(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2016-189787
(P2016-189787A)
(43)公開日　平成28年11月10日(2016.11.10)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12P 7/64	(2006.01)	C12P	7/64	ZNA	2B150
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A	4B018
C12N 1/15	(2006.01)	C12N	1/15		4B064
A23L 33/115	(2016.01)	A23L	33/115		4B065
A23K 10/16	(2016.01)	A23K	10/16		4C087

審査請求 有　請求項の数 28　ＯＬ　（全 84 頁）　最終頁に続く

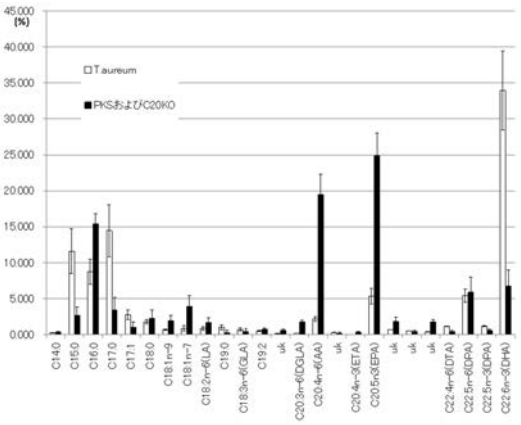
(21)出願番号　特願2016-142299 (P2016-142299)
(22)出願日　平成28年7月20日 (2016.7.20)
(62)分割の表示　特願2012-536598 (P2012-536598)の分割
原出願日　平成23年9月30日 (2011.9.30)
(31)優先権主張番号　特願2011-179194 (P2011-179194)
(32)優先日　平成23年8月18日 (2011.8.18)
(33)優先権主張国　日本国(JP)
(31)優先権主張番号　特願2010-224225 (P2010-224225)
(32)優先日　平成22年10月1日 (2010.10.1)
(33)優先権主張国　日本国(JP)

(71)出願人　504145342
国立大学法人九州大学
福岡県福岡市東区箱崎六丁目１０番１号
(71)出願人　504224153
国立大学法人　宮崎大学
宮崎県宮崎市学園木花台西１丁目１番地
(71)出願人　397022911
学校法人甲南学園
兵庫県神戸市東灘区岡本８丁目９番１号
(71)出願人　000004189
日本水産株式会社
東京都港区西新橋一丁目３番１号
(74)代理人　100102314
弁理士　須藤　阿佐子

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ストラメノパイルの形質転換方法

(57)【要約】
【課題】　遺伝子を遺伝子工学的に破壊あるいは発現抑制することにより不飽和脂肪酸産生能力が向上したストラメノパイルを得る形質転換方法を提供する。形質転換されたストラメノパイルは高度不飽和脂肪酸を加えない培地で生育可能であり、不飽和脂肪酸含量が増加した微生物油を産生する。
【解決手段】　ストラメノパイルの遺伝子を遺伝子工学的に破壊あるいは発現抑制するストラメノパイルの形質転換方法であり、特に、ストラメノパイルからThraustochytrium aureum、Parietichytrium sarkarianum、Thraustochytrium roseum、またはParietichytrium sp.から選ばれ、破壊あるいは発現抑制される遺伝子が脂肪酸生合成関連遺伝子であることを特徴とするストラメノパイルの形質転換方法。
【選択図】　図４２



【特許請求の範囲】
【請求項１】
下記（ａ）～（ｆ）からなる群から選ばれる１以上を満たし、高度不飽和脂肪酸を蓄積する微生物から得られる微生物油であって、（ａ）ＡＡが全脂肪酸組成のうち、１．５％以上である。　（ｂ）ＤＧＬＡが全脂肪酸組成のうち、０．２％以上である。　（ｃ）ＥＴＡが全脂肪酸組成のうち、０．０４％以上である。　（ｄ）ＥＰＡが全脂肪酸組成のうち、３．８％以上である。（ｅ）n-6ＤＰＡが全脂肪酸組成のうち、１３．７％以下である。（ｆ）ＤＨＡが全脂肪酸組成のうち、４３．９％以下である。微生物が、脂肪酸生合成に関連する遺伝子が破壊され、または発現抑制されたラビリンチュラ類である、微生物油。
【請求項２】
脂肪酸生合成に関連する遺伝子が、ＰＫＳ遺伝子、脂肪酸鎖長伸長酵素遺伝子、および/または脂肪酸不飽和化酵素遺伝子である、請求項１に記載の微生物油。
【請求項３】
微生物油が、ＧＣ面積でn-6ＤＰＡ/ＤＴＡの値が１２．６以下である、請求項１または２に記載の微生物油。
【請求項４】
微生物油が、ＧＣ面積でＤＨＡ/n-3ＤＴＡの値が３８．８以下である、請求項１ないし３のいずれかに記載の微生物油。
【請求項５】
微生物油が、ＧＣ面積でＣ２０ＰＵＦＡ/Ｃ２２ＰＵＦＡの値が０．３以上２９．６以下を満たす、請求項１ないし４のいずれかに記載の微生物油。
【請求項６】
微生物油が、ＧＣ面積でn-6ＰＵＦＡ/n-3ＰＵＦＡの値が０．２以上である、請求項１ないし５のいずれかに記載の微生物油。
【請求項７】
微生物が下記（１）および（２）のいずれかのラビリンチュラ類である、請求項１ないし６のいずれかに記載の微生物油。（１）ＰＫＳ遺伝子、脂肪酸鎖長伸長酵素遺伝子、および/または脂肪酸不飽和化酵素遺伝子を破壊または発現抑制することにより、脂肪酸組成が改変されたラビリンチュラ類。（２）ＰＫＳ遺伝子、脂肪酸鎖長伸長酵素遺伝子、および/または脂肪酸不飽和化酵素遺伝子を破壊または発現抑制することに加えて、さらに脂肪酸鎖長伸長酵素遺伝子、および/または脂肪酸不飽和化酵素遺伝子を導入することにより、脂肪酸組成が改変されたラビリンチュラ類。
【請求項８】
微生物が、高度不飽和脂肪酸を加えない培地で生育可能である、請求項１ないし７のいずれかに記載の微生物油。
【請求項９】
ＰＫＳ遺伝子がＯｒｆＡである、請求項２ないし８のいずれかに記載の微生物油。
【請求項１０】
脂肪酸鎖長伸長酵素遺伝子がＣ２０エロンゲース遺伝子である、請求項２ないし９のいずれかに記載の微生物油。
【請求項１１】
脂肪酸不飽和化酵素遺伝子が、Δ４デサチュラーゼ遺伝子、Δ１２デサチュラーゼ遺伝子および／またはω３デサチュラーゼ遺伝子である、請求項２ないし１０のいずれかに記載の微生物油。
【請求項１２】
遺伝子を破壊または導入する方法が、エレクトロポレーション法または遺伝子銃法である、請求項１ないし１１のいずれかに記載の微生物油。
【請求項１３】
遺伝子を発現抑制する方法が、アンチセンス法またはＲＮＡ干渉である、請求項１ないし

１２のいずれかに記載の微生物油。
【請求項１４】
微生物が、Labyrinthula属、Althornia属、Aplanochytrium属、Japonochytrium属、Labyrinthuloides属、Schizochytrium属、Aurantiochytrium 属、Thraustochytrium属、Ulkenia 属、Oblongichyriumt属、Botryochytrium属、、Parietichytrium属、またはSicyoidochytrium属に属するラビリンチュラ類である、請求項１ないし１３のいずれかに記載の微生物油。
【請求項１５】
微生物が、Thraustochytrium aureum、Parietichytrium sarkarianum、Thraustochytrium roseum、Parietichytrium sp.またはSchizochytrium sp.である、請求項１４に記載の微生物油。
【請求項１６】
微生物が、Thraustochytrium aureum ATCC 34304、Parietichytrium sarkarianum SEK 364 FERM BP-11298、Thraustochytrium roseum ATCC 28210、Parietichytrium sp.SEK358 FERM BP-11405、Parietichytrium sp. SEK571 FERM BP-11406 またはSchizochytrium sp. TY12Ab FERM BP-11421である、請求項１５に記載の微生物油。
【請求項１７】
ＰＫＳ遺伝子、脂肪酸鎖長伸長酵素遺伝子、および/または脂肪酸不飽和化酵素遺伝子を破壊または発現抑制することにより、産生する脂肪酸組成が改変されたラビリンチュラ類である微生物から、微生物油を得ることを特徴とする微生物油の作成方法。
【請求項１８】
ＰＫＳ遺伝子、脂肪酸鎖長伸長酵素遺伝子、および/または脂肪酸不飽和化酵素遺伝子を破壊または発現抑制することに加えて、さらに脂肪酸鎖長伸長酵素遺伝子、および/または脂肪酸不飽和化酵素遺伝子を導入することにより、産生する脂肪酸組成が改変されたラビリンチュラ類である微生物から、微生物油を得ることを特徴とする微生物油の作成方法。
【請求項１９】
微生物が、高度不飽和脂肪酸を加えない培地で生育可能である、請求項１７または１８に記載の微生物油の作成方法。
【請求項２０】
ＰＫＳ遺伝子がＯｒｆＡである、請求項１７、１８または１９に記載の微生物油の作成方法。
【請求項２１】
脂肪酸鎖長伸長酵素遺伝子がＣ２０エロンゲース遺伝子である、請求項１７ないし２０のいずれかに記載の微生物油の作成方法。
【請求項２２】
脂肪酸不飽和化酵素遺伝子が、Δ４デサチュラーゼ遺伝子、Δ１２デサチュラーゼ遺伝子および／またはω３デサチュラーゼ遺伝子である、請求項１７ないし２１のいずれかに記載の微生物油の作成方法。
【請求項２３】
遺伝子を破壊または導入する方法が、エレクトロポレーション法または遺伝子銃法である、請求項１７ないし２２のいずれかに記載の微生物油の作成方法。
【請求項２４】
遺伝子を発現抑制する方法が、アンチセンス法またはＲＮＡ干渉である、請求項１７ないし２３のいずれかに記載の微生物油の作成方法。
【請求項２５】
微生物が、Labyrinthula属、Althornia属、Aplanochytrium属、Japonochytrium属、Labyrinthuloides属、Schizochytrium属、Aurantiochytrium 属、Thraustochytrium属、Ulkenia 属、Oblongichyriumt属、Botryochytrium属、、Parietichytrium属、またはSicyoidochytrium属に属するラビリンチュラ類である、請求項１７ないし２４のいずれかに記載の微

生物油の作成方法。
【請求項２６】
微生物が、Thraustochytrium aureum、Parietichytrium sarkarianum、Thraustochytrium roseum、Parietichytrium sp.またはSchizochytrium sp.である、請求項２５に記載の微生物油の作成方法。
【請求項２７】
微生物が、Thraustochytrium aureum ATCC 34304、Parietichytrium sarkarianum SEK 364 FERM BP-11298、Thraustochytrium roseum ATCC 28210、Parietichytrium sp.SEK358 FERM BP-11405、Parietichytrium sp. SEK571 FERM BP-11406 またはSchizochytrium sp. TY12Ab FERM BP-11421である、請求項２６に記載の微生物油の作成方法。
【請求項２８】
脂質組成物として、請求項１ないし１６のいずれかに記載の微生物油を含む、食品、飼料、医薬または工業製品。

【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、ストラメノパイルの遺伝子を遺伝子工学的に破壊または／および発現抑制することを特徴とするストラメノパイルの形質転換方法に関する。特に、脂肪酸生合成関連遺伝子を破壊または／および発現抑制する形質転換方法であり、形質転換したストラメノパイルが高度不飽和脂肪酸を加えない培地で生育可能であるストラメノパイルの脂肪酸組成の改変方法、ストラメノパイルに高度に脂肪酸を蓄積させる方法及び不飽和脂肪酸含量を改変したストラメノパイル及びストメノパイルに蓄積される不飽和脂肪酸含量を改変した微生物油、これら不飽和脂肪酸含量を改変したストラメノパイルから不飽和脂肪酸を改変した微生物油を生産する方法、等に関する。
【背景技術】
【０００２】
高度不飽和脂肪酸（polyunsaturaeted fatty acid, PUFA）は動物およびヒトの栄養において重要な成分である。エイコサペンタエン酸（EPA）またはドコサヘキサエン酸（DHA）のようなω3高度不飽和脂肪酸（n-3 高度不飽和脂肪酸ともいう）は、小児の脳の発達、眼の機能、ホルモンおよび他のシグナル物質の合成ならびに心血管障害、癌および糖尿病の予防を含め健康の態様において種々の役割を果たすため（非特許文献１、２）、それらはヒトの栄養において重要な成分である。そのような理由で、高度不飽和脂肪酸の製造が必要とされている。
【０００３】
一方、ラビリンチュラ類に分類される微生物は、高度不飽和脂肪酸を製造することが既に知られている。ヤブレツボカビ科に属する微生物においては、シゾキトリウム属の微生物を用いた高度不飽和脂肪酸含有リン脂質の製造方法（特許文献１）、ドコサヘキサエン酸生産能を有するスラウストキトリウム属の微生物（特許文献２）等が既に報告されている。これらの不飽和脂肪酸は、食物および／または飼料の強化を可能にするために、これらの不飽和脂肪酸の、特に真核生物系における、簡便で経済的な製造方法が大いに必要とされている。
【０００４】
ラビリンチュラ類において、外来遺伝子の導入方法として、Schizochytrium属の特定の株（現在の分類体系（非特許文献３）ではAurantiochytrium属に属する（非特許文献４）

）に対する方法が既に報告されている（特許文献３、４）。また、形質転換により脂肪酸組成に変化を起こさせる方法として、ポリケチド合成酵素（ポリケチドシンターゼ、PKS）遺伝子を破壊しその結果脂肪酸組成に変化があった例が知られているが（非特許文献５）、エロンガーゼ／デサチュラーゼ経路を構成する酵素を操作して脂肪酸組成を変化させる報告は今までに知られていない。このような状況下、本発明者らは、エロンガーゼ／デサチュラーゼ遺伝子を各種ラビリンチュラ類に導入し、脂肪酸組成を変化させることを見出し、既に特許出願している（特許文献５）。

【先行技術文献】

【特許文献】

【０００５】

【特許文献１】特開２００７－１４３４７９号公報
【特許文献２】特開２００５－１０２６８０号公報
【特許文献３】特開２００６－３０４６８５号公報
【特許文献４】特開２００６－３０４６８６号公報
【特許文献５】国際特許公開WO2011/037207号公報
【特許文献６】国際特許公開WO1997/011094号公報
【特許文献７】米国特許公開US2005/0014231号公報
【特許文献８】特表２００７－５３２１０４号公報

【非特許文献】

【０００６】

【非特許文献１】Poulos A., Lipids, 30, 1-14(1995)
【非特許文献２】Horrocks L.A. and Yeo Y.K., Pharmacol Res., 40, 211-225(1999)
【非特許文献３】Yokoyama R., Honda D., Mycoscience, 48, 199-211(2007)
【非特許文献４】第60回日本生物工学会大会講演要旨集, p136(2008)
【非特許文献５】Lippmeier J.C. et al., Lipids, 44(7), 621-630(2009)
【非特許文献６】Tonon T. et al., FEBS Lett., 553, 440-444(2003).
【非特許文献７】Thompson J.D. et al., Nucleic Acids Res., 22, 4673-4680(1994)
【非特許文献８】Yazawa K., Lipids, 31, Supple. 297-300(1996)
【非特許文献９】Jiang X. et al., Wei Sheng Wu Xue Bao., 48(2), 176-183(2008)
【非特許文献１０】PEREIRA S.L. et al., Biochem. J., 378, 665-671(2004)
【非特許文献１１】Prasher D.C. et al., Gene, 111(2), 229-233(1992)
【非特許文献１２】Chalfie M. et al., Science, 263, 802-805(1994)
【非特許文献１３】Southern P.J., and Berg, P., J. Molec. Appl. Gen., 1, 327-339(1982)
【非特許文献１４】Saitou N. et al., Mol. Biol. Evol., 4, 406-425(1987)
【非特許文献１５】Ausubel F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Unit 13(1994)」
【非特許文献１６】Guthrie C., Fink G. et al., Methods in Enzymology: Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Volume 194(1991)
【非特許文献１７】Abe E., et al., J. Biochem, 142, 31561-31566 (2006)
【非特許文献１８】「バイオ実験イラストレイテッド　第２巻　遺伝子解析の基礎」、p117-128、秀潤社、1995年発行
【非特許文献１９】日本農芸化学会会誌, 77, 2, 150-153(2003)
【非特許文献２０】「バイオ実験イラストレイテッド　第２巻　遺伝子解析の基礎」、p63-68、秀潤社、1995年発行
【非特許文献２１】Sanger, F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci, 74, 5463 (1977)
【非特許文献２２】Meyer, A., et al. J. Lipid Res., 45, 1899-1909 (2004)
【非特許文献２３】Cigan and Donahue, 1987; Romanos et al., 1992
【非特許文献２４】Qiu, X., et al. J. Biol. Chem., 276, 31561-6 (2001)
【非特許文献２５】DIG説明書集[日本語版] 8th, Roche Applied Science

【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００７】
本発明は、ストラメノパイルの有用物質の産生能力を向上させるために、ストラメノパイルの遺伝子を遺伝子工学的に破壊または／および発現抑制して形質転換することを目的とする。ストラメノパイルの有用物質の産生に係わる遺伝子を遺伝子工学的に破壊または／および発現抑制して有用物質の産生能力を改変することにより、ストラメノパイルが産生する脂肪酸組成の改変方法、ストラメノパイルに高度に脂肪酸を蓄積させる方法、不飽和脂肪酸の製造方法、不飽和脂肪酸含量を改変したストラメノパイル、これら不飽和脂肪酸含量を改変したストラメノパイルから不飽和脂肪酸を改変した微生物油を生産して提供することを目的とする。本発明により、形質転換したストラメノパイルが高度不飽和脂肪酸を加えない培地で生育可能であるストラメノパイルが産生する脂肪酸組成を改変すること、およびストラメノパイルに高度不飽和脂肪酸を改変した微生物油を蓄積させる方法が提供され、高度不飽和脂肪酸をより効率的に製造することが可能となる。
【課題を解決するための手段】
【０００８】
本発明者らは、上記の従来技術の状況に鑑み鋭意研究の結果、ストラメノパイルの高度に不飽和脂肪酸を産生する能力を向上させるために、ストラメノパイルの遺伝子を遺伝子工学的に破壊または／および発現抑制して形質転換することに成功し、さらに、ストラメノパイルの遺伝子を遺伝子工学的に破壊あるいは発現抑制することによりストラメノパイルが産生する脂肪酸組成の改変を行なう方法、およびこの形質転換ストラメノパイルに高度に不飽和脂肪酸を蓄積させる方法を見出しその実用化のための研究、開発をさらに増進することにより本発明を完成させるに至った。
【０００９】
本発明は、以下の（１）ないし（１２）に記載のストラメノパイルの形質転換方法を要旨とするものである。
（１）ストラメノパイルの遺伝子を遺伝子工学的に破壊または／および発現抑制することを特徴とする、ストラメノパイルの形質転換方法。
（２）ストラメノパイルがラビリンチュラ類である、上記（１）に記載のストラメノパイルの形質転換方法。
（３）ラビリンチュラ類がラビリンチュラ属(Labyrinthula)、アルトルニア属(Althornia)、アプラノキトリウム属（Aplanochytrium）、イァポノキトリウム属(Japonochytrium)、ラビリンチュロイデス属（Labyrinthuloides）、シゾキトリウム属(Schizochytrium)、アウランティオキトリウム属（Aurantiochytrium）、ヤブレツボカビ属(Thraustochytrium)、ウルケニア属(Ulkenia)、オブロンギキトリウム属（Oblongichytrium）、ボトリオキトリウム属（Botryochytrium）、パリエティキトリウム属（Parietichytrium）、またはシクヨイドキトリウム属（Sicyoidochytrium）に属する微生物である、上記（２）に記載のストラメノパイルの形質転換方法。
（４）微生物がThraustochytrium aureum、Parietichytrium sarkarianum、Thraustochytrium roseum、Parietichytrium sp. または Schizochytrium sp.である、上記（３）に記載のストラメノパイルの形質転換方法。
（５）微生物がThraustochytrium aureum ATCC 34304、Parietichytrium sarkarianum SEK 364(FERM BP-11298)、Thraustochytrium roseum ATCC 28210、Parietichytrium sp. SEK358(FERM BP-11405)、Parietichytrium sp. SEK571(FERM BP-11406) またはSchizochytrium sp. TY12Ab（FERM ABP-11421）である、上記（４）に記載のストラメノパイルの形質転換方法。
（６）ストラメノパイルの遺伝子が脂肪酸生合成関連遺伝子である、上記（１）ないし（５）のいずれかに記載のストラメノパイルの形質転換方法。
（７）脂肪酸生合成関連遺伝子がポリケチド合成酵素、脂肪酸鎖長伸長酵素、および／または脂肪酸不飽和化酵素に関連する遺伝子である、上記（６）に記載のストラメノパイル

の形質転換方法。
（８）脂肪酸鎖長伸長酵素がC20エロンガーゼである、上記（７）に記載のストラメノパイルの形質転換方法。
（９）脂肪酸不飽和化酵素がΔ12デサチュラーゼである、上記（７）に記載のストラメノパイルの形質転換方法。
（１０）ストラメノパイルの遺伝子を遺伝子工学的に破壊する方法が、エレクトロポレーションまたは遺伝子銃法によって機能欠損型の遺伝子あるいは遺伝子をコードする領域を欠失したDNA断片を導入することを特徴とする、上記（１）ないし（９）のいずれかに記載のストラメノパイルの形質転換方法。
（１１）ストラメノパイルの遺伝子を遺伝子工学的に発現抑制する方法が、アンチセンス法あるいはRNA干渉であることを特徴とする、上記（１）ないし（１０）のいずれかに記載のストラメノパイルの形質転換方法。
（１２）さらに脂肪酸不飽和化酵素に関連する遺伝子を導入することを特徴とする、上記（１）ないし（１１）のいずれかに記載のストラメノパイルの形質転換方法。
（１３）脂肪酸不飽和化酵素に関連する遺伝子がω3デサチュラーゼである、上記（１２）に記載のストラメノパイルの形質転換方法。
【００１０】
また、本発明は、以下の（１４）ないし（２６）に記載のストラメノパイルの脂肪酸組成の改変方法を要旨とするものである。
（１４）ストラメノパイルの遺伝子を遺伝子工学的に破壊または／および発現抑制することを特徴とする、ストラメノパイルの脂肪酸組成の改変方法。
（１５）ストラメノパイルがラビリンチュラ類である、上記（１４）に記載のストラメノパイルの脂肪酸組成の改変方法。
（１６）ラビリンチュラ類がラビリンチュラ属(Labyrinthula)、アルトルニア属(Althornia)、アプラノキトリウム属（Aplanochytrium）、イァポノキトリウム属(Japonochytrium)、ラビリンチュロイデス属（Labyrinthuloides）、シゾキトリウム属(Schizochytrium)、アウランティオキトリウム属（Aurantiochytrium）、ヤブレツボカビ属(Thraustochytrium)、ウルケニア属(Ulkenia)、オブロンギキトリウム属（Oblongichytrium）、ボトリオキトリウム属（Botryochytrium）、パリエティキトリウム属（Parietichytrium）、またはシクヨイドキトリウム属（Sicyoidochytrium）に属する微生物である、上記（１５）に記載のストラメノパイルの脂肪酸組成の改変方法。
（１７）微生物がThraustochytrium aureum、Parietichytrium sarkarianum、Thraustochytrium roseum、Parietichytrium sp. または Schizochytrium sp.である、上記（１６）に記載のストラメノパイルの脂肪酸組成の改変方法。
（１８）微生物がThraustochytrium aureum ATCC 34304、Parietichytrium sarkarianum SEK 364(FERM BP-11298)、Thraustochytrium roseum ATCC 28210、Parietichytrium sp. SEK358(FERM BP-11405)、Parietichytrium sp. SEK571(FERM BP-11406) またはSchizochytrium sp. TY12Ab（FERM ABP-11421）である、上記（１７）に記載のストラメノパイルの脂肪酸組成の改変方法。
（１９）ストラメノパイルの遺伝子が脂肪酸生合成関連遺伝子である、上記（１４）ないし（１８）のいずれかに記載のストラメノパイルの脂肪酸組成の改変方法。
（２０）脂肪酸生合成関連遺伝子がポリケチド合成酵素、脂肪酸鎖長伸長酵素、および／または脂肪酸不飽和化酵素に関連する遺伝子である、上記（１９）に記載のストラメノパイルの脂肪酸組成の改変方法。
（２１）脂肪酸鎖長伸長酵素がC20エロンガーゼである、上記（２０）に記載のストラメノパイルの脂肪酸組成の改変方法。
（２２）脂肪酸不飽和化酵素がΔ12デサチュラーゼである、上記（２１）に記載のストラメノパイルの脂肪酸組成の改変方法。
（２３）ストラメノパイルの遺伝子を遺伝子工学的に破壊する方法が、エレクトロポレーションまたは遺伝子銃法によって機能欠損型の遺伝子あるいは遺伝子をコードする領域を

欠失したDNA断片を導入することを特徴とする、上記（１４）ないし（２２）のいずれかに記載のストラメノパイルの脂肪酸組成の改変方法。
（２４）ストラメノパイルの遺伝子を遺伝子工学的に発現抑制する方法が、アンチセンス法あるいはRNA干渉であることを特徴とする、上記（１４）ないし（２３）のいずれかに記載のストラメノパイルの脂肪酸組成の改変方法。
（２５）さらに脂肪酸不飽和化酵素に関連する遺伝子を導入することを特徴とする、上記（１４）ないし（２４）のいずれかに記載のストラメノパイルの脂肪酸組成の改変方法。
（２６）脂肪酸不飽和化酵素に関連する遺伝子がω3デサチュラーゼである、上記（２５）に記載のストラメノパイルの脂肪酸組成の改変方法。
【００１１】
また、本発明は、以下の（２７）ないし（２９）に記載のストラメノパイルに高度に脂肪酸を蓄積させる方法を要旨とするものである。
（２７）上記（１４）ないし（２６）のいずれかに記載の方法により、ストラメノパイルに高度に脂肪酸を蓄積させる方法。
（２８）脂肪酸が不飽和脂肪酸である、上記（２７）に記載の方法。
（２９）不飽和脂肪酸が炭素数１８～２２の不飽和脂肪酸である、上記（２８）に記載の方法。
【００１２】
また、本発明は、以下の（３０）に記載の脂肪酸を要旨とするものである。
（３０）上記（２７）ないし（２９）のいずれかに記載の方法により得られた高度に脂肪酸を蓄積させたストラメノパイルから取得した脂肪酸。
【００１３】
また、本発明は、以下の（３１）ないし（４３）に記載の形質転換されたストラメノパイルを要旨とするものである。
（３１）脂肪酸組成の改変を目的としてその遺伝子を遺伝子工学的に破壊または／および発現抑制することにより形質転換されたストラメノパイル。
（３２）ラビリンチュラ類である、上記（３１）に記載のストラメノパイル。
（３３）ラビリンチュラ類がラビリンチュラ属(Labyrinthula)、アルトルニア属(Althornia)、アプラノキトリウム属（Aplanochytrium）、イァポノキトリウム属(Japonochytrium)、ラビリンチュロイデス属（Labyrinthuloides）、シゾキトリウム属(Schizochytrium)、アウランティオキトリウム属（Aurantiochytrium）、ヤブレツボカビ属(Thraustochytrium)、ウルケニア属(Ulkenia)、オブロンギキトリウム属（Oblongichytrium）、ボトリオキトリウム属（Botryochytrium）、パリエティキトリウム属（Parietichytrium）、またはシクヨイドキトリウム属（Sicyoidochytrium）に属する微生物である、上記（３２）に記載のストラメノパイル。
（３４）微生物がThraustochytrium aureum、Parietichytrium sarkarianum、Thraustochytrium roseum、Parietichytrium sp. または Schizochytrium sp.である、上記（３３）に記載のストラメノパイル。
（３５）微生物がThraustochytrium aureum ATCC 34304、Parietichytrium sarkarianum SEK 364(FERM BP-11298)、Thraustochytrium roseum ATCC 28210、Parietichytrium sp. SEK358(FERM BP-11405)、Parietichytrium sp. SEK571(FERM BP-11406) またはSchizochytrium sp. TY12Ab（FERM ABP-11421）である、上記（３４）に記載のストラメノパイル。
（３６）ストラメノパイルの遺伝子が脂肪酸生合成関連遺伝子である、上記（３１）ないし（３５）のいずれかに記載のストラメノパイル。
（３７）脂肪酸生合成関連遺伝子がポリケチド合成酵素、脂肪酸鎖長伸長酵素、および／または脂肪酸不飽和化酵素に関連する遺伝子である、（３６）に記載のストラメノパイル。
（３８）脂肪酸鎖長伸長酵素がC20エロンガーゼである、上記（３６）に記載のストラメノパイル。

（３９）脂肪酸不飽和化酵素がΔ12デサチュラーゼである、上記（３７）に記載のストラメノパイル。
（４０）ストラメノパイルの遺伝子を遺伝子工学的に破壊する方法が、エレクトロポレーションまたは遺伝子銃法によって機能欠損型の遺伝子あるいは遺伝子をコードする領域を欠失したDNA断片を導入することを特徴とする、上記（３１）ないし（３９）のいずれかに記載のストラメノパイル。
（４１）ストラメノパイルの遺伝子を遺伝子工学的に発現抑制する方法が、アンチセンス法あるいはRNA干渉であることを特徴とする、上記（３１）ないし（４０）のいずれかに記載のストラメノパイル。
（４２）さらに脂肪酸不飽和化酵素に関連する遺伝子を導入することを特徴とする、上記（３１）ないし（４１）のいずれかに記載のストラメノパイル。
（４３）脂肪酸不飽和化酵素に関連する遺伝子がω3デサチュラーゼである、上記（４２）に記載のストラメノパイル。
【発明の効果】
【００１４】
本発明により、ストラメノパイルの有用物質の産生能力を向上させるために、ストラメノパイルの遺伝子を遺伝子工学的に破壊または／および発現抑制して形質転換することを目的とする。ストラメノパイルの有用物質の産生に係わる遺伝子を遺伝子工学的に破壊または／および発現抑制して有用物質の産生能力を改変することにより、ストラメノパイルが産生する脂肪酸組成の改変方法、ストラメノパイルに高度に脂肪酸を蓄積させる方法、不飽和脂肪酸の製造方法、不飽和脂肪酸含量の増加したストラメノパイル、これら不飽和脂肪酸含量の増加したストラメノパイルから不飽和脂肪酸を生産して提供され、ストラメノパイルが産生する微生物油の脂肪酸組成を改変すること、およびストラメノパイルに高度に脂肪酸を蓄積させる方法が提供され、高度不飽和脂肪酸をより効率的に製造することが可能となる。
【図面の簡単な説明】
【００１５】
【図１】実施例２－２における、T. aureum ATCC 34304由来エロンガーゼ遺伝子を増幅するRACEの結果を示す。[符号の簡単な説明] １：合成アダプター特異的なオリゴヌクレオチド、および縮重オリゴヌクレオチドelo-Rを用いた5’-RACE ２：合成アダプター特異的なオリゴヌクレオチド、および縮重オリゴヌクレオチドelo-Fを用いた3’-RACE ３：elo-Rのみを用いた5’-RACE (negative control) ４：elo-Fのみを用いた3’-RACE (negative control) ５：合成アダプター特異的なオリゴヌクレオチドのみを用いた5’-RACE (negative control) ６：合成アダプター特異的なオリゴヌクレオチドのみを用いた3’-RACE (negative control)
【図２】実施例２－３における、T. aureum ATCC 34304由来Δ6/Δ9エロンガーゼおよびΔ5/Δ6エロンガーゼ (TaELO1およびTaELO2) の分子系統樹を示す。
【図３】実施例２－８における、KONeorを導入した形質転換体の評価を示す。(A) ゲノムDNAを鋳型としたPCRによる形質転換体の評価において、用いたオリゴヌクレオチドプライマー対を示す。[符号の簡単な説明] (1) Neor検出プライマー (SNeoFおよびSNeoR) (2) KO確認１(KO Pro F SmaIおよびKO Term R SmaI) (3) KO確認２(E2 KO ProF EcoRVおよびSNeoR) (4) KO確認３(SNeoFおよびE2 KO Term R EcoRV) (5) TaELO2検出 (E2 HindIIIおよびE2 XbaI)(B) ゲノムDNAを鋳型としたPCRによる形質転換体の評価における、アガロース電気泳動図を示す。[符号の簡単な説明] 1，5，9，13，17：形質転換体 2，6，10，14，18：野生株 3，7，11，15，19：KONeorを鋳型としたもの 4，8，12，16：鋳型なし 尚、レーン番号の上には、用いたオリゴヌクレオチドプライマー対(1)～(5)を記載している。
【図４】実施例２－９における、サザンブロッティングによるTaELO2のコピー数の確認の結果を示す。[符号の簡単な説明] 1：ゲノムDNA (2.5 μg), BamHI処理 2： BglII処理 3： EcoRI処理 4： EcoRV処理 5： HindIII処理 6： KpnI処理 7： SmaI処理 8：

XbaI処理　9：positive control（1 ngのE2 KO ProF EcoRVおよびE2 KO Term R EcoRVで増幅したPCR産物。TaELO2を含む）
【図５】実施例２－１０における、TKONeorを導入した形質転換体のサザンブロッティングによる評価を示す。(A) 野生型アリル、もしくはTKONeor導入による変異アリルを検出するサザンブロッティングの模式図を示す。(B) サザンブロッティングの結果を示す。[符号の簡単な説明]　1：T. aureum野生株（2.5 μgのゲノムDNA）　2，3：TKONeor導入形質転換体（2.5 μgのゲノムDNA）　4：positive control（50 ngのE2 KO ProF EcoRVおよびE2 KO Term R EcoRVで増幅したPCR産物。TaELO2を含む）
【図６】実施例２－１２における、KOub600Hygrの再導入によって得た形質転換体のゲノムDNAを鋳型にしたPCRによる評価を示す。(A) 用いたオリゴヌクレオチドプライマー対を示す。[符号の簡単な説明]　(1) TaELO2 ORF検出（SNeoFおよびSNeoR）　(2) KO確認（E2 KO Pro F EcoRVおよび ubi-hygro R)(B) KO確認のオリゴヌクレオチドプライマー対(1)を用いたPCRのアガロース電気泳動図を示す。矢印は、特異的産物の増幅が確認され、TaELO2欠損ホモ接合体と推定された形質転換体を示す。(C) TaELO2欠損ホモ接合体と同定された形質転換体における、TaELO2 ORF検出のオリゴヌクレオチドプライマー対(2)を用いたPCRのアガロース電気泳動図を示す。[符号の簡単な説明]　1：KOub600Hygrを鋳型としたもの　2：野生株
【００１６】
【図７】実施例２－１２における、KOub600Hygrの再導入によって得た形質転換体のサザンブロッティングによる評価を示す。(A) 野生型アリル、KONeor導入による変異アリル、およびKOub600Hygr導入による変異アリルを検出するサザンブロッティングの模式図を示す。(B) サザンブロッティングの結果を示す。[符号の簡単な説明]　1，9：野生株　2-8および10-16：TaELO2欠損ホモ接合体
【図８】実施例２－１２における、TaELO2を検出するサザンブロッティングの結果を示す。[符号の簡単な説明]　1：野生株　2-5：T TaELO2欠損ホモ接合体
【図９】実施例２－１２における、TaELO2 mRNAを検出するRT-PCRのアガロースゲル電気泳動の結果を示す。[符号の簡単な説明]　1-4：TaELO2欠損ホモ接合体　5：野生株　6-9：TaELO2欠損ホモ接合体、total RNAを鋳型にしたもの（negative control）　10：野生株、total RNAを鋳型にしたもの（negative control）　11：野生株ゲノムDNAを鋳型にしたもの（positive control）
【図１０】実施例２－１３における、野生株、およびTaELO2欠損ホモ接合体の脂肪酸組成比較の結果を示す。
【００１７】
【図１１】サブクローニングしたpcDNA 3.1 Myc-His vector 由来のSV40 terminator配列を含むプラスミドを表す。
【図１２】Fusion PCR に使用したプライマーと産物の模式図を表す。最終産物は、Thraustochytrium aureum ATCC 34304 由来ubiquitin promoterと 人工合成ネオマイシン耐性遺伝子の融合した配列になる。
【図１３】作製した人工合成ネオマイシン耐性遺伝子 のBglIIカセットを表す。
【図１４】Fusion PCR に使用したプライマーと産物の模式図を表す。最終産物は、Thraustochytrium aureum ATCC 34304 由来ubiquitin promoterと pcDNA 3.1/ Hygro由来ハイグロマイシン耐性遺伝子の融合した配列になる。
【図１５】作製したpcDNA 3.1/ Hygro由来ハイグロマイシン耐性遺伝子のBglIIカセットを表す。
【図１６】クローニングしたParietichytrium属C20エロンガーゼ配列を含むプラスミドを表す。
【図１７】図１６記載プラスミドのParietichytrium属C20エロンガーゼ配列中にBglIIサイトを挿入したプラスミドを表す。
【図１８】作製したParietichytrium属C20エロンガーゼ遺伝子ターゲティングベクター(2種)を表す。薬剤耐性マーカーとして、ネオマイシン耐性遺伝子（pRH85）もしくはハイグ

ロマイシン耐性遺伝子（pRH86）を有する。
【図１９】Parietichytrium sarkarianum SEK364のC20エロンガーゼ遺伝子破壊株同定に用いたPCR用プライマーの位置、および予想される産物を示した模式図を表す。
【図２０】Parietichytrium sarkarianum SEK364ゲノムDNAを鋳型にしたPCRによるC20エロンガーゼ遺伝子破壊の評価を表す。[符号の説明]　＋/＋：Parietichytrium sarkarianum SEK364 野生型株　＋/－：Parietichytrium sarkarianum SEK364由来C20エロンガーゼ遺伝子1本目アリル相同組換体　－/－：Parietichytrium sarkarianum SEK364由来C20エロンガーゼ遺伝子破壊株
【図２１】Parietichytrium sarkarianum SEK364 野生型株およびC20エロンガーゼ遺伝子破壊株の脂肪酸組成の比較を表す。白棒と黒棒は、それぞれ野生型株と遺伝子破壊株の脂肪酸組成を表している。値は、平均値±標準偏差の値である。
【図２２】Parietichytrium sarkarianum SEK364 野生型株を100%とした時の、C20エロンガーゼ遺伝子破壊株の脂肪酸割合を示す。
【００１８】
【図２３】Fusion PCR に使用したプライマーと産物の模式図を表す。最終産物は、Thraustochytrium aureum ATCC 34304 由来18S rDNA、Thraustochytrium aureum ATCC 34304 由来EF1α promoter、人工合成ネオマイシン耐性遺伝子およびThraustochytrium aureum ATCC 34304 由来EF1α terminator の融合した配列になる。
【図２４】図２３で連結したDNA断片の一部をクローニングしたプラスミドを表す。Thraustochytrium aureum ATCC 34304 由来18S rDNAのEcoRIサイトより3’側の一部配列、Thraustochytrium aureum ATCC 34304 由来EF1α promoter、人工合成ネオマイシン耐性遺伝子、およびThraustochytrium aureum ATCC 34304 由来EF1α terminatorのNcoIサイトより5’側の一部配列を含む。
【図２５】作製したThraustochytrium aureum ATCC 34304 PKS経路関連遺伝子orfAのターゲティングベクターを表す。薬剤耐性マーカーとして、ネオマイシン耐性遺伝子を有する。
【図２６】Thraustochytrium aureum ATCC 34304 PKS経路関連遺伝子orfAの上流配列、Thraustochytrium aureum ATCC 34304 由来ubiquitin promoter、ハイグロマイシン耐性遺伝子を含むプラスミドを表す。
【図２７】作製したThraustochytrium aureum ATCC 34304 PKS経路関連遺伝子orfAのターゲティングベクターを表す。薬剤耐性マーカーとして、ハイグロマイシン耐性遺伝子を有する。
【図２８】Thraustochytrium aureum ATCC 34304のPKS経路関連遺伝子orfA破壊株同定に用いたサザンハイブリダイゼーション解析用プローブの位置、および予想される遺伝子断片のサイズを示した模式図を表す。
【図２９】Thraustochytrium aureum ATCC 34304ゲノムDNAを用いたサザンハイブリダイゼーション法によるPKS経路関連遺伝子orfA遺伝子破壊の評価を表す。[符号の説明]　T.au　：Thraustochytrium aureum ATCC 34304 野生型株　＋/－：Thraustochytrium aureum ATCC 34304由来PKS経路関連遺伝子orfA 1本目アリル相同組換体　－/－：Thraustochytrium aureum ATCC 34304由来PKS経路関連遺伝子orfA遺伝子破壊株
【図３０】Thraustochytrium aureum ATCC 34304 野生型株およびPKS経路関連遺伝子orfA遺伝子破壊株の脂肪酸組成の比較を表す。白棒と黒棒は、それぞれ野生型株と遺伝子破壊株の脂肪酸組成を表している。値は、平均値±標準偏差の値である。
【図３１】Thraustochytrium aureum ATCC 34304 野生型株を100%とした時の、PKS経路関連遺伝子orfA遺伝子破壊株の脂肪酸割合を示す。
【００１９】
【図３２】Fusion PCR に使用したプライマーと産物の模式図を表す。最終産物は、Thraustochytrium aureum ATCC 34304 由来ubiquitin promoterと pTracer-CMV/Bsd/lacZ由来ブラスチシジン耐性遺伝子の融合した配列になる。
【図３３】作製したpTracer-CMV/Bsd/lacZ由来ブラストサイジン耐性遺伝子 BglIIカセッ

トを表す。
【図３４】Fusion PCR に使用したプライマーと産物の模式図を表す。最終産物は、Thraustochytrium aureum ATCC 34304 由来ubiquitin promoterと Enhanced GFP遺伝子（clontech社製）の融合した配列になる。
【図３５】Fusion PCR に使用したプライマーと産物の模式図を表す。最終産物は、Thraustochytrium aureum ATCC 34304 由来ubiquitin promoter、 Enhanced GFP遺伝子（clontech社製）およびpcDNA3.1 Zeo(+) 由来ゼオシン耐性遺伝子の融合した配列になる。
【図３６】作製したEnhanced GFP－ゼオシン耐性融合遺伝子のBglIIカセットを表す。
【図３７】クローニングしたThraustochytrium aureum ATCC 34304 C20エロンガーゼ配列および周辺配列を含むプラスミドを表す。
【図３８】図３７記載プラスミドからThraustochytrium aureum ATCC 34304 C20エロンガーゼ配列を完全に欠失させ、BglIIサイトを挿入したプラスミドを表す。
【図３９】作製したThraustochytrium aureum ATCC 34304 C20エロンガーゼ遺伝子ターゲティングベクター(2種)を表す。薬剤耐性マーカーとして、ブラストサイジン耐性遺伝子（pRH43）もしくはEnhanced GFP－ゼオシン耐性融合遺伝子（pRH54）を有する。
【図４０】Thraustochytrium aureum ATCC 34304 PKS経路（orfA遺伝子）破壊株の、C20エロンガーゼ遺伝子破壊株同定に用いたサザンハイブリダイゼーション解析用プローブの位置、および予想される遺伝子断片のサイズを示した模式図を表す。
【図４１】Thraustochytrium aureum ATCC 34304ゲノムDNAを用いたサザンハイブリダイゼーション法によるC20エロンガーゼ遺伝子破壊の評価を表す。[符号の説明]T.au ：Thraustochytrium aureum ATCC 34304 野生型株－/－：Thraustochytrium aureum ATCC 34304 由来PKS経路（orfA遺伝子）とC20エロンガーゼ遺伝子の2重破壊株
【図４２】Thraustochytrium aureum ATCC 34304 野生型株および、PKS経路（orfA遺伝子）とC20エロンガーゼ遺伝子の2重破壊株の脂肪酸組成の比較を表す。白棒と黒棒は、それぞれ野生型株と遺伝子破壊株の脂肪酸組成を表している。値は、平均値±標準偏差の値である。
【図４３】Thraustochytrium aureum ATCC 34304 野生型株を100%とした時の、PKS経路（orfA遺伝子）とC20エロンガーゼ遺伝子の2重破壊株の脂肪酸割合を示す。
【００２０】
【図４４】Fusion PCR に使用したプライマーと産物の模式図を表す。最終産物は、Thraustochytrium aureum ATCC 34304 由来ubiquitin promoterと Saprolegnia diclina由来・ω3 desaturase遺伝子配列およびThraustochytrium aureum ATCC 34304 由来ubiquitin terminatorの融合した配列になる。
【図４５】図３３記載ブラストサイジン耐性遺伝子BglIIカセットにおける一方 のBglIIサイトをKpnIサイトに置換えたプラスミドを表す。
【図４６】作製したSaprolegnia diclina由来ω3 デサチュラーゼ遺伝子発現プラスミドを表す。薬剤耐性マーカーとして、ブラスチシジン耐性遺伝子を有する。
【図４７】Saprolegnia diclina由来ω3 デサチュラーゼ遺伝子のゲノム挿入確認に用いたPCRプライマーの位置を示した模式図を表す。
【図４８】Thraustochytrium aureum ATCC 34304 PKS経路（orfA遺伝子）破壊株由来の形質転換株の評価を表す。[符号の説明] レーン1～2：形質転換体
【図４９】Thraustochytrium aureum ATCC 34304 PKS経路（orfA遺伝子）破壊株のコントロール株およびω3デサチュラーゼ遺伝子導入株の脂肪酸組成の比較を表す。白棒と黒棒は、それぞれコントロール株とω3デサチュラーゼ遺伝子導入株の脂肪酸組成を表している。値は、平均値±標準偏差の値である。
【図５０】Thraustochytrium aureum ATCC 34304 PKS経路（orfA遺伝子）破壊株を100%とした時の、 ω3デサチュラーゼ遺伝子導入株の脂肪酸割合を示す。
【００２１】
【図５１】Thraustochytrium aureum ATCC 34304由来C20 elongaseを含む配列をクローニングしたpRH59の図を表す。

