

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5657406号
(P5657406)

(45) 発行日 平成27年1月21日(2015.1.21)

(24) 登録日 平成26年12月5日(2014.12.5)

(51) Int. Cl.	F 1	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 1 2 N 9/00 (2006.01)	C 1 2 N 9/00	
C 1 2 P 7/40 (2006.01)	C 1 2 P 7/40	
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	

請求項の数 3 外国語出願 (全 76 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2011-14983 (P2011-14983)	(73) 特許権者	391008788
(22) 出願日	平成23年1月27日(2011.1.27)		アボット・ラボラトリーズ
(62) 分割の表示	特願2000-567706 (P2000-567706) の分割		ABBOTT LABORATORIES
原出願日	平成11年8月30日(1999.8.30)		アメリカ合衆国 イリノイ州 アボット
(65) 公開番号	特開2011-139703 (P2011-139703A)		パーク アボット パーク ロード 100
(43) 公開日	平成23年7月21日(2011.7.21)	(74) 代理人	110001173
審査請求日	平成23年2月25日(2011.2.25)		特許業務法人川口国際特許事務所
(31) 優先権主張番号	09/145,828	(72) 発明者	ブラディブ・ムケルジ
(32) 優先日	平成10年9月2日(1998.9.2)		アメリカ合衆国、オハイオ・43230、
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	アマンド・ユン・ヨン・レオナルド
前置審査			アメリカ合衆国、オハイオ・43230、
			ガハナ、シエイドウッド・コート・581

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 エロンガーゼ遺伝子及びそれらの使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

a) 配列番号 3 (図 4 3) と 100% の配列同一性を有するヌクレオチド配列を有する核酸を単離する工程、

b) 前記単離された核酸を含むベクターを構築する工程、

c) 前記単離された核酸によってコードされたエロンガーゼ酵素の発現に十分な時間および条件の下で、前記ベクターを宿主細胞に導入する工程、ならびに

d) 基質ポリ不飽和脂肪酸を生成物ポリ不飽和脂肪酸に変換するために、前記基質に前記発現されたエロンガーゼ酵素を曝露する工程を含む、ポリ不飽和脂肪酸の製造方法。

【請求項 2】

前記の生成物ポリ不飽和脂肪酸を別のポリ不飽和脂肪酸に変換するために、前記の生成物ポリ不飽和脂肪酸を少なくとも一つのデサチュラーゼに曝露する工程をさらに含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記別のポリ不飽和脂肪酸を最終ポリ不飽和脂肪酸に変換するために、前記別のポリ不飽和脂肪酸を、少なくとも一つのエロンガーゼと少なくとも一つの付加的なデサチュラーゼからなる群から選択された一つまたは複数の酵素に曝露する工程をさらに含むことを特徴とする請求項 2 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、長鎖ポリ不飽和脂肪酸の伸長に関するいくつかの遺伝子（即ち「エロンガーゼ（*elongase*）」）の同定及びそれらの使用に関する。特に、エロンガーゼ酵素は、脂肪酸の他の脂肪酸への変換において利用される。例えば、エロンガーゼは、ガンマリノレン酸（GLA）のジホモ- γ -リノレン酸（DGLA、 $20:3n-6$ ）への変換及びステアリドン酸（*stearidonic acid*）（STA、 $18:4n-3$ ）の（ $n-3$ ）-エイコサテトラエン酸（ $20:4n-3$ ）への変換を触媒する。エロンガーゼは、アラキドン酸（AA、 $20:4n-6$ ）のアドレン酸（ADA、 $22:4n-6$ ）への変換、エイコサペンタエン酸（EPA、 $20:5n-3$ ）の3-ドコサペンタエン酸（ $22:5n-3$ ）への変換及び α -リノレン酸（ALA、 $18:3n-3$ ）の $20:3n-3$ への変換も触媒する。例えば、DGLAは、薬学的組成物、栄養組成物、動物飼料及び化粧品のようなその他の製品へ添加されうる、アラキドン酸（AA）のようなその他のポリ不飽和脂肪酸（PUFA）の製造において利用されうる。

10

【背景技術】

【0002】

（背景情報）

過去に同定されたエロンガーゼは、それらが作用する基質に関して異なっている。さらに、それらは、動物及び植物の両方に存在する。哺乳動物において見出されるものは、飽和脂肪酸、モノ不飽和脂肪酸及びポリ不飽和脂肪酸に作用する能力を有する。対照的に、植物において見出されるものは、飽和脂肪酸又はモノ不飽和脂肪酸に特異的である。従って、植物においてポリ不飽和脂肪酸を生成させるためには、PUFA特異的なエロンガーゼが必要である。

20

【0003】

植物においても動物においても、伸長過程は、4段階のメカニズムの結果であると考えられている（Lassnerら、*The Plant Cell* 8:281-292（1996））。CoAが、アシル・キャリアーである。第1段階は、マロニル-CoAと長鎖アシル-CoAとの縮合を含み、それにより二酸化酸素と、アシル部分の2炭素原子が伸長された β -ケトアシル-CoAとが生じる。続く反応には、 β -ヒドロキシアシル-CoAへの還元、エノイル-CoAへの脱水及び第二の還元が含まれ、それにより伸長されたアシル-CoAが生じる。最初の縮合反応は、基質特異的な段階であるのみならず、律速段階でもある。

30

【0004】

前述のように、エロンガーゼ、より具体的に、PUFAを基質として利用するエロンガーゼは、多くの重要な機能を有する長鎖ポリ不飽和脂肪酸の生成において重要である。例えば、PUFAは、細胞膜の重要な成分であり、細胞膜にリン脂質の形態で見出される。PUFAは、哺乳動物のプロスタサイクリン、エイコサノイド、ロイコトリエン及びプロスタグランジンの前駆体としてもはたらく。さらに、PUFAは、発達中の幼児の脳の適切な発達、並びに組織の形成及び修復に必要である。PUFAの生物学的重要性を考慮して、それら及びそれらの生成に至る中間体を効率的に製造すべく、努力がなされている。

40

【0005】

エロンガーゼ（*elo*）（図1参照）を含む多数の酵素が、PUFAの生合成に関与している。例えば、リノレン酸（LA、 $18:2-9, 12$ 又は $18:2n-6$ ）は、12デサチュラーゼにより、オレイン酸（OA、 $18:1-9$ 又は $18:1n-9$ ）から生成される。GLA（ $18:3-6, 9, 12$ ）は、 Δ^6 -デサチュラーゼにより、リノレン酸から生成される。AA（ $20:4-5, 8, 11, 14$ ）は、 Δ^5 -デサチュラーゼにより、ジホモ- γ -リノレン酸（DGLA、 $20:3-8, 11, 14$ ）から生成される。前述のように、DGLAは、エロンガーゼにより、GLAから生成される。

【0006】

動物は、9位より先を不飽和化することができず、従ってオレイン酸をリノレン酸に

50

変換することができないことに注意しなければならない。同様に、動物は、 Δ^5 -デサチュラーゼ活性を欠いているため、 Δ^6 -リノレン酸 (ALA、18:3-9, 12, 15 又は 18:3n-3) を合成することができない。しかし、 Δ^6 -リノレン酸は、哺乳動物及び藻類においては、 Δ^6 -デサチュラーゼ (PCT 公開第 96/13591 号参照: 米国特許第 5,552,306 号も参照のこと) により、ステアリドン酸 (STA、18:4-6, 9, 12, 15) へ変換され、続いて (n-3)-エイコサテトラエン酸 (20:4-8, 11, 14, 17 又は 20:4n-3) へ伸長されうる。このポリ不飽和脂肪酸 (即ち、20:4-8, 11, 14, 17) は、次いで、 Δ^5 -デサチュラーゼにより、エイコサペンタエン酸 (EPA、20:5-5, 8, 11, 14, 17) へと変換されうる。真菌及び植物を含むその他の真核生物は、12 位 (PCT 公開第 94/11516 号及び米国特許第 5,443,974 号を参照のこと) 及び 15 位 (PCT 公開第 93/11245 号参照) の炭素を不飽和化する酵素を有する。従って、動物の主要なポリ不飽和脂肪酸は、食事、並びにノ又はリノール酸もしくは Δ^6 -リノレン酸の不飽和化及び伸長に由来する。哺乳動物が、これらの必須長鎖脂肪酸を生成させることができないことを考慮すると、これらの脂肪酸を天然に生成させる種から、PUFA 生合成に關与している遺伝子を単離し、商業的な品質の一つ又は複数の PUFA の製造を提供するように改変されうる、微生物、植物又は動物の系において、これらの遺伝子を発現させることは非常に重要である。従って、エロンガーゼ酵素、その酵素をコードする遺伝子及びこの酵素を製造する組み換え法が、明らかに必要とされている。さらに、天然に存在する油よりも高いレベルの PUFA を含有する油、及び新規な PUFA が濃縮された油が必要とされている。そのような油は、エロンガーゼ遺伝子の単離及び発現によってのみ作製されうる。

10

20

【0007】

最も重要な長鎖 PUFA の一つは、前述のように、アラキドン酸 (AA) である。AA は、繊維状真菌に見出され、肝臓及び副腎を含む哺乳動物の組織からも精製されうる。前述のように、AA の DGLA からの生成は、 Δ^5 -デサチュラーゼにより触媒され、DGLA の Δ^6 -リノレン酸 (GLA) からの生成は、エロンガーゼにより触媒される。しかし、本発明以前には、長鎖 PUFA、特に、AA、エイコサペンタエン酸 (EPA)、アドレン酸、ドコサヘキサエン酸 (DHA、22:6n-3)、 Δ^3 -ドコサペンタエン酸 (22:5n-3) 又は Δ^6 -ドコサペンタエン酸 (22:5n-6) の生成のための経路において、基質脂肪酸に対する活性を有するエロンガーゼは、同定されていなかった。

30

【0008】

2つの遺伝子が、エロンガーゼ遺伝子に関する本研究において重要であると考えられた。特に、ホホバ Δ^6 -ケトアシル-補酵素 A シンターゼ (KCS) 又はホホバ KCS (ジェンバンク (GenBank) 登録番号 U37088) は、脂肪酸アシル-CoA 伸長経路の最初の反応 (即ち、マロニル-CoA と長鎖アシル-CoA との縮合 (Lassner ら, The Plant Cell 8:281-292 (1996))) を触媒する。ホホバ KCS の基質選択性は、18:0、20:0、20:1、18:1、22:1、22:0 及び 16:0 である。サッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) エロンガーゼ (ELO2) も、長鎖の飽和脂肪酸及びモノ不飽和脂肪酸の変換を触媒し、高レベルの 22:0、24:0 を生成させ、18:0、18:1、20:0、20:1、22:0、22:1 及び 24:1 も生成させる (Ohra, The Journal of Biological Chemistry 272(28):17376-17384 (1997)); ELO2 の配列を含むヌクレオチド配列に關しては、米国特許第 5,484,724 号の参照のこと; 実施例 V に記載されているグリコシル化阻害因子の配列の考察に關しては、PCT 公開第 88/07577 号を参照のこと)。これらの2つの遺伝子間の相同性の考慮に基づき、PUFA-エロンガーゼ活性に關する発現スクリーニングにより、モルチエレラ・アルピナ (Mortierella alpina) における長鎖 PUFA 特異的エロンガーゼの研究を開始した。

40

【先行技術文献】

50

【特許文献】

【0009】

【特許文献1】国際公開第96/13591号

【特許文献2】米国特許第5,552,306号明細書

【特許文献3】国際公開第94/11516号

【特許文献4】米国特許第5,443,974号明細書

【特許文献5】国際公開第93/11245号

【特許文献6】米国特許第5,484,724号明細書

【特許文献7】国際公開第88/07577号

【非特許文献】

10

【0010】

【非特許文献1】Lassner R, The Plant Cell 8:281-292 (1996)

【非特許文献2】Ohra, The Journal of Biological Chemistry 272(28):17376-17384 (1997)

【発明の概要】

【0011】

本発明は、配列番号1(図6)に示されたヌクレオチド配列の少なくとも約50%と一致するか、又は相補的である、単離されたヌクレオチド配列に関する。この単離された配列は、配列番号1により表されうる。その配列は、ポリ不飽和脂肪酸又はモノ不飽和脂肪酸を基質として利用する、機能的活性を有するエロンガーゼをコードする。特に、その配列は、モルチエレラ属の真菌に由来するものであってよく、特に、モルチエレラ・アルピナから単離されうる。

20

【0012】

本発明は、前記ヌクレオチド配列によりコードされる精製されたタンパク質も含み、さらに、ポリ不飽和脂肪酸又はモノ不飽和脂肪酸を伸長し、かつ前記ヌクレオチド配列によりコードされる精製されたタンパク質のアミノ酸配列と少なくとも約50%のアミノ酸類似性を有する、精製されたポリペプチドも含む。

