aggtgcatgc atggatgcc cgtggaaagt 900  
 ttaaaaaat tttggaaatg atttgcatgg aagccatgtg taaaaccatg acatccactt 960 10  
 ggaggatgca ataataaga aaactacaaa tttacatgca actagttatg catgtagtct 1020  
 atataatgag gattttgcaa tactttcatt catacacact cactaagttt tacacgatta 1080  
 taatttcttc atagccagcg gatccgatat cgggcccgct agcgttaacc ctgctttaat 1140  
 gagatatgcg agacgcctat gatcgcatga tatttgcttt caattctgtt gtgcacgttg 1200  
 taaaaaacct gagcatgtgt agctcagatc cttaccgccc gtttcgggtc attctaataga 1260  
 atatatcacc cgtaactatc gtatttttat gaataataat ctcogttcaa tttactgatt 1320  
 gtcogtgcac gaattcgagc toggcgcgcc aagcttggcg taatcatggt catagctgtt 1380 20  
 tctgtgtga aattgttacc cgctcacaat tccacacaac atacgagccc gaagcataaa 1440  
 gtgtaaagcc tggggtgcct aatgagtgag ctaactcaca tcaattgctt tggcctcact 1500  
 gccgctttc cagtgggaa acctgtcgtg ccagctgcat taatgaatcg gccaacgccc 1560  
 ggggagagggc gtttgcgta ttgggcgctc ttccgcttc togtcactg actcgcgcg 1620  
 ctccgctgtt cggctcggc gagcggatc agctcactca aaggcggtaa tacggttatc 1680  
 cacagaatca ggggataacg .caggaaagaa catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag 1740  
 gaaccgtaaa aaggccgctt tgctggcgtt tttccatagg ctccgcccc ctgacgagca 1800 30  
 tcacaaaaat cgacgctcaa gtcagaggtg gcgaaacccg acaggactat aaagatacca 1860  
 ggcgtttccc cctggaagct ccctcgtcgc ctctcctgtt ccgaccctgc cgttaccgg 1920  
 atacctgtcc gctttctcc ctccgggaag cgtggcgtt tctcatagct cacgctgtag 1980  
 gtatctcagt togggttagg togttcgctc caagctgggc tgtgtgcacg aacccccgt 2040  
 tcagccogac cgtcgcct tatccgtaa ctatcgtctt ggtccaacc cggtaagaca 2100  
 cgacttatcg cactggcag cagccactgg taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg 2160  
 cggctctaca gattcttga agtggtggcc taactacggc tacactagaa ggacagtatt 2220  
 tggatatctg cctcgtcga agccagttac ctccgaaaa agagttggta gctcttgatc 2280 40

cggcaaacaa accaccgctg gtagcgggtg tttttttggt tgcaagcagc agattacgcg 2340  
 cagaaaaaaaa ggatctcaag aagatccttt gatcttttct acgggggtctg acgctcagtg 2400  
 gaacgaaaaac tcacgttaag ggattttggt catgagatta tcaaaaagga tcttcacctt 2460  
 gatcctttta aattaaaaat gaagttttaa atcaatctaa agtatatatg agtaaacttg 2520  
 gtctgacagt taccaatgct taatcagtga ggcacctatc tcagcgatct gtctatttctg 2580  
 ttcattccata gttgcoctgac tccccgtcgt gtagataaact acgatacggg agggccttacc 2640  
 atctggcccc agtgetgcaa tgataccggc agaccacgc tcaccggctc cagatttctc 2700  
 agcaataaac cagccagccg gaagggccga gcgcagaagt ggtcctgcaa ctttatccgc 2760  
 ctccatccag tctattaatt gttgccggga agctagagta agtagttcgc cagttaatag 2820  
 tttgcgcaac gttgttgcca ttgctacagg catcgtgggtg tcacgctcgt cgtttggtat 2880  
 ggcttcattc agctccggct cccaacgatc aaggcgagtt acatgatccc ccatggttggtg 2940  
 caaaaaagcg gttagctcct toggctctcc gatcgttgct agaagtaagt tggccgcagt 3000  
 gttatcactc atggttatgg cagcactgca taattctctt actgtcatgc catccgtaag 3060  
 atgcttttct gtgactgggt agtactcaac caagtcattc tgagaatagt gtatgcggcg 3120  
 accgagttgc tcttgcccgg cgtcaatacg ggataatacc gcgccacata gcagaacttt 3180  
 aaaagtgtc atcattggaa aacgttcttc ggggcgaaaa ctctcaagga tcttaccgct 3240  
 gttgagatcc agttogatgt aaccactcgc tgcaccaaac tgatcttcag catcttttac 3300  
 tttcaccagc gtttctgggt gagcaaaaac aggaaggcaa aatgccgcaa aaaagggaaat 3360  
 aagggcgaca cggaaatgtt gaatactcat actctctctt tttoaatatt attgaagcat 3420  
 ttatcagggt tattgtctca tgagcggata catatttgaa tgtattttaga aaaataaaca 3480  
 aataggggtt ccgcgcacat ttccccgaaa agtgccacct gacgtctaag aaaccattat 3540  
 tatcatgaca ttaacctata aaaataggcg taccacgagg cctttctgctc 3590

10

20

30

<210> 15  
 <211> 3584  
 <212> DNA  
 <213> Unknown

<220>  
 <223> Sequenz stellt eine pflanzliche  
 Promotor-Terminator-Expressionskassette in Vektor  
 pUC19 dar

<400> 15  
 tcgcgcgttt cgggtgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccc gagacggtca 60

40

cagcttgctt gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg 120  
ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc 180  
accatatgcg gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcaggcgcc 240  
attcgcatt caggctgctc aactgttggg aagggcgatc ggtgcgggcc tcttcgctat 300  
tacgccagct ggogaaaggg ggatgtgctg caaggcgatt aagttgggta acgccagggt 360  
ttcccagtc acgacgttgt aaaacgacgg ccagtgaatt cggcgcgcc agctctcga 420  
gcaaatttac acattgccac taaacgtcta aacccttgta atttgtttt gttttactat 480  
gtgtgttatg tatttgatct gcgataaatt tttatatttg gtactaaatt tataacacct 540  
tttatgctaa cgtttgcca cacttagcaa tttgcaagtt gattaattga ttctaaatta 600  
ttttgtctt ctaaatacat atactaatca actggaaatg taaatatttg ctaaatattc 660  
tactatagga gaattaaagt gagtgaatat ggtaccacaa ggtttgaga tttaatggt 720  
gcaatgctgc atggatggca tatacaccac acattcaata attcttgagg ataataatgg 780  
taccacacaa gatttgaggt gcatgaacgt cacgtggaca aaaggtttag caatttttca 840  
agacaacaat gttaccacac acaagttttg aggtgcatgc atggatgcc tgtggaaagt 900  
ttaaaaat tttggaaatg atttgcatgg aagccatgtg taaaaccatg acatccactt 960  
ggaggatgca ataatgaaga aaactacaaa tttacatgca actagttatg catgtagtct 1020  
acataatgag gattttgcaa tactttcatt catacacact cactaagttt tacacgatta 1080  
taatctctt atagccagca gatctgccgg catcgatccc gggccatggc ctgctttaat 1140  
gagatatgcg agacgcctat gatcgcatga ttttgcttt caattctggt gtgcacgttg 1200  
taaaaaacct gagcatgtgt agctcagatc cttaccgccg gtttcggttc attcctaatga 1260  
acatatacacc cgttactatc gtatttttat gaataatatt ctccgttcaa tttactgatt 1320  
gtccgtcgac gagctcggcg cgcgaagctt ggcgtaatca tggatcatagc tgtttcctgt 1380  
gtgaaattgt tatccgctca caattccaca caacatacga gccggaagca taaagtgtaa 1440  
agcctggggt gcctaagtag tgagctaact cacattaatt gcgttgctc cactgccgc 1500  
ttccagtcg ggaaacctgt cgtgccagct gcattaatga atcggccaac gcgcggggag 1560  
agggggttg cgtattgggc gctcttcgc ttcctcgtc actgactcgc tgcgctcgg 1620  
cgttcggctg cggcgagcgg tatcagctca ctcaaaggcg gtaatacgg 1680  
atcaggggat aacgcaggaa agaacatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg 1740  
taaaaaggcc gcgttgctgg cgtttttcca taggctcgc cccctgacg agcatcaca 1800

10

20

30

40

aaatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat accaggcgct 1860  
 tccccctgga agctccctcg tggctctcc tgttccgacc ctgccgctta cgggatacct 1920  
 gtccgccttt ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct gtaggtatct 1980  
 cagttcggtg taggtcgttc gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc 2040  
 cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg tottgagtcc aaccggtaa gacacgactt 2100  
 atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg taggcgggtc 2160  
 tacagagttc ctgaagtggc gccctaacta cggctacact agaaggacag tatttggtat 2220  
 ctgctctctg ctgaagccag ctaccttcgg aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa 2280  
 acaaaccacc gctggtagcg gtggtttttt tgtttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa 2340  
 aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt ttctacggg tctgacgctc agtggaacga 2400  
 aaactcacgt taagggattt tggtcattgag attatcaaaa aggatcttca cctagatcct 2460  
 tttaaattaa aatgaagtt ttaaataaat ctaaagtata tatgagtaaa ctgggtctga 2520  
 cagttaccaa tgcctaatca gtgaggcacc tatctcagcg atctgtctat ttcgttcctc 2580  
 catagttgcc tgactccccg tcgtgtagat aactacgata cgggagggct taccatctgg 2640  
 cccagtgct gcaatgatac cgcgagacc acgctcaccg gctccagatt tatcagcaat 2700  
 aaaccagcca gccggaaggg ccgagcgcag aagtgtctct gcaactttat ccgcctccat 2760  
 ccagtcatt aattgttgc ggaagctag agtaagtagt tcgccagtta atagtttgcg 2820  
 caacgttgtt gccattgcta caggcatcgt ggtgtcacgc tcgtogtttg gtatggcttc 2880  
 attcagctcc ggttccaac gatcaaggcg agttacatga tccccatgt tgtgcaaaaa 2940  
 agcggttagc tccttcggtc ctccgatcgt tgtcagaagt aagttggccg cagtgttctc 3000  
 actcatggtt atggcagcac tgcataattc tcttactgtc atgccatccg taagatgctt 3060  
 ttctgtgact ggtgagtact caaccaagtc attctgagaa tagtgtatgc ggcgaccgag 3120  
 ttgctcttgc ccggcgtcaa tacgggataa tacgcgcca catagcagaa ctttaaaagt 3180  
 gctcatcatt ggaaaacgtt ctccggggcg aaaactctca aggatcttac cgtgttgag 3240  
 atccagttcg atgtaacca ctctgcacc caactgatct tcagatctt ttactttcac 3300  
 cagcgtttct gggtagcaaa aaacaggaag gcaaaatgcc gcaaaaaagg gaataagggc 3360  
 gacacggaaa tgttgaatac tcatactctt cctttttcaa tattattgaa gcatttatca 3420  
 gggttattgt ctcatgagcg gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata aacaaatagg 3480  
 ggttccgccc acatttcccc gaaaagtgcc acctgacgtc taagaaacca ttattatcat 3540

10

20

30

40

gacattaacc tataaaaata ggcgtatcac gaggcctttt cgtc 3584

<210> 16  
<211> 4507  
<212> DNA  
<213> Unknown

<220>  
<223> Sequenz stellt eine pflanzliche Promotor-Terminator-Expressionskassette in Vektor pUC19 dar

<400> 16  
tcgcgcggtt cgggtgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacgggtca 60  
cagcttgctt gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg 120  
ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc 180  
accatagcgc gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcagggcgc 240  
attcgccatt caggctgcgc aactgttggg aaggcgcgac ggtgcgggcc tcttcgctat 300  
tacgccagct ggcgaaaggg ggatgtgctg caaggcgatt aagtgggta acgccagggt 360  
tttcccagtc acgacgttgt aaaacgacgg ccagtgaatt cggcgcggcg agctcctcga 420  
gcaaatttac acattgccac taaacgtcta aacccttgta atttgtttt gtttactat 480  
gtgtgttatg tatttgattt gcgataaatt tttatatttg gtactaaatt tataacacct 540  
tttatgctaa cgtttgccaa cacttagcaa tttgcaagtt gattaattga ttctaaatta 600  
ttttgtctt ctaaatacat aactaatca actggaaatg taaatatttg ctaatatctc 660  
tactatagga gaattaaagt gagtgaatat ggtaccacaa ggtttgaga ttaattgtt 720  
gcaatgctgc atggatggca tatacaccaa acattcaata attcttgagg ataataatgg 780  
taccacacaa gatttgaggt gcatgaacgt cacgtggaca aaaggtttag taatttttca 840  
agacaacaat gttaccacac acaagttttg aggtgcatgc atggatgcc tgtggaaagt 900  
ttaaaaaat tttggaaatg atttgcatgg aagccatgg taaaacctg acatccactt 960  
ggaggatgca ataatgaaga aactacaaa tttacatgca actagttatg catgtagtct 1020  
atataatgag gattttgcaa tactttcatt catacacact cactaagttt tacacgatta 1080  
taattttctc atagccagcc caccgcgggtg ggcggccgcc tgcagtctag aaggcctcct 1140  
gctttaatga gatatgcgag acgcctatga tcgcatgata tttgctttca attctgttgt 1200  
gcacgttgta aaaaacctga gcattgttag ctgagatcct taccgcgggt ttcggttcat 1260  
tctaataaat atatcacccg ttaactatct atttttatga ataataattc ccgttcaatt 1320

10

20

30

40

tactgattgt cgcgcgagca aatttacaca ttgccactaa acgtctaacc ccttgtaatt 1380  
 tgtttttggt ttactatgtg tgttatgtat ttgatctgcg ataaatcttt atatttggtg 1440  
 ctaaatttat aacacctttt atgctaactg ttgccaacac ttagcaattt gcaagttgat 1500  
 taattgattc taaattatct ttgtcttcta aatacatata ctaatcaact ggaaatgtaa 1560  
 atatttgcta atatttctac tataggagaa ttaaagtgag tgaatatggt accacaaggt 1620  
 ttggagattc aattggttga atgctgcatg gatggcatat acaccaaaca ttcaataatt 1680  
 cttgaggata ataatggtac cacacaagat ttgaggtgca tgaacgtcac gtggacaaaa 1740  
 ggtttagtaa tttttcaaga caacaatgtt accacacaca agttttgagg tgcattgcatg 1800  
 gatgcctgt ggaaagtta aaaatctttt ggaaatgatt tgcattggaag ccatgtgtaa 1860  
 aaccatgaca tccacttggg ggatgcaata atgaagaaaa ctacaaattt acatgcaact 1920  
 agttatgcat gtagtctata taatgaggat tttgcaatac tttcattcat acacactcac 1980  
 taagttttac acgattabaa tttcttcata gccagcggat ccgatatcgg gcccgcctagc 2040  
 gttaaccttg ctttaatgag atatgcgaga ccctatgat ccgatgatat ttgctttcaa 2100  
 ttctgtttg cagctttaa aaaacctgag catgtgtagc tcagatcctt accgcgggtt 2160  
 tcggttcatt ctaatgaata tatcaccogt tactatcgtt tttttatgaa taatattctc 2220  
 cgttcaattt actgattgtc cgcgcgagaa ttgcagctcg gccgcgcaag cttggcgtaa 2280  
 tcattggtat agctgtttcc tgtgtgaaat tgttatccgc tcacaattcc acacaacata 2340  
 cgagccggaa gcataaagtg taaagcctgg ggtgcctaact gagtgagcta actcacatta 2400  
 attgctgtgc gctcactgcc ccctttccag tcgggaaacc tgtcgtgcca gctgcattaa 2460  
 tgaatcggcc aacgcgcggg gagagcgggt ttgcgtattg ggccctcttc cccttctctg 2520  
 ctactgact ccctgcgctc ggtcgttcgg ctgcggcgag ccgtatcagc tcactcaaag 2580  
 gccgtaatac ggttatccac agaatcaggg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa 2640  
 ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcgttttt ccataggctc 2700  
 ccccccttg acgagcatca caaaaatcga ccctcaagtc agaggtggcg aaaccgaca 2760  
 ggactataaa gataccaggc gtttccccct ggaagctccc tcgtgcgctc tctgttccg 2820  
 accctgcgc ttaccggata cctgtccgcc tttctccctt ccggaagcgt gccgctttct 2880  
 catagctcac gctgtaggta tctcagttcg gtgtaggtcg ttogctccaa gctgggctgt 2940  
 gtgcacgaac cccccgttca gcccgaccgc tgcgccttat ccggtacta tcgtcttgag 3000  
 tccaaccogt taagacacga cttatcgcga ctggcagcag cactggtaa caggattagc 3060

10

20

30

40

agagcggagg atgtaggccc tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac 3120  
 actagaagga cagtatttgg tatctgcgct ctgctgaagc cagttacott cggaaaaaga 3180  
 gttggtagct cttgatccgg caaacaacc accgctggta ggggtggttt ttttgttgc 3240  
 aagcagcaga ttacggcag aaaaaagga tctcaagaag atcctttgat cttttctacg 3300  
 gggctctgacg ctcaaggaa cgaaaactca cgtaaggga ttttggcat gagactatca 3360  
 aaaaggatct tcacctagat ccttttaaat taaaaatgaa gttttaaate aatctaaagt 3420  
 atatatgagt aaacttggc tgacagttac caatgcttaa tcagtgaggc acctatctca 3480  
 gcgatctgtc tatttcgttc atccatagtt gctgactcc ccgtcgtgta gataactacg 3540  
 atacgggagg gcttaccatc tggccccagt gctgcaatga taccgcgaga cccacgctca 3600  
 cggctccag atttatcagc aataaacagc ccagccggaa gggccgagcg cagaagtggg 3660  
 cctgcaactt tatccgctc catccagtct ataatgttc gccgggaagc tagagtaagt 3720  
 agttcgccag ttaatagttt gcgcaacggt gttgccattg ctacaggcat cgtggtgtca 3780  
 cgctcgtcgt ttggtatggc ttcattcagc tcgggttccc aacgatcaag gcgagttaca 3840  
 tgatcccca tgttgtgcaa aaaagcgggt agctccttcg gtctcogab cgttgtcaga 3900  
 agtaagttgg ccgagtggt atcactcatg gttatggcag cactgcataa ttctcttact 3960  
 gtcagccat ccgtaagatg cttttctgtg actggtgagt actcaaccaa gtcattctga 4020  
 gaatagtgtc tgcggcagcc gagtgtctct tgcggcgt caatacggga taataccgcy 4080  
 ccacatagca gaactttaa agtgctcatc attggaaaac gttcttcggg gcgaaaactc 4140  
 tcaaggatct taccgctggt gagatccagt tcgatgtaac ccaactcgtc acccaactga 4200  
 tcttcagcat cttttacttt caccagcgtt tctgggtgag caaaaacagc aaggcaaat 4260  
 gccgcaaaa agggaataag ggcgacacgg aaatggtgaa tactcact cttcctttt 4320  
 caatattatt gaagcattta tcagggttat tgtctcatga gcggatacat atltgaatgt 4380  
 atttagaaaa ataaacaaat aggggttccg cgcacatttc cccgaaaagt gccacctgac 4440  
 gtctaagaaa ccattattat catgacatta acctataaaa ataggcgtac cagaggccc 4500  
 tttcgtc 4507

10

20

30

<210> 17  
 <211> 5410  
 <212> DNA  
 <213> Unknown

<220>

40

<223> Sequenz stellt eine pflanzliche  
Promotor-Terminator-Expressionskassette in Vektor  
pUC19 dar

<400> 17

```

ttttggaaat gatttgcatg gaagccatgt gtaaaacat gacatccact tggaggatgc 60
aataatgaag aaaactacaa atttacatgc aactagttat gcatgtagtc tatataatga 120
ggattttgca atactttcat tcatacacac tcaactaagt ttacacgatt ataatttctt 180
catagccagc ggatccgata tggggccgc tagcgtaac cctgctttaa tgagatatgc 240
gagacgccta tgatcgcagc atatttgctt tcaattctgt tgtgcaogt gtaaaaaacc 300
tgagcatgtg tagctcagat ccttaccgcc ggtttcgggt cattctaattg aatataatc 360
cogttactat cgtattttta tgaataatat tctccgttca atttactgat tgtccgtcga 420
gcaaatttac acattgccac taaacgtcta aacccttgta atttgTTTT gtttactat 480
gtgtgttatg tatttgattt gcgataaatt tttatatttg gtactaaatt tataaacct 540
tttatgctaa cgtttgccaa cacttagcaa tttgcaagt gattaattga ttctaaatta 600
tttttgtctt ctaaatacat atactaatca actggaaatg taaatatttg ctaatatttc 660
tactatagga gaattaaagt gagtgaatat ggtaccacaa ggtttggaga ttttaattgt 720
gcaatgctgc atggatggca tatacaccaa acattcaata attcttgagg ataataatgg 780
taccacacaa gatttgaggt gcatgaacgt cacgtggaca aaaggtttag taattttca 840
agacaacaat gttaccacac acaagttttg aggtgcatgc atggatgcc tgtggaaagt 900
ttaaaaatat tttggaaatg atttgcatgg aagccatgtg taaaaccatg acatccactt 960
ggaggatgca ataatgaaga aaactacaaa tttacatgca actagttatg catgtagtct 1020
atataatgag gattttgcaa tactttcatt cacacacact cactaagttt tacacgatta 1080
taattttctc atagccagca gatctgccgg catcgatccc gggccatggc ctgctttaat 1140
gagatatgcg agacgcctat gatcgcagta tatttgcttt caattctggt gtgcacggtg 1200
taaaaaacot gagcatgtgt agctcagatc cttaccgcog gtttcggctc attctaata 1260
atatatcacc cgttactatc gtatttttat gaataatatt ctccgttcaa tttactgatt 1320
gtccgtcgac gagctcggcg cgccaagctt ggcgtaatca tggtcatagc tgtttcctgt 1380
gtgaaattgt tatccgctca caattccaca caacatacga gccggaagca taaagtgtaa 1440
agcctggggg gcctaataag tgagctaact cacatattt gcggttgctc cactgccgc 1500
tttccagtcg ggaacctgt cgtgccagct gcattaatga atcggccaac gcgcggggag 1560
aggcggtttg cgtattgggc gctcttcgc tctctcctc actgactcgc tgcgctcggt 1620

```

10

20

30

40

cgttcggctg cggcgagcgg tatcagctca ctcaaaggcg gtaatacggg tatccacaga 1680  
 atcaggggat aacgcaggaa agaacatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg 1740  
 taaaaaggcc gcgttgctgg cgtttttcca taggctccgc cccctgacg agcatcacia 1800  
 aaatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat accaggcggt 1860  
 tcccctgga agctccctcg tgcgctctcc tgttcgacc ctgccgctta cggataacct 1920  
 gtccgcccc tccccttcgg gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct gtaggtatct 1980  
 cagttcggtg taggtcgttc gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc 2040  
 cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg tcttgagtcc aaccggtaa gacacgactt 2100  
 atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg taggcggtgc 2160  
 tacagagttc ttgaagtggg ggcctaacta cggctacact agaaggacag tatttggtat 2220  
 ctgcgctctg ctgaagccag ttacctcgg aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa 2280  
 acaaacacc gctggtagcg gtggtttttt tgtttgcaag cagcagatta cggcagaaa 2340  
 aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt ttctacggg totgacgctc agtggaaaga 2400  
 aaactcacgt taagggatth tggcatgag attatcaaaa aggatcttca cctagatcct 2460  
 tttaaattaa aaatgaagtt ttaaatcaat ctaaagtata tatgagtaa cttggtctga 2520  
 cagttaccaa tgcctaatca gtgaggcacc tatctcagcg atctgtctat ttcgttcato 2580  
 catagttgcc tgactccccg tcgtgtagat aactacgata cgggagggct taccatctgg 2640  
 cccagtgct gcaatgatac cgcgagacc acgctcaccg gctccagatt taccagcaat 2700  
 aaaccagcca gccggaaggg ccgagcgcag aagtggctct gcaactttat ccgctccat 2760  
 ccagtctatt aattgttgc ggaagctag agtaagtagt tcgccagtta atagtttgcg 2820  
 caacgttgtt gccattgcta caggcatcgt ggtgtcacgc tcgtcgtttg gtatggcttc 2880  
 attcagctcc ggttcccaac gatcaaggcg agttacatga tccccatgt tgtgcaaaaa 2940  
 agcggtagc tccttcggtc ctccgatcgt tgtcagaagt aagttggccg cagtgttacc 3000  
 actcatggtt atggcagcac tgcataattc tcttactgtc atgccatccg taagatgctt 3060  
 ttctgtgact ggtgagtact caaccaagtc attctgagaa bagtgtatgc ggcgaccgag 3120  
 ttgctcttgc ccggcgtcaa tacgggataa taaccgcca catagcagaa ctttaaaagt 3180  
 gctcatcatt ggaaaacggt cttcggggcg aaaactctca aggatcttac cgctgttgag 3240  
 atccagttcg atgtaacca ctctgcacc caactgatct tcagcatctt ttactttcac 3300  
 cagcgtttct ggtgagcaa aaacaggaag gcaaaatgcc gcaaaaaagg gaataagggc 3360

10

20

30

40

gacacggaaa tgttgaatac tcatactcct cctttttcaa tattattgaa gcatttatca 3420  
gggttattgt ctcatgagcg gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata aacaaatagg 3480  
ggttcogcgc acatttcccc gaaaagtgcc acctgacgtc taagaaacca ttattatcat 3540  
gacattaacc tataaaaaata ggcgtatcac gaggcccttt cgtctcgcgc gtttcoggtga 3600  
tgacggtgaa aacctctgac acatgcagct cccggagacg gtcacagctt gtctgtaagc 3660  
ggatgcocggg agcagacaag cccgtcaggg cgcgtcagcg ggtgttggcg ggtgtcgggg 3720  
ctggcttaac tatgcccgat cagagcagat tgtactgaga gtgcaccata tgcgggtgta 3780  
aataccgcac agatgcgtaa ggagaaaata ccgcctcagg cgcattcgc cattcaggct 3840  
gogcaactgt tgggaagggc gatcgggtcgc ggcctcttcg ctattaogcc agctggcgaa 3900  
agggggatgt gctgcaaggc galtaagtgt ggtaacgcca gggttttccc agtcacgacg 3960  
ttgtaaaacg acggccagtg aattcggcgc gccgagctcc tcgagcaaat ttacacattg 4020  
ccactaaacg tctaaaccct tgtaatttgt tttgtttta ctatgtgtgt tatgtatttg 4080  
atltgcgata aatttttata tttggtaact aatttataac accttttatg ctaacgtttg 4140  
ccaaacttta gcaatttga agttgatcaa ttgattctaa attatttttg tcttctaaat 4200  
acataacta atcaactgga aatgtaaata tttgctaata tttctactat aggagaatta 4260  
aagtgagtga atatgggtacc acaaggtttg gagatttaat tgttgcaatg ctgcatggat 4320  
ggcatataca ccaaaccattc aataattctt gaggataata atggtaccac acaagatttg 4380  
aggtgcatga acgtoacgtg gacaaaaggt ttagtaattt ttcaagacaa caatgttacc 4440  
acacacaagt tttgaggtgc atgcatggat gccctgtgga aagtttaaaa atattttgga 4500  
aatgatttgc atggaagcca tgtgtaaaac catgacatcc acttggagga tgcaataatg 4560  
aagaaaacta caaatttaca tgcaactagt tatgcatgta gtctatataa tgaggatttt 4620  
gcaatacttt cattoatata cactcactaa gttttacacg attataattt ctcatagcc 4680  
agcccaccgc ggtggggcgc cgcctgcagt ctagaaggcc tctgtcttta atgagatatg 4740  
cgagacgcct atgatcgcct gatatttgc tccaattctg ttgtgcacgt tgtaaaaaac 4800  
ctgagcatgt gttagctcaga tccctaccgc cggtttcggg tcattctaat gaatatatca 4860  
cccgttacta tcgtattttt atgaataata ttctccgttc aatttactga ttgtccgctg 4920  
agcaaatlta cacattgcca ctaaactct aaacccttgt aatttgtttt tgttttacta 4980  
tgtgtgttat gtatttgatt tggataaat ttttatattt ggtactaaat ttataacacc 5040  
ttttatgcta acgtttgcca acacttagca atttgcaagt tgattaattg attctaaatt 5100

10

20

30

40

atttttgtct tctaaataca tataactaatc aactggaaat gtaaataattt gctaataattt 5160  
 ctactatagg agaattaaag tgagtgaata tgggtaccaca aggtttggag atttaattgt 5220  
 tgcaatgctg catggatggc atatacacca aacattcaat aattcttgag gataataatg 5280  
 gtaccacaca agatttgagg tgcatagaacg tcacgtggac aaaagggttta gtaatttttc 5340  
 aagacaacaa tgttaccaca cacaagtttt gaggtgcatg catggatgcc ctgtggaaag 5400  
 tttaaaaata 5410

<210> 18  
 <211> 648  
 <212> DNA  
 <213> *Phaeodactylum tricornutum*

10

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(648)

<220>  
 <223> .