【図５２】Thraustochytrium aureum ATCC 34304由来C20 elongase内にBglIIサイトを含む配列をクローニングしたpRH64の図を表す。
【図５３】Thraustochytrium aureum ATCC 34304由来C20 elongase内にユビキチンプロモーター、ネオマイシン耐性遺伝子、SV40ターミネーター含む配列をクローニングしたpRH65、及び、Thraustochytrium aureum ATCC 34304由来C20 elongase内にユビキチンプロモーター、ハイグロマイシン耐性遺伝子、SV40ターミネーター含む配列をクローニングしたpRH66の図を表す。
【図５４】PCRにおける野生株アリル及びノックアウト株の予想フラグメントサイズを表す。
【図５５】PCRにおける野生株アリル及びノックアウト株の検出結果を表す。
【図５６】野生株及びC20エロンガーゼノックアウト株の脂肪酸組成を表す。白棒と黒棒は、それぞれ野生株と株の脂肪酸組成を表している。
【図５７】野生株とノックアウト株の脂肪酸組成の比較を表す。
【００２２】
【図５８】クローニングしたThraustochytrium aureum ATCC 34304株のΔ4デサチュラーゼ遺伝子上流1071 bp～Δ4デサチュラーゼ遺伝子内1500 bpの配列を含むプラスミドを表す。
【図５９】図５８記載プラスミドのΔ4デサチュラーゼ遺伝子上流60 bpおよびΔ4デサチュラーゼ遺伝子内の開始コドンを含む556 bpの配列（616 bp、配列番号：205）を欠失させ、かつ、欠失部分にBglII サイトを挿入したプラスミドを表す。
【図６０】作製したThraustochytrium aureum ATCC 34304株のΔ4デサチュラーゼ遺伝子ターゲティングベクター(2種)を表す。薬剤耐性マーカーとして、ブラスチシジン耐性遺伝子（pTM6）もしくはEnhanced GFP－ゼオシン耐性融合遺伝子（pTM8）を有する。
【図６１】Thraustochytrium aureum ATCC 34304 PKS経路（orfA遺伝子）破壊株の、Δ4デサチュラーゼ遺伝子破壊株同定に用いたPCR用プライマーの位置、および予想される産物を示した模式図を表す。
【図６２】Thraustochytrium aureum ATCC 34304株ゲノムDNAを鋳型にしたPCRによるΔ4デサチュラーゼ遺伝子破壊の評価を表す。［符号の説明］＋/＋：Thraustochytrium aureum ATCC 34304 由来PKS経路（orfA遺伝子）破壊株＋/－：Thraustochytrium aureum ATCC 34304 由来PKS経路（orfA遺伝子）破壊株由来の、Δ4デサチュラーゼ遺伝子1本目アリル相同組換体－/－：Thraustochytrium aureum ATCC 34304 由来PKS経路（orfA遺伝子）とΔ4デサチュラーゼ遺伝子の2重破壊株
【図６３】Thraustochytrium aureum ATCC 34304 野生型株および、PKS経路（orfA遺伝子）とΔ4デサチュラーゼ遺伝子の2重破壊株の脂肪酸組成の比較を表す。 白棒と黒棒は、それぞれ野生型株と遺伝子破壊株の脂肪酸組成を表している。
【図６４】Thraustochytrium aureum ATCC 34304 野生型株を100%とした時の、PKS経路（orfA遺伝子）とΔ4デサチュラーゼ遺伝子の2重破壊株の脂肪酸割合を示す。
【００２３】
【図６５】Parietichytrium sp. SEK358株ゲノムDNAを鋳型にしたPCRによるC20エロンガーゼ遺伝子破壊の評価を表す。［符号の説明］＋/＋：Parietichytrium sp. SEK358野生型株－/－：Parietichytrium sp. SEK358株由来C20エロンガーゼ遺伝子破壊株
【図６６】Parietichytrium sp. SEK358野生型株および、Parietichytrium sp. SEK358株由来C20エロンガーゼ遺伝子破壊株の脂肪酸組成の比較を表す。 白棒と黒棒は、それぞれ野生型株と遺伝子破壊株の脂肪酸組成を表している。
【図６７】Parietichytrium sp. SEK358野生型株を100%とした時の、Parietichytrium sp. SEK358株由来C20エロンガーゼ遺伝子破壊株の脂肪酸割合を示す。Parietichytrium sp. SEK358野生型株において、該当する脂肪酸が検出限界以下の場合は斜線で表記した。
【００２４】
【図６８】Parietichytrium sp. SEK571株ゲノムDNAを鋳型にしたPCRによるC20エロンガーゼ遺伝子破壊の評価を表す。［符号の説明］＋/＋：Parietichytrium sp. SEK571野生

型株－/－：Parietichytrium sp. SEK571株由来C20エロンガーゼ遺伝子破壊株
【図６９】Parietichytrium sp. SEK571野生型株および、Parietichytrium sp. SEK571株由来C20エロンガーゼ遺伝子破壊株の脂肪酸組成の比較を表す。 白棒と黒棒は、それぞれ野生型株と遺伝子破壊株の脂肪酸組成を表している。
【図７０】Parietichytrium sp. SEK571野生型株を100%とした時の、Parietichytrium sp. SEK571株由来C20エロンガーゼ遺伝子破壊株の脂肪酸割合を示す。
【００２５】
【図７１】TΔ12dと Thalassiosira pseudonana、Micromonas sp、およびPhaeodactylum tricornutum由来Δ12デサチュラーゼ遺伝子の推定アミノ酸配列の多重アライメントを示す。[符号の説明]下線部：ヒスチジンボックス
【図７２】出芽酵母Sacchromyces cerevisiaeにおけるTΔ12d過剰発現株のGC解析のチャート図と各脂肪酸組成の割合を示す。
【図７３】TΔ12d KOターゲッティングベクター構築スキームを示す。
【図７４】Split marker法による効率的な相同組換え体の取得を目指した相同組換え断片の調製スキームを示す。
【図７５】野生株、TΔ12dの1つ目のアリルを破壊した株、およびTΔ12d破壊株（2つのアリルを破壊した株）における、それぞれのゲノムDNAを鋳型にしたPCRによって、ハイグロマイシン耐性遺伝子、ブラストサイジン耐性遺伝子、およびTΔ12d遺伝子を増幅した結果を示す。[符号の説明]M : λHindIII digest / φX174 HincII digest W : wild-typeS1～S3 : 1st allele knock-out株D1～D3 : 2nd allele knock-out株
【図７６】野生株、TΔ12dの1つ目のアリルを破壊した株、およびTΔ12d破壊株において、RT-PCRによってハイグロマイシン耐性遺伝子、ブラストサイジン耐性遺伝子、およびTΔ12d遺伝子のmRNAを検出した結果を示す。[符号の説明]M : λHindIII digest / φX174 HincII digest W : wild-typeS1～S3 : 1st allele knock-out株D1～D3 : 2nd allele knock-out株
【図７７】野生株、TΔ12dの1つ目のアリルを破壊した株、およびTΔ12d破壊株において、サザンブロッティングの結果を示す。
【図７８】野生株、TΔ12dの1つ目のアリルを破壊した株、およびTΔ12d破壊株において、OD600および乾燥菌体重量測定による増殖率を比較した結果を示す。
【図７９】野生株、TΔ12dの1つ目のアリルを破壊した株、およびTΔ12d破壊株において、各脂肪酸組成の割合を示す。[符号の説明]星印：p<0.01で有意差あり（n=3）
【図８０】野生株、TΔ12dの1つ目のアリルを破壊した株、およびTΔ12d破壊株において、乾燥菌体当たりの各脂肪酸量を示す。[符号の説明]星印：p<0.01で有意差あり（n=3）
【図８１】ブラストサイジン耐性遺伝子を用いた、図39記載のThraustochytrium aureum C20エロンガーゼ遺伝子ターゲティングベクター（pRH43）を改変し、BamHIサイトを挿入したプラスミドを表す。
【図８２】図８１記載プラスミドを改変し、KpnIサイトを挿入したプラスミドを示す。
【図８３】作製したThraustochytrium aureum C20 エロンガーゼ遺伝子ターゲティングかつミズカビ由来ω3デサチュラーゼ発現ベクターを表す。薬剤耐性マーカーとして、ブラスチシジン耐性遺伝子を有する。
【図８４】Thraustochytrium aureum PKS経路（orfA遺伝子）破壊株の、C20エロンガーゼ遺伝子破壊かつミズカビ由来ω3デサチュラーゼ発現株同定に用いたサザンハイブリダイゼーション解析用プローブの位置、および予想される遺伝子断片のサイズを示した模式図を表す。
【図８５】Thraustochytrium aureum ATCC 34304ゲノムDNAを用いたサザンハイブリダイゼーション法によるC20エロンガーゼ遺伝子破壊かつミズカビ由来ω3デサチュラーゼ発現株の評価を表す。[符号の説明]PKSKO ：Thraustochytrium aureum ATCC 34304由来PKS経路（orfA遺伝子）破壊株＋/－：Thraustochytrium aureum ATCC 34304由来PKS経路（orfA遺伝子）破壊株における、C20エロンガーゼ遺伝子1本目アリル相同組換体－/－：Thraustochytrium aureum 由来PKS経路（orfA遺伝子）とC20エロンガーゼ遺伝子の2重破壊かつミ

ズカビ由来ω3デサチュラーゼ発現株
【図８６】Thraustochytrium aureum ATCC 34304 野生型株および、PKS経路（orfA遺伝子）とC20エロンガーゼ遺伝子の2重破壊かつミズカビ由来ω3デサチュラーゼ発現株の脂肪酸組成の比較を表す。 白棒と黒棒は、それぞれ野生型株と遺伝子破壊株の脂肪酸組成を表している。
【図８７】Thraustochytrium aureum ATCC 34304 野生型株を100%とした時の、PKS経路（orfA遺伝子）とC20エロンガーゼ遺伝子の2重破壊かつミズカビ由来ω3デサチュラーゼ発現株の脂肪酸割合を示す。
【図８８】ミズカビ由来ω3デサチュラーゼ発現ベクター作製の土台に使用したプラスミドを表す。
【図８９】図８８記載プラスミドに、ミズカビ由来ω3デサチュラーゼ発現KpnIカセットを挿入したプラスミドを示す。
【図９０】図８９記載プラスミドに、薬剤耐性マーカーとしてハイグロマイシン耐性遺伝子を挿入し、作製したミズカビ由来ω3デサチュラーゼ発現ベクターを表す。
【図９１】ミズカビ由来ω3 デサチュラーゼ遺伝子のゲノム挿入確認に用いたPCRプライマーの位置を示した模式図を表す。
【図９２】Parietichytrium sp. SEK571 C20エロンガーゼ遺伝子破壊株由来の形質転換株の評価を表す。[符号の説明] レーン1～2：形質転換体
【図９３】Parietichytrium sp. SEK571 野生型株および、C20エロンガーゼ遺伝子破壊かつミズカビ由来ω3デサチュラーゼ発現株の脂肪酸組成の比較を表す。 白棒と黒棒は、それぞれ野生型株と形質転換株の脂肪酸組成を表している。
【図９４】Parietichytrium sp. SEK571野生型株を100%とした時の、C20エロンガーゼ遺伝子破壊かつミズカビ由来ω3デサチュラーゼ発現株の脂肪酸割合を示す。
【図９５】Schizochytrium属由来C20エロンガーゼ遺伝子を含む配列をクローニングしたpRH70の図を表す。
【図９６】Schizochytrium属由来C20エロンガーゼ内にBglIIサイトを含む配列をクローニングしたpRH71の図を表す。
【図９７】Schizochytrium属由来C20エロンガーゼ内にユビキチンプロモーター、ネオマイシン耐性遺伝子、SV40ターミネーター含む配列をクローニングしたpRH73、及び、Schizochytrium属由来C20エロンガーゼ内にユビキチンプロモーター、ハイグロマイシン耐性遺伝子、SV40ターミネーター含む配列をクローニングしたpKS-SKOの図を表す。
【図９８】PCRにおける野生株アリル及びノックアウト株の予想フラグメントサイズを表す。
【図９９】PCRにおける野生株アリル及びノックアウト株の検出結果を表す。
【図１００】野生株及びC20エロンガーゼノックアウト株の脂肪酸組成を表す。白棒と黒棒は、それぞれ野生株と株の脂肪酸組成を表している。
【図１０１】野生株とノックアウト株の脂肪酸組成の比較を表す。
【発明を実施するための形態】
【００２６】
近年、脂質の生理活性や薬理作用についての研究が進み不飽和脂肪酸の代謝において様々の化学物質への変換とその働きについての解明がなされている。特に飽和脂肪酸、モノエン酸、不飽和脂肪酸の栄養学上の好ましい比率やエイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸等の魚油由来のω3系（n-3系ともいう）の脂肪酸とリノール酸を中心とする植物由来のω6系（n-6系ともいう）の脂肪酸の比率が疾病との関連の中で重用視されている。しかしながら、動物は脂肪酸不飽和化酵素（デサチュラーゼ、desaturase）の欠損または低下から一部の不飽和脂肪酸を食物として摂取しなければならない。これらの脂肪酸を必須脂肪酸（またはビタミンＦ）とよび、リノール酸（LA）、γ－リノレン酸（GLA）、アラキドン酸（AAまたはARA）等がこれにあたる。
【００２７】
不飽和脂肪酸の生成には、脂肪酸不飽和化酵素（デサチュラーゼ）という酵素が関与す

る。脂肪酸不飽和化酵素（デサチュラーゼ）には（１）脂肪酸のカルボニル基から決まった位置に二重結合（不飽和結合ともいう）を作るタイプ（例：Δ9デサチュラーゼはカルボニル炭素を1番目の炭素とした場合の、9番目の位置に二重結合を作る。）および（２）脂肪酸のメチル末端から特定の位置に二重結合を作るタイプ（例：ω3デサチュラーゼはメチル末端を1番目とした場合の、3番目の位置に二重結合を作る） があり、これらデサチュラーゼによる二重結合の生成（不飽和化）と、いくつかの異なるエロンガーゼによる鎖長延長が繰り返されることにより、不飽和脂肪酸が生合成されることが知られている。例えば、Δ9デサチュラーゼは、体内でパルミチン酸から合成されたか外部から直接摂取されたステアリン酸を不飽和化することによってオレイン酸（OA）を合成する。またΔ6、Δ5、Δ4デサチュラーゼはアラキドン酸（AA）、エイコサペンタエン酸（EPA）、そしてドコサヘキサエン酸（DHA）のような高度不飽和脂肪酸の合成に必要な脂肪酸不飽和化酵素（デサチュラーゼ）である。

【００２８】

一方、ストラメノパイルに属するラビリンチュラ類（Labyrinthulomycetes）には、ヤブレツボカビ科（スラウストキトリウム科とも言う）（Thraustochytriaceae）およびラビリンチュラ科（Labyrinthulaceae）の２つの科が存在する。これらはアラキドン酸、EPA、DTA、DPA、DHA等の高度不飽和脂肪酸を蓄積する微生物として知られている。

【００２９】

本発明は、ストラメノパイルの遺伝子を遺伝子工学的に破壊あるいは発現抑制することを特徴とするストラメノパイルの形質転換方法に関するものである。特に、脂肪酸生合成に関連する遺伝子を破壊あるいは発現抑制する形質転換方法、それによるストラメノパイルの脂肪酸組成の改変方法、ストラメノパイルに高度に脂肪酸を蓄積させる方法及び不飽和脂肪酸含量の増加したストラメノパイル、これら不飽和脂肪酸含量の増加したストラメノパイルから不飽和脂肪酸を生産する方法を開発し、提供することが可能となった。

本発明は、ストラメノパイルのエロンガーゼ／デサチュラーゼ経路を構成する酵素を操作してストラメノパイルが産生する脂肪酸組成を変化させることを含むものであり、特に、（１）脂肪酸鎖長伸長酵素遺伝子の破壊または／および発現抑制、（２）ポリケチド合成酵素遺伝子の破壊または／および発現抑制、（３）脂肪酸不飽和化酵素の破壊または／および発現抑制、（３）ポリケチド合成酵素遺伝子、脂肪酸鎖長伸長酵素遺伝子、または脂肪酸不飽和化酵素のうち二者あるいは全ての破壊または／および発現抑制、（４）脂肪酸鎖長伸長酵素遺伝子の破壊または／および発現抑制および脂肪酸不飽和化酵素遺伝子の導入、（５）ポリケチド合成酵素遺伝子の破壊または／および発現抑制および脂肪酸不飽和化酵素遺伝子の導入、（６）脂肪酸不飽和化酵素の破壊または／および発現抑制および脂肪酸不飽和化酵素遺伝子の導入、（６）ポリケチド合成酵素遺伝子、脂肪酸鎖長伸長酵素遺伝子、または脂肪酸不飽和化酵素のうち二者あるいは全ての破壊または／および発現抑制および脂肪酸不飽和化酵素遺伝子の導入、によってストラメノパイルが産生する脂肪酸組成を改変することができる。

【００３０】

次に、本発明について更に詳細に説明する。

［微生物］

本発明の脂肪酸改変方法で用いる微生物としては、脂肪酸生合成に関連する遺伝子を破壊または／および発現抑制することにより脂肪酸組成が改変されるであろうと思われるストラメノパイルであれば特に限定されないが、特に好ましくはラビリンチュラ類を対象とする。ラビリンチュラ類としては、ラビリンチュラ属(Labyrinthula)、アルトルニア属(Althornia)、アプラノキトリウム属（Aplanochytrium）、イァポノキトリウム属(Japonochytrium)、ラビリンチュロイデス属（Labyrinthuloides）、シゾキトリウム属(Schizochytrium)、ヤブレツボカビ属(Thraustochytrium)、またはウルケニア属(Ulkenia)、アウランティオキトリウム属(Aurantiochytrium)、オブロンギキトリウム属（Oblongichytrium）、ボトリオキトリウム属（Botryochytrium）、パリエティキトリウム属（Parietichytrium）、またはシクヨイドキトリウム属（Sicyoidochytrium）に属するものが挙げられる。

尚、学術的に、ラビリンチュロイデス属（Labyrinthuloides）はアプラノキトリウム属（Aplanochytrium）と同義と解釈されている（Leander, Celeste A. & David Porter, Mycotaxon, vol.76, 439-444 (2000)）。

【００３１】

本発明で用いるラビリンチュラ類としては、ヤブレツボカビ属(Thraustochytrium)、およびパリエティキトリウム属（Parietichytrium）に属する微生物が好ましく、その中でも特に好ましくは、Thraustochytrium aureum、Parietichytrium sarkarianum、Thraustochytrium roseumが挙げられ、具体的にはThraustochytrium aureum ATCC 34304、Parietichytrium sarkarianum SEK 364(FERM B P-11298)、Thraustochytrium roseum ATCC 28210、Parietichytrium sp. SEK358（FERM BP-11405）、またはParietichytrium sp. SEK571（FERM BP-11406）の菌株が挙げられる。Thraustochytrium aureum ATCC 34304及びThraustochytrium roseum ATCC 28210はATCCに寄託されており、一般に分譲されている。Parietichytrium sarkarianum SEK364株は、石垣島・吹通川の河口域で採取した表層水 10 mLを試験管に入れ、松花粉を添加して室温で放置した。７日後に松花粉を無菌寒天培地（2 gグルコース, １ｇ ペプトン, 0.5 ｇ 酵母エキス, 0.2 ｇ クロラムフェニコール, 15 ｇ 寒天, 蒸留水 100 mL, 海水900mL）に塗布し、５日後に出現したコロニーを分離し培養することを数回繰り返し、菌体を分離した。この株は独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（茨城県つくば市東1-1-1中央第6）に受託番号（FERM BP-11298）として平成22年9月24日に国際寄託されており、そこから入手可能である。Parietichytrium sp. SEK358株は、石垣島・宮良川河口域から採取した海水サンプルを、上記同様に培養し菌体を分離した。この株は独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（茨城県つくば市東1-1-1中央第6）に受託番号（FERM BP-11405）として平成23年8月11日に国際寄託されており、そこから入手可能である。Parietichytrium sp. SEK571株は、西表島・後良川河口域から採取した海水サンプルを、上記同様に培養し菌体を分離した。この株は独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（茨城県つくば市東1-1-1中央第6）に受託番号（FERM BP-11406）として平成23年8月11日に国際寄託されており、そこから入手可能である。Schizochytrium sp. TY12Ab株は、種子島の沿岸で採取された枯れ葉から、上記同様に培養し菌体を分離した。この株は独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（茨城県つくば市東1-1-1中央第6）に受託番号（FERM ABP-11421）として平成23年9月29日に国際寄託されており、そこから入手可能である。

【００３２】

［脂肪酸生合成に関連する遺伝子］

本発明における脂肪酸生合成関連遺伝子は、ストラメノパイル、特にラビリンチュラ類において脂肪酸生合成に関連する酵素の遺伝子であれば特に限定されない。このような遺伝子として、ポリケチド合成酵素遺伝子、脂肪酸鎖長伸長酵素（エロンガーゼ）遺伝子、あるいは脂肪酸不飽和化酵素遺伝子が挙げられる。本発明においては、これらのうちどちらか片方、あるいは両方とも遺伝子工学的に破壊あるいは発現抑制の対象とする。この時、遺伝子破壊または／および発現抑制の対象となる遺伝子は、そのストラメノパイルにおいてもしポリケチド合成酵素が所望の脂肪酸以外の脂肪酸を産生する場合は、例えばそのオープンリーディングフレームが対象となる。また脂肪酸鎖長伸長酵素であれば、所望の脂肪酸を他の脂肪酸に変換する酵素に関連する遺伝子が対象となり、例えばエイコサペンタエン酸（EPA）を所望する時には、エイコサペンタエン酸をドコサペンタエン酸（DPA）に変換するのに関わる脂肪酸鎖長伸長酵素の遺伝子、具体的にはC20エロンガーゼ遺伝子を破壊または／および発現抑制すれば良い。また脂肪酸不飽和化酵素であれば、所望の脂肪酸を他の脂肪酸に変換する酵素に関連する遺伝子が対象となり、例えばオレイン酸を所望する時には、オレイン酸をリノール酸に変換するのに関わる脂肪酸不飽和化酵素の遺伝子、具体的にはΔ12デサチュラーゼ遺伝子を破壊または／および発現抑制すれば良い。また所望の脂肪酸に応じてポリケチド合成酵素遺伝子、脂肪酸鎖長伸長酵素（エロンガーゼ）遺伝子、あるいは脂肪酸不飽和化酵素のうち２者又は全てについて遺伝子破壊または／および発現抑制しても良い。

【００３３】
さらに、上記の通り遺伝子工学的に遺伝子破壊または／および発現抑制した形質転換株に、脂肪酸生合成に関連する遺伝子を導入しても良い。この際、導入する遺伝子は所望する脂肪酸を生合成する酵素に関連する遺伝子が対象となり、例えばエイコサペンタエン酸を所望する時には、アラキドン酸（AA）をエイコサペンタエン酸に変換する脂肪酸不飽和化酵素の遺伝子、具体的にはω3デサチュラーゼ遺伝子を導入すれば良い。
【００３４】
［ポリケチド合成酵素及び脂肪酸鎖長伸長酵素］
ポリケチド合成酵素（ポリケチドシンターゼ 、polyketide synthase, PKS）はスター
ター基質（アセチル-CoA、脂肪酸CoAエステル、ベンゾイルCoA、クマロイル CoA）に伸長
鎖基質 (マロニルCoAなど)を複数回縮合する反応を触媒する酵素であり、一般に植物や真菌等の二次代謝産物の生合成に関わる酵素として知られているが、ある種の生物においては高度不飽和脂肪酸の生合成にも関与することが報告されている。例えば海洋細菌Shewanellaはこの酵素によりエイコサペンタエン酸（EPA）を生産する（非特許文献８）。ある種のストラメノパイルでもポリケチド合成酵素が同様に高度不飽和脂肪酸の生合成に関わることが知られており、またラビリンチュラ類ではその遺伝子配列も明らかにされている。例えば特許文献７に記載のように、Schizochytrium属のラビリンチュラのポリケチド合成酵素遺伝子はOrfA、OrfB、OrfCの3つのオープン・リーディング・フレームからなる。また特許文献８に記載のように、Ulkenia属のラビリンチュラのポリケチド合成酵素遺伝子も3つのオープン・リーディング・フレームを持つとされている。
また、本発明の脂肪酸鎖長伸長酵素（エロンガーゼ、elongase）は、脂肪酸の鎖長を伸長する機能を有するものであれば特に限定されないが、C18エロンガーゼ遺伝子、C20エロンガーゼ遺伝子を好適に例示することができる。かかるC18エロンガーゼ遺伝子、C20エロンガーゼ遺伝子は、炭素数18、20の脂肪酸をそれぞれ２炭素鎖ずつ伸長して炭素数20、22の脂肪酸とするものであり、これらの脂肪酸鎖長伸長酵素は様々な生物に広く存在するが、ストラメノパイルにも存在し例えばThraustochytrium属のラビリンチュラ類にも存在することが報告されている（非特許文献９）。C18エロンガーゼはγ－リノレン酸（GLA）からジホモ－γ－リノレン酸（DGLA）への変換およびステアリドン酸（STA）からエイコサテトラエン酸（ETA）への変換を触媒する。C20エロンガーゼはアラキドン酸（AA）からドコサテトラエン酸（DTA）への変換およびエイコサペンタエン酸（EPA）からn-3 ドコサペンタエン酸（DPA, 22:5n-3）への変換を触媒する。
【００３５】
したがい、例えばステアリドン酸（STA）を所望する時には、ステアリドン酸をエイコサテトラエン酸（ETA）に変換するのに関わる脂肪酸鎖長伸長酵素の遺伝子、具体的にはC18エロンガーゼ遺伝子を破壊または／および発現抑制すれば良い。また例えばエイコサペンタエン酸（EPA）を所望する時には、エイコサペンタエン酸をドコサペンタエン酸（DPA）に変換するのに関わる脂肪酸鎖長伸長酵素の遺伝子、具体的にはC20エロンガーゼ遺伝子を破壊または／および発現抑制すれば良い。さらに、当該ストラメノパイルにおいてもし所望以外の脂肪酸がポリケチド合成酵素によって生合成される場合は、ポリケチド合成酵素遺伝子を破壊または／および発現抑制すれば良い。なお、非特許文献５ではSchizochytrium属のラビリンチュラのポリケチド合成酵素遺伝子を破壊した株はドコサヘキサエン酸を生合成する能力を失い、高度不飽和脂肪酸を加えた培地以外では生育できないという結果を示している。しかし本発明においては、ある種のラビリンチュラはポリケチド合成酵素遺伝子を破壊しても、高度不飽和脂肪酸を加えない培地でも生育が可能であり、上述のような遺伝子の破壊や発現抑制によって所望する高度不飽和脂肪酸を得ることが可能である。
【００３６】
［脂肪酸不飽和化酵素］
本発明の脂肪酸不飽和化酵素（デサチュラーゼ、desaturase）は脂肪酸不飽和化酵素としての機能を有するものであれば特に限定されない。脂肪酸不飽和化酵素遺伝子としては

動物由来、植物由来等その由来は特に制限されないが、Δ4デサチュラーゼ遺伝子、Δ5デサチュラーゼ遺伝子、Δ6デサチュラーゼ遺伝子、Δ12デサチュラーゼ遺伝子、ω3デサチュラーゼ遺伝子等の脂肪酸不飽和化酵素遺伝子を好適に例示することができ、これらは単独でまたは多重に用いることができる。かかるΔ4デサチュラーゼ遺伝子、Δ5デサチュラーゼ遺伝子、Δ6デサチュラーゼ遺伝子、Δ12デサチュラーゼ遺伝子は、脂肪酸の末端カルボキシル基の炭素（デルタエンド）から数えて、それぞれ４番目、５番目、６番目、１２番目の炭素において不飽和結合を形成するものであり、これらの脂肪酸不飽和化酵素遺伝子としては、例えば微細藻類由来のΔ4デサチュラーゼ遺伝子（非特許文献６）を具体的に挙げることができる。さらに具体的には、Δ5デサチュラーゼとしては、T. aureum由来Δ5デサチュラーゼ、Thraustochytrium sp. ATCC 26185, Dictyostelium discoideum, Rattus norvegicus, Mus musculus, Homo sapiens, Caenorhabditis elegans, Leishmania major由来するΔ5デサチュラーゼ等が例示される。また、Δ12デサチュラーゼとしては、ピンギオ藻Pinguiochrysis pyriformis由来Δ12デサチュラーゼ、真菌および原虫由来Δ12デサチュラーゼが例示される。ω3デサチュラーゼは、脂肪酸の炭素鎖のメチル末端から数えて３番目の位置に二重結合を形成するものであり、例えばミズカビ由来のω3デサチュラーゼ（非特許文献１０）等が例示される。Δ5デサチュラーゼは、例えば、ジホモ－γ－リノレン酸（DGLA）からアラキドン酸（AA）への変換およびエイコサテトラエン酸（ETA）からエイコサペンタエン酸（EPA）への変換を触媒する。Δ6デサチュラーゼは例えば、リノール酸（LA）からγ－リノレン酸（GLA）への変換およびα－リノレン酸（ALA）からステアリドン酸（STA）への変換を触媒する。ω3デサチュラーゼはアラキドン酸からエイコサペンタエン酸への変換を触媒する。また、リノール酸（LA）はオレイン酸（OA）からΔ12デサチュラーゼにより生産される。

【００３７】

［産生不飽和脂肪酸］

ストラメノパイル内で発現する脂肪酸不飽和化酵素により生成される不飽和脂肪酸は、例えば、炭素数１８～２２の不飽和脂肪酸である。用いる脂肪酸不飽和化酵素の種類や脂肪酸基質の種類によって異なるが、ドコサヘキサエン酸(DHA)やエイコサペンタエン酸（EPA）を好適に例示することができ、これらの他にα－リノレン酸（ALA)、オクタデカテトラエン酸（OTA、18:4n-3)、エイコサテトラエン酸（ETA、20:4n-3)、n-3ドコサペンタエン酸（DPA、22:5n-3)、テトラコサペンタエン酸（TPA、24:5n-3)、テトラコサヘキサエン酸（THA、24:6n-3)、リノール酸(LA)、γ-リノレン酸(GLA)、エイコサトリエン酸(20:3n-6)、アラキドン酸(AA)、n-6ドコサペンタエン酸(DPA, 22:5n-6)等を挙げることができる。

【００３８】

［脂肪酸生合成関連酵素遺伝子源］

本発明においてポリケチド合成酵素、脂肪酸鎖長伸長酵素（エロンガーゼ）、および／または脂肪酸不飽和化酵素遺伝子源として利用できる生物は、特に属、種あるいは株などを限定するものではなく、高度不飽和脂肪酸生産能を有する生物であればいずれのものでも用いることができる。これらの生物は、例えば微生物であれば公的微生物寄託機関で容易に入手することができる。このような微生物としては、モリテラ属（Moritella）に属する細菌モリテラ・マリナ（Moritella marina）MP-1株（ATCC15381）等が例示され、デサチュラーゼおよびエロンガーゼ遺伝子源の例として本株を用いる場合の方法について以下に説明する。しかしながら、ここで示す方法はデサチュラーゼ/エロンガーゼ経路を有する全ての生物種から、その構成遺伝子であるデサチュラーゼおよびエロンガーゼ遺伝子の単離を行う際に適応が可能である。

MP-1株からデサチュラーゼおよび/もしくはエロンガーゼ遺伝子を単離するためには、それぞれの目的酵素遺伝子のアミノ酸配列において、保存された領域を推定することが必要である。例えば、デサチュラーゼにおいては一つのシトクロムb5ドメインと3つのヒスチジンボックス、エロンガーゼにおいては２つのヒスチジンボックスが生物種を通して保存されていることが知られている。より具体的には、様々な生物種由来の既知のデサチュ

ラーゼもしくはエロンガーゼ遺伝子のアミノ酸配列を、clustal wプログラム（非特許文献７）を使用した多重アライメントによって比較することで、目的酵素の保存領域を推定することができる。さらには、既知の他生物由来デサチュラーゼおよび/もしくはエロンガーゼにおいて、同じ基質特異性を有するデサチュラーゼもしくはエロンガーゼ遺伝子のアミノ酸配列を多重アライメントによって比較することで、同じ基質特異性を有するデサチュラーゼおよび/もしくはエロンガーゼに特異的な保存領域を推定することも可能である。次に、推定した保存領域を元に様々な縮重オリゴヌクレオチドプライマーを作製し、MP-1株由来cDNAライブラリーを鋳型にしたPCR、RACE法などを行うことで、MP-1株由来目的遺伝子の部分配列を増幅する。引き続き、得た増幅産物をプラスミドベクターにクローニング後、常法により塩基配列を決定し、既知の酵素遺伝子と比較することにより、MP-1株より目的酵素遺伝子の一部が単離できたことを確認する。目的酵素遺伝子全長取得には、得た部分配列をプローブとしたハイブリダイゼーション法によるスクリーニング、もしくは目的遺伝子の部分配列から作製したオリゴヌクレオチドプライマーを用いたRACE法を行う。

ポリケチド合成酵素は、特許文献７に記載のPUFA PKSの配列を参考に、常法によってクローニングすることができる。

［その他遺伝子源］

GFP（Green Fluorescent Protein）は 非特許文献１１あるいは非特許文献１２、EGFP（Enhanced GFP）は 特許文献６、ネオマイシン耐性遺伝子は非特許文献１３が、それぞれ参考になる。

【００３９】

［ストラメノパイルの脂肪酸生合成関連遺伝子の破壊］

ストラメノパイルの脂肪酸生合成関連遺伝子の破壊方法としては、従来の微生物への遺伝子破壊する方法が適用でき、組換え発現ベクターを細胞に導入して形質転換する方法を挙げることができる。

例えば、Thraustochytrium aureumの遺伝子を破壊する場合には、まずThraustochytrium aureumから常法によりゲノムDNAを抽出し、ゲノムライブラリを作製する。次に破壊対象となる目的遺伝子のDNA配列を基にゲノムウォーキング用プライマーを設定し、作製したゲノムライブラリを鋳型にPCRを行い、Thraustochytrium aureumの目的遺伝子の上流配列および下流配列を取得する。取得した配列を遺伝子破壊の際の相同組換領域として両側に配し、間に選択のための薬剤マーカー遺伝子を挿入する。このDNAを線状化し、遺伝子銃法にてThraustochytrium aureumに導入、薬剤含有プレート上で約1週間培養する。薬剤耐性を獲得した細胞から常法によりゲノムDNAを抽出し、PCR法ないしはサザンハイブリダイゼーション法にて相同組換株の同定を行う。Thraustochytrium aureumは2倍体であることから、線状化したDNAを遺伝子銃法にて細胞に導入し、相同組換株を同定するまでの工程を2回繰り返すことにより、目的遺伝子が破壊されたThraustochytrium aureumを得ることができる。目的遺伝子が2以上ある場合には、以上の操作を繰り返すことにより、2以上の目的遺伝子の破壊された株を得ることができる。この時、Thraustochytrium aureumが2倍体であることから、1つの遺伝子につき2種類ずつ、選択マーカーを用意する必要がある。

【００４０】

また、例えば、Parietichytrium sarkarianumのC20エロンガーゼを破壊する場合には、まずParietichytrium 属より常法によりゲノムDNAを抽出し、ゲノムを解読する。既知のC20エロンガーゼ遺伝子と相同性の高い遺伝子配列を検索し、この遺伝子配列の開始コドンから終止コドンまでをPCRにて増幅する。遺伝子配列のほぼ中央に、突然変異導入法により制限酵素サイトを挿入し、この制限酵素サイトに選択のための薬剤マーカー遺伝子カセットを挿入する。このDNAを線状化し、遺伝子銃法にてParietichytrium sarkarianum SEK364に導入、薬剤含有プレート上で約1週間培養する。薬剤耐性を獲得した細胞から常法によりゲノムDNAを抽出し、PCR法にて相同組換株の同定を行う。Parietichytrium sarkarianum SEK364が2倍体であることから、線状化したDNAを遺伝子銃法にて細胞に導入し、相同組

換株を同定するまでの工程を2回繰り返すことにより、C20エロンガーゼ遺伝子が破壊されたParietichytrium sarkarianum SEK364を得ることができる。この時、Parietichytrium sarkarianum SEK364が2倍体であることから、2種類の選択マーカーを用意する必要がある。

また、例えば、Thraustochytrium aureum ATCC 34304 由来OrfA破壊株のΔ4デサチュラーゼを破壊する場合には、まずThraustochytrium aureum ATCC 34304より常法によりゲノムDNAを抽出し、ゲノムを解読する。既知のΔ4デサチュラーゼと相同性の高い遺伝子配列を検索し、この遺伝子配列の上流領域から終止コドン付近までをPCRにて増幅する。突然変異導入法により、開始コドンを含むORFの一部を欠損させると同時に制限酵素サイトを挿入し、この制限酵素サイトに選択のための薬剤マーカー遺伝子カセットを挿入する。このDNAを線状化し、遺伝子銃法にてThraustochytrium aureum ATCC 34304 由来OrfA破壊株に導入、薬剤含有プレート上で約1週間培養する。薬剤耐性を獲得した細胞から常法によりゲノムDNAを抽出し、PCR法にて相同組換株の同定を行う。Thraustochytrium aureum ATCC 34304が2倍体であることから、線状化したDNAを遺伝子銃法にて細胞に導入し、相同組換株を同定するまでの工程を2回繰り返すことにより、Δ4デサチュラーゼ遺伝子が破壊されたThraustochytrium aureum ATCC 34304 由来OrfA破壊株を得ることができる。この時、Thraustochytrium aureum ATCC 34304が2倍体であることから、2種類の選択マーカーを用意する必要がある。

【００４１】

また、Thraustochytrium roseumのC20エロンガーゼを破壊する目的で、Thraustochytrium aureumのC20エロンガーゼ遺伝子配列を用いた。Thraustochytrium aureumより、常法によりゲノムDNAを抽出し、C20エロンガーゼ遺伝子の開始コドンから終止コドンまでをPCRにて増幅する。遺伝子配列のほぼ中央に、突然変異導入法により制限酵素サイトを挿入し、この制限酵素サイトに選択のための薬剤マーカー遺伝子カセットを挿入する。このDNAを線状化し、遺伝子銃法にてThraustochytrium roseumに導入、薬剤含有プレート上で約1週間培養する。薬剤耐性を獲得した細胞から常法によりゲノムDNAを抽出し、PCR法にて相同組換株の同定を行う。Thraustochytrium roseumが2倍体であることから、線状化したDNAを遺伝子銃法にて細胞に導入し、相同組換株を同定するまでの工程を2回繰り返すことにより、C20エロンガーゼ遺伝子が破壊されたThraustochytrium roseumを得ることができる。この時、Thraustochytrium roseumが2倍体であることから、2種類の選択マーカーを用意する必要がある。

【００４２】

本発明におけるストラメノパイルの脂肪酸生合成関連遺伝子の破壊の詳細については、実施例に具体的に記載した。また、形質転換の対象となるストラメノパイルも特に限定されるものではなく、前述するように、ラビリンチュラ類を好適な例として挙げることができる。

例えば、Parietichytrium sp. SEK358株のC20エロンガーゼを破壊するため、実施例３－６で作製したパリエティキトリウム属C20エロンガーゼ遺伝子ターゲティングベクターを使用した。このDNAを線状化し、遺伝子銃法にてParietichytrium sp. SEK358株に導入、薬剤含有プレート上で約1週間培養する。薬剤耐性を獲得した細胞から常法によりゲノムDNAを抽出し、PCR法にて相同組換株の同定を行った（実施例９参照）。また、例えば、Parietichytrium sp. SEK571株のC20エロンガーゼを破壊するため、実施例３－６で作製したパリエティキトリウム属C20エロンガーゼ遺伝子ターゲティングベクターを使用した。このDNAを線状化し、遺伝子銃法にてParietichytrium sp. SEK571株に導入、薬剤含有プレート上で約1週間培養する。薬剤耐性を獲得した細胞から常法によりゲノムDNAを抽出し、PCR法にて相同組換株の同定を行った（実施例１０参照）。

【００４３】

発現ベクターとしては特に限定されるものではなく、遺伝子が挿入された組換え発現ベクターが挙げられる。組換え発現ベクターの作製には、プラスミド、ファージ、またはコスミド等を用いることができるが特に限定されるものではない。また、作製方法も公知の

方法を用いて行えばよい。ベクターの具体的な種類は特に限定されるものではなく、宿主細胞中で発現可能なベクターを適宜選択すればよい。すなわち、宿主細胞の種類に応じて、確実に遺伝子を発現させるために適宜プロモータ配列を選択し、これと本発明の遺伝子を各種プラスミド等に組み込んだものを発現ベクターとして用いればよい。ベクターは環状あるいは線状化したものを用いることができる。発現ベクターには、好ましくは少なくとも１つの選択マーカーを含む。このような選択マーカーとしては、栄養要求性マーカー、薬剤耐性マーカー、蛍光蛋白質マーカー、あるいはこれらの融合マーカーなどが挙げられ、例えば栄養要求性マーカーとしてはジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子など、薬剤耐性マーカーとしてはネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子、ブラストサイジン耐性遺伝子、ゼオシン耐性遺伝子など、蛍光蛋白質マーカーとしてはGFP、Enhanced GFP(EGFP)など、また融合マーカーとしては例えば蛍光蛋白質マーカーと薬剤耐性マーカーを融合させたもの、具体的にはGFP融合ゼオシン耐性遺伝子などが挙げられる。これら選択マーカーを用いれば、本発明に係るポリヌクレオチドが宿主細胞に導入されたか否か、さらには宿主細胞中で確実に発現しているか否かを確認することができる。あるいは、本発明に係る脂肪酸不飽和化酵素を融合ポリペプチドとして発現させてもよく、例えば、GFPをマーカーとして用い、本発明に係る脂肪酸不飽和化酵素をGFP融合ポリペプチドとして発現させてもよい。

【００４４】

遺伝子破壊のための遺伝子導入方法としては、エレクトロポレーションまたは遺伝子銃を用いることが好ましい。本発明においては、脂肪酸生合成関連遺伝子が破壊されることによって、当該遺伝子を破壊する前と比較して、細胞の脂肪酸組成が変化する。すなわち、脂肪酸生合成関連遺伝子が破壊されることにより、脂肪酸組成の改変という効果が得られる。さらに、このようにして脂肪酸生合成関連酵素遺伝子を破壊したストラメノパイルに、脂肪酸不飽和化酵素遺伝子を導入することにより、所望の脂肪酸をより多く得ることも可能となる。この時、さらに導入する脂肪酸不飽和化酵素遺伝子として、ω3デサチュラーゼ遺伝子を導入することが好適である。

【００４５】

ストラメノパイルの形質転換により、産生する脂肪酸組成が改変されたストラメノパイル（微生物）が得られる。この脂肪酸生合成関連遺伝子が破壊されてなるストラメノパイルは、例えば、不飽和脂肪酸の製造に利用することができる。不飽和脂肪酸の製造には、上述の産生脂肪酸組成が改変されたストラメノパイルを使用すればよく、その他の工程、製造設備・器具等の諸条件については、特に限定されるものではない。不飽和脂肪酸の製造には、上述の改変方法によって産生する脂肪酸組成が改変された微生物を培養する工程を含み、微生物およびその培地を利用して、不飽和脂肪酸を製造する。

【００４６】

上記細胞の培養条件（培地、培養温度、通気状態等）は、細胞の種類や、目的とする不飽和脂肪酸の種類、その量等に応じて適宜設定することができる。なお、本発明での不飽和脂肪酸とは、不飽和脂肪酸を含む物質をも意味し、その含有量、純度、形状、組成、等は特に限定されるものではない。つまり、本発明では、脂肪酸組成が改変された細胞またはその培地自体を、不飽和脂肪酸とみなしてもよい。また、この細胞または培地から不飽和脂肪酸を精製する工程をさらに含んでいてもよい。不飽和脂肪酸を精製する方法としては、不飽和脂肪酸を始めとする脂質（複合脂質を含む）の精製方法として公知である方法を適用することができる。

【００４７】

［ストラメノパイルに高度に不飽和脂肪酸を蓄積させる方法］

ストラメノパイルに不飽和脂肪酸を蓄積させるには、形質転換した本発明のストラメパイルを培養することにより達成される。例えば、通常用いられる固体培地あるいは液体培地等で培養する。この時、用いられる培地としては、例えば炭素源としてグルコース、フルクトース、サッカロース、デンプン、グリセリン等、また窒素源として酵母エキス、コーンスティープリカー、ポリペプトン、グルタミン酸ナトリウム、尿素、酢酸アンモニウ

ム、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸ナトリウム等、また無機塩としてリン酸カリウム等、その他必要な成分を適宜組み合わせた培地であり、ラビリンチュラ類を培養するために通常用いられるものであれば特に限定されないが、特に好ましくは酵母エキス・グルコース培地（GY培地）が用いられる。培地は調製後、pHを３．０～８．０の範囲内に調整した後、オートクレーブ等により滅菌して用いる。培養は、１０～４０℃、好ましくは１５～３５℃にて、１～１４日間、通気撹拌培養、振とう培養、あるいは静置培養で行えば良い。