【0013】

さらに、本発明は、a)配列番号1(図6)により表されたヌクレオチド配列を単離する工程、b)i)プロモーター、およびii)該プロモーターと機能的に連結された単離されたヌクレオチド配列を含むベクターを構築する工程、並びにc)エロンガーゼ酵素の発現にとって十分な時間及び条件で、宿主細胞へベクターを導入する工程を含む、エロンガーゼ酵素を製造する方法を包含する。宿主細胞は、真核細胞であっても、又は原核細胞であってもよい。

30

【0014】

原核細胞は、例えば、大腸菌(*E. coli*)細胞、シアノバクテリア細胞又は枯草菌(*B. subtilis*)細胞でありうる。真核細胞は、例えば、真核細胞の適当な例には、哺乳動物細胞、昆虫細胞、植物細胞及び真菌細胞でありうる。真菌細胞は、例えば哺乳動物細胞、昆虫細胞、植物細胞又は真菌細胞でありうる。真菌細胞は、例えば、サッカロミセス種(*Saccharomyces* spp.)、カンジダ種(*Candida* spp.)、リポミセス種(*Lipomyces* spp.)、ヤロウイア種(*Yarrowia* spp.)、クルイベロミセス種(*Kluyveromyces* spp.)、ハンセヌラ種(*Hansenula* spp.)、アスペルギルス種(*Aspergillus* spp.)、ペニシリウム種(*Penicillium* spp.)、ノイロスポラ種(*Neurospora* spp.)、トリコデルマ種(*Trichoderma* spp.)又はピキア種(*Pichia* spp.)でありうる。特に、真菌細胞は、サッカロミセス種、特にサッカロミセス・セレビシエ、カンジダ種、ハンセヌラ種、又はピキア種のような酵母細胞でありうる。

40

【0015】

50

本発明は、a) プロモーター、およびb) 該プロモーターと機能的に連結された配列番号1 (図6) により表されるヌクレオチド配列を含むベクターも含み、さらに、このベクターを含む宿主細胞も含む。宿主は、真核細胞であっても、又は原核細胞であってもよい。原核細胞の適当な例には、大腸菌細胞、シアノバクテリア細胞、又は枯草菌細胞が含まれる。真核細胞の適当な例には、哺乳動物細胞、昆虫細胞、植物細胞及び真菌細胞が含まれる。真菌細胞は、例えば、サッカロミセス種、カンジダ種、リボミセス種、ヤロウイア種、クルイペロミセス種、ハンセヌラ種、アスペルギルス種、ペニシリウム種、ニューロスポラ種、トリコデルマ種及びピキア種でありうる。特に、真菌細胞は、例えば、例えばサッカロミセス種、特にサッカロミセス・セレピシエ、カンジダ種、ハンセヌラ種及びピキア種のような酵母細胞でありうる。

10

【0016】

本発明は、ベクターのヌクレオチド配列の発現により、植物細胞、植物又は植物組織によるモノ不飽和脂肪酸及びポリ不飽和脂肪酸からなる群より選択される少なくとも一つの脂肪酸の生成が引き起こされる、前記ベクターを含む植物細胞、植物又は植物組織を含む。ポリ不飽和脂肪酸は、例えば、ジホモ- γ -リノレン酸(DGLA)、 $20:4n-3$ 及びアドレン酸(ADA)でありうる。本発明は、植物細胞、植物又は植物組織により発現された一つ又は複数の植物油又は脂肪酸も含む。さらに、本発明は、ベクターのヌクレオチド配列の発現により、トランスジェニック植物の種子におけるポリ不飽和脂肪酸の生成が引き起こされる、前記ベクターを含むトランスジェニック植物を包含する。

【0017】

20

さらに、本発明は、プロモーターと機能的に連結されたエロンガーゼをコードするDNA配列を含むゲノムを有する、ヒト以外のトランスジェニック哺乳動物を含む。DNA配列は、配列番号1 (図6) により表されうる。本発明は、少なくとも一つのエロンガーゼ、又は例えばDGLA、 6 -ドコサペンタエン酸、ADA及び/もしくは $20:4n-3$ (図1参照) のようなそれらの生成物を検出可能なレベルで含む、ヒト以外のトランスジェニック動物により産生された体液 (例えば、乳汁) も含む。

【0018】

さらに、本発明は、a) 配列番号1 (図6) により表されるヌクレオチド配列を単離する工程、b) 単離されたヌクレオチド配列を含むベクターを構築する工程、c) 単離されたヌクレオチド配列によりコードされるエロンガーゼ酵素の発現にとって十分な時間及び条件で、宿主細胞へベクターを導入する工程、並びにd) 基質を「生成物」ポリ不飽和脂肪酸へ変換するため、発現されたエロンガーゼ酵素を「基質」ポリ不飽和脂肪酸へ曝露する工程を含む、ポリ不飽和脂肪酸を製造するための方法を含む。基質ポリ不飽和脂肪酸は、例えば、 γ -リノレン酸(GLA)、ステアリドン酸(STA)及びアラキドン酸(AA)からなる群より選択され、生成物ポリ不飽和脂肪酸は、例えば、それぞれDGLA、 $20:4n-3$ 及びADAからなる群より選択されうる。本発明は、生成物ポリ不飽和脂肪酸を「第二生成物」ポリ不飽和脂肪酸へ変換するため、生成物ポリ不飽和脂肪酸を、少なくとも一つのデサチュラーゼへ曝露する工程をさらに含む。生成物ポリ不飽和脂肪酸は、例えばDGLA、 $20:4n-3$ 及びADAからなる群より選択されうる。第二生成物ポリ不飽和脂肪酸は、例えば、それぞれAA、エイコサペンタエン酸(EPA)、 6 -ドコサペンタエン酸からなる群より選択され、少なくとも一つのデサチュラーゼは、AA又はEPAの製造に関しては 5 -デサチュラーゼであり、 6 -ドコサペンタエン酸の製造に関しては 4 -デサチュラーゼである。この方法は、第二生成物ポリ不飽和脂肪酸を「最終」ポリ不飽和脂肪酸へ変換するため、少なくとも一つのエロンガーゼ及び少なくとも一つの付加的なデサチュラーゼからなる群より選択される一つ又は複数の酵素へ、第二生成物ポリ不飽和脂肪酸を曝露する工程をさらに含む。最終ポリ不飽和脂肪酸は、例えば、ドコサヘキサエン酸(DHA)、AA、 6 -ドコサペンタエン酸又は 3 -ドコサペンタエン酸でありうる。

30

40

【0019】

又、本発明は、前記方法に従い製造された生成物ポリ不飽和脂肪酸、前記方法に従い製

50

造された第二生成物ポリ不飽和脂肪酸及び前記方法に従い製造された最終ポリ不飽和脂肪酸からなる群より選択される、少なくとも一つのポリ不飽和脂肪酸を含む栄養組成物を含む。生成物ポリ不飽和脂肪酸は、例えばDGLA、 $20:4n-3$ 及びADAからなる群より選択されうる。第二生成物ポリ不飽和脂肪酸は、例えば、AA、EPA又は6-ドコサペンタエン酸でありうる。最終ポリ不飽和脂肪酸は、例えば、DHA、アドレン酸、

6-ドコサペンタエン酸又は3-ドコサペンタエン酸でありうる。栄養組成物は、例えば、幼児用調合物、栄養補助食品又は食品代用物であってよく、ヒト又は動物へ投与されることができ、経口的又は非経口的に投与されうる。栄養組成物は、ココヤシ油、ダイズ油、カノーラ油、モノグリセリド、ジグリセリド、トリグリセリド、グルコース、食用ラクトース、電気透析されたホエー、電気透析されたスキムミルク、乳清、ダイズ・タンパク質、タンパク質加水分解物、ヒマワリ油、ベニバナ油、コーン油及びアマ油からなる群より選択される、少なくとも一つの多量養素をさらに含みうる。栄養組成物は、ビタミンA、ビタミンC、ビタミンD、ビタミンE及びビタミンB複合体からなる群より選択される少なくとも一つのビタミン、並びにカルシウム、マグネシウム、亜鉛、マンガン、ナトリウム、カリウム、リン、銅、塩素、ヨウ素、セレン及び鉄からなる群より選択される少なくとも一つの無機物も含みうる。

【0020】

さらに、本発明は、1)前記方法に従い製造された生成物ポリ不飽和脂肪酸、請求項32の前記方法に従い製造された第二生成物ポリ不飽和脂肪酸及び前記方法に従い製造された最終ポリ不飽和脂肪酸からなる群より選択される、少なくとも一つのポリ不飽和脂肪酸と、2)薬学的に許容される担体とを含む薬学的組成物を包含する。この組成物は、ヒト又は動物へ投与されうる。この組成物は、ビタミン、無機物、塩、炭水化物、アミノ酸、遊離脂肪酸、保存料、賦形剤、抗ヒスタミン、増殖因子、抗生物質、希釈剤、リン脂質、抗酸化剤及びフェノール化合物からなる群より選択される少なくとも一つの要素をさらに含みうる。この組成物は、経口、非経口、局所、直腸内、筋肉内、皮下、皮内、又はその他の任意の適当な手段により、投与されうる。

【0021】

本発明は、前記方法に従い製造された生成物ポリ不飽和脂肪酸、前記方法に従い製造された第二生成物ポリ不飽和脂肪酸及び前記方法に従い製造された最終ポリ不飽和脂肪酸からなる群より選択される、少なくとも一つのポリ不飽和脂肪酸を含む動物飼料も含む。生成物ポリ不飽和脂肪酸は、例えばDGLA、 $20:4n-3$ 及びADAでありうる。第二生成物ポリ不飽和脂肪酸は、例えば、AA、EPA又は6-ドコサペンタエン酸でありうる。最終ポリ不飽和脂肪酸は、例えば、DHA、アドレン酸、6-ドコサペンタエン酸又は3-ドコサペンタエン酸でありうる。

【0022】

さらに、本発明は、前記方法に従い製造された生成物ポリ不飽和脂肪酸、前記方法に従い製造された第二生成物ポリ不飽和脂肪酸及び前記方法に従い製造された最終ポリ不飽和脂肪酸からなる群より選択される、少なくとも一つのポリ不飽和脂肪酸を含む化粧品も含む。

【0023】

さらに、本発明は、予防又は治療を行うために十分な量で前記栄養組成物を患者に投与することを含む、ポリ不飽和脂肪酸の不十分な摂取又は生成により引き起こされる状態を予防又は治療する方法を含む。

【0024】

本発明は、配列番号2(図22)に示されたヌクレオチド配列の少なくとも約35%と一致するか、又は相補的である、単離されたヌクレオチド配列も含む。この配列は、配列番号2により表されうる。その配列は、ポリ不飽和脂肪酸を基質として利用する、機能的活性を有するエロンガーゼをコードする。この配列は、例えば、モルチエレラ属の真菌に由来するものであってよい。特に、それは、M.アルピナに由来するものであってよい。

【0025】

さらに、本発明は、前記ヌクレオチド配列によりコードされる精製されたタンパク質を含み、さらに、ポリ不飽和脂肪酸を伸長し、かつ精製されたタンパク質のアミノ酸配列と少なくとも約30%のアミノ酸類似性を有する、精製されたポリペプチドを含む。

【0026】

本発明は、前記のようなエロンガーゼ酵素を製造する方法も含む。ベクターへ挿入される配列は、配列番号2(図22)により表される。宿主細胞は、原核細胞であっても、又は真核細胞であってもよい。適当な例は、前記と同様である。

【0027】

本発明は、a)プロモーター、およびb)該プロモーターと機能的に連結された配列番号2(図22)により表されるヌクレオチド配列を含むベクターも含み、さらに、このベクターを含む宿主細胞も含む。この場合にも、宿主細胞は、原核細胞であっても、又は真核細胞であってもよい。適当な例は、前記と同様である。

10

【0028】

本発明は、ベクターのヌクレオチド配列の発現により、植物細胞、植物又は植物組織によるポリ不飽和脂肪酸の生成が引き起こされる、前記ベクターを含む植物細胞、植物又は植物組織も含む。ポリ不飽和脂肪酸は、例えば、DGLA、20:4n-3又はADAでありうる。さらに、本発明は、植物細胞、植物又は植物組織により発現された一つ又は複数の植物油又は脂肪酸を含む。

【0029】

さらに、本発明は、ベクターのヌクレオチド配列(配列番号2)の発現により、トランスジェニック植物の種子におけるポリ不飽和脂肪酸の生成が引き起こされる、前記ベクターを含むトランスジェニック植物も含む。