<400> 18  
 tgg tgg aaa aac aag cac aac gga cac cac gcc gtc ccc aac ctc cac 48  
 Trp Trp Lys Asn Lys His Asn Gly His His Ala Val Pro Asn Leu His  
 1 5 10 15  
 tgc tcc tcc gca gtc gcg caa gat ggg gac ccg gac atc gat acc atg 96  
 Cys Ser Ser Ala Val Ala Gln Asp Gly Asp Pro Asp Ile Asp Thr Met  
 20 25 30  
 ccc ctt ctc gcc tgg tcc gtc cag caa gcc cag tct tac cgg gaa ctc 144  
 Pro Leu Leu Ala Trp Ser Val Gln Gln Ala Gln Ser Tyr Arg Glu Leu  
 35 40 45  
 caa gcc gac gga aag gat tcg ggt ttg gtc aag ttc atg atc cgt aac 192  
 Gln Ala Asp Gly Lys Asp Ser Ser Gly Leu Val Lys Phe Met Ile Arg Asn  
 50 55 60  
 caa tcc tac ttt tac ttt ccc atc ttg ttg ctc gcc cgc ctg tcg tgg 240  
 Gln Ser Tyr Phe Tyr Phe Pro Ile Leu Leu Leu Ala Arg Leu Ser Trp  
 65 70 75 80  
 ttg aac gag tcc ttc aag tgc gcc ttt ggg ctt gga gct gcg tcg gag 288  
 Leu Asn Glu Ser Phe Lys Cys Ala Phe Gly Leu Gly Ala Ala Ser Glu  
 85 90 95  
 aac gct gct ctc gaa ctc aag gcc aag ggt ctt cag tac ccc ctt ttg 336  
 Asn Ala Ala Leu Glu Leu Lys Ala Lys Gly Leu Gln Tyr Pro Leu Leu  
 100 105 110  
 gaa aag gct ggc atc ctg ctg cac tac gct tgg atg ctt aca gtt tcg 384  
 Glu Lys Ala Gly Ile Leu Leu His Tyr Ala Trp Met Leu Thr Val Ser  
 115 120 125

20

30

40

tcc ggc ttt gga cgc ttc tcg ttc gcg tac acc gca ttt tac ttt cta	432	
Ser Gly Phe Gly Arg Phe Ser Phe Ala Tyr Thr Ala Phe Tyr Phe Leu		
130 135 140		
acc gcg acc gcg tcc tgt gga ttc ttg ctc gcc att gtc ttt ggc ctc	480	
Thr Ala Thr Ala Ser Cys Gly Phe Leu Leu Ala Ile Val Phe Gly Leu		
145 150 155 160		
ggc cac aac ggc atg gcc acc tac aat gcc gac gcc cgt ccg gac ttc	528	
Gly His Asn Gly Met Ala Thr Tyr Asn Ala Asp Ala Arg Pro Asp Phe		
165 170 175		
tgg aag ctc caa gtc acc acg act cgc aac gtc acg gcc gga cac ggt	576	
Trp Lys Leu Gln Val Thr Thr Thr Arg Asn Val Thr Gly Gly His Gly		10
180 185 190		
ttc ccc caa gcc ttt gtc gac tgg ttc tgt ggt ggc ctc cag tac caa	624	
Phe Pro Gln Ala Phe Val Asp Trp Phe Cys Gly Gly Leu Gln Tyr Gln		
195 200 205		
gtc gac cac cac tta ttc ccc agc	648	
Val Asp His His Leu Phe Pro Ser		
210 215		
<210> 19		
<211> 216		
<212> PRT		
<213> <i>Phaeodactylum tricornutum</i>		20
<400> 19		
Trp Trp Lys Asn Lys His Asn Gly His His Ala Val Pro Asn Leu His		
1 5 10 15		
Cys Ser Ser Ala Val Ala Gln Asp Gly Asp Pro Asp Ile Asp Thr Met		
20 25 30		
Pro Leu Leu Ala Trp Ser Val Gln Gln Ala Gln Ser Tyr Arg Glu Leu		
35 40 45		
Gln Ala Asp Gly Lys Asp Ser Gly Leu Val Lys Phe Met Ile Arg Asn		
50 55 60		
Gln Ser Tyr Phe Tyr Phe Pro Ile Leu Leu Leu Ala Arg Leu Ser Trp		30
65 70 75 80		
Leu Asn Glu Ser Phe Lys Cys Ala Phe Gly Leu Gly Ala Ala Ser Glu		
85 90 95		
Asn Ala Ala Leu Glu Leu Lys Ala Lys Gly Leu Gln Tyr Pro Leu Leu		
100 105 110		
Glu Lys Ala Gly Ile Leu Leu His Tyr Ala Trp Met Leu Thr Val Ser		
115 120 125		
Ser Gly Phe Gly Arg Phe Ser Phe Ala Tyr Thr Ala Phe Tyr Phe Leu		
130 135 140		40

Thr Ala Thr Ala Ser Cys Gly Phe Leu Leu Ala Ile Val Phe Gly Leu  
 145 150 155 160

Gly His Asn Gly Met Ala Thr Tyr Asn Ala Asp Ala Arg Pro Asp Phe  
 165 170 175

Trp Lys Leu Gln Val Thr Thr Thr Arg Asn Val Thr Gly Gly His Gly  
 180 185 190

Phe Pro Gln Ala Phe Val Asp Trp Phe Cys Gly Gly Leu Gln Tyr Gln  
 195 200 205

Val Asp His His Leu Phe Pro Ser  
 210 215

10

<210> 20  
 <211> 12093  
 <212> DNA  
 <213> Unknown

<220>  
 <223> pflanzlicher Expressionsvektor mit einer  
 Promotor-Terminator-Expressionskassette

<400> 20  
 gatctggcgc cggccagcga gacgagcaag attggccgcc gcccgaaacg atccgacagc 60  
 gcgcccagca caggtgcgca ggcaaattgc accaacgcat acagcgccag cagaatgcca 120  
 tagtgggicgg tgacgtcgtt cgagtgaacc agatcgcgca ggaggcccg cagcaccggc 180  
 ataatacaggc cgatgccgac agcgtcgcgc ggcacagtgc tcagaattac gatcaggggt 240  
 atgttggggtt tcacgtctgg cctccggacc agcctccgct ggtccgattg aacgcgcgga 300  
 ttctttatca ctgataagtt ggtggacata ttatgtttat cagtgataaa gtgtcaagca 360  
 tgacaaaagtt gcagccgaat acagtgatcc gtgcccctt ggacctgttg aacgaggtcg 420  
 gcgtagacgg tctgacgaca cgcaactgg cggaacggtt gggggttcag cagccggcgc 480  
 tttactggca cttcaggaac aagcgggicgc tgctcgacgc actggccgaa gccatgctgg 540  
 cggagaatca taogcattcg gtgcccagag cgcacgacga ctggcgctca tttctgatcg 600  
 ggaatgcccg cagcttcagg caggcgcctgc tcgcctaccg cgatggcgcg cgcattccatg 660  
 ccggcacgcg accgggicgca ccgcagatgg aaacggccga cgcgcagctt cgcttcctct 720  
 gcgagggicgg tttttcggcc ggggacgccg tcaatgcgct gatgacaatc agctacttca 780  
 ctgttggggc cgtgcttgag gagcaggccg ggcacagcga tgccggcgag cgcggcggca 840  
 ccgttgaaca ggctccgctc tcgcccgtgt tcggggicgc gatagacgcc ttcgacgaa 900  
 ccggtccgga cgcagcgttc gagcaggac tcgcggtgat tctcgatgga ttggcgaaaa 960

20

30

40

ggaggctcgt tgtcaggaac gttgaaggac cgagaaaggg tgacgattga tcaggaccgc 1020  
 tgccggagcg caaccocactc actacagcag agccatgtag acaacatccc ctcccccttt 1080  
 ccaccgcgctc agacgcccgt agcagcccgc tacgggcttt ttcattgcctt gccttagcgt 1140  
 ccaagcctca cggccgcgct cggcctctct ggccggccttc tggcgctctt ccgcttctc 1200  
 gctcaactgac tcgctgcgct cggctcgttc gctgcggcga gcggtatcag ctcaactcaaa 1260  
 ggcggtaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa 1320  
 aggcdagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggccgcttg ctggcgtttt tccataggct 1380  
 ccgccccctt gacgagcctc acaaaaatcg acgctcaagt cagaggctggc gaaacccgac 1440  
 aggactataa agataccagg cgtttcccc tggaaagctc ctctgcgct ctctgttcc 1500  
 gaccctgccg cttaccggat acctgtccgc cttctccct tggggaagcg tggcgctttt 1560  
 ccgctgcata accctgcctc ggggtcatta tagcgtttt tccggtatat ccatcctttt 1620  
 tcgcacgata tacaggattt tgccaaaggg ttcgtgtaga ctttcttgg tgtatccaac 1680  
 ggcgtcagcc gggcaggata ggtgaagtag gccacccgc gagcgggtgt tcttcttca 1740  
 ctgtccctta ttgcacctg gcgggtcctc acgggaatcc tgctctgcga ggctggccgg 1800  
 ctaccgccgg cgtaacagat gagggaagc ggatggctga tgaaccaag ccaaccagga 1860  
 agggcagccc acctatcaag gtgtactgcc ttccagacga acgaagagcg attgaggaaa 1920  
 aggcggcggc ggccggcatg agcctgtcgg cctacctgct ggccgtcggc cagggtaca 1980  
 aatcacggg cgctcgtggac tatgagcag tccgcgagct ggcccgcatc aatggcgacc 2040  
 tggccgcctt gggggcctg ctgaaactct ggctcaccga cgaccgcgc acggcgcggt 2100  
 tcggtgatgc cagatcctc gccctgctgg cgaagatga agagaagcag gacgagcttg 2160  
 gcaaggtcat gatggcgctg gtccgcccga gggcagagcc atgacttttt tagccgctaa 2220  
 aacggccggg ggggtgcgct gattgccaag cacgtccca tgcgctccat caagaagagc 2280  
 gacttcgagg agctggtgaa gtacatcacc gacgagcaag gcaagaccga gcgcctttgc 2340  
 gacgctcacc gggtcgttg cctcgcgcgc tgggctggcg gccgtctatg gccctgcaaa 2400  
 cgcgccagaa acgcccgcga agccgtgtgc gagacaccgc ggccgcggc gttgtggata 2460  
 cctcgggaa aacttggccc tcaactgacag atgagggcg gacgttgaca cttgaggggc 2520  
 cgactcacc ggccggcgct tgacagatga gggcaggct cgatttcggc cggcgacgtg 2580  
 gagctggcca gcctcgcaaa tcggcgaaaa cgcctgattt tacgcgagtt tcccacagat 2640  
 gatgtggaca agcctgggga taagtgcctt gcggtattga cacttgagg gcgcgactac 2700

10

20

30

40

tgacagatga ggggocgat ccttgacact tgaggggcag agtgctgaca gatgaggggc 2760  
 gcacctattg acatctgagg ggtgtccac aggcagaaaa tccagcattt gcaaggggtt 2820  
 ccgccggtt ttccggccacc gctaacctgt cttttaacct gcttttaaac caatatctat 2880  
 aaaccttggt ttaaccagg gctgcgccct gtgcgcgtga cgcgcacgc cgaagggggg 2940  
 tgccccctt tctcgaacce tccgggccg ctaacgcggg cctcccatcc ccccaggggc 3000  
 tgogccctc ggocgcgaac ggccctaccc caaaaatggc agcgcctggca gtccttgcca 3060  
 ttgcgggat cggggcagta acgggatggg cgatcagccc gagcgcgacg cccggaagca 3120  
 ttgacgtgcc gcagggtgct gcatcgacat tcagcgacca ggtgcggggc agtgagggcg 3180  
 gcggcctggg tggggcctg cccctcactt cggcctcggg ggcattcacg gacttcattg 3240  
 cggggccggc aatctttacc ttgggcattc ttggcatagt ggtgcggggc gccgtgctcg 3300  
 tgttcggggg tgcgataaac ccagcgaacc atctgaggtg ataggtaga ttataccgag 3360  
 gtatgaaaac gagaattgga cctttacaga attactctat gaagcgccat atttaaaaag 3420  
 ctaccaagac gaagaggatg aagaggatga ggaggcagat tgccttgaat atattgacaa 3480  
 tactgataag ataatatatc ttttatatag aagatatcgc cgtatgtaag gatctcaggg 3540  
 ggcaaggcat aggcagcgcg cttatcaata tatctataga atgggcaaag cataaaaact 3600  
 tgcattgact aatgcttgaa acccaggaca ataaccttat agcttgtaa ttctatcata 3660  
 attgggtaat gactccaact tattgatagt gttttatggt cagataatgc ccgatgactt 3720  
 tgtcatgcag ctccaccgat tttgagaacg acagcgactt ccgtccagc cgtgccaggt 3780  
 gctgcctcag attcagggtta tgcgcctcaa ttcgctcgtt atatcgcttg ctgattacgt 3840  
 gcagctttcc cttcaggcgg gattcataca gggccagcc atccgctatc catatacca 3900  
 cgtcaaaggg tgacagcagg ctcataagac gcccagcgt cgcctatagt cgttcaccga 3960  
 atacgtgcgc aacaaccgct ttcgggagac tgcatacgc gtaaacagc cagcgcctggc 4020  
 gcgatttagc cccgacatag cccactggt cgtccattc cgcgcagacg atgacgtcac 4080  
 tgcccgctg tatgcgcgag gttaccgact gcggcctgag ttttttaagt gacgtaaaat 4140  
 cgtgttgagg ccaacgccc taatgcgggc tgttgccgg catccaacgc cattcatggc 4200  
 catatcaatg atttctggt gcgtaccggg ctgagaagcg gtgtaagtga actgcagttg 4260  
 ccatgtttta cggcagtgag agcagagata gcgctgatgt ccggcgggtc ttttgccgtt 4320  
 acgcaccacc ccgtcagtag ctgaacagga gggacagctg atagacacag aagccactgg 4380  
 agcaacctca aaacaccatc atacactaaa tcagtaagtt ggcagcatca cccataattg 4440

10

20

30

40

tggtttcaaa atcggtccog tggatactat gttatacgcc aactttgaaa acaactttga 4500  
 aaaagctggt ttctggtatt taaggtttta gaatgcaagg aacagtgaat tggagttcgt 4560  
 cttgttataa ttagcttctt ggggtatctt taaatactgt agaaaagagg aaggaaataa 4620  
 taaatggcta aaatgagaat atcaccggaa ttgaaaaaac tgatcgaaaa ataccgctgc 4680  
 gtaaaagata cgggaaggaat gtctcctgct aagggtatata agctggtggg agaaaatgaa 4740  
 aacctatatt taaaaatgac ggacagccgg tataaaggga ccacctatga tgtggaacgg 4800  
 gaaaaggaca tgatgctatg gctggaagga aagctgctg ttccaaagggt cctgcacttt 4860  
 gaacggcatg atggctggag caatctgctc atgagtgagg ccgatggcgt cctttgctcg 4920  
 gaagagtatg aagatgaaca aagccctgaa aagattatcg agctgtatgc ggagtgcac 4980  
 aggctctttc actccatcga catatcggat tgtccctata cgaatagctt agacagccgc 5040  
 ttagccgaat tggattaact actgaataac gatctggccg atgtggattg cgaaaactgg 5100  
 gaagaagaca ctccatttaa agatccgcgc gagctgtatg atcttttaa gacggaaaag 5160  
 cccgaagagg aacttgtctt ttcccacggc gacctgggag acagcaacat ctttgtgaaa 5220  
 gatggcaaag taagtggctt tattgatctt gggagaagcg gcagggcggg caagtgggat 5280  
 gacattgect tctgogtccg gtogacagc gaggatatcg ggaagaaca gtatgctgag 5340  
 ctattttttg acttaactgg gatcaagcct gattgggaga aaataaaata ttatatttca 5400  
 ctggatgaat tgttttagta cctagatgtg gcgcaacgat gccggcgaca agcaggagcg 5460  
 caccgacttc ttccgcatca agtgtttttg ctctcaggcc gagggccacg gcaagtattt 5520  
 gggcaagggg tctgtggtat tctgtcaggg caagattcgg aataccaagt acgagaagga 5580  
 cggccagacg gtctacggga ccgacttoat tgccgataag gtggattatc tggacaccaa 5640  
 ggcaccaggc gggtaaatc aggaataaag gcacattgcc ccggcgtgag tgggggcaat 5700  
 cccgaagga gggatgaatga atcggacgtt tgaccggaag gcatacaggc aagaactgat 5760  
 cgacggggg ttttccgccc aggatgccga aaccatcgca agccgcaccg tcatgctgc 5820  
 gcccgcgaa accttccagt ccgtcggctc gatggtccag caagctacgg ccaagatcga 5880  
 ggcgcacagc gtgcaactgg ctccccctgc cctgcccgcg ccacggccg ccgtggagcg 5940  
 ttcgctcgt ctggaacagg aggcggcagg tttggcgaag tctgatgacca tgcacacgcg 6000  
 agyaactatg acgaccaaga agcgaaaaac cgcggcgag gacctggcaa aacaggtcag 6060  
 cgaggccaag caggccgctg tctgaaaca cacgaagcag cagatcaagg aaatgcagct 6120  
 ttcttgttc gatattgccc cgtggccgga cacgatgcca gcgatgcaa acgacacggc 6180

10

20

30

40

ccgctctgcc ctgttcacca cgcgcaacaa gaaaatcccc cgcgaggcgc tgcaaaacaa 6240  
 ggtcattttc cacgtcaaca aggacgtgaa gatcacctac accggcgctcg agctgcgggc 6300  
 cgacgatgac gaactgggtg ggcagcaggt gttggagtac gcgaagcgca cccctatcgg 6360  
 cgagccgata accttcacgt tctacgagct ttgccaggac ctgggctggt cgatcaatgg 6420  
 ccggtattac acgaaggccg aggaatgcct gtcgcgcta caggcgacgg cgatgggctt 6480  
 cacgtccgac cgcgttgggc acctggaatc ggtgtgcctg ctgcaccgct tcgcgctcct 6540  
 ggaccgtggc aagaaaacgt cccgttgcca ggtcctgatc gacgaggaaa tcgtcgtgct 6600  
 gtttgcctggc gaccactaca cgaaattcat atgggagaag taccgcaagc tgtcgcgcgac 6660  
 ggcccgcagg atgttcgact atttcagctc gcaccyggag ccgtaccgcg tcaagctgga 6720  
 aaccttcgcg ctcattgtgc gatcggattc caccgcgctg aagaagtggc gcgagcaggt 6780  
 cggcgaagcc tgcgaagagt tgcgaggcag cggcctggtg gaacacgcct gggccaatga 6840  
 tgacctggtg cattgcaaac gctagggcct tgtgggggtca gttccggctg ggggttcagc 6900  
 agccagcgct ttaactggcat ttcaggaaca agcgggcaact gctcgacgca cttgcttcgc 6960  
 tcagtatcgc tcgggacgca cggcgcgctc tacgaactgc cgataaacag aggattaaaa 7020  
 ttgacaattg tgattaaggc tcagattcga cggcctggag cggccgacgt gcaggatttc 7080  
 cgcgagatcc gattgtcggc cctgaagaaa gctccagaga tgbtcgggtc cgtttacgag 7140  
 cacgaggaga aaaagcccat ggaggcgttc gctgaacggg tgcgagatgc cgtggcattc 7200  
 ggcgcctaca tcgacggcga gatcattggg ctgtcggctt tcaaacagga ggacggcccc 7260  
 aaggacgctc acaaggcgca tctgtccggc gttttcgtgg agcccgaca gcgaggccga 7320  
 ggggtcggcg gtatgctgct gggggcgttg ccggcgggtt tattgctcgt gatgatcgtc 7380  
 cgacagatcc caacgggaat ctgggtggatg cgcattctca tcctcggcgc acttaatat 7440  
 tcgctattct ggagcttgtt gtttatttcg gtcacccg ccgcggggcg ggtcgcggcg 7500  
 acggtaggcg ctgtgcagcc gctgatggtc gtgttcactt ctgcgcctct gctaggtagc 7560  
 ccgatacgat tgatggcggc cctgggggct atttcgggaa ctgcgggctt ggcgctgttg 7620  
 gtgttgacac caaacgcagc gctagatcct gtcggcgtcg cagcgggctt ggcggggcg 7680  
 gtttccatgg cgttcggaac cgtgctgacc cgcaagtggc aacctcccgt gcctctgctc 7740  
 acctttaccg cctggcaact ggcggccgga ggactctcgc tcggttcagt agcttttagt 7800  
 ttgatccgc caatcccgat gcctacagga accaatgttc tcggcctggc gtggctcggc 7860  
 ctgatcggag cgggtttaac ctacttcctt tggttccggg ggatctcgcg actcgaacct 7920

10

20

30

40

acagttggtt ccttactggg ctttctcagc cccagatctg gggtcgatca gccggggatg 7980  
catcaggccg acagtcggaa cttcgggtcc ccgacctgta ccattcgggtg agcaatggat 8040  
aggggagttg atalogtcaa cgttcacttc taaagaaata gcgccactca gcttctctcag 8100  
cggctttatc cagcgatttc ctattatgtc ggcatagttc tcaagatcga cagcctgtca 8160  
cggttaagcg agaaatgaat aagaaggctg ataattcggg tctctgagag ggagatgata 8220  
tttgatcaca ggcagcaacg ctctgtcatc gttacaatca acatgctacc ctccgcgaga 8280  
tcattcogtgt ttcaaaccgg gcagccttagt tgccgttctt ccgaatagca tcggtaacat 8340  
gagcaaagtc tgccgcctta caacggctct cccgctgaag ccgtcccggg ctgatgggct 8400  
gcctgtatcg agtggtgatt ttgtgccgag ctgccggctg gggagctggt ggctggctgg 8460  
tggcaggata tattgtgggt taaacaaatt gacgcttaga caacttaata acacattgcy 8520  
gacgttttta atgtactggg gtggtttttc ttttcaccag tgagacgggc aacagctgat 8580  
tgcccttcac cgctggccc tgagagagtt gcagcaagcg gtccacgctg gtttgcccca 8640  
gcaggogaaa atcctgtttg atgggtggtc cgaaatcggc aaaatccctt ataaatcaaa 8700  
agaatagccc gagatagggg tgagtgtgtg tccagtttgg aacaagagtc cactattaaa 8760  
gaacgtggac tccaacgtca aagggcgaaa aaccgtctat cagggcgatg gccactacg 8820  
tgaaccatca cccaaatcaa gttttttggg gtcgaggtgc cgtaaagcac taaatcggaa 8880  
ccctaaaggg agccccgat ttagagcttg acggggaaaag ccggcgaacg tggcgagaaa 8940  
ggaagggag aaagcgaaa ggcggggcgc cattcaggct gcgcaactgt tgggaagggc 9000  
gatcgggtgc ggccctcttc ctattacgcc agctggcgaa agggggatgt gctgcaaggc 9060  
gattaagttg ggtaacgcc gggttttccc agtcacgacg ttgtaaaacg acggccagtg 9120  
aattaattcc catcttgaag gaaatatagt ttaaataatt attgataaaa taacaagtca 9180  
ggatttatag tccaagcaaa aacataaatt tattgatgca agtttaaat cagaaatatt 9240  
tcaataactg attatatcag ctggtacatt gccgtagatg aaagactgag tgcgatatta 9300  
tgtgtaatac ataaattgat gatatagcta gcttagctca tcgggggatc cgtogaagct 9360  
agcttgggtc ccgctcagaa gaactcgtca agaaggcgat agaaggcgat gcgctgcgaa 9420  
tcgggagcgg cgataccgta aagcacgagg aagcggctcag cccattcgcc gccaaagctct 9480  
tcagcaatat cacgggtagc caacgctatg tcctgatagc ggtccgccac acccagccgg 9540  
ccacagtcga tgaatocaga aaagcggcca tttccacca tgatattcgg caagcaggca 9600  
tcgccatggg tcacgacgag atcctcgccg tcgggcatgc gcgccttgag cctggcgaac 9660

10

20

30

40

agttcggctg gcgcgagccc ctgatgctct tegtccagat catcctgac gacaagaccg 9720  
 gcttccatcc gagtaogtgc tgcctgatg cgatgtttcg cttgggtggtc gaatgggcag 9780  
 gtagccggat caagcgtatg cagccgccgc attgcatcag ccatgatgga tactttctcg 9840  
 gcaggagcaa ggtgagatga caggagatcc tgccccggca cttcgcccaa tagcagccag 9900  
 tcccttcccg cttcagtgc aacgtcgagc acagctgccc aaggaacgcc cgtcgtggcc 9960  
 agccacgata gccgcgctgc ctgcctctgc agttcattca gggcaccgga caggtcggtc 10020  
 ttgacaaaaa gaaccgggcg cccctggcct gacagccgga acacggcggc atcagagcag 10080  
 cggattgtct gttgtgcca gtcatagccg aatagcctct ccaccaagc ggcccggagaa 10140  
 cctgcgtgca atccatcttg tccaatccaa gctcccatgg gccctcgact agagtcgaga 10200  
 tctggattga gagtgaatat gagactctaa ttggataccg aggggaattt atggaacgtc 10260  
 agtggagcat ttttgacaag aatatattgc tagctgatag tgacctagg cgacttttga 10320  
 acgcgcaata atggtttctg acgtatgtgc ttagctcatt aaactccaga aaccgcggc 10380  
 tgagtggctc cttcaacgct gccggtctgt cagttccaaa cgtaaacgg cttgtcccgc 10440  
 gtcacggcg ggggtcataa cgtgactccc ttaattctcc gctcatgac ttgatccct 10500  
 gcgccatcag atccttggcg gcaagaaagc catccagttt actttgcagg gcttcccaac 10560  
 cttaccagag ggcccccag ctggcaattc cggttcgctt gctgtccata aaaccgcca 10620  
 gtctagctat cgccatgtaa gccactgca agctacctgc tttctcttg cgcttgogtt 10680  
 ttcccttgc cagatagccc agtagctgac attcatccgg ggtcagcacc gtttctgogg 10740  
 actggcttcc tacgtgttcc gcttccctta gcagccctg cgccctgagt gcttgccgca 10800  
 gcgtgaagct tgcattgctg caggtcgacg gcgcgcccag ctccctcgagc aaatttacac 10860  
 attgccacta aacgtctaaa cccttgtaat ttgtttttgt tttactatgt gtgttatgta 10920  
 tttgatttgc gataaatttt tatatttggc actaaattta taacacctt tatgctaacg 10980  
 tttgccaaca cttagcaatt tgcaagttga ttaattgatt ctaaattact tttgtcttct 11040  
 aaatacatat actaatcaac tggaaatgta aatatttgc aatatttcta ctataggaga 11100  
 attaaagtga gtgaatatgg taccacaagg tttggagatt taattgttc aatgctgcat 11160  
 ggatggcata tacaccaaac attcaataat tcttgaggat aataatgta ccacacaaga 11220  
 tttgaggtgc atgaacgtca cgtggacaaa aggtttagta atttttcaag acaacaatgt 11280  
 taccacacac aagttttgag gtgcatgcat ggatgccctg tggaaagttt aaaaatattt 11340  
 tggaaatgat ttgcatggaa gccatgtgta aaaccatgac atccacttgg aggatgcaat 11400

10

20

30

40

aatgaagaaa actacaaatt tacatgcaac tagttatgca tgtagtctat ataatgagga 11460  
 ttttgcaata ctttcattca tacacactca ctaagtttta cacgattata atttcttcat 11520  
 agccagccca ccgcggtggg cggccgcctg cagtctagaa ggccctcctgc tttaatgaga 11580  
 tatgcgagac gcotatgabc gcatgatatt tgctttoaat tctgttgtgc acgttgtaaa 11640  
 aaacctgagc atgtgtagct cagatcctta ccgcccgttt cggttcattc taatgaatat 11700  
 atcaccogtt actatcgtat ttttatgaat aatattctcc gttcaattta ctgattgtcc 11760  
 gtcgacgaat tegagctcgg ccgcccctca gaggatcgat gaattcagat cggctgagtg 11820  
 gtccttcaa cgttgccggt ctgtcagttc caaacgtaaa acggttgtc ccgctcatc 11880  
 ggcgggggtc ataacgtgac tcccttaatt ctccgctcat gatcagattg tcgtttcccg 11940  
 ccttcagttt aaactatcag tgtttgacag gataattgg cgggtaaacc taagagaaaa 12000  
 gagcgtttat tagaataatc ggatatttaa aagggcgtga aaaggtttat ccttcgtcca 12060  
 tttgtatgtg catgcccaacc acaggttcc cca 12093

10

<210> 21  
 <211> 12085  
 <212> DNA  
 <213> Unknown

20

<220>  
 <223> pflanzlicher Expressionsvektor mit einer Promotor-Terminator-Expressionskassette

<400> 21  
 gatctggcgc cggccagcga gacgagcaag attggccgcc gcccgaaacg atccgacagc 60  
 gcgccagca caggtgcgca ggcaaattgc accaacgcat acagccccag cagaatgccca 120  
 tagtgggctg tgacgtcgtt cgagtgaacc agatcgcgca ggaggcccgg cagcaccggc 180  
 ataatcaggc cgatgccgac agcgtcgagc gcgacagtgc tcagaattac gatcaggggt 240  
 atgttgggtt tcacgtctgg cctccggacc agcctccgct ggtccgattg aacgcgcgga 300  
 ttctttatca ctgataagtt ggtggacata ttatgtttat cagtgataaa gtgtcaagca 360  
 tgacaaagtt gcagccgaat acagtgatcc gtgccgccct ggacctgttg aacgaggtcg 420  
 gcgtagacgg tctgaccgaca ccgaaactgg ccgaaacggtt gggggttcag cagccggcgc 480  
 tttactggca cttcaggaac aagcgggcgc tgctcgacgc actggccgaa gccatgctgg 540  
 cggagaatca tacgcattcg gtgccgagag ccgacgacga ctggcgctca tttctgatcg 600  
 ggaatgcccg cagcttcagg cagggcgtgc tcgctaccg cgatggcgcg cgcattcatg 660

30

40

ccggcaccgcg accggggcgca ccgcagatgg aaacggccga cgcgcagctt cgcttcctct 720  
 gcgaggcggg tttttcggcc ggggacgcgc tcaatgcgct gatgacaatc agctacttca 780  
 ctgttggggc cgtgcttgag gagcaggccg gcgacagcga tgccggcgag cgcggcggca 840  
 ccgttgaaca ggctccgctc tgcccgctgt tcggggccgc gatagacgcc ttogacgaag 900  
 ccggtccgga cgcagcgctc gagcagggac tcgcggtgat tgcgatgga ttggcgaaaa 960  
 ggaggctcgt tgtcaggaac gttgaaggac cgagaaaggg tgacgattga tcaggaccgc 1020  
 tgccggagcg caaccctc actacagcag agccatgtag acaacatccc ctcccccttt 1080  
 ccaccgcgtc agacgcccgt agcagcccgc tacgggcttt ttcattgcct gcctagcgt 1140  
 ccaagcctca cggccgcgct cggcctctct ggcggccttc tggcgctctt ccgcttctc 1200  
 gctcaactgac tcgctgcgct cggctgttcg gctgcccga gcggtatcag ctcaactcaa 1260  
 ggcggtaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgca ggaagaaca tgtgagcaaa 1320  
 aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggcgcgcttg ctggcgcttt tccataggct 1380  
 ccgccccct gacgagcctc acaaaaatcg acgctcaagt cagaggtggc gaaaccgac 1440  
 aggactataa agataccagg cgtttcccc tggaagctcc ctctgcgct ctctgttcc 1500  
 gaccctgccc cttaccgat acctgtccgc ctttctccct tgggaagcg tggcgctttt 1560  
 ccgctgcata acctgcttc ggggtcatta tagcgatttt ttcggtatat ccactctttt 1620  
 tcgcacgata tacaggatct tgccaaaggg ttcgtgtaga ctttccttgg tgtatecaac 1680  
 ggcgtcagcc gggcaggata ggtgaagtag gccaccgcgc gagcgggtgt tccttcttca 1740  
 ctgtccctta ttgcacctg gcgggtgctc accgggaatc tgcctcgcga ggctggccgg 1800  
 ctaccgcccg cgtaacagat gagggcaagc ggatggctga tgaaccaag ccaaccagga 1860  
 agggcagccc acctatcaag gtgtactgcc ttccagacga acgaagagcg attgaggaaa 1920  
 aggcggcggc ggccggcatg agcctgtcgg cctacctgct ggcctcggc cagggctaca 1980  
 aaatcacggg cgtcgtggac tatgagcacg tccgcgagct ggcccgcctc aatggcgacc 2040  
 tgggcgcctt gggcggcctg ctgaaactct ggctcacoga cgaccgcgc acggcgcggt 2100  
 tcggtgatgc cagatcctc gccctgctgg cgaagatcga agagaagcag gacgagcttg 2160  
 gcaaggatcat gatgggcgtg gtccgccga gggcagagcc atgacttttt tagccgctaa 2220  
 aacggccggg ggggtgcgct gattgccaag cacgtcccca tgcgctccat caagaagagc 2280  
 gacttcgccc agctggtgaa gtacatcacc gacgagcaag gcaagaccga gcgcctttgc 2340  
 gacgctcacc gggctgggtg cctcgcgcgc tgggctggcg gccgtctatg gcctgcaaa 2400