【００４８】

産生した不飽和脂肪酸を回収するには、ストラメノパイルを培地で生育し、その培地から得た微生物細胞を処理し、細胞内脂質（高度不飽和脂肪酸を含む油脂含有物あるいは高度不飽和脂肪酸）を放出させ、 その放出された細胞内脂質を含む培地から脂質を回収する。すなわち、このようにして培養したストラメノパイルを遠心分離等回収し、細胞を破砕し定法に従い適当な有機溶媒を用いて細胞内の脂肪酸を抽出することにより、高度不飽和脂肪酸含有率の増加した油脂を得ることができる。

【００４９】

本発明は、脂肪酸生合成関連遺伝子、詳しくはポリケチド合成酵素、脂肪酸鎖長伸長酵素、および／または脂肪酸不飽和化酵素遺伝子を破壊または／および発現抑制した形質転換ストラメノパイルを培養することにより、ストラメノパイルが産生する脂肪酸の組成が改変されるが、これはストラメノパイルの脂肪酸生合成関連遺伝子が破壊または／および発現抑制されたことにより、当該ストラメノパイルにおいて所望の脂肪酸がさらに別の脂肪酸に変換されることなく蓄積されることによる。また、遺伝子破壊または／および発現抑制した形質転換ストラメノパイルにさらに脂肪酸不飽和化酵素関連遺伝子を導入することにより、所望の脂肪酸の前駆脂肪酸の所望の脂肪酸への変換能を強化することにより、所望の脂肪酸が蓄積されることによる。

【００５０】

また、本発明の不飽和脂肪酸は、種々の医薬品、食品、または工業製品も含まれ、その利用分野は特に限定されない。また、本発明の不飽和脂肪酸含有油脂が含まれる食品には、サプリメント等の健康食品や、食品添加物等が含まれる。また、工業製品としては、人以外の生物を対象とした飼料、フィルム、生分解性プラスチック、機能性繊維、潤滑油、洗剤等が挙げられる。

【００５１】

次に、本発明を実施例に基づいて具体的に説明するが、本発明は以下の実施例によって何ら限定されるものではない。

【実施例１】

【００５２】

［ラビリンチュラ類とその培養法・保存法］

（１）本発明で使用する菌株

Thraustochytrium aureum ATCC 34304及びThraustochytrium roseum ATCC 28210は、ATCCより分譲を受けた。また、Parietichytrium sarkarianum SEK364（FERM BP-11298）、Parietichytrium sp. SEK358（FERM BP-11405）及びParietichytrium sp. SEK571（FERM BP-11406） は甲南大学理工学部より分譲を受けた。Schizochytrium sp. TY12Ab（FERM ABP-11421）は宮崎大学農学部より分譲を受
けた。

【００５３】

（２）培地組成

ｉ．寒天平板培地組成

PDA寒天平板培地

0.78% (w/v) ポテトデキストロース寒天培地 (日水製薬社製)、1.75% (w/v) シーライフ (マリンテック社製) 、1.21% (w/v) 寒天末 (ナカライテスク社製) を混合し、121℃で20分間オートクレーブ滅菌を行った。十分に冷却後に、バクテリアのコンタミネーションを

防ぐために終濃度が100 μg/mlとなるようにアンピシリン酸ナトリウム（ナカライテスク社製）を添加し、シャーレに分注して平らな所に静置して固化させた。

【００５４】

ｉｉ．液体培地組成

GY液体培地

3.18% (w/v) グルコース（ナカライテスク社製)、1.06% (w/v) 乾燥酵母エキス（ナカライテスク社製)、1.75% (w/v) シーライフ（マリンテック社製)を混合し、121℃で20分間オートクレーブ滅菌後に、100 μg/mlのアンピシリン酸ナトリウム（ナカライテスク社製）を添加した。

【００５５】

PD液体培地

0.48% (w/v) ポテトデキストロース (Difco社製)、1.75% (w/v) シーライフ（マリンテック社製）を混合し、121℃で20分間オートクレーブ滅菌後に、100 μg/mlのアンピシリン酸ナトリウム（ナカライテスク社製）を添加した。

【００５６】

（３）培養方法

ｉ．寒天平板培養

ラビリンチュラ菌体を白金耳、もしくはスプレッダーを用いて接種し、25℃で静置培養することでコロニーを出現させた。その継代培養に関しては、コロニーを白金耳で釣菌して滅菌生理食塩水に懸濁後、その懸濁液を白金耳、もしくはスプレッダーを用いて塗布することで行った。尚、必要に応じて平板上の菌体を液体培地に接種することで、液体培養への転換を行った。

【００５７】

ｉｉ．液体培養

ラビリンチュラ菌体を接種し、三角フラスコ、もしくは試験管を用いて、25℃、150 rpmの回転数で攪拌しながら懸濁培養を行った。その継代培養に関しては、増殖が確認された対数増殖期～定常期までの培養液を、新しいGYもしくはPD液体培地に対して1/200～1/10容添加することで行った。尚、必要に応じて細胞培養液をPDA寒天平板培地に塗布することで、寒天平板培養への転換を行った。

【００５８】

（４）ラビリンチュラ類の保持・保存法

継代培養に加えて、グリセロールストック作製による凍結保存を行った。すなわち、GY液体培地を用いた対数増殖期～定常期の細胞懸濁液に対して、終濃度が15% (v/v) のグリセロール（ナカライテスク社製）を添加し、-80℃のディープフリーザー中にて保存した。

【実施例２】

【００５９】

［Thraustochytrium aureumのC20エロンガーゼ遺伝子の破壊］

[実施例２－１] T. aureum ATCC 34304由来total RNAの抽出、およびmRNAの精製

GY 液体培地を用いた培養3日目のT. aureum ATCC 34304培養液を、3,500 x gで15分間遠心することでその菌体を回収した。得た菌体を滅菌生理食塩水に懸濁後に再遠心操作を行うことで菌体を洗浄し、液体窒素で急速凍結して乳鉢中で粉末状になるまで擂り潰した。得た細胞破砕液中からセパゾールRNA I Super（ナカライテスク社製）を使用してtotal RNAを抽出した。引き続き、OligotexTM-dT30<Super> mRNA Purification Kit（タカラバイオ社製）を使用し、添付のマニュアルに従いtotal RNAからmRNAの精製を行った。得たtotal RNAおよびmRNAは適当量のTEに溶解後、ホルマリン変性ゲル（1%アガロース/MOPSバッファー）を用いた電気泳動を行った。その結果、total RNAの抽出が成功していること、total RNAからmRNAが精製されていること、およびRNAがRNaseによる分解を受けていないことを確認した。また、RNAの分解を極力避けるために、本実験操作を通じてゴム手袋やマスク等を着用し、器具は全てRNaseフリーのもの、もしくはジエチルピロカーボネート（

ナカライテスク社製）処理によってRNaseを失活したものを使用した。またRNAを溶解する際は、ジエチルピロカーボネート処理した滅菌ミリQ水に、組換え型RNaseインヒビターであるRNaseOUTTM（invitrogen社製）を添加した溶液を使用した。

【００６０】

[実施例２－２] RACE法によるT. aureum ATCC 34304由来エロンガーゼ遺伝子の単離

エロンガーゼ遺伝子に高度に保存されるヒスチジン・ボックス（His box)を標的として、正方向（elo-F；5’- TTY YTN CAY GTN TAY CAY CAY -3’）（配列番号：1)、および逆方向（elo-R；5’- GCR TGR TGR TAN ACR TGN ARR AA -3’）（配列番号：2）の縮重オリゴヌクレオチドを合成した。オリゴヌクレオチドの合成は、DNA合成機（Applied Biosystems社製）を用いて行った。次に、SMART^{TM} RACE cDNA Amplification Kit（clontech社製）を使用して、添付のマニュアルに従って3’および5’末端に合成アダプターを付加した3’-および5’-RACE cDNAライブラリそれぞれを作製した。それらを鋳型として、合成アダプター特異的なオリゴヌクレオチド、および前述した縮重オリゴヌクレオチドelo-Fおよびelo-Rを用いた3’-および5’-RACE [PCR cycles: 94℃ 1 min/94℃ 30 sec, 60℃ 30 sec, 72℃ 3 min, 30 cycles/72℃ 10 min/4℃ ∞] を行ったところ、特異的に増幅した3’-および5’-RACE産物のバンドが確認された（図１)。次に、該当RACE産物全量を1%アガロースゲルによる電気泳動に供し、分離したDNA断片を清浄なカッター等で切り出し、非特許文献２０記載の方法に従ってアガロースゲルからDNA断片を抽出した。次に、pGEM-T easy Vector （Promega社製）を使用して該当DNA断片のTAクローニングを行い、Sangerらの方法（非特許文献２１）によってそれらの塩基配列を決定した。具体的には、BigDye(登録商標) Terminator v3.1Cyele Sequencing Kitおよび3130ジェネティックアナライザ(Applied Biosystems社製）を使用し、添付マニュアルに従ったダイターミネーター法による塩基配列決定を行った。

【００６１】

その結果、3’-RACE産物においてはelo1（配列番号：3）およびelo2（配列番号：4）と名付けた190 bpおよび210 bpの2種の配列、5’-RACE産物においてはelo3（配列番号：5）と名付けた200 bpの1種の配列の同定に成功した。これらelo1、elo2、およびelo3の配列は、種々のエロンガーゼ遺伝子の配列と有意な相同性を示すことから、T. aureum ATCC 34304由来エロンガーゼ遺伝子の部分配列であることが示唆された。更に、elo1、elo2、およびelo3それぞれに関して再度オリゴヌクレオチドプライマーを設計し、RACEによるcDNA配列の取得を試みた。以下に作製したオリゴヌクレオチドプライマーを示す。elo1正方向オリゴヌクレオチドプライマー （elo1-F1；5’- TAT GAT CGC CAA GTA CGC CCC -3’）（配列番号：6）および逆方向オリゴヌクレオチドプライマー（elo1-R1；5’- GAA CTG CGT CAT CTG CAG CGA -3’）（配列番号：7)、elo2正方向オリゴヌクレオチドプライマー （elo2-F1；5’- TCT CGC CCT CGA CCA CCA AC -3’）（配列番号：8）および逆方向オリゴヌクレオチドプライマー（elo2-R1；5’- CGG TGA CCG AGT TGA GGT AGC C -3’）（配列番号：9)、elo3正方向オリゴヌクレオチドプライマー （elo3-F1；5’- CAA CCC TTT CGG CCT CAA CAA G -3’）（配列番号：10）および逆方向オリゴヌクレオチドプライマー（elo3-R1；5’- TTC TTG AGG ATC ATC ATG AAC GTG TC -3’）（配列番号：11)。

【００６２】

作製した正方向および逆方向オリゴヌクレオチドプライマーを用いて、前述に記載した方法と同様に、RACEおよび該増幅産物の塩基配列解析を行った。その結果、elo1に関しては特異的に増幅した3’-および5’-RACE産物が得られ、それらの重複部分が完全に一致することから、1,139 bpのelo1 cDNA配列（配列番号：12）であることが明らかになった。同様に、elo3に関しても特異的に増幅した3’-および5’-RACE産物が得られ、それらの重複部分が完全に一致することから、1,261 bpのelo3 cDNA配列（配列番号13）であることが明らかになった。

配列解析の結果、elo1は275アミノ酸残基（配列番号：14）をコードする825 bpの翻訳領域（配列番号：15）から成り、BLAST検索の結果、種々のエロンガーゼ遺伝子と有意な相同性を示すのみならず、公知のT. aureum由来推定Δ5エロンガーゼ遺伝子の配列（NCBI

accession No. CS486301）と完全に一致することが分かった。一方、elo3は317アミノ酸残基（配列番号：16）をコードする951 bpの翻訳領域（配列番号：17）から成ることが推定され、BLAST検索の結果、種々のエロンガーゼ遺伝子と有意な相同性を示すことから、T. aureum ATCC 34304由来推定エロンガーゼ遺伝子であることが確認された。尚、両遺伝子の推定アミノ酸配列中には、エロンガーゼ遺伝子に高度に保存されるHis boxが見出された。以上の結果を受けて、elo1およびelo3遺伝子をT. aureum ATCC 34304由来推定エロンガーゼ遺伝子とし、それぞれをTaELO1、TaELO2と命名した。

【００６３】

[実施例２－３] TaELO1およびTaELO2の系統樹解析

種々のエロンガーゼは、基質特異性により1. SFA/MUFA elongases（飽和脂肪酸、もしくは単価不飽和脂肪酸に作用）2. PUFA-elongases (single-step)（決まった鎖長の多価不飽和脂肪酸に作用）および3. PUFA elongases (multi-step)（様々な鎖長の多価不飽和脂肪酸に作用）の3つのグループに大別される。Meyerら(非特許文献２２）が行ったエロンガーゼの系統解析によると、その基質特異性と系統関係がよく一致することが分かっている。

そこでMeyerらの方法に準じて、TaELO1、TaELO2、および他生物由来の種々のエロンガーゼ遺伝子の系統解析を行った。具体的には、CLUSTAL Wプログラム（非特許文献７）を使用した近隣結合法（非特許文献１４）による分子系統樹を作製した。その結果、TaELO1およびTaELO2は、PUFA-elongases (single-step)のグループに分類されることが明らかになり、決まった鎖長の多価不飽和脂肪酸に作用することが示唆された（図２）

【００６４】

[実施例２－４] 出芽酵母Saccharomyces cerevisiaeを宿主としたTaELO1およびTaELO2の発現と、遺伝子導入株の脂肪酸組成の解析

TaELO1およびTaELO2を出芽酵母S. cerevisiaeを宿主として発現させるために、それぞれの発現ベクターを構築した。以降にその概略を示す。TaELO1の翻訳領域の配列を元に、1対のオリゴヌクレオチドプライマー（E1 HindIII；5’- ATA AGC TTA AAA TGT CTA GCA ACA TGA GCG CGT GGG GC -3’）（配列番号：18）およびE1 XbaI；5’- TGT CTA GAA CGC GCG GAC GGT CGC GAA A -3’）（配列番号：19）を作製した。E1 HindIIIは正方向オリゴヌクレオチドプライマーであり、5’末端に制限酵素HindIII部位（AAGCTT）を有する。また、酵母のコンセンサス配列（(A/Y) A (A/U) A AUG UCU；下線部は開始コドン）(非特許文献２３)を参考に、TaELO1の開始コドン近傍の配列を改変している。E1 XbaIは逆方向オリゴヌクレオチドプライマーであり、5’末端にXbaI部位（TCTAGA）を有する。

同様に、TaELO2の翻訳領域の配列を元に1対のオリゴヌクレオチドプライマー（E2 HindIII；5’- TAA AGC TTA AAA TGT CTA CGC GCA CCT CGA AGA GCG CTC C -3’）（配列番号：20）およびE2 XbaI；5’- CAT CTA GAC TCG GAC TTG GTG GGG GCG CTT G -3’）（配列番号：21）を作製した。E2 HindIIIは正方向オリゴヌクレオチドプライマーであり、5’末端に制限酵素HindIII部位を有する。また、酵母のコンセンサス配列を参考に、TaELO2の開始コドン近傍の配列を改変している。E2 XbaIは逆方向オリゴヌクレオチドプライマーであり、5’末端にXbaI部位を有する。

【００６５】

以上の2種のオリゴヌクレオチドプライマー対を用いて、実施例２－２記載の5’-RACE cDNAライブラリを鋳型にPCRを行い、5’末端に制限酵素HindII、3’末端に制限酵素XbaIサイトを有し、開始コドン近傍が酵母のコンセンサス配列に改変された949 bpのTaELO1翻訳領域（配列番号：22）、および967 bpのTaELO2翻訳領域（配列番号：23）を増幅した。尚、PCR酵素は伸長ミスを避けるために校正活性の高いPrimeSTAR(登録商標) DNA polymerase（タカラバイオ社製）を使用した [PCR cycles: 98℃ 2 min/98℃ 5 sec, 60℃ 5 sec, 72℃ 1.5 min, 30 cycles/72℃ 7 min/4℃ ∞]。

次に、増幅したPCR産物を1%アガロースゲルにて分離後、該DNA断片を切り出しアガロースゲルから抽出した。さらに、制限酵素HindIIIおよびXbaIで処理した後に再度アガロースゲルを用いた精製を行い、制限酵素HindIIIおよびXbaI処理により直鎖化した出芽酵母

用発現ベクターpYES2/CT（invitrogen社製）に、DNA Ligation Kit <Mighty Mix>（タカラバイオ社製)を使用して連結することで環状化ベクターを構築した。また塩基配列を解析することで、pYES2/CTに導入したTaELO1およびTaELO2翻訳領域の配列に、PCR伸長ミスによる変異が導入されていないことを確認した。以上の結果により、TaELO1の発現ベクターpYEELO1、およびTaELO2の発現ベクターpYEELO2の構築に成功した。

【００６６】

構築した2種の発現ベクター、およびpYES2/CTを非特許文献１５および非特許文献１６記載の方法に従い、酢酸リチウム法によって出芽酵母S. cerevisiaeに導入し形質転換体の選別を行った。次に、得た形質転換体（pYEELO1導入株、pYEELO2導入株、およびmock導入株）をQiuらの方法（非特許文献２４）に準じて培養し、菌体由来脂肪酸の抽出とメチルエステル化を行った。ただし、培地にはΔ9エロンガーゼの基質としてα-linolenic acid（ALA，C18:3Δ9，12，15）およびlinoleic acid（LA，C18:2Δ9，12）を、Δ6エロンガーゼの基質としてstearidonic acid（STA，C18:4Δ6，9，12，15）およびγ-linolenic acid（GLA，C18:3Δ6，9，12）を、Δ5エロンガーゼの基質として、eicosapentaenoic acid（EPA，C20:5Δ5，8，11，14，17）および arachidonic acid（AA，C20:4Δ5，8，11，14）を、それぞれ終濃度で0.2 mM添加した上で培養を行っている。引き続き、Abeらの方法（非特許文献１７）に従い、メチルエステル化脂肪酸のガスクロマトグラフィー（GC）解析を行った。GC解析にはガスクロマトグラフGC-2014（島津製作所社製）を使用し、カラム：HR-SS-10（30 m x 0.25 mm；信和化工社製）、カラム温度：150℃ →（5℃/min）→ 220℃（10 min）、キャリアガス：He（1.3 mL/min）の条件で行った。

【００６７】

その結果、pYEELO1導入株においては、ステアリドン酸（STA）をエイコサテトラエン酸（ETA，C20:4Δ8，11，14，17)、γ－リノレン酸（GLA）をジホモ－γ－リノレン酸（DGLA，C20:3Δ8，11，14）に変換する宿主（mock導入株）にはないΔ6エロンガーゼ活性を示す一方で、α－リノレン酸（ALA）をエイコサテトリエン酸(ETrA，C20:3Δ11，14，17)、リノール酸（LA）をエイコサジエン酸(EDA，C20:3Δ11，14）に変換するΔ9エロンガーゼ活性、エイコサペンタエン酸（EPA）をω3ドコサペンタエン酸(ω3DPA，C22:5Δ7，10，13，16，19)、アラキドン酸（AA）をドコサテトラエン酸（DTA，C22:4Δ7，10，13，16）に変換するΔ5エロンガーゼ活性をも示すことが分かった（表１）。

【００６８】

またpYEELO2導入株においては、EPAをω3 DPA（C22:5Δ7，10，13，16，19)、AAをDTAに変換する宿主にはないΔ5エロンガーゼ活性を示す一方で、STAをETA、GLAをDGLAに変換する僅かなΔ6エロンガーゼ活性を示すことが分かった（表１)。以上の結果により、TaELO1はΔ6/Δ9/Δ5エロンガーゼであり、TaELO2はΔ5/Δ6エロンガーゼであることが確認され、実施例２－３、図２で示した系統樹解析によるTaELO1およびTaELO2の基質特異性予想とは異なる結果を示した。

【００６９】

【表１】

LA添加 (0.2 mM)

	mock	TaELO1	TaELO2
LA	30.5	23.5	36.3
EDA	0.2	8.9	0.2
変換効率(%)		27.4	

ALA添加 (0.2 mM)

	mock	TaELO1	TaELO2
ALA	49.1	25.8	47.1
ETrA	0.2	17.9	0.3
変換効率(%)		41	

GLA添加 (0.2 mM)

	mock	TaELO1	TaELO2
GLA	44.0	7.6	43.6
DGLA	0.2	29.0	0.8
変換効率(%)		79.3	1.9

STA添加 (0.2 mM)

	mock	TaELO1	TaELO2
STA	46.2	8.3	40.5
ETA	0.3	28.1	1.7
変換効率(%)		77.2	4.0

ARA添加 (0.2 mM)

	mock	TaELO1	TaELO2
ARA	30.9	23.2	8.9
ADA	-	5.8	13.6
変換効率(%)		20.1	60.3

EPA添加 (0.2 mM)

	mock	TaELO1	TaELO2
EPA	42.0	31.2	13.1
DPA	0.1	10.6	24.5
変換効率(%)		25.3	65.1

$$\text{変換効率}(\%) = 100 \times \text{product (area)} / \text{substrate (area)} + \text{product (area)} \quad (n=1)$$

【００７０】

[実施例２－５] PCRゲノムウォーキング法によるTaELO2 ORF上流および下流領域の取得

TaELO2を破壊するためのターゲッティングベクターにおいて、相同組換え部位となるTaELO2 ORF上流および下流領域の取得を、PCRゲノムウォーキング法によって行った。以下その概要を示す。

GY 液体培地を用いた培養3日目のT. aureum ATCC 34304菌体を液体窒素で急速凍結して乳鉢中で粉末状になるまで擂り潰し、非特許文献１８に記載の方法に従ってゲノムDNAを抽出後に適当量のTEに溶解した。ゲノムDNAの量と純度の検定は、O.D.260およびO.D.280測定によって行った。次に、TaKaRa LA PCRTM in vitro Cloning Kit（タカラバイオ社製）を用いて、添付のプロトコールに従い各種制限酵素で切断したゲノムDNAに、制限酵素サイトを有するカセット配列を付加したゲノムDNAライブラリを構築した。次に、作製したゲノムDNAライブラリを鋳型にして、TaELO2の配列を元に作製した正方向オリゴヌクレオチドプライマーE2 XbaI（実施例２－４記載。配列番号：21）およびelo3-F1（実施例２－２記載。配列番号：10）、もしくは逆方向オリゴヌクレオチドプライマーE2 HindIII（実施例２－４記載。配列番号：20）およびelo3-R1（実施例２－２記載。配列番号：11）を使用して、キット付属のカセット配列に相補的なオリゴヌクレオチドプライマーと共に添付のプロトコールに従ったnested PCRを行った。その結果、1,122 bpのTaELO2 ORF上流配列（配列番号：24）、および1,204 bpのTaELO2 ORF下流配列（配列番号：25）の取得に成功した。

【００７１】

[実施例２－６] Neorを選択マーカーとしたTaELO2ターゲッティングベクターの構築

fusion PCRによってTaELO2 ORF上流配列/人工合成Neor/ TaELO2 ORF下流配列を連結したDNA断片を作製した。使用したオリゴヌクレオチドプライマーを以下に示す。

・KO Pro F SmaI (31 mer: 5’- CTC CCG GGT GGA CCT AGC GCG TGT GTC ACC T-3’,) (

配列番号：26)
・Pro R (25 mer: 5’-GGT CGC GTT TAC AAA GCA GCG CAG C -3’) (配列番号：27)
・SNeo F (52 mer; 5’- GCT GCG CTG CTT TGT AAA CGC GAC CAT GAT TGA ACA GGA CGG C CT TCA CGC T -3’) (配列番号：28)
・SNeoR (52 mer; 5’-TCG GGA GCC AGC CGG AAA CAG GTT CAA AAG AAC TCG TCC AGG AGG CGG TAG A-3’) (配列番号：29)
・Term F (23 mer: 5’- ACC TGT TTC CGG CTG GCT CCC GA -3’) (配列番号：30)
・KO Term R SmaI (27 mer: 5’- ATC CCG GGG CCG AGA ACG GGG TCG CCC -3’) (配列番号：31)

これらのオリゴヌクレオチドプライマーのうち、KO Pro F SmaI/ Pro Rは実施例２－５に記載したT. aureum ATCC 34304ゲノムDNAを鋳型にしたTaELO2 ORF上流配列の増幅、SNeo F/SNeo Rは人工合成Neorを鋳型にした人工合成Neorの増幅、Term F/ KO Term R SmaIは実施例２－５に記載したT. aureum ATCC 34304ゲノムDNAを鋳型にしたTaELO2 ORF下流配列の増幅に使用した。尚、PCR反応条件は変性温度を98℃10秒とし、アニーリングおよび伸長反応はプライマーのTmおよび増幅産物の長さによって適宜調節して行った。

その結果、2,696 bp (配列番号：32) のTaELO2 ORF上流配列/人工合成Neor/ TaELO2 ORF下流配列の連結に成功し、これをpGEM-T easy Vector（Promega社製）を使用してTAクローン化したものをノックアウトベクターとし、pTKONeorを名付けた。

【００７２】

[実施例２－７] T. aureum ATCC 34304へのTKONeorの導入

実施例２－６で作製した人工合成Neorを選択マーカーとしたTaELO2ターゲティングベクター、pTKONeorを鋳型とし、1対のオリゴヌクレオチドプライマーKO Pro F SmaI (実施例２－６、配列番号：26) /KO Term R SmaI (実施例２－６、配列番号：31) 、およびPrime STAR HS DNA polymerase (タカラバイオ社製) を用いて、TaELO2 ORF上流配列/人工合成Neor/ TaELO2 ORF下流配列を増幅し [PCR cycles: 98℃ 2 min/98℃ 10 sec, 68℃ 3 min, 30 cycles/68℃ 10 min/4℃ ∞]、1%アガロースゲルを用いた電気泳動後に該DNA断片を抽出し、エタノール沈殿後に適当量のTEに溶解した。DNA断片の量と純度の検定は、O.D.260およびO.D.280測定によって行った。得られたDNA断片を、以降TKONeorと呼称する。

次に、遺伝子銃法によるDNAの打ち込み操作を行った。すなわち、GY液体培地を用いて、T. aureum ATCC 34304を25℃、150 rpmで対数増殖期中期～後期まで培養後に、3,500 x g, 4℃, 10 min遠心し上清を除いた。次に、得た菌体を元の培養液の100倍濃縮となるようにGY液体培地に再懸濁し、うち20 μl分の細胞懸濁液を、1 mg/ml G418 (ナカライテスク社製)を含有する直径5 cmのPDA寒天平板培地上に、直径3 cm程度に薄く均一に塗布して乾燥させた。これに対し、PDS-1000 /Heシステム (BioRad社製) を使用して、target distance - 6 cm、vacuum - 26 inches Hg、micro carrier size -0.6 μm、Rupture disk (打ち込み圧) - 1,100 psiの条件で打ち込み操作を行った。その後PDA寒天平板培地に100 μlのPD液体培地を滴下して菌体を拡げ直して静置培養を行った。その結果、4.7 x 10^1 cfu/μg DNAの効率でG418耐性能が付与された形質転換体が得られた。

【００７３】

[実施例２－８] TKONeorを導入した形質転換体のゲノムDNAを鋳型としたPCR

形質転換体7コロニーを爪楊枝で釣菌後に、0.5 mg/ml G418 (ナカライテスク社製)を含有するGY液体培地に植菌した。複数回継代後に、実施例２－５記載の方法で菌体からゲノムDNAを抽出し、エタノール沈殿後に適当量のTEに溶解した。抽出したゲノムDNAの量と純度の検定はO.D.260およびO.D.280測定によって行った。次に、得た形質転換体および野生株のゲノムDNAを鋳型として、様々なオリゴヌクレオチドプライマー対を用いてPCRを行った。使用したオリゴヌクレオチドプライマー対は、

(1)Neor検出 - SNeoF (実施例２－６記載。配列番号：28) およびSNeoR (実施例２－６記載。配列番号：29)、

(2)KO確認1 - KO Pro F SmaI (実施例２－６記載。配列番号：26) およびKO Term R SmaI (実施例２－６記載。配列番号：31)

(3)KO確認2 - E2 KO ProF EcoRV （30 mer: 5’- GGA TAT CCC CCG CGA GGC GAT GGC TGC TCC -3’）(配列番号：33)およびSNeoR
(4)KO確認3 - SNeoFおよびE2 KO Term R EcoRV (30 mer: 5’- TGA TAT CGG GCC GCG CCC TGG GCC GTA GAT -3’）(配列番号：34)
(5)TaELO2増幅 - E2 HindIII（実施例２－４記載。配列番号：20）およびE2 XbaI（実施例２－４記載。配列番号21)
である（図３A）。

その結果、解析した7クローンのうち6クローンはランダムインテグレーションによる形質転換体であったが、1クローンは相同組換えによってTaELO2 ORFがNeorへ置き換わっていることが確認された（図３B，レーン9，13)。しかし同時に、TaELO2 ORFが増幅する(図３B，レーン17）ことが分かった。以上のことから、T. aureum ATCC 34304は2倍体以上であるか、もしくはTaELO2がマルチコピー遺伝子である可能性が示唆された。

【００７４】

[実施例２－９] サザンブロッティングによるTaELO2のコピー数の確認

以下の実験は「DIG説明書集[日本語版] 8th，Roche Applied Science」（非特許文献２５）記載の方法に準じて行った。すなわち、野生株のゲノムDNAを各種制限酵素で切断後、１レーンあたり2.5 μgずつ0.7% のSeaKem(登録商標) GTG(登録商標) agarose（タカラバイオ社製）を使用した電気泳動に供した。これをナイロンメンブラン（HybondTM-N+，GEヘルスケア社製）にトランスファーし、PCR DIG Probe Synthesis Kit （Roche Applied Science社製）を使用して作製したDIGラベルプローブと48 ℃、16 hr でハイブリダイズさせた。DIGラベルプローブ作製に用いた1対のオリゴヌクレオチドプライマーは、TaELO2 det F (25 mer: 5’- GTA CGT GCT CGG TGT GAT GCT GCT C -3’）(配列番号：35）およびTaELO2 det R (24 mer: 5’- GCG GCG TCC GAA CAG GTA GAG CAT-3’）(配列番号：36）である[PCR cycles: 98℃ 2min/ 98℃ 30 sec，65℃ 30 sec，72℃ 1 min，30 cycles/ 72℃ 7 min/4℃ ∞]。ハイブリダイズしたプローブの検出は発色法（NBT / BCIP溶液）を用いて行った。

その結果、各種制限酵素で処理したレーン全てにシングルバンドが検出されることから（図４)、TaELO2はシングルコピー遺伝子であることが示された。このことから、T. aureum ATCC 34304が2倍体以上であることが示唆された。

【００７５】

[実施例２－１０] TKONeorを導入した形質転換体のサザンブロッティングによる評価

実施例２－９記載の方法でサザンブロッティングを行った。すなわち、1対のオリゴヌクレオチドプライマーuprobe F (35 mer: 5’- ATC CGC GTA TAT ATC CGT AAA CAA CGG AAC ATT CT-3’）(配列番号：37）およびuprobe R (26 mer: 5’-CTT CGG GTG GAT CAG CGA GCG ACA GC-3’）(配列番号：38）を用いてPCR [PCR cycles: 98℃ 2min/ 98℃ 30 sec，65℃ 30 sec，72℃ 1 min，30 cycles/ 72℃ 7 min/4℃ ∞] で増幅したDIGラベルプローブを用いて、EcoRVおよびPstIで消化した野生株と形質転換体のゲノムDNAに対する発色法（NBT / BCIP溶液）を用いたサザンブロッティングを行った。この場合、野生型アリルは約1.2 kbpのDNA断片が検出されるが、相同組換えによってTaELO2 ORFがNeorへ置き換わっている変異アリルでは、約2.5 kbpのDNA断片が検出される（図５A)。

解析の結果、形質転換体においては変異型アリルと同時に野生型アリルのバンドも検出される（図５B）ことから、T. aureum ATCC 34304は2倍体以上であることが示された。

【００７６】

[実施例２－１１] Hygrを選択マーカーとしたTaELO2ターゲッティングベクターの構築

残存した野生型アリルを破壊するために、Hygrを選択マーカーとしたTaELO2ターゲッティングベクターの構築を行った。

先ず、fusion PCRによってT. aureum ATCC 34304由来ユビキチンプロモーター配列とHygrの連結を行った。使用したオリゴヌクレオチドプライマーを以下に示す。

・ubi-600p F (27 mer: 5’- GCC GCA GCG CCT GGT GCA CCC GCC GGG-3’）(配列番号：39)

・ubi-hygro R (59 mer: 5’-TCG CGGG TGA GTT CAG GCT TTT TCA TGT TGG CTA GTG TTG CTT AGG TCG CTT GCT GCT G-3’) (配列番号：40)
・ubi-hygro F (57 mer; 5’-AGC GAC CTA AGC AAC ACT AGGC CAA CAT GAA AAA GCC TGA ACT CAC CGC GAC GTC TG-3’) (配列番号：41)
・hygro R (29 mer; 5’-CTA TTC CTT TGC CCT CGG ACG AGT GCT GG-3’) (配列番号：42)

これらのオリゴヌクレオチドプライマーのうち、ubi-600p F/ubi-hygro Rは実施例２－５に記載したT. aureum ATCC 34304ゲノムDNAを鋳型にしたT. aureum ATCC 34304由来ユビキチンプロモーター配列の増幅に使用した。ubi-hygro F/ hygro RはpcDNA 3.1 Zeo (Invitogen) を鋳型にした人工合成Hygrの増幅に使用した。尚、PCR反応条件は変性温度を98℃10秒とし、アニーリングおよび伸長反応はプライマーのTmおよび増幅産物の長さによって適宜調節して行った。

その結果、1,636 bp (配列番号：43) のT. aureum ATCC 34304由来ユビキチンプロモーター配列/ Hygrの連結に成功し、これをpGEM-T easy Vector (Promega社製) を使用してTAクローン化したものをpTub600Hygrと名付けた。

【００７７】

続いて、pTub600Hygrを鋳型とし、PrimeSTAR HS DNA polymerase (タカラバイオ社製) を使用して、1対のオリゴヌクレオチドプライマーubi-600p F NheI (33 mer: 5’-GTG CTA GCC GCA GCG CCT GGT GCA CCC GCC GGG-3’) (配列番号：44) およびhygro R XbaI (37 mer: 5’-GTT CTA GAC TAT TCC TTT GCC CTC GGA CGA GTG CTG G-3’) (配列番号：45) を用いてPCR [PCR cycles: 98℃ 2min/ 98℃ 10 sec, 68℃ 3 min, 30 cycles/ 68℃ 10 min/4℃ ∞] を行い、5’末端にNheI、3’末端にXbaIサイトを付加したT. aureum ATCC 34304由来ユビキチンプロモーター配列/ Hygr DNA断片を調製した。また、実施例２－６記載のpTKONeorを鋳型とし、PrimeSTAR HS DNA polymerase (タカラバイオ社製) を使用して、1対のオリゴヌクレオチドプライマーKO vec F XbaI (37 mer: 5’-GTT CTA GAC CTG TTT CCG GCT GGC TCC CGA GCC ATG C -3’) (配列番号：46) およびKO vec R NheI (40 mer: 5’-GTG CTA GCG GTC GCG TTT ACA AAG CAG CGC AGC AAC AGA A -3’) (配列番号：47) を用いてPCR [PCR cycles: 98℃ 2min/ 98℃ 10 sec, 68℃ 3 min, 30 cycles/ 68℃ 10 min/4℃ ∞] を行い、実験例２－６記載の pTKONeorのNeorを除去し3’末端にNheI、5’末端にXbaIサイトを付加した直鎖状ベクターを調製した。両DNA断片を制限酵素NheIおよびXbaIで消化後にアガロースゲルを用いた精製を行い、Ligation Convinience Kit (ニッポンジーン社製) を用いて環状ベクターを構築した。

構築したHygrを選択マーカーとしたTaELO2ターゲッティングベクターは、pGEM-T easy Vector (Promega社製) を基本骨格とし、挿入配列として3,537 bp (配列番号：48)のTaELO2 ORF上流配列/T. aureum ATCC 34304由来ユビキチンプロモーター配列/ Hygr /TaELO2 ORF下流配列を有している。これをpTKOub600Hygrと命名した。

【００７８】

[実施例２－１２] KOub600Hygrの再導入とゲノムDNAを鋳型にしたPCR、サザンブロッティング、RT-PCRによる形質転換体の評価

構築したHygrを選択マーカーとしたTaELO2ターゲッティングベクターpTKOub600Hygr(実施例２－１１記載) を鋳型として、1対のオリゴヌクレオチドプライマーKO Pro F SmaI (実施例２－６、配列番号：26) /KO Term R SmaI (実施例２－８、配列番号：31) 、およびPrimeSTAR HS DNA polymerase (タカラバイオ社製) を用いて、TaELO2 ORF上流配列/T. aureum ATCC 34304由来ユビキチンプロモーター配列/ Hygr /TaELO2 ORF下流配列を増幅し[PCR cycles: 98℃ 2 min/98℃ 10 sec, 68℃ 3.5 min, 30 cycles/68℃ 10 min/4℃ ∞]、得られたDNA断片をKOub600Hygrと名付けた。これを実施例２－６で得た形質転換体に対して同様の手法で導入し、1 mg/ml G418 (ナカライテスク社製)含有PDA寒天平板培地上で24時間静置培養後、菌体を回収して1 mg/ml G418 (ナカライテスク社製)および2 mg/ml ハイグロマイシンB (和光純薬工業社製) を含有するPDA寒天平板培地上で静置培養を続けたところ、多数の形質転換体が得られた (導入効率: 1.02 x 10^3 cfu/μg DNA)。

そのうち50クローンを釣菌し、1 mg/ml G418（ナカライテスク社製）および2 mg/ml ハイグロマイシンB（和光純薬工業社製）含有GY液体培地中で複数回継代培養後に、実施例２－５記載と同様の手法でゲノムDNAを抽出し、エタノール沈殿後に適当量のTEに溶解した。抽出したゲノムDNAの量と純度の検定はO.D.260およびO.D.280測定によって行った。
次に、得た形質転換体および野生株のゲノムDNAを鋳型として、様々なオリゴヌクレオチドプライマー対を用いてPCR [PCR cycles: 98℃ 2 min/98℃ 10 sec, 68℃ 1 min, 30 cycles/68℃ 10 min/4℃ ∞] を行った。使用したオリゴヌクレオチドプライマー対は、
(1)TaELO2 ORF検出 - SNeoF（実施例２－６記載。配列番号：28）およびSNeoR（実施例２－６記載。配列番号：29）、
(2)KO確認 - E2 KO Pro F EcoRV（実施例２－8記載。配列番号：33）および ubi-hygro R（実施例２－１１記載。配列番号：40)
である（図６A）。

【００７９】

その結果、解析した50クローンのうち、14クローンがTaELO2 ORFを置換する形での相同組み換えを起こした形質転換体であることが示唆された（図６B，矢印)。またそれらのクローンに関しては、TaELO2 ORFが増幅しないこと（図６C）が確認された。
引き続き、実施例２－１０記載の手法を用いたサザンブロッティングを行った。すなわち、1対のオリゴヌクレオチドプライマーuprobe F（配列番号：37）およびuprobe R（配列番号：38）を用いて調製したDIGラベルプローブを用いて、EcoRVおよびPstIで消化した野生株と形質転換体のゲノムDNAに対する発色法（NBT / BCIP溶液）を用いたサザンブロッティングを行った。この場合、野生型アリルは約1.2 kbpのDNA断片、相同組換えによってTaELO2 ORFがNeorへ置き換わっている変異アリルでは約2.5 kbpのDNA断片、相同組換えによってTaELO2 ORFがHygrへ置き換わっている変異アリルでは約1 .9 kbpのDNA断片が検出される（図７A)。
解析の結果、得た形質転換体では約2.5 kbpの野生型アリルのバンドが消失し、代わりにTaELO2 ORFがHygrへ置き換わっている約1 .9 kbpの変異アリルのバンドが新たに検出された（図７B)。

【００８０】

同様に、1対のオリゴヌクレオチドプライマーTaELO2 probe F（30 mer: 5’-ATG GCG ACG CGC ACC TCG AAG AGC GCT CCG-3’）（配列番号：49）およびTaELO2 probe R（30 mer: 5’-AGG ATC ATC ATG AAC GTG TCG CTC CAG TCG-3’）（配列番号：50）を用いて、PCR [PCR cycles: 98℃ 2min/ 98℃ 30 sec, 65℃ 30 sec, 72℃ 1 min, 30 cycles/ 72℃ 7 min/4℃ ∞] でTaELO2を検出するDIGラベルプローブを調製し、EcoRVで消化した野生株と形質転換体（クローン1, 8, 9, 10）のゲノムDNAに対する発色法（NBT / BCIP溶液）を用いたサザンブロッティングを行った。この場合、TaELO2は約2.5 kbpのDNA断片として検出される（図７A)。
解析の結果、野生株ではTaELO2 が検出される（図８，レーン1）のに対し、形質転換体では全く検出されないことが分かった（図８，レーン2-5)。

【００８１】

さらに、TaELO2破壊をmRNAレベルで検証するために、RT-PCRによるTaELO2 mRNAの検出を行った。GY 液体培地を用いた培養3日目の野生株、および形質転換体（クローン1, 8, 9, 10）の菌体から実施例２－１の場合と同様にセパゾールRNA I Super（ナカライテスク社製）を使用してtotal RNAを抽出した。引き続き、RNeasy Mini Kit (QIAGEN社製）を使用して添付のプロトコールに従いクリーンナップしたtotal RNA 50 μgを、50 UのRecombinant DNase I（タカラバイオ社製）を使用して37℃で1時間処理し、コンタミしたゲノムDNAの分解除去を行った。続いて、得たtotal RNAを鋳型として、oligo(dT) primer (Novagen社製）およびPrimeScript Reverse Transcriptase（タカラバイオ社製）を使用し、添付のマニュアルに従い1本鎖cDNAライブラリを調製した。さらに、得た1本鎖cDNAライブラリを鋳型として、1対のオリゴヌクレオチドプライマーE2 HindIII（実施例２－４記載。配列番号：20）およびE2 XbaI（実施例２－４記載。配列番号21）、およびLA taq Hot Star

t Version（タカラバイオ社製）を使用し、TaELO2 ORFを増幅 [PCR cycles: 98℃ 2 min/ 98℃ 10 sec, 68℃ 1 min, 30 cycles/68℃ 10 min/4℃ ∞]した。

その結果、野生株では検出されるTaELO2 mRNAが（図９，レーン5)、形質転換体(クローン1，8，9，10）では全く検出されないことが分かった(図９，レーン1-4)。

以上の結果から、TaELO2を完全に破壊したTaELO2欠損ホモ接合体の取得に成功したことが分かった。またこの結果から、T. aureum ATCC 34304が2倍体であることが判明した。

【００８２】

[実施例２－１３] 野生株、およびTaELO2欠損ホモ接合体の脂肪酸組成の比較

実施例２－１２で得たTaELO2欠損ホモ接合体と野生株の脂肪酸組成を、メチルエステル化した脂肪酸のGC解析によって行った。すなわち、GY液体培地で培養5日後のTaELO2欠損ホモ接合体と野生株の菌体を回収し、実施例２－４記載の方法で菌体由来脂肪酸の抽出とメチルエステル化、およびGC解析を行った。GC解析にはガスクロマトグラフGC-2014（島津製作所社製）を使用し、カラム：HR-SS-10（30 m x 0.25 mm；信和化工社製）、カラム温度：150℃ →（5℃/min）→ 220℃（10 min）、キャリアガス：He（1.3 mL/min）の条件で行った。

その結果、TaELO2欠損ホモ接合体では、TaELO2の基質となるEPA量が野生株の2倍程度まで増加すると共に、下流の代謝産物であるDHA量の減少が観察された（図１０)。

ラビリンチュラにおいて、デサチュラーゼ/エロンガーゼ経路を構成する遺伝子の破壊による脂肪酸組成を改変した例は本発明が初である。すなわち、ラビリンチュラT. aureumにおいてデサチュラーゼ/エロンガーゼ経路がPUFA生合成に関与することを明確に示したのみならず、その構成遺伝子のノックアウトによって、脂肪酸組成の改変が可能であることを意味している。将来的には、外来デサチュラーゼ/エロンガーゼ遺伝子の過剰発現やPUFA-PKS遺伝子のノックアウト等を組み合わせたPUFA生合成経路の人工構築によって、産業上有用なPUFAを選択的に大量生産するラビリンチュラ類分子育種が可能であると予想される。

【実施例３】

【００８３】

［Parietichytrium sarkarianumのC20エロンガーゼ遺伝子の破壊］

[実施例３－１] SV40 terminator配列のサブクローニング

pcDNA 3.1 Myc-His vectorを鋳型に、PrimeSTAR HS DNA polymerase（タカラバイオ社製）によりSV40 terminator配列を増幅した。用いたPCR primer は下記の通りで、RHO58はSV40 terminator配列上に設定し、BglIIおよびBamHIリンカー配列を含む。RHO52はSV40 terminator配列上に設定し、BglII配列を含む。 [RHO58: 34mer: 5’- CAG ATC TGG ATC CGC GAA ATG ACC GAC CAA GCG A-3’（配列番号：51)、 RHO52: 24mer: 5’- ACG CAA T TA ATG TGA GAT CTA GCT -3’（配列番号：52）]。下記の条件で増幅後、pGEM-T easy vector（Promega社製）にクローニングした。[PCR cycles: 98℃ 2 min/ 98℃ 30 sec, 60℃ 30 sec, 72℃ 1 min, 30 cycles/ 72℃ 1min]。大腸菌にて増幅後、Dye Terminator Cycle Sequencing Kit（BECKMAN COULTER社製）を用いて配列を確認した。これをpRH27と名付けた。