20

【0030】

本発明は、プロモーターと機能的に連結されたエロンガーゼをコードするDNA配列(配列番号2)を含むゲノムを有する、ヒト以外のトランスジェニック哺乳動物も含む。本発明は、少なくとも一つのエロンガーゼ又はそれらの生成物を検出可能なレベルで含む、ヒト以外のトランスジェニック動物により産生された体液も含む。

【0031】

本発明は、a)配列番号2(図22)により表されるヌクレオチド配列を単離する工程、b)単離されたヌクレオチド配列を含むベクターを構築する工程、c)単離されたヌクレオチド配列によりコードされるエロンガーゼ酵素の発現にとって十分な時間及び条件で、宿主細胞へベクターを導入する工程、並びにd)基質を生成物ポリ不飽和脂肪酸へ変換するため、発現されたエロンガーゼ酵素を基質ポリ不飽和脂肪酸へ曝露する工程を含む、ポリ不飽和脂肪酸を製造するための方法も含む。基質ポリ不飽和脂肪酸は、例えば、GLA、STA及びAAであり、生成物ポリ不飽和脂肪酸は、例えば、それぞれDGLA、20:4n-3又は6-ドコサペンタエン酸でありうる。本発明は、生成物ポリ不飽和脂肪酸を第二生成物ポリ不飽和脂肪酸へ変換するため、発現されたエロンガーゼ酵素を、少なくとも一つの前駆体へ曝露する工程をさらに含む。生成物ポリ不飽和脂肪酸は、例えばDGLA、20:4n-3又はADAであり、第二生成物ポリ不飽和脂肪酸は、例えば、それぞれAA、EPA又は6-ドコサペンタエン酸であり、少なくとも一つの前駆体は、AA又はEPAの製造に関しては5-デサチラーゼであり、6-ドコサペンタエン酸の製造に関しては4-デサチラーゼである。この方法は、第二生成物ポリ不飽和脂肪酸を最終ポリ不飽和脂肪酸へ変換するため、少なくとも一つのエロンガーゼ及び少なくとも一つの前駆体からなる群より選択される一つ又は複数の酵素へ、第二生成物ポリ不飽和脂肪酸を曝露する工程をさらに含む。最終ポリ不飽和脂肪酸は、例えば、ドコサヘキサエン酸、AA、6-ドコサペンタエン酸又は3-ドコサペンタエン酸でありうる。

30

40

【0032】

本発明は、配列番号2に関して記載された方法に従い製造された生成物ポリ不飽和脂肪酸、配列番号2に関して記載された方法に従い製造された第二生成物ポリ不飽和脂肪酸及

50

び配列番号2に関して記載された方法に従い製造された最終ポリ不飽和脂肪酸からなる群より選択される、少なくとも一つのポリ不飽和脂肪酸を含む栄養組成物を含む。生成物ポリ不飽和脂肪酸は、例えば、DGLA、 $20:4n-3$ 及びADAからなる群より選択されうる。第二生成物ポリ不飽和脂肪酸は、例えば、AA、EPA及び6-ドコサペンタエン酸からなる群より選択されうる。最終ポリ不飽和脂肪酸は、例えば、DHA、AA、6-ドコサペンタエン酸及び3-ドコサペンタエン酸からなる群より選択されうる。投与、特徴、成分等に関する組成物のその他の属性は、前記と同様である。

【0033】

本発明は、1)配列番号2に関する前述の方法に従い製造された生成物ポリ不飽和脂肪酸、配列番号2に関する前記の方法に従い製造された第二生成物ポリ不飽和脂肪酸及び配列番号2に関する前記の方法に従い製造された最終ポリ不飽和脂肪酸からなる群より選択される、少なくとも一つのポリ不飽和脂肪酸と、2)薬学的に許容される担体とを含む薬学的組成物も含む。前記の薬学的組成物の特徴(例えば、投与、成分等)が、この組成物にも適合する。

10

【0034】

本発明は、配列番号2に関して記載された方法に従い製造された生成物ポリ不飽和脂肪酸、配列番号2に関する前記の方法に従い製造された第二生成物ポリ不飽和脂肪酸及び配列番号2に関して記載された方法に従い製造された最終ポリ不飽和脂肪酸からなる群より選択される、少なくとも一つのポリ不飽和脂肪酸を含む動物飼料も含む。生成物ポリ不飽和脂肪酸は、例えば、DGLA、 $20:4n-3$ 又はADAでありうる。第二生成物ポリ不飽和脂肪酸は、例えば、AA、EPA又は6-ドコサペンタエン酸でありうる。最終ポリ不飽和脂肪酸は、例えば、DHA、アドレン酸、6-ドコサペンタエン酸又は3-ドコサペンタエン酸でありうる。

20

【0035】

本発明は、配列番号2に関する前記の方法に従い製造された生成物ポリ不飽和脂肪酸、配列番号2に関する前記の方法に従い製造された第二生成物ポリ不飽和脂肪酸及び配列番号2に関する前記の方法に従い製造された最終ポリ不飽和脂肪酸からなる群より選択される、少なくとも一つのポリ不飽和脂肪酸を含む化粧品も含む。

【0036】

さらに、本発明は、予防又は治療を行うために十分な量で、直前に記載された栄養組成物を患者に投与することを含む、ポリ不飽和脂肪酸の不十分な摂取又は生成により引き起こされる状態を予防又は治療する方法を含む。

30

【0037】

さらに、本発明は、配列番号3(図43)に示されたヌクレオチド配列の少なくとも約35%と一致するか、又は相補的である、単離されたヌクレオチド配列も含む。この配列は、配列番号3により表されるものでありうる。この配列は、ポリ不飽和脂肪酸又はモノ不飽和脂肪酸を基質として利用する、機能的活性を有するエロンガーゼをコードする。この配列は、例えばヒトのような哺乳動物に由来する。

【0038】

本発明は、このヌクレオチド配列によりコードされる精製されたタンパク質も含む。また、本発明は、ポリ不飽和脂肪酸又はモノ不飽和脂肪酸を伸長し、かつこの精製されたタンパク質のアミノ酸配列と少なくとも約30%のアミノ酸類似性を有する、精製されたポリペプチドを含む。

40

【0039】

さらに、本発明は、a)配列番号3(図43)により表されるヌクレオチド配列を単離する工程、b)i)プロモーター、およびii)該プロモーターと機能的に連結された単離されたヌクレオチド配列を含むベクターを構築する工程、並びにc)エロンガーゼ酵素の発現にとって十分な時間及び条件で、宿主細胞へ該ベクターを導入する工程を含む、エロンガーゼ酵素を製造する方法を含む。宿主細胞は、配列番号1又は2を利用した対応する方法に関する前記の細胞と同様でありうる。

50

【0040】

本発明は、a) プロモーター、およびb) 該プロモーターと機能的に連結された配列番号3 (図43) により表されたヌクレオチド配列を含むベクターも含み、さらに、このベクターを含む宿主細胞も含む。宿主細胞は、前記の細胞と同様でありうる。

【0041】

本発明は、ベクターのヌクレオチド配列の発現により、植物細胞、植物又は植物組織によるモノ不飽和脂肪酸及びポリ不飽和脂肪酸からなる群より選択される少なくとも一つの脂肪酸の生成が引き起こされる、前記ベクターを含む植物細胞、植物又は植物組織も含む。ポリ不飽和脂肪酸は、例えば、DGLA、 $20:4n-3$ 又はADAでありうる。本発明は、植物細胞、植物又は植物組織により発現された一つ又は複数の植物油又は酸も含む。

10

【0042】

本発明は、ベクターのヌクレオチド配列の発現により、トランスジェニック植物の種子におけるポリ不飽和脂肪酸の生成が引き起こされる、配列番号3を含むベクターを含むトランスジェニック植物も含む。

【0043】

さらに、本発明は、プロモーターと機能的に連結されたエロンガーゼをコードするヒトDNA配列を含むゲノムを有する、ヒト以外のトランスジェニック哺乳動物を含む。DNA配列は、配列番号3 (図43) により表される。本発明は、少なくとも一つのエロンガーゼ又はそれらの生成物を検出可能なレベルで含む、ヒト以外のトランスジェニック哺乳動物により産生された体液も含む。

20

【0044】

本発明は、a) 配列番号3 (図43) により表されるヌクレオチド配列を単離する工程、b) 該ヌクレオチド配列を含むベクターを構築する工程、c) 単離されたヌクレオチド配列によりコードされるエロンガーゼ酵素の発現にとって十分な時間及び条件で、宿主細胞へベクターを導入する工程、並びにd) 基質を生成物ポリ不飽和脂肪酸へ変換するため、発現されたエロンガーゼ酵素を基質ポリ不飽和脂肪酸へ曝露する工程を含む、ポリ不飽和脂肪酸を製造するための方法も包含する。基質ポリ不飽和脂肪酸は、例えば、GLA、STA 又はAAであり、生成物ポリ不飽和脂肪酸は、例えば、それぞれDGLA、 $20:4n-3$ 又はADAでありうる。この方法は、生成物ポリ不飽和脂肪酸を第二生成物ポリ不飽和脂肪酸へ変換するため、生成物ポリ不飽和脂肪酸を、少なくとも一つのデサチュラーゼへ曝露する工程をさらに含む。生成物ポリ不飽和脂肪酸は、例えば、DGLA、 $20:4n-3$ 及びADAであり、第二生成物ポリ不飽和脂肪酸は、例えば、それぞれAA、EPA 及び6-ドコサペンタエン酸であり、少なくとも一つのデサチュラーゼは、AA 又はEPAの生成に関しては5-デサチュラーゼであり、6-ドコサペンタエン酸の生成に関しては4-デサチュラーゼである。この方法は、第二生成物ポリ不飽和脂肪酸を最終ポリ不飽和脂肪酸へ変換するため、少なくとも一つのエロンガーゼ及び少なくとも一つの付加的なデサチュラーゼからなる群より選択される一つ又は複数の酵素へ、第二生成物ポリ不飽和脂肪酸を曝露する工程をさらに含む。最終ポリ不飽和脂肪酸は、例えば、DHA、ADA、6-ドコサペンタエン酸及び3-ドコサペンタエン酸でありうる。

30

40

【0045】

例えば、配列番号3に関する前述の方法に従い製造された生成物ポリ不飽和脂肪酸、配列番号3に関する前述の方法に従い製造された第二生成物ポリ不飽和脂肪酸及び配列番号3に関する前述の方法に従い製造された最終ポリ不飽和脂肪酸でありうる、少なくとも一つのポリ不飽和脂肪酸を含む栄養組成物。生成物ポリ不飽和脂肪酸は、例えば、DGLA、 $20:4n-3$ 又はADAでありうる。第二生成物ポリ不飽和脂肪酸は、AA、EPA 又は6-ドコサペンタエン酸からなる群より選択されうる。最終ポリ不飽和脂肪酸は、例えば、DHA、ADA、6-ドコサペンタエン酸又は3-ドコサペンタエン酸でありうる。組成物のその他の特性又は特徴 (例えば、投与、成分等) は、他の栄養組成物に

50

関する前述のものと同様である。

【0046】

さらに、本発明は、1) 配列番号3に関する前記の方法に従い製造された生成物ポリ不飽和脂肪酸、配列番号3に関する前記の方法に従い製造された第二生成物ポリ不飽和脂肪酸及び配列番号3に関する前記の方法に従い製造された最終ポリ不飽和脂肪酸からなる群より選択される、少なくとも一つのポリ不飽和脂肪酸と、2) 薬学的に許容される担体とを含む薬学的組成物も含む。組成物のその他の特性(例えば、投与、付加的成分等)は、他の薬学的組成物に関する前述のものと同様である。

【0047】

本発明は、配列番号3に関する前述の方法に従い製造された生成物ポリ不飽和脂肪酸、配列番号3に関する前述の方法に従い製造された第二生成物ポリ不飽和脂肪酸及び配列番号3に関する前述の方法に従い製造された最終ポリ不飽和脂肪酸からなる群より選択される、少なくとも一つのポリ不飽和脂肪酸を含む動物飼料も含む。生成物ポリ不飽和脂肪酸は、例えば、DGLA、 $20:4n-3$ 又はADAでありうる。ポリ不飽和脂肪酸は、例えば、AA、EPA又は6-ドコサペンタエン酸でありうる。最終ポリ不飽和脂肪酸は、例えば、DHA、ADA、6-ドコサペンタエン酸又は3-ドコサペンタエン酸でありうる。

10

【0048】

また、本発明は、配列番号3に関する前述の方法に従い製造された生成物ポリ不飽和脂肪酸、配列番号3に関する前述の方法に従い製造された第二生成物ポリ不飽和脂肪酸及び配列番号3に関する前述の方法に従い製造された最終ポリ不飽和脂肪酸からなる群より選択される、少なくとも一つのポリ不飽和脂肪酸を含む化粧品を含む。