10

20

30

40

cgcgccagaa acgcccgtcga agcccgtgtgc gagacaccgc ggccgcccggc gttgtggata 2460  
cctcgcggaa aacttggccc tcaactgacag atgagggggcg gacgttgaca cttgagggggc 2520  
cgactcaccg ggcgcccggc tgacagatga ggggcaggct cgatctcggc cggcgacgtg 2580  
gagctggcca gcctcgcaaa tcggcgaaaa cgcctgattt tacgagagtt tcccacagat 2640  
gatgtggaca agcctggggga taagtgcctt gcgggtattga cacttgaggg gcgcgactac 2700  
tgacagatga ggggcgcat ccttgacact tgaggggag agtgctgaca gatgaggggc 2760  
gcacctattg acatttgagg ggctgtccac aggcagaaaa tccagcattt gcaaggggtt 2820  
ccgcccgttt ttgggccacc gctaacctgt cttttaacct gcttttaaag caatatttat 2880  
aaaccttgtt ttaaccagg gctgcgcctt gtgcgcgtga ccgcgcacgc cgaagggggg 2940  
tgccccctt tctcgaacct tcccggccc ctaacgccc cctcccattc cccagggggc 3000  
tgcgcccctc ggccgcgaac ggccctcacc caaaaatggc agcgtggca gtccttgcca 3060  
ttgcccggat cggggcagta acgggatggg cgatcagccc gagcgcgacg cccggaagca 3120  
ttgacgtgcc gcaggtgctg gcatcgacat tcagcgacca ggtgccgggc agtgagggcg 3180  
gcggcctggg tggcggcctg ccttcactt cggcgcctgg ggcattcacg gacttcatgg 3240  
cggggccggc aatttttacc ttgggcatte ttggcatagt ggtcgcgggt gccgtgctcg 3300  
tgttccgggg tgcgataaac ccagcgaacc atttgaggtg ataggtaaga ttataccgag 3360  
gtatgaaaac gagaattgga cctttacaga attacttat gaagcgccat atttaaaaag 3420  
ctaccaagac gaagaggatg aagaggatga ggagcagat tgccttgaat atattgacaa 3480  
tactgataag ataatatatc ttttatatag aagatatcgc cgtatgtaag gatttcaggg 3540  
ggcaaggcat aggcagcgcg cttatcaata tatctataga atgggcaaag cataaaaact 3600  
tgcattggact aatgctttaa acccaggaca ataaccttat agcttgtaaa ttctatcata 3660  
attgggtaat gactccaact tattgatagt gttttatggt cagataatgc ccgatgactt 3720  
tgtcatgcag ctccaccgat tttgagaacg acagcgactt ccgtcccagc cgtgccaggc 3780  
gctgcctcag attcaggta tgccgctcaa ttgctgctg atatcgcttg ctgattacgt 3840  
gcagctttcc cttcaggcgg gattcataca gcggccagcc atccgctatc catatcacca 3900  
cgtcaaaggg tgacagcagg ctcataagac gcccagcgt cgcctatgtg cgttcaccga 3960  
atacgtgccc aacaaccgtc tccggagac tgtcatacgc gtaaacagc cagcgtggc 4020  
gcgatttagc cccgacatag cccactgtt cgtccatttc cggcgagacg atgacgtcac 4080  
tgcccggctg tatgcgcgag gttaccgact gcggcctgag ttttttaagt gacgtaaaat 4140

10

20

30

40

cgtgttgagg ccaacgcccc taatgcgggc tgttgcccgg catccaacgc cattcatggc 4200  
 catatcaatg attttctggg gcgtaccggg ttgagaagcg gtgtaagtga actgcagttg 4260  
 ccatgtttta cggcagtgag agcagagata gogctgatgt ccggcgggtgc ttttgccgtc 4320  
 acgcaccacc ccgtcagtag ctgaacagga gggacagctg atagacacag aagccactgg 4380  
 agcacctcaa aaacaccatc atacactaaa tcagtaagtt ggcagcatca cccataattg 4440  
 tggtttcaaa ateggctccg tcgatactat gttatacggc aactttgaaa acaactttga 4500  
 aaaagctggt ctctgggtatt taaggtttta gaatgcaagg aacagtgaat tggagttcgt 4560  
 cttgttataa ttagcttctt ggggtatctt taaatactgt agaaaagagg aaggaaataa 4620  
 taaatggcta aatgagaat atcaccggaa ttgaaaaaac tgatcgaaaa ataccgctgc 4680  
 gtaaaagata cgggaaggaat gtctcctgct aaggtatata agctgggagg agaaaatgaa 4740  
 aacctatatt taaaaatgac ggacagccgg tataaaggga ccacctatga tgtggaacgg 4800  
 gaaaaggaca tgatgctatg gctggaagga aagctgctg ttccaaaggc cctgcacttt 4860  
 gaacggcatg atggctggag caatctgctc atgagtgagg ccgatggcgt cctttgctcg 4920  
 gaagagtatg aagatgaaca aagccctgaa aagattatcg agctgtatgc ggagtgcac 4980  
 aggctctttc actccatcga catatcggat tgtccctata cgaatagctt agacagccgc 5040  
 ttaggcgaat tggattactt actgaataac gatctggcgg atgtggattg cgaaaactgg 5100  
 gaagaagaca ctccatttaa agatccgcgc gagctgtatg attttttaa gacggaaaag 5160  
 cccgaagagg aacttgtctt tcccacggc gacctgggag acagcaacat ctttgtgaaa 5220  
 gatggcaaaag caagtggcct tattgatctt gggagaagcg gcagggcgga caagtggat 5280  
 gacattgcct ctgctgctcg gtgatcagg gaggatatcg ggaagaaca gtatgtcgag 5340  
 ctatTTTTTg acttactggg gatcaagcct gattgggaga aaataaaata ttatTTTTT 5400  
 ctggatgaat tgttttagta cctagatgtg ggcacaacgat gccggcgaca agcaggagcg 5460  
 caccgacttc tccgcatca agtgttttgg ctctcaggcc gaggccacg gcaagtattt 5520  
 gggcaagggg tcgctgggat tcgtgcaggg caagattcgg aataccaagt acgagaagga 5580  
 cggccagacg gtctacggga ccgacttcat tgccgataag gtggattatc tggacaccaa 5640  
 ggcaccaggc ggtcaaabc aggaataagg gcacattgcc ccggcgtgag tcggggcaat 5700  
 cccgcaagga ggtgaatga atcggacggt tgaccggaag gcatacaggc aagaactgat 5760  
 cgacgcgggg ttttccggcg aggatgccga aaccatcgca agccgcaccg tcatgctgctc 5820  
 gccccgcgaa accttocagt ccgtcggctc gatggtccag caagctacgg ccaagatcga 5880

10

20

30

40

gcgcgacagc gtgcaactgg ctccccctgc cctgccccgg ccacgggccc cgtgggagcg 5940  
 ttcgcgtcgt ctcgaacagg agggggcagg tttggcgaag tcgatgacca tcgacacggc 6000  
 aggaactatg acgaccaaga agcgaaaaac cgccggcgag gacctggcaa aacaggtcag 6060  
 cgaggccaag caggccgcgt tgctgaaaca cacgaagcag cagatcaagg aatgcagct 6120  
 ttccttggtc gatattgcgc cgtggccgga cacgatgcga gcgatgcaa acgacacggc 6180  
 ccgctctgcc ctgttcacca cgcgcaaca gaaaatccc cgcgaggcgc tgcaaaaca 6240  
 ggtcattttc cacgtcaaca aggacgtgaa gatcacctac accggcgctg agctgcccggc 6300  
 cgacgatgac gaactgggtg ggcagcagg gttggagtac gcgaagcgca cccctatcgg 6360  
 cgagccgata accttcacgt tctacgagct ttgccaggac ctgggctggt cgatcaatgg 6420  
 ccggtattac acgaaggccc aggaatgcct gtcgcgccta caggcgacgg cgatgggctt 6480  
 cacgtccgac cgcgttgggc acctggaatc ggtgtcgtc ctgcaccgct tccgcgtcct 6540  
 ggaccgtggc aagaaaacgt cccgttgcca ggtcctgata gacgagaaa tcgtcgtgct 6600  
 gttctgctggc gaccactaca cgaaattcat atgggagaag taccgcaagc tctcggcgac 6660  
 ggcccgacgg atgttcgact atttcagctc gcaccgggag ccgtaccgac tcaagctgga 6720  
 aaccttccgc ctcatgtgcg gatcggattc caccgcgctg aagaagtggc gcgagcagg 6780  
 cggcgaagcc tgcgaagagt tgcgaggcag cggcctggcg gaacacgcct gggtaaatga 6840  
 tgacctggcg cattgcaaac gctagggcct tgtggggcca gttccggctg ggggttcagc 6900  
 agccagcgc ttaactggcat ttcaggaaca agcgggcact gctcgacgca cttgcttcgc 6960  
 tcagtatcgc tcgggacgca cggcgcgctc tacgaactgc cgataaacag aggattaaaa 7020  
 ttgacaattg tgattaaggc tcagattcga cggcttggag cggccgacgt gcaggatttc 7080  
 cgcgagatcc gattgtcggc cctgaagaaa gctccagaga tgttcgggct cgtttacgag 7140  
 cacgaggaga aaaagcccat ggaggcgttc gctgaacggc tcgagatgc cgtggcattc 7200  
 ggcgcctaca tcgacggcga gatcattggg ctgtcggctc tcaaacagga ggacggcccc 7260  
 aaggacgctc acaaggcgca tctgtccggc gttttcgtgg agcccgaaca gcgaggccga 7320  
 ggggtcgcgc gtatgctgct gggggcgttg ccggcgggtt tattgctcgt gatgatcgtc 7380  
 cgacagattc caacgggaat ctgggtgatg cgcaccttca tcctcggcgc acttaatat 7440  
 tcgctattct ggagcttggt gtttatttcg gctacccgc tcgcccggcg ggtcgcggcg 7500  
 acggtagggc ctgtgcagcc gctgatggtc gtgttcactc ctgccgctc gcbaggtagc 7560  
 ccgatacgat tgatggcggc cctgggggct atttcgggaa ctgcgggctg ggcgctggtg 7620

10

20

30

40

gtgttgacac caaacgcagc gctagatcct gtggcgctcg cagcgggcct ggcgggggcg 7680  
 gtttccatgg cgttcggaac cgtgctgacc cgcaagtggc aacctcccgt gcctctgctc 7740  
 accttaccg cctggcaact ggcggccgga ggacttctgc tcgttccagt agctttagtg 7800  
 tttgatccgc caatccgat gcctacagga accaatgttc tggccctggc gtggctcggc 7860  
 ctgatcggag cgggtttaa cctactcctt tggttccggg ggatctcgcg actcgaacct 7920  
 acagttgttt ccttactggg ctttctcagc ccagatctg gggctgatca gccggggatg 7980  
 catcaggccg acagtcggaa ctccgggtcc ccgacctgta ccattcggtg agcaatggat 8040  
 aggggagttg atatcgtcaa cgttcacttc taaagaaata gcgccactca gcttctcag 8100  
 cggctttatc cagcgatttc ctattatgtc ggcatagttc tcaagatcga cagcctgtca 8160  
 cggttaagcg agaaatgaat aagaaggctg ataattcggga tctctgcgag ggagatgata 8220  
 tttgatcaca ggcagcaacg ctctgtcacc gttacaatca acatgctacc ctccgcgaga 8280  
 tcatccgtgt ttcaaaccgg gcagcttagt tgccgttctt ccgaatagca tcggtaacat 8340  
 gagcaaagtc tgccgcctta caacggctct cccgctgacg ccgtcccga ctgatgggct 8400  
 gcctgtatcg agtggtgatt ttgtccgag ctgcccgtcg gggagctgtt ggctggctgg 8460  
 tggcaggata tattgtggtg taaacaaatt gacgcttaga caacttaata acacattgcg 8520  
 gacgttttta atgtactggg gtggtttttc ttttcaccag tgagacgggc aacagctgat 8580  
 tgcccttcac cgcctggccc tgagagagtt gcagcaagcg gtccacgctg gtttgcccca 8640  
 gcaggcgaaa atcctgtttg atggcggttc cgaatccggc aaaatccctt ataaatcaaa 8700  
 agaatagccc gagatagggt tgagtgttgt tccagtttgg aacaagagtc cactattaa 8760  
 gaacgtggac tccaacgtca aaggcgaaa aaccgtctat cagggcgatg gccactacg 8820  
 tgaaccatca cccaaatcaa gttttttggg gtcgaggtgc cgtaaagcac taaatcggaa 8880  
 cccaaaggg agccccgat ttagagcttg acggggaaag ccggcgaacg tggcgagaaa 8940  
 ggaagggaag aaagcgaaa gacggggcgc cttcaggct gcgcaactgt tgggaagggc 9000  
 gatcgggtcg ggcctcttcg ctattacgcc agctggcgaa agggggatgt gctgcaaggc 9060  
 gattaagttg ggtaacgcca gggttttccc agtcacgacg ttgtaaaacg acggccagtg 9120  
 aattaattcc catcttgaaa gaaatatagt ttaaataatt attgataaaa taacaagtca 9180  
 ggtattatag tccaagcaaa aacataaatt tattgatgca agtttaaatt cagaaatatt 9240  
 tcaataactg attatatcag ctggtacatt gccgtagatg aaagactgag tgcgatatta 9300  
 tgtgtaatac ataaattgat gatatagcta gcttagctca tgggggatc cgtcgaagct 9360

10

20

30

40

agcttggggtc ccgctcagaa gaactcgtca agaaggcgat agaaggcgat gcgctgcgaa 9420  
 tcgggagcgg cgataccgta aagcacgagg aagcggtcag cccattcgcc gccaaagctct 9480  
 tcagcaatat cacgggtagc caacgctatg tcctgatagc ggcccgccac accagccgg 9540  
 ccacagtcga tgaatccaga aaagcggcca tttccacca tgatattcgg caagcaggca 9600  
 tcgccatggg tcacgacgag atcctcgccg tcgggcatgc gcgccttgag cctggcgaac 9660  
 agttcggctg gcgcgagccc ctgatgctct tcgtccagat catcctgac gacaagaccg 9720  
 gcttccatcc gagtacgtgc tcgctcgatg cgatgtttcg cttgggtggc gaatgggag 9780  
 gtagccggat caagcgtatg cagccgccc attgcatcag ccatgatgga tactttctcg 9840  
 gcaggagcaa ggtgagatga caggagatcc tgccccggca cttcgcccaa tagcagccag 9900  
 tcccttccc cttcagtgc aacgtcgagc acagctgccc aaggaacgcc cgtcgtggcc 9960  
 agccacgata gcgcgctgc ctgctcctgc agttcattca gggcaccgga caggtcggtc 10020  
 ttgacaaaaa gaaccgggcg ccoctgocgt gacagccgga acacggcggc atcagagcag 10080  
 ccgattgtct gttgtgccc gtcatagccg aatagcctct ccaccaagc ggccggagaa 10140  
 cctgcgtgca atccatcttg ttcaatccaa gctcccatgg gcctcgact agagtgcaga 10200  
 tctggattga gagtgaatat gagactctaa ttggataccg aggggaattt atggaacgtc 10260  
 agtggagcat ttttgacaag aaatatttgc tagctgatag tgacctagg cgacttttga 10320  
 acgcgcaata atggtttctg acgtatgtgc ttagctcatt aaactccaga aaccgcggc 10380  
 tgagtggctc cttaacggtt gcggttctgt cagttccaaa cgtaaaacgg cttgtcccgc 10440  
 gtcateggcg ggggtcataa cgtgactccc ttaattctcc gctcatgac ttgatcccct 10500  
 gcgccatcag atccttggcg gcaagaaagc catccagttt actttgcagg gcttcccaac 10560  
 ctaccagag ggcccccag ctggcaattc cggttcgtt gctgtccata aaaccgcca 10620  
 gtctagctat cggcatgtaa gccactgca agctacctgc tttctctttg cgcttgcgtt 10680  
 ttcccttctc cagatagccc agtagctgac attcatccgg ggccagcacc gtttctcggg 10740  
 actggctttc tacgtgttcc gcttccctta gcagccctg gcacctgagt gcttgccgca 10800  
 gcgtgaagct tgcatgocg caggctgacg gcgcgcccag ctctcgagc aaatttacac 10860  
 attgccacta aacgtctaaa cccctgtaab ttgttttgt tttactatgt gtgttatgta 10920  
 tttgatttgc gataaatttt tataatttgg actaaattta taacacctt tatgctaacg 10980  
 tttgcccaaca cttagcaatt tgcaagtga ttaattgatt cttaaattatt tttgtctct 11040  
 aaatacatat actaatcaac tggaaatgta aatatttct aatatttcta ctataggaga 11100

10

20

30

40

attaaagtga gtgaatatgg taccacaagg tttggagatt taattgttgc aatgctgcat 11160  
 ggatggcata tacaccaaac attcaataat tottgaggat aataatggta ccacacaaga 11220  
 tttgaggtgc atgaacgtca cgtggacaaa aggttttagta atttttcaag acaacaatgt 11280  
 taccacacac aagttttgag gtgcatgcat ggatgccttg tggaaagttt aaaaatattt 11340  
 tggaaatgat ttgcatggaa gccatgtgta aaacctgac atccacttgg aggatgcaat 11400  
 aatgaagaaa actacaaatt tacatgcaac tagttatgca tgtagtctat ataatgagga 11460  
 ttttgcaata ctttcattca tacacactca ctaagtttta cacgattata atttcttcat 11520  
 agccagcggga tccgatatcg ggcccgtag cgttaaccct gctttaatga gatatgag 11580  
 acgcctatga tgcgatgata tttgctttca attctgttgt gcacgttga aaaaacctga 11640  
 gcatgtgtag ctcagatcct taccgcccgt ttcggttcat tctaataat atatcaccgg 11700  
 ttactatcgt atttttatga ataataattct ccgttcaatt tactgattgt ccgtcgacga 11760  
 attcgagctc ggcggcctc tagaggatcg atgaattcag atcggctgag tggctccttc 11820  
 aacgttgagg ttctgtcagt tccaaacgta aaacggcttg tcccgcgtca tggcggggg 11880  
 tcataacgtg actccotaa ttctccgctc atgatcagat tgtcgtttcc cgccttcagt 11940  
 ttaaactatc agtgtttgac aggatatatt ggcgggtaaa cctaagagaa aagagcgttt 12000  
 attagaataa tccgatattt aaaagggcgt gaaaaggttt atccttogtc catttgtatg 12060  
 tgcattgcaa ccacaggggt cccca 12085

10

20

<210> 22  
 <211> 12079  
 <212> DNA  
 <213> Unknown

<220>  
 <223> pflanzlicher Expressionsvektor mit einer  
 Promotor-Terminator-Expressionskassette

30

<400> 22  
 gatctggcgc cggccagcga gacgagcaag attggccgcc gcccgaaacg atccgacagc 60  
 ggcgccagca caggtgagca ggcaaattgc accaacgcat acagcggcag cagaatgcca 120  
 tagtgggggg tgacgtggtt cgagtgaacc agatcggcga ggaggccgg cagcaccggc 180  
 ataatacaggc cgatgcccgc agcgtcagc gcgacagtgc tcagaattac gatcaggggt 240  
 atgttgggtt tcacgtctgg cctccggacc agcctccgct ggtccgattg aacgcggcga 300  
 ttctttatca ctgataagtt ggtggacata ttatgtttat cagtgataaa gtgtcaagca 360  
 tgacaaagtt gcagccgaat acagtgatcc gtgccgccct ggacctgtg aacgaggtcg 420

40

gcgtagacgg tctgacgaca cgcaactgg cggaacgggtt gggggttcag cagccggcgc 480  
 tttactggca cttcaggaac aagcggggcgc tgctcgacgc actggccgaa gccatgctgg 540  
 cggagaatca tacgcattcg gtgccgagag cgcacgacga ctggcgctca tttctgatcg 600  
 ggaatgcccg cagcttcagg cagggcgtgc tcgcctaccg cgatggcgcg cgcattccatg 660  
 ccggcacgcg accggggcga ccgcagatgg aaacggccga cgcgcagctt cgcttctct 720  
 gogaggcggg tttttcggcc ggggacgccc tcaatgogct gatgacaatc agctacttca 780  
 ctgttggggc cgtgcttgag gagcaggccg ggcacagcga tgccggcgag cgcggcggca 840  
 ccgttgaaca ggctccgctc tcgcccgtgt tgcgggcgc gatagacgcc ttcgacgaag 900  
 ccggtccgga cgcagcgttc gagcaggac tcgcggtgat tgtcgatgga ttggcgaaaa 960  
 ggaggctcgt tgtcaggaac gttgaaggac cgagaaaggg tgacgattga tcaggaccgc 1020  
 tgccggagcg caaccactc actacagcag agccatgtag acaacatccc ctccccctt 1080  
 ccacgcgctc agacgcccg agcagcccgc tacgggcttt ttcattgccct gccctagcgt 1140  
 ccaagcctca cggccgcgct cggcctctct ggcggccttc tggcgctctt ccgcttctc 1200  
 gctcactgac tcgctgcgct cggctcgttc gctgcggcga gcggtatcag ctactcaaa 1260  
 ggcggttaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgca gaaagaaca tgtgagcaaa 1320  
 agccagcaa aaggccagga accgtaaaa ggcgcgcttg ctggcgcttt tccataggct 1380  
 ccgccccct gacgagcctc acaaaaatcg acgctcaagt cagagggtggc gaaaccgac 1440  
 aggactataa agataccagg cgtttcccc tggaagctcc ctcgctgcgct ctctgttcc 1500  
 gacctgcg cttaccggat acctgtccgc ctttctccct tcgggaagcg tggcgctttt 1560  
 ccgctgcata accctgctc ggggtcatta tagcgatctt ttoggtatat ccactcttt 1620  
 tcgcacgata tacaggattt tgccaaaggg ttcgtgtaga ctttcccttg tgtatccaac 1680  
 ggcgtcagcc gggcaggata ggtgaagtag gccaccgcg gagcgggtgt tccctcttca 1740  
 ctgtccctta ttgcacctg ggggtgctca acgggaatcc tgctctgcga ggctggccgg 1800  
 ctaccgccgg cgtaacagat gagggcaagc ggatggctga tgaaaccaag ccaaccagga 1860  
 agggcagccc acctatcaag gtgtactgcc ttccagacga acgaagagcg attgaggaaa 1920  
 agggggcggc ggccggcatg agcctgtcgg cctacctgct ggccgtcggc cagggctaca 1980  
 aaatcacggg cgtcgtggac tatgagcacg tccgcgagct ggcccgcctc aatggcgacc 2040  
 tgggcgcctt gggcggcctg ctgaaactct ggctcaccga cgaccgcgc accggcgggt 2100  
 tcggtgatgc cagatcctc gccctgctgg cgaagatcga agagaagcag gacgagcttg 2160

10

20

30

40

gcaaggtcat gatgggctg gtccgccga gggcagagcc atgacttttt tagccgctaa 2220  
aacggccggg ggggtgcgct gattgccaag cacgtcccca tgcgctccat caagaagagc 2280  
gacttcgogg agctggtgaa gtacatcacc gacgagcaag gcaagaccga gcgcctttgc 2340  
gacgctcacc gggctggtg ccctcgccgc tgggctggcg gccgtctatg gccctgcaaa 2400  
cgcgccagaa acgccgtcga agccgtgtgc gagacaccgc gggccgccgc gttgtggata 2460  
cctcgggaa aacttgccc tcaactgacag atgagggggc gacgttgaca cttgaggggc 2520  
cgactcacc gccgcggcgt tgacagatga ggggcaggct cgatttcggc cggcgacgtg 2580  
gagctggcca gcctcgcaaa tcggcgaaaa cgctgattt tacgcgagtt tcccacagat 2640  
gatgtggaca agcctgggga taagtgcctt gcggtattga cacttgaggg gcgcgactac 2700  
tgacagatga ggggcgggat ccttgacact tgagggggcag agtgctgaca gatgaggggc 2760  
gcacctattg acatttgagg ggctgtccac aggcagaaaa tccagcattt gcaagggttt 2820  
ccgccgttt ttcggccacc gctaacctgt cttttaacct gcttttaaac caatatttat 2880  
aaacctgtt ttaaccagg gctgcgccct gtgcgcgtga ccgcgcacgc cgaagggggg 2940  
tgccccctt tctegaacct tccgggccg ctaacgcggg cctcccatcc ccccaggggc 3000  
tgcgcccctc ggcgcggaac ggcctcacc caaaaatggc agcgcctggca gtcccttgcca 3060  
ttgcgggat cggggcagta acgggatggg cgatcagccc gagcgcgacg cccggaagca 3120  
ttgacgtgcc gcaggtgctg gcacgcacat tcagcgacca ggtgccgggc agtgagggcg 3180  
gcggcctggg tggcggcctg cccttcactt cggccgtcgg ggcattcacg gacttcattg 3240  
cggggccggc aatttttacc ttgggcattc ttggcatagt ggtcgcgggt gccgtgctcg 3300  
tgttcggggg tgcgataaac ccagcgaacc atttgaggtg ataggtaaaga ttataccgag 3360  
gtatgaaaac gagaattgga cctttacaga attactctat gaagcgccat atttaaaaag 3420  
ctaccaagac gaagaggatg aagaggatga ggaggcagat tgccttgaat atattgacaa 3480  
tactgataag ataatatatc ttttatatag aagatatcgc cgtatgtaag gatttcaggg 3540  
ggcaaggcat aggcagcgcg cttatcaata tatctataga atgggcaaag cataaaaact 3600  
tgcattgact aatgcttgaa acccaggaca ataaccttat agcttgtaaa tctatcata 3660  
attgggtaat gaccocaact tattgatagt gttttatggt cagataatgc ccgatgactt 3720  
tgtcatgcag ctccaccgat tttgagaacg acagcgactt ccgtccacgc cgtgccaggt 3780  
gctgcctcag attcaggta tgcgcctcaa ttcgctgcgt atatcgcttg ctgattacgt 3840  
gcagctttcc cttcagggcg gattcataca gcggccagcc atccgtcctc catatcacca 3900

10

20

30

40

## 56

cgtcaaaggg tgacagcagg ctcataagac gccccagcgt cgccatagtg cgttcaccga 3960  
 atacgtgcmc aacaaccgtc ttccggagac tgtcatacgc gtaaaacagc cagcgcctggc 4020  
 gcgatttagc cccgacatag cccactggt cgtccatttc cgcgcagacg atgacgtcac 4080  
 tgcccggctg tatgcccag gttaccgact ggggcctgag ttttttaagt gacgtaaaat 4140  
 cgtgttgagg ccaacgccc aatgcccggc tgltgccgg catccaacgc cattcatggc 4200  
 catatcaatg attttctggt cggtagccgg ttgagaagcg gtgtaagtga actgcagttg 4260  
 ccatgtttta cggcagtgag agcagagata ggcctgatgt ccggcgggtgc ttttgccgtt 4320  
 acgcaccacc ccgtcagtag ctgaacagga gggacagctg atagacacag aagccactgg 4380  
 agcacctcaa aaacaccatc atacactaaa tcagtaagtt ggcagcatca ccataattg 4440  
 tggtttcaaa atcggctccg tcgatactat gttatacgc aactttgaaa acaactttga 4500  
 aaaagctggt ttctggatt taaggtttta gaatgcaagg aacagtgaat tggagttcgt 4560  
 ctgtttataa ttagcttctt ggggtatctt taaatactgt agaaaagagg aaggaaataa 4620  
 taaatggcta aatgagaat atcaccggaa ttgaaaaaac tgatcgaaaa ataccgctgc 4680  
 gtaaaagata cgggaaggaat gtctcctgct aaggatatata agctgggtgg agaaaaatga 4740  
 aacctatatt taaaaatgac ggacagccgg tataaagggc ccaoctatga tgtggaacgg 4800  
 gaaaaggaca tgatgctatg gctggaagga aagctgcctg ttccaaaggt cctgcacttt 4860  
 gaacggcatg atggctggag caatctgctc atgagtgagg ccgatggcgt cctttgctcg 4920  
 gaagagtatg aagatgaaca aagccctgaa aagattatcg agctgtatgc ggagtgcac 4980  
 aggctctttc actccatcga catatcggat tgtccctata cgaatagctt agacagccgc 5040  
 ttagccgaat tggattactt actgaataac gatctggccg atgtggattg cgaaaactgg 5100  
 gaagaagaca ctccatttaa agatccggc gagctgtatg attttttaa gacggaaaag 5160  
 ccgaagagg aactgtctt ttcccaggc gacctgggag acagcaacat ctttgtgaaa 5220  
 gatggcaag taagtggctt tattgatctt gggagaagcg gcagggcgga caagtggat 5280  
 gacattgcct tctgcgtccg gtgatcagg gaggatatcg gggaagaaca gtatgtcag 5340  
 ctatlttttg acttactggg gatcaagcct gattgggaga aaataaaata ttatatttta 5400  
 ctggatgaat tgttttagta cctagatgtg gcgcaacgat gccggcgaca agcaggagcg 5460  
 caccgacttc ttccgatca agtgttttgg ctctcaggcc gaggcccacg gcaagtattt 5520  
 gggcaagggg tcgctggtat tctgcaggg caagattcgg aataccaagt acgagaagga 5580  
 cggccagacg gtctacggga ccgacttcat tgcogataag gtggattatc tggacaccaa 5640