サブクローニングしたSV40 terminator配列（342 bp、配列番号：53）を含むプラスミド（pRH27）を図１１に示す。

【００８４】

[実施例３－２]人工合成ネオマイシン耐性遺伝子カセットの作製

Thraustochytrium aureum ATCC 34304株をGY培地で培養し、対数増殖期後期の細胞を4℃、3,500×g、5 min遠心してペレットにし、液体窒素にて凍結後破砕した。細胞破砕液をフェノール抽出後、エタノール沈殿させ、沈殿をTE溶液に溶解した。TE溶液に溶解した核酸を37℃、30 min RNase 処理してRNAを分解し、再度フェノール抽出後、エタノール沈殿させ、沈殿をTE溶液に溶解した。A260/280を測定しDNA濃度を算出した。

これを鋳型に、PrimeSTAR HS DNA polymerase with GC Buffer（タカラバイオ社製）によりubiquitin promoter 配列（619 bp、配列番号：54）を増幅した。用いたPCR primer

は下記の通りで、RHO53はubiquitin promoter 配列上に設定、BglIIリンカー配列を含む。TKO1はubiquitin promoter 配列と人工合成ネオマイシン耐性遺伝子配列を含む。[RHO53: 36mer: 5'- CCC AGA TCT GCC GCA GCG CCT GGT GCA CCC GCC GGG -3' (配列番号：55)、TKO1: 58mer: 5'- CGT GAA GGC CGT CCT GTT CAA TCA TGT TGG CTA GTG TTG CTT AGG TCG CTT GCT GCT G -3' (配列番号：56)]。[PCR cycles: 98℃ 2min/ 98℃ 10 sec, 68℃ 1 min, 30 cycles/ 68℃ 1min]。

人工合成ネオマイシン耐性遺伝子配列を鋳型に、PrimeSTAR HS DNA polymerase with GC Buffer（タカラバイオ社製）により人工合成ネオマイシン耐性遺伝子配列（826 bp、配列番号：57）を増幅した。用いたPCR primer は下記の通りで、TKO2はubiquitin promoter 配列と人工合成ネオマイシン耐性遺伝子配列を含む。RHO57は人工合成ネオマイシン耐性遺伝子配列を含み、BglIIリンカー配列を有する。[TKO2: 54mer: 5'- AGC GAC CTA AGC AAC ACT AGC CAA CAT GAT TGA ACA GGA CGG CCT TCA CGC TGG -3' (配列番号：58)、RHO57: 26mer: 5'- CAG ATC TCA AAA GAA CTC GTC CAG GA -3' (配列番号：59)]。[PCR cycles: 98℃ 2min/ 98℃ 10 sec, 68℃ 1 min, 30 cycles/ 68℃ 1min]。

【００８５】

配列番号54および57を鋳型に、非特許文献１９記載の方法に従ってRHO53（配列番号：55）およびRHO57（配列番号：59）を用いFusion PCRを行った。酵素はLA taq Hot start version（タカラバイオ社製）を使用し、PCR cycles: 94℃ 2min/ 94℃ 20 sec, 55℃ 30 sec, 68℃ 1 min, 30 cycles/ 68℃ 1min（ただし55℃から68℃へは1℃/ 10sec とした）の条件で増幅後、BglIIにて消化した。(図１２)。

上記のようにしてFusionしたThraustochytrium aureum ATCC 34304 由来ubiquitin promoter－人工合成ネオマイシン耐性遺伝子配列（1395 bp、配列番号：60）を、BglIIにて消化し、これを実施例３－１記載pRH27のBamHIサイトに繋いだ。出来たプラスミドを大腸菌にて増幅後、Dye Terminator Cycle Sequencing Kit（BECKMAN COULTER社製）を用いて配列を確認した。これをpRH31と名付けた。

作製した人工合成ネオマイシン耐性遺伝子カセット（pRH31）を図１３に示す。

【００８６】

[実施例３－３]ハイグロマイシン耐性遺伝子カセットの作製

Thraustochytrium aureum ATCC 34304 ゲノムDNAを鋳型に、PrimeSTAR HS DNA polymerase with GC Buffer（タカラバイオ社製）によりubiquitin promoter 配列（617 bp、配列番号：61）を増幅した。用いたPCR primer は下記の通りで、RHO53はubiquitin promoter 配列上に設定、BglIIリンカー配列を含む。KSO8はubiquitin promoter 配列とハイグロマイシン耐性遺伝子配列を含む。[RHO53: 36mer: 5'- CCC AGA TCT GCC GCA GCG CCT GGT GCA CCC GCC GGG -3' (実施例３－２記載。配列番号：55)、KSO8: 58mer: 5'- TCG CGG TGA GTT CAG GCT TTT TCA TGT TGG CTA GTG TTG CTT AGG TCG CTT GCT GCT G -3' (配列番号：62)]。[PCR cycles: 98℃ 2min/ 98℃ 30 sec, 68℃ 2 min, 30 cycles/ 68℃ 2min]。

pcDNA 3.1/ Hygro(invitrogen社製）を鋳型に、PrimeSTAR HS DNA polymerase with GC Buffer（タカラバイオ社製）によりハイグロマイシン耐性遺伝子（1058 bp、配列番号：63）を増幅した。用いたPCR primer は下記の通りで、KSO7はubiquitin promoter 配列とハイグロマイシン耐性遺伝子配列を含む。RHO56はハイグロマイシン耐性遺伝子を含み、BglIIリンカー配列を有する。[KSO7: 56mer: 5'- AGC GAC CTA AGC AAC ACT AGC CAA CAT GAA AAA GCC TGA ACT CAC CGC GAC GTC TG -3' (配列番号：64)、RHO56: 36mer: 5'- CAG ATC TCT ATT CCT TTG CCC TCG GAC GAG TGC TGG -3' (配列番号：65)]。[PCR cycles: 98℃ 2min/ 98℃ 30 sec, 68℃ 2 min, 30 cycles/ 68℃ 2min]。

【００８７】

配列番号61および63を鋳型に、非特許文献１９記載の方法に従ってRHO53（実施例３－２記載。配列番号：55）およびRHO56（配列番号：65）を用いてFusion PCRを行った。酵素はLA taq Hot start version（タカラバイオ社製）を使用し、下記の条件で増幅後、BglIIにて消化した。[PCR cycles: 94℃ 2min/ 94℃ 20 sec, 55℃ 30 sec, 68℃ 1 min,

30 cycles/ 68℃ 1min。ただし55℃から68℃へは1℃/ 10sec とした]（図１４）。
上記のようにしてFusionしたThraustochytrium aureum ATCC 34304 由来ubiquitin promoter－pcDNA 3.1/ Hygro(invitrogen社製)由来ハイグロマイシン耐性遺伝子（1625 bp、配列番号：66）を、BglIIにて消化し、これを実施例３－１、図１１記載pRH27のBamHIサイトに繋いだ。出来たプラスミドを大腸菌にて増幅後、Dye Terminator Cycle Sequencing Kit（BECKMAN COULTER社製） を用いて配列を確認した。これをpRH32と名付けた。
作製した人工合成ネオマイシン耐性遺伝子カセット（pRH32）を図１５に示す。

【００８８】

[実施例３－４]パリエティキトリウム属C20エロンガーゼ遺伝子のクローニング

実施例３－２記載の方法で抽出したParietichytrium sarkarianum SEK364ゲノムDNAを抽出し、ゲノムを解読した。

C20エロンガーゼ遺伝子に保存される領域を標的として、正方向（PsTaELO2 F1；5’- CCT TCG GCG CTC CTC TTA TGT ATG T -3’）（配列番号：67)、および逆方向（PsTaELO2 R2；5’- CAA TGC AAG AGG CGA ACT GGG AGA G-3’）（配列番号：68）のオリゴヌクレオチドを合成した。次に、実施例３－２に記載の方法で調製したParietichytrium sarkarianum SEK364ゲノムDNAを鋳型として、オリゴヌクレオチドPsTaELO2 F1およびPsTaELO2 R2を用いたPCRを、LA taq Hot start version (TaKaRa)を用いて行った [PCR cycles: 98℃ 1 min/98℃ 10 sec, 60℃ 30 sec, 72℃ 1 min, 30 cycles/72℃ 7 min/4℃ ∞]。得た特異的増幅産物をゲル精製し、ダイレクトシーケンスによってその塩基配列を解析したところ、既知のC20エロンガーゼ遺伝子の配列と有意な相同性を示すことから、Parietichytrium sarkarianum SEK364由来C20エロンガーゼ遺伝子の部分配列であることが示唆された。

【００８９】

続いて、実施例２－２の場合と同様に、3’および5’RACEによるParietichytrium sarkarianum SEK364由来C20エロンガーゼ遺伝子のクローニングを行った。まず、正方向オリゴヌクレオチドプライマー（PsRACE F1；5’- TGG GGC TCT GGA ACC GCT GCT TAC G -3’）（配列番号：69）および（PsRACE F2；5’- CTT CCA GCT CTC CCA GTT CGC CTC T -3’）（配列番号：70)、逆方向オリゴヌクレオチドプライマー（PsRACE R1；5’- CGG GTT GTT GAT GTT GAG CGA GGT G-3’）（配列番号：71）および（PsRACE R2；5’- CCC ACG CCA TCC ACG AGC ACA CCA C-3’）（配列番号：72）を設計した。次に、SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit (Clontech社製）によって作製したcDNAライブラリを鋳型に、合成アダプター特異的なオリゴヌクレオチド、および前述したオリゴヌクレオチドPsRACE F1もしくはPsRACE R1を用いた3’-および5’-RACE [PCR cycles: 94℃ 30 sec 5 cycles/94℃ 30 sec, 70℃ 30 sec, 72℃ 3 min, 5 cycles/94℃ 30 sec, 68℃ 30 sec, 72℃ 3 min, 25 cycles /4℃ ∞] を行った。続いて、得た両RACE産物を鋳型として、合成アダプター特異的なオリゴヌクレオチド、および前述したオリゴヌクレオチドPsRACE F2もしくはPsRACE R2を用いたnested PCR [PCR cycles: 94℃ 1 min/94℃ 30 sec, 68℃ 30 sec, 72℃ 3 min, 25 cycles/72℃ 10 min /4℃ ∞] を行った。得た特異的産物をゲル精製し、pGEM-T easy Vector （Promega社製）を使用したTAクローン化後に塩基配列を解析した結果、Parietichytrium sarkarianum SEK364由来C20エロンガーゼ遺伝子であることが確認された。

【００９０】

さらに、実施例３－２に記載の方法で抽出したParietichytrium 属のゲノムDNAを鋳型にし、LA taq Hot start version（タカラバイオ社製）によりC20 エロンガーゼ遺伝子配列を含む配列（957 bp、配列番号：73）を増幅した。用いたPCR primerは下記のとおりで、RHO153は開始codonを含み、リンカー配列としてBamHIサイトを有する。RHO154は終止codonを含み、リンカー配列としてBamHIサイトを有する。[RHO153: 32 mer: 5’- CCC GGA TCC ATG GCA GCT CGC GTG GAG AAA CA -3’（配列番号：74)、RHO154: 33 mer: 5’- CCC GGA TCC TTA CTG AGC CTT CTT GGA GGT CTC -3’（配列番号：75）]。[PCR cycles: 98℃ 2min/ 98℃ 10 sec, 68℃ 1 min, 30 cycles/ 68℃ 2min]。

得られたDNA断片はpGEM-T easy vector にクローニングし、大腸菌にて増幅後、Dye Terminator Cycle Sequencing Kit（BECKMAN COULTER社製） を用いて配列を確認した。

Parietichytrium 属C20エロンガーゼ遺伝子936 bp（配列番号：76）をクローニングした。これをpRH80と名付けた(図１６)。アミノ酸配列を配列番号：77に示す。

【００９１】

[実施例３－５]パリエティキトリウム属C20エロンガーゼ遺伝子ターゲティングベクターの作製のための土台プラスミド作製

実施例３－４で作製したpRH80（図１６）を鋳型に、C20 エロンガーゼ遺伝子配列中腹部分にBglIIサイトを挿入する様、逆向きに設定したprimer setを用意し、PrimeSTAR Max DNA Polymerase（タカラバイオ社製）にて増幅した。用いたPCR primer は下記の通りでともにBglIIリンカー配列を有する。 [RHO155: 26 mer: 5’- ACA AAG ATC TCG ACT GGA CCG ACA CC -3’（配列番号：78)、 RHO156: 27 mer: 5’- AGT CGA GAT CTT TGT CAG GA G GTG GAC -3’（配列番号：79)]。[PCR cycles: 98℃ 2 min/ 98℃ 10 sec, 56℃ 15 sec, 72℃ 1 min, 30 cycles/ 72℃ 1 min]。上記条件で増幅後、BglIIにて消化したのち、セルフライゲーションした。ライゲーションしたサンプルは大腸菌にて増幅後、Dye Terminator Cycle Sequencing Kit（BECKMAN COULTER社製）を用いて配列を確認した。これをpRH83と名付けた。BglIIサイトを挿入したC20エロンガーゼ遺伝子配列 935 bpを配列番号：80に示す。

作製したParietichytrium属C20エロンガーゼ遺伝子ターゲティングベクターの作製のための土台プラスミド（pRH83）を図１７に示す。

【００９２】

[実施例３－６]ターゲティングベクターの作製（人工合成ネオマイシン耐性遺伝子およびハイグロマイシン耐性遺伝子）

実施例３－２記載のpRH31（図１３）をBglIIにて消化し、人工合成ネオマイシン耐性遺伝子カセットを含むDNA断片を実施例３－５記載pRH83（図１７）のBglIIサイトに繋いだ。これをpRH85と名付けた。

実施例３－３記載のpRH32（図１５)をBglIIにて消化し、ハイグロマイシン耐性遺伝子カセットを含むDNA断片を実施例３－５記載pRH83（図１７）のBglIIサイトに繋いだ。これをpRH86と名付けた。

作製した2種のターゲティングベクター(pRH85および86)を図１８に示す。

【００９３】

[実施例３－７] C20エロンガーゼ遺伝子ターゲティングベクター導入

実施例３－６で作製した2種類のターゲティングベクターを鋳型に、RHO153（実施例３－４記載、配列番号：74）およびRHO154（実施例３－４記載、配列番号：75）をprimerとして用いて、PrimeSTAR Max DNA polymerase（タカラバイオ社製）により遺伝子を増幅した。[PCR cycles: 98℃ 2min/ 98℃ 30 sec, 68℃ 2 min, 30 cycles/ 68℃ 2min]。フェノールクロロホルム抽出、クロロホルム抽出後、DNAをエタノール沈殿させ、沈殿を0.1×TEに溶解した。A260/280を測定しDNA濃度を算出した。実施例３－６記載pRH85（図１８）を鋳型とした際に得られる導入断片は 2661 bpで、Parietichytrium属 C20エロンガーゼ遺伝子前半－SV40 terminator配列－人工合成ネオマイシン耐性遺伝子配列－ubiquitin promoter配列－Parietichytrium属 C20エロンガーゼ遺伝子後半という並びになる（配列番号：81)。実施例３－６記載pRH86（図１８）を鋳型とした際に得られる導入断片は 2892 bpで、Parietichytrium属 C20エロンガーゼ遺伝子前半－SV40 terminator配列－ハイグロマイシン耐性遺伝子配列－ubiquitin promoter配列－Parietichytrium属 C20エロンガーゼ遺伝子後半という並びになる（配列番号：82)。

Parietichytrium sarkarianum SEK364株をGY培地中で4日間培養し、対数増殖期にある細胞を遺伝子導入に使用した。OD600 = 1～1.5相当分の細胞に対し、0.625μgのDNA断片を遺伝子銃法（マイクロキャリア：0.6 micronの金粒子、target distance：6 cm、chamber vacuum：26 mmHg、Rupture disk：1,550 PSI）により導入した。遺伝子導入した細胞は24時間のリカバリータイムの後、PDA寒天平板培地(2 mg/ml G418 含有もしくは2 mg/ml ハイグロマイシン含有)に塗布した。この結果、1撃ちこみあたり10から20個の薬剤耐性株を得た。

【００９４】

[実施例３－８] C20エロンガーゼ遺伝子ジーンターゲティング相同組換体の同定

実施例３－２記載の方法で、Parietichytrium sarkarianum SEK364株、および、C20エロンガーゼ遺伝子ヘテロ相同組換体、C20エロンガーゼ遺伝子ホモ相同組換体（遺伝子破壊株）よりゲノムDNAを抽出後、A260/280を測定しDNA濃度を算出した。これを鋳型にし、LA taq Hot start version（タカラバイオ社製）を用いてゲノム構造確認のPCRを行った。用いたprimerの位置、増幅に用いる組み合わせ、増幅産物の予想サイズを図１９に示す。RHO184はC20 エロンガーゼ上流、RHO185は下流、RHO142およびRHO143は人工合成ネオマイシン耐性遺伝子上、RHO140およびRHO141はハイグロマイシン耐性遺伝子上に、それぞれ設定した。[RHO140: 20 mer: 5’- GGT TGA CGG CAA TTT CGA TG -3’（配列番号：83)、RHO141: 22 mer: 5’- CCT CCT ACA TCG AAG CTG AAA G -3’（配列番号：84)、RHO142: 21 mer: 5’- CTT CTC GGG CTT TAT CGA CTG -3’（配列番号：85)、RHO143: 22 mer: 5’- TAA GGT CGG TCT TGA CAA ACA G -3’（配列番号：86)、RHO184: 24 mer: 5’- AGT AGT CCC CGA TTT GGT AGT TGA -3’（配列番号：87)、RHO185: 22 mer: 5’- GGC AGA GA G CAA AAA CAC GAG C-3’（配列番号：88)]。[PCR cycles: 98℃ 2min/ 98℃ 10 sec, 68℃ 4 min, 30 cycles/ 68℃ 7min]。

野生型アリル（Wt allele）に増幅がなく、人工合成ネオマイシン耐性遺伝子アリル（NeoR allele）およびハイグロマイシン耐性遺伝子アリル（HygR allele）に増幅のないC20エロンガーゼ ノックアウト株が得られた（図２０)。

【００９５】

[実施例３－９] C20エロンガーゼ破壊による脂肪酸組成の変化

Parietichytrium sarkarianum SEK364、および遺伝子破壊株を、GY培地で培養した。対数増殖期後期の細胞を4℃、3,000rpm、10 min遠心してペレットにし、0.9% NaClに懸濁、洗浄する。つづいて4℃、3,000rpm、10 min遠心し、ペレットを滅菌水に懸濁、洗浄した。それをさらに3,000rpm、10 min遠心し、上清を除き、凍結乾燥した。

凍結乾燥した細胞に2 mlのmethanolic KOH（7.5% KOH in 95% methanol）を加え、ボルテックス後、超音波で菌体を破砕した（80℃、30 min）。ついで、500 μlの滅菌水を加えてボルテックスした後、2 mlのn-hexaneを加えてボルテックスした。続いて3,000 rpmで10 min遠心し、上層を捨てる。再び2 mlのn-hexaneを加えてボルテックスし、3,000 rpmで10 min遠心して、上層を捨てた。残った下層に1 mlの6N HClを添加してボルテックスした後、2 mLのn-hexaneを加えてボルテックスした。続いて3,000 rpmで10 min遠心し、上層を回収した。再び2 mlのn-hexaneを加えてボルテックスし、3,000 rpmで10 min遠心して、上層を回収した。回収した上層を窒素ガスで濃縮乾固した。濃縮乾固したサンプルに2 mlの3N methanolic HClを添加し、80℃で一晩インキュベートした。

【００９６】

サンプルを室温まで冷まし、1 mlの0.9% NaClを添加した。ついで、2 mlのn-hexaneを加えてボルテックスした。3,000 rpmで10 min遠心し、上層を回収した。再び2 mlのn-hexaneを加えてボルテックスし、3,000 rpmで10 min遠心して、上層を回収した。回収した上層に無水硫酸ナトリウムを少量添加後、ボルテックス。3,000 rpmで10 min遠心して、上層を回収した。回収した上層を窒素ガスで濃縮乾固した。濃縮乾固したサンプルを0.5 mlのn-hexaneに溶解し、1 μlをGC解析にかけた。GC解析にはガスクロマトグラフGC-2014（島津製作所社製）を使用し、カラム：HR-SS-10（30 m x 0.25 mm；信和化工社製）、カラム温度：150℃ →（5℃/min）→ 220℃（10 min）、キャリアガス：He（1.3 mL/min）の条件で行った。

【００９７】

この結果、 Parietichytrium sarkarianum SEK364においてC20エロンガーゼをノックアウトすると、炭素鎖長22以上の脂肪酸が減少し、炭素鎖長20の脂肪酸が増加した。(図２１)。図２２に野生型株を100%とした時の割合を示す。図２２は、全脂肪酸組成のうちAA 25.2%,DGLA 8.6%,ETA 0.6%, EPA 11.6%, n-6DPA 1.6%,DHA 1.3%を示している。GC面積でn-6DPA/DTAの値 2.4,DHA/n-3DPAの値 4.9,C20PUFA/C22PUFAの値 11.9,n-6PUFA/

n-3PUFAの値　2.6を示している。これらの結果、アラキドン酸が約10倍、EPAが約8倍に増加し、またDPAが約1/4、DHAが約1/5に減少した。

【実施例４】

【００９８】

［Thraustochytrium aureumのPUFA PKS経路関連遺伝子: OrfAの破壊］

[実施例４－１]PUFA PKS経路関連遺伝子: OrfAの上流配列のクローニング

実施例３－２記載の方法で、Thraustochytrium aureum ATCC 34304よりゲノムDNAを抽出後、A260/280を測定しDNA濃度を算出した。これを用い、LA PCRTM in vitro Cloning Kit（タカラバイオ社製）を使用して、ゲノムカセットライブラリを作製した。特許文献７に記載のPUFA PKS経路関連遺伝子: OrfA上にPCR lower primer [RHO20: 23mer: 5’- CGA TGA AAG GTC ACA GAA GAG TC -3’（配列番号：89)] を設定し、上記記載のKit付属カセットプライマーと組み合わせてDNAを増幅した[1st PCR cycles: 98℃ 2min/ 98℃ 30 sec, 56℃ 30 sec, 72℃ 4 min, 30 cycles/ 72℃ 5min]。つづいて、1st PCR 増幅産物を100倍希釈し、PCR lower primer [RHO20] および上記記載のKit付属ネスティッド プライマーを組み合わせてDNAを増幅した[2nd PCR cycles: 98℃ 2min/ 98℃ 30 sec, 56℃ 30 sec, 72℃ 4 min, 30 cycles/ 72℃ 5min]。得られたDNA断片はpGEM-T easy vector にクローニングし、大腸菌にて増幅後、Dye Terminator Cycle Sequencing Kit（BECKMAN COULTER社製） を用いて配列を確認した。

OrfAの上流3,181 bp（配列番号：90）を含む3,377 bp（配列番号：91）のDNA断片をクローニングした。OrfAの上流DNA配列情報として3,181 bpが明らかになった。

【００９９】

[実施例４－２] PUFA PKS経路関連遺伝子: OrfAの下流配列のクローニング

実施例４－１で作製したゲノムカセットライブラリを鋳型として使用した。特許文献７に記載のPUFA PKS経路関連遺伝子: OrfA上にPCR upper primer [RHO21: 21mer: 5’- CAG GGC GAG CGA GTG TGG TTC -3’（配列番号：92）] を設定し、実施例４－１記載の方法でDNAを増幅した。得られたDNA断片をpGEM-T easy vector にクローニングし、大腸菌にて増幅後、Dye Terminator Cycle Sequencing Kit（BECKMAN COULTER社製） を用いて配列を確認した。OrfAの下流1,160 bp（配列番号：93）を含む1,204 bpのDNA断片（配列番号：94）をクローニングした。

配列番号94上に再度PCR upper primer [RHO28: 20mer: 5’- TGA TGC CGA TGC TAC AAA AG -3’（配列番号：95] を作製し、実施例４－１記載の方法でDNAを増幅した。得られたDNA断片をpGEM-T easy vector にクローニングし、大腸菌にて増幅後、Dye Terminator Cycle Sequencing Kit（BECKMAN COULTER社製） を用いて配列を確認した。

さらに下流配列を含む1,488 bpのDNA断片（配列番号：96）をクローニングした。OrfAの下流DNA配列情報として通算2,551 bp（配列番号：97）が明らかになった。

【０１００】

[実施例４－３] PUFA PKS経路関連遺伝子: OrfAターゲティングベクターの作製

Thraustochytrium aureum ATCC 34304のゲノムDNAを鋳型に、PrimeSTAR HS DNA polymerase （タカラバイオ社製）により18S rDNA 配列（1835 bp、配列番号：98）を増幅した。用いたPCR primer は下記の通りで、TMO30は18S rDNA 配列上に設定した。TMO31は18S rDNA配列とEF1α promoter配列を含む。 [TMO30: 30mer: 5’- CGA ATA TTC CTG GTT GAT CCT GCC AGT AGT -3’（配列番号：99）、 TMO31: 46mer: 5’- GTA ACG GCT TTT TTT GAA TTG CAG GTT CAC TAC GCT TGT TAG AAA C -3’（配列番号：100）]。[PCR cycles: 98℃ 10 sec/ 98℃ 10 sec, 58℃ 30 sec, 72℃ 2 min, 30 cycles/ 72℃ 2min]。

また、Thraustochytrium aureum ATCC 34304 ゲノムDNAを鋳型に、PrimeSTAR HS DNA polymerase （タカラバイオ社製）によりEF1α promoter配列（ 661 bp、配列番号：101）を増幅した。用いたPCR primer は下記の通りで、TMO32は18S rDNA配列とEF1α promoter配列を含む。TMO33はEF1α promoter配列と人工合成ネオマイシン耐性遺伝子配列を含む。[TMO32: 46mer: 5’- GGT TTC CGT AGT GAA CCT GCA ATT CAA AAA AAG CCG TTA CTC ACA T -3’（配列番号：102）、 TMO33: 46mer: 5’- GCG TGA AGG CCG TCC TGT TCA ATC ATC

TAG CCT TCC TTT GCC GCT G-3’（配列番号：103）]。[PCR cycles: 98℃ 10 sec/ 98℃ 10 sec, 58℃ 30 sec, 72℃ 1 min, 30 cycles/ 72℃ 1min]。

【０１０１】

人工合成ネオマイシン耐性遺伝子を鋳型に、PrimeSTAR HS DNA polymerase（タカラバイオ社製）により人工合成ネオマイシン耐性遺伝子配列（835 bp、配列番号：104）を増幅した。用いたPCR primer は下記の通りで、TMO34はEF1α promoter配列と人工合成ネオマイシン耐性遺伝子配列を含む。TMO35は人工合成ネオマイシン耐性遺伝子配列とEF1α terminator 配列を含む。[TMO34: 45mer: 5’- CAT CGG CAA AGG AAG GCT AGA TGA TTG AAC AGG ACG GCC TTC ACG -3’（配列番号：105)、TMO 35: 46mer: 5’- GCG CAT AGC CGG CGC GGA TCT CAA AAG AAC TCG TCC AGG AGG CGG T -3’（配列番号：106）]。[PCR cycles: 98℃ 10 sec/ 98℃ 10 sec, 58℃ 30 sec, 72℃ 1 min, 30 cycles/ 72℃ 1min]。また、Thraustochytrium aureum ATCC 34304 ゲノムDNAを鋳型に、PrimeSTAR HS DNA polymerase（タカラバイオ社製）によりEF1α terminator配列（1249 bp、配列番号：107）を増幅した。用いたPCR primer は下記の通りで、TMO36は人工合成ネオマイシン耐性遺伝子配列とEF1α terminator 配列を含む。TMO37はEF1α terminator 中に設定した。[TMO36: 46mer: 5’- TCC TGG ACG AGT TCT TTT GAG ATC CGC GCC GGC TAT GCG CCC GTG C -3’（配列番号：108)、TMO37: 30mer: 5’- CAC TGC AGC GAA AGA CGG GCC GTA AGG ACG -3’（配列番号：109）]。[PCR cycles: 98℃ 10 sec/ 98℃ 10 sec, 58℃ 30 sec, 72℃ 2 min, 30 cycles/ 72℃ 2min]。

【０１０２】

配列番号98、101、104、107を鋳型に、非特許文献１９記載の方法に従ってFusion PCRを行った。酵素にはLA taq Hot start version（タカラバイオ社製）を用いた。初回の増幅には、TMO30（配列番号：99）およびTMO33（配列番号：103)のset、TMO34（配列番号：105）およびTMO37（配列番号：109）のsetを用いた。2度目の増幅はTMO30（配列番号：99）およびTMO37（配列番号：109）のsetを用いた。PCR反応の条件は変性温度を98℃ 10 secとし、アニーリングおよび伸長反応はプライマーのTm値および増幅断片の長さによって適宜調節した(図２３)。

【０１０３】

上記のようにして連結したDNA断片（図２３、配列番号：110、4453 bp ）をT. aureum 18S rDNA 中のEcoRIサイト、および、T. aureum EF1α terminator 中のNcoI サイトで切り出し、pGEM-T easy vector由来のvectorにつなぎ換えた。これをpRH5と名付けた（図２４）。

Thraustochytrium aureum ATCC 34304 ゲノムDNAを鋳型にし、実施例４－１で明らかにした上流配列（配列番号：90および特許文献７に記載のPUFA PKS経路関連遺伝子: OrfA)中にPCR primerを設定し、PrimeSTAR HS DNA polymerase with GC Buffer（タカラバイオ社製）によりDNAを増幅した。この増幅により、1218 bp のDNA断片（配列番号：111）が得られた。これをターゲティングベクターの5’ 相同領域とした。用いたPCR primer は下記の通りで、それぞれリンカー配列としてEcoRIサイト、もしくはHindIIIサイトを付加した。[RHO33: 32mer: 5’- CCC GAA TTC GGA CGA TGA CTG ACT GAC TGA TT -3’（配列番号：112)、RHO34: 28mer: 5’- CCC AAG CTT GTC TGC CTC GGC TCT TGG T -3’（配列番号：113）]。[PCR cycles: 98℃ 2min/ 98℃ 30 sec, 57℃ 30 sec, 72℃ 1 min, 30 cycles/ 72℃ 3min]。

【０１０４】

Thraustochytrium aureum ATCC 34304 ゲノムDNAを鋳型にし、実施例４－２で明らかにした下流配列（配列番号：97）中にPCR primerを設定し、PrimeSTAR HS DNA polymerase with GC Buffer（タカラバイオ社製）によりDNAを増幅した。この増幅により、1000 bp のDNA断片（配列番号：114）が得られた。これをターゲティングベクターの3’ 相同領域とした。用いたPCR primer は下記の通りで、ともにリンカー配列NcoIサイトを付加した。[RHO29: 28mer: 5’- CCC CCA TGG TGT TGC TGT GGG ATT GGT C -3’（配列番号：115)、RHO30: 30mer: 5’- CCC CCA TGG CTC GGT TAC ATC TCT GAG GAA -3’（配列番号：116

)]。[PCR cycles: 98℃ 2min/ 98℃ 30 sec, 57℃ 30 sec, 72℃ 1 min, 30 cycles/ 72℃ 3min]。

増幅した上流配列を図24記載 pRH5中のEcoRIサイトおよびHindIIIサイトに連結した。増幅した下流配列をNcoIサイトに連結した。このベクターをpRH21と名付けた。

作製した人工合成ネオマイシン耐性遺伝子を使用したターゲティングベクター（pRH21）を図２５に示す。

【０１０５】

[実施例４－４] PUFA PKS経路関連遺伝子: OrfAターゲティングベクターの作製（ハイグロマイシン耐性遺伝子）

実施例３－３記載pRH32（図１５)を鋳型にし、PrimeSTAR HS DNA polymerase with GC Buffer（タカラバイオ社製）によりubiqitin promoter-ハイグロマイシン耐性遺伝子断片（1632 bp、配列番号：117）を増幅した。用いたPCR primer は下記の通りで、RHO59はubiquitin promoter上に設定し、リンカー配列HindIIIサイトを付加した。RHO60はハイグロマイシン耐性遺伝子配列を終止codon含み、リンカー配列SphI、SalIを有する。[RHO59: 36mer: 5’- CCC AAG CTT GCC GCA GCG CCT GGT GCA CCC GCC GGG -3’（配列番号：118）、RHO60: 43mer: 5’- CCC GCA TGC GTC GAC TAT TCC TTT GCC CTC GGA CGA GTG CTG G -3’（配列番号：119）]。[PCR cycles: 98℃ 2min/ 98℃ 30 sec, 68℃ 2 min, 30 cycles/ 68℃ 2min]。

増幅した断片を実施例４－３記載pRH21（図２５）のHindIIIおよびSphIサイトに連結した（図２６、pRH30)。

Thraustochytrium aureum ATCC 34304ゲノムDNAを鋳型にし、実施例４－２で明らかにした下流配列（配列番号：97）中に作製したPCR primer を用いて、PrimeSTAR HS DNA polymerase with GC Buffer（タカラバイオ社製）により遺伝子を増幅した。この増幅により、1000 bp のDNA断片（配列番号：120）が得られた。これをターゲティングベクターの3’相同領域とした。用いたPCR primer は下記の通りで、ともにリンカー配列SalIサイトを付加した。[RHO61: 29mer: 5’- CCC GTC GAC GTG TTG CTG TGG GAT TGG TC -3’（配列番号：121)、RHO62: 29mer: 5’- CCC GTC GAC TCG GTT ACA TCT CTG AGG AA -3’（配列番号：122）]。[PCR cycles: 98℃ 2min/ 98℃ 30 sec, 57℃ 30 sec, 72℃ 1 min, 30 cycles/ 72℃ 3min]。

増幅した下流配列をpRH30（図２６）のSalIサイトに連結した。これをpRH33と名付けた。作製したハイグロマイシン耐性遺伝子を使用したターゲティングベクター（pRH33）を図２７に示す。

【０１０６】

[実施例４－５] PUFA PKS経路関連遺伝子: OrfAターゲティングベクター導入

実施例４－３および４－４で作製したターゲティングベクターを鋳型に、RHO30（実施例４－３記載。配列番号：116）およびRHO33（実施例４－３記載。配列番号：112）をprimerとして用いて、PrimeSTAR Max DNA polymerase（タカラバイオ社製）により遺伝子を増幅した。 [PCR cycles: 98℃ 2min/ 98℃ 30 sec, 60℃ 30 sec, 72℃ 1 min, 30 cycles/ 72℃ 3min]。フェノールクロロホルム抽出、クロロホルム抽出後、DNAをエタノール沈殿させ、沈殿を0.1×TEに溶解した。A260/280を測定しDNA濃度を算出した。実施例４－３記載pRH21（図２５）を鋳型とした際に得られる導入断片は 3705 bpで、Thraustochytrium aureum OrfA遺伝子上流－EF1α promoter配列－人工合成ネオマイシン耐性遺伝子配列－Thraustochytrium aureum OrfA 遺伝子下流という並びになる（配列番号：123)。実施例４－４記載pRH33（図２７）を鋳型とした際に得られる導入断片は 3826 bpで、Thraustochytrium aureum OrfA遺伝子上流－ubiquitin promoter配列－ハイグロマイシン耐性遺伝子配列－Thraustochytrium aureum OrfA 遺伝子下流という並びになる（配列番号：124)。

Thraustochytrium aureum ATCC 34304株をGY培地中で4日間培養し、対数増殖期にある細胞を遺伝子導入に使用した。OD600 = 1～1.5相当分の細胞に対し、0.625μgのDNA断片を遺伝子銃法（マイクロキャリア：0.6 micronの金粒子、target distance：6 cm、chamb

er vacuum：26 mmHg、Rupture disk：1,100 PSI）により導入した。遺伝子導入した細胞は4～6時間のリカバリータイムの後、PDA寒天平板培地(2 mg/ml G418 含有もしくは2 mg/ml ハイグロマイシン含有)に塗布した。この結果、1撃ちこみあたり100から200個の薬剤耐性株を得た。

【０１０７】

[実施例４－６] PUFA PKS経路関連遺伝子: OrfAジーンターゲティング相同組換体の同定

実施例３－２記載の方法でThraustochytrium aureum ATCC 34304、および、ヘテロ相同組換体、ホモ相同組換体（PKS経路関連遺伝子破壊株）よりゲノムDNAを抽出後、A260/280を測定しDNA濃度を算出した。

ゲノムDNAを制限酵素で切断後、１ウェルあたり約2～3 μgずつ0.7% SeaKem GTG アガロースゲル（タカラバイオ社製）に電気泳動した。これをナイロンメンブレンにトランスファーし、DIGシステム(Roche Applied Science社製）を使用して作製したprobeと54 ℃、16 hr でハイブリダイズさせた。 probe作製に用いたprimerは下記の通り。5’側[RHO37: 22mer: 5’- GAA GCG TCC CGT AGA TGT GGT C -3’ (配列番号：125)、RHO38: 21mer: 5’- GCC CGA GAG GTC AAA GTA CGC -3’ (配列番号：126)]、3’側[RHO39: 20mer: 5’- GCG AGC CCA GGT CCA CTT GC -3’ (配列番号：127)、RHO40: 22mer: 5’- CAG CCC GAT GAA AAA CTT GGT C -3’ (配列番号：128)]。[PCR cycles: 98℃ 2min/ 98℃ 30 sec, 60℃ 30 sec、72℃ 2 min, 30 cycles/ 72℃ 3min]。使用した制限酵素およびprobeの位置は図２８に示した。ハイブリダイズしたプローブの検出は発色法（NBT / BCIP溶液）を用いて行った。

5’側および3’側の解析いずれにおいても、薬剤耐性遺伝子が相同組換えをおこした際あらかじめ予想されるサイズに、バンドが観察された（図２９)。

【０１０８】

[実施例４－７] PUFA PKS経路関連遺伝子：OrfAの破壊による脂肪酸組成の変化

実施例３－９記載の方法でThraustochytrium aureum ATCC 34304および遺伝子破壊株を培養、凍結乾燥後、脂肪酸をメチルエステル化し、GCを用いて解析した。

脂肪酸組成の変化を図３０に示す。図３１に野生型株を100%とした時の割合を示した。図31は、全脂肪酸組成のうちAA 3.1%,DGLA 0.2%,ETA 0.04%, EPA 6.8%, n-6DPA 10.7%,DHA 22.6%を示している。GC面積でn-6DPA/DTAの値 5.3,DHA/n-3DPAの値 20.0,C20PUFA/C22PUFAの値 0.3,n-6PUFA/n-3PUFAの値 0.5を示している。この結果、Thraustochytrium aureumにおいてPUFA PKS経路関連遺伝子：OrfAを破壊すると、DPA（C22: 5n-6）に増加傾向、DHA（C22: 6n-3）に減少傾向が見られた。

【実施例５】

【０１０９】

［Thraustochytrium aureum OrfA破壊株におけるC20エロンガーゼ遺伝子の破壊］

[実施例５－１]Thraustochytrium aureum C20エロンガーゼ遺伝子の上流配列のクローニング

実施例４－１で作製したゲノムカセットライブラリを鋳型として使用した。実施例２－５記載のC20エロンガーゼ遺伝子上流配列（配列番号：24）上にPCR lower primer [RHO71: 22mer: 5’- GGG AGC GCA GGG AAA ACG GTC T -3’ (配列番号：129)] を作製し、実施例４－１記載のKit付属カセットプライマーと組み合わせて遺伝子を増幅した[1st PCR cycles: 98℃ 2min/ 98℃ 30 sec, 56℃ 30 sec, 72℃ 4 min, 30 cycles/ 72℃ 5min]。続いて、1st PCR 増幅産物を100倍希釈し、PCR lower primer [RHO72: 20mer: 5’- CCA GCC CAC GTC GTC GGA GC -3’ (配列番号：130)] および実施例４－１記載のKit付属ネスティッド プライマーを組み合わせて遺伝子を増幅した[2nd PCR cycles: 98℃ 2min/ 98℃ 30 sec, 56℃ 30 sec, 72℃ 4 min, 30 cycles/ 72℃ 5min]。得られたDNA断片はpGEM-T easy vector にクローニングし、大腸菌にて増幅後、Dye Terminator Cycle Sequencing Kit（BECKMAN COULTER社製） を用いて配列を確認した。

C20エロンガーゼ遺伝子の上流－3277 bp～－981 bpの領域を含む2297 bpのDNA断片（配列番号：131) をクローニングした。

【０１１０】
[実施例５－２] C20エロンガーゼ遺伝子の下流配列のクローニング
実施例４－１で作製したゲノムカセットライブラリを鋳型として使用した。実施例２－５記載のC20エロンガーゼ遺伝子下流配列（配列番号：25）上にPCR upper primer [RHO87: 23 mer: 5’- GCC GCT CAT GCC CAC GCT CAA AC -3’（配列番号：132）] を作製し、実施例４－１記載のKit付属カセットプライマーと組み合わせて遺伝子を増幅した[1st PCR cycles: 98℃ 2min/ 98℃ 30 sec, 56℃ 30 sec, 72℃ 4 min, 30 cycles/ 72℃ 5min]。続いて、1st PCR 増幅産物を100倍希釈し、PCR lower primer [RHO73: 23 mer: 5’- CTT TCG GCT GCC AGG AAT CTA CG -3’（配列番号：133）] および実施例４－１記載のKit付属ネスティッド プライマーを組み合わせて遺伝子を増幅した[2nd PCR cycles: 98℃ 2min/ 98℃ 30 sec, 56℃ 30 sec, 72℃ 4 min, 30 cycles/ 72℃ 5min]。得られたDNA断片はpGEM-T easy vector にクローニングし、大腸菌にて増幅後、Dye Terminator Cycle Sequencing Kit（BECKMAN COULTER社製） を用いて配列を確認した。
C20エロンガーゼ遺伝子の下流1,106 bp～3,294 bpの領域を含む2,189 bpのDNA断片(配列番号：134) をクローニングした。
【０１１１】
[実施例５－３]ブラストサイジン耐性遺伝子カセットの作製
Thraustochytrium aureum ATCC 34304よりゲノムDNAを鋳型に、PrimeSTAR HS DNA polymerase with GC Buffer（タカラバイオ社製）によりubiquitin promoter 配列（618 bp、配列番号135) を増幅した。用いたPCR primer は下記の通りで、RHO53はubiquitin promoter 配列上に設定、BglIIリンカー配列を含む（実施例３－２、配列番号：55)。RHO48はubiquitin promoter 配列とブラストサイジン耐性遺伝子配列を含む。 [RHO48: 58mer: 5’- CTT CTT GAG ACA AAG GCT TGG CCA TGT TGG CTA GTG TTG CTT AGG TCG CTT GCT GCT G -3’（配列番号：136）]。[PCR cycles: 98℃ 2min/ 98℃ 10 sec, 68℃ 1 min, 30 cycles/ 68℃ 1min]。
pTracer-CMV/Bsd/lacZ を鋳型に、PrimeSTAR HS DNA polymerase with GC Bufferによりブラストサイジン耐性遺伝子(432 bp、配列番号：137) を増幅した。用いたPCR primer は下記の通りで、RHO47はubiquitin promoter 配列とブラストサイジン耐性遺伝子配列を含む。RHO49はブラストサイジン耐性遺伝子配列を含み、BglIIリンカー配列を有する。[RHO47: 54mer:5’- AGC GAC CTA AGC AAC ACT AGC CAA CAT GGC CAA GCC TTT GTC TCA AGA AGA ATC -3’（配列番号：138)、RHO49: 38mer: 5’- CCC AGA TCT TAG CCC TCC CAC ACA TAA CCA GAG GGC AG -3’（配列番号：139)]。[PCR cycles: 98℃ 2min/ 98℃ 10 sec, 68℃ 1 min, 30 cycles/ 68℃ 1min]。
【０１１２】
配列番号135および137を鋳型に、非特許文献１９記載の方法に従ってRHO53（実施例３－２、配列番号：55) およびRHO49（配列番号：139) を用いてFusion PCRを行った。酵素はLA taq Hot start version（タカラバイオ社製）を使用し、下記の条件で増幅後、BglIIにて消化した。 [PCR cycles: 94℃ 2min/ 94℃ 20 sec, 55℃ 30 sec, 68℃ 1 min, 30 cycles/ 68℃ 1min。ただし55℃から68℃へは1℃/ 10sec とした]（図３２)。
上記のようにしてFusionしたThraustochytrium aureum ATCC 34304 由来ubiquitin promoter－pTracer-CMV/Bsd/lacZ由来ブラストサイジン耐性遺伝子（1000 bp、配列番号：140）を、BglIIにて消化し、これを実施例３－１記載pRH27（図１１）のBamHIサイトに繋いだ。出来たプラスミドを大腸菌にて増幅後、Dye Terminator Cycle Sequencing Kit（BECKMAN COULTER社製） を用いて配列を確認した。これをpRH38と名付けた。
作製したブラストサイジン耐性遺伝子カセット（pRH38) を図３３に示す。
【０１１３】
[実施例５－４] GFP融合ゼオシン耐性遺伝子カセットの作製
Thraustochytrium aureum ATCC 34304よりゲノムDNAを鋳型に、PrimeSTAR HS DNA polymerase with GC Buffer（タカラバイオ社製）によりubiquitin promoter 配列（812 bp、配列番号：141) を増幅した。用いたPCR primer は下記の通りで、TMO38はubiquitin pro

moter配列上に設定した。TMO39はubiquitin promoter配列とEnhanced GFP 遺伝子配列を含む。 [TMO38: 29mer: 5’- TCG GTA CCC GTT AGA ACG CGT AAT ACG AC -3’ (配列番号：142)、TMO39: 41mer: 5’- TCC TCG CCC TTG CTC ACC ATG TTG GCT AGT GTT GCT TAG GT -3’ (配列番号：143)]。[PCR cycles: 98℃ 10 sec/ 98℃ 10 sec, 58℃ 30 sec, 72℃ 1 min, 30 cycles/ 72℃ 1min]。