20

【0049】

予防又は治療を行うために十分な量で、配列番号3に関する前述の栄養組成物を患者に投与することを含む、ポリ不飽和脂肪酸の不十分な摂取又は生成により引き起こされる状態を予防又は治療する方法。

【0050】

さらに、本発明は、配列番号4(図46)に示されたヌクレオチド配列の少なくとも約35%と一致するか、又は相補的である、単離されたヌクレオチド配列を含む。この配列は、配列番号4により表されうる。この配列は、ポリ不飽和脂肪酸を基質として利用する、機能的活性を有するエロンガーゼをコードする。この配列は、セノラブディティス(*Caenorhabditis*)属の線虫に由来し、又はそれから単離され、特に*C. elegans*から単離されうる。

30

【0051】

本発明は、前記ヌクレオチド配列によりコードされる精製されたタンパク質を含む。本発明は、ポリ不飽和脂肪酸を伸長し、かつこの精製されたタンパク質のアミノ酸配列と少なくとも約30%のアミノ酸類似性を有する精製されたポリペプチドも含む。

【0052】

さらに、本発明は、a) 配列番号4(図46)により表されるヌクレオチド配列を単離する工程、b) i) プロモーター、および ii) 該プロモーターと機能的に連結された単離されたヌクレオチド配列を含むベクターを構築する工程、並びにc) エロンガーゼ酵素の発現にとって十分な時間及び条件で、宿主細胞へベクターを導入する工程を含む、エロンガーゼ酵素を製造する方法を含む。宿主細胞の特性は、配列番号1、配列番号2及び配列番号3に関する前記の特性と同様である。

40

【0053】

本発明は、a) プロモーター、およびb) 該プロモーターと機能的に連結された配列番号4(図46)により表されるヌクレオチド配列を含むベクターも包含し、さらに、このベクターを含む宿主細胞も包含する。宿主細胞は、配列番号1、配列番号2及び配列番号3のための前述の宿主細胞に関する前述の特性と同一の特性を有する。

【0054】

50

さらに、本発明は、ベクターの該ヌクレオチド配列の発現により、植物細胞、植物又は植物組織によるポリ不飽和脂肪酸の生成が引き起こされる、配列番号4を含む前記ベクターを含む植物細胞、植物又は植物組織を含む。ポリ不飽和脂肪酸は、例えば、DGLA、 $20:4n-3$ 又はADAでありうる。本発明は、植物細胞、植物又は植物組織により発現された一つ又は複数の植物油又は脂肪酸も含む。

【0055】

本発明は、ベクターのヌクレオチド配列の発現により、トランスジェニック植物の種子におけるポリ不飽和脂肪酸の生成が引き起こされる、配列番号4に相当するヌクレオチド配列を含む前記ベクターを含むトランスジェニック植物も含む。

【0056】

さらに、本発明は、プロモーターと機能的に連結されたエロンガーゼをコードするC.エレガンスDNA配列を含むゲノムを有する、ヒト以外のトランスジェニック哺乳動物を含む。そのDNA配列は、配列番号4(図46)により表されうる。本発明は、少なくとも一つのエロンガーゼ又はそれらの生成物を検出可能なレベルで含む、請求項187のヒト以外のトランスジェニック哺乳動物により産生された体液も含む。

【0057】

本発明は、a)配列番号4(図46)により表されるヌクレオチド配列を単離する工程、b)単離されたヌクレオチド配列を含むベクターを構築する工程、c)単離されたヌクレオチド配列によりコードされるエロンガーゼ酵素の発現にとって十分な時間及び条件で、宿主細胞へベクターを導入する工程、並びにd)基質を生成物ポリ不飽和脂肪酸へ変換するため、発現されたエロンガーゼ酵素を基質ポリ不飽和脂肪酸へ曝露する工程を含む、ポリ不飽和脂肪酸を製造するための方法も含む。基質ポリ不飽和脂肪酸は、例えば、GLA、STA又はAAであり、生成物ポリ不飽和脂肪酸は、例えば、それぞれDGLA、 $20:4n-3$ 又はADAでありうる。この方法は、該生成物ポリ不飽和脂肪酸を第二生成物ポリ不飽和脂肪酸へ変換するため、発現されたエロンガーゼ酵素を、少なくとも一つの前駆酵素へ曝露する工程をさらに含みうる。生成物ポリ不飽和脂肪酸は、例えば、DGLA、 $20:4n-3$ 又はADAであり、第二生成物ポリ不飽和脂肪酸は、例えば、それぞれAA、EPA又は6-ドコサペンタエン酸であり、少なくとも一つの前駆酵素は、AA又はEPAの製造に関しては5-デサチュラーゼであり、6-ドコサペンタエン酸の製造に関しては4-デサチュラーゼである。この方法は、第二生成物ポリ不飽和脂肪酸を最終ポリ不飽和脂肪酸へ変換するため、少なくとも一つのエロンガーゼ及び少なくとも一つの前駆酵素からなる群より選択される一つ又は複数の酵素へ、第二生成物ポリ不飽和脂肪酸を曝露する工程をさらに含みうる。最終ポリ不飽和脂肪酸は、例えば、DHA、ADA、6-ドコサペンタエン酸又は3-ドコサペンタエン酸でありうる。

【0058】

本発明は、配列番号4に関する前記の方法に従い製造された該ポリ不飽和脂肪酸、配列番号4に関する前記の方法に従い製造された第二生成物ポリ不飽和脂肪酸及び配列番号4に関する前記の方法に従い製造された最終ポリ不飽和脂肪酸からなる群より選択される、少なくとも一つの前駆酵素を含む栄養組成物も含む。生成物ポリ不飽和脂肪酸は、例えば、DGLA、 $20:4n-3$ 又はADAでありうる。第二生成物ポリ不飽和脂肪酸は、例えば、AA、EPA又は6-ドコサペンタエン酸でありうる。最終ポリ不飽和脂肪酸は、例えば、DHA、ADA、6-ドコサペンタエン酸又は3-ドコサペンタエン酸でありうる。組成物のその他の特徴は、前記の栄養組成物に関して記述されたものと同様である。

【0059】

さらに、本発明は、1)配列番号4に関する前記の方法に従い製造された生成物ポリ不飽和脂肪酸、配列番号4に関する前記の方法に従い製造された第二生成物ポリ不飽和脂肪酸及び配列番号4に関する前記の方法に従い製造された最終ポリ不飽和脂肪酸からなる群より選択される、少なくとも一つの前駆酵素と、2)薬学的に許容される担体と

10

20

30

40

50

を含む薬学的組成物を含む。組成物は、他の薬学的組成物に関する前記の特性と同様の特性（例えば、投与、追加要素等）を有する。

【0060】

本発明は、配列番号4に関する前記の方法に従い製造された生成物ポリ不飽和脂肪酸、配列番号4に関する前述の方法に従い製造された第二生成物ポリ不飽和脂肪酸及び配列番号4に関する前記の方法に従い製造された最終ポリ不飽和脂肪酸からなる群より選択される、少なくとも一つのポリ不飽和脂肪酸を含む動物飼料も含む。生成物ポリ不飽和脂肪酸は、例えば、DGLA、 $20:4n-3$ 又はADAでありうる。第二生成物ポリ不飽和脂肪酸は、例えば、AA、EPA又は6-ドコサペンタエン酸でありうる。最終ポリ不飽和脂肪酸は、例えば、DHA、ADA、6-ドコサペンタエン酸又は3-ドコサペンタエン酸でありうる。

10

【0061】

さらに、本発明は、配列番号4に関する前述の方法に従い製造された生成物ポリ不飽和脂肪酸、配列番号4に関する前述の方法に従い製造された第二生成物ポリ不飽和脂肪酸及び配列番号4に関する前記の方法に従い製造された最終ポリ不飽和脂肪酸からなる群より選択されるポリ不飽和脂肪酸を含む化粧品を含む。

【0062】

さらに、本発明は、予防又は治療を行うために十分な量で、配列番号4に関して記述された栄養組成物を患者に投与することを含む、ポリ不飽和脂肪酸の不十分な摂取又は生成により引き起こされる状態を予防又は治療する方法を包含する。

20

【0063】

本明細書において言及された米国特許及び公開物は全て、参照として完全に本明細書に組み込まれる。

【図面の簡単な説明】

【0064】

【図1】様々な脂肪酸生合成経路を示す図である。エロンガーゼの役割に注意されたい。

【図2】ホホバKCS及びELO2のアミノ酸配列の類似性(%)及び同一性(%)を示す図である。

【図3】図2のホホバKCS配列(下線部がプライマー配列)と相同なS.セレピシエELO2配列を示す図である。

30

【図4】図4Aは、MAELO cDNAを含有するpRAE-2の物理的地図を示す図である。図4Bは、酵母におけるエロンガーゼ酵素産生に使用された構成性発現ベクターpRAE-5の物理的地図を示す図である。

【図5】クローンpRAE-5及びpRAE-6のヌクレオチド配列の比較を示す図である。

【図6】モルチエレラ・アルピナ・エロンガーゼ(MAELO)の全長ヌクレオチド配列を示す図である。

【図7】MAELO(図6参照)から翻訳されたモルチエレラ・アルピナ・エロンガーゼのアミノ酸配列を示す図である。

【図8】3つのエロンガーゼ、S.セレピシエELO2(GNS1)とS.セレピシエELO3(SUR4)と図7に示された翻訳されたMAELO配列とのアミノ酸配列アラインメントを示す図である。

40

【図9】MAELOのヌクレオチド配列とS.セレピシエ由来のELO2のヌクレオチド配列との比較を示す図である。

【図10A】パン酵母において発現されたMAELOのPUFAエロンガーゼ活性を示す図である。

【図10B】パン酵母において発現されたMAELOのPUFAエロンガーゼ活性を示す図である。

【図11】AAを生成するようM.アルピナ由来の5-デサチュラーゼcDNAと共に共発現された場合のMAELOのPUFAエロンガーゼ活性を示す図である。

50

【図12】MAELOのPUFAエロンガーゼ活性と、パン酵母におけるS・セレピシエ由来のELO2の過剰発現との比較を示す図である。

【図13】GenEMBLデータベースのC・エレガンス・ヌクレオチド配列由来のアミノ酸配列と、翻訳されたMAELOとの3つの異なる比較を示す図である。

【図14】GenEMBLデータベースのC・エレガンス・ヌクレオチド配列由来のアミノ酸配列と、翻訳されたMAELOとの3つの異なる比較を示す図である。

【図15】GenEMBLデータベースのC・エレガンス・ヌクレオチド配列由来のアミノ酸配列と、翻訳されたMAELOとの3つの異なる比較を示す図である。

【図16】GenEMBLデータベースの2つの異なる哺乳動物配列のアミノ酸翻訳と、翻訳されたMAELOとの比較を示す図である。

10

【図17】翻訳されたDNA配列（公開されたPCT出願第88/07577号を参照）と、データベース検索において検出されたMAELO由来のアミノ酸配列との比較を示す図である。

【図18】M・アルピナ由来の5-デサチュラーゼの全長ヌクレオチド配列を示す図である。

【図19】MAD708プールの一次GC-FAME分析を示す図である。DGLA(C20:3n-6)ピークの検出に注意されたい。

【図20】酵母中の5つのMAD708クローンの、GLAを基質として用いたPUFAエロンガーゼ活性を示す図である。全てのクローンが明白なエロンガーゼ活性を有する。

【図21】プラスミドpRPB2のDNA配列決定分析を示す図である。分析により957bp長のオープン・リーディング・フレームが明らかとなった。

20

【図22】GLAエロンガーゼ活性のためGLELOと名付けられた、プラスミドpRPB2に含まれるM・アルピナcDNAの全長ヌクレオチド配列を示す図である。

【図23】GLELO(図22参照)から翻訳されたM・アルピナ・エロンガーゼのアミノ酸配列を示す図である。

【図24】GLAを補足した場合の、334(pRPB2)の誘導された培養物におけるn-6PUFAエロンガーゼ活性を示す図である。

【図25】25μmの他の脂肪酸基質を補足した場合の、334(pRPB2)の誘導された培養物におけるn-3及びn-6PUFAエロンガーゼ活性を示す図である。

【図26】図26Aは、AAを生成するようM・アルピナの5-デサチュラーゼcDNAと共に共発現された場合の、GLELOのGLAを基質として用いたエロンガーゼ活性を示す図である。図26Bは、EPAを生成するようM・アルピナの5-デサチュラーゼcDNAと共に共発現された場合の、GLELOのSTAを基質として用いたエロンガーゼ活性を示す図である。

30

【図27】翻訳されたGLELO配列(図23参照)と翻訳されたMAELO配列(図7参照)との比較を示す図である。

【図28】4つのエロンガーゼのアミノ酸配列、即ちGLELO(図23参照)、MAELO配列(図7参照)、S・セレピシエELO2(GNS1)及びS・セレピシエELO3(SUR4)の翻訳されたアミノ酸配列の比較を示す図である。ヒスチジン・ボックスが下線で示されている。