10

20

30

40

ggcaccaggc ggggtcaaate aggaataagg gcacattgcc ccggcgtgag tcggggcaat 5700  
cccgcaagga ggggtgaatga atcggacggtt tgaccggaag gcatacaggc aagaactgat 5760  
cgacgcgggg ttttcgcccg aggatgccga aaccatcgca agccgcaccg tcatgcgtgc 5820  
gccccgggaa accttccagt ccgtcggctc gatgggtccag caagctacgg ccaagatcga 5880  
ggcgcacagc gtgcaactgg ctccccctgc cctgcccgcg ccatcggccg ccgtggagcg 5940  
ttcgcgtcgt ctcgaaacagg aggcggcagg tttggcgaag tcgatgacca tcgacacggc 6000  
aggaactatg acgaccaaga agcgaaaaac cgccggcgag gacctggcaa aacaggtcag 6060  
cgaggccaag caggcccggt tgctgaaaca cacgaagcag cagatcaagg aatgcagct 6120  
ttccttgttc gatattgcgc cgtggccgga cacgatgoga gcgatgcaa acgacacggc 6180  
ccgctctgcc ctgttcacca cgcgcaacaa gaaaatcccg cgcgaggcgc tgcaaaacaa 6240  
ggtcattttc cacgtcaaca aggacgtgaa gatcacctac accggcgtcg agctgcgggc 6300  
cgacgatgac gaactggtgt ggcagcaggc gttggagtac gcgaagcgca cccctacgg 6360  
cgagccgatc accttccagt tctacgagct ttgccaggac ctgggctggc cgatcaatgg 6420  
ccggtattac acgaaggccg aggaatgcct gtcgcgcta caggcgacgg cgatgggctt 6480  
cacgtccgac cgcgttgggc acctggaate ggtgtcgtcg ctgcaccgct tccgcgtcct 6540  
ggaccgtggc aagaaaacgt ccgcttgcca ggtcctgatc gacgaggaaa tcgtcgtgct 6600  
gtttgctggc gaccactaca cgaaattcat atgggagaag taccgcaagc tgcgcccgc 6660  
ggcccgacgg atgttcgact atttcagctc gcaccgggag ccgtaccgcg tcaagctgga 6720  
aaccttccgc tcatgtgcg gatcggatc caccgcgtg aagaagtggc gcgagcaggc 6780  
cggcgaagcc tcgcaagagt tgcgaggcag cggcctggcg gaacacgcct ggggtcaatga 6840  
tgacctggcg cattgcaaac gctagggcct tgtggggtca gttccggctg ggggttcagc 6900  
agccagcgct ttactggcat ttcaggaaca agcgggcact gctcgacgca cttgcttcgc 6960  
tcagtatcgc tcgggacgca cggcgcgctc tacgaactgc cgataaacag aggattaaaa 7020  
ttgacaattg tgattaaggc tcagattcga cggccttgag cggccgacgt gcaggatttc 7080  
cgcgagatcc gattgtggc cctgaagaaa gctccagaga tgttcgggtc cgtttacgag 7140  
cacgaggaga aaaagcccat ggaggcgttc gctgaacggt tgcgagatgc cgtggcattc 7200  
ggcgcctaca tcgacggcga gatcattggg ctgtcggctc tcaaacagga ggacggccc 7260  
aaggacgctc acaaggcgca tctgtccggc gtttccgtgg agcccgaaca gcgaggccga 7320  
cagatcagca atatactact ccaacattta ccaacattt tattactcat aataatcctc 7380

10

20

30

cgacagattc caacgggaat ctggtggatg cgcacttca tcctcggcgc acttaataatt 7440  
tcgctattct ggagcctgtt gtttatttcg gtctaccgcc tgcggggcgg ggtcggggcg 7500  
acggtaggcg ctgtgcagcc gctgatggtc gtgttcactc ctgccgctct gctaggtagc 7560  
ccgatacgat tgatggcggg cctgggggct atttgcggaa ctgcgggctt ggcgctgttg 7620  
gtgttgacac caaacgcagc gctagatcct gtcggcgctc cagcgggcct ggcggggggc 7680  
gtttccatgg cgttcggaac cgtgctgacc cgcaagtggc aacctcccgt gctctgtctc 7740  
acctttaccg cctggcaact ggcgcccgga ggacttctgc tcgttccagt agcttttagtg 7800  
tttgatccgc caatcccgat gcctacagga accaatgttc tcggcctggc gtggctcggc 7860  
ctgatcggag cgggtttaac ctacttcctt tggttccggg ggatctcggc actcgaacct 7920  
acagttgttt ccttactggg ctttctcagc ccagatctg gggtcgatca gccggggatg 7980  
catcaggccg acagtccgaa cttcgggtcc ccgacctgta ccattcggtg agcaatggat 8040  
aggggagttg atatcgtcaa cgttcacttc taaagaaata gcgccactca gcttccctcag 8100  
cggctttatc cagcgatttc ctattatgtc ggcatagttc tcaagatcga cagcctgtca 8160  
cggttaagcg agaatgaat aagaaggctg ataattcggg tctctcggag ggagatgata 8220  
tttgatcaca ggcagcaacg ctctgtcacc gttacaatca acatgctacc ctcccgagaga 8280  
tcacccgtgt ttcaaaccgg gcagcttagt tgcggttctt ccgaatagca tcggtaacat 8340  
gagcaaagtc tgcgcctta caacgctct cccgctgacg ccgtcccgga ctgatgggct 8400  
gcctgtatcg agtgggtgatt ttgtgccgag ctgccggctc gggagctgtt ggctggctgg 8460  
tggcaggata tattgtggtg taaacaaatt gacgcttaga caacttaata acacattggc 8520  
gaogttttta atgtactggg gtggtttttc ttttcaccag tgagacgggc aacagctgat 8580  
tgcccttcac cgcctggccc tgagagagtt gcagcaagcg gtccacgctg gtttgcccca 8640  
gcaggcgaaa atcctgtttg atggtggttc cgaatcggc aaaatccctt ataatcaaa 8700  
agaatagccc gagatagggt tgagtgttgt tccagtttg aacaagagtc cactattaaa 8760  
gaacgtggac tccaacgtca aagggcgaaa aaccgtctat cagggcgatg gccactacg 8820  
tgaaccatca cccaaatcaa gttttttggg gtcgaggtgc cgtaaagcac taaatcggaa 8880  
ccctaaaggg agccccgat ttagagcttg acggggaaag ccggcgaacg tggcgagaaa 8940  
ggaagggaaag aaagcgaag gagcgggggc cattcaggct gcgcaactgt tgggaagggc 9000  
gatcgggtcg ggcctcttcg ctattacgcc agctggcgaa agggggatgt gctgcaaggg 9060  
gattaagttg ggtaacgcca gggttttccc agtcacgacg ttgtaaaacg acggccagtg 9120

10

20

30

40

aattaattcc catcttghaa gaaatatagt ttaaataattt attgataaaa taacaagtca 9180  
ggattatag tccaagcaaa aacataaatt battgatgca agtttaaat cagaaatatt 9240  
tcaataactg attatatcag ctggtacatt gccgtagatg aaagactgag tgcgatatta 9300  
tgtgtaatac ataaattgat gatatagcta gcttagctca tcgggggatc cgtcgaagct 9360  
agcttgggtc ccgctcagaa gaactcgtca agaaggcagat agaaggcagat gcgctgcgaa 9420  
tcgggagcgg cgataccgta aagcacgagg aagcggtcag cccattcgcc gccaaagctct 9480  
tcagcaatac cacgggtagc caacgctatg tcctgatagc ggtcggccac acccagccgg 9540  
ccacagtcca tgaatccaga aaagcggcca tttccacca tgatattcgg caagcaggca 9600  
tcgccatggg tcacgacgag atcctcgccg tcgggcatgc gcgccttgag cctggcgaac 9660  
agttcggctg gcgcgagccc ctgatgctct tcgtccagat catcctgatc gacaagaccg 9720  
gcttccatcc gagtacgtgc tcgctcgatg cgatgtttcg cttggtggtc gaatgggcag 9780  
gtagccggat caagcgtatg cagccgcgcg attgcatcag ccatgatgga tactttctcg 9840  
gcaggagcaa ggtgagatga caggagatcc tgccccgca cttcgccaa tagcagccag 9900  
tccttcccc cttcagtgac aacgtcgagc acagctgcgc aaggaacgcc cgtcgtggcc 9960  
agccaogata gccgcgctgc ctogtcctgc agttcattca gggcaccgga caggtcggtc 10020  
ttgacaaaaa gaaccgggcg ccctcgctg gacagccgga acacggcggc atcagagcag 10080  
ccgattgtct gttgtgcccc gtcatagccg aatagcctct ccaccaagc ggccggagaa 10140  
cctgcgtgca atccatcttg ttaaatcaa gctcccatgg gccctcgact agagtcgaga 10200  
tctggattga gagtgaatat gagactcaa ttggataccg aggggaattt atggaacgtc 10260  
agtgagcat ttttgacaag aaatatttgc tagctgatag tgacctagg cgacttttga 10320  
acgcgcaata atggtttctg acgtatgtgc ttagctcatt aaactccaga aaccgcggc 10380  
tgagtggctc cttcaacggt gcggttctgt cagttccaaa cgtaaaacgg cttgtccccg 10440  
gtcatcggcg ggggtcataa cgtgactccc ttaattctcc gctcatgatc ttgatcccct 10500  
gcgccatcag atccttggcg gcaagaaagc catccagttt actttgcagg gcttcccaac 10560  
cttaccagag ggcgccccag ctggcaattc cggttcgctt gctgtccata aaaccgcca 10620  
gtctagctat cggcatgtaa gccactgca agctacctgc tttctcttg cgcttgctt 10680  
ttcccttctc cagatagccc agtagctgac atccatccgg ggtcagcacc gtttctgagg 10740  
actggcttc tacgtgttc gcttcctta gcagccctg cgcctgagt gcttggcgca 10800  
gcgtgaagct tgcattgctg caggctgagc gcgcgagc ctctcgagc aaatttacac 10860

10

20

30

40

attgccacta aacgtctaaa cccttgtaat ttgtttttgt tttactatgt gtgttatgta 10920  
 tttgatttgc gataaatltt tataatctggg actaaattta taacaccttt tatgctaacy 10980  
 tttgccaca cttagcaatt tgcaagttga ttaattgatt ctaaattatt tttgtcttct 11040  
 aaatacatat actaatcaac tggaaatgta aatatttggc aatatttcta ctataggaga 11100  
 attaaagtga gtgaatatgg taccacaagg tttggagatt taattgttgc aatgctgcat 11160  
 ggatggcata tacaccaaac attcaataat tcttgaggat aataatggta ccacacaaga 11220  
 tttgaggtgc atgaacgtca cgtggacaaa aggttttagta atttttcaag acaacaatgt 11280  
 taccacacac aagttttgag gtgcatgcat ggatgccttg tggaaagttt aaaaatattt 11340  
 tggaaatgat ttgcatggaa gccatgtgta aaaccatgac atccacttgg aggatgcaat 11400  
 aatgaagaaa actacaaatt tacatgcaac tagttatgca tgtagtctat ataatgagga 11460  
 ttttgcaata ctttcattca tacacactca ctaagtttta cacgattata atttcttcat 11520  
 agccagcaga tctgcccga tcgatcccgg gccatggcct gctttaatga gatatgagag 11580  
 acccctatga tcgcatgata tttgctttca attctgttgt gcacgttgta aaaaacctga 11640  
 gcatgtgtag ctcagatcct taccgcccgt ttcggttcat tctaatgaat atabcaccgg 11700  
 ttactatcgt atttttatga ataatttct ccgttcaatt tactgattgt ccgtcgacga 11760  
 gctcggcggc cctctagagg atcgatgaat tcagatcggc tgagtggctc cttcaacggt 11820  
 gcggttctgt cagttccaaa cgtaaaacgg cttgtcccgc gtcacggcg ggggtcataa 11880  
 cgtgactccc ttaattctcc gtcgatgatc agattgtcgt ttcccgcctt cagtttaaac 11940  
 tatcagtgtt tgacaggata tattggcggg taaacctaa agaaaagagc gtttattaga 12000  
 ataatcggat atttaaaagg gcgtgaaaag gtttatcctt cgtccatttg tatgtgcatg 12060  
 ccaaccacag ggttcccca 12079

10

20

<210> 23  
 <211> 13002  
 <212> DNA  
 <213> Unknown

<220>  
 <223> pflanzlicher Expressionsvektor mit zwei  
 Promotor-Terminator-Expressionskassetten

<400> 23  
 gatctggcgc cggccagcga gacgagcaag attggccgcc gcccgaaacg atccgacagc 60  
 gcgcccagca caggtgcccga ggcaaatgac accaacgcat acagcggcag cagaatgcc 120

30

tagtggggcgg tgacgtcgtt cgagtgaacc agatcgcgca ggaggcccg cagcacccgc 180  
 ataatacaggc cgatgccgac agcgtcgagc gcgacagtgc tcagaattac gatcaggggt 240  
 atgttgggtt tcacgtctgg cctccggacc agcctccgct ggtccgattg aacgcgcgga 300  
 ttctttatca ctgataagtt ggtggacata ttatgtttat cagtgataaa gtgtcaagca 360  
 tgacaaaagtt gcagccgaat acagtgatcc gtgccgccct ggacctgttg aacgaggtcg 420  
 gcgtagacgg tctgacgaca cgcaaactgg cggaacggbt gggggttcag cagccggcgc 480  
 tttactggca cttcaggaac aagcggggcg tgctcgacgc actggccgaa gccatgctgg 540  
 cggagaatca tacgcattcg gtgccgagag ccgacgacga ctggcgctca tttctgatcg 600  
 ggaatgcccg cagcttcagg caggcgctgc tcgcctaccg cgatggcgcg cgcattccatg 660  
 ccggcacgcg accggggcga ccgcagatgg aaacggccga cgcgcagctt cgcttcctct 720  
 gcgaggcggg tttttcggcc ggggacgccc tcaatgcgct gatgacaatc agctacttca 780  
 ctgttggggc cgtgcttgag gagcaggccg gcgacagcga tgccggcgag cgcggcggca 840  
 ccgttgaaca ggctccgctc tcgccgctgt tgccggccgc gatagacgcc ttcgacgaag 900  
 ccggtcogga cgcagcgttc gagcaggggac tcgcgggtgat tgtcgatgga ttggcgaaaa 960  
 ggaggctcgt tgtcaggaac gttgaaggac cgagaaaggg tgacgattga tcaggaccgc 1020  
 tgccggagcg caacccactc actacagcag agccatgtag acaacatccc ctcccccttt 1080  
 ccaccgcgtc agacgccogt agcagcccgc tacgggcttt ttcattgcct gccctagcgt 1140  
 ccaagcctca cggccgcgct cggcctctct gggggccttc tggcgctott ccgcttctc 1200  
 gctcactgac tcgctgcgct cggctgctcg gctgcccgca ggggtatcag ctactcaaa 1260  
 ggcggtaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa 1320  
 aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgctg ctggcgcttt tccataggct 1380  
 ccgccccct gacgagcacc acaaaaatcg acgctcaagt cagaggtggc gaaaccggac 1440  
 aggactataa agataccagg cgtttcccc tggaagctcc ctctgtcgtc ctctgttcc 1500  
 gaccctgccg cttaccggat acctgtccgc cttttccct tcgggaagcg tggcgctttt 1560  
 ccgctgcata accctgcttc ggggtcatta tagcgatttt ttccgtatat ccatcctttt 1620  
 togcacgata tacaggattt tgccaaaggg ttogtgtaga ctttccttgg tgtatccaac 1680  
 ggcgtcagcc gggcaggata ggtgaagtag gccacccgc gagcgggtgt tccttcttca 1740  
 ctgtccctta ttcgcacctg gcggtgctca acgggaatcc tgctctgcga ggctggccgg 1800  
 ctaccgccgg cgtaacagat gagggcaagc ggatggctga tgaaaccaag ccaaccagga 1860

10

20

30

40

agggcagccc acctatcaag gtgtactgcc ttccagacga acgaagagcg attgaggaaa 1920  
 aggcggcggc ggccggcatg agcctgtcgg cctacctgct ggccgtcggc cagggctaca 1980  
 aaatcacggg cgtcgtggac tatgagcacg tccgcgagct ggcccccatc aatggcgcacc 2040  
 tgggccgcct gggcggcctg ctgaaactct ggctcaccga cgaccocgcg acggcggcgg 2100  
 tcgggtgatgc cacgatcctc gccctgctgg cgaagatcga agagaagcag gacgagcttg 2160  
 gcaaggatcat gatgggcgtg gtccgcccga gggcagagcc atgacttttt tagccgctaa 2220  
 aacggccggg ggggtgcggt gattgccaaag cacgtccccca tgcgctccat caagaagagc 2280  
 gacttcgggg agctggtgaa gtacatcacc gacgagcaag gcaagaccga ggccttttg 2340  
 gacgctcacc gggctgggtg cctcgcgcgc tgggctggcg gccgtctatg gccctgcaaa 2400  
 cgcgccagaa acgcccgcga agccgtgtgc gagacaccgc ggcccgcggc gttgtggata 2460  
 cctcgcggaa aacttgccc tcaactgacag atgagggggc gacgttgaca cttgaggggc 2520  
 cgactcacc ggccggcgtg tgacagatga ggggcaggct cgatttcggc cggcgacgtg 2580  
 gagctggcca gcctcgcaaa cggcgcaaaa cgctgattt tacgcgagtt tcccacagat 2640  
 gatgtggaca agcctgggga taagtgccct ggggtattga cacttgaggg gcgcgactac 2700  
 tgacagatga ggggcccgat ccttgacact tgaggggcag agtgctgaca gatgaggggc 2760  
 gcacctattg acatttgagg ggtgtccac aggcagaaaa tccagcattt gcaaggggtt 2820  
 ccgccggtt ttcggccacc gtaacctgt cttttaacct gcttttaaac caatatttat 2880  
 aaaccttgtt ttaaccagg gctgcgccct gtgcgcgtga ccgcgcacgc cgaagggggg 2940  
 tgccccctc tctogaacce tccggcccgc ctaacgcggg cctcccatcc cccaggggc 3000  
 tgccccctc ggccgcgaac ggcctcacc caaaaatggc agcgtggyca gtccttgcca 3060  
 ttgcccggat cggggcagta acgggatggg cgatcagccc gagcgcgacg cccggaagca 3120  
 ttgacgtgcc gcaggtgctg gcacgcacat tcagcgacca ggtgccgggc agtgaggggc 3180  
 gcggcctggg tggcggcctg ccttcactt cggccgtcgg ggcattcacg gaotcatgg 3240  
 cggggccggc aatttttacc ttggcattc ttggcatagt ggtcgcgggt gccgtgctcg 3300  
 tgttcggggg tgcgataaac ccagcgaacc atttgaggtg ataggtaaga ttataccgag 3360  
 gtatgaaaac gagaattgga cctttacaga attactctat gaagcgcct atttaaaaag 3420  
 ctaccaagac gaagaggatg aagaggatga ggaggcagat tgcottgaat atattgaaa 3480  
 tactgataag ataatatatc ttttatatag aagatatcgc cgtatgtaag gatttcaggg 3540  
 ggcaaggcat aggcagcgcg cttatcaata tatctataga atgggcaaag cataaaaact 3600

10

20

30

40

tgcattgact aatgcttgaa acccaggaca ataaccttat agcttgtaaa ttctatcata 3660  
attgggtaat gactccaact tattgatagt gttttatggt cagataatgc cggatgactt 3720  
tgatcatgag ctccacogat ttgagaacg acagcgactt cggcccagc cgtgccaggt 3780  
gctgcctcag attcagggtta tggcgcctcaa ttggctgctg atatcgcttg ctgattacgt 3840  
gcagctttcc ctccaggcgg gattcataka ggggccagcc atccgtcacc catatcacca 3900  
cgtcaaaggg tgacagcagg ctcataagac gcccagcgt cgccatagtg cgttcaccga 3960  
atacgtgctc aacaaccgtc ttccggagac tgtcatacgc gtaaaacagc cagcgctggc 4020  
gcgatttagc cccgacatag ccccactggt cgtccatttc cggcgagacg atgacgtcac 4080  
tgcccggctg tatgcgcgag gttaccgact ggggcctgag ttttttaagt gacgtaaaat 4140  
cgtgttgagg ccaacgcca taatgctggc tgttgcccgg catccaacgc cattcatggc 4200  
catatcaatg attttctggt gcgtaccggg ttgagaagcg gtgtaagtga actgcagttg 4260  
ccatgtttta cggcagtgag agcagagata ggcctgatgt ccggcggctg ttttgccgtt 4320  
acgcaccacc ccgtcagtag ctgaacagga gggacagctg atagacacag aagccactgg 4380  
agcacctcaa aaacaccatc atacactaaa tcagtaagtt ggcagcatca ccataattg 4440  
tggtttcaaa atcggctccg tcgatactat gttatacgc aactttgaaa acaactttga 4500  
aaaagctggt ttctggtatt taaggtttta gaatgcaagg aacagtgaat tggagtctgt 4560  
cttgttataa ttagcttctt ggggtatctt taaatactgt agaaaagagg aaggaaataa 4620  
taaatggcta aatgagaat atcaccgga ttgaaaaaac tgatogaaaa ataccgctgc 4680  
gtaaagata cgggaaggaat gtctcctgct aaggtatata agctgggtgg agaaaatgaa 4740  
aacctatatt taaaaatgac ggacagccgg tataaagggc ccacctatga tgtggaacgg 4800  
gaaaaggaca tgatgctatg gctggaagga aagctgcctg ttccaaaggc cctgcacttt 4860  
gaacggcatg atggctggag caatctgctc atgagtgagg ccgatggcgt cctttgctcg 4920  
gaagagtatg aagatgaaca aagccctgaa aagattatcg agctgtatgc ggagtgcacc 4980  
aggctcttcc actccatcga catatcggat tgtccctata cgaatagctt agacagccgc 5040  
ttagccgaat tggattactt actgaataac gatctggccg atgtggattg cgaaaactgg 5100  
gaagaagaca ctccatttaa agatccgcgc gagctgtatg attttttaa gacggaaaag 5160  
cccgaagagg aacttgctct ttcccacggc gacctggag acagcaacat ctttgtgaaa 5220  
gatggcaaag taagtggctt tattgatctt gggagaagcg gcagggcgga caagtggat 5280  
gacattgcct tctgctccg gtcgatcagg gaggatatcg gggagaaca gtatgtcag 5340

10

20

30

40

ctatTTTTtg actractggg gatcaagcct gattgggaga aaataaaata ttatatttta 5400  
ctggatgaat tgttttagta cctagatgtg gcgcaacgat gccggcgaca agcaggagcg 5460  
caccgacttc ttccgcatca agtgttttgg ctctcaggcc gagggcccacg gcaagtatTT 5520  
gggcaagggg tgcctgggat tCGTgcaggg caagattcgg aataccaagt acgagaagga 5580  
cggccagacg gtctacggga ccgacttcat tgccgataag gtggattatc tggacaccaa 5640  
ggcaccaggc gggTcaaatc aggaataagg gcacattgcc ccggcgtgag tCGgggcaat 5700  
cccgcaagga gggTgaatga atcggacgTt tgaccggaag gcatacaggc aagaactgat 5760  
cgacgcgggg ttttccgccg aggatgccga aaccatcgca agccgcaccg tcatgCGTgc 5820  
gccccgcgaa accttccagt ccgtcggctc gatggTccag caagctacgg ccaagatcga 5880  
gcgcgacagc gtgcaactgg ctccccctgc cctgcccgcg ccacggcccg ccgtggagcg 5940  
ttcgcgtcgt ctCGaacagg agggggcagg tttggcgaag tCGatgacca tCGacacgcg 6000  
aggaactatg acgaccaaga agcgaaaaac cgcCGcggag gacctggcaa aacaggTcag 6060  
cgaggccaag caggccgCGt tGctgaaaca cacgaagcag cagatcaagg aatgcagct 6120  
ttccttGttc gatattgcgc cgtggccgga cacgatgCGa gcgatgcaa acgacacgcg 6180  
ccgctctgcc ctgttcacca cgcgcaacaa gaaaatcccg cgcgaggcgc tGcaaaaacaa 6240  
ggTcattttc cacgtcaaca aggacgtgaa gatcacctac accggcgtcg agctgCGggc 6300  
cgacgatgac gaactggTgt ggcagcaggt gttggagtac gcgaagcGca ccctatcgg 6360  
cgagccgate accttccagT tctacgagct ttGCCaggac ctgggctggT cGatcaatgg 6420  
ccggtattac acgaaggccg aggaatgcct gtCGcgccta caggcgacgg cGatgggctt 6480  
cacgtccgac cgcgttgggc acctggaatc ggtgtcgtg ctgcaccgct tccgcgtcct 6540  
ggaccgtggc aagaaaacgt cccgttgcca ggtcctgac gacgaggaaa tCGtCGtGct 6600  
gtttgctggc gaccactaca cGaaatcGat atgggagaag taccgcaagc tGtCGccgac 6660  
ggcccgacgg atgttcgact atttcagctc gcaccgggag ccgtaccgc tcaagctgga 6720  
aaccttccgc ctcatgtcgc gatcggattc caccCGcgtg aagaagtggc gcgagcaggt 6780  
cggcgaagcc tGcgaagagt tGcGaggcag cggcctggTg gaacacgcct gggTcaatga 6840  
tgacctggTg cattgcaaac gctagggcct tgtggggtca gttccggctg ggggttcagc 6900  
agccagcGct ttactggcat ttcaggaaca agcgggcact gctCGacgca ctTgcttGc 6960  
tcagtatcgc tCGggacgca cggcgcgctc tacgaactgc cGataaacag aggattaaaa 7020  
ttgacaattg tgattaaggc tcagattcga cggcttggag cggccgacgt gcaggatttc 7080

10

20

30

40

cgcgagatcc gattgtcggc cctgaagaaa gctccagaga tgttcgggtc cgtttacgag 7140  
 cacgaggaga aaaagcccat ggaggcgttc gctgaacggt tgcgagatgc cgtggcattc 7200  
 ggcgccatac togacggcga gatcattggg ctgtcggctt tcaaacagga ggacggcccc 7260  
 aaggacgctc acaaggcgca tctgtccggc gttttcgtgg agcccgaaca gcgaggccga 7320  
 ggggtcgccg gtatgctgct gggggcgttg ccggcgggtt tattgctcgt gatgatcgtc 7380  
 cgacagattc caacgggaat ctggtggatg cgcacttca tctcggcgc acttaatat 7440  
 tcgctattct ggagcttgtt gtttatttcg gctaccgcc tgccggcggg ggtcggcggc 7500  
 acggtaggcg ctgtgcagcc gctgatggtc gtgttcatct ctgccgctct gctaggtagc 7560  
 ccgatacgat tgatggcggc cctgggggct atttgcggaa ctgccggcgt ggcgctgttg 7620  
 gtgttgacac caaacgcagc gctagatcct gtccggctcg cagcgggcct ggcggggcgc 7680  
 gtttccatgg cgttcggaac cgtgctgacc cgcagtggc aacctccgt gcctctgctc 7740  
 accttaccg cctggcaact ggcgcccgga ggacttctgc tegtccagt agctttagtg 7800  
 tttgatcgc caatccgat gcctacagga accaatgttc tggcctggc gtggctcggc 7860  
 ctgatcggag cgggtttaac ctacttctt tggttccggg ggatctcgc actcgaacct 7920  
 acagttgtt cttactggg ctttctcagc ccagatctg ggtcgatca gccggggatg 7980  
 catcaggccg acagtcggaa cttcgggtcc ccgacctgta ccattcggtg agcaatggat 8040  
 aggggagttg atatcgtcaa cgttcacttc taagaaata gcgccactca gttcctcag 8100  
 cggctttatc cagcgatttc ctattatgtc ggcattgtc tcaagatcga cagcctgtca 8160  
 cggttaagcg agaaatgaat aagaaggctg ataattcggg tctctgcgag ggagatgata 8220  
 tttgatcaca ggcagcaacg ctctgtcacc gttacaatca acatgctacc ctccgcgaga 8280  
 tcatccgtgt tcaaacccg gcagcttagt tgcggttctt ccgaatagca tcggtaacat 8340  
 gagcaaagtc tgccgctta caacgctct cccgctgacg ccgtcccgga ctgatgggct 8400  
 gcctgtatcg agtggtgatt ttgtgccgag ctgccggctg gggagctgtt ggctggctgg 8460  
 tggcaggata tattgtggtg taaacaaatt gacgcttaga caacttaata acacattgcg 8520  
 gacgttttta atgtactggg gtggtttttc ttttcaccag tgagacgggc aacagctgat 8580  
 tgcccttca cgcctggccc tgagagagtt gcagcaagcg gtccacgctg gtttgcccca 8640  
 gcaggcgaat atcctgtttg atggtggttc cgaatccgc aaaatccctt ataaatcaaa 8700  
 agaatagccc gagatagggt tgagcttgt tccagtttg aacaagagtc cactattaaa 8760  
 gaacgtggac tccaacgtca aaggcgcaaa aaccgtctat cagggcgatg gccactacg 8820

10

20

30

40

tgaaccatca cccaaatcaa gttttttggg gtcgaggtgc cgtaaagcac taaatcggaa 8880  
ccctaaaggg agccccgat ttagagcttg acggggaaag cggcgaacg tggcgagaaa 8940  
ggaagggag aaagcgaaag gagcgggdc cattcaggct gcgcaactgt tgggaagggc 9000  
gatcgggtgc ggctctctcg ctattacgcc agctggcgaa agggggatgt gctgcaaggc 9060  
gattaagttg ggtaacgcca gggttttccc agtcacgacg ttgtaaaacg acggccagtg 9120  
aattaattcc catcttgaaa gaaatatagt ttaaataatt attgataaaa taacaagtca 9180  
ggattatag tccaagcaaa aacataaatt tattgatgca agtttaatt cagaaatatt 9240  
tcaataactg attatctcag ctgggtacatt gccgtagatg aaagactgag tgcgatatta 9300  
tgtgtaatac ataaattgat gatatagcta gcttagctca tcgggggatc cgtcgaagct 9360  
agcttgggct cgcctcagaa gaactcgtca agaaggcgat agaaggcgat gcgctgcgaa 9420  
tcgggagcgg cgataccgta aagcacgagg aagcggtcag cccattcgcc gccaaagctct 9480  
tcagcaatat caagggtagc caacgctatg tctgatagc ggtccgccac acccagccgg 9540  
ccacagtcga tgaatccaga aaagcggcca tttccacca tgatattcgg caagcaggca 9600  
tcgccatggg tcacgacgag atcctcgcg tcgggcatgc gcgcottgag cctggcgaac 9660  
agttcggctg gcgagagccc ctgatgctct tcgtccagat catcctgatc gacaagaccg 9720  
gcttccatcc gactacgtgc tcgctcagc cgatgtttcg cttgggtggc gaatgggcag 9780  
gtagccggat caagcgtatg cagccgcgc attgcatcag ccatgatgga tactttctcg 9840  
gcaggagcaa ggtgagatga caggagatcc tgccccggca ctccgccaa tagcagccag 9900  
tccttcccgc cttcagtgac aacgtcgcgc acagctgcgc aaggaacgcc cgtcgtggcc 9960  
agccacgata gccgcgctgc ctgcctctgc agttcattca gggcacccga caggtcggtc 10020  
ttgacaaaaa gaaccgggcg cccctgcgct gacagccgga acacggcggc atcagagcag 10080  
ccgattgtct gttgtgcca gtcatagccg aatagcctct ccacccaagc ggcgggagaa 10140  
cctgcgtgca atccatcttg ttcaatccaa gctcccatgg gccctcgact agagtcgaga 10200  
cttgattga gagtgaatat gagactctaa ttggataccg aggggaattt atggaacgtc 10260  
agtggagcat ttttgacaag aaatatttgc tagctgatag tgaccttagg cgacttttga 10320  
acgggcaata atggtttctg acgtatgtgc ttagctcatt aaactccaga aaccggggc 10380  
tgagtggctc cttcaacggt gcggttctgt cagttccaaa cgtaaaacgg cttgtccgc 10440  
gtcatcggcg ggggtcataa cgtgactccc ttaattctcc gctcatgatc ttgatcccct 10500  
gcgccatcag atccttggcg gcaagaaagc catccagttt actttgcagc gcttcccaac 10560