Enhanced GFP 遺伝子配列（clontech社製）を鋳型に、PrimeSTAR HS DNA polymerase（タカラバイオ社製）によりEnhanced GFP 遺伝子配列 (748 bp、配列番号：144) を増幅した。用いたPCR primer は下記の通りで、TMO40はubiquitin promoter配列とEnhanced GFP 遺伝子配列を含む。RHO91はEnhanced GFP配列およびゼオシン耐性遺伝子配列を含む。 [TMO40: 41mer: 5’- ACC TAA GCA ACA CTA GCC AAC ATG GTG AGC AAG GGC GAG GA -3’ (配列番号：145)、RHO91: 58mer: 5’- GAA CGG CAC TGG TCA ACT TGG CGT CCA TGC CGA GAG TGA TCC CGG CGG CGG TCA CGA A-3’(配列番号：146)]。[PCR cycles: 98℃ 10 sec/ 98℃ 10 sec, 58℃ 30 sec, 72℃ 2 min, 30 cycles/ 72℃ 2min]。

【０１１４】

配列番号141および144を鋳型に、非特許文献１９記載の方法に従ってLA taq Hot start version（タカラバイオ社製） により、Fusion PCRを行った。PrimerにはTMO38 (配列番号：142) およびRHO91 (配列番号：146) を用い、条件はPCR cycles: 94℃ 2min/ 94℃ 20 sec, 55℃ 30 sec, 68℃ 2 min, 30 cycles/ 68℃ 2min（ただし、55℃から68℃へは1℃/ 10sec）とした（図３４、1519 bp、配列番号：147)。

配列番号147を鋳型に、PrimeSTAR HS DNA polymerase（タカラバイオ社製）によりubiquitin promoter配列－Enhanced GFP遺伝子配列 (1319 bp、配列番号：148) を増幅した。用いたprimerは下記の通り。RHO53 (実施例３－２、配列番号：55) はubiquitin promoter配列を含み、BglIIサイトを有する。RHO91 (配列番号：146) はEnhanced GFP配列およびゼオシン耐性遺伝子配列を含む。[PCR cycles: 98℃ 2 min/ 98℃ 10 sec, 68℃ 2 min, 30 cycles/ 68℃ 2min]。

pcDNA3.1 Zeo(+)を鋳型に、PrimeSTAR HS DNA polymerase（タカラバイオ社製）によりゼオシン耐性遺伝子配列 (408 bp、配列番号：149) を増幅した。RHO92はEnhanced GFP配列およびゼオシン耐性遺伝子配列を含む。RHO64はゼオシン耐性遺伝子配列を含み、BglIIサイトを有する。 [RHO92: 54mer: 5’- CGC CGC CGG GAT CAC TCT CGG CAT GGA CGC CAA GTT GAC CAG TGC CGT TCC GGT -3’ (配列番号：150)、 RHO64: 38mer: 5’- CCC AGA TCT CAG TCC TGC TCC TCG GCC ACG AAG TGC AC -3’ (配列番号：151)]。[PCR cycles: 98℃ 2 min/ 98℃ 10 sec, 68℃ 1 min, 30 cycles/ 68℃ 1min]。

【０１１５】

配列番号148および149を鋳型に、非特許文献１９記載の方法に従ってLA taq Hot start version（タカラバイオ社製）によりFusion PCRを行った。PrimerにはRHO53 (実施例３－２、配列番号：55) およびRHO64 (配列番号：151) を用い、条件はPCR cycles: 94℃ 2min/ 94℃ 20 sec, 68℃ 2 min, 30 cycles/ 68℃ 2min（ただし55℃から68℃へは1℃/ 10sec）とした（図３５)。

上記のようにしてFusionしたThraustochytrium aureum ATCC 34304 由来ubiquitin promoter－Enhanced GFP遺伝子－pcDNA3.1 Zeo(+) 由来ゼオシン耐性遺伝子（図３５、 1677 bp、配列番号：152) をBglIIにて消化し、これを実施例３－１記載pRH27 （図１１）のBamHIサイトに繋いだ。出来たプラスミドを大腸菌にて増幅後、Dye Terminator Cycle Sequencing Kit（BECKMAN COULTER社製） を用いて配列を確認した。これをpRH51と名付けた。

作製したGFP融合ゼオシン耐性遺伝子カセット (pRH51) を図３６に示す。

【０１１６】

[実施例５－５] C20エロンガーゼ遺伝子ターゲティングベクターの作製のための土台となるプラスミド作製

Thraustochytrium aureum ATCC 34304ゲノムDNAを鋳型に、PrimeSTAR HS DNA polymerase（タカラバイオ社製）により、C20 エロンガーゼ遺伝子およびその周辺配列をPCR法に

て増幅した 2884 bp、配列番号：153）。用いたPCR primer は下記の通りで、いずれもEcoRIリンカー配列を含み、KSO9はC20 エロンガーゼ遺伝子上流（配列番号：24）中に、KSO10はC20 エロンガーゼ遺伝子下流（配列番号：25）に設定した。[KSO9: 50mer: 5’- CCC GAA TTC ACT AGT GAT TCT CCC GGG TGG ACC TAG CGC GTG TGT CAC CT -3’（配列番号：154)、 KSO10: 40mer: 5’- CCC GAA TTC GAT TAT CCC GGG GCC GAG AAC GGG GTC GCC C -3’（配列番号：155）]。[PCR cycles: 98℃ 2 min/ 98℃ 10 sec, 68℃ 3.5 min, 30 cycles/ 68℃ 10 min]。酵素はPrimeSTAR HS DNA Polymerase（タカラバイオ社製）を使用し、増幅後、EcoRIにて消化したのち、pBluescript(SK)（stratagene社製）vector EcoRIサイトにクローニングした。大腸菌にて増幅後、Dye Terminator Cycle Sequencing Kit（BECKMAN COULTER社製） を用いて配列を確認した（図３７）。

【０１１７】

図３７記載のプラスミドを鋳型に、C20 エロンガーゼ遺伝子配列部分を欠失し、BglIIサイトを挿入（1939 bp、配列番号：156）する目的で、逆向きに設定したprimer setを用意し、PrimeSTAR Max DNA Polymerase（タカラバイオ社製）にて増幅した。用いたPCR primer は下記の通りで、ともにBglIIリンカー配列を有する。[RHO69: 38mer: 5’- CCC AGA TCT ACC TGT TTC CGG CTG GCT CCC GAG CCA TG -3’（配列番号：157)、 RHO70: 38mer: 5’- CCC AGA TCT GGT CGC GTT TAC AAA GCA GCG CAG CAA CA -3’（配列番号：158)]。[PCR cycles: 98℃ 2 min/ 98℃ 10 sec, 68℃ 1.5 min, 30 cycles/ 68℃ 1.5 min]上記条件で増幅後、BglIIにて消化したのち、セルフライゲーションした。ライゲーションしたサンプルは大腸菌にて増幅後、Dye Terminator Cycle Sequencing Kit（BECKMAN COULTER社製） を用いて配列を確認した。これをpRH40と名付けた。

作製したC20エロンガーゼ遺伝子ターゲティングベクターの作製のための土台となるプラスミド（pRH40）を図３８に示す。

【０１１８】

[実施例５－６]ターゲティングベクターの作製（ブラストサイジン耐性遺伝子およびGFP融合ゼオシン耐性遺伝子）

実施例５－３記載のpRH38（図３３）をBglIIにて消化し、ブラストサイジン耐性遺伝子カセットを含むDNA断片を実施例５－５記載のpRH40（図３８）のBglIIサイトに繋いだ。これをpRH43と名付けた。

実施例５－４記載のpRH51（図３６）をBglIIにて消化し、GFP融合ゼオシン耐性遺伝子カセットを含むDNA断片を実施例５－５記載のpRH40（図３８）のBglIIサイトに繋いだ。これをpRH54と名付けた。

作製した2種のターゲティングベクター(pRH43および54)を図３９に示す。

【０１１９】

[実施例５－７]Thraustochytrium aureum OrfA破壊株へのC20エロンガーゼ遺伝子ターゲティングベクター導入

実施例５－６で作製した2種類のターゲティングベクターを鋳型に、KSO11およびKSO12をprimerとして用いて、PrimeSTAR Max DNA polymerase（タカラバイオ社製）により遺伝子を増幅した。KSO11はThraustochytrium aureum C20エロンガーゼ遺伝子上流に、KSO12はThraustochytrium aureum C20エロンガーゼ遺伝子下流に設定した。[KSO11: 31mer: 5’- CTC CCG GGT GGA CCT AGC GCG TGT GTC ACC T -3’（配列番号：159)、 KSO12: 27mer: 5’- ATC CCG GGG CCG AGA ACG CCC TCG CCC -3’（配列番号：160)]。[PCR cycles: 98℃ 2min/ 98℃ 30 sec, 68℃ 2 min, 30 cycles/ 68℃ 2min]。フェノールクロロホルム抽出、クロロホルム抽出後、DNAをエタノール沈殿させ、沈殿を0.1×TEに溶解した。A260/280を測定しDNA濃度を算出した。実施例５－６記載pRH43（図３９）を鋳型とした際に得られる導入断片は 3215 bpで、Thraustochytrium aureum C20エロンガーゼ遺伝子上流－ubiquitin promoter－ブラストサイジン耐性遺伝子配列－SV40 terminator 配列－Thraustochytrium aureum C20エロンガーゼ遺伝子下流という並びになる（配列番号：161)。実施例５－６記載pRH54（図３９）を鋳型とした際に得られる導入断片は 3887 bpで、Thraustochytrium aureum C20エロンガーゼ遺伝子上流－ubiquitin promoter－Enhanced GFP

遺伝子配列－ゼオシン耐性遺伝子配列－SV40 terminator 配列－Thraustochytrium aureum C20エロンガーゼ遺伝子下流という並びになる（配列番号：162)。

実施例４記載のPUFA PKS経路関連遺伝子: OrfA遺伝子破壊株をGY培地中で4日間培養し、対数増殖期にある細胞を遺伝子導入に使用した。OD600 = 1～1.5相当分の細胞に対し、0.625μgのDNA断片を遺伝子銃法（マイクロキャリア：0.6 micronの金粒子、target distance：6 cm、chamber vacuum：26 mmHg、Rupture disk：1,100 PSI）により導入した。遺伝子導入した細胞は4～6時間のリカバリータイムの後、PDA寒天平板培地(2 mg/ml G418含有もしくは2 mg/ml ハイグロマイシン含有)に塗布した。この結果、1撃ちこみあたり100から200個の薬剤耐性株を得た。

【０１２０】

[実施例５－８] C20エロンガーゼ遺伝子ジーンターゲティング相同組換体の同定

実施例３－２記載の方法で、Thraustochytrium aureumおよびThraustochytrium aureum OrfA破壊株におけるC20エロンガーゼ遺伝子の破壊株からゲノムDNAを抽出後、A260/280を測定しDNA濃度を算出した。

ゲノムDNAを制限酵素で切断後、１ウェルあたり約2～3 μgずつ0.7% SeaKem GTG アガロースゲル（タカラバイオ社製）に電気泳動した。これをナイロンメンブレンにトランスファーし、DIGシステム(Roche Applied Science社製) を使用して作製したprobeと51 ℃、16 hr でハイブリダイズさせた。 probe作製に用いたprimerは下記の通り。5’側[RHO94: 21mer: 5’- ACG TCC GCT TCA AAC ACC TCG -3’ (配列番号：163)、RHO95: 24mer: 5’- TCG GAA CAA CTG GAA CAA CTA AAG -3’ (配列番号：164)]、3’側[RHO96: 22mer: 5’- ATG TCG CTC TCC TTC TTC TCA G-3’ (配列番号：165)、RHO97: 21mer: 5’- TCG GCT CCT GGA AAG TGC TCT -3’ (配列番号：166)]。[PCR cycles: 98℃ 2min/ 98℃ 30 sec, 58℃ 30 sec、72℃ 1 min, 30 cycles/ 72℃ 3min]。使用した制限酵素およびprobeの位置は図４０に示した。ハイブリダイズしたプローブの検出は発色法（NBT / BCIP溶液）を用いて行った。

5’側および3’側の解析いずれにおいても、薬剤耐性遺伝子が相同組換えをおこした際あらかじめ予想されるサイズに、バンドが観察された(図４１)。この実験により、Thraustochytrium aureum ATCC 34304株は、PKS経路関連遺伝子: OrfA および C20 エロンガーゼ 遺伝子を欠損しても栄養要求性にならないことが分かった。

【０１２１】

[実施例５－９] Thraustochytrium aureum OrfA破壊株におけるC20エロンガーゼ遺伝子の破壊による脂肪酸組成の変化

実施例３－９記載の方法でThraustochytrium aureum ATCC 34304および遺伝子破壊株を培養、凍結乾燥後、脂肪酸をメチルエステル化し、GCを用いて解析した。GC解析にはガスクロマトグラフGC-2014（島津製作所社製）を使用し、カラム：HR-SS-10（30 m x 0.25 mm；信和化工社製）、カラム温度：150℃ → (5℃/min) → 220℃（10 min）、キャリアガス：He（1.3 mL/min）の条件で行った。

脂肪酸組成の変化を図４２に示す。また、図４３に野生型株を100%とした時の割合を示す。図４３は、全脂肪酸組成のうちAA 19.5%,DGLA 1.8%,ETA 0.3%, EPA 24.9%, n-6DPA 5.9%,DHA 6.8%を示している。GC面積でn-6DPA/DTAの値 12.6,DHA/n-3DPAの値 11.7,C20PUFA/C22PUFAの値 3.4,n-6PUFA/n-3PUFAの値 0.8を示している。

この結果、Thraustochytrium aureum OrfA破壊株においてC20エロンガーゼ遺伝子を破壊すると、C20: 4n-6(AA)が約8倍に増加、C20: 5n3(EPA)が約4倍に増加、C22: 6n-3(DHA)が約1/5倍に減少した。

【実施例６】

【０１２２】

［Thraustochytrium aureum OrfA破壊株におけるω3デサチュラーゼ遺伝子の発現］

[実施例６－１]ミズカビSaprolegnia diclina由来 ω3デサチュラーゼ遺伝子のクローニングと遺伝子発現プラスミドの作製

実施例３－２記載の方法でThraustochytrium aureum ATCC 34304よりゲノムDNAを抽出

後、A260/280を測定しDNA濃度を算出した。これを鋳型に、LA Taq with GC Buffer（タカラバイオ社製、Buffer II使用）によりubiquitin promoter 配列（longer）（812 bp、配列番号：167）を増幅した。用いたPCR primer は下記の通りで、TMO42はubiquitin promoter 配列上、RHO53（実施例３－２、配列番号：55）よりも上流に設定、KpnIリンカー配列を含む。TMO43はubiquitin promoter 配列とSaprolegnia diclina由来ω3 デサチュラーゼ遺伝子配列を含む。 [TMO42: 29mer: 5’- TCG GTA CCC GTT AGA ACG CGT AAT ACG AC -3’（配列番号：168)、TMO43: 45mer: 5’- TTC GTC TTA TCC TCA GTC ATG TTG GCT AGT GTT GCT TAG GTC GCT -3’（配列番号：169）]。[PCR cycles: 96℃ 2min/ 98℃ 20 sec, 60℃ 30 sec, 72℃ 1 min, 30 cycles/ 72℃ 1min]。

【０１２３】

次に、Saprolegnia diclinaを、1LあたりD-Glucose 31.8g、Yesat Extract 10.6g、を含有する培地（脱イオン水で調整）で培養した。対数増殖期後期の細胞を4℃、3,500×g、5 min 遠心してペレットにし、液体窒素にて凍結破砕した。細胞破砕液をフェノール抽出後、エタノール沈殿させ、沈殿を TE 溶液に溶解した。TE 溶液に溶解した核酸を37℃、30 min RNase 処理して RNA を分解し、再度フェノール抽出後、エタノール沈殿させ、沈殿を TE 溶液に溶解した。A260/280 を測定し、DNA 純度、および濃度を算出した。このようにして得られたSaprolegnia diclinaのゲノムDNAを鋳型に、LA Taq with GC Buffer（タカラバイオ社製、Buffer II使用）によりSaprolegnia diclina由来ω3 デサチュラーゼ遺伝子配列（1116 bp、配列番号：170）を増幅した。用いたPCR primer は下記の通りで、TMO44はubiquitin promoter 配列とSaprolegnia diclina由来ω3 デサチュラーゼ遺伝子配列を含む。TMO45はSaprolegnia diclina由来ω3 デサチュラーゼ遺伝子配列およびubiquitin terminatorを含む。 [TMO44: 43mer: 5’- CCT AAG CAA CAC TAG CCA ACA TGA CTG AGG ATA AGA CGA AGG T -3’（配列番号：171)、TMO45: 40mer: 5’- ATA CTA CAG ATA GCT TAG TTT TAG TCC GAC TTG GCC TTG G -3’（配列番号：172）]。[PCR cycles: 96℃ 2min/ 98℃ 20 sec, 60℃ 30 sec, 72℃ 1 min 30 sec, 30 cycles/ 72℃ 1min 30 sec]。

【０１２４】

Thraustochytrium aureum ATCC 34304ゲノムDNAを鋳型に、LA Taq with GC Buffer（タカラバイオ社製、Buffer II使用）によりubiquitin terminator 配列（614 bp、配列番号：173）を増幅した。用いたPCR primer は下記の通りで、TMO46はSaprolegnia diclina由来ω3 デサチュラーゼ遺伝子配列およびubiquitin terminatorを含む。TMO47はubiquitin terminator配列上に設計し、KpnIリンカー配列を含む。[TMO46: 44mer: 5’- CCA AGG CCA AGT CGG ACT AAA ACT AAG CTA TCT GTA GTA TGT GC -3’（配列番号：174)、TMO47: 45mer: 5’- TCG GTA CCA CCG CGT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GAG ACT GCA GTT -3’（配列番号：175）]。[PCR cycles: 96℃ 2min/ 98℃ 20 sec, 60℃ 30 sec, 72℃ 1 min, 30 cycles/ 72℃ 1min]。

配列番号167、170、173を鋳型に、非特許文献１９記載の方法に従ってTMO42（配列番号：168）およびTMO47（配列番号：175）を用いてFusion PCRを行った。酵素はLA Taq with GC Buffer（タカラバイオ社製、Buffer II使用）を使用し、下記の条件で増幅した。 [PCR cycles: 96℃ 2min/ 98℃ 20 sec, 55℃ 30 sec , 68℃ 3 min, 30 cycles/ 68℃ 3min。ただし55℃から68℃へは1℃/ 10sec とした]（図４４、2463 bp、配列番号：176)。

【０１２５】

実施例５－３記載pRH38（図３３)を鋳型にRHO84（配列番号：177、配列後述）およびRHO52（実施例３－１、配列番号：52）を用いてPCRを行った。RHO84はubiquitin promoter上に設定、KpnIリンカー配列を有する。RHO52はSV40 terminator配列上に設定、BglIIリンカーを有する。酵素はLA taq Hot start versionを使用し、下記の条件で増幅後、pGEM-T easy vector にクローニングした。[RHO84: 36mer: 5’- CCC GGT ACC GCC GCA GCG CCT GGT GCA CCC GCC GGG -3’（配列番号：177)]。[PCR cycles: 98℃ 2min/ 98℃ 10 sec, 68℃ 1 min 30 sec, 30 cycles/ 68℃ 3min]。大腸菌にて増幅後、Dye Terminator Cycle Sequencing Kit（BECKMAN COULTER社製） を用いて配列を確認した。これをpRH45と

名付けた（図４５）。

図４４でFusionしたThraustochytrium aureum ATCC 34304 由来ubiquitin promoter－Saprolegnia diclina由来ω3 デサチュラーゼ遺伝子－Thraustochytrium aureum ATCC 34304 由来ubiquitin terminator（配列番号：176）を、KpnIにて消化し、これをpRH45（図４５）のKpnIサイトに繋いだ。出来たプラスミドを大腸菌にて増幅後、Dye Terminator Cycle Sequencing Kit（BECKMAN COULTER社製） を用いて配列を確認した。これをpRH48と名付けた。

作製したSaprolegnia diclina由来ω3 デサチュラーゼ遺伝子発現プラスミド（pRH48）を図４６に示す。

【０１２６】

[実施例６－２]Thraustochytrium aureum OrfA破壊株へのミズカビ由来ω3デサチュラーゼ発現プラスミド導入

実施例６－１で作製したターゲティングベクターを鋳型に、TMO42（配列番号：168）およびRHO52（実施例３－１、配列番号：52）をprimerとして用いて、PrimeSTAR Max DNA polymerase（タカラバイオ社製）によりDNAを増幅した。 [PCR cycles: 94℃ 30 sec, 72℃ 1 min, 5 cycles/ 94℃ 30 sec, 70℃ 30 sec, 72℃ 1 min, 5 cycles/ 94℃ 30 sec, 68℃ 30 sec, 72℃ 1 min, 25 cycles / 72℃ 2 min]。1.0% アガロースゲルより増幅産物を回収し、エタノール沈殿させ、沈殿を0.1×TEに溶解した。A260/280を測定しDNA濃度を算出した。PCRによって得られる導入断片は 3777 bpで、ubiquitin promoter－ω3 デサチュラーゼ遺伝子－ubiquitin terminator－ubiquitin promoter－ブラストサイジン耐性遺伝子配列－SV40 terminator 配列という並びになる（配列番号：178)。

実施例４で作製したThraustochytrium aureum OrfA破壊株をGY培地中で4日間培養し、対数増殖期にある細胞を遺伝子導入に使用した。OD600 = 1～1.5相当分の細胞に対し、0.625μgのDNA断片を遺伝子銃法（マイクロキャリア：0.6 micronの金粒子、target distance：6 cm、chamber vacuum：26 mmHg、Rupture disk：1,100 PSI）により導入した。遺伝子導入した細胞は4～6時間のリカバリータイムの後、PDA寒天平板培地(0.2 mg/ml ブラストサイジン含有)に塗布した。この結果、1撃ちこみあたり20から30個の薬剤耐性株を得た。

【０１２７】

[実施例６－３]ミズカビ由来ω3デサチュラーゼ遺伝子発現株の取得

実施例３－２記載の方法で、実施例３で作製したThraustochytrium aureum OrfA 破壊株およびω3デサチュラーゼ遺伝子発現株からゲノムDNAを抽出後、A260/280を測定しDNA濃度を算出した。これを鋳型にし、LA taq Hot start version を用いてゲノム構造確認のPCRを行った。用いたprimerの位置、増幅に用いる組み合わせ、増幅産物の予想サイズを図４７に示す。TMO42（実施例６－１、配列番号：168）はubiquitin promoter上、RHO49（実施例５－３、配列番号：139)はブラストサイジン耐性遺伝子上に設定した。[PCR cycles: 98℃ 2min/ 98℃ 10 sec, 68℃ 4 min, 30 cycles/ 68℃ 7min]。

予想されるサイズに増幅するバンドが確認できた(図４８)。導入した発現断片がゲノムに安定に導入された株が単離できた。

【０１２８】

[実施例６－４] PUFA PKS経路破壊株におけるω3 デサチュラーゼ発現による脂肪酸組成の変化

実施例３－９記載の方法で、実施例４で作製したThraustochytrium aureum OrfA破壊株および実施例６－３で作製したω3 デサチュラーゼ発現株を培養、凍結乾燥後、脂肪酸をメチルエステル化し、GCを用いて解析した。GC解析にはガスクロマトグラフGC-2014（島津製作所社製）を使用し、カラム：HR-SS-10（30 m x 0.25 mm；信和化工社製）、カラム温度：150℃ →（5℃/min）→ 220℃（10 min）、キャリアガス：He（1.3 mL/min）の条件で行った。

この結果、ω3 デサチュラーゼ発現株ではn-6系列の脂肪酸が減少し、n-3系列の脂肪酸に増加傾向が見られた(図４９)。図５０に野生型株を100%とした時の割合を示す。図５０は

、全脂肪酸組成のうちAA 1.5%,DGLA 1.8%,ETA 0.5%, EPA 11.4%, n-6DPA 1.2%,DHA 22.0%を示している。GC面積でn-6DPA/DTAの値 0.6,DHA/n-3DPAの値 5.7,C20PUFA/C22 PUFAの値 0.5,n-6PUFA/n-3PUFAの値 0.2を示している。
これらの結果、アラキドン酸が約1/7、DPAが約1/10に減少し、またEPA、DHAともに約3倍に増加した。

【実施例７】

【０１２９】

［Thraustochytrium roseumのC20エロンガーゼ遺伝子の破壊］

[実施例７－１] T. roseum由来C20エロンガーゼ遺伝子のクローニング

Thraustochytrium roseum ATCC 28210 株のC20エロンガーゼ遺伝子に保存される領域を標的として、正方向 (ELO20F；5’- ATH GAR TWY TKB RTI TTY GTI CA-3’) (配列番号：179)、および逆方向 (ELO20R；5’- TAR TRI SWR TAC ATI ADI AMR TG-3’) (配列番号：180) の縮重オリゴヌクレオチドを合成した。次に、実施例２－５記載の方法と同様の手法で抽出したT. roseumゲノムDNAを鋳型として、Advantage 2 Polymerase Mix (Clontech社製) を使用したPCR [PCR cycles: 94℃ 1 min/ 94℃ 30 sec, 55℃ 30 sec, 72℃ 1 min, 30 cycles/72℃ 7min/4℃ ∞] を行った。得た特異的産物を、2%アガロースゲル電気泳動による分離後に精製し、pGEM-T easy Vector (Promega社製) を使用して該DNA断片のTAクローニングを行った後に、その塩基配列を解析した。その結果、既知のT. aureum由来C20エロンガーゼ遺伝子の配列と極めて高い配列同一性を示すことから、T. roseum由来C20エロンガーゼ遺伝子の部分配列であることが示唆された。

【０１３０】

続いて、実施例２－２の場合と同様に、3’および5’RACEによるT. roseum由来C20エロンガーゼ遺伝子のクローニングを行った。まず、以下に示すオリゴヌクレオチドプライマーを設計した。正方向オリゴヌクレオチドプライマー (8 F1；5’- CTG ACA AAG TTT CTC GAC TGG AGC GAC A-3’) (配列番号：181)、逆方向オリゴヌクレオチドプライマー (8 R1；5’- TAC GCG GCG GTG CCC GAG CCC CAG-3’) (配列番号：182) および (8 R2；5’- TGC CGA TCG TTG CGT GGT GGA ACA CCT G-3’) (配列番号：183)。次に、SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit (clontech社製) によって作製したcDNAライブラリを鋳型に、合成アダプター特異的なオリゴヌクレオチド、および前述したオリゴヌクレオチド8 F1もしくは8 R1を用いた3’-および5’-RACE [PCR cycles: 94℃ 30 sec 5 cycles/94℃ 30 sec, 70℃ 30 sec, 72℃ 3 min, 5 cycles/94℃ 30 sec, 68℃ 30 sec, 72℃ 3 min, 25 cycles /4℃ ∞] を行った。さらに5’RACEにおいては、得たRACE産物を鋳型として、合成アダプター特異的なオリゴヌクレオチド、および前述したオリゴヌクレオチド8 R2を用いたnested PCR [PCR cycles: 94℃ 1 min/94℃ 30 sec, 68℃ 30 sec, 72℃ 3 min, 25 cycles/72℃ 10 min /4℃ ∞] を行った。得た両特異的産物をゲル精製し、pGEM-T easy Vector (Promega社製) を使用したTAクローン化後に塩基配列を解析した結果、実施例２－２記載のT. aureum ATCC 34304由来C20エロンガーゼ (TaELO2) (配列番号：16)と完全に一致した。

【０１３１】

そこで次に、推定翻訳配列を増幅する正方向 (8 ORF F；5’- ATG GCG ACG CGC ACC TCG AA -3’) (配列番号：184)、および逆方向 (8 ORF R；5’- TTA CTC GGA CTT GGT GGG GG C G -3’) (配列番号：185) のオリゴヌクレオチドを合成し、T. roseumゲノムDNAを鋳型として、Advantage GC 2 polymerase Mix (Clontech) を用いたPCR [PCR cycles: 94℃ 1 min/94℃ 30 sec, 65℃ 30 sec, 72℃ 1 min, 30 cycles/72℃ 7 min/4℃ ∞] を行った。得た特異的産物をゲル精製し、ダイレクトシーケンスによる塩基配列解析を行った結果、T. roseum由来C20エロンガーゼ遺伝子は、TaELO2と同一であった。以上の結果から、本配列はThraustochytrium aureum C20 エロンガーゼの配列と完全に一致するものであることが判明した。その塩基配列を配列番号：186に、アミノ酸配列を配列番号：187に示す。

【０１３２】

[実施例７－２] C20エロンガーゼ遺伝子ターゲティングベクターの作製のための土台プラスミド作製

Thraustochytrium aureum ATCC 34304株を、GY培地で培養した。対数増殖期後期の細胞を4℃、3,500×g、5 min遠心してペレットにし、液体窒素にて凍結後破砕した。細胞破砕液をフェノール抽出後、エタノール沈殿させ、沈殿をTE溶液に溶解した。TE溶液に溶解した核酸を37℃、30 min RNase 処理してRNAを分解し、再度フェノール抽出後、エタノール沈殿させ、沈殿をTE溶液に溶解した。A260/280を測定しDNA濃度を算出した。これを鋳型にし、LA taq Hot start version（タカラバイオ社製）によりC20 エロンガーゼ遺伝子配列を含む配列（3193bp、配列番号：188）を増幅した [PCR cycles: 98℃ 2min/ 98℃ 10 sec, 68℃ 1 min, 30 cycles/ 68℃ 2min]。用いたPCR primerは実施例２－８記載のE2 KO ProF EcoRV（配列番号：33)、およびE2KO TermR EcoRV（配列番号：34）である。 得られたDNA断片はpGEM-T easy vector （Promega社製)にクローニングし、大腸菌にて増幅後、Dye Terminator Cycle Sequencing Kit（BECKMAN COULTER社製）を用いて配列を確認した。これをpRH59と名付けた(図５１)。

作製したpRH59（図５１）を鋳型に、C20エロンガーゼ遺伝子配列中腹部分にBglIIサイトを挿入する様、逆向きに設定したprimer setを用意し、PrimeSTAR Max DNA Polymerase（タカラバイオ社製）にて増幅した。用いたPCR primer は下記の通りで、ともにBglIIリンカー配列を有する。 [RHO120: 27 mer: 5’- GAC AAA GAT CTC GAC TGG AGC GAC CAC-3’（配列番号：189)、 RHO121: 27 mer: 5’- GTC GAG ATC TTT TGT CAG GAG GTG CAC-3’(配列番号：190)]。[PCR cycles: 98℃ 2 min/ 98℃ 10 sec, 56℃ 15 sec, 72℃ 1 min, 30 cycles/ 72℃ 1 min]。上記条件で増幅後、BglIIにて消化したのち、セルフライゲーションした。ライゲーションしたサンプルは大腸菌にて増幅後、Dye Terminator Cycle Sequencing Kit（BECKMAN COULTER社製）を用いて配列を確認した。これをpRH64と名付けた。BglIIサイトを挿入したC20エロンガーゼ遺伝子配列 951 bpを配列番号：191に示す。

作製したThraustochytrium roseum C20エロンガーゼ遺伝子ターゲティングベクターの作製のための土台プラスミド（pRH64）を図５２に示す。

【０１３３】

[実施例７－３]ターゲティングベクターの作製（人工合成ネオマイシン耐性遺伝子およびハイグロマイシン耐性遺伝子）

実施例３－２記載のpRH31（図13）をBglIIにて消化し、人工合成ネオマイシン耐性遺伝子カセットを含むDNA断片を実施例７－２記載pRH64（図５２）のBglIIサイトに繋いだ。これをpRH65と名付けた。

実施例３－３記載のpRH32（図15)をBglIIにて消化し、ハイグロマイシン耐性遺伝子カセットを含むDNA断片を実施例７－２記載pRH64（図５２）のBglIIサイトに繋いだ。これをpRH66と名付けた。

作製した2種のターゲティングベクター(pRH65および66)を図５３に示す。

【０１３４】

[実施例７－４] C20エロンガーゼ遺伝子ターゲティングベクター導入

実施例７－３で作製した2種類のターゲティングベクターを鋳型に、翻訳開始点を含む正方向プライマー（RHO130: 5’-ATG GCG ACG CGC ACC TCG AAG AG-3’）（配列番号：192）および翻訳終止点を含む逆方向プライマー(RHO131: 5’-TTA CTC GGA CTT GCT GGG GGC GC)（配列番号：193）をprimerとして用いて、PrimeSTAR GXL polymerase（タカラバイオ社製）により遺伝子を増幅した。[PCR cycles: 98℃ 2min/ 98℃ 30 sec, 60 30 sec, 72℃ 3 min, 30 cycles]。フェノールクロロホルム抽出、クロロホルム抽出後、DNAをエタノール沈殿させ、沈殿を0.1×TEに溶解した。A260/280を測定しDNA濃度を算出した。実施例７－３記載pRH65（図５３）を鋳型とした際に得られる導入断片は 2655 bpで、Thraustochytrium aureum C20エロンガーゼ遺伝子前半－SV40 terminator配列－人工合成ネオマイシン耐性遺伝子配列－ubiquitin promoter配列－Thraustochytrium aureum C20エロンガーゼ遺伝子後半という並びになる（配列番号：194)。実施例７－３記載pRH66（図５３）を鋳型とした際に得られる導入断片は 2887 bpで、Thraustochytrium aureum C20エ

ロンガーゼ遺伝子前半－ubiquitin promoter配列－ハイグロマイシン耐性遺伝子配列－SV40 terminator配列－Thraustochytrium aureum C20エロンガーゼ遺伝子後半という並びになる（配列番号：195)。

【０１３５】

Thraustochytrium roseum株をGY培地中で7日間培養し、対数増殖期にある細胞を遺伝子導入に使用した。OD600 = 1～1.5相当分の細胞に対し、0.625μgのDNA断片を遺伝子銃法により、マイクロキャリア：0.6 micronの金粒子、target distance：6 cm、chamber vacuum：26 mmHg、Rupture disk：900 PSIの条件で導入した。遺伝子導入した細胞は24時間のリカバリータイムの後、PDA平板培地(2 mg/ml G418 含有もしくは2 mg/ml ハイグロマイシン含有)に塗布した。

この結果、1撃ちこみあたり、20個程度の薬剤耐性株を得た。

【０１３６】

[実施例７－５] C20エロンガーゼ遺伝子ジーンターゲティング相同組換体の同定

Thraustochytrium roseum ATCC 28210株、C20エロンガーゼ遺伝子ヘテロ相同組換体、およびC20エロンガーゼ遺伝子ホモ相同組換体（遺伝子破壊株）についてGY培地で培養後、得られた細胞を4℃、3,000rpm、10 min遠心してペレットにし、20 μlのSNET溶液[20 mM Tris-HCl; pH 8.0, 5 mM NaCl, 0.3 % SDS, 200 μg/ml Proteinase K (ナカライテスク社製)] にけん濁後、55℃, 6 h/ 99.9℃, 5 minで細胞を溶解した。得られた細胞溶解液を10倍希釈したものを鋳型とし、Mighty Amp DNA polymerase (タカラバイオ社製)を用いてゲノム構造確認のPCRを行った。用いたprimerの位置、増幅に用いる組み合わせ、増幅産物の予想サイズを図５４に示す。RoseumFはC20 エロンガーゼ上流、RoseumRは下流、NeoFおよびNeoRは人工合成ネオマイシン耐性遺伝子上、HygFおよびHygRはハイグロマイシン耐性遺伝子上に、それぞれ設定した。[RoseumF: 26 mer: 5’- GCT CGG CTG GAA GTT GAG TAG TTT GC-3’ (配列番号：196)、RoseumR: 24 mer: 5’- TCT TTC TTC GTC GAC GTC CCA CTG-3’ (配列番号：197)、NeoF: 24 mer: 5’- ATG ATT GAA CAG GAC GGC CTT CAC -3’ (配列番号：198)、NeoR: 24 mer: 5’- TCA AAA GAA CTC GTC CAG GAG GCG -3’ (配列番号：199)、HygF: 24 mer: 5’-ATG AAA AAG CCT GAA CTC ACC GCG-3’ (配列番号：200)、HygR: 25 mer: 5’- CTA TTC CTT TGC CCT CGG ACG AGT G- 3’ (配列番号：201)]。[PCR cycles: 98℃ 2min/ 98℃ 10 sec, 60℃ 15 sec, 68℃ 4 min, 30 cycles]。

野生型アリル (Wt allele) に増幅がなく、人工合成ネオマイシン耐性遺伝子アリル (NeoR allele) およびハイグロマイシン耐性遺伝子アリル (HygR allele) に増幅のあるC20エロンガーゼ ノックアウト株が得られた（図５５)。

【０１３７】

[実施例７－６] C20エロンガーゼ破壊による脂肪酸組成の変化

Thraustochytrium roseum ATCC 28210株および遺伝子破壊株を、GY培地にて培養した。対数増殖期後期の細胞を4℃、3,000rpm、10 min遠心してペレットにし、0.9% NaClに懸濁、洗浄した。つづいて4℃、3,000rpm、10 min遠心し、ペレットを滅菌水に懸濁、洗浄した。これを3,000rpm、10 min遠心し、上清を除き、凍結乾燥した。 凍結乾燥した細胞に2 mlのmethanolic KOH（7.5% KOH in 95% methanol）を加え、ボルテックス後、超音波で菌体を破砕した（80℃、30 min）。500 μlの滅菌水を加えてボルテックスした後、2 mlのn-hexaneを加えてボルテックスした。続いて3,000 rpmで10 min遠心し、上層を捨てた。再び2 mlのn-hexaneを加えてボルテックスし、3,000 rpmで10 min遠心して、上層を捨てた。残った下層に1 mlの6N HClを添加してボルテックスした後、2 mLのn-hexaneを加えてボルテックスした。続いて3,000 rpmで10 min遠心し、上層を回収した。再び2 mlのn-hexaneを加えてボルテックスし、3,000 rpmで10 min遠心して、上層を回収した。回収した上層を窒素ガスで濃縮乾固した。濃縮乾固したサンプルに2 mlの3N methanolic HClを添加し、80℃で一晩インキュベートした。

【０１３８】

サンプルを室温まで冷まし、1 mlの0.9% NaClを添加した。2 mlのn-hexaneを加えてボルテックスした。3,000 rpmで10 min遠心し、上層を回収した。再び2 mlのn-hexaneを加

えてボルテックスし、3,000 rpmで10 min遠心して、上層を回収した。回収した上層に無水硫酸ナトリウムを少量添加後、ボルテックスした。3,000 rpmで10 min遠心して、上層を回収した。回収した上層を窒素ガスで濃縮乾固した。濃縮乾固したサンプルを0.2 mlのn-hexaneに溶解し、2 μlをGC解析にかけた。GC解析にはガスクロマトグラフGC-2014（島津製作所社製）を使用し、カラム：HR-SS-10（30 m x 0.25 mm；信和化工社製）、カラム温度：150℃ →（5℃/min）→ 220℃（10 min）、キャリアガス：He（1.3 mL/min）の条件で行った。

この結果、Thraustochytrium roseumにおいてC20エロンガーゼをノックアウトすると、炭素鎖長20の脂肪酸が増加した（図５６）。図５７に野生型株を100%とした時の割合を示す。図５７は、全脂肪酸組成のうちAA 5.5%, EPA 8.5%, n-6DPA 13.2%,DHA 43.9%を示している。

これらの結果、アラキドン酸が約1.2倍、EPAが約1.6倍、DPAが約1.2倍、およびDHAが約1.5倍にそれぞれ増加した。

【実施例８】

【０１３９】

Thraustochytrium aureum ATCC 34304 OrfA破壊株におけるΔ4デサチュラーゼ遺伝子の破壊

[実施例８－１] Thraustochytrium aureum ATCC 34304株のΔ4デサチュラーゼ遺伝子上流1071 bp～Δ4デサチュラーゼ遺伝子内1500 bpの配列のクローニング

実施例３－２に記載の方法で抽出したThraustochytrium aureum ATCC 34304株のゲノムDNAを解読し、既知のΔ4デサチュラーゼと相同性の高い遺伝子配列を検索した。この検索結果をもとに2種のPCR primer を設計した。TMO3は、Thraustochytrium aureum ATCC 34304株のΔ4デサチュラーゼ遺伝子上流1071～1049 bpに位置する配列で、TMO4は、開始コドンから数えて1477～1500 bpに位置するたんぱく質コーディング領域内の配列である。[TMO3: 23 mer: 5’- GGC GGA GCG AAG TGT GAA AGT TA -3’（配列番号：202)、TMO4: 24 mer: 5’- GCG ACA GCA TCT TGA AAT AGG CAG -3’（配列番号：203）]。この2種のprimer を使用し、Thraustochytrium aureum ATCC 34304株のゲノムDNAを鋳型に、LA taq Hot start version（タカラバイオ社製）によりThraustochytrium aureum ATCC 34304株のΔ4デサチュラーゼ遺伝子上流1071 bp～Δ4デサチュラーゼ遺伝子内1500 bpの配列（2571 bp、配列番号：204）を増幅した。増幅条件は下記の通り。[PCR cycles: 98℃ 2min/ 98℃ 20 sec, 60℃ 30 sec, 72℃ 3 min, 30 cycles/ 72℃ 8 min]。得られたDNA断片はpGEM-T easy vector にクローニングし、大腸菌にて増幅後、Dye Terminator Cycle Sequencing Kit（BECKMAN COULTER社製）を用いて配列を確認した。これをpTM1と名付けた(図５８)。

【０１４０】

[実施例８－２] Δ4デサチュラーゼ遺伝子ターゲティングベクター作製のための、土台となるプラスミド作製

実施例８－１で作製したpTM1（図５８）を鋳型に、Δ4デサチュラーゼ遺伝子上流60 bpおよびΔ4デサチュラーゼ遺伝子内の開始コドンを含む556 bpの配列（616 bp、配列番号：205）を欠失させ、かつ、欠失部分にBglII サイトが生じる様、逆向きに設定したprimer setを用意した。TMO7、TMO8ともにBglII配列を包含する。増幅にはPrimeSTAR Max DNA Polymerase（タカラバイオ社製）を使用した。 [TMO7: 25 mer: 5’-CAG GAG ATC TCC AAG TCG CGA TTC A -3’（配列番号：206)、 TMO8: 26 mer: 5’- CTT GGA GAT CTC CTG CCC GTC CCG AA -3’（配列番号：207）]。[PCR cycles: 98℃ 3 min/ 98℃ 10 sec, 55℃ 15 sec, 72℃ 30 sec, 30 cycles/ 72℃ 30 sec]。上記条件で増幅後、アガロースゲルに泳動して精製した。得られたDNA断片を大腸菌に導入して増幅し、Dye Terminator Cycle Sequencing Kit（BECKMAN COULTER社製）を用いて配列を確認した。これをpTM2と名付けた。

作製したΔ4デサチュラーゼ遺伝子ターゲティングベクター作製のための土台となるプラスミド（pTM2）を図５９に示す。

【０１４１】
[実施例８－３]ターゲティングベクターの作製（ブラストサイジン耐性遺伝子およびGFP融合ゼオシン耐性遺伝子）
実施例５－３記載のpRH38（図３３）をBglIIにて消化し、ブラストサイジン耐性遺伝子カセットを含むDNA断片を実施例８－２記載のpTM2（図５９）のBglIIサイトに繋いだ。これをpTM6と名付けた。
実施例５－４記載のpRH51（図３６）をBglIIにて消化し、GFP融合ゼオシン耐性遺伝子カセットを含むDNA断片を実施例８－２記載のpTM2（図５９）のBglIIサイトに繋いだ。これをpTM8と名付けた。
作製した2種のターゲティングベクター(pTM6および8)を図６０に示す。