40

【図29】翻訳されたMAELO配列と翻訳された推定ヒト・ホモログHS1配列とのアラインメントを示す図である。

【図30】翻訳されたMAELO配列と翻訳された推定ヒト・ホモログHS2配列とのアラインメントを示す図である。

【図31】翻訳されたMAELO配列と翻訳された推定マウス・ホモログMM2配列とのアラインメントを示す図である。

【図32】翻訳されたMAELOと翻訳された推定マウス・ホモログAI225632配列とのアラインメントを示す図である。

【図33】翻訳されたGLELO配列と翻訳された推定ヒト・ホモログAI815960配列とのアラインメントを示す図である。

50

【図34】翻訳されたGLELO配列と翻訳された推定ヒト・ホモログHS1配列とのアラインメントを示す図である。

【図35】翻訳されたGLELO配列と翻訳された推定ヒト・ホモログAC004050配列とのアラインメントを示す図である。

【図36】翻訳されたGLELO配列と翻訳された推定マウス・ホモログMM2配列とのアラインメントを示す図である。

【図37】翻訳されたGLELO配列と翻訳された推定マウス・ホモログAI225632配列とのアラインメントを示す図である。

【図38】翻訳されたGLELO配列と翻訳された推定マウス・ホモログU97107とのアラインメントを示す図である。

10

【図39】翻訳されたGLELO配列と翻訳された推定C・エレガンスU68749(F56H11.4)ホモログ配列とのアラインメントを示す図である。

【図40】翻訳されたMAELO配列と翻訳された推定C・エレガンスU68749(F56H11.4)ホモログ配列とのアラインメントを示す図である。

【図41】翻訳されたGLELO配列と翻訳された推定キイロショウジョウバエ・ホモログ配列DM1とのアラインメントを示す図である。

【図42】翻訳されたMAELO配列と翻訳された推定キイロショウジョウバエ・ホモログ配列DM1とのアラインメントを示す図である。

【図43】ヒト・エロンガーゼHSELO1の全長ヌクレオチド配列を示す図である。

【図44】ヒト・エロンガーゼHSELO1の推定アミノ酸配列を示す図である。

20

【図45】GLA又はAAを補足した場合の、334(pRAE-58-A1)の誘導された培養物のエロンガーゼ活性(PUFA及びその他)を示す図である。

【図46】C・エレガンス・エロンガーゼCEELOの全長ヌクレオチド配列を示す図である。

【図47】C・エレガンス・エロンガーゼCEELOの推定アミノ酸配列を示す図である。

【図48】GLA又はAAを補足した場合の、334(pRET-21)及び334(pRET-22)の誘導された培養物のPUFAエロンガーゼ活性を示す図である。

【図49】推定ヒト・エロンガーゼ遺伝子HS3の全長ヌクレオチド配列を示す図である。

30

【図50】推定ヒト・エロンガーゼ酵素HS3の推定アミノ酸配列を示す図である。

【0065】

(発明の詳細な説明)

本発明は、モルチエレラ・アルピナ由来の2つのエロンガーゼcDNAのヌクレオチド配列及び対応するアミノ酸配列に関し、さらにヒト由来のエロンガーゼcDNAのヌクレオチド配列及び対応するアミノ酸配列、並びにC・エレガンス由来のエロンガーゼcDNAのヌクレオチド配列及び対応するアミノ酸配列に関する。さらに、本発明は、cDNAの使用、及び遺伝子によりコードされるタンパク質の使用も含む。例えば、遺伝子及び対応する酵素は、薬学的組成物、栄養組成物及びその他の有用な製品へ添加されうる、DGLA、AA、ADA、EPA及び/又はDHAのような、ポリ不飽和脂肪酸及び/又はモノ不飽和脂肪酸の製造において使用されうる。

40

【0066】

エロンガーゼ遺伝子及びそれらによりコードされる酵素

前述のように、エロンガーゼcDNAによりコードされるエロンガーゼ酵素は、様々なポリ不飽和脂肪酸、特に20~24個の炭素を含むPUFAの生成に必須である。本発明に関して、単離されたM・アルピナ・エロンガーゼcDNA(MAELO)のヌクレオチド配列は、図6に示され、このヌクレオチド配列によりコードされる対応する精製されたタンパク質又は酵素のアミノ酸配列は、図7に示されている。さらに、単離されたGLAエロンガーゼcDNA(GLELO)のヌクレオチド配列は、図22に示され、このヌクレオチド配列によりコードされる対応する精製されたタンパク質又は酵素のアミノ酸配列

50

は、図 23 に示されている。単離されたヒト配列 1 (HSELO1) エロンガーゼのヌクレオチド配列は、図 43 に示され、この配列によりコードされる対応する精製されたタンパク質又は酵素のアミノ酸配列は、図 44 に示されている。さらに、単離された C.エレガンス・エロンガーゼ cDNA (CEELO1) のヌクレオチド配列は、図 46 に示され、それによりコードされる対応する精製されたタンパク質又は酵素のアミノ酸配列は、図 47 に示されている。

【0067】

例として、本発明の cDNA によりコードされる単離されたエロンガーゼは、GLA を DGLA へ、又は STA を $20:4n-3$ へ、又は AA を ADA へ伸長する。次いで、DGLA からのアラキドン酸の生成、又は $20:4n-3$ からの EPA の生成が、5-デサチウラーゼにより触媒される。従って、AA (又は EPA)、DGLA (又は $20:4n-3$)、ADA (又は 3-ドコサペンタエン酸) は、いずれも、少なくとも一つのエロンガーゼ cDNA 及びそれらによりコードされる酵素が存在しない場合には合成されえない。

【0068】

本発明は、配列番号 1 のヌクレオチド (即ち、本明細書に記載された MAELO cDNA のヌクレオチド配列 (図 6 参照)) の少なくとも約 50%、好ましくは少なくとも約 60%、より好ましくは少なくとも約 70% と一致する (即ち、同一性を有する) か、又は相補的な配列を有するヌクレオチド配列 (及び対応するコードされるタンパク質) も包含することに注意されたい。さらに、本発明は、配列番号 2 のヌクレオチド (即ち、本明細書に記載された GLELO cDNA のヌクレオチド配列 (図 22 参照)) の少なくとも約 35%、好ましくは少なくとも約 45%、より好ましくは少なくとも約 55% と一致する (即ち、同一性を有する) か、又は相補的な配列を有するヌクレオチド配列 (及び対応するコードされるタンパク質) も含む。さらに、本発明は、配列番号 3 のヌクレオチド (即ち、本明細書に記載されたヒト配列 1 (HSELO1) cDNA のヌクレオチド配列 (図 43 参照)) の少なくとも約 35%、好ましくは少なくとも約 45%、より好ましくは少なくとも約 55% と一致する (即ち、同一性を有する) か、又は相補的な配列を有するヌクレオチド配列 (及び対応するコードされたタンパク質) も含む。さらに、本発明は、配列番号 4 のヌクレオチド (即ち、本明細書に記載された C.エレガンス cDNA、CEELO1 のヌクレオチド配列 (図 46 参照)) の少なくとも約 35%、好ましくは少なくとも約 45%、より好ましくは少なくとも約 55% と一致する (即ち、同一性を有する) か、又は相補的な配列を有するヌクレオチド配列 (及び対応するコードされるタンパク質) も含む。そのような配列は、モルチエレラ以外の起源 (例えば、真核生物 (例えば、トラウストキトリウム種 (*Thraustochytrium* spp.)) (例えば、トラウストキトリウム・アウレウム (*Thraustochytrium aureum*) 及びトラウストキトリウム・ロセウム (*Thraustochytrium roseum*))、シゾキトリウム種 (*Schizochytrium* spp.)) (例えば、シゾキトリウム・アグレガツム (*Schizochytrium aggregatum*))、コニディオボルス種 (*Conidiobolus* spp.)) (例えば、コニディオボルス・ナノデス (*Conidiobolus nanodes*))、エントモルフトラ種 (*Entomophthora* spp.)) (例えば、エントモルフトラ・エキシタリス (*Entomophthora exitalis*))、サブロレグニア種 (*Saprolegnia* spp.)) (例えば、サブロレグニア・パラシティカ (*Saprolegnia parasitica*) 及びサブロレグニア・ディクリナ (*Saprolegnia diclina*))、レプトミツス種 (*Leptomitus* spp.)) (例えば、レプトミツス・ラクテウス (*Leptomitus lacteus*))、エントモルフトラ種 (*Entomophthora* spp.))、ピチウム種 (*Pythium* spp.))、ポルフィリディウム種 (*Porphyridium* spp.)) (例えば、ポルフィリジウム・クルエンツム (*Porphyridium cruentum*))、コニディオボルス種 (*Conidiobolus* spp.))、フィットフトラ種 (Ph

10

20

30

40

50

ytrophathora spp.)、ペニシリウム種、コイドスポリウム種 (Coidosporium spp.)、ムコール種 (Mucor spp.) (例えば、ムコール・サーシネロイデス (Mucor circinelloides) 及びムコール・ジャバニクス (Mucor javanicus))、フザリウム種 (Fusarium spp.)、アスペルギルス種及びロドトルラ種 (Rhodotorula spp.)、酵母 (例えば、ディポダスコプシス・ユニヌクレアタ (Dipodascopsis uninucleata))、哺乳動物以外の生物、例えばハエ (キイロショウジョウバエ (Drosophila melanogaster)) 又はセノラブディティス種 (例えば、セノラブディティス・エレガンス)、又は哺乳動物 (例えば、ヒトもしくはマウス) に由来するものでありうる。そのような配列は、アルピナ種以外のモルチエレラ属に属する種、例えば、モルチエレラ・エロンガタ (Mortierella elongata)、モルチエレラ・エキシグア (Mortierella exigua)、モルチエレラ・イザベリナ (Mortierella isabellina)、モルチエレラ・ヒグロフィラ (Mortierella hygrophila) 及びモルチエレラ・ラマニアナ (Mortierella ramanniana)、va. アングリスポラ (va. angulispora) に由来するものであってもよい。さらに、本発明は、本発明のヌクレオチド配列 (即ち、配列番号 1 (MAELO)、配列番号 2 (GLELO)、配列番号 3 (HSELO1) 及び配列番号 4 (CEELO1)) 及びモルチエレラ以外の起源に由来する、前記の相補性又は一貫性/同一性を有する配列の断片及び誘導体も包含する。前記配列の機能的等価物 (即ち、エロンガーゼ活性を有する配列) も、本発明に包含される。

【0069】

本発明の目的のために「相補性」を 2 個の DNA セグメント間の関連性の程度と定義する。これは適当な条件下で 1 個の DNA セグメントのセンス鎖が別の DNA セグメントのアンチセンス鎖とハイブリダイズして 2 重らせんを形成する能力を測定することにより決定する。2 重らせんではアデニンが一方の鎖に現れるともう一方の鎖にはいつもチミンが現れる。同様に一方の鎖にグアニンが現れるともう一方の鎖にはいつもシトシンが現れる。2 個の DNA セグメントのヌクレオチド配列間の関連性が大きいほど 2 個の DNA セグメントの鎖間でハイブリッド 2 本鎖を形成する能力が大きくなる。

【0070】

2 個のヌクレオチド配列間の「同一性」を、2 個の DNA セグメントの同一鎖 (センスまたはアンチセンスのいずれか) 間の同一性、対応性または同等性の程度と定義する。同一性%が大きくなるほど、鎖間の対応性、同一性または同等性が高くなる。

【0071】

2 個のアミノ酸配列間の「類似性」を、両方の配列における一連の同等および保存アミノ酸残基の存在と定義する。2 個のアミノ酸配列間の類似性の程度が高いほど、2 個の配列の対応性、同一性または同等性が高くなる。(2 個のアミノ酸配列間の「同一性」を両配列における一連の正確に類似したまたは不変のアミノ酸残基の存在と定義する)

「相補性」、「同一性」および「類似性」の定義は当業者に周知である。

【0072】

本発明はまたポリ不飽和およびモノ不飽和脂肪酸を伸長し、前記タンパク質のアミノ酸配列に対して少なくとも約 50% のアミノ酸類似性を有し (例えば図 7 (MAELO) を参照のこと)、また前記ヌクレオチド配列によりコードされる精製ポリペプチドをも含む。さらに、本発明はポリ不飽和脂肪酸を伸長し、前記のタンパク質のアミノ酸配列に対して少なくとも約 30% のアミノ酸類似性を有し (例えば図 23 (GLELO) を参照のこと)、また前記ヌクレオチド配列によりコードされる精製ポリペプチドをも含む。さらに、本発明はまたポリ不飽和およびモノ不飽和脂肪酸を伸長し、前記のタンパク質のアミノ酸配列に対して少なくとも約 30% のアミノ酸類似性を有し (例えば図 44 (HSELO1) を参照のこと)、また前記ヌクレオチド配列によりコードされる精製ポリペプチドをも含む。また、本発明はポリ不飽和脂肪酸を伸長し、前記のタンパク質のアミノ酸配列に