10

20

30

40

ettaccagag ggcgccccag ctggcaattc cggttcgcctt gctgtccata aaaccgccca 10620  
 gtctagctat cgccatgtaa gcccaactgca agctacctgc tttctctttg cgcttgogtt 10680  
 ttcccttgtc cagatagccc agtagctgac attcatccgg ggtcagcacc gtttctgctg 10740  
 actggctttc tacgtgttcc gcttccttta gcagcccttg cgccttgagt gcttgogcca 10800  
 gcgtgaagct tgcattgcctg caggctgcagc gcgcgccgag ctccctcgagc aaatttacac 10860  
 attgccacta aacgtctaaa cccttgtaat ttgtttttgt tttactatgt gtgttatgta 10920  
 tttgatttgc gataaatttt tatatttggg actaaattta taacaccttt tatgctaacy 10980  
 tttgccaaca cttagcaatt tgcaagttga ttaattgatt ctaaattatt tttgtcttct 11040  
 aaatacatat actaatcaac tggaaatgta aatatttgcct aatatttcta ctataggaga 11100  
 attaaagtga gtgaatatgg taccacaagg tttggagatt taattgttgc aatgctgcat 11160  
 ggatggcata tacaccaaac attcaataat tcttgaggat aataatggta ccacacaaga 11220  
 tttgaggtgc atgaacgtca cgtggacaaa aggttttagta atttttcaag acaacaatgt 11280  
 taccacacac aagttttgag gtgcatgcat ggatgccttg tggaaagttt aaaaatattt 11340  
 tggaaatgat ttgcatggaa gccatgtgta aaaccatgac atccacttgg aggatgcaat 11400  
 aatgaagaaa actacaaatt tacatgcaac tagttatgca tgtagtctat ataatgagga 11460  
 ttttgcaara ctttcattca tacacactca ctaagtttta cagattara atttcttcat 11520  
 agccagccca ccgcggtggg cggccgcctg cagtctagaa ggccctctgc tttaatgaga 11580  
 tatcgagagc gcctatgacg gcatgatatt tgctttcaat tctgttgtgc acgttgtaaa 11640  
 aaactgagc atgtgtagct cagatcctta ccgcgggttt cggttcattc taatgaatat 11700  
 atcacccgtt actatcgtat ttttatgaat aatattctcc gttcaattta ctgattgtcc 11760  
 gtcgagcaaa tttacacatt gccactaac gtctaaacc ttgtaatttg tttttgcttt 11820  
 actatgtgtg ctatgtattt gatttgcgat aaatttttat atttggctact aaatttataa 11880  
 caccttttat gctaacgttc gccaacactt agcaatttgc aagttgatta attgattcta 11940  
 aattattttt gtcttctaaa tacatatact aatcaactgg aatgtaaat atttgctaat 12000  
 atttctacta taggagaatt aaagtgcagc aataggttac cacaaggttt ggagatttaa 12060  
 ttgttgcatt gctgcatgga tggcatatac accaaacatt caataattct tgaggataat 12120  
 aatggtacca cacaagattt gaggtgcatg aacgtcacgt ggacaaaagg tttagtaatt 12180  
 tttcaagaca acaatgttac cacacacaag ttttgaggtg catgcatgga tgcctgttgg 12240  
 aaagtttaaa aatatttttg aaatgatttg catggaagcc atgtgtaaaa ccatgacatc 12300

10

20

30

40

cacttggagg atgcaataat gaagaaaact acaaatttac atgcaactag ttatgcatgt 12360  
 agtctatata atgaggabtt tgcaataactt tcattcatac aactcacta agttttacac 12420  
 gattataatt ttttcatagc cagcggatcc gatatogggc ccgctagcgt taaccctgct 12480  
 ttaatgagat atgcgagacg cctatgatcg catgatattt gctttcaatt ctgtttgtga 12540  
 cgttgtaaaa aacctgagca tgtgtagetc agatccttac cgcgggtttc ggttcattct 12600  
 aatgaatata tcaccggttâ ctatcgtatt tttatgaata atattctccg ttcaatttac 12660  
 tgattgtccg tcgacgaatt cgagctcggc gcgcctctag aggatcgtg aattcagatc 12720  
 ggctgagtgg ctccttcaac gttgcggttc tgtcagttcc aaacgtaaaa cggcttgtcc 12780  
 cgcgtcatcg gcgggggtca taacgtgact ccttaattc tccgctcatg atcagattgt 12840  
 cgtttcccgc cttcagttta aactatcagt gtttgacagg atatatggc gggtaaacct 12900  
 aagagaaaag agcgtttatt agaataatcg gatatttaa agggcgtgaa aaggtttate 12960  
 cttcgtccat ttgtatgtgc atgccaacca cagggttccc ca 13002

10

<210> 24  
 <211> 13905  
 <212> DNA  
 <213> Unknown

20

<220>  
 <223> pflanzlicher Expressionsvektor mit drei  
 Promotor-Terminator-Expressionskassetten

<400> 24  
 gatctggcgc cggccagcga gacgagcaag attggccgcc gcccgaaacg atccgacagc 60  
 gcgcccagca caggtgcgca ggcaaattgc accaacgcac acagcgcag cagaatgcca 120  
 tagtggggcg tgacgtcgtt cgagtgaacc agatcgcgca ggaggcccgg cagcaccggc 180  
 ataatcaggc cgatgccgac agcgtcagc gcgacagtgc tcagaattac gatcaggggt 240  
 atgttgggtt tcacgtctgg cctccggacc agcctccgct ggtccgattg aacgcgcgga 300  
 ttctttatca ctgataagtt ggtggacata ttatgtttat cagtgataaa gtgtcaagca 360  
 tgacaaagtt gcagccgaat acagtgatcc gtgccgccct ggacctgttg aacgaggtcg 420  
 gcgtagacgg tctgacgaca cgcaaactgg cggaacgggt gggggttcag cagccggcgc 480  
 tttactggca cttcaggaac aagcggggcg tgctcgacgc actggccgaa gccatgctgg 540  
 cggagaatca tacgcattcg gtgccgagag ccgacgacga ctggcgctca tttctgatcg 600  
 ggaatgcccg cagcttcagg cagggcgtgc tcgcctaacc cgatggcgcg cgcattcatg 660  
 ccggcacgcg accggggcga ccgcagatgg aaacggccga cgcgcagctt cgcttctct 720

30

40

gcgaggcggg tttttcggcc ggggacgccc tcaatgcgct gatgacaatc agctacttca 780  
ctgttggggc cgtgcttgag gagcaggccc ggcacagcga tgccggcgag cgcggcggca 840  
ccgttgaaca ggctccgctc tcgcccgtgt tgccggccgc gatagacgcc ttcgacgaag 900  
ccggtccgga cgcagcgttc gagcagggac tcgccgtgat tgtcgatgga ttggcgaaaa 960  
ggaggctcgt tgtcaggaac gttgaaggac cgagaaaggg tgacgattga tcaggaccgc 1020  
tgccggagcg caaccocactc actacagcag agccatgtag acaacatccc ctcccccttt 1080  
ccaccgctc agacgccctg agcagcccgc tacgggcttt ttcattgccc gccctagcgt 1140  
ccaagcctca cggccgctc cggcctctct ggcggccttc tggcgctctt ccgcttctc 1200  
gctcactgac tcgctcgctc cggctcgttc gctgcggcga gccgtatcag ctcaactcaa 1260  
ggcgtaata cgtttatcca cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa 1320  
aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggcggcgttg ctggcgcttt tccataggct 1380  
ccgccccctc gacgagcctc acaaaaatcg acgctcaagt cagaggtggc gaaaccgcac 1440  
aggactataa agataccagg cgtttcccc tggaaagctc ctctgcccct ctctgttcc 1500  
gaccctgccc cttaccggat acctgtccc cttctcccct tcgggaagcg tggcgctttt 1560  
ccgctgcata accctgcttc ggggtcatta tagcgtttt ttcggtatat ccatccttt 1620  
tcgcacgata tacaggattt tgccaaaggg ttcgtgtaga ctttccttgg tgtatccaac 1680  
ggcgtcagcc gggcaggata ggtgaagtag gccaccocgc gagcgggtgt tccttcttca 1740  
ctgtccctta ttcgcacctg gcggtgctca accggaaatc tgctctgcga ggctggcccg 1800  
ctaccgcccg cgtaacagat gggggcaagc ggatggctga tgaaccaag ccaaccagga 1860  
agggcagccc acctatcaag gtgtaactgc ttcagacga acgaagagcg attgaggaaa 1920  
aggcggcggc ggcggcctg agcctgtcgg cctacctgct gcccgccgc cagggtaca 1980  
aaatcacggg cgtcgtggac tatgagcag tcgcccagct ggcccgcac aatggcgacc 2040  
tgggcccctt gggcggcctg ctgaaactct ggctcaccga cgaccocgc accggcgggt 2100  
tcggtgatgc cagcctctc gccctgctgg cgaagatcga agagaagcag gacgagcttg 2160  
gcaaggctcat gatggcgctg gtcccocga gggcagagcc atgacttttt tagccgctaa 2220  
aacggccggg ggggtcgcgt gattgccaag cacgtcccca tgcgctccat caagaagagc 2280  
gacttcgctg agctggtgaa gtacatcacc gacgagcaag gcaagaccga ggcctttgc 2340  
gacgctcacc gggctggttg cctcgcgcgc tgggctggcg gccgtctatg gccctgcaa 2400  
cgcgccagaa acccgtcga agccgtgtgc gagacaccgc ggcggccggc gttgtggata 2460

10

20

30

40

cctcgcggaa aacttgcccc tcactgacag atgaggggcg gacgttgaca cttgaggggc 2520  
cgactcaccg ggcggggcgt tgacagatga ggggcaggct cgatttcggc cggcgacgtg 2580  
gagctggcca gcctcgcaaa tcggcgaaaa cgcttgattt tacgagagtt tcccacagat 2640  
gatgtggaca agcctgggga taagtgcctt gcggtattga cacttgaggg gcgcgactac 2700  
tgacagatga ggggcgcgat ccttgacact tgaggggcag agtgctgaca gatgaggggc 2760  
gcacctattg acatttgagg ggctgtccac aggcagaaaa tccagcattt gcaagggttt 2820  
cggcccgttt ttgggcccac gctaacctgt cttttaacct gcttttaaac caatatttat 2880  
aaaccttggt ttttaaccag gctgcgcctt gtgcgcgtga ccgcgcacgc cgaagggggg 2940  
tgccccccct tctcgaacct tcccggcccg ctaacgcggg cctcccatcc ccccaggggc 3000  
tgcgccccct ggccgcgaac ggccctcacc caaaaatggc agcgcctggca gtccttgcca 3060  
ttgcccggat cggggcagta acgggatggg cgatcagccc gagcgcgacg cccggaagca 3120  
ttgacgtgcc gcagggtgtg gcacgcacat tcagcgacca ggtgccgggc agtgagggcg 3180  
goggcctggg tggcggcctg cccttcaact cggccgtcgg ggcaattcag gacttcatgg 3240  
cggggccggc aatttttacc ttgggcattc ttggcatagt ggtcgcgggt gccgtgtctg 3300  
tgttcggggg tgcgataaac ccagcgaacc atttgagggt ataggtaaga ttataccgag 3360  
gtatgaaaac gagaattgga cctttacaga attactctat gaagcgccat atttaaaaag 3420  
ctaccaagac gaagaggatg aagaggatga ggaggcagat tgccttgaat atattgacaa 3480  
tactgataag ataatatatc ttttatatag aagatatcgc cgtatgtaag gatttcaggg 3540  
ggcaaggcat aggcagcgcg cttatcaata tatctataga atgggcaaag cataaaaact 3600  
tgcattggact aatgcttgaa acccaggaca ataaccttat agcttgtaaa ttctatcata 3660  
attgggtaat gactccaact tattgatagt gttttatggt cagataatgc ccgatgactt 3720  
tgtcatgcag ctccaccgat tttgagaacg acagcgactt cgtcccage cgtgccagggt 3780  
gctgcctcag attcaggtta tgcgcgtcaa ttgcgtgcgt atatcgcttg ctgattacgt 3840  
gcagctttcc cttcaggcgg gattcataca gggccagcc atccgtoato catatcacca 3900  
cgtcaaaggg tgacagcagg ctcataagac gcccagcgt cggcatagtg cgttcaaccga 3960  
atacgtgcgc aacaaccgtc ttccggagac tgcatacgc gtaaacagc cagcgtggc 4020  
gcgatttagc cccgacatag cccactggt cgtccattc cgcgcagacg atgacgtcac 4080  
tgcccggctg tatgcgcgag gttaccgact ggggcctgag ttttttaagt gacgtaaaat 4140  
cgtgttgagg ccaacgcca taatgcgggc tgttgcccgg catccaacgc cattcatggc 4200

10

20

30

40

catatcaatg attttctggt gcgtaccggg ttgagaagcg gtgtaagtga actgcagttg 4260  
 ccatgtttta cggcagtgag agcagagata gcgctgatgt ccggcgggtgc ttttgccgtt 4320  
 acgcaccacc ccgtcagtag ctgaacagga gggacagctg atagacacag aagccactgg 4380  
 agcacctcaa aaacaccatc atacactaaa tcagtaagtt ggcagcatca cccataattg 4440  
 tggtttcaaa atcggctccg tcgatactat gttatacggc aactttgaaa acaactttga 4500  
 aaaagctggt ttctggtatt taaggtttta gaatgcaagg aacagtgaat tggagttcgt 4560  
 cttgttataa ttagcttctt ggggtatctt taaatactgt agaaaaggg aaggaaataa 4620  
 taaatggcta aatgagaat atcacggaa ttgaaaaaac tgatcgaaaa ataccgctgc 4680  
 gtaaaagata cggaaaggaat gtctcctgct aaggatatata agctggggg agaaaatgaa 4740  
 aacctatatt taaaaatgac ggacagccgg tataaagggg ccacctatga tgtggaacgg 4800  
 gaaaaggaca tgatgctatg gctggaagga aagctgcctg ttccaaaggt cctgcacttt 4860  
 gaacggcatg atggctggag caatctgctc atgagtgagg ccgatggcgt cctttgctcg 4920  
 gaagagtatg aagatgaaca aagccctgaa aagattatcg agctgtatgc ggagtgcac 4980  
 aggctcttct actccatcga catatcggat tgcctctata cgaatagctt agacagccgc 5040  
 ttagccgaat tggattactt actgaataac gatctggcgg atgtggattg cgaaaactgg 5100  
 gaagaagaca ctccatttaa agatccgcgc gagctgtatg attttttaa gacggaaaag 5160  
 cccgaagagg aactgtctt ttcccacggc gacctgggag acagcaacat ctttgtgaaa 5220  
 gatggcaaag taagtggctt tattgatctt gggagaagcg gcagggcggg caagtggat 5280  
 gacattgctt tctgcgtccg gtogatcagg gaggatatcg gggagaaca gtatgtcgag 5340  
 ctatttttbg acttactggg gatcaagcct gattgggaga aaataaata ttatatttta 5400  
 ctggatgaat tgttttagta cctagatgtg gcgcaacgat gccggcgaca agcaggagcg 5460  
 caccgacttc ttccgcatca agtgttttgg ctctcaggcc gagggccacg gcaagtattt 5520  
 gggcaagggg tcgctgggat tcgtgcaggg caagattcgg aataccaagt acgagaagga 5580  
 cggccagacg gtctacggga ccgacttcat tgccgataag gtggattatc tggacaccaa 5640  
 ggcaccaggg gggctaaatc aggaataagg gcacattgcc ccggcgtgag tcggggcaat 5700  
 cccgcaagga gggatgaatga atcggacggt tgaccggaag gcatacaggc aagaactgat 5760  
 cgacgcgggg ttttccgccc aggatgccga aaccatcgca agccgcaccg tcatgctgc 5820  
 gccccgggaa acctccagt ccgtcggctc gatggctcag caagctacgg ccaagatcga 5880  
 gcgcgacagc gtgcaactgy ctccccctgc cctgcccgcg ccacggcccg ccgtggagcg 5940

10

20

30

40

ttcgcgtcgt ctggaacagg aggcggcagg tttggcgaag tcgatgacca tcgacacgcg 6000  
 aggaactatg acgaccaaga agcgaaaaac cgccggcgag gacctggcaa aacaggtcag 6060  
 cgaggccaag caggccgcgt tgctgaaaca cacgaagcag cagatcaagg aatgcagct 6120  
 ttocctgttc gatattgcgc ogtggccgga cacgatgcga gcgatgccaa acgacacggc 6180  
 ccgctctgcc ctgttcacca cgcgcaâcaa gaaaatcccg cgcgaggcgc tgcaaaâcaa 6240  
 ggtoattttc cacgtcaaca aggacgtgaa gatcacctac accggcgtcg agctgcgggc 6300  
 cgacgatgac gaactggtgt ggcagcaggt gttggagtac gogaagcgca cccctatcgg 6360  
 cgagccgatc accttcacgt tctacgagct ttgccaggac ctgggctggt cgatcaatgg 6420  
 ccggtattac aogaaggccg aggaatgcct gtccgccta caggcgacgg cgatgggctt 6480  
 cacgtccgac cgcgttgggc acctggaatc ggtgtcgtg ctgcaccgct tccgcgtcct 6540  
 ggaccgtggc aagaaaacgt cccgttgcca ggtcctgatc gacgaggaaa tcgtcgtgct 6600  
 gtttgctggc gaccactaca cgaaattcat atgggagaag taccgcaagc tgtcccgac 6660  
 ggcccgcagc atgttcgact atttcagctc gcaccgggag ccgtaccgc tcaagctgga 6720  
 aaccttccgc ctcatgtgcg gatcggatc caccgcgtg aagaagtggc gcgagcaggt 6780  
 cggcgaagcc tgcgaagagt tgcgagcag cggcctgggt gaacacgcct gggccaatga 6840  
 tgacctgggt cattgcaaac gctagggcct tgtgggtca gttccggctg ggggttcagc 6900  
 agccagcgcct ttactggcat ttcaggaaca agcgggcact gctcgacgca cttgcttcgc 6960  
 tcagtatcgc tggggacgca cggcgcgctc tacgaaactgc cgataaacag aggattââââ 7020  
 ttgacaattg tgattaaggc tcagattcga cggcctggag cggccgacgt gcaggatttc 7080  
 cgcgagatcc gattgtcggc cctgaagaaa gctccagaga tgttcgggtc cgtttacgag 7140  
 cacgaggaga aaaagcccat ggaggcgttc gctgaacgggt tgcgagatgc cgtggcattc 7200  
 ggcgcctaca tcgacggcga gatcattggg ctgtcggctc tcaaacagga ggacggcccc 7260  
 aaggacgctc acaaggcgca tctgtccggc gtttctgtgg agcccgââââ gcgaggccga 7320  
 ggggtcgcgc gtatgctgct gggggcgtg ccggcgggtt tattgctcgt gatgatcgtc 7380  
 cgacagattc caacgggaat ctgggtgatg cgcattctca tcctcggcgc acttaatatt 7440  
 tcgctattct ggagcttgtt gtttatttcg gtctaccgcc tgcggggcgg ggtcgcggcg 7500  
 acggtaggcg ctgtgcagcc gctgatggtc gtgttcattc ctgcgcctc gctaggtagc 7560  
 ccgatacgat tgatggcggt cctgggggct atttgcggaâ ctgcgggcgt ggcgctgttg 7620  
 gtgttgacac caaacgcagc gctagatcct gtcggcgtc cagcgggcct ggcgggggcg 7680

10

20

30

40

gtttccatgg cgttoggaaac cgtgctgacc cgcaagtggc aacctcccgt gcctctgctc 7740  
 acctttaccg cctggcaact ggcggccgga ggaattctgc tcgttccagt agcttttagtg 7800  
 tttgatccgc caatcccgat gcctacagga accaatgttc tcggcctggc gtggctoggc 7860  
 ctgatcggag cgggtttaac ctacttcctt tggttccggg ggatctcgcg actdgaacct 7920  
 acagttgttt ccttactggg ctttctcagc ccagatctg gggtcgatca gccggggatg 7980  
 catcaggccg acagtcggaa cttcgggtcc ccgacctgta ccattcggtg agcaatggat 8040  
 aggggagtgg atactgtcaa cgttcacttc taaagaaata gcgccactca gcttcctcag 8100  
 cggctttatc cagcgatttc ctattatgtc ggcatagttc tcaagatcga cagcctgtca 8160  
 cggttaagcg agaaatgaat aagaaggctg ataattcggg tctctgcgag ggagatgata 8220  
 tttgatcaca ggcagcaacg ctctgtcacc gttacaatca acatgctacc ctccgcgaga 8280  
 tcatecgtgt tcaaaaccgg gcagcttagt tgccgttctt ccgaatagca tcggtaacat 8340  
 gagcaaagtc tgccgcctta caacggctct cccgctgacg ccgtcccggg ctgatgggct 8400  
 gcccttatcg agtgggtgatt ttgtgccgag ctgccggtcg gggagctgtt ggctggctgg 8460  
 tggcaggata tatgtgggtg taaacaaatt gacgcttaga caacttaata acacattgog 8520  
 gacgttttta atgtactggg gtggtttttc ttttcaccag tgagacgggg aacagctgat 8580  
 tgcccttcac cgctggccc tgagagagtt gcagcaagcg gtccacgctg gtttgcccca 8640  
 gcaggcgaaa atcctgtttg atgggtggtc cgaaatcggc aaaatccctt ataaatcaaa 8700  
 agaatagccc gagatagggt tgagtgttgt tccagtttg aacaagagtc cactattaa 8760  
 gaacgtggac tccaacgtca aagggcgaaa aaccgtctat cagggcgatg gccactacg 8820  
 tgaaccatca cccaaatcaa gttttttggg gtcgaggtgc cgtaaagcac taaatcggaa 8880  
 ccctaaaggg agccccgat ttagagcttg acggggaaaag ccggcgaacg tggcgagaaa 8940  
 gyaaggggag aaagcgaaag gagcggggcg cattcaggct gcgcaactgt tgggaagggc 9000  
 gatcgggtgc ggcctcttcg ctattacgcc agctggcgaa agggggatgt gctgcaaggc 9060  
 gattaagttg ggtaacgcca gggttttccc agtcacgacg ttgtaaaacg acggccagtg 9120  
 aattaattcc catcttgaaa gaaatatagt ttaaataatt attgataaaa taacaagtca 9180  
 ggtattatag tocaagcaaa aacataaatt tattgatgca agtttaaatt cagaaatatt 9240  
 tcaataactg attatatcag ctggtacatt gccgtagatg aaagactgag tgcgatatta 9300  
 tgtglaatac ataaattgat gatatagcta gcttagctca tcgggggatc cgtcgaagct 9360  
 agcttgggtc ccgctcagaa gaactcgtca agaaggcgat agaaggcgat gcgctgcgaa 9420

10

20

30

40

tcgggagogg cgataccgta aagcacgagg aagcggtcag ccattogcc gccaaagtct 9480  
tcagcaatat cacgggtagc caacgctatg tcctgatagc ggtoogccac acccagccgg 9540  
ccacagtoga tgaatocaga aaagcggcca tttccacca tgatattcgg caagcaggca 9600  
tcgccatggg tcacgacgag atcctogccg tcgggcatgc gcgccttgag cctggcgaac 9660  
agttcggctg gcgcgagccc ctgatgctct tcgtccagat catcctgac gacaagaccg 9720  
gcttccatcc gagtacgtgc togetcogat cgatgtttcg cttggtggtc gaatgggcag 9780  
gtagccggat caagcgtatg cagccgccgc attgcatcag ccatgatgga tactttctcg 9840  
gcaggagcaa ggtgagatga caggagatcc tgccccgga cttcgcccaa tagcagccag 9900  
tcccttcccg cttcagtgac aacgtcgagc acagctggc aaggaacgcc cgtcgtggcc 9960  
agccacgata gccgogctgc ctogtcctgc agttcattca gggcaccgga caggtcggtc 10020  
ttgacaaaaa gaaccggggcg cccctgcgct gacagccgga acacggcggc atcagagcag 10080  
ccgattgtct gttgtgcccc gtcatagccg aatagcctct ccaccaagc ggccggagaa 10140  
cctgcgtgca atccatcttg ttaaatcaa gctcccatgg gccctcgact agagtcgaga 10200  
tctggattga gagtgaatat gagactctaa ttggataccg aggggaattt atggaacgtc 10260  
agtggagcat ttttgacaag aaatatgtgc tagctgatag tgaccttagg cgacttttga 10320  
acgcgcaata atggtttctg acgtatgtgc ttagctcatt aaactccaga aaccgcggc 10380  
tgagtggctc cttcaacgct gcggttctgt cagttccaaa cgtaaaacgg cttgtcccgc 10440  
gtcatogggg ggggtcataa cgtgactccc ttaattctcc gctcatgac ttgatcccc 10500  
gcgccatcag atccttgggc gcaagaaagc catccagttt actttgcagg gcttcccaac 10560  
cttaccagag ggcgccccag ctggcaatc cggttcgctt gctgtccata aaaccgcca 10620  
gtctagctat cgccatgtaa gccactgca agctacctgc tttctctttg cgettgctt 10680  
ttcccttgtc cagatagccc agtagctgac attcatccgg ggtcagcacc gtttctcggg 10740  
actggctttc tacgtgttcc gcttccctta gcagccctg cgcctgagt gcttgccgca 10800  
gcgtgaagct tgcatgcctg caggtcgacg gcgcgccgag ctctcagac aaatttacac 10860  
attgcacta aaogtctaaa ccttgtaat ttgtttttgt tttactatgt gtgttatgta 10920  
tttgatttgc gataaatttt tatatttgg actaaattta taacacctt tatgctaacg 10980  
tttgccaaca cttagcaatt tgcaagtga ttaattgatt ctaaattatt tttgtcttct 11040  
aaatacatal actaatcaac tggaaatgta aatatttgc aatatttcta ctataggaga 11100  
attaagtgta gtgaatatgg taccacaagg tttggagatt taattgttgc aatgctgcat 11160

10

20

30

40

ggatggcata tacaccaaac attcaataat tcttgaggat aataatggta ccacacaaga 11220  
 tttgaggtgc atgaacgtca cgtggacaaa aggtttagta atttttcaag acaacaatgt 11280  
 taccacacac aagttttgag gtgcatgcat ggatgccctg tggaaagtcc aaaaatattt 11340  
 tggaaatgat ttgcatggaa gccatgtgta aaaccatgac atccacttgg aggatgcaat 11400  
 aatgaagaaa actacaaatt tacatgcaac tagttatgca tgtagtccat ataatgagga 11460  
 ttttgcaata ctttcattca tacacactca ctaagtttta cagcattata atttcttcat 11520  
 agccagccca cgcggtggg cggccgctg cagtctagaa ggcctcctgc tttaatgaga 11580  
 tatgcgagac gcctatgac gcatgatatt tgctttcaat tctgttgtgc acgttgtaaa 11640  
 aaacctgagc atgtgtagct cagatcctta cgcgctgtt cggttcattc taatgaatat 11700  
 atcaccggtt actatcgtat ttttatgaat aatattctcc gttcaattta ctgattgtcc 11760  
 gtcgagcaaa tttacacatt gccactaaac gtctaaacc ttgtaatttg tttttgtttt 11820  
 actatgtgtg ttatgtattt gatttgcat aaatttttat atttggtact aaatttataa 11880  
 caccttttat gctaacgttt gccaacactt agcaatttgc aagttgatta attgattcta 11940  
 aattattttt gtcttctaaa tacatatact aatcaactgg aaatgtaaat atttgctaat 12000  
 atttctacta taggagaatt aaagtgtgtg aatattgtac cacaaggttt ggagatttaa 12060  
 ttgttgcaat gctgcatgga tggcatatac accaaacatt caataattct tgaggataat 12120  
 aatggtacca cacaagattt gaggtgcatg aacgtcacgt ggacaaaagg tttagtaatt 12180  
 tttcaagaca acaatgttac cacacacaag ttttgaggtg catgcatgga tgcctgtgg 12240  
 aaagtttaa aatatttttg aaatgatttg catggaagcc atgtgtaaaa ccatgacatc 12300  
 cacttgagg atgcaataat gaagaaaact acaaatctac atgcaactag ttatgcatgt 12360  
 agtctatata atgaggattt tgcaataact tcattcatac acactcacta agttttacac 12420  
 gattataatt tcttcatagc cagcggatcc gatatcgggc cgcctagcgt taacctgct 12480  
 ttaatgagat atgagagacg cctatgatcg catgatattt gctttcaatt ctgttgtgca 12540  
 cgttgtaaaa aacctgagca tgtgtagctc agatccttac cgcggtttc ggttcattct 12600  
 aatgaatata tcaccgta ctatcgtatt tttatgaata atattctccg ttcaatttac 12660  
 tgattgtccg tcgagcaaat ttacacattg ccactaaacg tctaaaccct tgtaatttgt 12720  
 tttgtttta ctatgtgtgt tatgtatttg atttgogata aattttata tttggtacta 12780  
 aatttataac accttttatg ctaacgtttg ccaacactta gcaabttgca agttgattaa 12840  
 ttgattctaa attattttg tcttctaat acatatacta atcaactgga aatgtaata 12900

10

20

30

40

tttgctaata tttctactat aggagaatta aagtgagtga atatggtacc acaaggtttg 12960  
 gagatttaat tgttgcaatg ctgcatggat ggcatataca ccaaacattc aataattctt 13020  
 gaggataata atggtaccac acaagatttg aggtgcatga acgtcacgtg gacaaaaggt 13080  
 ttagtaatth ttcaagacaa caatggtacc acacacaagt tttgaggtgc atgcatggat 13140  
 gccctgtgga aagtttaaaa atatthttgga aatgatttgc atggaagcca tgtgtaaaac 13200  
 catgacatcc acttggagga tgcaataatg aagaaaacta caaatttaca tgcaactagt 13260  
 tatgcatgta gtctatataa tgaggattht gcaatactth cattcataca cactcaacta 13320  
 gttttcacag attataatth ctcatagcc agcagatctg ccggcatcga tcccgggcca 13380  
 tggcctgctt taatgagata tggagagcgc ctatgatcgc atgatatttg ctttcaattc 13440  
 tgttggtcac gttgtaaaaa acctgagcat gtgtagctca gatccttacc gcgggttctg 13500  
 gttcattota atgaatatat caccogttac taccgtatth ttatgaataa tattctccgt 13560  
 tcaatttact gattgtccgt cgacgagctc ggcgcgcctc tagaggatcg atgaattcag 13620  
 atcggctgag tggctccttc aacgttgcgg ttctgtcagt tccaaacgta aaacggcttg 13680  
 tcccgcgtca tggcgggggg tcataacgtg actccctbaa ttctccgctc atgatcagat 13740  
 tgtcgtttcc cgccttcagt ttaaactatc agtgthtgac aggatatatt ggcgggtaaa 13800  
 cctaagagaa aagagcgtth attagaataa tcggatathh aaaagggcgt gaaaaggtth 13860  
 atccttcgct catttgatg tgcatgcaa ccacaggtt ccca 13905

10

20

<210> 25  
 <211> 15430  
 <212> DNA  
 <213> Unknown

<220>  
 <223> pflanz. Expressionsvektor mit zwei Promotor-  
 Terminator-Expressionskassetten inseriert ist  
 Physcomitrella patens Elongase und Desaturase

30

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (11543)..(12415)

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (13313)..(14890)

<400> 25  
 gatctggcgc cggccagcga gacgagcaag attggcgcgc gcccgaaacg atccgacagc 60  
 gcgcccagca caggtgcgca ggcaaattgc accaacgcat acagcgccag cagaatgcca 120