【０１４２】
[実施例８－４]Thraustochytrium aureum OrfA破壊株へのΔ4デサチュラーゼ遺伝子ターゲティングベクター導入
実施例８－３で作製した2種類のターゲティングベクターを鋳型に、TMO3(実施例８－１記載。配列番号：202)およびTMO4(実施例８－１記載。配列番号：203)をprimerとして用いて、PrimeSTAR HS DNA polymerase (タカラバイオ社製)により遺伝子を増幅した。[PCR cycles: 98℃ 3min/ 98℃ 10 sec, 55℃ 5 sec, 72℃ 4 min, 30 cycles/ 72℃ 3 min]。フェノールクロロホルム抽出、クロロホルム抽出後、DNAをエタノール沈殿させ、沈殿を0.1×TEに溶解した。A260/280を測定しDNA濃度を算出した。実施例８－３記載pTM6（図６０）を鋳型とした際に得られる導入断片は 3264 bpで、Thraustochytrium aureum Δ4デサチュラーゼ遺伝子上流－SV40 terminator 配列－ブラストサイジン耐性遺伝子配列－ubiquitin promoter－Thraustochytrium aureum Δ4デサチュラーゼ遺伝子内の配列という並びになる（配列番号：208)。実施例８－３記載pTM8（図６０）を鋳型とした際に得られる導入断片は 3935 bpで、Thraustochytrium aureum Δ4デサチュラーゼ遺伝子上流－SV40 terminator 配列－ゼオシン耐性遺伝子配列－Enhanced GFP遺伝子配列－ubiquitin promoter－Thraustochytrium aureum Δ4デサチュラーゼ遺伝子内の配列という並びになる（配列番号：209)
実施例４記載のPUFA PKS経路関連遺伝子: OrfA遺伝子破壊株をGY培地中で4日間培養し、対数増殖期にある細胞を遺伝子導入に使用した。OD600 = 1～1.5相当分の細胞に対し、0.625μgのDNA断片を遺伝子銃法（マイクロキャリア：0.6 micronの金粒子、target distance：6 cm、chamber vacuum：26 mmHg、Rupture disk：1,100 PSI）により導入した。遺伝子導入した細胞は4～6時間のリカバリータイムの後、PDA寒天平板培地(20 mg/ml ゼオシン 含有もしくは0.2 mg/ml ブラストサイジン含有)に塗布した。この結果、1撃ちこみあたり100から200個の薬剤耐性株を得た。

【０１４３】
[実施例８－５] Δ4デサチュラーゼ遺伝子ジーンターゲティング相同組換体の同定
実施例３－２記載の方法で、Thraustochytrium aureumおよび、Thraustochytrium aureum OrfA破壊株におけるΔ4デサチュラーゼ遺伝子の破壊株からゲノムDNAを抽出後、A260/280を測定しDNA濃度を算出した。これを鋳型にし、Mighty Amp DNA polymerase (タカラバイオ社製)を用いてゲノム構造確認のPCRを行った。用いたprimerの位置、増幅に用いる組み合わせ、増幅産物の予想サイズを図６１に示す。TMO1はΔ4デサチュラーゼ遺伝子上流、TMO2はΔ4デサチュラーゼ遺伝子下流、RHO198およびRHO49(実施例５－３記載。配列番号：139) はブラストサイジン耐性遺伝子上、RHO128はEnhanced GFP遺伝子上、RHO64(実施例５－４記載。配列番号：151)はゼオシン耐性遺伝子上に、それぞれ設定した。[TMO1: 23 mer: 5’- AAA AGA ACA AGC CCT CTC CTG GA -3’ (配列番号：210)、TMO2: 23 mer: 5’- GAG GTT TGT ATG TTC GGC GGT TT -3’ (配列番号：211)、RHO198: 26 mer: 5’- TGG GGG ACC TTG TGC AGA ACT CGT GG -3’ (配列番号：212)、RHO128: 22 mer: 5’- GAC CTA CGG CGT GCA GTG CTT C -3’ (配列番号：213)]。[PCR cycles: 98℃ 2 min/ 98℃ 10 sec, 68℃ 4 min 30 sec, 30 cycles/ 68℃ 4min]。 野生型アリル (Wt allele) に増幅がなく、ブラストサイジン耐性遺伝子アリル (BlaR allele) およびゼオシン耐性

遺伝子アリル (ZeoR allele) に増幅のあるΔ4デサチュラーゼ遺伝子ノックアウト株が得られた（図６２）。この実験により、Thraustochytrium aureum ATCC 34304株は、PKS経路関連遺伝子: OrfA および Δ4デサチュラーゼ遺伝子を欠損しても栄養要求性にならないことが分かった。

【０１４４】

[実施例８－６] Thraustochytrium aureum OrfA破壊株におけるΔ4デサチュラーゼ遺伝子の破壊による脂肪酸組成の変化

実施例３－９記載の方法でThraustochytrium aureum ATCC 34304および遺伝子破壊株を培養、凍結乾燥後、脂肪酸をメチルエステル化し、GCを用いて解析した。GC解析にはガスクロマトグラフGC-2014（島津製作所社製）を使用し、カラム：HR-SS-10（30 m x 0.25 mm；信和化工社製）、カラム温度：150℃ →（5℃/min）→ 220℃（10 min）、キャリアガス：He（1.3 mL/min）の条件で行った。

脂肪酸組成の変化を図６３に示す。また、図６４に野生型株を100%とした時の割合を示す。図６４は、全脂肪酸組成のうちAA 8.4%,DGLA 0.8%,ETA 0.3%, EPA 6.2%, n-6DPA 0.2%,DHA 0.5%を示している。GC面積でn-6DPA/DTAの値 0.02,DHA/n-3DPAの値 0.03, C20PUFA/C22PUFAの値 0.6,n-6PUFA/n-3PUFAの値 0.9を示している。

この結果、Thraustochytrium aureum OrfA破壊株においてΔ4デサチュラーゼ遺伝子を破壊すると、C22: 5n-6(DPA) およびC22: 6n-3(DHA) がほとんど生合成されなくなり、C22: 4n-6(DTA) およびC22: 5n-3(DPA) が蓄積した。

【実施例９】

【０１４５】

Parietichytrium sp. SEK358株におけるC20エロンガーゼ遺伝子の破壊

[実施例９－１] Parietichytrium sp. SEK358株へのC20エロンガーゼ遺伝子ターゲティングベクター導入

実施例３－６記載pRH85（図１８）で作製したターゲティングベクターを鋳型に、RHO153 (実施例３－４記載、配列番号：74) およびRHO154 (実施例３－４記載、配列番号：75) をprimerとして用いて、PrimeSTAR Max DNA polymerase（タカラバイオ社製）により遺伝子を増幅した。[PCR cycles: 98℃ 2min/ 98℃ 30 sec, 68℃ 2 min, 30 cycles/ 68℃ 2 min]。フェノールクロロホルム抽出、クロロホルム抽出後、DNAをエタノール沈殿させ、沈殿を0.1×TEに溶解した。A260/280を測定しDNA濃度を算出した。実施例３－６記載pRH85（図１８）を鋳型とした際に得られる導入断片は 2661 bpで、Parietichytrium属 C20エロンガーゼ遺伝子前半－SV40 terminator配列－人工合成ネオマイシン耐性遺伝子配列－ubiquitin promoter配列－Parietichytrium属 C20エロンガーゼ遺伝子後半という並びになる（実施例３－７記載、配列番号：81)。

Parietichytrium sp. SEK358株をGY培地中で3日間培養し、対数増殖期にある細胞を遺伝子導入に使用した。OD600 = 1～1.5相当分の細胞に対し、0.625μgのDNA断片を遺伝子銃法（マイクロキャリア：0.6 micronの金粒子、target distance：6 cm、chamber vacuum：26 mmHg、Rupture disk：900 PSI）により導入した。遺伝子導入した細胞は24時間のリカバリータイムの後、0.5 mg/ml G418 含有PDA寒天平板培地に塗布した。この結果、1撃ちこみあたり10から30個の薬剤耐性株を得た。

【０１４６】

[実施例９－２] C20エロンガーゼ遺伝子ジーンターゲティング相同組換体の同定

実施例３－２記載の方法で、Parietichytrium sp. SEK358株、および、C20エロンガーゼ遺伝子破壊株よりゲノムDNAを抽出後、A260/280を測定しDNA濃度を算出した。これを鋳型にし、Mighty Amp DNA polymerase (タカラバイオ社製)を用いてゲノム構造確認のPCRを行った。用いたprimerの位置、増幅に用いる組み合わせ、増幅産物の予想サイズは実施例３－８記載、図１９に示す。

RHO184 (実施例３－８記載。配列番号：87) はC20 エロンガーゼ上流、RHO185 (実施例３－８記載。配列番号：88) は下流、RHO142 (実施例３－８記載。配列番号：85) およびRHO143 (実施例３－８記載。配列番号：86) は人工合成ネオマイシン耐性遺伝子上に、そ

れぞれ設定した。[PCR cycles: 98℃ 2min/ 98℃ 10 sec, 68℃ 2 min, 30 cycles/ 68℃ 7min]。

野生型アリル (Wt allele) に増幅がなく、人工合成ネオマイシン耐性遺伝子アリル (NeoR allele) に増幅があるC20 エロンガーゼノックアウト株が得られた (図６５)。

【０１４７】

[実施例９－３] C20エロンガーゼ破壊による脂肪酸組成の変化

実施例３－９記載の方法でParietichytrium sp. SEK358株および遺伝子破壊株を培養、凍結乾燥後、脂肪酸をメチルエステル化し、GCを用いて解析した。GC解析にはガスクロマトグラフGC-2014（島津製作所社製）を使用し、カラム：HR-SS-10（30 m x 0.25 mm；信和化工社製）、カラム温度：150℃ →（5℃/min）→ 220℃（10 min）、キャリアガス：He（1.3 mL/min）の条件で行った。

脂肪酸組成の変化を図６６に示す。また、図６７に野生型株を100%とした時の割合を示す。図６７は、全脂肪酸組成のうちAA 21.4%,DGLA 8.6%,ETA 2.1%, EPA 23.8%, n-6DPA 0.5%,DHA 0.9%を示している。GC面積でn-6DPA/DTAの値 1.8,DHA/n-3DPAの値 4.1, C20PUFA/C22PUFAの値 29.6,n-6PUFA/n-3PUFAの値 1.1を示している。この結果、Parietichytrium sp. SEK358株においてC20エロンガーゼをノックアウトすると、炭素鎖長22以上の脂肪酸が減少し、炭素鎖長20の脂肪酸が増加した。具体的には、アラキドン酸が約7倍、EPAが約11倍に増加し、またDPAが約1/15、DHAが約1/8に減少した。

【実施例１０】

【０１４８】

Parietichytrium sp. SEK571株におけるC20エロンガーゼ遺伝子の破壊

[実施例１０－１] Parietichytrium sp. SEK571株へのC20エロンガーゼ遺伝子ターゲティングベクター導入

実施例３－６記載pRH85（図１８）で作製したターゲティングベクターを鋳型に、RHO153 (実施例３－４記載、配列番号：74) およびRHO154 (実施例３－４記載、配列番号：75) をprimerとして用いて、PrimeSTAR Max DNA polymerase（タカラバイオ社製）により遺伝子を増幅した。[PCR cycles: 98℃ 2min/ 98℃ 30 sec, 68℃ 2 min, 30 cycles/ 68℃ 2 min]。フェノールクロロホルム抽出、クロロホルム抽出後、DNAをエタノール沈殿させ、沈殿を0.1×TEに溶解した。A260/280を測定しDNA濃度を算出した。実施例３－６記載pRH85（図１８）を鋳型とした際に得られる導入断片は 2661 bpで、Parietichytrium属 C20エロンガーゼ遺伝子前半－SV40 terminator配列－人工合成ネオマイシン耐性遺伝子配列－ubiquitin promoter配列－Parietichytrium属 C20エロンガーゼ遺伝子後半という並びになる(実施例３－７記載、配列番号：81)。

Parietichytrium sp. SEK571株をGY培地中で3日間培養し、対数増殖期にある細胞を遺伝子導入に使用した。OD600 = 1～1.5相当分の細胞に対し、0.625μgのDNA断片を遺伝子銃法（マイクロキャリア：0.6 micronの金粒子、target distance：6 cm、chamber vacuum：26 mmHg、Rupture disk：1550 PSI）により導入した。遺伝子導入した細胞は24時間のリカバリータイムの後、0.5 mg/ml G418 含有PDA寒天平板培地に塗布した。この結果、1撃ちこみあたり5から15個の薬剤耐性株を得た。

【０１４９】

[実施例１０－２] C20エロンガーゼ遺伝子ジーンターゲティング相同組換体の同定

実施例３－２記載の方法で、Parietichytrium sp. SEK571株、および、C20エロンガーゼ遺伝子破壊株よりゲノムDNAを抽出後、A260/280を測定しDNA濃度を算出した。これを鋳型にし、Mighty Amp DNA polymerase (タカラバイオ社製)を用いてゲノム構造確認のPCRを行った。用いたprimerの位置、増幅に用いる組み合わせ、増幅産物の予想サイズは実施例３－８記載、図１９に示す。

RHO184 (実施例３－８記載。配列番号：87) はC20 エロンガーゼ上流、RHO185 (実施例３－８記載。配列番号：88) は下流、RHO142 (実施例３－８記載。配列番号：85) およびRHO143 (実施例３－８記載。配列番号：86) は人工合成ネオマイシン耐性遺伝子上に、それぞれ設定した。[PCR cycles: 98℃ 2min/ 98℃ 10 sec, 68℃ 2 min, 30 cycles/ 68

℃ 7min]。
野生型アリル (Wt allele) に増幅がなく、人工合成ネオマイシン耐性遺伝子アリル (NeoR allele) に増幅があるC20 エロンガーゼノックアウト株が得られた (図６８)。
【０１５０】
[実施例１０－３] C20エロンガーゼ破壊による脂肪酸組成の変化
実施例３－９記載の方法でParietichytrium sp. SEK571株および遺伝子破壊株を培養、凍結乾燥後、脂肪酸をメチルエステル化し、GCを用いて解析した。GC解析にはガスクロマトグラフGC-2014（島津製作所社製）を使用し、カラム：HR-SS-10（30 m x 0.25 mm；信和化工社製）、カラム温度：150℃ →（5℃/min）→ 220℃（10 min）、キャリアガス：He（1.3 mL/min）の条件で行った。
脂肪酸組成の変化を図６９に示す。また、図７０に野生型株を100%ととした時の割合を示す。図７０は、全脂肪酸組成のうちAA 13.2%,DGLA 1.9%,ETA 1.1%, EPA 20.6%, n-6DPA 1.0%,DHA 1.2%を示している。GC面積でn-6DPA/DTAの値 6.4,DHA/n-3DPAの値 4.7,C20PUFA/C22PUFAの値 14.6,n-6PUFA/n-3PUFAの値 0.7を示している。この結果、Parietichytrium sp. SEK571株においてC20エロンガーゼをノックアウトすると、炭素鎖長22以上の脂肪酸が減少し、炭素鎖長20の脂肪酸が増加した。具体的には、アラキドン酸が約4倍、EPAが約8倍に増加し、またDPAが約1/12、DHAが約1/12に減少した。
【実施例１１】
【０１５１】
Thraustochytrium aureum ATCC 34304由来Δ12デサチュラーゼ遺伝子の破壊
[実施例１１－１] Thraustochytrium aureum ATCC 34304由来Δ12デサチュラーゼ遺伝子の単離
Thraustochytrium aureum ATCC 34304のゲノムDNAを鋳型として、正方向オリゴヌクレオチドプライマーTw3-F1 (22 mer: 5’- ATG TGC AAG GTC GAT GGG ACA A -3’) (配列番号：214)、および逆方向オリゴヌクレオチドプライマーTw3-R1 (22 mer : 5’- TCA CAA AC A TCG CAG CCT TCG G -3’) (配列番号：215) を用いたPCR（使用酵素：LA taq Hot Start Version, TaKaRa社製、PCR cycles: 98℃ 2 min/ 98℃ 30 sec, 53℃ 30 sec, 72℃ 1 min, 30 cycles/ 72℃ 7 min/4℃ ∞） によって、Thraustochytrium aureum ATCC 34304由来Δ12デサチュラーゼ遺伝子を増幅した。その結果、395アミノ酸（配列番号：216）をコードする1,185 bp（配列番号：217）のORFを有する新奇遺伝子配列を取得した。当該遺伝子のアミノ酸配列中には、desaturaseに共通して保存され、活性部位を構築するとされる3つのヒスチジンボックスが保存されていた（図７１）。またBlast検索の結果、Thalassiosira pseudonana、Micromonas sp.、Phaeodactylum tricornutum由来Δ12デサチュラーゼとアミノ酸レベルで41%、44%、41%と高い同一性を示す（図７１）ことから、本遺伝子はThraustochytrium aureum ATCC 34304由来Δ12デサチュラーゼ遺伝子であることが強く示唆された。以降、本遺伝子をTΔ12dと呼称する。
【０１５２】
[実施例１１－２] 出芽酵母Saccharomyces cerevisiaeを宿主としたTΔ12dの発現と、遺伝子導入株の脂肪酸組成の解析
Thraustochytrium aureum ATCC 34304のゲノムDNAを鋳型として、正方向オリゴヌクレオチドプライマーTw3-Hind3-F (30 mer: 5’- GGA AGC TTA TGT GCA AGG TCG ATG GGA CAA -3’) (配列番号：218)、および逆方向オリゴヌクレオチドプライマーTw3-Xba1-R (29 mer : 5’- TTC TAG ACT AGA GCT TTT TGG CCG CAC GC -3’) (配列番号：219) を用いたPCR（使用酵素：LA taq Hot Start Version, TaKaRa社製、PCR cycles: 98℃ 2 min/ 98℃ 30 sec, 53℃ 30 sec, 72℃ 1 min, 30 cycles/ 72℃ 7 min/4℃ ∞）を行うことで、TΔ12dの両端にHindIIIおよびXba Iサイトを付加したDNA断片を調製した。続いて、当該DNA断片をpYES2/CTベクターのHindIII/ Xba Iサイトに組み込むこで、TΔ12dの発現ベクター、pYESTD12を構築した。次に、pYESTD12とpYES2/CTそれぞれを、酢酸リチウム法によって酵母に導入した。得たTΔ12d過剰発現株（pYESTD12導入株）の脂肪酸組成のGC解析を行ったところ、LA（C18:2Δ9,12）およびC16:2Δ9,12のリテンションタイムに相当する位置に

、mock導入株（pYES2/CT導入株）には見られない新規ピークが確認された。図７２にGC解析のチャート図、および乾燥菌体あたりの脂肪酸量を示す。一方、TΔ12d過剰発現株は他の脂肪酸〔LA、GLA（C18:3Δ6,9,12）、C20:2Δ11,14、DGLA（C20:3Δ8,11,14）、ARA（C20:4Δ5,8,11,14）、DTA（C22:4Δ7,10,13,16）〕に対する変換活性を示さないことが確認された。以上の結果から、TΔ12dはThraustochytrium aureum ATCC 34304由来Δ12デサチュラーゼ遺伝子であることが明確に示された。

【０１５３】

[実施例１１－３] TΔ12dターゲッティングベクターの構築

Thraustochytrium aureum ATCC 34304のゲノムDNAを鋳型として、TΔ12d ORF上流、および下流配列1,001 bpをPCR（使用酵素：PrimeSTAR GXL, TaKaRa社製）、PCR cycles: 98℃ 2 min/ 98℃ 30 sec, 53℃ 30 sec, 72℃ 1 min, 30 cycles/ 72℃ 7 min/4℃ ∞）によって増幅した。用いた正方向、および逆方向オリゴヌクレオチドプライマーは、TD12d-up-F（23 mer: 5’- AGT CAG CCC AGG CAC CGA TGA CG -3’）（配列番号：220）およびTD12d-up-R（39 mer : 5’- AGC CAG AGC TAG ATC TCT TGT GCT CCT TTT CAA TCC TTT-3’）（配列番号：221)、TD12d-down-F （39 mer : 5’- GGA GCA CAA GAG ATC TAG CTC TGG CTC AAG GGA CAC CGT -3’）（配列番号：222）およびTD12d-down-R （24 mer : 5’- CAC AGA AAC TGC CTT CAC GGG TCT-3’）（配列番号：223）である。続いて、得た両DNA断片を、間にBgl IIサイトを導入する形でfusion PCRによって連結し、これをpGEM-T easy Vector（Promega社製）に組込んだ。次に、得たベクターのBgl IIサイトに、実施例3－3記載のハイグロマイシン耐性遺伝子カセット、および実施例5－3記載のブラストサイジン耐性遺伝子カセットを組み込むことでTΔ12d KOターゲッティングベクターを構築し、それぞれをpTD12dKOHyg、およびpTD12dKOBlaと名付けた。以上のTΔ12d KOターゲッティングベクター構築スキームを図７３に示す。

【０１５４】

[実施例１１－４] Thraustochytrium aureum ATCC 34304に対するTΔ12dターゲッティングベクターの導入とTΔ12d破壊株の取得

Split marker法による効率的な相同組換え体の取得を目指し、pTD12dKOHygを鋳型として、PCR [使用酵素：LA taq Hot Start Version, TaKaRa社製、PCR cycles: 98℃ 2 min/ 98℃ 30 sec, 60℃ 30 sec, 72℃ X min (X=1 min/ kbp), 30 cycles/ 72℃ 7 min/4℃ ∞]によって2つの相同組換え断片を増幅し（図７４)、これを遺伝子銃法にてThraustochytrium aureum ATCC 34304に導入した。相同組換え断片の増幅に用いた正方向、および逆方向オリゴヌクレオチドプライマーは、TD12d-up-F（配列番号：220）および: Hyg-Knock-R（24 mer : 5’- TGT TAT GCG GCC ATT GTC CGT CAG -3’）（配列番号：224)、Hyg-Knock-F （24 mer : 5’- TGC GAT CGC TGC GGC CGA TCT TAG -3’）（配列番号：225）およびTD12d-down-R（配列番号：223）である。その結果、TΔ12dの1つ目のアリルを破壊した相同組換え体を取得した。続いて、pTD12dKOBla を鋳型とし、正方向、および逆方向オリゴヌクレオチドプライマーTD12d-up-F（配列番号：220）およびTD12d-down-R（配列番号：223）を用いて、PCR（使用酵素：LA taq Hot Start Version, TaKaRa社製）[PCR cycles: 98℃ 2 min/ 98℃ 30 sec, 60℃ 30 sec, 72℃ 3 min, 30 cycles/ 72℃ 7 min/4℃ ∞]によって2つ目のアリルを破壊する目的の相同組換え断片を増幅し、これを1つ目のアリルを破壊した相同組換え体に導入した。TΔ12dの完全破壊は、以下に示すゲノムDNAを鋳型にしたPCRおよびRT-PCRによる、ハイグロマイシン耐性遺伝子、ブラストサイジン耐性遺伝子、およびTΔ12dの検出、もしくはサザンブロッティングによって検証した。

【０１５５】

図７５に野生株、TΔ12dの1つ目のアリルを破壊した株、およびTΔ12d破壊株（2つのアリルを破壊した株）における、それぞれのゲノムDNAを鋳型にしたPCRによって、ハイグロマイシン耐性遺伝子、ブラストサイジン耐性遺伝子、およびTΔ12dを増幅した結果を示す。この結果から、TΔ12d破壊株は導入した相同組換え断片中に含まれるハイグロマイシン耐性遺伝子、およびブラストサイジン耐性遺伝子の増幅が確認されるが、破壊したTΔ12dの増幅が認められないことが示された。尚、ハイグロマイシン耐性遺伝子、ブラストサイジ

ン耐性遺伝子、およびTΔ12dの増幅に用いた正方向、および逆方向オリゴヌクレオチドプライマーはHyg-F（26 mer：5’-ATG AAA AAG CCT GAA CTC ACC GCG AC -3’）（配列番号：226）およびHyg-R （25 mer：5’-CTA TTC CTT TGC CCT CGG ACG AGT G-3’）（配列番号：227）、Bla-F（27 mer：5’-ATG GCC AAG CCT TTG TCT CAA GAA GAA-3’）（配列番号：228）およびBla-R（30 mer：5’-TTA GCC CTC CCA CAC ATA ACC AGA GGG CAG-3’）（配列番号：229）、Tw3-F1（配列番号：214）およびTw3-R1（配列番号：215）である。
また、図７６に野生株、TΔ12dの1つ目のアリルを破壊した株、およびTΔ12d破壊株において、RT-PCRによってハイグロマイシン耐性遺伝子、ブラストサイジン耐性遺伝子、およびTΔ12dのmRNAを検出した結果を示す。この結果から、TΔ12d破壊株は導入した相同組換え断片中に含まれるハイグロマイシン耐性遺伝子およびブラストサイジン耐性遺伝子mRNAが検出されるが、破壊したTΔ12d mRNAは検出されないことが示された。尚、用いたプライマーはゲノムDNAを鋳型にしたPCRと同じである。

【０１５６】

さらに、Thraustochytrium aureum ATCC 34304のゲノムDNAを鋳型として、2つのDIGラベルプローブを調製し、それらを用いたサザンブロッティングを行った。尚、DIGラベルプローブの調製に使用した正方向、および逆方向オリゴヌクレオチドプライマーはKO up-probe-F1 （23 mer：5’- GGG GTC GGC CGG TGC AGC CTT AG -3’）（配列番号：230）およびKO up-probe-R1（24 mer：5’- GGC GGT CAG CGA TCG GTC GGA CTC -3’）（配列番号：231）、およびKO down-probe-F3（23 mer：5’- GCT TGC GGC TCC TGT TGG GTG AC -3’）（配列番号：232）およびKO down-probe-R3（23 mer：5’- ACG CCT GGC TGC CCA CCA TAA AC -3’）（配列番号：233）である。
その結果、TΔ12d破壊株において、野生型アリルのバンド（上流側2,028 bp、下流側2,334 bp）の消失が認められ、代わりにハイグロマイシン耐性遺伝子、およびブラストサイジン耐性遺伝子を含む相同組換え断片（上流側5,880および5,253 bp、下流側1,496および2,334 bp）のバンドが検出された（図７７）。
以上のゲノムDNAを鋳型にしたPC R、RT-PCR、およびサザンブロッティングの結果によって、TΔ12dの破壊が明確に示された。

【０１５７】

[実施例１１－５] TΔ12d破壊株の表現型解析

250 mlのGY液体培地で5日間培養した菌体を10 mlずつ回収し、OD 600 nmにおける吸光度を測定（n=3）した。さらに、測定後の菌体を回収し、滅菌超純水で1回洗浄した後、凍結乾燥機を行い、デシケーターで1時間乾燥後の乾燥菌体重量を測定（n=3）した。その結果、野生株株と1つ目のアリルを破壊した株、およびTΔ12d破壊株の増殖に有意な違いはみられなかった（図７８）。続いて、野生株株と1つ目のアリルを破壊した株、およびTΔ12d破壊株の脂肪酸組成のGC解析を行った。
その結果、多くの脂肪酸組成の変化が観察され、特にTΔ12d破壊株においてはC18:1n9（OA）の蓄積が顕著に観察された。図７９に脂肪酸組成の割合を、図８０に乾燥菌体1 mgあたりの脂肪酸量を示す。

【実施例１２】

【０１５８】

Thraustochytrium aureum ATCC 34304 OrfA遺伝子破壊株における、C20エロンガーゼ遺伝子破壊およびω3デサチュラーゼ遺伝子の発現

[実施例１２－１] C20 エロンガーゼ遺伝子ターゲティングかつミズカビ由来ω3デサチュラーゼ発現ベクターの作製（ブラストサイジン耐性遺伝子）

実施例５－６記載、pRH43（図３９）を鋳型に、2つの制限酵素KpnIサイトを欠失させ、かつ、欠失部分にBamHIサイトが生じる様、逆向きに設定したprimer setを用意した。RHO189、RHO190ともにBamHI配列を包含する。増幅にはPrimeSTAR Max DNA Polymerase（タカラバイオ社製）を使用した。 [RHO189: 28 mer: 5’- TTA GCG GGA TCC CAA TTC GCC CTA TAG T -3’（配列番号：234）、 RHO190: 27 mer: 5’- AAT TGG GAT CCC GCT AAG TAT CTC CG -3’（配列番号：235）]。[PCR cycles: 98℃ 2 min/ 98℃ 10 sec, 55℃ 15 sec

, 72℃ 40 sec, 31 cycles/ 72℃ 1 min]。上記条件で増幅後、アガロースゲルに泳動して精製した。得られたDNA断片を大腸菌に導入して増幅し、Dye Terminator Cycle Sequencing Kit（BECKMAN COULTER社製）を用いて配列を確認した。これをpRH101と名付けた(図８１)。

pRH101を鋳型に、制限酵素KpnIサイトを挿入する様、逆向きに設定したprimer setを用意した。RHO191、RHO192ともにKpnI配列を包含する。増幅にはPrimeSTAR Max DNA Polymerase（タカラバイオ社製）を使用した。 [RHO191: 28 mer: 5’- AGA TCT GGT ACC GCA GCG CCT GGT GCA C -3’（配列番号：236)、 RHO192: 27 mer: 5’- GCT GCG GTA CCA GAT CTG GTC GCG TTT -3’（配列番号：237）]。[PCR cycles: 98℃ 2 min/ 98℃ 10 sec, 55℃ 15 sec, 72℃ 40 sec, 31 cycles/ 72℃ 1 min]。上記条件で増幅後、アガロースゲルに泳動して精製した。得られたDNA断片を大腸菌に導入して増幅し、Dye Terminator Cycle Sequencing Kit（BECKMAN COULTER社製）を用いて配列を確認した。これをpRH102と名付けた(図８２)。

実施例６－１記載のpRH48（図４６）をKpnIにて消化し、ミズカビ由来ω3デサチュラーゼ発現カセットを含むDNA断片をpRH102（図８２）のKpnIサイトに繋いだ。これをpRH103と名付けた。

作製したC20エロンガーゼ遺伝子ターゲティングかつミズカビ由来ω3デサチュラーゼ発現ベクターpRH103を図８３に示す。

【０１５９】

[実施例１２－２] Thraustochytrium aureum OrfA破壊株へのC20 エロンガーゼ遺伝子ターゲティングかつミズカビ由来ω3デサチュラーゼ発現ベクターの導入

実施例５－６記載C20 エロンガーゼ遺伝子ターゲティングベクターpRH54（図３９）を鋳型に、KSO11（実施例５－７記載、配列番号：159）およびKSO12（実施例５－７記載、配列番号：160）をprimerとして用いて、PrimeSTAR Max DNA polymerase（タカラバイオ社製）により遺伝子を増幅した。[PCR cycles: 98℃ 2min/ 98℃ 30 sec, 68℃ 2 min, 30 cycles/ 68℃ 2min]。これを、フェノールクロロホルム抽出、クロロホルム抽出後、DNAをエタノール沈殿させ、沈殿を0.1×TEに溶解した。A260/280を測定しDNA濃度を算出した。この時得られる導入断片は 3887 bpで、Thraustochytrium aureum C20エロンガーゼ遺伝子上流－ubiquitin promoter－Enhanced GFP遺伝子配列－ゼオシン耐性遺伝子配列－SV40 terminator 配列－Thraustochytrium aureum C20エロンガーゼ遺伝子下流という並びになる（実施例５－７記載、配列番号：162)。

実施例１２－１記載、C20エロンガーゼ遺伝子ターゲティングかつミズカビ由来ω3デサチュラーゼ発現ベクターpRH103（図８３）を制限酵素BamHIにて消化し、フェノールクロロホルム抽出、クロロホルム抽出後、DNAをエタノール沈殿させ、沈殿を0.1×TEに溶解した。A260/280を測定しDNA濃度を算出した。この時得られる導入断片は 5611 bpで、Thraustochytrium aureum C20エロンガーゼ遺伝子上流－ubiquitin promoter－ミズカビ由来ω3デサチュラーゼ遺伝子配列－ubiquitin terminator－ubiquitin promoter－ブラストサイジン耐性遺伝子配列－SV40 terminator－Thraustochytrium aureum C20エロンガーゼ遺伝子下流という並びになる（配列番号：238)。

実施例４記載のPUFA PKS経路関連遺伝子: OrfA遺伝子破壊株をGY培地中で4日間培養し、対数増殖期にある細胞を遺伝子導入に使用した。OD600 = 1～1.5相当分の細胞に対し、0.625μgのDNA断片を遺伝子銃法（マイクロキャリア：0.6 micronの金粒子、target distance：6 cm、chamber vacuum：26 mmHg、Rupture disk：1,100 PSI）により導入した。遺伝子導入した細胞は4～6時間のリカバリータイムの後、PDA寒天平板培地(20 mg/mlゼオシン含有もしくは、0.2 mg/ml ブラストサイジン含有)に塗布した。この結果、20から60個の薬剤耐性株を得た。

【０１６０】

[実施例１２－３] C20 エロンガーゼ遺伝子ターゲティングかつミズカビ由来ω3デサチュラーゼ発現ベクターがゲノムに挿入された相同組換体の同定

実施例３－２記載の方法で、Thraustochytrium aureum PUFA PKS経路関連遺伝子: OrfA

破壊株および、Thraustochytrium aureum OrfA破壊株におけるC20エロンガーゼ遺伝子の1本目アリル相同組換体および破壊株からゲノムDNAを抽出後、A260/280を測定しDNA濃度を算出した。

ゲノムDNAを制限酵素で切断後、１ウェルあたり約2～3 μgずつ0.7% SeaKem GTG アガロースゲル（タカラバイオ社製）に電気泳動した。これをナイロンメンブレンにトランスファーし、DIGシステム(Roche Applied Science社製）を使用して作製したprobeと51 ℃、16 hr でハイブリダイズさせた。 5’ 側のprobe作製には、RHO94（実施例５－８記載、配列番号163)、およびRHO95（実施例５－８記載、配列番号 164）を用いた。3’ 側のprobe作製には、RHO96（実施例５－８記載、配列番号165)、およびRHO97（実施例５－８記載、配列番号 166）を用いた。増幅条件は下記の通りで、増幅にはLA taq Hot start version（タカラバイオ社製）を使用した。 [PCR cycles: 98℃ 2min/ 98℃ 30 sec, 58℃ 30 sec、72℃ 1 min, 30 cycles/ 72℃ 3min]。使用した制限酵素およびprobeの位置は図８４に示した。ハイブリダイズしたプローブの検出は発色法（NBT / BCIP溶液）を用いて行った。5’ 側および3’ 側の解析いずれにおいても、薬剤耐性遺伝子が相同組換えをおこした際あらかじめ予想されるサイズに、バンドが観察された(図８５)。

【０１６１】

[実施例１２－４] Thraustochytrium aureum OrfA破壊株におけるC20エロンガーゼ遺伝子破壊かつミズカビ由来ω3デサチュラーゼ発現による脂肪酸組成の変化

実施例３－９記載の方法でThraustochytrium aureum ATCC 34304野生型株およびPKS経路（orfA遺伝子）とC20エロンガーゼ遺伝子の2重破壊かつミズカビ由来ω3デサチュラーゼ発現株を培養、凍結乾燥後、脂肪酸をメチルエステル化し、GCを用いて解析した。GC解析にはガスクロマトグラフGC-2014（島津製作所社製）を使用し、カラム：HR-SS-10（30 m x 0.25 mm；信和化工社製）、カラム温度：150℃ →（5℃/min）→ 220℃（10 min）、キャリアガス：He（1.3 mL/min）の条件で行った。

脂肪酸組成の変化を図８６に示す。また、図８７に野生型株を100%とした時の割合を示す。図８７は、全脂肪酸組成のうちAA 16.0%,DGLA 2.2%,ETA 0.3%, EPA 21.6%, n-6DPA 2.1%,DHA 2.2%を示している。GC面積でn-6DPA/DTAの値 9.5,DHA/n-3DPAの値 10.3,C20PUFA/C22PUFAの値 8.5,n-6PUFA/n-3PUFAの値 0.8を示している。

この結果、Thraustochytrium aureum OrfA破壊株においてC20エロンガーゼ遺伝子を破壊しかつミズカビ由来ω3デサチュラーゼを発現させると、C20: 4n-6(AA)が約6倍に増加、C20: 5n3(EPA)が約10倍に増加、C22: 6n-3(DHA)が約1/16倍に減少した。

【実施例１３】

【０１６２】

Parietichytrium sp. SEK571 C20エロンガーゼ遺伝子破壊株におけるω3デサチュラーゼ遺伝子の発現

[実施例１３－１] ハイグロマイシンを薬剤耐性マーカーとするミズカビ由来ω3デサチュラーゼ発現プラスミドの作製

ハイグロマイシンを薬剤耐性マーカーとするミズカビ由来ω3デサチュラーゼ発現プラスミドの作製にあたり、pGEM-T easy vector に、パリエティキトリウム属C20エロンガーゼ上流配列（904 bp、配列番号：239） およびパリエティキトリウム属C20エロンガーゼ下流配列（721 bp、配列番号：240）をサブクローニングし、制限酵素サイトを一部改変したプラスミドpRH107（図８８）を土台として使用した。参考のためpRH107の全配列を示す（4592 bp、配列番号：241）。この発現プラスミド作製の土台となる配列は、本実験における細胞導入時、積極的には使用しないので、これと類似の実験をする際、土台として用いるベクターとして必ずしもpRH107を使用する必要はない。これと類似の実験をする際はKpnIサイトとBamHIサイトを一か所ずつ近接して持つ特徴を有するクローニングベクターで代用が可能である。このとき、KpnIサイトとBamHIサイトの間の配列は、ω3デサチュラーゼ遺伝子発現カセットと、薬剤耐性遺伝子発現カセットの間のlinker として細胞に導入されることになるので、両者の間の長さは短いほどよい。本実験例ではパリエティキトリウム属C20エロンガーゼ下流配列37 bp（配列番号：242）がこれに該当する。

実施例６－１記載のpRH48（図４６）をKpnIにて消化し、ミズカビ由来ω3デサチュラーゼ遺伝子カセットを含むDNA断片を、pRH107(図８８）のKpnIサイトに繋いだ。これをpRH108（図８９）と名付けた。

実施例３－３記載のpRH32（図１５）をBglIIにて消化し、ハイグロマイシン耐性遺伝子カセットを含むDNA断片をpRH108（図８９）のBamHIサイトに繋いだ。これをpRH109（図９０)と名付けた。

【０１６３】

[実施例１３－２] Parietichytrium sp. SEK571 C20エロンガーゼ遺伝子破壊株へのミズカビ由来ω3デサチュラーゼ発現プラスミド導入

実施例１３－１で作製したpRH109（図９０)を鋳型に、TMO42（実施例６－１、配列番号：168）およびRHO52（実施例３－１、配列番号：52）をprimerとして用いて、PrimeSTAR Max DNA polymerase（タカラバイオ社製）によりDNAを増幅した。[PCR cycles: 94℃ 30 sec, 72℃ 1 min, 5 cycles/ 94℃ 30 sec, 70℃ 30 sec, 72℃ 1 min, 5 cycles/ 94℃ 30 sec, 68℃ 30 sec, 72℃ 1 min, 25 cycles / 72℃ 2 min]。1.0% アガロースゲルより増幅産物を回収し、エタノール沈殿させ、沈殿を0.1×TEに溶解した。A260/280を測定しDNA濃度を算出した。PCRによって得られる導入断片は 4448 bpで、ubiquitin promoter－ω3 デサチュラーゼ遺伝子－ubiquitin terminator－ubiquitin promoter－ハイグロマイシン耐性遺伝子配列－SV40 terminator 配列という並びになる（配列番号：243)。

実施例１０で作製したParietichytrium sp. SEK571 C20エロンガーゼ遺伝子破壊株をGY培地中で3日間培養し、対数増殖期にある細胞を遺伝子導入に使用した。OD600 = 1～1.5相当分の細胞に対し、0.625μgのDNA断片を遺伝子銃法（マイクロキャリア：0.6 micronの金粒子、target distance：6 cm、chamber vacuum：26 mmHg、Rupture disk：1550 PSI）により導入した。遺伝子導入した細胞は24時間のリカバリータイムの後、PDA寒天平板培地(1.0 mg/ml ハイグロマイシン含有)に塗布した。この結果、1撃ちこみあたり 5から20 個の薬剤耐性株を得た。

【０１６４】

[実施例１３－３]ミズカビ由来ω3デサチュラーゼ遺伝子発現株の取得

実施例３－２記載の方法で、実施例１０で作製したParietichytrium sp. SEK571 C20エロンガーゼ遺伝子破壊株、およびω3デサチュラーゼ遺伝子発現株からゲノムDNAを抽出後、A260/280を測定しDNA濃度を算出した。これを鋳型にし、LA taq Hot start version を用いてゲノム構造確認のPCRを行った。用いたprimerの位置、増幅に用いる組み合わせ、増幅産物の予想サイズを図９１に示す。RHO90 (27 mer: 5’- CGT TAG AAC GCG TAA TAC GAC TCA CTA - 3’ 配列番号：244) はubiquitin promoter上、RHO141（実施例３－８、配列番号：84)はハイグロマイシン耐性遺伝子上に設定した。[PCR cycles: 98℃ 2min/ 98℃ 10 sec, 68℃ 4 min, 30 cycles/ 68℃ 7min]。

予想されるサイズに増幅するバンドが確認できた(図９２)。導入した発現断片がゲノムに安定に導入された株が単離できた。

【０１６５】

[実施例１３－４] Parietichytrium sp. SEK571 C20エロンガーゼ遺伝子破壊株におけるω3 デサチュラーゼ発現による脂肪酸組成の変化

実施例３－９記載の方法で、Parietichytrium sp. SEK571株およびω3デサチュラーゼ遺伝子発現株を培養、凍結乾燥後、脂肪酸をメチルエステル化し、GCを用いて解析した。GC解析にはガスクロマトグラフGC-2014（島津製作所社製）を使用し、カラム：HR-SS-10（30 m x 0.25 mm；信和化工社製）、カラム温度：150℃ →（5℃/min）→ 220℃（10 min）、キャリアガス：He（1.3 mL/min）の条件で行った。

この結果、ω3 デサチュラーゼ発現株ではn-6系列の脂肪酸が減少し、n-3系列の脂肪酸に増加傾向が見られた(図９３)。図９４に野生型株を100%とした時の割合を示す。図９４は、全脂肪酸組成のうちAA 1.5%,DGLA 0.2%,ETA 0.5%, EPA 5.4%, n-6DPA 0.3%,DHA 0.4%を示している。GC面積でDHA/n-3DPAの値 1.9,C20PUFA/C22PUFAの値 8.2,n-6PUFA/n-3PUFAの値 0.3を示している。これらの結果、アラキドン酸が約1/2に減少し、EPAは約1

.4倍に増加した。
【実施例１４】
【０１６６】
Schizochytrium属のC20エロンガーゼ遺伝子の破壊
[実施例１４－１] Schizochytrium属由来のC20エロンガーゼ遺伝子のクローニング
Schizochytrium属より抽出したゲノムDNAを鋳型として、BamHIサイトを含む正方向オリゴヌクレオチドプライマーRHO134 (32 mer: 5’- CCC GGA TCC ATG GTG GCC AGC GAG GTG CTC AG-3’) (配列番号：245)、およびBamHIサイトを含む逆方向オリゴヌクレオチドプライマーRHO135(34 mer : 5’- CCC GGA TCC TTA GTC GCG CTT GAG CTC AGC ATC C-3’) (配列番号：246) を用いたPCR（使用酵素：LA taq Hot Start Version, TaKaRa社製、PCR cycles: 98℃ 2 min/ 98℃ 30 sec, 53℃ 30 sec, 72℃ 1 min, 30 cycles/ 72℃ 7 min /4℃ ∞） によって、Schizochytrium属由来C20エロンガーゼ遺伝子を増幅した。得た両特異的産物をゲル精製し、pGEM-T easy vector (Promega社製)にクローニングし、大腸菌にて増幅後、Dye Terminator Cycle Sequencing Kit（BECKMAN COULTER社製）を用いて配列を確認した。これをpRH70と名付けた（図９５）。塩基配列を解析した結果、315アミノ酸（配列番号：247）をコードする945 bp（配列番号：248）のORFを有する新奇遺伝子配列を取得した。
【０１６７】
[実施例１４－２]・C20エロンガーゼ遺伝子ターゲティングベクターの作製のための土台プラスミド作製
実施例１４－１で作製したpRH70 （図９５） を鋳型に、C20エロンガーゼ遺伝子配列中腹部分にBglIIサイトを挿入する様、逆向きに設定したprimer setを用意し、Prime STAR Max DNA Polymerase（タカラバイオ社製）にて増幅した。用いたPCR primer は下記の通りで、ともにBglIIリンカー配列を有する。 [RHO136: 25 mer: 5’-CAT CGA GAT CTT CGT G TT TGT CCA C -3’ (配列番号：249)、 RHO137: 25 mer: 5’- ACG AAG ATC TCG ATG CGG GCG TCC C-3’ (配列番号：250)]。[PCR cycles: 98℃ 2 min/ 98℃ 10 sec, 56℃ 15 sec, 72℃ 1 min, 30 cycles/ 72℃ 1 min]。上記条件で増幅後、BglIIにて消化したのち、セルフライゲーションした。ライゲーションしたサンプルは大腸菌にて増幅後、Dye Terminator Cycle Sequencing Kit（BECKMAN COULTER社製）を用いて配列を確認した。これをpRH71と名付けた。BglIIサイトを挿入したC20エロンガーゼ遺伝子配列 945 bpを配列番号：251に示す。
作製したSchizochytrium属C20エロンガーゼ遺伝子ターゲティングベクターの作製のための土台プラスミド (pRH71) を図９６に示す。
【０１６８】
[実施例１４－３]ターゲティングベクターの作製（人工合成ネオマイシン耐性遺伝子およびハイグロマイシン耐性遺伝子）
実施例２－２記載のpRH31（図１３）をBglIIにて消化し、人工合成ネオマイシン耐性遺伝子カセットを含むDNA断片を実施例１４－２記載pRH71 （図９６）のBglIIサイトに繋いだ。これをpRH73と名付けた。
実施例２－３記載のpRH32（図１５)をBglIIにて消化し、ハイグロマイシン耐性遺伝子カセットを含むDNA断片を実施例１４－２記載pRH71 （図９６） のBglIIサイトに繋いだ。これをpKS-SKOと名付けた。
作製した2種のターゲティングベクター(pRH73およびpKS-SKO)を図９７に示す。
【０１６９】
[実施例１４－４] C20エロンガーゼ遺伝子ターゲティングベクター導入
実施例１４－３で作製した2種類のターゲティングベクターを鋳型に、翻訳開始点を含む正方向プライマー (SorfF: 20 mer: 5’- AGA TGG TGG CCA GCG AGG TG-3’) (配列番号：252) および翻訳終止点を含む逆方向プライマー(SorfR: 25 mer: 5’- TTA GTC GCG CTT GAG CTC AGC ATC C-3’) (配列番号：253) をprimerとして用いて、Prime STAR GXL polymeraseにより遺伝子を増幅した。[PCR cycles: 98℃ 2min/ 98℃ 30 sec, 60 30 sec