対して少なくとも約30%のアミノ酸類似性を有し(例えば図47(C E E L O 1)を参照のこと)、また前記ヌクレオチド配列によりコードされる精製ポリペプチドをも含む。

【0073】

本発明はまたP U F Aエロンガーゼ活性をコードし、穏やかなストリンジェント条件下で図6に示す配列番号1(M A E L O)および/または図22に示す配列番号2(G L E L O)および/または図43に示す配列番号3(H S E L O 1)および/または図46に示す配列番号4(C E E L O 1)により表されるヌクレオチド配列に対応するまたは相補的であるヌクレオチド配列を有する核酸にハイブリダイズできる単離されたヌクレオチド配列をも包含する。適当な温度およびイオン強度条件下で核酸分子の1本鎖形態が別の核酸分子にアニーリングできる場合、核酸分子は別の核酸分子に「ハイブリダイズできる」(Sambrookら、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」第2版(1989)、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス、コールド・スプリング・ハーバー、ニューヨーク州)。温度およびイオン強度はハイブリダイゼーションの「ストリンジェンシー」により決定する。「ハイブリダイゼーション」には相補的な配列を含有する2個の核酸が必要である。しかしながら、ハイブリダイゼーションの厳密性に依拠して塩基間の誤対合を生じ得る。核酸をハイブリダイズするのに適当な厳密性は核酸の長さおよび相補性の程度に依存する。このような変動要因は当業界で周知である。より具体的には、2個のヌクレオチド配列間の類似性または相同性が高くなるほど、これらの配列を有する核酸のハイブリッドのT_m(融解温度)値が高くなる。100ヌクレオチド以上の長さのハイブリッドに関しては、T_mを算出するための方程式が誘導されている(前記で引用したSambrookらを参照のこと)。短い核酸でのハイブリダイゼーションに関しては、誤対合の位置がより重要であり、オリゴヌクレオチドの長さがその特異性を決定する(前記で引用したSambrookらを参照のこと)。

10

20

【0074】

エロンガーゼ酵素の生成

一度エロンガーゼをコードする遺伝子を単離すると、次いでそれをベクター、プラスミドまたは構築物を使用して原核または真核宿主細胞のいずれかに導入できる。

【0075】

ベクター例えばバクテリオファージ、コスミドまたはプラスミドはエロンガーゼをコード化するヌクレオチド配列および宿主細胞中で機能し、ヌクレオチド配列によりコードされるエロンガーゼの発現を誘導できるいずれかのプロモーターを含むことができる。プロモーターはヌクレオチド配列と関連して機能できるかまたはヌクレオチド配列と機能的に連結できる。(プロモーターがコーディング配列の転写または発現に影響する場合、プロモーターはコーディング配列と「機能的に連結している」と言える。)適当なプロモーターには例えばアルコールデヒドロゲナーゼ、グリセロアルデヒド-3-ホスフェート・デヒドロゲナーゼ、ホスフォグルコイソメラーゼ、ホスフォグリセレートキナーゼ、酸ホスファターゼ、T7、TP1、ラクターゼ、メタロチオネイン、サイトメガロウィルス前初期、乳清酸性タンパク質、グルコアミラーゼ、およびガラクトースの存在下で活性化されるプロモーター、例えばGAL1およびGAL10などがある。さらに、その他のタンパク質、オリゴ糖、脂質等をコードするヌクレオチド配列もまたベクターおよびポリアデニル化シグナル(例えばSV-40T抗原、卵アルブミンまたはウシ成長ホルモンのポリAシグナル)のようなその他の制御配列に含まれ得る。構築物に存在する配列の選択は望ましい発現生成物および宿主細胞の特性に依存する。

30

40

【0076】

前記するように、一度ベクターを構築すると、次いで当業者に周知の方法、例えばトランスフェクション、形質転換およびエレクトロポレーション(Sambrookら、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」第2版(1989)1ないし3巻、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレスを参照のこと)により、これを選択した宿主細胞に導入できる。次いでP U F Aの発現を可

50

能にする適当な条件下で宿主細胞を培養し、次いで回収し、精製する。

【0077】

2個またはそれ以上のcDNAのヌクレオチド配列を含んでなる一つの構築物またはベクターを用いる場合、独特のトリグリセリドまたはオイルを設計することにも留意すべきである(例えばMAELO、GLELO、HSELO1および/またはCEELO1)。次いでこのベクターを1個の宿主細胞に導入できる。別法として、各々の配列を別個のベクターに導入できる。次いでこれらのベクターを各々2個の宿主細胞に、または1個の宿主細胞に導入できる。

【0078】

適当な原核細胞宿主の例としては、例えば大腸菌(*Escherichia coli*)、枯草菌(*Bacillus subtilis*)のような細菌、およびスピルリナ(*Spirulina*)種(すなわち青緑藻)のようなシアノバクテリアなどが挙げられる。適当な真核細胞宿主の例としては、例えば哺乳動物細胞、植物細胞、酵母細胞、例えばサッカロミセス(*Saccharomyces*)種、リポミセス(*Lipomyces*)種、カンジダ(*Candida*)種例えばヤロウイア(*Yarrowia*) (カンジダ)種、クルイペロミセス(*Kluyveromyces*)種、ピチア(*Pichia*)種、トリコデルマ(*Trichoderma*)種もしくはハンセヌラ(*Hansenula*)種、または糸状菌細胞のような真菌細胞、例えばアスペルギルス(*Aspergillus*)、ニューロスポラ(*Neurospora*)およびペニシリウム(*Penicillium*)などが挙げられる。好ましくはビール酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*) (パン酵母)細胞を用いる。

【0079】

宿主細胞における発現は一過性のまたは安定した方法で行うことができる。一過性の発現は宿主細胞で機能する発現シグナルを含有する導入構築物から生じることができるが、この構築物は複製せず、宿主細胞に組み込まれることはまれであるか、または宿主細胞は増殖性でない。一過性の発現はまた目的の遺伝子に機能的に連結した制御可能なプロモーターの活性を誘導することにより達成することもできるが、このような誘導システムでは発現レベルの基底値がたびたび低くなる。安定した発現は宿主ゲノムに組み込むことができるかまたは宿主細胞において自発的に複製される構築物の導入により達成できる。発現構築物に位置するかまたは発現構築物でトランスフェクトされた選別可能なマーカーを使用し、続いてマーカーを発現する細胞を選別することにより、目的の遺伝子の安定発現を選択することができる。組み込みにより安定発現が得られた場合、構築物の組み込み部位を宿主ゲノム内に無作為に生じることができるか、または宿主座との組換えを標的化するのに十分な宿主ゲノムとの相同性領域を含有する構築物を使用することにより構築物の組み込み部位を標的化できる。構築物が内在性の座を標的にする場合、転写または翻訳制御領域の全てまたは一部が内在性の座により提供できる。

【0080】

前記のヌクレオチド配列の一つまたは両方によりコードされる目的の酵素(すなわちエロンガーゼ)を発現するために、トランスジェニックマウスをも用いることができる。より具体的には、一度前記の構築物を作ると、これを胚の前核に挿入できる。次いで胚を受体の雌に移植できる。別法として、核の移送法をも利用できる(Schniekerら、*Science*、278:2130-2133(1997))。次いで妊娠および出産してもよい(例えば米国特許第5750176号、米国特許第5700671号を参照のこと)。次いで子孫の乳、組織またはその他の体液サンプルは非トランスジェニック動物に通常見出されるレベルに比較して変化したレベルのPUFAを含有するはずである。レベルが変化したまたは増加したPUFA生成、およびエロンガーゼ酵素をコードする一つのまたは複数の遺伝子のゲノムへの組み込みに関して次世代をモニター観察できる。宿主として利用される哺乳動物は例えばマウス、ラット、ウサギ、ブタ、ヤギ、ヒツジ、ウマおよびウシからなる群から選択できる。しかしながら、目的の酵素をコードするDNAをゲノムに組み込む能力を有すればいずれの哺乳動物を用いてもよい。

【 0 0 8 1 】

エロンガーゼポリペプチドを発現するために、機能的な転写および翻訳開始および終止領域をエロンガーゼポリペプチドをコードするDNAに機能できるように結合する。転写および翻訳開始および終止領域を、発現すべきDNAを含む種々の非排他的供給源、望ましい系において発現可能であると知られているかもしくは考えられている遺伝子、発現ベクター、化学合成から、または宿主細胞の内在性の座から誘導する。植物組織および/または植物の部分における発現はとりわけ組織または部分が種子、葉、果実、花、根等のような初期に収穫されたものである場合、特定の有効性を呈する。特異的な制御配列例えば米国特許第5463174号、4943674号、51066739号、5175095号、5420034号、5188958号および5589379号の配列を利用することにより発現を植物のその位置に標的化できる。また別に、発現したタンパク質は、直接かまたはさらに修飾して宿主植物からの液体分画に混合することができる生成物を生成する酵素でよい。一つのまたは複数のエロンガーゼ遺伝子の発現、またはアンチセンスエロンガーゼ転写物は植物部分および/または植物組織に見出される特異的PUFAまたはその誘導体のレベルを変化させることができる。望ましいPUFAを高い比率で含有するか、またはPUFA組成物がヒト母乳によりよく類似している組織および/または植物部分を作るために、エロンガーゼコーディング領域を単独でまたはその他の遺伝子をと共に発現できる(Prietorら、PCT公開WO95/24494)。開始領域が得られる遺伝子の3'領域から、または異なる遺伝子から終止領域を誘導できる。多くの終止領域が周知であり、同一および異なる属および種の種々の宿主において満足できるものであることが解っている。終止領域は通常いずれかの特別な特性のためというよりむしろ利便性から選択する。

10

20

【 0 0 8 2 】

前記したように植物(例えばグリシン・マックス(Glycine max)(大豆)またはブラシカ・ナプス(Brassica napus)カノーラ)、植物組織、トウモロコシ、ジャガイモ、ヒマワリ、紅花または麻を各々エロンガーゼ酵素発現のための宿主または宿主細胞として用いることもでき、またポリ不飽和脂肪酸の生成に利用することができる。より具体的には、望ましいPUFAを種子に発現できる。種子油の単離方法は当業界で周知である。このように、PUFA供給源の提供に加え、エロンガーゼ遺伝子および恐らくデサチュラーゼ遺伝子の発現により種子油成分を操作して栄養組成物、薬学的組成物、動物飼料および化粧品に加えることができる種子油を提供できる。再度、一時的にエロンガーゼ遺伝子が十分に発現できる条件下で、機能的にプロモータに結合したエロンガーゼをコードするDNA配列を含んでなるベクターを植物組織または植物に導入する。ベクターは別の酵素例えば4-デサチュラーゼ、5-デサチュラーゼ、6-デサチュラーゼ、8-デサチュラーゼ、9-デサチュラーゼ、10-デサチュラーゼ、12-デサチュラーゼ、13-デサチュラーゼ、15-デサチュラーゼ、17-デサチュラーゼおよび/または19-デサチュラーゼをコードする1個またはそれ以上の遺伝子をも含んでなるとよい。植物組織または植物は酵素が作用する関連基質(例えばDGLA、GLA、STA、AA、ADA、EPA、20:4n-3、等)を生成できるか、またはこのような基質を生成する酵素をコードするベクターを植物組織、植物細胞、植物、または目的の宿主細胞に導入できる。加えて、適当な酵素を発現する植物組織に基質をスプレーできる。これらの種々の技術を用いることにより、植物細胞、植物組織、植物または目的の宿主細胞を用いてPUFA(例えばDGLA、AAもしくはADAのようなn-6不飽和脂肪酸、またはEPA、もしくはDHAのようなn-3脂肪酸)を生成できる。本発明はまた前記したベクターを含んでなるトランスジェニック植物をも包含し、この場合ベクターのヌクレオチド配列の発現の結果、例えばトランスジェニック植物の種子にポリ不飽和脂肪酸を生成することにも注目すべきである。

30

40

【 0 0 8 3 】

天然かまたはトランスジェニックのいずれかにより宿主細胞が生成できる基質、および続いて宿主細胞に導入されるベクターに存在するDNA配列によりコードされ得る酵素を

50

図 1 に示す。

【 0 0 8 4 】

前記を鑑み、本発明はまた 1) エロンガーゼ c D N A の望ましいヌクレオチド配列を単離する工程 ; 2) 該ヌクレオチド配列を含んでなるベクターを構築する工程 ; および 3) エロンガーゼ酵素を生成するのに十分な時間および条件下で該ベクターを宿主細胞に導入する工程 ; からなる前記のエロンガーゼ酵素の一つを生成する方法をも包含する。