40

tagtgggcccg tgacgtcgtt cgagtgaacc agatcgcgca ggaggcccgg cagcaccggc 180  
 ataatacaggc cgatgccgac agcgtcggagc ggcacagtgc tcagaattac gatcaggggt 240  
 atgttgggtt tcacgtctgg cctccggacc agcctccgct ggtccgattg aacgcgcgga 300  
 ttctttatca ctgataagtt ggtggacata ttatgtttat cagtgataaa gtgtcaagca 360  
 tgacaaagtt gcagccgaat acagtgatcc gtgccgcctt ggacctgttg aacgaggtcg 420  
 gcgtagacgg tctgacgaca cgcaactgg cggaaagggtt gggggttcag cagccggcgc 480  
 ttactggca cttcaggaac aagcggggcg tgctcgacgc actggccgaa gccatgctgg 540  
 cggagaatca tacgcattcg gtgccgagag ccgacgacga ctggcgctca tttctgatcg 600  
 ggaatgcccg cagcttcagg caggcgtctg tcgcctaccg cgatggcgcg cgcattccatg 660  
 ccggcacgcg accggggcgca ccgcagatgg aaacggccga cgcgcagctt cgttctctct 720  
 gcgaggcggg tttttcggcc ggggacgccc tcaatggcct gatgacaatc agctacttca 780  
 ctgttggggc cgtgcttgag gagcaggccg ggcacagcga tgccggcgag cgcggcggca 840  
 ccgttgaaca ggctccgctc tcgccgctgt tgccggccgc gatagacgcc ttcgacgaag 900  
 ccggtccgga cgcagcgttc gagcagggac tcgcgggtgat tgtcgatgga ttggcgaaaa 960  
 ggaggctcgt tgtcaggaac gttgaaggac cgagaaaggg tgacgattga tcaggaccgc 1020  
 tgccggagcg caaccactc actacagcag agccatgtag acaacatccc ctccccttt 1080  
 ccaccgcgtc agacgcccg agcagccgc taagggttt ttcattgcct gccctagcgt 1140  
 ccaagcctca cggccgcgct cggcctctct ggcggccttc tggcgctctt ccgcttctc 1200  
 gctcactgac tcgctgcgct cggctcgttc gctgcccga gcggtatcag ctactcaaa 1260  
 ggcggtaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa 1320  
 aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggcgcgcttg ctggcgtttt tccataggct 1380  
 ccgccccct gacgagcacc acaaaaatcg acgctcaagt cagaggtggc gaaaccggac 1440  
 aggactataa agataccagg cgtttcccc ttggaagctc ctcgctgcgt ctctgttcc 1500  
 gaccctgccg cttaccggat acctgtccgc ctttctccct tcgggaagcg tggcgctttt 1560  
 ccgctgcata accctgctc ggggtcatta tagcgatttt ttccgtatat ccatcctttt 1620  
 tcgcacgata tacaggattt tgccaaaggg ttcggtgaga ctttccttgg tgtatccaac 1680  
 ggcgtcagcc gggcaggata ggtgaagtag gccaccgcg gagcgggtgt tccttcttca 1740  
 ctgtccotta ttcgacctg gcggtgctca accgggaatcc tgctctgcga ggctggccgg 1800  
 ctaccgccgg cgtaacagat gagggcaagc ggatggctga tgaaaccaag ccaaccagga 1860

10

20

30

40

agggcagccc acctatcaag gtgtactgcc ttccagacga acgaagagcg attgaggaaa 1920  
 agggggcggc gggcggcatg agcctgtcgg cctacctgct ggccgtcggc cagggctaca 1980  
 aaatcacggg cgtcgtggac tatgagcacg tccgcgagct ggcccgcato aatggcgacc 2040  
 tgggcccgcct gggcggcctg ctgaaactct ggctcaccga cgaccccgcg acggcgcggt 2100  
 tcggtgatgc cacgatcctc gccctgctgg cgaagatcga agagaagcag gacgagcttg 2160  
 gcaaggtecat gatgggcgtg gtccgcccga gggcagagcc atgacttttt tagccgctaa 2220  
 aacggccggg ggggtgcggt gattgccaa gacgtcccca tgcgctccat caagaagagc 2280  
 gacttcgctg agctggtgaa gtacatcacc gacgagcaag gcaagaccga gcgcctttgc 2340  
 gacgctcacc gggctggttg cctcgcgcgc tgggctggcg gccgtctatg gccctgcaaa 2400  
 cgcgccagaa acgcccgcga agccgtgtgc gagacaccgc ggccgcccgc gttgtggata 2460  
 cctcgcggaa aachtggccc tcactgacag atgaggggcg gacgttgaca cttgaggggc 2520  
 cgactcacc ggcgcggcgt tgacagatga ggggcaggct cgatttcggc cggcgacgtg 2580  
 gagctggcca gcctcgcaaa cggcgaaaa cgcctgattt tacgcgagtt tcccacagat 2640  
 gatgtggaca agcctgggga taagtgcctt gcggatttga cacttgaggg gcgcgactac 2700  
 tgacagatga gggcgcgat ccttgacact tgaggggcag agtgctgaca gatgaggggc 2760  
 gcacctattg acatttgagg ggtgtccac aggcagaaaa tccagcattt gcaagggttt 2820  
 ccgcccgtt ttcggccacc gctaacctgt cttttaacct gcttttaaac caatatttat 2880  
 aaaccttggt ttaaccagg gctgcgccct gtgcgcgtga ccgcgcacgc cgaagggggg 2940  
 tgccccctt tctcgaaccc tcccgcccg ctaacgcggg cctcccctcc cccagggggc 3000  
 tgcgcccctc ggcgcggaac ggccctcacc caaaaatggc agcgtcggca gtccttgcca 3060  
 ttgccgggat cggggcagta acgggatggg cgatcagccc gagcgcgacg cccggaagca 3120  
 ttgacgtgcc gcagggtgctg gcacgcacat tcagcgacca ggtgccgggc agtgagggcg 3180  
 gcggcctggg tggcggcctg ccttcactt cggccgtcgg ggcattcacg gacttcatgg 3240  
 cggggccggc aatttttacc ttgggcattc ttggcatagt ggtcgcgggt gccgtgctcg 3300  
 tgttcggggg tgcgataaac ccagcgaacc atttgaggtg ataggttaaga ttataccgag 3360  
 gtatgaaaac gagaattgga cctttacaga attactotat gaagcgccat atttaaaaag 3420  
 ctaccaagac gaagaggatg aagaggatga ggaggcagat tgccttgaat atattgacaa 3480  
 tactgataag ataatatatc ttttatatag aagatatcgc cgtatgtaag gatbtcaggg 3540  
 ggcaaggcat aggcagcgcg cttatcaata tatctataga atgggcaaag cataaaaact 3600

10

20

30

40

tgcattggact aatgcttgaa acccaggaca ataaccttat agcttgtaaa ttctatcata 3660  
 attgggtaat gactccaact tattgatagt gttttatggt cagataatgc ccgatgactt 3720  
 tgtcatgcag ctccacogat tttgagaacg acagcgactt ccgtcccagc cgtgccaggt 3780  
 gctgcctcag attcaggtta tgccgctcaa ttccgctcgt atatacgttg ctgattacgt 3840  
 gcagctttcc cttcaggcgg gattcataca ggggccagcc atccgtcacc catatcacca 3900  
 cgtcaaaggg tgacagcagg ctcataagac gcccagcgt cgcctatagtg cgttcaccga 3960  
 atacgtgccc aacaaccgtc ttccggagac tgtcatagc gtaaaacagc cagcgtggc 4020  
 gcgatttagc ccgacatag cccactggt cgtccattc cgcgcagagc atgacgtcac 4080  
 tgcccggctg tatgcgogag gttaccgact gggcctgag ttttttaagt gacgtaaaat 4140  
 cgtgttgagg ccaacgccca taatgcccgc tgttgcccgc catccaacgc cattcatggc 4200  
 catatcaatg atttctcggg gcgtaccggg ttgagaagcg gtgtaagtga actgcagttg 4260  
 ccattgttta cggcagtgag agcagagata gcgctgatgt ccggcgggtc ttttgcggt 4320  
 acccaccacc ccgtcagtag ctgaacagga gggacagctg atagacacag aagccactgg 4380  
 agcacctcaa aaacaccacc atactactaa tcagtaagtt ggcagcatca cccataattg 4440  
 tggtttcaaa atcggctccg tcgatactat gttatacgc aactttgaaa acaactttga 4500  
 aaaagctggt ttctgggtatt taaggtttta gaatgcaagg aacagtgaat tggagttcgt 4560  
 cttgttataa ttagcttctt ggggtatctt taaatactgt agaaaagagg aaggaaataa 4620  
 taaatggcta aatgagaat atcaccggaa ttgaaaaaac tgatcgaaaa ataccgctgc 4680  
 gtaaaagata cggaaaggaat gtctcctgct aaggtatata agctggggg agaaaatgaa 4740  
 aacctatatt taaaaatgac ggacagccgg tataaagggc ccacctatga tgtggaacgg 4800  
 gaaaaggaca tgatgctatg gctggaagga aagctgcctg ttccaaaggc cctgcacttt 4860  
 gaacggcatg atggctggag caatctgctc atgagtgagg ccgatggcgt cctttgctcg 4920  
 gaagagtatg aagatgaaca aagccctgaa aagattatcg agctgtatgc ggagtgcacc 4980  
 aggtctttc actccatcga catatcggat tgtccctata cgaatagctt agacagccgc 5040  
 ttagccgaat tggattactt actgaataac gatctggcgg atgtggattg cgaaaactgg 5100  
 gaagaagaca ctccatttaa agatccgccc gagctgtatg attttttaa gacggaaaag 5160  
 cccgaagagg aactgtctt ttcccacggc gacctgggag acagcaacat ctttgtgaaa 5220  
 gatggcaaag taagtggctt tattgatctt gggagaagcg gcagggcggc caagtgggat 5280  
 gacattgcct tctgcgtccg gtccatcagg gaggatatcg gggagaaca gtatgtcag 5340

10

20

30

40

ctatlttttg acttactggg gatcaagcct gattgggaga aaataaaata ttatatttta 5400  
ctggatgaat tgttttagta cctagatgtg gcgcaacgat gccggcgaca agcaggagcg 5460  
caccgacttc ttccgcatca agtgttttgg ctctcaggcc gagggcccacg gcaagtattc 5520  
gggcaagggg tcgctgggat tcgtgcaggg caagattcgg aataccaagt acgagaagga 5580  
cggccagacg gtctacggga ccgacttcat tgccgataag gtggattatc tggacaccaa 5640  
ggcaccaggc gggtaaaatc aggaataagg gcacattgcc ccggcgtgag tcggggcaat 5700  
cccgaagga gggatgaatga atcggacgtt tgaccggaag gcatacaggc aagaactgat 5760  
cgacgcgggg tttccgccc aggatgccga aaccatcgca agccgcaccg tcatgcgtgc 5820  
gcccccgaa accttcacgt ccgtcggctc gatggtccag caagctacgg ccaagatcga 5880  
gcgcgacacg gtgcaactgg ctccccctgc cctgcccgcg ccacggcccg ccgtggagcg 5940  
ttcgcgtcgt ctgaaacagg agggggcagg tttggogaag tcgatgacca tcgacacgcg 6000  
aggaactatg acgaccaaga agcgaaaaac cgcgcgcgag gacctggcaa aacaggtcag 6060  
cgaggccaag caggccgcgt tgctgaaaca cacgaagcag cagatcaagg aatgcagct 6120  
ttccttgttc gatattgccc cgtggccgga cacgatgcca gcgatgcaa acgacacggc 6180  
ccgctctgcc ctgttcacca cgcgcaaaa gaaaatcccg Cgcgaggcgc tgcaaaaaca 6240  
ggtcattttc cagctcaaca aggacgtgaa gatcacctac accggcgtcg agctgcccgc 6300  
cgacgatgac gaactgggtg ggcagcaggt gttggagtac gcaagcgcga cccctatcgg 6360  
cgagccgatc accttcacgt tctacgagct ttgccaggac ctgggctggt cgatcaatgg 6420  
ccggtattac acgaaggccc aggaatgcct gtcgcgccta caggcgacgg cgatgggctt 6480  
cacgtccgac cgcgttgggc acctggaatc ggtgtcgtg ctgcaccgct tccgcgtcct 6540  
ggaccgtggc aagaaaacgt cccgttgcca ggtcctgate gacgaggaaa tcgtcgtgct 6600  
gtttgctggc gaccactaca cgaaatcct atgggagaag taccgcaagc tgtcggccgac 6660  
ggcccgcagg atgttcgact atttcagctc gcaccgggag ccgtaccgac tcaagctgga 6720  
aaccttcgac ctcatgtgcg gatcggatc caccgcgctg aagaagtggc gcgagcaggt 6780  
cggcgaagcc tgcaagagt tgcgaggcag cggcctggtg gaacacgcct gggatcaatga 6840  
tgacctggtg cattgcaaac gctagggcct tgtgggtca gttccggctg ggggttcagc 6900  
agccagcgtt ttactggcat ttcaggaaca agcgggcaact gctcagcga cttgcttcgc 6960  
tcagtatcgc tcgggacgca cggcgcgctc tacgaactgc cgataaacag aggattaaaa 7020  
ttgacaattg tgattaaggc tcagattcga cggcctggag cggccgacgt gcaggatttc 7080

10

20

30

40

cgcgagatcc gattgtcggc cctgaagaaa gctccagaga tgttcgggtc cgtttacgag 7140  
 cacgaggaga aaaagcccat ggaggcgttc gctgaacggt tgcgagatgc cgtggcattc 7200  
 ggcgcctaca tcgacggcga gatcattggg ctgtcgggtc tcaaacagga ggaaggcccc 7260  
 aaggacgctc acaaggcgca tctgtccggc gttttcgtgg agcccgaaaca gcgaggccga 7320  
 ggggtcgcgg gtatgctgct gcgggcgttg ccggcgggtt tattgctcgt gatgatcgtc 7380  
 cgacagattc caacgggaat ctggtygatg cgcactctca tcctcggcgc acttaatat 7440  
 tcgctattct ggagcttggt gtttatttcg gtctaccgcc tgccggggcg ggtcgcggcg 7500  
 acggtaggcg ctgtgcagcc gctgatggtc gtgttcatct ctgccgctct gctaggtagc 7560  
 ccgatacgat tgatggcggc cctgggggct atttgcgaa ctgcgggcgt ggcgctgctg 7620  
 gtgttgacac caaacgcagc gctagatcct gtcggcgtcg cagcgggcct ggcggggcg 7680  
 gtttccatgg cgttoggaa cgtgctgacc cgcaagtggc aacctccgt gcctctgctc 7740  
 acctttaccg cctggcaact ggcggccgga ggactctgce tcgttcagc agctttagt 7800  
 tttgatccgc caatcccgat gctacagga accaatgttc tcggcctggc gtggctcggc 7860  
 ctgatcggag cgggtttaac ctacttctt tggttccggg ggalctcgcg actcgaacct 7920  
 acagttggtt ccttactggg cttctcagc ccagatctg ggtogatca gccggggatg 7980  
 catcaggccc acagtcggaa ctccgggtcc ccgacctga ccattcggty agcaatggat 8040  
 aggggagttg atabcgtcaa cgttcacttc taaagaaata gcgcactca gcttctcag 8100  
 cggctttatc cagcgatttc ctattatgtc ggcatagttc tcaagatcga cagcctgtca 8160  
 cggttaagcg agaaatgaat aagaaggctg ataattogga tctctgcgag ggagatgata 8220  
 tttgatcaca ggcagcaacg ctctgtcacc gttacaatca acatgctacc ctccgcgaga 8280  
 tcatccgtgt tcaaacccg gcagcttagt tgccgttctt ccgaatagca tcggtaacat 8340  
 gagcaaagtc tgccgcctta caacggctct cccgctgacg ccgtcccgga ctgatgggt 8400  
 gcctgtatcg agtggtgatt ttgtgccgag ctgccggtcg gggagctgtt ggctggctgg 8460  
 tggcaggata tattgtggtg taaacaaatt gacgcttaga caacttaata acacattgcg 8520  
 gacgttttta atgtactggg gtggtttttc ttttcaccag tgagacgggc aacagctgat 8580  
 tgcccttcac ccctggccc tgagagagtt gcagcaagcg gtccacgctg gtttgccca 8640  
 gcaggcgaaa atcctgtttg atggtggttc cgaatcggc aaaatccctt ataaatcaaa 8700  
 agaatagccc gagatagggt tgagtgtgtg tcagtttgg aacaagagtc cactattaaa 8760  
 gaacgtggac tccaacgtca aaggcgaaa aaccgtctat cagggcgatg gccactacg 8820

10

20

30

40

tgaacatca cccaaarcaa gttttttggg gtcgaggtgc cgtaaagcac taaatcggaa 8880  
ccetaaaggg agccccgat ttagagcttg acggggaaag cggcggaacg tggcgagaaa 8940  
ggaagggaaag aaagcgaag gagcgggcgc cattcaggct gcgcaactgt tgggaagggc 9000  
gatcgggtgcg ggcctcttcg ctattacgcc agctggcgaa agggggatgt gctgcaaggc 9060  
gattaagttg ggtaacgcca gggttttccc agtcacgacg ttgtaaaacg accggccagtg 9120  
aattaattcc catcttgaaa gaaatatagt ttaaattttt attgataaaa taacaagtca 9180  
ggtattatag tccaagcaaa aacataaatt tattgatgca agtttaaatt cagaaatatt 9240  
tcaataactg attatatcag ctggtacatt gccgtagatg aaagactgag tgcgatatta 9300  
cgtgtaatac ataaattgat gatatagcta gcttagctca tcgggggatc cgtcgaagct 9360  
agcttgggtc ccgctcagaa gaaactcgtca agaaggcgat agaaggcgat gcgctgcgaa 9420  
tcggggagcgg cgataccgta aagcacgagg aagcggtcag ccatttcgcc gccaaagctct 9480  
tcagcaatat cacgggtagc caacgctatg tcctgatagc ggtccgccac acccagccgg 9540  
ccacagtcga tgaatccaga aaagcggcca ttttccacca tgatattcgg caagcaggca 9600  
tcgccatggg tcacgacgag atcctcgcg tcgggcatgc gcgccttgag cctggcgaa 9660  
agttcggctg gcgcgagccc ctgatgctct tcgtccagat catcctgatc gacaagaccg 9720  
gcttccatcc gagtacgtgc tcgctcgatg cgatgtttcg ctltggtggtc gaatgggag 9780  
gtagccggat caagcgtatg cagccgcgc attgcatcag ccatgatgga tactttctcg 9840  
gcaggagcaa ggtgagatga caggagatcc tgcctccgca cttcgccaa tagcagccag 9900  
tccttccccg cttcagtgc aacgtcgc acagctgcgc aaggaacgcc cgtcgtggcc 9960  
agccaagata gccgcgctgc ctgcctcgc agttcatca gggcaccgga caggtcggtc 10020  
ttgacaaaaa gaaccgggcg ccctcgcgt gacagccgga acacggcggc atcagagcag 10080  
ccgatgtct gttgtgcca gtcatagccg aatagcctct ccaccaagc ggccggagaa 10140  
cctgcgtgca atccatcttg ttcaatccaa gctcccatgg gcctcagact agagtcgaga 10200  
tctggattga gagtgaatat gagactctaa ttggataccg aggggaattt atggaacgtc 10260  
agtggagcat ttttgacaag aatatattgc tagctgatag tgaccttagg cgacttttga 10320  
acgcgcaata atggtttctg acgtatgtgc ttagctcatt aaactccaga aaccgcggc 10380  
tgagtggctc ctcaacggt gcggttctgt cagttccaaa cgtaaaacgg cttgtcccgc 10440  
gtcatcggcg ggggtcataa cgtgactccc ttaattctcc gctcatgate ttgatcccct 10500  
gcgccatcag atccttggcg gcaagaaagc catccagttt actttgcagg gcttcccaac 10560

10

20

30

40



Phe Cys Phe Ala Leu Ser Leu Tyr Met Cys Val Gly Ile Ala Tyr Gln		
95	100	105
gct att acc tgg cgg tac tct ctc tgg ggc aat gca tac aat cct aaa	11908	
Ala Ile Thr Trp Arg Tyr Ser Leu Trp Gly Asn Ala Tyr Asn Pro Lys		
110	115	120
cat aaa gag atg gcg att ctg gta tac ttg ttc tac atg tct aag tac	11956	
His Lys Glu Met Ala Ile Leu Val Tyr Leu Phe Tyr Met Ser Lys Tyr		
125	130	135
gtg gaa ttc atg gat acc gtt atc atg ata ctg aag cgc agc acc agg	12004	
Val Glu Phe Met Asp Thr Val Ile Met Ile Leu Lys Arg Ser Thr Arg		
140	145	150
caa ata agc ttc ctc cac gtt tac cat cat cct tca att tcc ctc att	12052	
Gln Ile Ser Phe Leu His Val Tyr His His Ser Ser Ile Ser Leu Ile		
155	160	165
tgg tgg gct att gct cat cac gct cct ggc ggt gaa gca tat tgg tct	12100	
Trp Trp Ala Ile Ala His His Ala Pro Gly Gly Glu Ala Tyr Trp Ser		
175	180	185
gcg gct ctg aac tca gga gtg cat gtt ctc atg tat gcg tat tac ttc	12148	
Ala Ala Leu Asn Ser Gly Val His Val Leu Met Tyr Ala Tyr Tyr Phe		
190	195	200
ttg gct gcc tgc ctt cga agt agc cca aag tta aaa aat aag tac ctt	12196	
Leu Ala Ala Cys Leu Arg Ser Ser Pro Lys Leu Lys Asn Lys Tyr Leu		
205	210	215
ttt tgg ggc agg tac ttg aca caa ttc caa atg ttc cag ttt atg ctg	12244	
Phe Trp Gly Arg Tyr Leu Thr Gln Phe Gln Met Phe Gln Phe Met Leu		
220	225	230
aac tta gtg cag gct tac tac gac atg aaa acg aat gcg cca tat cca	12292	
Asn Leu Val Gln Ala Tyr Tyr Asp Met Lys Thr Asn Ala Pro Tyr Pro		
235	240	245
caa tgg ctg atc aag att ttg ttc tac tac atg atc tcg ttg ctg ttt	12340	
Gln Trp Leu Ile Lys Ile Leu Phe Tyr Tyr Met Ile Ser Leu Leu Phe		
255	260	265
ctt ttc ggc aat ttt tac gta caa aaa tac atc aaa ccc tct gac gga	12388	
Leu Phe Gly Asn Phe Tyr Val Gln Lys Tyr Ile Lys Pro Ser Asp Gly		
270	275	280
aag caa aag gga gct aaa act gag tga tctagaaggc ctctgcttt	12435	
Lys Gln Lys Gly Ala Lys Thr Glu		
285	290	
aatgagatat gcgagacgcc tatgatcgca tgatatttgc tttcaattct gttgtgcacg	12495	
ttgtaaaaaa cctgagcatg tgtagctcag atccttaccg ccggtttcgg ttcattctaa	12555	
tgaatataac acccgttact atcgtatctt tatgaataat attctccggt caatttactg	12615	
attgtccgtc gagcaaattt acacattgcc actaaacgtc taaacccttg taatttgttt	12675	

10

20

30

40

ttgttttact atgtgtgtta tgtatttgat ttgcgataaa tttttatatt tggactataa 12735  
 tttataacac cttttatgct aacgtttgcc aacacttagc aatttgcaag ttgattaatt 12795  
 gattctaaat tatttttgtc ttctaaatac atatactaata caactggaaa tgtaaatatt 12855  
 tgctaataatt tctactatag gagaactaaa gtgagtgaat atggtaccac aaggtttggga 12915  
 gatttaattg ttgcaatgct gcatggatgg catabacacc aacattcaa taattcttga 12975  
 ggataataat ggtaccacac aagatttgag gtgcatgaac gtcacgtgga caaaaggttt 13035  
 agtaattttt caagacaaca atgttaccac acacaagttt tgaggtgcat gcatggatgc 13095  
 cctgtggaaa gtttaaaaat attttggaaa tgatttgcab ggaagccatg tgtaaaacca 13155  
 tgacatccac ttggaggatg caataatgaa gaaaactaca aatttcatg caactagtta 13215  
 tgcattgagt ctatataatg aggattttgc aatactttca ttcatacaca ctactaagt 13275  
 tttacacgat tataattttt tcatagccag cggatcc atg gta ttc gcg ggc ggt 13330  
 Met Val Phe Ala Gly Gly  
 295  
 gga ctt cag cag ggc tct ctc gaa gaa aac atc gac gtc gag cac att 13378  
 Gly Leu Gln Gln Gly Ser Leu Glu Glu Asn Ile Asp Val Glu His Ile  
 300 305 310  
 gcc agt atg tct ctc ttc agc gac ttc ttc agt tat gtg tct tca act 13426  
 Ala Ser Met Ser Leu Phe Ser Asp Phe Phe Ser Tyr Val Ser Ser Thr  
 315 320 325  
 gtt ggt tcg tgg agc gta cac agt ata caa cct ttg aag cgc ctg acg 13474  
 Val Gly Ser Trp Ser Val His Ser Ile Gln Pro Leu Lys Arg Leu Thr  
 330 335 340 345  
 agt aag aag cgt gtt tcg gaa agc gct gcc gtg caa tgt ata tca gct 13522  
 Ser Lys Lys Arg Val Ser Glu Ser Ala Ala Val Gln Cys Ile Ser Ala  
 350 355 360  
 gaa gtt cag aga aat tcg agt acc cag gga act gcg gag gca ctc gca 13570  
 Glu Val Gln Arg Asn Ser Ser Thr Gln Gly Thr Ala Glu Ala Leu Ala  
 365 370 375  
 gaa tca gtc gtg aag ccc acg aga cga agg tca tct cag tgg aag aag 13618  
 Glu Ser Val Val Lys Pro Thr Arg Arg Arg Ser Ser Gln Trp Lys Lys  
 380 385 390  
 tcg aca cac ccc cta tca gaa gta gca gta cac aac aag cca agc gat 13666  
 Ser Thr His Pro Leu Ser Glu Val Ala Val His Asn Lys Pro Ser Asp  
 395 400 405  
 tgc tgg att gtt gta aaa aac aag gtg tat gat gtt tcc aat ttt gcg 13714  
 Cys Trp Ile Val Val Lys Asn Lys Val Tyr Asp Val Ser Asn Phe Ala  
 410 415 420 425  
 gac gag cat ccc gga gga tca gtt att agt act tat ttt gga cga gac 13762

10

20

30

40



ttg gag aag gga act gtt ctg ttt cac tac ttt tgg ttc gtc ggg aca 14482  
 Leu Glu Lys Gly Thr Val Leu Phe His Tyr Phe Trp Phe Val Gly Thr  
                   670                                  675                                  680

gog tgc tat ctt ctc cct ggt tgg aag cca tta gta tgg atg gcg gtg 14530  
 Ala Cys Tyr Leu Leu Pro Gly Trp Lys Pro Leu Val Trp Met Ala Val  
                   685                                  690                                  695

act gag ctc atg tcc ggc atg ctg ctg ggc ttt gta ttt gta ctt agc 14578  
 Thr Glu Leu Met Ser Gly Met Leu Leu Gly Phe Val Phe Val Leu Ser  
                   700                                  705                                  710

cac aat ggg atg gag gtt tat aat tcg tct aaa gaa ttc gtg agt gca 14626  
 His Asn Gly Met Glu Val Tyr Asn Ser Ser Lys Glu Phe Val Ser Ala  
                   715                                  720                                  725

10

cag atc gta tcc aca cgg gat atc aaa gga aac ata ttc aac gac tgg 14674  
 Gln Ile Val Ser Thr Arg Asp Ile Lys Gly Asn Ile Phe Asn Asp Trp  
 730                                  735                                  740                                  745

ttc act ggt ggc ctt aac agg caa ata gag cat cat ctt ttc cca aca 14722  
 Phe Thr Gly Gly Leu Asn Arg Gln Ile Glu His His Leu Phe Pro Thr  
                   750                                  755                                  760

atg ccc agg cat aat tta aac aaa ata gca cct aga gtg gag gtg ttc 14770  
 Met Pro Arg His Asn Leu Asn Lys Ile Ala Pro Arg Val Glu Val Phe  
                   765                                  770                                  775

tgt aag aaa cac ggt ctg gtg tac gaa gac gta tct att gct acc ggc 14818  
 Cys Lys Lys His Gly Leu Val Tyr Glu Asp Val Ser Ile Ala Thr Gly  
                   780                                  785                                  790

20

act tgc aag gtt ttg aaa gca ttg aag gaa gtc gcg gag gct gcg gca 14866  
 Thr Cys Lys Val Leu Lys Ala Leu Lys Glu Val Ala Glu Ala Ala Ala  
                   795                                  800                                  805

gag cag cat gct acc acc agt taa gctagcgtta accctgcttt aatgagatat 14920  
 Glu Gln His Ala Thr Thr Ser  
 810                                  815

gcgagacgcc tatgatcgca tgatatttgc tttcaattct gttgtgcacg ttgtaaaaaa 14980

cctgagcatg tbtagctcag atccttaccg ccggtttcgg ttcattctaa tgaatataac 15040

30

accctgtact atcgtatctt tatgaataat attctccggt caatttactg attgtccgtc 15100

gacgaattcg agctcggcgc gcctctagag gatcgatgaa ttcagatcgg ctgagtggct 15160

ccttcaacgt tgcgggtctg tcagttccaa acgtaaaacg gcttgtcccg cgtcatcggc 15220

gggggtcata acgtgactcc cttaattctc cgctcatgat cagattgtcg tttcccgcct 15280

tcagttctaaa ctatcagtgt ttgacaggat atattggcgg gtaaacctaa gagaaaagag 15340

cgtttattag aataatcgga tatttaaaag ggcgtgaaaa ggtttatcct tcgtccattt 15400

gtatgtgcat gcccaaccaca gggttcccaca 15430

40

<210> 26  
 <211> 290  
 <212> PRT  
 <213> Unknown

<400> 26

Met Glu Val Val Glu Arg Phe Tyr Gly Glu Leu Asp Gly Lys Val Ser  
 1 5 10 15

Gln Gly Val Asn Ala Leu Leu Gly Ser Phe Gly Val Glu Leu Thr Asp  
 20 25 30

Thr Pro Thr Thr Lys Gly Leu Pro Leu Val Asp Ser Pro Thr Pro Ile  
 35 40 45

Val Leu Gly Val Ser Val Tyr Leu Thr Ile Val Ile Gly Gly Leu Leu  
 50 55 60

Trp Ile Lys Ala Arg Asp Leu Lys Pro Arg Ala Ser Glu Pro Phe Leu  
 65 70 75 80

Leu Gln Ala Leu Val Leu Val His Asn Leu Phe Cys Phe Ala Leu Ser  
 85 90 95

Leu Tyr Met Cys Val Gly Ile Ala Tyr Gln Ala Ile Thr Trp Arg Tyr  
 100 105 110

Ser Leu Trp Gly Asn Ala Tyr Asn Pro Lys His Lys Glu Met Ala Ile  
 115 120 125

Leu Val Tyr Leu Phe Tyr Met Ser Lys Tyr Val Glu Phe Met Asp Thr  
 130 135 140

Val Ile Met Ile Leu Lys Arg Ser Thr Arg Gln Ile Ser Phe Leu His  
 145 150 155 160