, 72℃ 3 min, 30 cycles]。フェノールクロロホルム抽出、クロロホルム抽出後、DNAをエタノール沈殿させ、沈殿を0.1×TEに溶解した。A260/280を測定しDNA濃度を算出した。実施例１４－３記載pRH73 （図９７） を鋳型とした際に得られる導入断片は 2644 bpで、Schizochytrium 属C20エロンガーゼ遺伝子前半－SV40 terminator配列－人工合成ネオマイシン耐性遺伝子配列－ubiquitin promoter配列－Schizochytrium 属C20エロンガーゼ遺伝子後半という並びになる (配列番号：254)。実施例１４－３記載pKS-SKO （図９７） を鋳型とした際に得られる導入断片は 2881 bpで、Schizochytrium 属C20エロンガーゼ遺伝子前半－ubiquitin promoter配列－ハイグロマイシン耐性遺伝子配列－SV40 terminator配列－Schizochytrium 属C20エロンガーゼ遺伝子後半という並びになる (配列番号：255)。

Schizochytrium sp. TY12Ab株をGY培地中で7日間培養し、対数増殖期にある細胞を遺伝子導入に使用した。OD600 = 1～1.5相当分の細胞に対し、0.625μgのDNA断片を遺伝子銃法により、マイクロキャリア：0.6 micronの金粒子、target distance：6 cm、chamber vacuum：26 mmHg、Rupture disk：1100 PSIの条件で導入した。遺伝子導入した細胞は24時間のリカバリータイムの後、PDA平板培地(2 mg/ml G418 含有もしくは2 mg/ml ハイグロマイシン含有)に塗布した。

この結果、1撃ちこみあたり、20個程度の薬剤耐性株を得た。

【０１７０】

[実施例１４－５] C20エロンガーゼ遺伝子ジーンターゲティング相同組換体の同定

Schizochytrium sp. TY12Ab株（FERM ABP-11421）、C20エロンガーゼ遺伝子ヘテロ相同組換体、およびC20エロンガーゼ遺伝子ホモ相同組換体（遺伝子破壊株）についてGY培地で培養後、得られた細胞を4℃、3,000rpm、10 min遠心してペレットにし、20 μlのSNET溶液[20 mM Tris-HCl; pH 8.0, 5 mM NaCl, 0.3 % SDS, 200 μg/ml Proteinase K (ナカライテスク社製)] にけん濁後、55℃, 6 h/ 99.9℃, 5 minで細胞を溶解した。得られた細胞溶解液を10倍希釈したものを鋳型とし、Mighty Amp DNA polymerase (タカラバイオ社製)を用いてゲノム構造確認のPCRを行った。用いたprimerの位置、増幅産物の予想サイズを図９８に示す。プライマーは実施例１４－４で用いたSorfF、及びSorfRの組み合わせで行った。[PCR cycles: 98℃ 2min/ 98℃ 10 sec, 60℃ 15 sec, 68℃ 4 min, 30 cycles]。

野生型アリル (Wt allele) に増幅がなく、人工合成ネオマイシン耐性遺伝子アリル (NeoR allele) およびハイグロマイシン耐性遺伝子アリル (HygR allele) に増幅のあるC20エロンガーゼ ノックアウト株が得られた （図９９）。

【０１７１】

[実施例１４－６] C20エロンガーゼ破壊による脂肪酸組成の変化

Schizochytrium sp. TY12Ab株および遺伝子破壊株を、GY培地にて培養した。対数増殖期後期の細胞を4℃、3,000rpm、10 min遠心してペレットにし、0.9% NaClに懸濁、洗浄した。つづいて4℃、3,000rpm、10 min遠心し、ペレットを滅菌水に懸濁、洗浄した。これを3,000rpm、10 min遠心し、上清を除き、凍結乾燥した。凍結乾燥した細胞に2 mlのmethanolic KOH（7.5% KOH in 95% methanol）を加え、ボルテックス後、超音波で菌体を破砕した（80℃、30 min）。

500 μlの滅菌水を加えてボルテックスした後、2 mlのn-hexaneを加えてボルテックスした。続いて3,000 rpmで10 min遠心し、上層を捨てた。再び2 mlのn-hexaneを加えてボルテックスし、3,000 rpmで10 min遠心して、上層を捨てた。残った下層に1 mlの6N HClを添加してボルテックスした後、2 mLのn-hexaneを加えてボルテックスした。続いて3,000 rpmで10 min遠心し、上層を回収した。再び2 mlのn-hexaneを加えてボルテックスし、3,000 rpmで10 min遠心して、上層を回収した。回収した上層を窒素ガスで濃縮乾固した。濃縮乾固したサンプルに2 mlの3N methanolic HClを添加し、80℃で一晩インキュベートした。

サンプルを室温まで冷まし、1 mlの0.9% NaClを添加した。2 mlのn-hexaneを加えてボルテックスした。3,000 rpmで10 min遠心し、上層を回収した。再び2 mlのn-hexaneを加

えてボルテックスし、3,000 rpmで10 min遠心して、上層を回収した。回収した上層に無水硫酸ナトリウムを少量添加後、ボルテックスした。3,000 rpmで10 min遠心して、上層を回収した。回収した上層を窒素ガスで濃縮乾固した。濃縮乾固したサンプルを0.2 mlのn-hexaneに溶解し、2 μlをGC解析にかけた。GC解析にはガスクロマトグラフGC-2014（島津製作所社製）を使用し、カラム：HR-SS-10（30 m x 0.25 mm；信和化工社製）、カラム温度：150℃ →（5℃/min）→ 220℃（10 min）、キャリアガス：He（1.3 mL/min）の条件で行った。

この結果、Schizochytrium sp. TY12Ab株においてC20エロンガーゼをノックアウトすると、炭素鎖長20の脂肪酸が増加した （図１００）。図１０１に野生型株を100%とした時の割合を示す。図１０１は、全脂肪酸組成のうちAA 17.2% EPA 3.8%, n-6DPA 13.7%,DHA 15.5%を示している。GC面積でDHA/n-3DPAの値 38.8を示している。

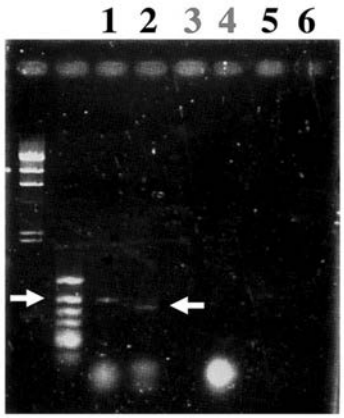
これらの結果、アラキドン酸が約1.7倍、EPAが約1.3倍、DPA(n-6) が約1.1倍、およびDHAが約0.9倍にそれぞれ変化した。

【産業上の利用可能性】

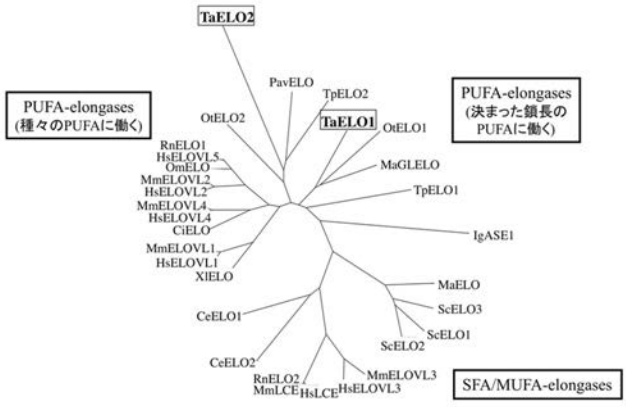
【０１７２】

本発明により、ストラメノパイルの遺伝子破壊または／および発現抑制によるストラメノパイルの形質転換方法、ストラメノパイルが産生する脂肪酸組成を改変すること、およびストラメノパイルに高度に脂肪酸を蓄積させる方法が提供され、高度不飽和脂肪酸をより効率的に製造することが可能となる。

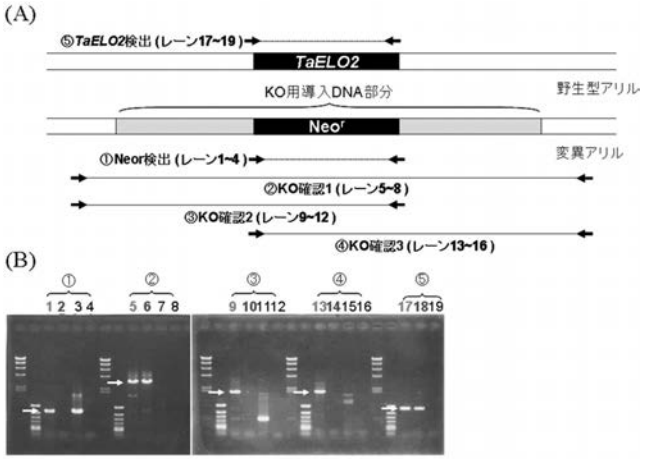
【図１】



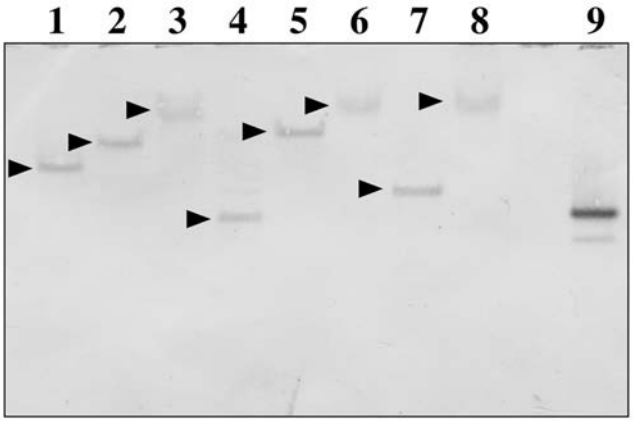
【図２】



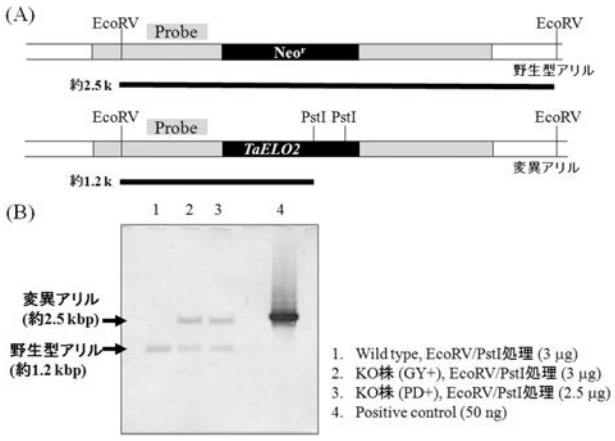
【図３】



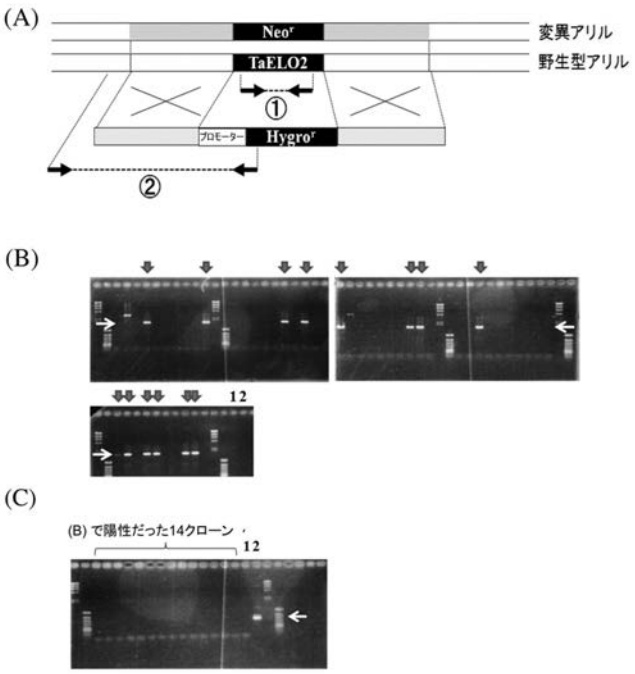
【図４】



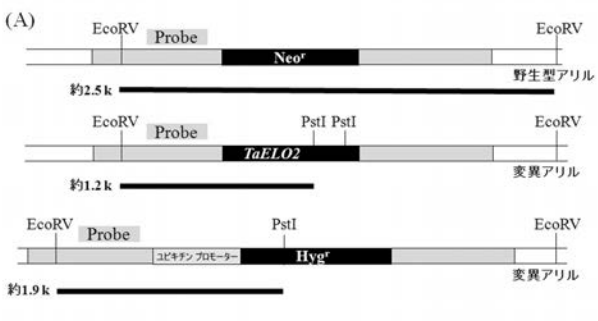
【図５】



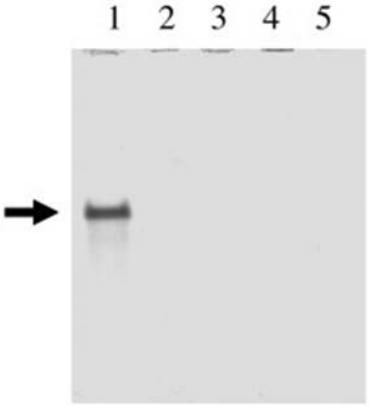
【図６】



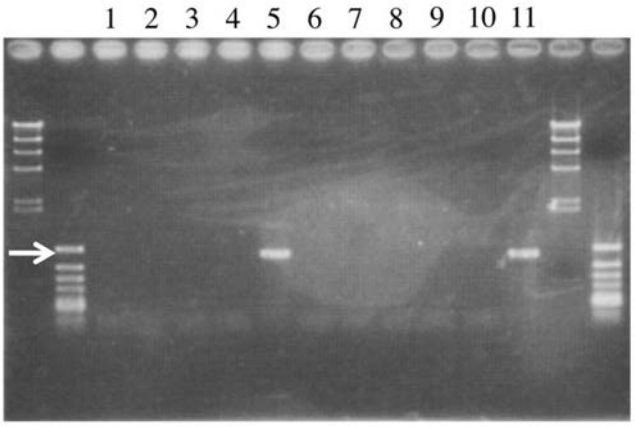
【図７】



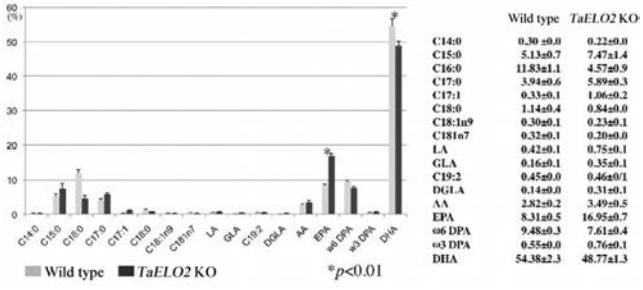
【図８】



【図９】

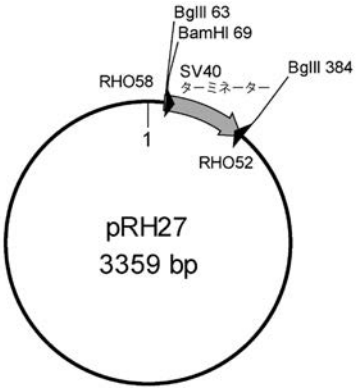


【図１０】

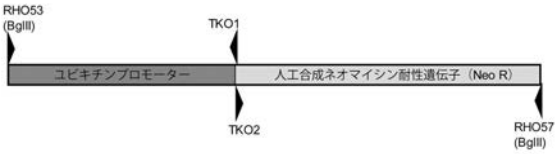


	Wild type	*TaELO2* KO
C14:0	0.30 ±0.0	0.22±0.0
C15:0	5.13±0.7	7.47±1.4
C16:0	11.83±1.1	4.57±0.9
C17:0	3.94±0.6	5.89±0.3
C17:1	0.33±0.1	1.06±0.2
C18:0	1.14±0.4	0.84±0.0
C18:1n9	0.30±0.1	0.23±0.1
C181n7	0.32±0.1	0.20±0.0
LA	0.42±0.1	0.75±0.1
GLA	0.16±0.1	0.35±0.1
C19:2	0.45±0.0	0.46±0/1
DGLA	0.14±0.0	0.31±0.1
AA	2.82±0.2	3.49±0.5
EPA	8.31±0.5	16.95±0.7
ω6 DPA	9.48±0.3	7.61±0.4
ω3 DPA	0.55±0.0	0.76±0.1
DHA	54.38±2.3	48.77±1.3

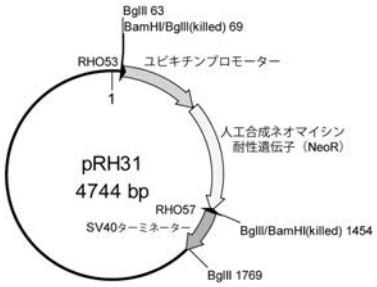
【図１１】



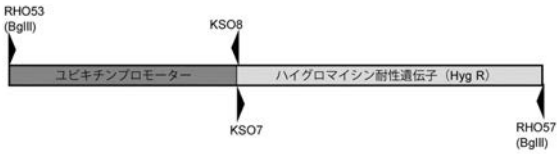
【図１２】



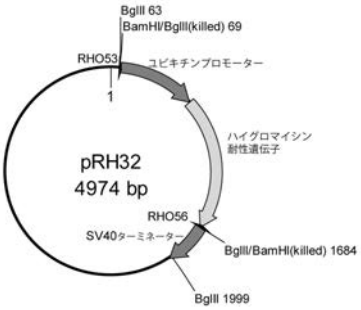
【図１３】



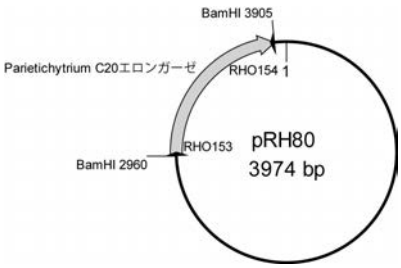
【図１４】



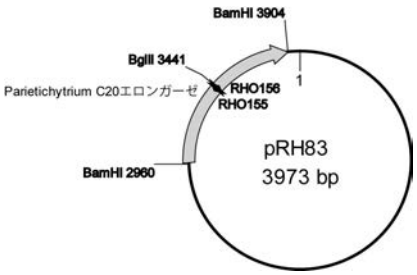
【図１５】



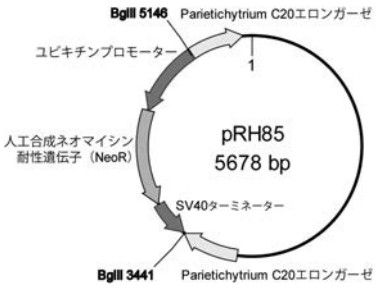
【図１６】

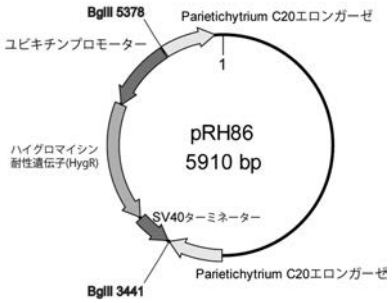


【図１７】

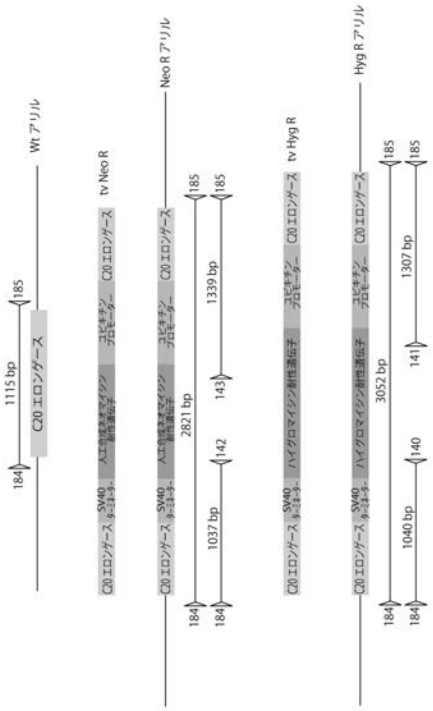


【図１８】

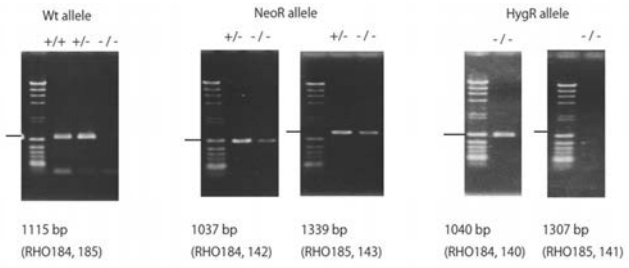




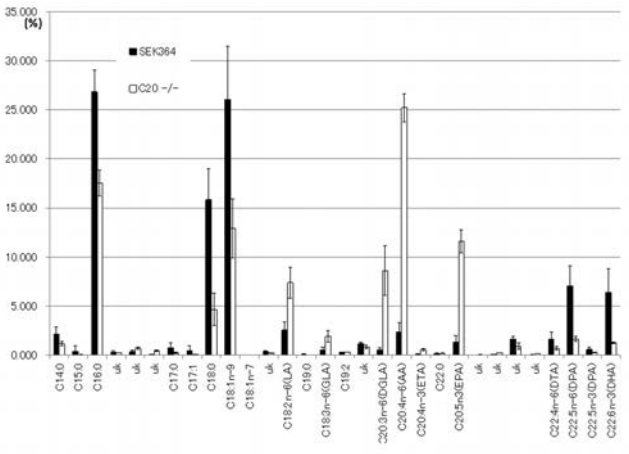
【図１９】



【図２０】



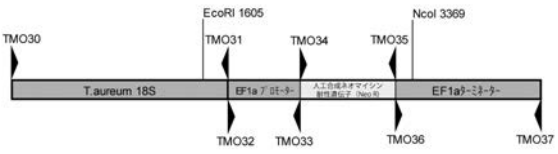
【図２１】



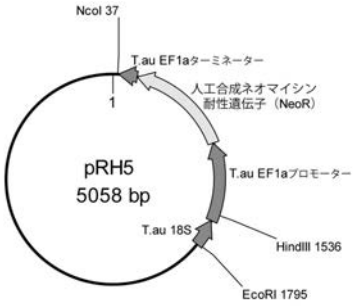
【図２２】

野生型株との比較	C20 -/-	SEK364	FA
54.4%	1.16	2.13	C14:0
6.5%	0.02	0.38	C15:0
65.4%	17.55	26.83	C16:0
31.6%	0.24	0.76	C17:0
12.0%	0.05	0.42	C17:1
29.4%	4.66	15.84	C18:0
49.5%	12.91	26.08	C18:1n-9
-	0.00	0.00	C18:1n-7
289.4%	7.38	2.55	C18:2n-6(LA)
35.3%	0.02	0.05	C19:0
366.7%	1.91	0.52	C18:3n-6(GLA)
99.5%	0.31	0.31	C19:2
1673.7%	8.62	0.51	C20:3n-6(DGLA)
1079.4%	25.22	2.34	C20:4n-6(AA)
722.8%	0.56	0.08	C20:4n-3(ETA)
105.7%	0.18	0.17	C22:0
851.2%	11.58	1.36	C20:5n3(EPA)
42.2%	0.67	1.59	C22:4n-6(DTA)
23.1%	1.64	7.07	C22:5n-6(DPA)
45.4%	0.26	0.56	C22:5n-3(DPA)
20.0%	1.28	6.38	C22:6n-3(DHA)

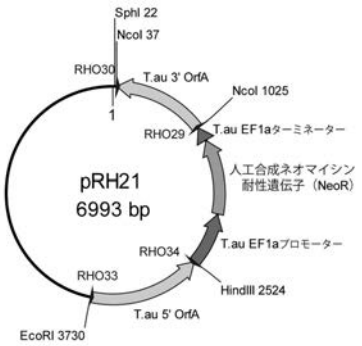
【図２３】



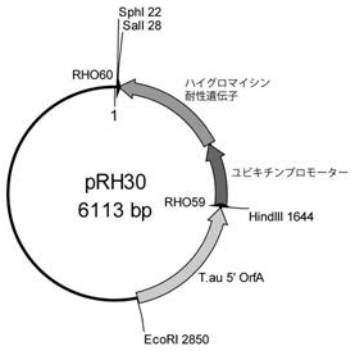
【図２４】



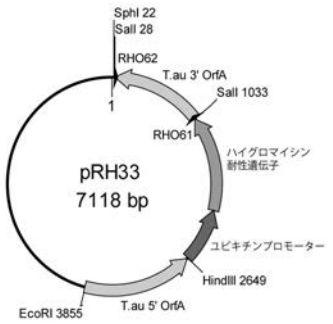
【図２５】



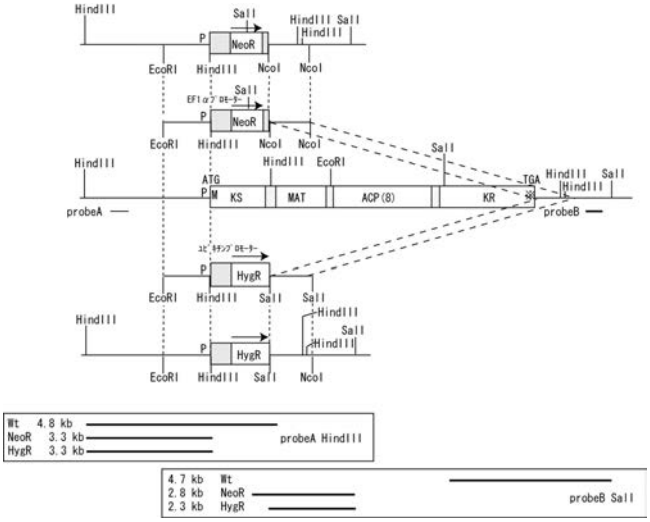
【図２６】



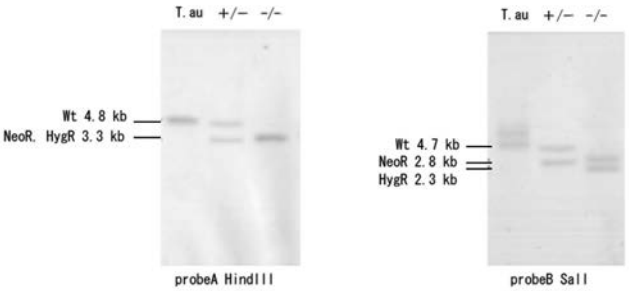
【図２７】



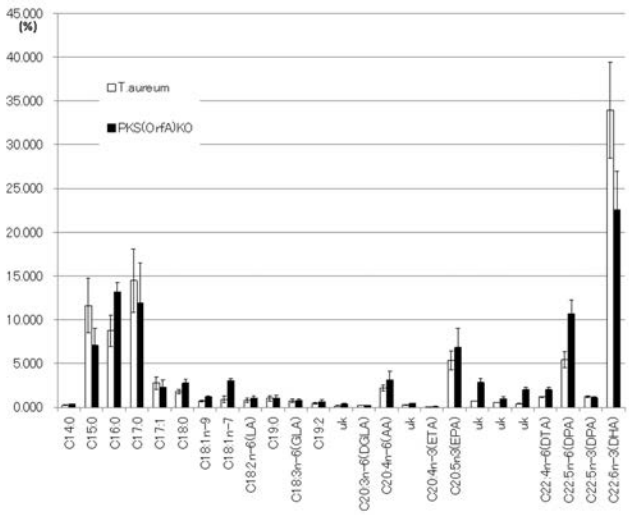
【図２８】



【図２９】



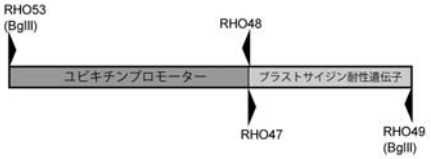
【図３０】



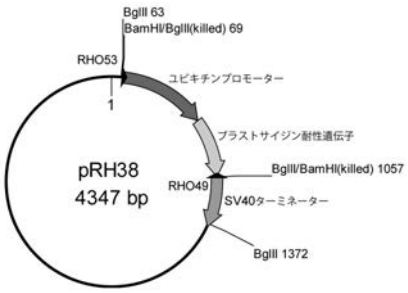
【図３１】

PKS(OrfA)KO		T.aureum	FA
121.2%	0.33	0.27	C14:0
60.9%	7.07	11.61	C15:0
151.2%	13.21	8.74	C16:0
82.8%	11.97	14.46	C17:0
83.4%	2.30	2.76	C17:1
153.7%	2.77	1.80	C18:0
172.6%	1.21	0.70	C18:1n-9
339.0%	3.03	0.89	C18:1n-7
130.6%	1.07	0.82	C18:2n-6(LA)
101.5%	1.02	1.01	C19:0
105.2%	0.77	0.73	C18:3n-6(GLA)
131.6%	0.65	0.49	C19:2
125.9%	0.23	0.18	C20:3n-6(DGLA)
141.2%	3.10	2.19	C20:4n-6(AA)
184.6%	0.04	0.02	C20:4n-3(ETA)
126.9%	6.82	5.38	C20:5n3(EPA)
169.6%	2.00	1.18	C22:4n-6(DTA)
196.3%	10.66	5.43	C22:5n-6(DPA)
93.6%	1.13	1.20	C22:5n-3(DPA)
66.5%	22.58	33.97	C22:6n-3(DHA)

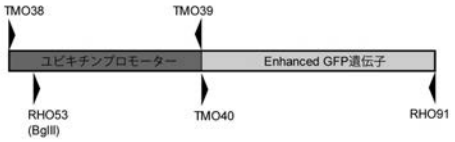
【図３２】



【図３３】



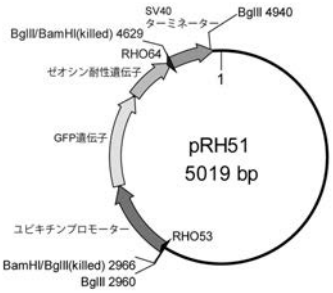
【図３４】



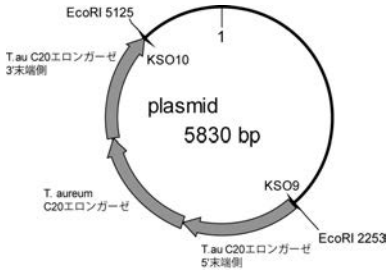
【図３５】



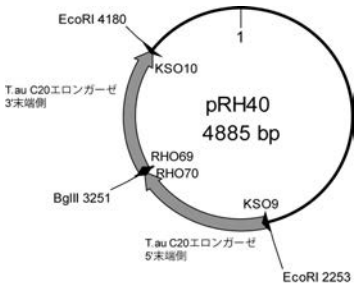
【図３６】



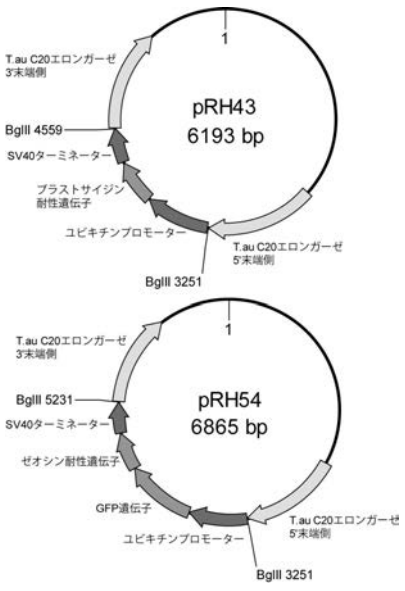
【図３７】



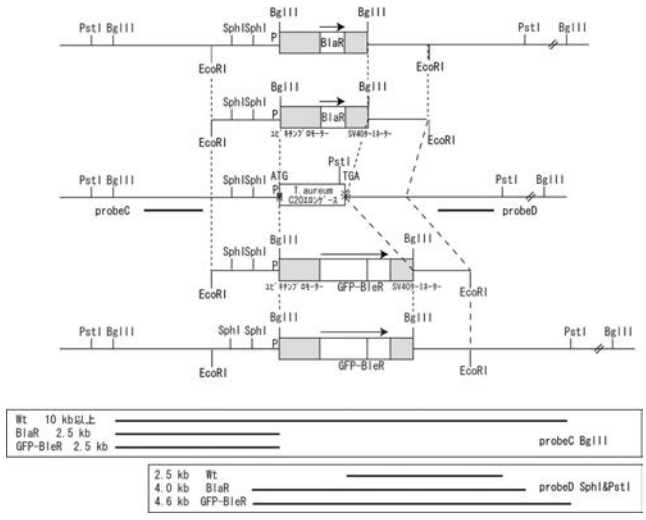
【図３８】



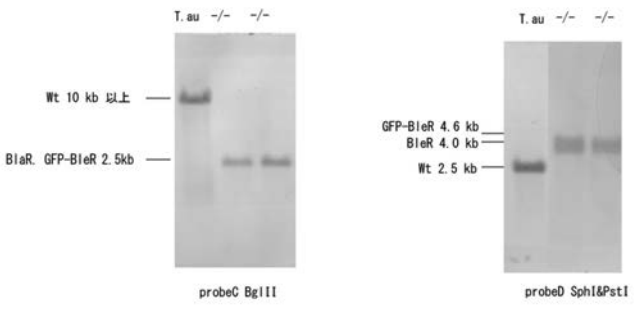
【図３９】



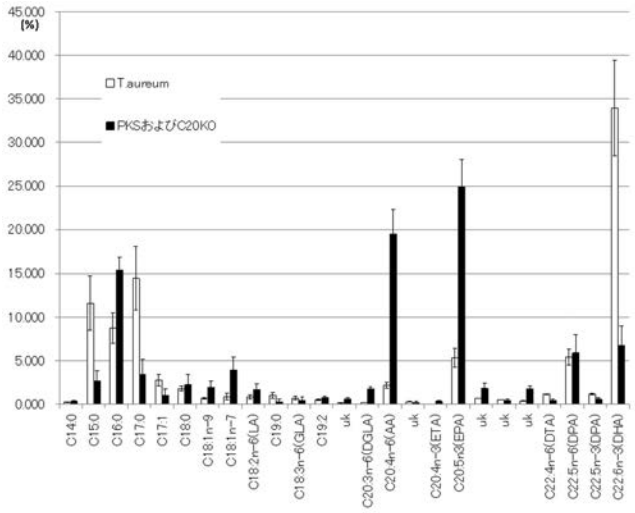
【図４０】



【図４１】



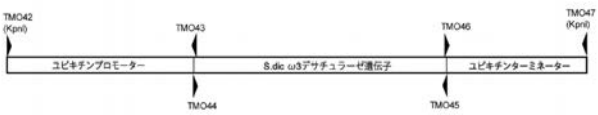
【図４２】



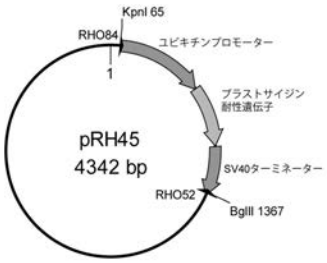
【図４３】

PKSおよびC20KO		T.aureum	FA
113.0%	0.31	0.27	C14:0
23.3%	2.71	11.61	C15:0
176.4%	15.41	8.74	C16:0
23.8%	3.44	14.46	C17:0
37.0%	1.02	2.76	C17:1
125.2%	2.26	1.80	C18:0
279.4%	1.96	0.70	C18:1n-9
443.0%	3.96	0.89	C18:1n-7
208.2%	1.71	0.82	C18:2n-6(LA)
26.0%	0.26	1.01	C19:0
60.9%	0.45	0.73	C18:3n-6(GLA)
163.7%	0.81	0.49	C19:2
996.6%	1.81	0.18	C20:3n-6(DGLA)
889.0%	19.50	2.19	C20:4n-6(AA)
1550.6%	0.31	0.02	C20:4n-3(ETA)
463.3%	24.92	5.38	C20:5n3(EPA)
40.3%	0.47	1.18	C22:4n-6(DTA)
108.6%	5.90	5.43	C22:5n-6(DPA)
47.9%	0.58	1.20	C22:5n-3(DPA)
20.0%	6.78	33.97	C22:6n-3(DHA)

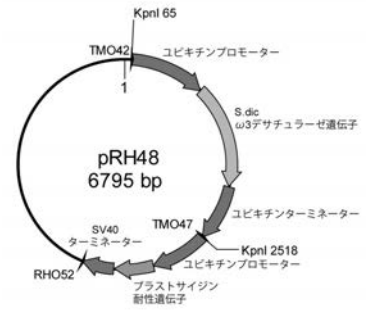
【図４４】



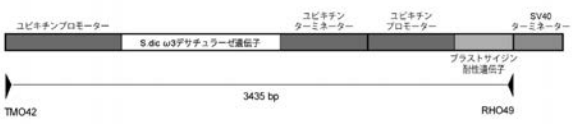
【図４５】



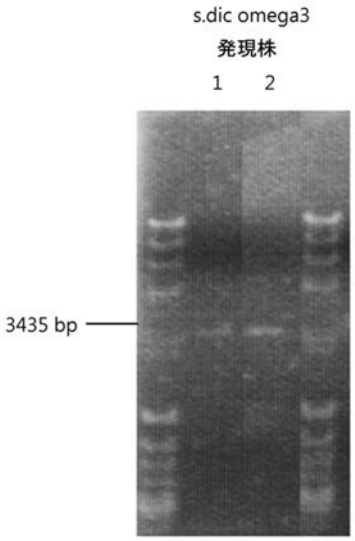
【図４６】



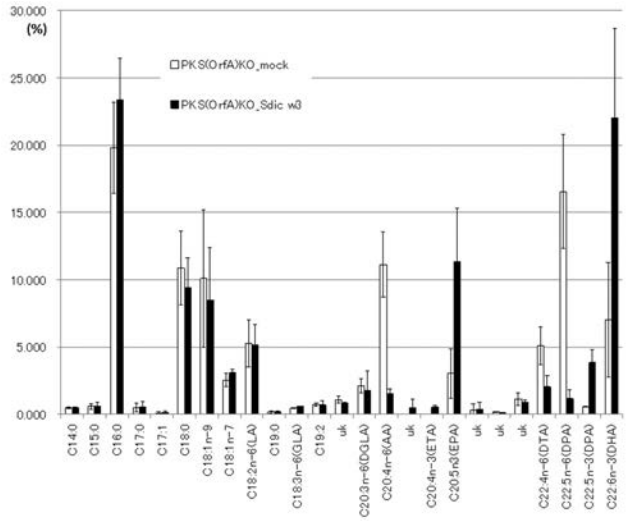
【図４７】



【図４８】



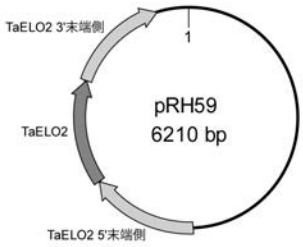
【図４９】



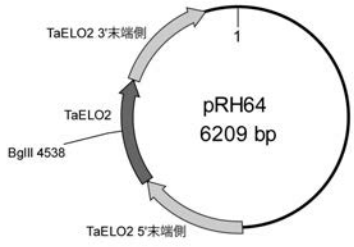
【図５０】

野生型株との比較	PKS(OrfA)KO Sdic w3	PKS(OrfA)KO mock	FA
106.1%	0.52	0.49	C14:0
105.7%	0.63	0.59	C15:0
118.1%	23.39	19.81	C16:0
109.6%	0.56	0.51	C17:0
147.4%	0.13	0.09	C17:1
86.7%	9.43	10.87	C18:0
84.2%	8.50	10.09	C18:1n-9
120.5%	3.09	2.56	C18:1n-7
98.4%	5.18	5.26	C18:2n-6(LA)
94.4%	0.17	0.18	C19:0
124.3%	0.59	0.47	C18:3n-6(GLA)
99.4%	0.70	0.70	C19:2
83.7%	1.77	2.12	C20:3n-6(DGLA)
13.8%	1.53	11.13	C20:4n-6(AA)
5398.4%	0.54	0.01	C20:4n-3(ETA)
375.8%	11.36	3.02	C20:5n3(EPA)
40.0%	2.04	5.11	C22:4n-6(DTA)
7.0%	1.16	16.55	C22:5n-6(DPA)
669.3%	3.85	0.58	C22:5n-3(DPA)
314.1%	22.04	7.02	C22:6n-3(DHA)

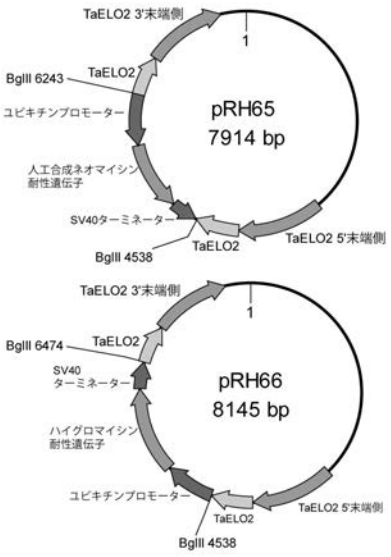
【図５１】



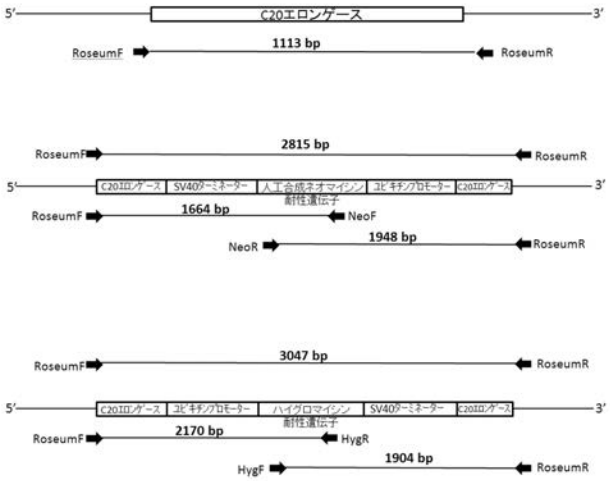
【図５２】



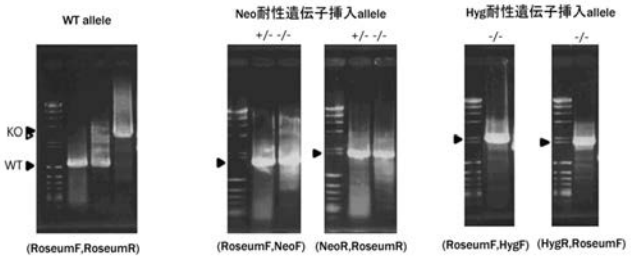
【図５３】



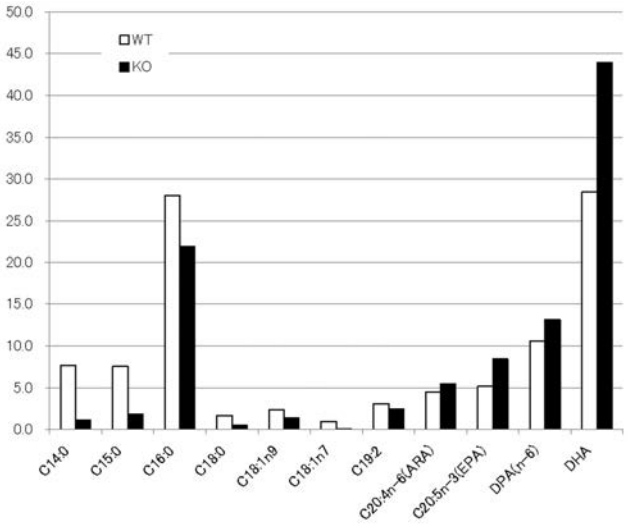
【図５４】



【図５５】



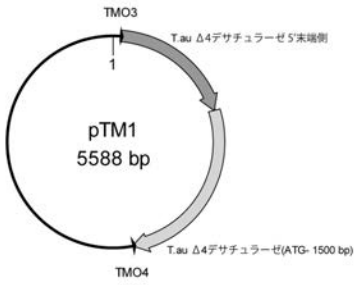
【図５６】



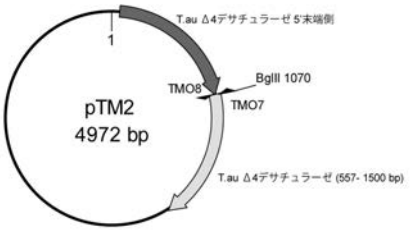
【図５７】

野生型株との比較	C20elo KO	T. roseum	FA
14.5%	1.11	7.65	C14:0
23.9%	1.81	7.57	C15:0
78.2%	21.89	27.99	C16:0
28.8%	0.48	1.68	C18:0
59.9%	1.42	2.37	C18:1n9
8.4%	0.08	0.99	C18:1n7
79.9%	2.47	3.09	C19:2
121.8%	5.50	4.51	C20:4n-6(ARA)
163.8%	8.45	5.16	C20:5n-3(EPA)
124.8%	13.17	10.55	DPA(n-6)
154.5%	43.94	28.44	DHA
	100	100	total