【 0 0 8 5 】

本発明はまたエロンガーゼが酸をポリ不飽和脂肪酸に変換するように酸を前記のように生成したエロンガーゼに曝露することからなるポリ不飽和脂肪酸の生成方法をも包含する。例えば G L A をエロンガーゼに曝露すると G L A は D G L A に変換される。次いで D G L A を 5 - デサチュラーゼに曝露すると、これは D G L A を A A に変換する。次いで 1 7 - デサチュラーゼを用いて A A を E P A に変換でき、またエロンガーゼおよび 4 - デサチュラーゼを用いて D H A に変換できる。別法として、エロンガーゼを用いて 1 8 : 4 n - 3 を 2 0 : 4 n - 3 に変換し、これを 5 - デサチュラーゼに曝露して E P A に変換できる。またエロンガーゼを用いて 1 8 : 3 n - 3 を 2 0 : 3 n - 3 に変換し、これをまた 8 - デサチュラーゼにより 2 0 : 4 n - 3 に変換できる。このようにエロンガーゼをポリ不飽和脂肪酸の生成に用いることができ、またこれを特定の有益な目的のために使用することができる。(いくつかの生合成経路でエロンガーゼが果たす多くの重要な役割の説明に関して図 1 を参照のこと。)

エロンガーゼ遺伝子およびそれによりコードされる酵素の使用

前記するように単離されたエロンガーゼ c D N A およびそれによりコードされる対応するエロンガーゼ酵素(または精製ポリペプチド)には多くの用途がある。例えば各々の c D N A および対応する酵素をポリ不飽和脂肪酸、例えば D G L A、A A、A D A、2 0 : 4 n - 3 または E P A の生成において間接的または直接的に使用できる。(「直接的」とは酵素が直接的に酸を別の酸に変換する状況を包含することを意味し、後者の酸は組成物において利用される(例えば G L A の D G L A への変換)。)「間接的」とはエロンガーゼにより脂肪酸を別の脂肪酸(すなわち経路中間体)に(例えば G L A を D G L A に)変換する状況を包含することを意味し、次いでエロンガーゼ以外の酵素を用いて後者の脂肪酸を別の脂肪酸に(例えば 5 - デサチュラーゼにより D G L A を A A に)変換する。これらのポリ不飽和脂肪酸(すなわちエロンガーゼ酵素の活性により直接的または間接的のいずれかにより生成されたもの)を例えば栄養組成物、薬学的組成物、化粧品および動物用飼料に添加することができ、これらはすべて本発明に包含される。これらの用途に関しては以下に詳細に記載する。

【 0 0 8 6 】

栄養組成物

本発明は栄養組成物を包含する。本発明の目的のためのこのような組成物には経腸または非経口摂取を含むヒト摂取用のいずれかの食物または調製物が含まれ、これは体内に取り込まれると (a) 栄養を与える、もしくは組織を作り上げる、もしくはエネルギーを供給するおよび / または (b) 十分な栄養状態もしくは代謝機能を維持、回復もしくは補助する。

【 0 0 8 7 】

本発明の栄養組成物は各々のエロンガーゼ遺伝子を用いて生成した少なくとも一つのエロンガーゼ酵素を用いて生成し、固体または液体のいずれかの形態でよい少なくとも一つの油または酸を含んでなる。加えて、組成物は特定の用途に望ましい量の食用多量要素、ビタミンおよびミネラルを含んでよい。このような成分の量は、組成物を正常で健康な幼児、子供に使用することを意図しているのか、それとも特定の代謝状態を伴う成人のような特別な必要性を有する(すなわち代謝障害)成人に使用することを意図しているのかに依存して変動する。

【 0 0 8 8 】

組成物に加えることができる多量要素の例としては食用脂肪、炭水化物およびタンパク

質などがあるが、これらに限定するものではない。このような食用脂肪の例としてはココナッツ油、大豆油並びにモノおよびジグリセリドなどが挙げられるが、これらに限定するものではない。このような炭水化物の例としてはグルコース、食用乳糖および加水分解デンプンなどが挙げられるが、これらに限定するものではない。加えて、本発明の栄養組成物において用いることができるタンパク質の例としては大豆タンパク質、電気透析乳清、電気透析スキムミルク、乳清、またはこれらのタンパク質の加水分解物などが挙げられるが、これらに限定するものではない。

【0089】

ビタミンおよびミネラルに関しては、以下のものを本発明の栄養組成物に添加してよい：カルシウム、リン、カリウム、ナトリウム、塩化物、マグネシウム、マンガン、鉄、銅、亜鉛、セレンウム、ヨウ素並びにビタミンA、E、D、CおよびB複合体。その他のこのようなビタミンおよびミネラルを添加してもよい。

10

【0090】

本発明の栄養組成物に用いられる成分は供給源を半精製または精製したものである。半精製または精製したとは天然物の精製により、または合成により調製された物質を意味する。

【0091】

本発明の栄養組成物の例としては幼児調合物、栄養補助食品、食品代用物、および再水和組成物などが挙げられるが、これらに限定するものではない。特定の目的の栄養組成物には、幼児用の経腸または非経口補助食品、幼児専用調合物、高齢者用の補助食品、並びに胃腸障害および/または吸収不良を有する者の補助食品に利用するものなどが挙げられるが、これらに限定するものではない。

20

【0092】

本発明の栄養組成物はまた食事に補充する必要がない場合でも食物に添加してよい。例えば、マーガリン、調製バター、チーズ、ミルク、ヨーグルト、チョコレート、キャンディー、スナック類、サラダ油、調理用油、調理用脂肪、肉、魚および飲料などのいかなる型の食品に添加してもよいが、これらに限定するものではない。

【0093】

本発明の好ましい実施態様では、栄養組成物は経腸栄養剤であり、より好ましくは成人または小児科用の経腸栄養剤である。ストレスを経験しているかまたは慢性もしくは急性の疾病状態のために特に必要性のある成人または子供にこの組成物を投与できる。組成物は本発明に従って生成したポリ不飽和脂肪酸に加えて、前記するような多量要素、ビタミンおよびミネラルを含んでなっており、多量要素は人乳に存在するのと等価の量で、またはエネルギーを基準にして、すなわちカロリー当たりを基準にして存在してよい。

30

【0094】

液体または固体経腸または非経口栄養剤を処方する方法は当業界で周知である。(以下の実施例も参照のこと。)

例えば経腸処方を滅菌し、次いでそのまま供給できるように(ready-to-feed:RTF用)にするかまたは濃縮液体もしくは粉末として保存する。粉末は前記するように調製した処方をスプレー乾燥して調製でき、濃縮物を再水和することにより再構成する。成人および小児科栄養調合物は当業界で周知であり、市販により入手できる(例えば、ロス・プロダクツ・ディビジョン、アボット・ラボラトリーズ、コロンバス、オハイオ州のSimilac(登録商標)、Ensure(登録商標)、Jevity(登録商標)、およびAlimentum(登録商標))。本発明に従って製造される油または脂肪酸をこれらの処方のいずれかに添加してよい。

40

【0095】

本発明の栄養組成物のエネルギー密度は、液体の形態では約0.6kcal/mlから約3kcal/mlの範囲でよい。固体または粉末の形態では栄養補助食品は約1.2から9kcal/g以上、好ましくは約3ないし7kcal/gを含んでよい。一般に、液体製品のオスモル濃度は700ミリオスモル以下、より好ましくは660ミリオスモル以下にす

50

べきである。

【0096】

栄養剤は前記するように本発明に従って製造したPUFAに加えて、多量要素、ビタミンおよびミネラルを含んでよい。これらの付加的な成分が存在することにより個体がこれらの要素の1日最低必要量を摂取するのを助ける。PUFAの供給に加えて亜鉛、銅、葉酸および抗酸化剤を組成物に添加するのも望ましい。これらの物質はストレスをうけた免疫系を高め、それにより組成物を摂取している個体がさらなる利益を享受することになると考えられる。薬学的組成物もまたこれらの要素を補給しうる。

【0097】

より好ましい実施態様では、栄養組成物は、抗酸化剤および少なくとも一つのPUFAに加えて、少なくとも炭水化物の5重量%が消化しにくいオリゴ糖である炭水化物供給源を含んでなる。より好ましい実施態様では栄養組成物はさらにタンパク質、タウリンおよびカルニチンを含んでなる。

【0098】

前記するように、静脈内投与を行っている患者用に、または栄養失調もしくはその他の症状もしくは疾病状態の予防もしくは治療のために、本発明に従って製造したPUFAまたはその誘導体を食品代用物または栄養補助食品、とりわけ幼児調合物に添加してよい。背景としてヒトの母乳は約0.15%から約0.36%のDHA、約0.03%から約0.13%のEPA。約0.30%から約0.88%のAA、約0.22%から約0.67%のDGLA、および約0.27%から約1.04%のGLAからなる脂肪酸プロフィールを有することに留意すべきである。従って、本発明に従って製造したDGLA、AA、EPAおよび/またはデコサヘキサエノン酸(DHA)のような脂肪酸を用いて例えばヒトの母乳のPUFA含量をよりよく模写するために幼児調合物の組成を変化させるか、またはヒト以外の哺乳動物の乳に通常見出されるPUFAの存在を変化させることができる。とりわけ薬理的に、または栄養補助食品、特に母乳代用品もしくは補助食品において使用するための組成物は一つまたはそれ以上のAA、DGLAおよびGLAを含んでなるのが好ましい。より好ましくは、油ブレンドは約0.3から30%のAA、約0.2から30%のDGLA、および/または約0.2から約30%のGLAからなる。

【0099】

非経口用栄養組成物はトリグリセリドとして算出した脂肪酸を約2から約30重量%含んでなり、これは本発明に包含される。好ましい組成物ではGLAとして全PUFA組成物の約1から約25重量%含まれる(米国特許第5196198号)。その他のビタミン、とりわけビタミンA、D、EおよびL-カルニチンのような脂溶性ビタミンを含んでもよい。望む場合、アルファ・トコフェロールのような保存剤を約0.1重量%の量で加えてもよい。

【0100】

加えて、AA、DGLAおよびGLAの比率は特定の最終使用目的に適合させることができる。母乳補助食品または代用品として処方する場合、一つまたはそれ以上のAA、DGLAおよびGLAを含んでなる組成物が各々約1:19:30から約6:1:0.2の比率で提供される。例えば、動物の乳はAA:DGLA:GLAの比率が1:19:30から6:1:0.2の範囲で変動し、好ましくは約1:1:1、1:2:1、1:1:4の中間的な比率も含まれる。宿主細胞において一緒に製造した場合、GLAおよびDGLAのような前駆体基質のAAへの変換率および%を調整してPUFAの比率を正確に調節できる。例えばDGLAのAAへの変換率を5%から10%にしてAAのDGLAに対する比率を約1:19にでき、一方変換率を約75%から80%にしてAAのDGLAに対する比率を約6:1にできる。このように、細胞培養系においても宿主動物においても、エロンガーゼ発現およびその他のデサチュラーゼ発現の時期、程度および特異性を制御してPUFAレベルおよび比率を調節できる。次いで本発明に従って製造したPUFA/酸(例えばAAおよびDGLA)を望ましい濃度および比率で別のPUFA/酸(例えばGLA)と組み合わせるとよい。

10

20

30

40

50

【0101】

加えて、本発明に従って製造したPUFAまたはそれらを含有する宿主細胞を動物用補助食品として用いて動物の組織または乳脂肪酸組成をヒトまたは動物の摂取により望ましいものに変化させることもできる。

【0102】

薬学的組成物

本発明はまた本明細書に記載した方法に従って、少なくとも一つのエロンガーゼcDNA（すなわちMAELO、GLELO、HSELO1またはCEELO）を用いて製造した一つまたはそれ以上の脂肪酸および/または得られた油を含んでなる薬学的組成物をも包含する。より具体的にはこのような薬学的組成物は一つまたはそれ以上の酸および/または油、ならびに標準的で周知の無毒性の医薬的に許容される担体、アジュバントまたはベヒクル例えばリン酸緩衝生理食塩水、水、エタノール、ポリオール、植物油、湿潤剤または水/油エマルジョンのようなエマルジョンを含んでなっておりよい。組成物は液体または固体の形態でよい。例えば、組成物を錠剤、カプセル、摂取可能な液体または粉末、注射可能なまたは局所用軟膏またはクリームでよい。例えば分散液の場合、必要な粒子径を維持することにより、および界面活性剤を使用することにより適当な流動性を維持できる。等張化剤、例えば糖、塩化ナトリウム等を含有するのも望ましい。このような不活性希釈剤に加え、組成物はまたアジュバント、例えば湿潤化剤、乳化および懸濁化剤、甘味剤、香味剤並びに芳香剤をも含有できる。