Val Tyr His His Ser Ser Ile Ser Leu Ile Trp Trp Ala Ile Ala His  
 165 170 175

His Ala Pro Gly Gly Glu Ala Tyr Trp Ser Ala Ala Leu Asn Ser Gly  
 180 185 190

Val His Val Leu Met Tyr Ala Tyr Tyr Phe Leu Ala Ala Cys Leu Arg  
 195 200 205

Ser Ser Pro Lys Leu Lys Asn Lys Tyr Leu Phe Trp Gly Arg Tyr Leu  
 210 215 220

Thr Gln Phe Gln Met Phe Gln Phe Met Leu Asn Leu Val Gln Ala Tyr  
 225 230 235 240

Tyr Asp Met Lys Thr Asn Ala Pro Tyr Pro Gln Trp Leu Ile Lys Ile  
 245 250 255

Leu Phe Tyr Tyr Met Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Gly Asn Phe Tyr  
 260 265 270

10

20

30

40

Val Gln Lys Tyr Ile Lys Pro Ser Asp Gly Lys Gln Lys Gly Ala Lys  
275 280 285

Thr Glu  
290

<210> 27  
<211> 525  
<212> PRT  
<213> Unknown

<400> 27

Met Val Phe Ala Gly Gly Gly Leu Gln Gln Gly Ser Leu Glu Glu Asn  
1 5 10 15

10

Ile Asp Val Glu His Ile Ala Ser Met Ser Leu Phe Ser Asp Phe Phe  
20 25 30

Ser Tyr Val Ser Ser Thr Val Gly Ser Trp Ser Val His Ser Ile Gln  
35 40 45

Pro Leu Lys Arg Leu Thr Ser Lys Lys Arg Val Ser Glu Ser Ala Ala  
50 55 60

Val Gln Cys Ile Ser Ala Glu Val Gln Arg Asn Ser Ser Thr Gln Gly  
65 70 75 80

Thr Ala Glu Ala Leu Ala Glu Ser Val Val Lys Pro Thr Arg Arg Arg  
85 90 95

20

Ser Ser Gln Trp Lys Lys Ser Thr His Pro Leu Ser Glu Val Ala Val  
100 105 110

His Asn Lys Pro Ser Asp Cys Trp Ile Val Val Lys Asn Lys Val Tyr  
115 120 125

Asp Val Ser Asn Phe Ala Asp Glu His Pro Gly Gly Ser Val Ile Ser  
130 135 140

Thr Tyr Phe Gly Arg Asp Gly Thr Asp Val Phe Ser Ser Phe His Ala  
145 150 155 160

30

Ala Ser Thr Trp Lys Ile Leu Gln Asp Phe Tyr Ile Gly Asp Val Glu  
165 170 175

Arg Val Glu Pro Thr Pro Glu Leu Leu Lys Asp Phe Arg Glu Met Arg  
180 185 190

Ala Leu Phe Leu Arg Glu Gln Leu Phe Lys Ser Ser Lys Leu Tyr Tyr  
195 200 205

Val Met Lys Leu Leu Thr Asn Val Ala Ile Phe Ala Ala Ser Ile Ala  
210 215 220

Ile Ile Cys Trp Ser Lys Thr Ile Ser Ala Val Leu Ala Ser Ala Cys  
225 230 235 240

40

Met Met Ala Leu Cys Phe Gln Gln Cys Gly Trp Leu Ser His Asp Phe  
 245 250 255

Leu His Asn Gln Val Phe Glu Thr Arg Trp Leu Asn Glu Val Val Gly  
 260 265 270

Tyr Val Ile Gly Asn Ala Val Leu Gly Phe Ser Thr Gly Trp Trp Lys  
 275 280 285

Glu Lys His Asn Leu His His Ala Ala Pro Asn Glu Cys Asp Gln Thr  
 290 295 300

Tyr Gln Pro Ile Asp Glu Asp Ile Asp Thr Leu Pro Leu Ile Ala Trp  
 305 310 315 320

Ser Lys Asp Ile Leu Ala Thr Val Glu Asn Lys Thr Phe Leu Arg Ile  
 325 330 335

Leu Gln Tyr Gln His Leu Phe Phe Met Gly Leu Leu Phe Phe Ala Arg  
 340 345 350

Gly Ser Trp Leu Phe Trp Ser Trp Arg Tyr Thr Ser Thr Ala Val Leu  
 355 360 365

Ser Pro Val Asp Arg Leu Leu Glu Lys Gly Thr Val Leu Phe His Tyr  
 370 375 380

Phe Trp Phe Val Gly Thr Ala Cys Tyr Leu Leu Pro Gly Trp Lys Pro  
 385 390 395 400

Leu Val Trp Met Ala Val Thr Glu Leu Met Ser Gly Met Leu Leu Gly  
 405 410 415

Phe Val Phe Val Leu Ser His Asn Gly Met Glu Val Tyr Asn Ser Ser  
 420 425 430

Lys Glu Phe Val Ser Ala Gln Ile Val Ser Thr Arg Asp Ile Lys Gly  
 435 440 445

Asn Ile Phe Asn Asp Trp Phe Thr Gly Gly Leu Asn Arg Gln Ile Glu  
 450 455 460

His His Leu Phe Pro Thr Met Pro Arg His Asn Leu Asn Lys Ile Ala  
 465 470 475 480

Pro Arg Val Glu Val Phe Cys Lys Lys His Gly Leu Val Tyr Glu Asp  
 485 490 495

Val Ser Ile Ala Thr Gly Thr Cys Lys Val Leu Lys Ala Leu Lys Glu  
 500 505 510

Val Ala Glu Ala Ala Ala Glu Gln His Ala Thr Thr Ser  
 515 520 525

10

20

30

<210> 28  
 <211> 17752

<212> DNA  
<213> Unknown

<220>

<223> pflanz. Expressionsvektor mit 3  
Promotor-Terminator- Expressionskassetten  
inseriert mit Physcomitrella Elongase + Desaturase  
+ Phaeodactylum Desaturase

<220>

<221> CDS

<222> (11543)..(12415)

10

<220>

<221> CDS

<222> (13313)..(14890)

<220>

<221> CDS

<222> (15791)..(17200)

<400> 28

gatctggcgc cggccagcga gacgagcaag attggccgcc gcccgaaacg atccgacagc 60  
gccccagca caggtgcgca ggcaaattgc accaacgcat acagcgccag cagaatgcc 120  
tagtggggcg tgacgtcgtt cgagtgaacc agatcgcgca ggaggcccg cagcaccggc 180  
ataatcaggc cgatgccgac agcgtcgagc gcgacagtgc tcagaattac gatcaggggt 240  
atggtgggtt tcacgtctgg cctccggacc agcctccgct ggtccgattg aacgcgcgga 300  
ttctttatca ctgataagtt ggtggacata ttatgtttat cagtgataaa gtgtcaagca 360  
tgacaaaagtt gcagccgaat acagtgatcc gtgccgccct ggacctgttg aacgaggtcg 420  
gcgtagacgg tctgacgaca cgaaactgg cggaacgggtt gggggttcag cagccggcgc 480  
tttactggca cttcaggaac aagcggggcg tgcctgacgc actggccgaa gccatgctgg 540  
cggagaatca tacgcattcg gtgccgagag ccgacgacga ctggcgctca tttctgatcg 600  
ggaatgcccg cagcttcagg caggcgtgc tcgcctaccg cgatggcgcg cgcattccatg 660  
ccggcacgcg accggggcgca ccgcagatgg aaacggccga cgcgcagctt cgcttcctct 720  
gcgaggcggg tttttcggcc ggggacgccc tcaatgcgct gatgacaatc agctacttca 780  
ctggtggggc cgtgcttgag gagcaggccg ggcacagcga tgccggcgag cgcggcggca 840  
ccgttgaaca ggctccgctc tcgccgctgt tgcgggcccg gatagacgcc ttcgacgaag 900  
ccggtccgga cgcagcgttc gagcaggggac tcgcggtgat tgtcgatgga ttggcgaaaa 960  
ggaggctcgt tgtcaggaac gttgaaggac cgagaaaggg tgacgattga tcaggaccgc 1020  
tgccggagcg caaccactc actacagcag agccatgtag acaacatccc ctcccccttt 1080

20

30

40

ccaccgctc agacgcccgt agcagcccgc tacgggcttt ttcattgcctt gccctagcgt 1140  
ccaagcctca cggccgcgct cggcctctct gggggccttc tggcgtcttt ccgcttcctc 1200  
gctcactgac tgcctgcgct cggctgctcg gctgcggcga gcggtatcag ctcactcaaa 1260  
ggcggtaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa 1320  
aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgttg ctggcgcttt tccataggct 1380  
ccgccccctt gacgagcctc acaaaaatcg acgctcaagt cagaggctggc gaaacccgac 1440  
aggactataa agataaccagg cgtttccccc tgggaagctcc ctctgtcgct ctctgttcc 1500  
gaccctgccc cttaccggat acctgtccgc ctttctccct tcgggaagcg tggcgctttt 1560  
ccgctgcata acctgcttc ggggtcatta tagcgatttt ttcggtatat ccatcctttt 1620  
tcgcacgata tacaggattt tgccaaaggg ttcgtgtaga ctttcttgg tgtatccaac 1680  
ggcgtcagcc gggcaggata ggtgaagtag gccaccgcg gagcgggtgt tcttcttca 1740  
ctgtccctta ttgcacctg gcgggtctca acgggaatcc tgctctgcga ggctggccgy 1800  
ctaccgcccg cgtaacagat gagggaagc ggatggctga tgaaccaag ccaaccagga 1860  
agggcagccc acctatcaag gtgtactgcc ttccagacga acgaagagcg attgaggaaa 1920  
agggcgccgc ggcggcatg agcctgtcgg cctacctgct ggccgtcggc cagggtaca 1980  
aatcacggg cgtcgtggac tatgagcag tccgcagct gccccgcctc aatggcgacc 2040  
tggccgcctt gggcggcctg ctgaaactct ggctcaccga cgaccgcgc accggcgggt 2100  
tcggtgatgc cactatctc gccctgctgg cgaagatoga agagaagcag gacgagcttg 2160  
gcaaggctat gatgggcgtg gtccgcccga gggcagagcc atgacttttt tagccgctaa 2220  
aacggccggg ggggtgcgct gattgccaaag cacgtcccca tgcgctccat caagaagagc 2280  
gacttcgccc agctggtgaa gtacatcacc gacgagcaag gcaagaccga gcgcctttgc 2340  
gacgtcacc gggctgggtg ccctcgcgc tgggtggcg gccgtctatg gccctgcaa 2400  
cgcgccagaa accgcgtcga agccgtgtgc gagacaccgc gcccgccgc gttgtggata 2460  
cctcgggaa aacttggccc tcaactgacag atgagggcg gacgttgaca cttgagggc 2520  
cgactcacc ggcgcggcgt tgacagatga ggggcaggct cgatttcggc cggcgacgtg 2580  
gagctggcca gcctcgcaa tgggcgaaa cgcctgattt tacgagagt tccacagat 2640  
gatgtggaca agcctgggga taagtgcctt gcggtattga cacttgagg gcgcgactac 2700  
tgacagatga ggggcgcgat ccttgacct tgagggcag agtgctgaca gatgagggc 2760  
gcacctattg acatttgagg ggctgtccac aggcagaaaa tccagcattt gcaagggtt 2820

10

20

30

40

cogccccgttt ttccggccacc gctaacctgt cttttaacct gottttaaac caatatttat 2880  
 aaaccttggt ttttaaccagg gctgcgccct gtgcgcgtga ccgcgcacgc cgaagggggg 2940  
 tgcccccct tctcgaaccc tcccggccc ctaacgcggg cctcccatcc ccccaggggc 3000  
 tgcgccccctc ggccgcgaac ggcctcacc caaaaatggc agcgctggca gtccttgcca 3060  
 ttgccgggat cggggcagta acgggatggg cgatcagccc gagcgcgacg cccggaagca 3120  
 ttgacgtgcc gcaggtgctg gcacgcacat tcagcgacca ggtgccgggc agtgagggcg 3180  
 ggggcctggg tggcggcctg ccttcaactt cggcgcctgg ggcattcaag gacttcatgg 3240  
 cggggccggc aatttttacc ttgggcattc ttggcatagt ggtcgcgggt gccgtgctcg 3300  
 tgttcggggg tgcgataaac ccagcgaacc atttgagtg ataggtaaaga ttataccgag 3360  
 gtatgaaaac gagaattgga cctttacaga attactctat gaagcgccat atttaaaaag 3420  
 ctaccaagac gaagaggatg aagaggatga ggaggcagat tgccttgaat atattgacaa 3480  
 tactgataag ataatatatc ttttatatag aagatatcgc cgtatgtaag gatttcaggg 3540  
 ggcaaggcat aggcagcgcg ctatcaata tatctataga atgggcaaag cataaaaact 3600  
 tgcattggact aatgcttgaa acccaggaca ataaccttat agcttgtaa ttctatcata 3660  
 attgggtaat gactccaact tattgatagt gttttatggt cagataatgc ccgatgactt 3720  
 tgtcatgcag ctccaaccgat tttgagaacg acagcgactt ccgtcccagc cgtgccaggt 3780  
 gctgcctcag attcaggtta tgcgcgtcaa ttccgtcgt atatcgcttg ctgattacgt 3840  
 gcagctttcc cttcaggcgg gattcataca gggccagcc atccgtcacc catatcacca 3900  
 cgtcaaaggg tgacagcagg ctcataagac gcccagcgt cgcataagtg cgttcaccga 3960  
 atacgtgogc aacaaccgtc ttccggagac tgtcatabgc gtaaaacagc cagcgctggc 4020  
 gcgatttagc ccgacatag cccactggt cgtccatttc cgcgcagacg atgacgtcac 4080  
 tgcccggtg tatgcgcgag gttaccgact gcggcctgag ttttttaagt gacgtaaaat 4140  
 cgtggtgagg ccaaogccca taatgcgggc tgttgcctgg catccaacgc cattcatggc 4200  
 catatcaatg attttctggt gcgtaccggg ttgagaagcg gtgtaagtga actgcagttg 4260  
 ccattgtttta ggcagtgag agcagagata gcgctgatgt ccggcgggtc ttttgccgtt 4320  
 acgcaccacc ccgtcagtag ctgaacagga gggacagctg atagacacag aagccactgg 4380  
 agcaacctcaa aaacaccatc atacactaaa tcagtaagtt ggcagcatca ccataattg 4440  
 tggtttcaaa atcggctccg tcgatactat gttatacgcc aactttgaaa acaactttga 4500  
 aaaagctggt ttctgggtatt taaggtttta gaatgcaagg aacagtgaat tggagttcgt 4560

10

20

30

40

cttgttataa ttagcttctt ggggtatctt taaatactgt agaaaagagg aaggaaataa 4620  
 taaatggcta aaatgagaat atcacdggaa ttgaaaaaac tgatcgaaaa ataccgctgc 4680  
 gtaaaagata cggaaggaat gtctcctgct aaggatata agctgggggg agaaaatgaa 4740  
 aacctatatt taaaaatgac ggacagccgg tataaaggga ccacctatga tgtggaacgg 4800  
 gaaaaggaca tgatgctatg gctggaagga aagctgcctg ttccaaaggc cctgcacttt 4860  
 gaacggcatg atggctggag caatctgctc atgagtgagg ccgatggcgt cctttgctcg 4920  
 gaagagtatg aagatgaaca aagccctgaa aagattatcg agctgtatgc ggagtgcac 4980  
 aggctctttc actccatoga catatcggat tgtccctata cgaatagctt agacagccgc 5040  
 ttagccgaat tggattactt actgaataac gatctggccg atgtggattg cgaaaactgg 5100  
 gaagaagaca ctccatttaa agatccgccc gagctgtatg attttttaa gacggaaaag 5160  
 cccgaagagg aacttgtctt ttcccacggc gacctgggag acagcaacat ctttgtgaaa 5220  
 gatggcaaag taagtggctt tattgatctt gggagaagcg gcagggcggg caagtggat 5280  
 gacattgctt tctgctccg gtcgatcagg gaggatatcg ggaagaaca gtatgtcgag 5340  
 ctatTTTTTg acttactggg gatcaagcct gattgggaga aaataaaata ttatatttta 5400  
 ctggatgaat tgttttagta cctagatgtg ggcacaagat gccggcgaca agcaggagcg 5460  
 caccgacttc ttccgcatca agtgTTTTTg ctctcaggcc gaggcccacg gcaagtattt 5520  
 gggcaagggg tcgctggat tcgtgcaggg caagattcgg aataccaagt acgagaagga 5580  
 cggccagacg gtctacggga ccgacttcat tgccgataag gtggattatc tggacaccaa 5640  
 ggcaccaggg ggtcaaatc aggaataagg gcacattgcc ccggcgtgag tcggggcaat 5700  
 cccgaagga ggtgaaatga atcggacgct tgaccggaag gcatacaggc aagaactgat 5760  
 cgacgggggg ttttccgccc aggatgccga aaccatcgca agccgcaccg tcatgctgctc 5820  
 gccccgcaa accttccagt ccgtcggctc gatggctcag caagctacgg ccaagatoga 5880  
 ggcgacagc gtgcaactgg ctccccctgc cctgccccgg ccacggcccg ccgtggagcg 5940  
 ttccgctcgt ctgcaacagg aggcggcagg tttggcgaag tcgatgacca tcgacacgct 6000  
 aggaactatg acgaccaaga agcgaaaaac ccgcggcgag gacctggcaa aacaggtcag 6060  
 cgaggccaag caggccgctg tgctgaaaca cacgaagcag cagatcaagg aaatgcagct 6120  
 ttctttgttc gatattgctc cgtggccgga cacgatgca gcatgcca acgacacggc 6180  
 ccgctctgcc ctgttcacca cgcgcaaaa gaaaatccc cgcgagggcg tcgaaaacaa 6240  
 ggtcattttc cagctcaaca aggacgtgaa gatcacctac accggcgtcg agctggggc 6300

10

20

30

40

cgacgatgac gaactgggtgt ggcagcaggt gttggagtac gcgaagcgca cccctatcgg 6360  
cgagccgatc accttcacgt tctacgagct ttgccaggac ctgggctgggt cgatcaatgg 6420  
ccggtactac acgaaggccg aggaatgcct gtccgcctca caggcgcacgg cgatgggctt 6480  
cacgtccgac cgcggtgggc acctggaatc ggtgtcgtg ctgcaccgct tccgcgtcct 6540  
ggaccgtggc aagaaaacgt cccggtgcc a ggtcctgac gacgaggaaa tcgtcgtgct 6600  
gtttgctggc gaccactaca cgaaatccat atgggagaag taccgcaagc tgtcccgac 6660  
ggcccgcagc atgttcgact atttcagctc gcaccgggag ccgtaccgc tcaagctgga 6720  
aaccttcgc ctcatgtgcy gatcggattc caccgcgctg aagaagtggc gcgagcaggt 6780  
cggcgaagcc tgcgaagagt tgcgaggcag cggcctggtg gaacacgcct gggccaatga 6840  
tgacctgggt cattgcaaac gctagggcct tgtggggtca gttccggctg ggggttcagc 6900  
agccagcgtc ttactggcat ttcaggaaca agcgggcact gctcgacgca cttgcttcgc 6960  
tcagtatcgc tggggacgca cggcgcgctc tacgaactgc cgataaacag aggattaaaa 7020  
ttgacaattg tgattaagc tcagattcga cggcttggag cggccgacgt gcaggatttc 7080  
cgcgagatcc gattgtcgc cctgaagaaa gctccagaga tgttcgggtc cgtttacgag 7140  
caccaggaga aaaagcccat ggaggcgttc gctgaacggg tgcgagatgc cgtggcattc 7200  
ggcgcctaca tcgacggcga gatcattggg ctgtcggctc tcaaacagga ggacggccc 7260  
aaggacgctc acaaggcgca tctgtccggc gttttcgtgg agcccgaaca gcgaggccga 7320  
ggggtcgcgc gtatgctgct gcgggogttg ccggcgggtc tattgctcgt gatgatcgtc 7380  
cgacagatc caacgggaat ctgggtgatg cgcatttca tccctggcgc acttaatt 7440  
tcgctattct ggagcttgtt gtttatttcg gtctaccgcc tgcggggcgg ggtcgcggcg 7500  
acggtaggog ctgtgcagcc gctgatggtc gtgttcact ctgcgcctct gctaggtagc 7560  
ccgatacgat tgatggcggc cctgggggct atttggggaa ctgcccggct ggcgctgttg 7620  
gtgttgacac caaacgcagc gctagatcct gtcggcgtcg cagcgggctt ggcggggcgg 7680  
gtttccatgg cgttcggaac cgtgctgacc cgaagtggc aacctccgt gcctctgctc 7740  
acctttaccg cctggcaact ggcggccgga ggactctcgc tcggttcagt agctttagt 7800  
ttgatccgc caatccgat gcctacagga accaatgttc tggcctggc gtggctcggc 7860  
ctgatcggag cgggttbaac ctacttcctc tggttccggg ggatctcgc actcgaacct 7920  
acagttgttt ctttactggg ctttctcagc ccagatctg gggctgatca gccggggatg 7980  
catcaggccg acagtcggaa cttcgggtcc ccgacctgta ccattcggtg agcaatggat 8040

10

20

30

40

aggggagttg atatcgtcaa cgttcacttc taaagaaata ggcactca gcttctcag 8100  
 cggctttatc cagcgatttc ctattatgtc ggcatagttc tcaagatcga cagcctgtca 8160  
 cggttaagcg agaaatgaat aagaaggctg ataattcgga tctctgcgag ggagatgata 8220  
 tttgatcaca ggcagcaacg ctctgtcctc gttacaatca acatgotacc ctccgcgaga 8280  
 tcacccgtgt ttcaaaccog gcagcttagt tgccgttctt cogaatagca tcggtaacat 8340  
 gagcaaagtc tgccgcctta caacggctct cccgctgacg ccgtcccgga ctgatgggct 8400  
 gcctgtatcg agtgggtgatt ttgtgccgag ctgccggctg gggagctgtt ggctggctgg 8460 10  
 tggcaggata tattgtggtg taaacaaatt gacgcttaga caacttaata acacattgag 8520  
 gacgttttta atgtactggg gtggtttttc tttcaccag tgagacgggc aacagctgat 8580  
 tgcccttcac cgcctggccc tgagagagtt gcagcaagcg gtccacgctg gtttgcccca 8640  
 gcagggcгаа atcctgtttg atgggtggtc cgaatcggc aaaatccctt ataaatcaaa 8700  
 agaatagccc gagatagggt tgagtgtgtg tccagtttg aacaagagtc cactattaa 8760  
 gaacgtggac tccaacgtca aagggcgaaa aaccgtctat cagggcgatg gccactacg 8820  
 tgaacatca cccaaatcaa gtttttggg gtcgaggtgc cgtaaagcac taaatcggaa 8880 20  
 ccctaaaggg agccccgat ttagagcttg acggggaaag cggcgaaag tggcgagaaa 8940  
 ggaagggag aaagcgaaag gagcggggc cattcaggct gcgcaactgt tgggaagggc 9000  
 gatcgggtgag ggcctcttcg ctattacgcc agctggcgaa agggggatgt gctgcaaggc 9060  
 gattaagttg ggtaacgcca gggttttccc agtcacgacg ttgtaaaacg acggcoagtg 9120  
 aattaattcc catcttgaaa gaaatatagt taaatattt attgataaaa taacaagtca 9180  
 ggtattatag tccaagcaaa aacataaatt tattgatgca agtttaatt cagaaatatt 9240  
 tcaataactg attatatcag ctggtacatt gccgtagatg aaagactgag tggatatta 9300  
 tgcgtaatac ataaattgat gatatagcta gcttagctca tcgggggagc cgtcgaagct 9360 30  
 agcttgggtc ccgctcagaa gaactogtca agaaggcgat agaaggcgat gcgctgcgaa 9420  
 tcgggagcgg cgataccgta aagcaagagg aagcggtcag cccattcgcc gccaaagctct 9480  
 tcagcaatat cacgggtagc caacgctatg tccgtatagc ggtccgccac acccagccgg 9540  
 ccacagtcga tgaatccaga aaagcggcca tttccacca tgatattcgg caagcaggca 9600  
 tcgccatggg tcacgacgag atcctcgccg tcgggcatgc gcgccttgag cctggcgaac 9660  
 agttcggctg gcgcgagccc ctgatgctct tegtccagat catcctgatc gacaagaccg 9720  
 gcttccatcc gagtacgtgc tcgctcgatg cgatgtttcg cttgggtggc gaatgggcag 9780 40

gtagccggat caagcgtatg cagccgccgc attgcatcag ccatgatgga tactttctcg 9840  
 gcaggagcaa ggtgagatga caggagatcc tgccccggca cttcgcccaa tagcagccag 9900  
 tcccttcccg cttcagtgac aacgtcagc acagctgcgc aaggaaogcc cgtcgtggcc 9960  
 agccacgata gccgcgctgc ctgcctctgc agttcattca gggcacogga caggtcggtc 10020  
 ttgacaaaaa gaaccgggcg cccctgcgct gacagccgga acacggcggc atcagagcag 10080  
 ccgattgtct gttgtgccca gtcatagccc aatagcctct ccaccaagc ggccggagaa 10140  
 cctgcgtgca atccatcttg ttcaatccaa gctcccattg gccctcgact agagtcgaga 10200  
 tctggattga gagtgaatat gagactctaa ttggataccg aggggaatth atggaacgic 10260  
 agtggagcat ttttgacaag aatatttgc tagctgatag tgaccttagg cgacttttga 10320  
 acgcgcaata atggttctcg acgtatgtgc ttagctcatt aaactccaga aaccgcggc 10380  
 tgagtggctc cttcaacgth ggggttctgt cagttccaaa cgtaaaacgg cttgtcccgc 10440  
 gtcacggcgc ggggtcataa cgtgactccc ttaattctcc gtcacatgc ttgatcccct 10500  
 gcgccatcag atccttggcg gcaagaaagc catccagttt actttgcagg gcttcccaac 10560  
 cttaccagag ggggccccag ctggcaatc cggttcgtt gctgtccata aaaccgcca 10620  
 gtctagctat cggcatgtaa gccactgca agctacctgc tttctctttg cgttcgctt 10680  
 tccccttgc cagatagccc agtagctgac attcatccgg ggtcagcacc gtttctgagg 10740  
 actggcttcc tacgtgttcc gcttcttta gcagccctg cgccctgagt gcttgcggca 10800  
 gcgtgaagct tgcacgctg caggtcgacg gcgcgccgag ctctcagac aaatttacac 10860  
 attgccacta aacgtctaaa ccttgtaat ttgtttttgt ttactatgt gtgttatgta 10920  
 tttgatttgc gataaatttt tatatttggc actaaattta taacacctt tatgctaacg 10980  
 tttgccaaca cttagcaatt tgcaagtga ttaattgatt ctaaattatt tttgtcttct 11040  
 aaatacatat actaatcaac tggaaatgta aatatttgc aatatttcta ctataggaga 11100  
 attaaagtga gtgaatatgg taccacaagg tttggagatt caattgttgc aatgctgcat 11160  
 ggatggcata tacaccaaac attcaataat tcttgaggat aataatggta ccacacaaga 11220  
 tttgaggtgc atgaacgtca cgtggacaaa aggttttagta atttttcaag acaacaatgt 11280  
 taccacacac aagttttgag gtgcatgcat ggatgcctg tggaaagttt aaaaatattt 11340  
 tggaaatgat ttgcatggaa gccatgtgta aaaccatgac atccacttgg aggatgcaat 11400  
 aatgaagaaa actacaaatt tacatgcaac tagttatgca tgtagtctat ataatgagga 11460  
 ttttgcaata ctttcattca tacacactca ctaagtttta cacgattata atttcttcat 11520

10

20

30

40

agccagccca ccgcggtgga aa atg gag gtc gtg gag aga ttc tac ggt gag	11572	
Met Glu Val Val Glu Arg Phe Tyr Gly Glu		
1 5 10		
ttg gat ggg aag gtc tcg cag ggc gtg aat gca ttg ctg ggt agt ttc	11620	
Leu Asp Gly Lys Val Ser Gln Gly Val Asn Ala Leu Leu Gly Ser Phe		
15 20 25		
ggg gtg gag ttg acg gat acg ccc act acc aaa ggc ttg ccc ctc gtt	11668	
Gly Val Glu Leu Thr Asp Thr Pro Thr Thr Lys Gly Leu Pro Leu Val		
30 35 40		
gac agt ccc aca ccc atc gtc ctc ggt gtt tct gta tac ttg act att	11716	
Asp Ser Pro Thr Pro Ile Val Leu Gly Val Ser Val Tyr Leu Thr Ile		10
45 50 55		
gtc att gga ggg ctt ttg tgg ata aag gcc agg gat ctg aaa cgg cgc	11764	
Val Ile Gly Gly Leu Leu Trp Ile Lys Ala Arg Asp Leu Lys Pro Arg		
60 65 70		
gcc tcg gag cca ttt ttg ctc caa gct ttg gtg ctt gtg cac aac ctg	11812	
Ala Ser Glu Pro Phe Leu Leu Gln Ala Leu Val Leu Val His Asn Leu		
75 80 85 90		
ttc tgt ttt gcg ctc agt ctg tat atg tgc gtg ggc atc gct tat cag	11860	
Phe Cys Phe Ala Leu Ser Leu Tyr Met Cys Val Gly Ile Ala Tyr Gln		
95 100 105		
gct att acc tgg cgg tac tct ctc tgg ggc aat gca tac aat cct aaa	11908	20
Ala Ile Thr Trp Arg Tyr Ser Leu Trp Gly Asn Ala Tyr Asn Pro Lys		
110 115 120		
cat aaa gag atg gcg att ctg gta tac ttg ttc tac atg tct aag tac	11956	
His Lys Glu Met Ala Ile Leu Val Tyr Leu Phe Tyr Met Ser Lys Tyr		
125 130 135		
gtg gaa ttc atg gat acc gtt atc atg ata ctg aag cgc agc acc agg	12004	
Val Glu Phe Met Asp Thr Val Ile Met Ile Leu Lys Arg Ser Thr Arg		
140 145 150		
caa ata agc ttc ctc cac gtt tat cat cat tct tca att tcc ctc att	12052	
Gln Ile Ser Phe Leu His Val Tyr His His Ser Ser Ile Ser Leu Ile		
155 160 165 170		30
tgg tgg gct att gct cat cac gct cct ggc ggt gaa gca tat tgg tct	12100	
Trp Trp Ala Ile Ala His His Ala Pro Gly Gly Glu Ala Tyr Trp Ser		
175 180 185		
ggc gct ctg aac tca gga gtg cat gtt ctc atg tat gcg tat tac ttc	12148	
Ala Ala Leu Asn Ser Gly Val His Val Leu Met Tyr Ala Tyr Tyr Phe		
190 195 200		
ttg gct gcc tgc ctt cga agt agc cca aag tta aaa aat aag tac ctt	12196	
Leu Ala Ala Cys Leu Arg Ser Ser Pro Lys Leu Lys Asn Lys Tyr Leu		
205 210 215		
ttt tgg ggc agg tac ttg aca caa ttc caa atg ttc cag ttt atg ctg	12244	40
Phe Trp Gly Arg Tyr Leu Thr Gln Phe Gln Met Phe Gln Phe Met Leu		