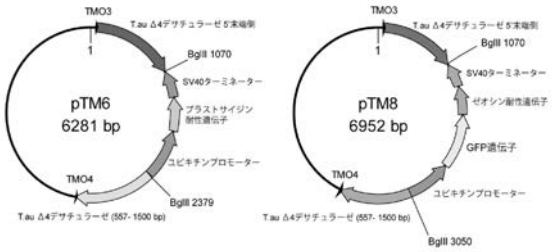
【図５８】



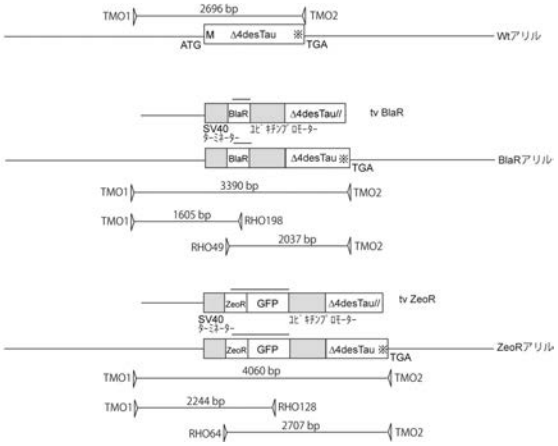
【図５９】



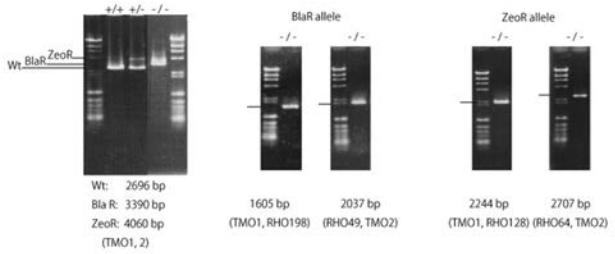
【図６０】



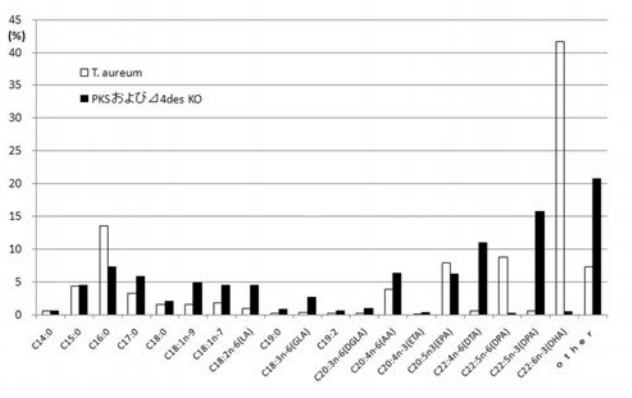
【図６１】



【図６２】



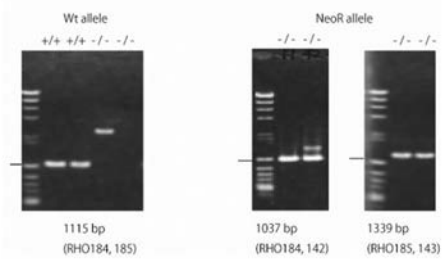
【図６３】



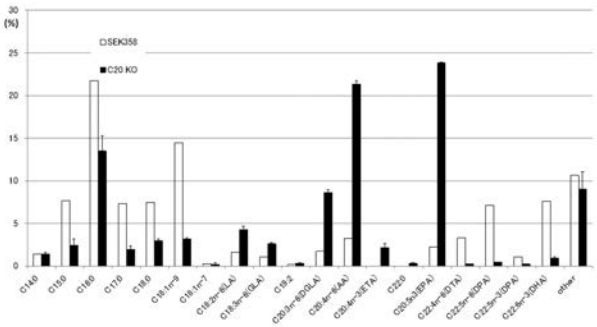
【図６４】

PKSおよびΔ4des KO		T.aureum	FA
92.6%	0.58	0.62	C14:0
101.0%	4.48	4.43	C15:0
53.7%	7.28	13.56	C16:0
176.1%	5.84	3.32	C17:0
128.4%	2.05	1.60	C18:0
304.9%	4.83	1.58	C18:1n-9
250.1%	4.49	1.80	C18:1n-7
450.5%	4.47	0.99	C18:2n-6(LA)
310.7%	0.81	0.26	C19:0
784.5%	2.67	0.34	C18:3n-6(GLA)
229.0%	0.59	0.26	C19:2
353.7%	0.90	0.25	C20:3n-6(DGLA)
164.2%	6.35	3.87	C20:4n-6(AA)
182.8%	0.28	0.15	C20:4n-3(ETA)
78.1%	6.22	7.96	C20:5n3(EPA)
2008.9%	11.01	0.55	C22:4n-6(DTA)
2.4%	0.21	8.79	C22:5n-6(DPA)
2695.8%	15.78	0.59	C22:5n-3(DPA)
1.2%	0.51	41.71	C22:6n-3(DHA)

【図６５】



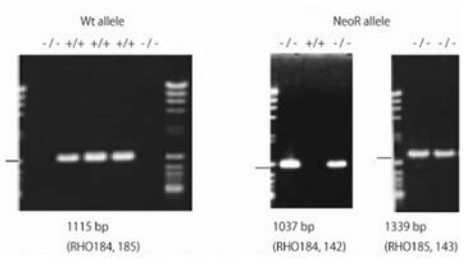
【図６６】



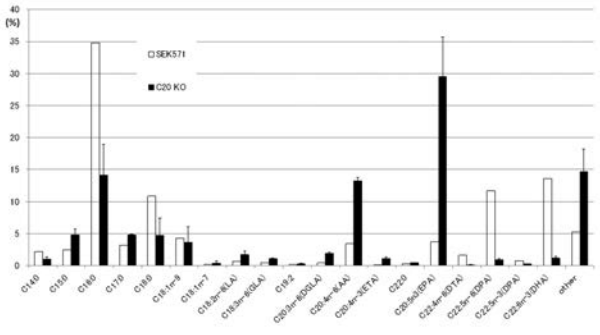
【図６７】

C20 elongase KO		SEK358	FA
101.0%	1.41	1.40	C14:0
32.0%	2.44	7.63	C15:0
62.1%	13.49	21.73	C16:0
26.6%	1.96	7.34	C17:0
39.6%	2.95	7.46	C18:0
22.0%	3.19	14.47	C18:1n-9
84.5%	0.19	0.23	C18:1n-7
269.4%	4.28	1.59	C18:2n-6(LA)
247.0%	2.61	1.06	C18:3n-6(GLA)
201.5%	0.34	0.17	C19:2
499.9%	8.64	1.73	C20:3n-6(DGLA)
654.8%	21.35	3.26	C20:4n-6(AA)
	2.14	0.00	C20:4n-3(ETA)
	0.30	0.00	C22:0
1069.6%	23.83	2.23	C20:5n3(EPA)
8.0%	0.26	3.28	C22:4n-6(DTA)
6.4%	0.46	7.10	C22:5n-6(DPA)
21.6%	0.23	1.06	C22:5n-3(DPA)
12.3%	0.94	7.61	C22:6n-3(DHA)

【図６８】



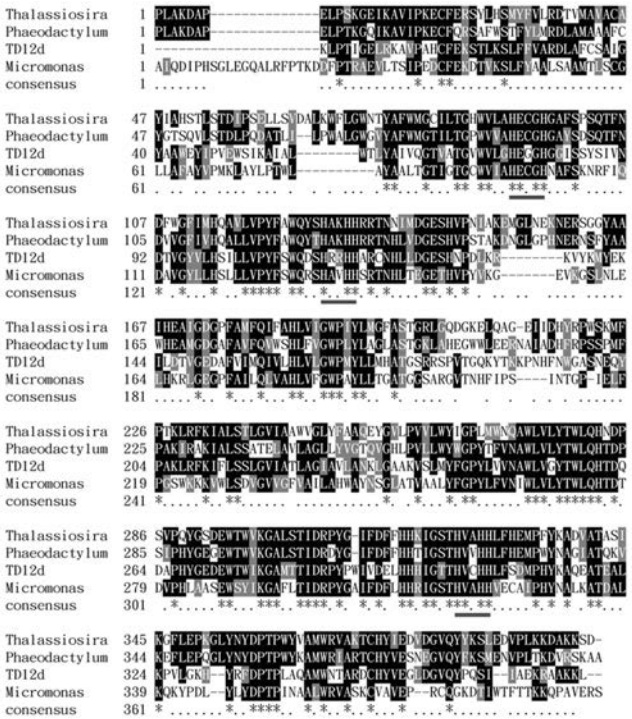
【図６９】



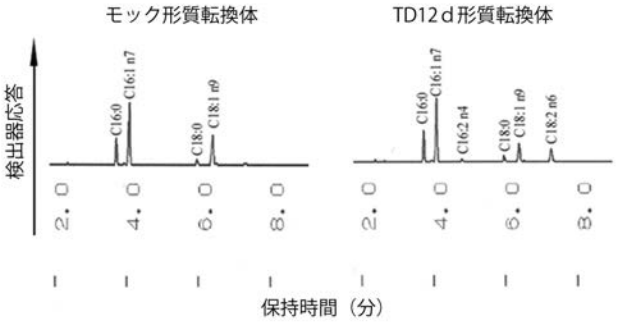
【図７０】

C20 elongase KO		SEK571	FA
43.8%	0.98	2.23	C14:0
197.0%	4.86	2.47	C15:0
40.6%	14.13	34.78	C16:0
152.7%	4.80	3.14	C17:0
43.4%	4.71	10.86	C18:0
85.5%	3.66	4.28	C18:1n-9
234.8%	0.37	0.16	C18:1n-7
251.6%	1.70	0.67	C18:2n-6(LA)
228.8%	1.07	0.47	C18:3n-6(GLA)
156.9%	0.24	0.16	C19:2
450.2%	1.93	0.43	C20:3n-6(DGLA)
388.5%	13.24	3.41	C20:4n-6(AA)
1048.9%	1.14	0.11	C20:4n-3(ETA)
182.8%	0.43	0.24	C22:0
796.8%	29.58	3.71	C20:5n3(EPA)
9.0%	0.15	1.61	C22:4n-6(DTA)
8.2%	0.96	11.69	C22:5n-6(DPA)
34.0%	0.25	0.75	C22:5n-3(DPA)
8.6%	1.17	13.62	C22:6n-3(DHA)

【図７１】



【図７２】

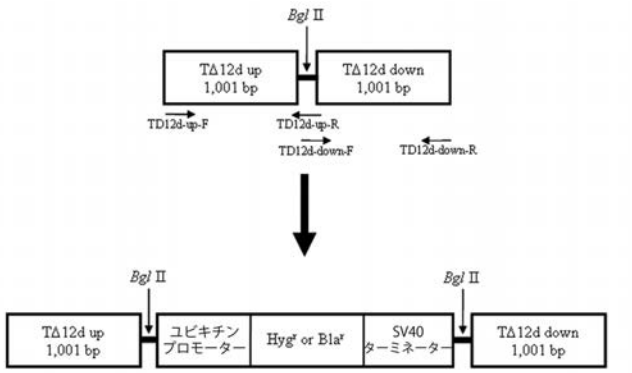


FA量(μg) 乾燥菌体重量1mgあたり

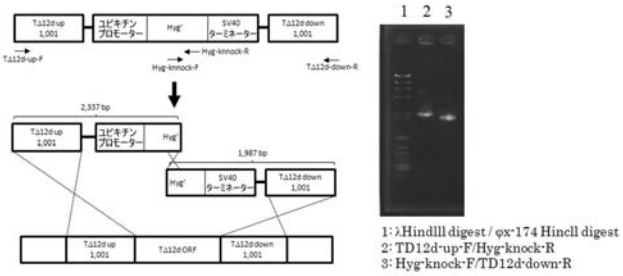
	mock ave.	mock std.	TΔ12d ave.	TΔ12d std.
C14:0	0.483883	0.118188	0.5181282	0.05081
C16:0	7.127198	1.223085	7.451359	0.579578
C16:1n7	19.16444	2.936704	17.042456	2.69802
C18:0	1.910871	0.255276	1.9670849	0.22879
C18:1n9	11.05722	0.945736	6.1005013	0.498143
C18:2n6	0	0	3.5566365	0.98697
Total	40.45796	5.459088	37.350518	4.913859

n=3

【図７３】

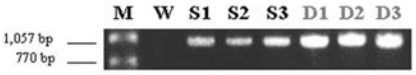


【図７４】

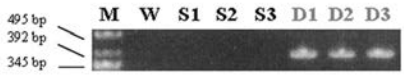


【図７５】

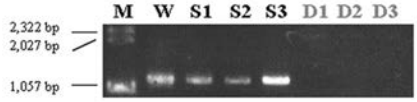
Hygr遺伝子



Blar遺伝子

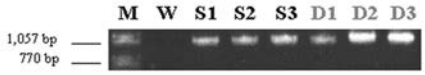


Δ12 desaturase遺伝子

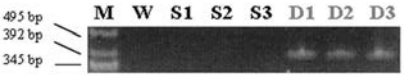


【図７６】

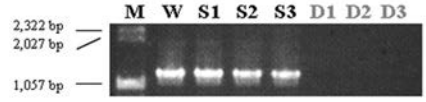
Hygr遺伝子



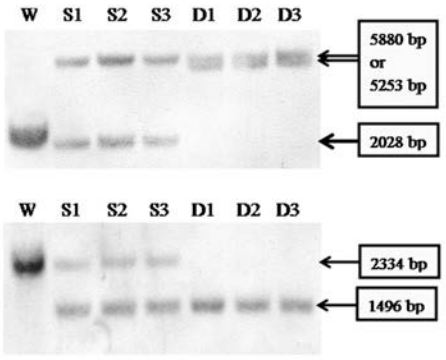
Blar遺伝子



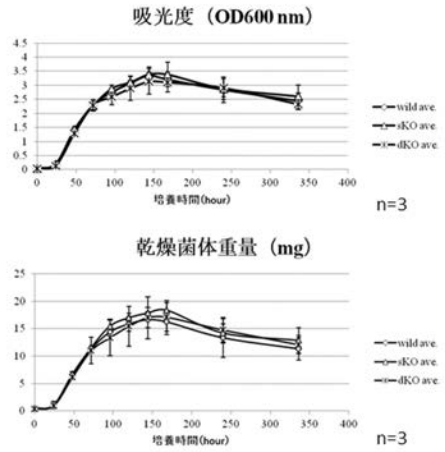
Δ12 desaturase遺伝子



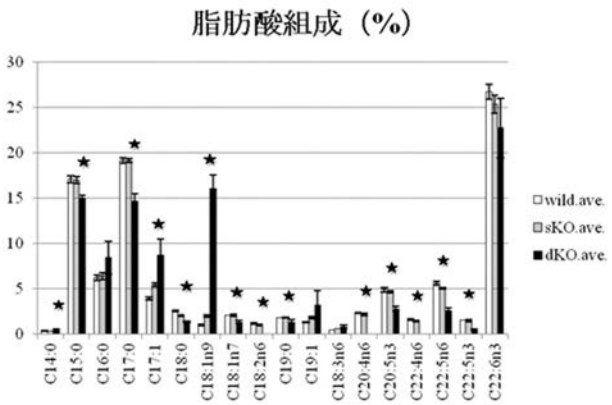
【図７７】



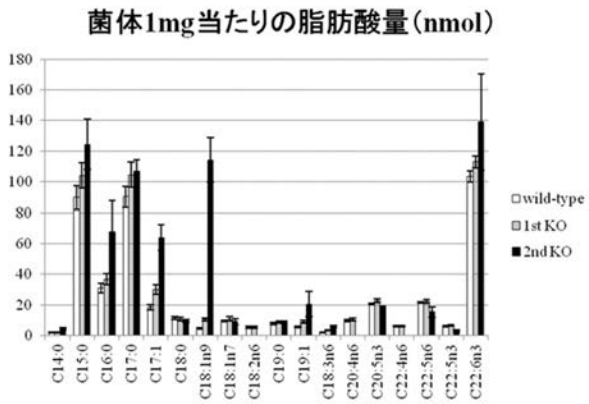
【図７８】



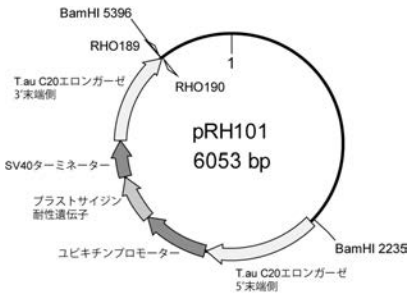
【図７９】



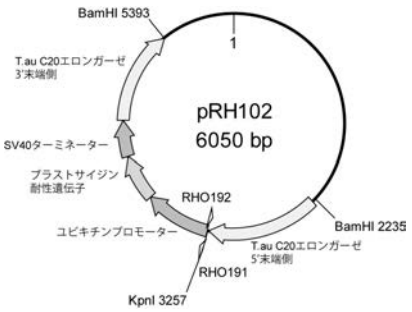
【図８０】



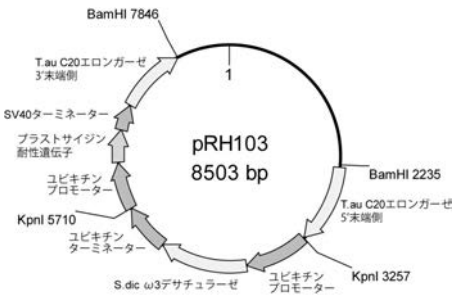
【図８１】



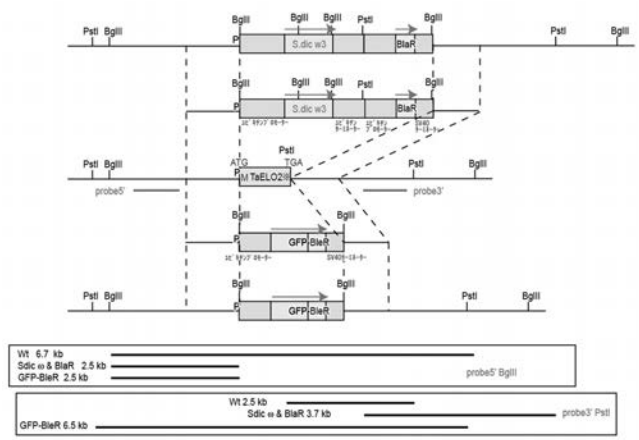
【図８２】



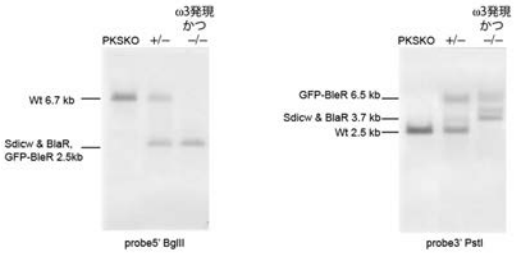
【図８３】



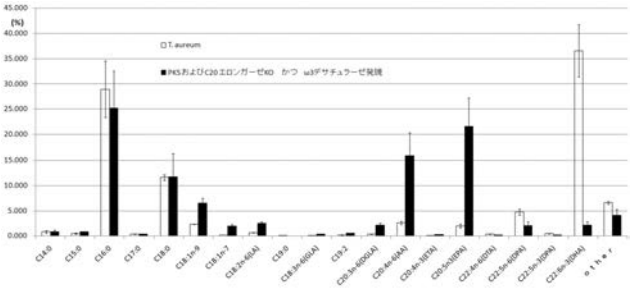
【図８４】



【図８５】



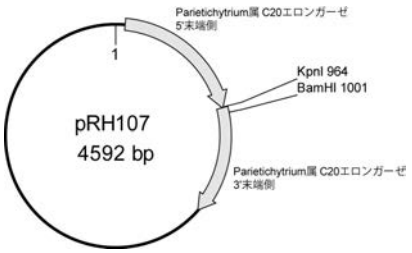
【図８６】



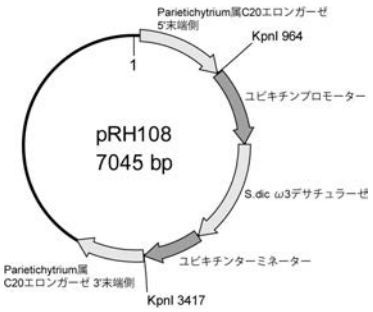
【図８７】

PKSおよび C20 elongase KO かつω3 desaturase 発現		T.aureum	FA
106.7%	0.89	0.83	C14:0
162.2%	0.84	0.52	C15:0
87.1%	25.22	28.96	C16:0
86.7%	0.36	0.42	C17:0
101.1%	11.75	11.62	C18:0
281.5%	6.55	2.33	C18:1n-9
795.0%	2.01	0.25	C18:1n-7
372.7%	2.55	0.69	C18:2n-6(LA)
0.0%	0.00	0.06	C19:0
333.5%	0.37	0.11	C18:3n-6(GLA)
300.4%	0.59	0.20	C19:2
576.4%	2.19	0.38	C20:3n-6(DGLA)
601.0%	15.95	2.65	C20:4n-6(AA)
235.5%	0.31	0.13	C20:4n-3(ETA)
1075.4%	21.58	2.01	C20:5n3(EPA)
60.2%	0.22	0.36	C22:4n-6(DTA)
43.9%	2.10	4.77	C22:5n-6(DPA)
40.4%	0.21	0.52	C22:5n-3(DPA)
5.9%	2.17	36.59	C22:6n-3(DHA)

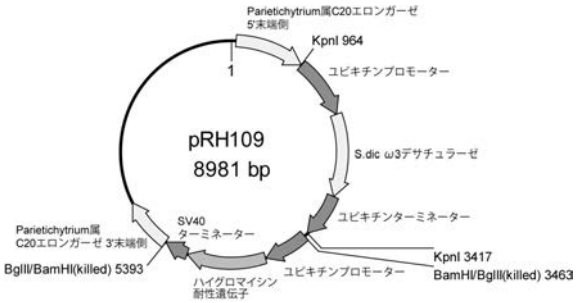
【図８８】



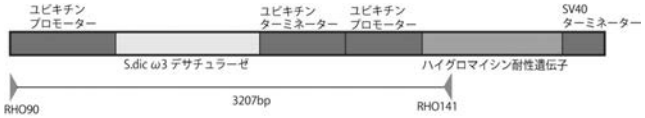
【図８９】



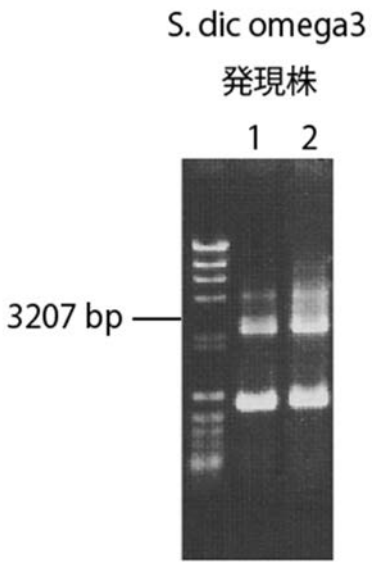
【図９０】



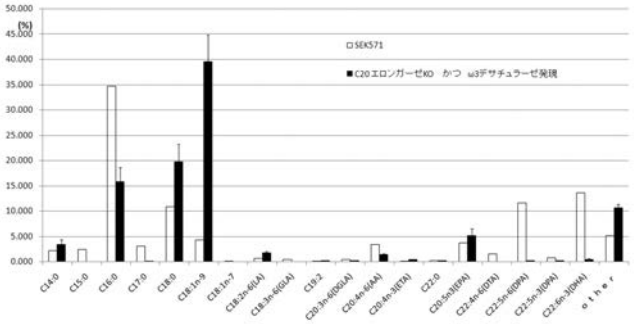
【図９１】



【図９２】



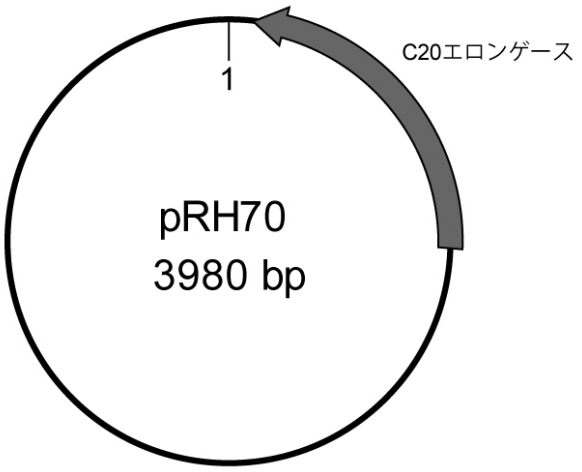
【図９３】



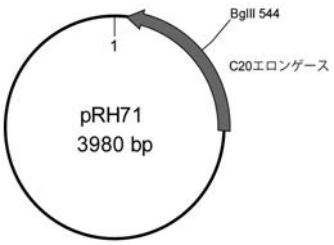
【図９４】

C20 elongase KO かつω3 desaturase 発現		SEK571	FA
154.8%	3.45	2.23	C14:0
0.0%	0.00	2.47	C15:0
45.6%	15.86	34.78	C16:0
4.7%	0.15	3.14	C17:0
182.1%	19.77	10.86	C18:0
925.2%	39.58	4.28	C18:1n-9
0.0%	0.00	0.16	C18:1n-7
265.2%	1.79	0.67	C18:2n-6(LA)
0.0%	0.00	0.47	C18:3n-6(GLA)
141.0%	0.22	0.16	C19:2
57.1%	0.24	0.43	C20:3n-6(DGLA)
42.9%	1.46	3.41	C20:4n-6(AA)
449.2%	0.49	0.11	C20:4n-3(ETA)
108.3%	0.26	0.24	C22:0
139.6%	5.18	3.71	C20:5n3(EPA)
0.0%	0.00	1.61	C22:4n-6(DTA)
1.8%	0.21	11.69	C22:5n-6(DPA)
28.5%	0.21	0.75	C22:5n-3(DPA)
3.2%	0.44	13.62	C22:6n-3(DHA)

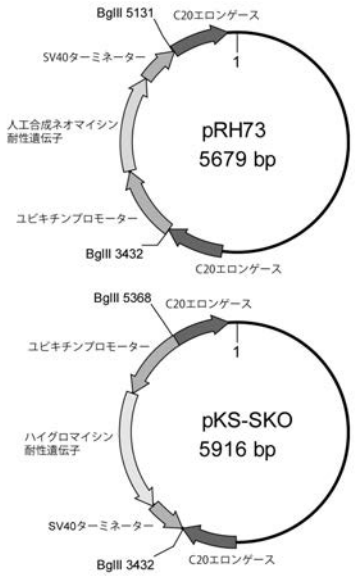
【図９５】



【図９６】



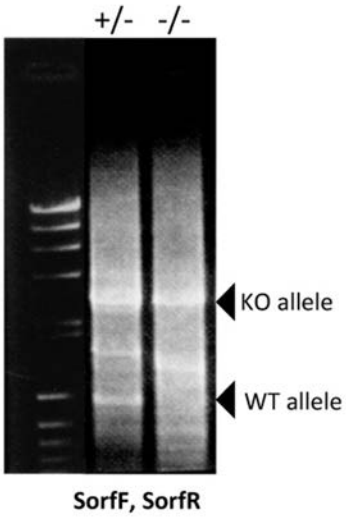
【図９７】



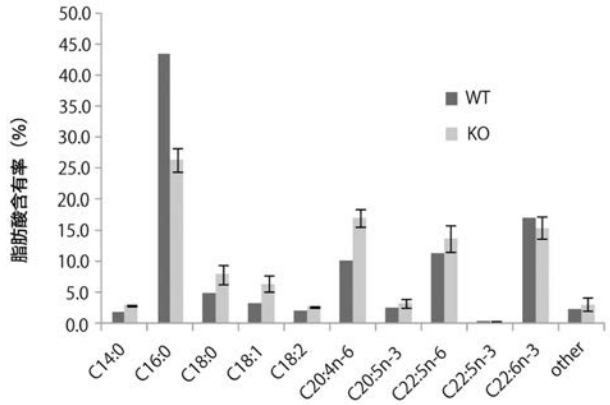
【図９８】



【図９９】



【図１００】



【図１０１】

野生型株との比較	C20elo KO	S. sp. TY12Ab	FA
150.0%	3.0±0.06	2.0	C14:0
59.8%	26.4±1.97	43.5	C16:0
160.0%	8.0±1.52	5.0	C18:0
197.0%	6.5±1.32	3.3	C18:1
127.3%	2.8±0.12	2.2	C18:2
166.7%	17.2±1.45	10.2	C20:4n-6
132.0%	3.3±0.64	2.5	C20:5n-3
114.0%	13.7±2.19	11.4	C22:5n-6
66.7%	0.4±0.10	0.6	C22:5n-3
87.7%	15.6±1.81	17.1	C22:6n-3
139.1%	3.2±1.08	2.3	other
	100	100	total

【配列表】
2016189787000001.app
【手続補正書】
【提出日】平成28年7月22日(2016.7.22)
【手続補正１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０００９
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０００９】
本発明は、以下の（１）ないし（１２）に記載のストラメノパイルの形質転換方法を要旨とするものである。
（１）ストラメノパイルの遺伝子を遺伝子工学的に破壊または／および発現抑制することを特徴とする、ストラメノパイルの形質転換方法。
（２）ストラメノパイルがラビリンチュラ類である、上記（１）に記載のストラメノパイルの形質転換方法。
（３）ラビリンチュラ類がラビリンチュラ属(Labyrinthula)、アルトルニア属(Althornia)、アプラノキトリウム属（Aplanochytrium）、イァポノキトリウム属(Japonochytrium)、ラビリンチュロイデス属（Labyrinthuloides）、シゾキトリウム属(Schizochytrium)、アウランティオキトリウム属（Aurantiochytrium）、ヤブレツボカビ属(Thraustochytrium)、ウルケニア属(Ulkenia)、オブロンギキトリウム属（Oblongichytrium）、ボトリオキトリウム属（Botryochytrium）、パリエティキトリウム属（Parietichytrium）、またはシクヨイドキトリウム属（Sicyoidochytrium）に属する微生物である、上記（２）に記載のストラメノパイルの形質転換方法。
（４）微生物がThraustochytrium aureum、Parietichytrium sarkarianum、Thraustochytrium roseum、Parietichytrium sp. または Schizochytrium sp.である、上記（３）に記載のストラメノパイルの形質転換方法。
（５）微生物がThraustochytrium aureum ATCC 34304、Parietichytrium sarkarianum SEK 364(FERM BP-11298)、Thraustochytrium roseum ATCC 28210、Parietichytrium sp. SEK358(FERM BP-11405)、Parietichytrium sp. SEK571(FERM BP-11406) またはSchizochytrium sp. TY12Ab（FERM BP-11421）である、上記（４）に記載のストラメノパイルの形質転換方法。
（６）ストラメノパイルの遺伝子が脂肪酸生合成関連遺伝子である、上記（１）ないし（５）のいずれかに記載のストラメノパイルの形質転換方法。
（７）脂肪酸生合成関連遺伝子がポリケチド合成酵素、脂肪酸鎖長伸長酵素、および／または脂肪酸不飽和化酵素に関連する遺伝子である、上記（６）に記載のストラメノパイルの形質転換方法。
（８）脂肪酸鎖長伸長酵素がC20エロンガーゼである、上記（７）に記載のストラメノパイルの形質転換方法。
（９）脂肪酸不飽和化酵素がΔ12デサチュラーゼである、上記（７）に記載のストラメノパイルの形質転換方法。
（１０）ストラメノパイルの遺伝子を遺伝子工学的に破壊する方法が、エレクトロポレーションまたは遺伝子銃法によって機能欠損型の遺伝子あるいは遺伝子をコードする領域を欠失したDNA断片を導入することを特徴とする、上記（１）ないし（９）のいずれかに記載のストラメノパイルの形質転換方法。
（１１）ストラメノパイルの遺伝子を遺伝子工学的に発現抑制する方法が、アンチセンス法あるいはRNA干渉であることを特徴とする、上記（１）ないし（１０）のいずれかに記載のストラメノパイルの形質転換方法。
（１２）さらに脂肪酸不飽和化酵素に関連する遺伝子を導入することを特徴とする、上記（１）ないし（１１）のいずれかに記載のストラメノパイルの形質転換方法。

（１３）脂肪酸不飽和化酵素に関連する遺伝子がω3デサチュラーゼである、上記（１２）に記載のストラメノパイルの形質転換方法。
【手続補正２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００１０
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００１０】
また、本発明は、以下の（１４）ないし（２６）に記載のストラメノパイルの脂肪酸組成の改変方法を要旨とするものである。
（１４）ストラメノパイルの遺伝子を遺伝子工学的に破壊または／および発現抑制することを特徴とする、ストラメノパイルの脂肪酸組成の改変方法。
（１５）ストラメノパイルがラビリンチュラ類である、上記（１４）に記載のストラメノパイルの脂肪酸組成の改変方法。
（１６）ラビリンチュラ類がラビリンチュラ属(Labyrinthula)、アルトルニア属(Althornia)、アプラノキトリウム属（Aplanochytrium）、イァポノキトリウム属(Japonochytrium)、ラビリンチュロイデス属（Labyrinthuloides）、シゾキトリウム属(Schizochytrium)、アウランティオキトリウム属（Aurantiochytrium）、ヤブレツボカビ属(Thraustochytrium)、ウルケニア属(Ulkenia)、オブロンギキトリウム属（Oblongichytrium）、ボトリオキトリウム属（Botryochytrium）、パリエティキトリウム属（Parietichytrium）、またはシクヨイドキトリウム属（Sicyoidochytrium）に属する微生物である、上記（１５）に記載のストラメノパイルの脂肪酸組成の改変方法。
（１７）微生物がThraustochytrium aureum、Parietichytrium sarkarianum、Thraustochytrium roseum、Parietichytrium sp. または Schizochytrium sp.である、上記（１６）に記載のストラメノパイルの脂肪酸組成の改変方法。
（１８）微生物がThraustochytrium aureum ATCC 34304、Parietichytrium sarkarianum SEK 364(FERM BP-11298)、Thraustochytrium roseum ATCC 28210、Parietichytrium sp. SEK358(FERM BP-11405)、Parietichytrium sp. SEK571(FERM BP-11406) またはSchizochytrium sp. TY12Ab（FERM BP-11421）である、上記（１７）に記載のストラメノパイルの脂肪酸組成の改変方法。
（１９）ストラメノパイルの遺伝子が脂肪酸生合成関連遺伝子である、上記（１４）ないし（１８）のいずれかに記載のストラメノパイルの脂肪酸組成の改変方法。
（２０）脂肪酸生合成関連遺伝子がポリケチド合成酵素、脂肪酸鎖長伸長酵素、および／または脂肪酸不飽和化酵素に関連する遺伝子である、上記（１９）に記載のストラメノパイルの脂肪酸組成の改変方法。
（２１）脂肪酸鎖長伸長酵素がC20エロンガーゼである、上記（２０）に記載のストラメノパイルの脂肪酸組成の改変方法。
（２２）脂肪酸不飽和化酵素がΔ12デサチュラーゼである、上記（２１）に記載のストラメノパイルの脂肪酸組成の改変方法。
（２３）ストラメノパイルの遺伝子を遺伝子工学的に破壊する方法が、エレクトロポレーションまたは遺伝子銃法によって機能欠損型の遺伝子あるいは遺伝子をコードする領域を欠失したDNA断片を導入することを特徴とする、上記（１４）ないし（２２）のいずれかに記載のストラメノパイルの脂肪酸組成の改変方法。
（２４）ストラメノパイルの遺伝子を遺伝子工学的に発現抑制する方法が、アンチセンス法あるいはRNA干渉であることを特徴とする、上記（１４）ないし（２３）のいずれかに記載のストラメノパイルの脂肪酸組成の改変方法。
（２５）さらに脂肪酸不飽和化酵素に関連する遺伝子を導入することを特徴とする、上記（１４）ないし（２４）のいずれかに記載のストラメノパイルの脂肪酸組成の改変方法。
（２６）脂肪酸不飽和化酵素に関連する遺伝子がω3デサチュラーゼである、上記（２５）に記載のストラメノパイルの脂肪酸組成の改変方法。

【手続補正３】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００１３
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００１３】
また、本発明は、以下の（３１）ないし（４３）に記載の形質転換されたストラメノパイルを要旨とするものである。
（３１）脂肪酸組成の改変を目的としてその遺伝子を遺伝子工学的に破壊または／および発現抑制することにより形質転換されたストラメノパイル。
（３２）ラビリンチュラ類である、上記（３１）に記載のストラメノパイル。
（３３）ラビリンチュラ類がラビリンチュラ属(Labyrinthula)、アルトルニア属(Althornia)、アプラノキトリウム属（Aplanochytrium）、イァポノキトリウム属(Japonochytrium)、ラビリンチュロイデス属（Labyrinthuloides）、シゾキトリウム属(Schizochytrium)、アウランティオキトリウム属（Aurantiochytrium）、ヤブレツボカビ属(Thraustochytrium)、ウルケニア属(Ulkenia)、オブロンギキトリウム属（Oblongichytrium）、ボトリオキトリウム属（Botryochytrium）、パリエティキトリウム属（Parietichytrium）、またはシクヨイドキトリウム属（Sicyoidochytrium）に属する微生物である、上記（３２）に記載のストラメノパイル。
（３４）微生物がThraustochytrium aureum、Parietichytrium sarkarianum、Thraustochytrium roseum、Parietichytrium sp. または Schizochytrium sp.である、上記（３３）に記載のストラメノパイル。
（３５）微生物がThraustochytrium aureum ATCC 34304、Parietichytrium sarkarianum SEK 364(FERM BP-11298)、Thraustochytrium roseum ATCC 28210、Parietichytrium sp. SEK358(FERM BP-11405)、Parietichytrium sp. SEK571(FERM BP-11406) またはSchizochytrium sp. TY12Ab（FERM BP-11421）である、上記（３４）に記載のストラメノパイル。
（３６）ストラメノパイルの遺伝子が脂肪酸生合成関連遺伝子である、上記（３１）ないし（３５）のいずれかに記載のストラメノパイル。
（３７）脂肪酸生合成関連遺伝子がポリケチド合成酵素、脂肪酸鎖長伸長酵素、および／または脂肪酸不飽和化酵素に関連する遺伝子である、（３６）に記載のストラメノパイル。
（３８）脂肪酸鎖長伸長酵素がC20エロンガーゼである、上記（３６）に記載のストラメノパイル。
（３９）脂肪酸不飽和化酵素がΔ12デサチュラーゼである、上記（３７）に記載のストラメノパイル。
（４０）ストラメノパイルの遺伝子を遺伝子工学的に破壊する方法が、エレクトロポレーションまたは遺伝子銃法によって機能欠損型の遺伝子あるいは遺伝子をコードする領域を欠失したDNA断片を導入することを特徴とする、上記（３１）ないし（３９）のいずれかに記載のストラメノパイル。
（４１）ストラメノパイルの遺伝子を遺伝子工学的に発現抑制する方法が、アンチセンス法あるいはRNA干渉であることを特徴とする、上記（３１）ないし（４０）のいずれかに記載のストラメノパイル。
（４２）さらに脂肪酸不飽和化酵素に関連する遺伝子を導入することを特徴とする、上記（３１）ないし（４１）のいずれかに記載のストラメノパイル。
（４３）脂肪酸不飽和化酵素に関連する遺伝子がω3デサチュラーゼである、上記（４２）に記載のストラメノパイル。
【手続補正４】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００３１

【補正方法】変更
【補正の内容】
【００３１】
本発明で用いるラビリンチュラ類としては、ヤブレツボカビ属(Thraustochytrium)、およびパリエティキトリウム属（Parietichytrium）に属する微生物が好ましく、その中でも特に好ましくは、Thraustochytrium aureum、Parietichytrium sarkarianum、Thraustochytrium roseumが挙げられ、具体的にはThraustochytrium aureum ATCC 34304、Parietichytrium sarkarianum SEK 364(FERM ＢＰ-11298)、Thraustochytrium roseum ATCC 28210、Parietichytrium sp. SEK358（FERM BP-11405）、またはParietichytrium sp. SEK571（FERM BP-11406）の菌株が挙げられる。Thraustochytrium aureum ATCC 34304及びThraustochytrium roseum ATCC 28210はATCCに寄託されており、一般に分譲されている。Parietichytrium sarkarianum SEK364株は、石垣島・吹通川の河口域で採取した表層水 10 mLを試験管に入れ、松花粉を添加して室温で放置した。７日後に松花粉を無菌寒天培地（2 gグルコース，１ｇ ペプトン，0.5 ｇ 酵母エキス，0.2 ｇ クロラムフェニコール，15 ｇ 寒天，蒸留水 100 mL，海水900mL）に塗布し、５日後に出現したコロニーを分離し培養することを数回繰り返し、菌体を分離した。この株は独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（茨城県つくば市東1-1-1中央第6）に受託番号（FERM BP-11298）として平成22年9月24日に国際寄託されており、そこから入手可能である。Parietichytrium sp. SEK358株は、石垣島・宮良川河口域から採取した海水サンプルを、上記同様に培養し菌体を分離した。この株は独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（茨城県つくば市東1-1-1中央第6）に受託番号（FERM BP-11405）として平成23年8月11日に国際寄託されており、そこから入手可能である。Parietichytrium sp. SEK571株は、西表島・後良川河口域から採取した海水サンプルを、上記同様に培養し菌体を分離した。この株は独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（茨城県つくば市東1-1-1中央第6）に受託番号（FERM BP-11406）として平成23年8月11日に国際寄託されており、そこから入手可能である。Schizochytrium sp. TY12Ab株は、種子島の沿岸で採取された枯れ葉から、上記同様に培養し菌体を分離した。この株は独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（茨城県つくば市東1-1-1中央第6）に受託番号（FERM BP-11421）として平成23年9月29日に国際寄託されており、そこから入手可能である。
【手続補正５】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００５２
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００５２】
［ラビリンチュラ類とその培養法・保存法］
（１）本発明で使用する菌株
Thraustochytrium aureum ATCC 34304及びThraustochytrium roseum ATCC 28210は、ATCCより分譲を受けた。また、Parietichytrium sarkarianum SEK364（FERM BP-11298）、Parietichytrium sp. SEK358（FERM BP-11405）及びParietichytrium sp. SEK571（FERM BP-11406） は甲南大学理工学部より分譲を受けた。Schizochytrium sp. TY12Ab（FERM BP-11421）は宮崎大学農学部より分譲を受けた。
【手続補正６】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０１７０
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０１７０】
［実施例１４－５］C20エロンガーゼ遺伝子ジーンターゲティング相同組換体の同定
Schizochytrium sp. TY12Ab株（FERM BP-11421）、C20エロンガーゼ遺伝子ヘテロ相同組

換体、およびC20エロンガーゼ遺伝子ホモ相同組換体（遺伝子破壊株）についてGY培地で培養後、得られた細胞を4℃、3,000rpm、10 min遠心してペレットにし、20 μlのSNET溶液[20 mM Tris-HCl; pH 8.0, 5 mM NaCl, 0.3 % SDS, 200 μg/ml Proteinase K (ナカライテスク社製)] にけん濁後、55℃, 6 h/ 99.9℃, 5 minで細胞を溶解した。得られた細胞溶解液を10倍希釈したものを鋳型とし、Mighty Amp DNA polymerase (タカラバイオ社製)を用いてゲノム構造確認のPCRを行った。用いたprimerの位置、増幅産物の予想サイズを図９８に示す。プライマーは実施例１４－４で用いたSorfF、及びSorfRの組み合わせで行った。[PCR cycles: 98℃ 2min/ 98℃ 10 sec, 60℃ 15 sec, 68℃ 4 min, 30 cycles]。

野生型アリル (Wt allele) に増幅がなく、人工合成ネオマイシン耐性遺伝子アリル (NeoR allele) およびハイグロマイシン耐性遺伝子アリル (HygR allele) に増幅のあるC20エロンガーゼ ノックアウト株が得られた （図９９）。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード（参考）
Ａ２３Ｋ	***20/158***	***(2016.01)***	Ａ２３Ｋ	20/158		４Ｃ２０６
Ａ６１Ｋ	***31/202***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	31/202		
Ａ６１Ｋ	*35/74*	*(2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/74	Ｄ	

(74)代理人 100123984
弁理士 須藤 晃伸
(72)発明者 坂口 圭史
福岡県福岡市東区箱崎六丁目１０番１号 九州大学内
(72)発明者 濱口 理恵
福岡県福岡市東区箱崎六丁目１０番１号 九州大学内
(72)発明者 松田 高宜
福岡県福岡市東区箱崎六丁目１０番１号 九州大学内
(72)発明者 伊東 信
福岡県福岡市東区箱崎六丁目１０番１号 九州大学内
(72)発明者 長野 直樹
宮崎県宮崎市学園木花台西１丁目１番地 国立大学法人宮崎大学内
(72)発明者 林 雅弘
宮崎県宮崎市学園木花台西１丁目１番地 国立大学法人宮崎大学内
(72)発明者 本多 大輔
兵庫県神戸市東灘区岡本八丁目９番１号 甲南大学内
(72)発明者 沖田 裕司
東京都千代田区大手町２－６－２ 日本水産株式会社 バイオ生産研究所内
(72)発明者 杉本 愼一
東京都千代田区大手町２－６－２ 日本水産株式会社 バイオ生産研究所内

Ｆターム(参考) 2B150 DA57 DD12 DD21
4B018 MD10 MD11 MD12 MD80 MF13
4B064 AD88 CA05 CA19 CC24 DA01 DA10 DA16
4B065 AA57X AA57Y AA72X AB01 BA02 CA41 CA44 CA60
4C087 AA01 BC30 CA10 NA14
4C206 AA01 DA05 MA01 MA04 NA14