220 225 230

aac tta gtg cag gct tac tac gac atg aaa acg aat gcg cca tat cca 12292  
 Asn Leu Val Gln Ala Tyr Tyr Asp Met Lys Thr Asn Ala Pro Tyr Pro  
 235 240 245 250

caa tgg ctg atc aag att ttg ttc tac tac atg atc tcg ttg ctg ttt 12340  
 Gln Trp Leu Ile Lys Ile Leu Phe Tyr Tyr Met Ile Ser Leu Leu Phe  
 255 260 265

ctt ttc ggc aat ttt tac gta caa aaa tac atc aaa ccc tct gac gga 12388  
 Leu Phe Gly Asn Phe Tyr Val Gln Lys Tyr Ile Lys Pro Ser Asp Gly  
 270 275 280

aag caa aag gga gct aaa act gag tga tctagaaggc ctctgcttt 12435  
 Lys Gln Lys Gly Ala Lys Thr Glu  
 285 290

aatgagatat gcgagacgcc tatgatcgca tgatatttgc tttcaattct gttgtgcacg 12495

ttgtaaaaaa cctgagcatg tgtagctcag atccttaccg ccggtttcgg ttcattctaa 12555

tgaatatatc acccgttact atcgtatttt tatgaataat attctccggt caatttactg 12615

attgtccgtc gagcaaattt acacattgcc actaaacgtc taaacccttg taatttgttt 12675

ttgttttact atgtgtgtta tgtatttgat ttgcgataaa tttttatatt tgggtactaaa 12735

tttataacac cttttatgct aacgtttgcc aacacttagc aatttgcaag ttgattaatt 12795

gattotaaat tatttttgc tctaaatac atatactaata caactggaaa tgtaaatatt 12855

tgctaataatt totactatag gagaattaaa gtgagtgaat atggtaccac aagggttgga 12915

gatttaattg ttgcaatgct gcatggatgg catatacacg aaacattcaa taattcttga 12975

ggataataat ggtaccacac aagatttgag gtgcatgaac gtcacgtgga caaaaggttt 13035

agtaattttt caagacaaca atgttaccac acacaagttt tgaggtgcat gcatggatgc 13095

cctgtggaaa gtttaaaaat attttgaaa tgatttgc atggaagccatg tgtaaaacca 13155

tgacatccac ttggaggatg caataatgaa gaaaactaca aatttacatg caactagtta 13215

tgcatgtagt ctatataatg aggattttgc aatactttca ttcatacaca ctactaagt 13275

tttacacgat tataatttct tcatagccag cggatcc atg gta ttc gcg ggc ggt 13330  
 Met Val Phe Ala Gly Gly  
 295

gga ctt cag cag ggc tct ctc gaa gaa aac atc gac gtc gag cac att 13378  
 Gly Leu Gln Gln Gly Ser Leu Glu Glu Asn Ile Asp Val Glu His Ile  
 300 305 310

gcc agt atg tct ctc ttc agc gac ttc ttc agt tat gtg tct tca act 13426  
 Ala Ser Met Ser Leu Phe Ser Asp Phe Phe Ser Tyr Val Ser Ser Thr  
 315 320 325

10

20

30

ggt ggt tgc tgg agc gta cac agt ata caa cct ttg aag cgc ctg acg	13474	
Val Gly Ser Trp Ser Val His Ser Ile Gln Pro Leu Lys Arg Leu Thr		
330 335 340 345		
agt aag aag cgt gtt tgc gaa agc gct gcc gtg caa tgt ata tca gct	13522	
Ser Lys Lys Arg Val Ser Glu Ser Ala Ala Val Gln Cys Ile Ser Ala		
350 355 360		
gaa gtt cag aga aat tgc agt acc cag gga act gcg gag gca ctc gca	13570	
Glu Val Gln Arg Asn Ser Ser Thr Gln Gly Thr Ala Glu Ala Leu Ala		
365 370 375		
gaa tca tgc gtg aag ccc acg aga cga agg tca tct cag tgg aag aag	13618	10
Glu Ser Val Val Lys Pro Thr Arg Arg Arg Ser Ser Gln Trp Lys Lys		
380 385 390		
tgc aca cac ccc cta tca gaa gta gca gta cac aac aag cca agc gat	13666	
Ser Thr His Pro Leu Ser Glu Val Ala Val His Asn Lys Pro Ser Asp		
395 400 405		
tgc tgg att gtt gta aaa aac aag gtg tat gat gtt tcc aat ttt gcg	13714	
Cys Trp Ile Val Val Lys Asn Lys Val Tyr Asp Val Ser Asn Phe Ala		
410 415 420 425		
gac gag cat ccc gga gga tca gtt att agt act tat ttt gga cga gac	13762	
Asp Glu His Pro Gly Gly Ser Val Ile Ser Thr Tyr Phe Gly Arg Asp		
430 435 440		
ggc aca gat gtt ttc tct agt ttt cat gca gct tct aca tgg aaa att	13810	20
Gly Thr Asp Val Phe Ser Ser Phe His Ala Ala Ser Thr Trp Lys Ile		
445 450 455		
ctt caa gac ttt tac att ggt gac gtg gag agg gtg gag ccg act cca	13858	
Leu Gln Asp Phe Tyr Ile Gly Asp Val Glu Arg Val Glu Pro Thr Pro		
460 465 470		
gag ctg ctg aaa gat ttc cga gaa atg aga gct ctt ttc ctg agg gag	13906	
Glu Leu Leu Lys Asp Phe Arg Glu Met Arg Ala Leu Phe Leu Arg Glu		
475 480 485		
caa ctt ttc aaa agt tgc aaa ttg tac tat gtt atg aag ctg ctc acg	13954	30
Gln Leu Phe Lys Ser Ser Lys Leu Tyr Tyr Val Met Lys Leu Leu Thr		
490 495 500 505		
aat gtt gct att ttt gct gcg agc att gca ata ata tgt tgg agc aag	14002	
Asn Val Ala Ile Phe Ala Ala Ser Ile Ala Ile Ile Cys Trp Ser Lys		
510 515 520		
act att tca gcg gtt ttg gct tca gct tgt atg atg gct ctg tgt ttc	14050	
Thr Ile Ser Ala Val Leu Ala Ser Ala Cys Met Met Ala Leu Cys Phe		
525 530 535		
caa cag tgc gga tgg cta tcc cat gat ttt ctc cac aat cag gtg ttt	14098	
Gln Gln Cys Gly Trp Leu Ser His Asp Phe Leu His Asn Gln Val Phe		
540 545 550		
gag aca cgc tgg ctt aat gaa gtt gtc ggg tat gtg atc ggc aac gcc	14146	40
Glu Thr Arg Trp Leu Asn Glu Val Val Gly Tyr Val Ile Gly Asn Ala		

555	560	565	
ggt ctg ggg ttt agt aca ggg tgg tgg aag gag aag cat aac ctt cat			14194
Val Leu Gly Phe Ser Thr Gly Trp Trp Lys Glu Lys His Asn Leu His			
570	575	580	585
cat gct gct cca aat gaa tgc gat cag act tac caa cca att gat gaa			14242
His Ala Ala Pro Asn Glu Cys Asp Gln Thr Tyr Gln Pro Ile Asp Glu			
	590	595	600
gat att gat act ctc ccc ctc att gcc tgg agc aag gac ata ctg gcc			14290
Asp Ile Asp Thr Leu Pro Leu Ile Ala Trp Ser Lys Asp Ile Leu Ala			
	605	610	615
aca gtt gag aat aag aca ttc ttg cga atc ctc caa tac cag cat ctg			14338
Thr Val Glu Asn Lys Thr Phe Leu Arg Ile Leu Gln Tyr Gln His Leu			
	620	625	630
ttc ttc atg ggt ctg tta ttt ttc gcc cgt ggt agt tgg ctc ttt tgg			14386
Phe Phe Met Gly Leu Leu Phe Phe Ala Arg Gly Ser Trp Leu Phe Trp			
	635	640	645
agc tgg aga tat acc tct aca gca gtg ctc tca cct gtc gac agg ttg			14434
Ser Trp Arg Tyr Thr Ser Thr Ala Val Leu Ser Pro Val Asp Arg Leu			
	650	655	660
ttg gag aag gga act gtt ctg ttt cac tac ttt tgg ttc gtc ggg aca			14482
Leu Glu Lys Gly Thr Val Leu Phe His Tyr Phe Trp Phe Val Gly Thr			
	670	675	680
gcg tgc tat ctt ctc cct ggt tgg aag cca tta gta tgg atg gcg gtg			14530
Ala Cys Tyr Leu Leu Pro Gly Trp Lys Pro Leu Val Trp Met Ala Val			
	685	690	695
act gag ctc atg tcc ggc atg ctg ctg ggc ttt gta ttt gta ctt agc			14578
Thr Glu Leu Met Ser Gly Met Leu Leu Gly Phe Val Phe Val Leu Ser			
	700	705	710
cac aat ggg atg gag gtt tat aat tcc tct aaa gaa ttc gtg agt gca			14626
His Asn Gly Met Glu Val Tyr Asn Ser Ser Lys Glu Phe Val Ser Ala			
	715	720	725
cag atc gta tcc aca cgg gat atc aaa gga aac ata ttc aac gac tgg			14674
Gln Ile Val Ser Thr Arg Asp Ile Lys Gly Asn Ile Phe Asn Asp Trp			
	730	735	740
ttc act ggt ggc ctt aac agg caa ata gag cat cat ctt ttc cca aca			14722
Phe Thr Gly Gly Leu Asn Arg Gln Ile Glu His His Leu Phe Pro Thr			
	750	755	760
atg ccc agg cat aat tta aac aaa ata gca cct aga gtg gag gtg ttc			14770
Met Pro Arg His Asn Leu Asn Lys Ile Ala Pro Arg Val Glu Val Phe			
	765	770	775
tgt aag aaa cac ggt ctg gtg tac gaa gac gta tct att gct acc ggc			14818
Cys Lys Lys His Gly Leu Val Tyr Glu Asp Val Ser Ile Ala Thr Gly			
	780	785	790

10

20

30

40

act tgc aag gtt ttg aaa gca ttg aag gaa gtc gcg gag gct gcg gca	14866	
Thr Cys Lys Val Leu Lys Ala Leu Lys Glu Val Ala Glu Ala Ala Ala		
795 800 805		
gag cag cat gct acc acc agt taa gctagcgtta accctgcttt aatgagatat	14920	
Glu Gln His Ala Thr Thr Ser		
810 815		
gcgagacgcc tatgatcgca tgatatttgc tttcaattct gttgtgcacg ttgtaaaaa	14980	
cctgagcatg tgtagctcag atccttaaccg ccggtttcgg ttcattctaa tgaatatatc	15040	
accggttact atcgatcttt tatgaataat attctcogtt caatttactg attgtccgtc	15100	10
gagcaaatc acacattgcc actaaacgtc taaacccttg taatttgttt ttgttttact	15160	
atgtgtgtta tgtatttgat ctgcgataaa tttttatatt tgggtactaaa tttataacac	15220	
cttttatgct aacggtttgcc aacacttagc aatttgcaag ttgattaatt gattctaaat	15280	
tatttttgtc ttctaaatac atatacraat caactggaaa tgtaaataatt tgctaataatt	15340	
tctactatag gagaattaaa gtgagtgaat atggtaccac aagggttgga gatttaattg	15400	
ttgcaatgct gcatggatgg catatacacc aaacattcaa taattcttga ggataataat	15460	
ggtaccacac aagatttgag gtgcatgaac gtcacgtgga caaaaggttt agtaattttt	15520	
caagacaaca atgttaccac acacaagttt tgaggtgcat gcatggatgc cctgtggaaa	15580	20
gtttaaaaat attttgaaa tgatttgc atggaagccatg tgtaaaacca tgacatccac	15640	
ttggaggatg caataatgaa gaaaactaca aatttacatg caactagtta tgcattgtagt	15700	
ctatataatg aggattttgc aatactttca ttcatacaca ctcactaagt tttacacgat	15760	
tataatttct tcatagocag cagatctaaa atg gct ccg gat gcg gat aag ctt	15814	
Met Ala Pro Asp Ala Asp Lys Leu	820 825	
cga caa cgc cag acg act gcg gta gcg aag cac aat gct gct acc ata	15862	
Arg Gln Arg Gln Thr Thr Ala Val Ala Lys His Asn Ala Ala Thr Ile		
830 835 840		30
tcg acg cag gaa cgc ctt tgc agt ctg tct tgc ctc aaa ggc gaa gaa	15910	
Ser Thr Gln Glu Arg Leu Cys Ser Leu Ser Ser Leu Lys Gly Glu Glu		
845 850 855		
gtc tgc atc gac gga atc atc tat gac ctc caa tca ttc gat cat ccc	15958	
Val Cys Ile Asp Gly Ile Ile Tyr Asp Leu Gln Ser Phe Asp His Pro		
860 865 870		
ggg ggt gaa acg atc aaa atg ttt ggt ggc aac gat gtc act gta cag	16006	
Gly Gly Glu Thr Ile Lys Met Phe Gly Gly Asn Asp Val Thr Val Gln		
875 880 885		
tac aag atg att cac ccg tac cat acc gag aag cat ttg gaa aag atg	16054	
Tyr Lys Met Ile His Pro Tyr His Thr Glu Lys His Leu Glu Lys Met		40

890	895	900	905	
aag cgt gtc ggc aag gtg acg gat ttc gtc tgc gag tac aag ttc gat				16102
Lys Arg Val Gly Lys Val Thr Asp Phe Val Cys Glu Tyr Lys Phe Asp				
	910	915	920	
acc gaa ttt gaa cgc gaa atc aaa cga gaa gtc ttc aag att gtg cga				16150
Thr Glu Phe Glu Arg Glu Ile Lys Arg Glu Val Phe Lys Ile Val Arg				
	925	930	935	
cga ggc aag gat ttc ggt acc ttg gga tgg ttc ttc cgt gcg ttt tgc				16198
Arg Gly Lys Asp Phe Gly Thr Leu Gly Trp Phe Phe Arg Ala Phe Cys				
	940	945	950	
tac att gcc att ttc ttc tac ctg cag tac cat tgg gtc acc acg gga				16246
Tyr Ile Ala Ile Phe Phe Tyr Leu Gln Tyr His Trp Val Thr Thr Gly				
	955	960	965	
acc tct tgg ctg ctg gcc gtg gcc tac gga atc tcc caa gcg atg att				16294
Thr Ser Trp Leu Leu Ala Val Ala Tyr Gly Ile Ser Gln Ala Met Ile				
	970	975	980	985
ggc atg aat gtc cag cac gat gcc aac cac ggg gcc acc tcc aag cgt				16342
Gly Met Asn Val Gln His Asp Ala Asn His Gly Ala Thr Ser Lys Arg				
	990	995	1000	
ccc tgg gtc aac gac atg cta gcc ctc ggt gcg gat ttt att ggt ggt				16390
Pro Trp Val Asn Asp Met Leu Gly Leu Gly Ala Asp Phe Ile Gly Gly				
	1005	1010	1015	20
tcc aag tgg ctc tgg cag gaa caa cac tgg acc cac cac gct tac acc				16438
Ser Lys Trp Leu Trp Gln Glu Gln His Trp Thr His His Ala Tyr Thr				
	1020	1025	1030	
aat cac gcc gag atg gat ccc gat agc ttt ggt gcc gaa cca atg ctc				16486
Asn His Ala Glu Met Asp Pro Asp Ser Phe Gly Ala Glu Pro Met Leu				
	1035	1040	1045	
cta ttc aac gac tat ccc ttg gat cat ccc gct cgt acc tgg cta cat				16534
Leu Phe Asn Asp Tyr Pro Leu Asp His Pro Ala Arg Thr Trp Leu His				
	1050	1055	1060	1065
cgc ttt caa gca ttc ttt tac atg ccc gtc ttg gct gga tac tgg ttg				16582
Arg Phe Gln Ala Phe Phe Tyr Met Pro Val Leu Ala Gly Tyr Trp Leu				
	1070	1075	1080	30
tcc gct gtc ttc aat cca caa att ctt gac ctc cag caa cgc ggc gca				16630
Ser Ala Val Phe Asn Pro Gln Ile Leu Asp Leu Gln Gln Arg Gly Ala				
	1085	1090	1095	
ctt tcc gtc ggt atc cgt ctc gac aac gct ttc att cac tcg cga cgc				16678
Leu Ser Val Gly Ile Arg Leu Asp Asn Ala Phe Ile His Ser Arg Arg				
	1100	1105	1110	
aag tat gcg gtt ttc tgg cgg gct gtg tac att gcg gtg aac gtg att				16726
Lys Tyr Ala Val Phe Trp Arg Ala Val Tyr Ile Ala Val Asn Val Ile				
	1115	1120	1125	40



cagggttccc ca

17752

<210> 29  
<211> 290  
<212> PRT  
<213> Unknown

<400> 29

Met Glu Val Val Glu Arg Phe Tyr Gly Glu Leu Asp Gly Lys Val Ser  
1 5 10 15

Gln Gly Val Asn Ala Leu Leu Gly Ser Phe Gly Val Glu Leu Thr Asp  
20 25 30

10

Thr Pro Thr Thr Lys Gly Leu Pro Leu Val Asp Ser Pro Thr Pro Ile  
35 40 45

Val Leu Gly Val Ser Val Tyr Leu Thr Ile Val Ile Gly Gly Leu Leu  
50 55 60

Trp Ile Lys Ala Arg Asp Leu Lys Pro Arg Ala Ser Glu Pro Phe Leu  
65 70 75 80

Leu Gln Ala Leu Val Leu Val His Asn Leu Phe Cys Phe Ala Leu Ser  
85 90 95

Leu Tyr Met Cys Val Gly Ile Ala Tyr Gln Ala Ile Thr Trp Arg Tyr  
100 105 110

20

Ser Leu Trp Gly Asn Ala Tyr Asn Pro Lys His Lys Glu Met Ala Ile  
115 120 125

Leu Val Tyr Leu Phe Tyr Met Ser Lys Tyr Val Glu Phe Met Asp Thr  
130 135 140

Val Ile Met Ile Leu Lys Arg Ser Thr Arg Gln Ile Ser Phe Leu His  
145 150 155 160

Val Tyr His His Ser Ser Ile Ser Leu Ile Trp Trp Ala Ile Ala His  
165 170 175

His Ala Pro Gly Gly Glu Ala Tyr Trp Ser Ala Ala Leu Asn Ser Gly  
180 185 190

30

Val His Val Leu Met Tyr Ala Tyr Tyr Phe Leu Ala Ala Cys Leu Arg  
195 200 205

Ser Ser Pro Lys Leu Lys Asn Lys Tyr Leu Phe Trp Gly Arg Tyr Leu  
210 215 220

Thr Gln Phe Gln Met Phe Gln Phe Met Leu Asn Leu Val Gln Ala Tyr  
225 230 235 240

Tyr Asp Met Lys Thr Asn Ala Pro Tyr Pro Gln Trp Leu Ile Lys Ile  
245 250 255

Leu Phe Tyr Tyr Met Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Gly Asn Phe Tyr

40

260 265 270

Val Gln Lys Tyr Ile Lys Pro Ser Asp Gly Lys Gln Lys Gly Ala Lys  
 275 280 285

Thr Glu  
 290

<210> 30  
 <211> 525  
 <212> PRT  
 <213> Unknown

<400> 30

Met Val Phe Ala Gly Gly Gly Leu Gln Gln Gly Ser Leu Glu Glu Asn  
 1 5 10 15

Ile Asp Val Glu His Ile Ala Ser Met Ser Leu Phe Ser Asp Phe Phe  
 20 25 30

Ser Tyr Val Ser Ser Thr Val Gly Ser Trp Ser Val His Ser Ile Gln  
 35 40 45

Pro Leu Lys Arg Leu Thr Ser Lys Lys Arg Val Ser Glu Ser Ala Ala  
 50 55 60

Val Gln Cys Ile Ser Ala Glu Val Gln Arg Asn Ser Ser Thr Gln Gly  
 65 70 75 80

Thr Ala Glu Ala Leu Ala Glu Ser Val Val Lys Pro Thr Arg Arg Arg  
 85 90 95

Ser Ser Gln Trp Lys Lys Ser Thr His Pro Leu Ser Glu Val Ala Val  
 100 105 110

His Asn Lys Pro Ser Asp Cys Trp Ile Val Val Lys Asn Lys Val Tyr  
 115 120 125

Asp Val Ser Asn Phe Ala Asp Glu His Pro Gly Gly Ser Val Ile Ser  
 130 135 140

Thr Tyr Phe Gly Arg Asp Gly Thr Asp Val Phe Ser Ser Phe His Ala  
 145 150 155 160

Ala Ser Thr Trp Lys Ile Leu Gln Asp Phe Tyr Ile Gly Asp Val Glu  
 165 170 175

Arg Val Glu Pro Thr Pro Glu Leu Leu Lys Asp Phe Arg Glu Met Arg  
 180 185 190

Ala Leu Phe Leu Arg Glu Gln Leu Phe Lys Ser Ser Lys Leu Tyr Tyr  
 195 200 205

Val Met Lys Leu Leu Thr Asn Val Ala Ile Phe Ala Ala Ser Ile Ala  
 210 215 220

Ile Ile Cys Trp Ser Lys Thr Ile Ser Ala Val Leu Ala Ser Ala Cys

10

20

30

40



<211> 469  
<212> PRT  
<213> Unknown

<400> 31

Met	Ala	Pro	Asp	Ala	Asp	Lys	Leu	Arg	Gln	Arg	Gln	Thr	Thr	Ala	Val	
1				5					10					15		
Ala	Lys	His	Asn	Ala	Ala	Thr	Ile	Ser	Thr	Gln	Glu	Arg	Leu	Cys	Ser	
			20					25					30			
Leu	Ser	Ser	Leu	Lys	Gly	Glu	Glu	Val	Cys	Ile	Asp	Gly	Ile	Ile	Tyr	
		35					40					45				
Asp	Leu	Gln	Ser	Phe	Asp	His	Pro	Gly	Gly	Glu	Thr	Ile	Lys	Met	Phe	10
	50					55					60					
Gly	Gly	Asn	Asp	Val	Thr	Val	Gln	Tyr	Lys	Met	Ile	His	Pro	Tyr	His	
65					70					75					80	
Thr	Glu	Lys	His	Leu	Glu	Lys	Met	Lys	Arg	Val	Gly	Lys	Val	Thr	Asp	
				85					90					95		
Phe	Val	Cys	Glu	Tyr	Lys	Phe	Asp	Thr	Glu	Phe	Glu	Arg	Glu	Ile	Lys	
			100					105					110			
Arg	Glu	Val	Phe	Lys	Ile	Val	Arg	Arg	Gly	Lys	Asp	Phe	Gly	Thr	Leu	
		115					120					125				20
Gly	Trp	Phe	Phe	Arg	Ala	Phe	Cys	Tyr	Ile	Ala	Ile	Phe	Phe	Tyr	Leu	
	130					135					140					
Gln	Tyr	His	Trp	Val	Thr	Thr	Gly	Thr	Ser	Trp	Leu	Leu	Ala	Val	Ala	
145					150					155					160	
Tyr	Gly	Ile	Ser	Gln	Ala	Met	Ile	Gly	Met	Asn	Val	Gln	His	Asp	Ala	
				165					170					175		
Asn	His	Gly	Ala	Thr	Ser	Lys	Arg	Pro	Trp	Val	Asn	Asp	Met	Leu	Gly	
			180					185					190			
Leu	Gly	Ala	Asp	Phe	Ile	Gly	Gly	Ser	Lys	Trp	Leu	Trp	Gln	Glu	Gln	
		195					200					205				30
His	Trp	Thr	His	His	Ala	Tyr	Thr	Asn	His	Ala	Glu	Met	Asp	Pro	Asp	
	210					215					220					
Ser	Phe	Gly	Ala	Glu	Pro	Met	Leu	Leu	Phe	Asn	Asp	Tyr	Pro	Leu	Asp	
225					230					235					240	
His	Pro	Ala	Arg	Thr	Trp	Leu	His	Arg	Phe	Gln	Ala	Phe	Phe	Tyr	Met	
				245					250					255		
Pro	Val	Leu	Ala	Gly	Tyr	Trp	Leu	Ser	Ala	Val	Phe	Asn	Pro	Gln	Ile	
		260						265					270			
Leu	Asp	Leu	Gln	Gln	Arg	Gly	Ala	Leu	Ser	Val	Gly	Ile	Arg	Leu	Asp	
		275					280					285				40

Asn Ala Phe Ile His Ser Arg Arg Lys Tyr Ala Val Phe Trp Arg Ala  
 290 295 300

Val Tyr Ile Ala Val Asn Val Ile Ala Pro Phe Tyr Thr Asn Ser Gly  
 305 310 315 320

Leu Glu Trp Ser Trp Arg Val Phe Gly Asn Ile Met Leu Met Gly Val  
 325 330 335

Ala Glu Ser Leu Ala Leu Ala Val Leu Phe Ser Leu Ser His Asn Phe  
 340 345 350

Glu Ser Ala Asp Arg Asp Pro Thr Ala Pro Leu Lys Lys Thr Gly Glu  
 355 360 365

Pro Val Asp Trp Phe Lys Thr Gln Val Glu Thr Ser Cys Thr Tyr Gly  
 370 375 380

Gly Phe Leu Ser Gly Cys Phe Thr Gly Gly Leu Asn Phe Gln Val Glu  
 385 390 395 400

His His Leu Phe Pro Arg Met Ser Ser Ala Trp Tyr Pro Tyr Ile Ala  
 405 410 415

Pro Lys Val Arg Glu Ile Cys Ala Lys His Gly Val His Tyr Ala Tyr  
 420 425 430

Tyr Pro Trp Ile His Gln Asn Phe Leu Ser Thr Val Arg Tyr Met His  
 435 440 445

Ala Ala Gly Thr Gly Ala Asn Trp Arg Gln Met Ala Arg Glu Asn Pro  
 450 455 460

Leu Thr Gly Arg Ala  
 465

【 図 1 】

図 1 : Pp\_des6のコード領域 (上列) とPT001078032RのEST配列 (下列) とのポリペプチドアライメント

```

398 WKPLVWMAVTELSGMLLGPVFLSHNGMEVYNSSEKPVSAQI-----VSTR 444
W+ + + + + L +F LSHN + S+ +A+ V T
430 WRVFGNIMLMGVAESLALAVLFSLSHN----FESADRDPTAPLKTGEPVDWFKTQVETS 263
445 DTRGNIFNDWFPTGGLNRQIEHHLFPPTMPRHNLNKIAPRVEVFCXKHLAVY 494
G + FTGGLN Q+EHLEFP M IAP+V C XHG+ Y
262 CTYGGFLSGCTGGLNFOVBEHHLFPRMSSAWYXYIAPKVRICAKHGVIY 113

```

【 図 2 】

図 2 : Ma\_des12のコード領域 (上の配列) とPT0010070010Rとのポリペプチドアライメント

```

105 GVWLAHECGHQSFSSTKTLNN 126
G WVLAHECGH +FS +++L +
533 GFVWLAHECGHGFASKVRSLQD 598

```

【 図 2 a 】

図 2 a : Ma\_des12のコード領域 (上の配列) とPT001072031Rとのポリペプチドアライメント

```

117 SFSTSKTLNNTVGVWILHSMLLVPYHSWRISHSKHH 151
++S S+T N+ VG+I+H LLVVPY +N+ +H+KHH
465 AYSDSQTNDVYVGFIVHQALLVPPYFAWQITHAKHH 569

```

【 図 3 】

図 3 : フェオダクトリウム (Paedactylum) デサチュラーゼ断片をコードするプライマー対P6aおよびR4a2のPCR産物のコード領域 (上列) とストレプトミセス・コエリコロル (Streptomyces coelicolor) 配列T36617 (下列) とのポリペプチドアライメント

```

1 WWKKNHGHHAHPNLHCSSAVAQDGDDEIDTTPMLLWVSOQOQSYRELDQADGKDSGLVKF 60
WN++KH HHA PN +D DEDI LL WS Qa++ +GL +
114 WQDKHTRHANPN-----TEDLDPDIPG-DLLWSPDQARAA-----TGLPRL 156
61 MTRNQSYFFPILLARLSWLNESFKCAFGLGAASENAALAKAGLQYPLLEKAGILLH 120
+ R Q++ +FP+L L E F G A N L+ +A L+ A +L H
157 LGRWQAFLEFFLLTL-----EGFNLHVASGRAMANRRLKRA-----LDGALLAH 202
121 YAWMLTVSSGFRXXXXXXXXXXXXXXXXXCGFLLAIVFGLHNGMATYNADARPDFWKLQ 180
A LT F G L F H GM AD REDE + Q
203 CAVYLAL--FWVLPQMAIAFLAVHQCLEFVYLGSAFAFNHKGMPILTADDRPDFLRRQ 260
181 VPTTRNVIGHGFPQAFVDWFCGGLQVQVDDHLLFPS 216
V T+RNV GG F D GGL +Q++HHLFPS
261 VLTSRNVNGG-----LFTDLALGGLNHLQIEHHLFPS 291

```

10

20



## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
 C 1 2 N 9/02 (2006.01) C 1 2 N 9/02  
 C 1 2 P 7/62 (2006.01) C 1 2 P 7/62

(72)発明者 レンツ, アンドレアス  
 ドイツ国 6 7 1 1 7 リンバーガーホフ, ハイリッヒ - フォン - クライスト - シュトラーセ  
 6  
 (72)発明者 ハイイツ, エルンスト  
 ドイツ国 2 2 6 0 9 ハンブルク, プュートカムプスヴェーク 1 3  
 (72)発明者 ドマーギュ, フレデリック  
 ドイツ国 2 2 7 6 1 ハンブルク, バーレンフェルダール スタインダム 9 8  
 (72)発明者 ツェーリンガー, ウルリッヒ  
 ドイツ国 2 2 9 2 6 アーレンズブルク, テオドール - ストーム - シュトラーセ 3 4アー

審査官 高 美葉子

(56)参考文献 国際公開第 9 9 / 0 6 4 5 7 9 (WO, A 1)  
 国際公開第 9 4 / 0 1 1 5 1 6 (WO, A 1)  
 国際公開第 9 8 / 0 4 6 7 6 5 (WO, A 1)  
 Enzyme Microb Technol. (2000), Vol. 26, No. 7, p. 516-529  
 Lipids, 1 9 7 9 年 1 月, Vol. 14, No. 1, p. 15-19

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

C12N 15/00  
 A01H 5/00  
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)  
 GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq  
 UniProt/GeneSeq  
 PubMed  
 BIOSIS/WPI(DIALOG)