【0103】

懸濁液は活性化化合物に加えて例えばエトキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシエチレンソルビトールおよびソルビタンエステル、微結晶性セルロース、アルミニウムメタヒドロキッド、ペントナイト、寒天およびトラガカントまたはこれらの基質の混合物を含んでなっておりよい。

【0104】

錠剤およびカプセルのような固体投与形態は当業界で周知の技術を用いて調製できる。例えば、本発明に従って製造されたPUFAをラクトース、スクロース、およびコーンスターチのような慣用される錠剤基剤をアカシア、コーンスターチまたはゼラチンのような結合剤、ジャガイモデンプンまたはアルギン酸のような崩壊剤、およびステアリン酸またはステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤と組み合わせて錠剤化できる。これらの賦形剤を抗酸化剤および適当なPUFAと共にゼラチンカプセルに組み入れてカプセルを調製できる。抗酸化剤およびPUFA成分は前記したガイドラインに適合しなければいけない。

【0105】

静脈内投与用には本発明に従って製造したPUFAまたはその誘導体をIntralipids（登録商標）のような市販の処方に組み入れてよい。典型的な正常の成人血漿脂肪酸プロファイルは6.64から9.46%のAA、1.45から3.11%のDGLAおよび0.02から0.08%のGLAからなる。患者の正常な脂肪酸プロファイルを達成するために、これらのPUFAまたはその代謝前駆体を単独でまたはその他のPUFAと組み合わせて、投与できる。望む場合、処方各々の成分を別個に、キットの形態で1回または多数回投与用に提供できる。特定の脂肪酸の典型的な投与量は1日0.1mgから20g（100gまで）、好ましくは1日10mgから1、2、5または10gである。

【0106】

本発明の薬学的組成物の可能な投与経路には例えば経腸（例えば経口および直腸経路）および非経口経路等がある。例えば、液体調製物を例えば経口または直腸経路で投与できる。加えて、均質な混合物を水に完全に分散し、滅菌条件下で生理学的に許容される希釈剤、保存剤、緩衝液またはプロペラントと混合してスプレーまたは吸入剤を形成できる。

【0107】

投与経路はもちろん望まれる効果に依存する。例えば、組成物を荒れて乾燥した、また

10

20

30

40

50

は加齢皮膚の処置または外傷のあるまたは火傷した皮膚の処置、または疾病もしくは症状の影響を受けた皮膚もしくは髪処置に用いる場合、恐らく局所的に適用できる。

【0108】

患者に投与すべき組成物の用量は当業者により決定でき、患者の体重、患者の年齢、患者の免疫状態等に依存する。

【0109】

形態に関しては、組成物を例えば溶液、分散液、懸濁液、エマルジョンまたは次いで再構築するための滅菌粉末にできる。

【0110】

本発明はまた本明細書に記載した薬学のおよび/または栄養組成物を用いた種々障害の処置をも包含する。とりわけ、本発明の組成物を用いて血管形成後の再狭窄を処置することができる。さらに、本発明の組成物を用いて炎症、リウマチ性関節炎、喘息および乾癬の症状を処置することもできる。PUFAがカルシウム代謝に関与し得ることも実証されており；従って、本発明の組成物を恐らく骨粗鬆症および腎臓または尿路結石の処置または予防に利用することができる。

10

【0111】

加えて、本発明の組成物を癌の処置にも用いることができる。悪性細胞が脂肪酸組成を変化させていることが明らかになっている。脂肪酸の添加がその成長を遅延させ、細胞死を招き、化学療法剤の感受性を高めることが示されている。さらに本発明の組成物はまた癌に関連する悪液質の処置にも有益である。

20

【0112】

本発明の組成物を用いて糖尿病を処置することもできる（米国特許第4826877号およびHorrobinら、Am. J. Clin. Nutr. 57(補):732S-737Sを参照のこと）。糖尿病の動物では脂肪酸代謝および組成が変化していることが明らかにされている。

【0113】

さらに、エロンガーゼ酵素を使用して直接的かまたは間接的のいずれかにより製造したPUFAを含んでなる本発明の組成物を、湿疹の処置、血圧低下および数学的な試験スコアの改善にも用いることができる。加えて、本発明の組成物を血小板凝集の阻止、血管拡張の誘発、コレステロール値の低下、血管壁平滑筋および繊維組織の増殖の阻止(Brennerら、Adv. Exp. Med. Biol. 83:85-101(1976))、消化管出血およびその他の非ステロイド性抗炎症薬の副作用の低減または予防(米国特許第4666701号)、子宮内膜症および月経前症候群の予防または処置(米国特許第4758592号)、並びに筋肉脊髄炎およびウイルス感染後の慢性疲労の処置(米国特許第5116871号)に用いることができる。

30

【0114】

さらに本発明の組成物の用途にはAIDS、多発性硬化症および炎症性皮膚障害の処置、並びに一般的な健康状態の保持における使用も含まれる。

【0115】

加えて、本発明の組成物を化粧用の目的に利用することもできる。これを、混合物を形成するように既存の化粧用組成物に加えるか、または単独の組成物として用いることができる。

40

【0116】

獣医学的適用

前記の薬学のおよび栄養組成物をヒトと同様に動物(すなわち家畜または家畜以外の動物)に関連して利用することも注目すべきである。動物はヒトと同じ必要性および状況を多く経験するからである。例えば、本発明の油または酸を動物用栄養補助食餌、動物用食餌代用品、動物用ビタミンに、または動物用局所用軟膏に利用することができる。

【0117】

本発明を以下の実施例を用いて説明するが、これらは本発明を限定するものではない。

50

【0118】

実施例1

モルチエレラ・アルピナ (*Mortierella alpina*) で用いるコドンの決定

1000のランダムcDNAクローンの5'末端をモルチエレラ・アルピナ (*Mortierella alpina*) cDNAライブラリーからシーケンシングした。配列をファストAアルゴリズムを用いるGCG (ジェネティクス・コンピューター・グループ (マジソン、ウィスコンシン州)) を用いて6個の読み枠で翻訳し (PearsonおよびLipman、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、85: 2444-2448 (1988))、クエリー配列と同型の配列群 (核酸またはタンパク質) の類似性を、とりわけスイスポート・データベース (ジェネバイオ、ジュネーブ、スイス) を用いて調べた。既知遺伝子に対するタンパク質配列相同性に基づいて多くのクローンを推定ハウスキーピング遺伝子として同定した。データベースの既知ハウスキーピング遺伝子に適合する21個のM.アルピナ (*M. alpina*) cDNA配列を選別した (以下の表1を参照のこと)。これらの21個の配列およびM.アルピナ 5 - (図18を参照のこと)、6 - および 12 - デサチュラーゼ配列全長に基づいてM.アルピナコドンパイアスの表 (表2を参照のこと) を作った。M.アルピナcDNA配列によってコードされる推定タンパク質および既知タンパク質配列間のファストA整列化がいくつかの区域で弱いので、相同性の強い区域のコドンのみを用いた。

10

【0119】

20

【表 1】

表 1

クローン番号	適合	塩基対番号	アミノ酸番号	
193	伸長因子1-アルファ	426	142	
143	60Sリボソームタンパク質L17	417	139	
235	アクチン1	360	120	
299	40Sリボソームタンパク質YS11	387	129	10
390	ラス関連タンパク質rab-1	342	114	
65	40Sリボソームタンパク質RP10	366	122	
289	ユビキチン結合酵素E2-16KD	294	98	
151	ユビキノールサイトクロームCリダクターゼ	375	125	
80	開始因子5A-2	183	61	
33	60Sリボソームタンパク質L15	252	84	
132	60Sリボソームタンパク質L3-2	300	100	
198	ヒストンH3	285	95	20
286	6-ホスフォグルコネート・デヒドロゲナーゼ、 カルボキシル基の除去	363	121	
283	40Sリボソームタンパク質S22	261	87	
127	伸長因子2	231	77	
197	アクチン、ガンマ	252	84	
496	40Sリボソームタンパク質S16	270	90	
336	ヒストンH4	219	73	
262	ユビキチン	228	76	30
188	グアニンヌクレオチド結合タンパク質ベータ サブユニット様タンパク質	213	71	
81	ユビキチン	228	76	
21	合計	6252	2084	

【0120】

【表 2】

表 2

アミノ酸	コドンバイアス	使用%	アミノ酸	コドンバイアス	使用%
Ala	GCC	63%	Lys	AAG	96%
Arg	CGC	50%	Met	ATG	100%
Asn	AAC	97%	Phe	TTC	78%
Asp	GAC	65%	Pro	CCC	68%
Cys	TGC	87%	Ser	TCC	46%
Gln	CAG	78%	Thr	ACC	78%
Glu	GAG	85%	Trp	TGG	100%
Gly	GGT	47%	Tyr	TAC	95%
His	CAC	91%	Val	GTC	72%
Ile	ATC	72%	Stop	TAA	50%
Leu	CTC	49%			

10

20

【0121】

実施例 I I

M. アルピナのエロンガーゼ様 cDNA 全長のクローニング

ホホバ由来の - ケトアシル補酵素 A シンターゼ (KCS) およびビール酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) エロンガーゼ (ELO2) を並べてアミノ酸相同性の区域を決定した (図 2 を参照のこと)。コドンバイアスを二つのエロンガーゼ間の相同性アミノ酸に対応する配列の区域に適用し、この配列の偏りに基づいてプライマーを設計した (図 3 を参照のこと)。M11M. アルピナ cDNA ライブラリーから挿入物の大きさの平均が 1.1 キロ塩基対である約 6×10^5 のクローンを含む cDNA を切除した (Knutzon ら、*J. Biol. Chem.* 273: 29360 - 29366 (1998))。内在プライマー RO339 (5' - TTG GAG AGG AGG AAG CGA CCA CCG AAG ATG ATG - 3') およびベクター順行プライマー RO317 (5' - CAC ACA GGA AAC AGC TAT GAC CAT GAT TAC G - 3') を用いて切除した cDNA を増幅した。切除した M. アルピナ cDNA ライブラリー 300 ng、各プライマー 50 ピコモル、10 倍バッファー 10 μ l、10 mM PCR ヌクレオチド・ミックス (ベーリンガー・マンハイム・コーポレーション、インディアナポリス、インディアナ州)、および Taq ポリメラーゼ 1.0 ユニット; を含有する 100 μ l の容量でポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を実施した。パーキン・エルマー 9600 (ノーウォーク、コネチカット州) の熱循環器条件は以下のとおりである: 94 で 2 分間、次いで 94 で 1 分間を 30 サイクル、58 で 2 分間、および 72 で 3 分間。続いて 72 で 2 分間さらに PCR を延長した。

30

40

【0122】

PCR 増幅生成物をゲルに流し、約 360 塩基対の増幅フラグメントのゲルを精製し、ABI 373A DNA シークエンサー (パーキン・エルマー、フォスター・シティー、カリフォルニア州) を用いて単離したフラグメントを直接的にシークエンシングした。GCG の配列分析パッケージを用いて得られた配列を既知配列と比較した。ファストアルゴリズムを用いる GCG 分析プログラムで、6 個の読み枠全てで配列を翻訳した (Pearson および Lipman、前記で引用)。タンパク質のスイスポートデータベース (ジェネバイオ、ジュネーブ、スイス) を検索した。ビール酵母菌 ELO2 (GNS1) に

50

対する推定タンパク質配列の相同性に基づき、この翻訳したcDNAフラグメントを推定エロンガーゼの一部であると同定し、これは63個のアミノ酸において41.3%の同一性を有した。

【0123】

推定エロンガーゼ配列およびM.アルピナcDNAライブラリーの構築に使用したベクター、pZL1(ライフ・テクノロジーズ・インコーポレーティッド、ガイザースブルグ、メリーランド州)配列に基づいて新規プライマーを設計した。前記した条件を用いて、BamHI制限部位を加えた(下線)プライマーRO350(5'-CAT CTC A T G G A T C C G C C A T G G C C G C C G C A A T C T T G - 3')、およびベクター逆行プライマーRO352(5'-ACG CGT ACG TAA A G C T T G - 3')を使用してM.アルピナ切除したcDNAライブラリーを再度PCR増幅し、M.アルピナエロンガーゼcDNAの全長を単離した。約1.5キロ塩基対のPCR増幅フラグメントの末端をT4 DNAポリメラーゼ(ペーリンガー・マンハイム・コーポレーション、インディアナポリス、インディアナ州)で埋め、プラント末端を作り、PCR-プラントベクター(インビトロゲン・コーポレーション、カールスバッド、カリフォルニア州)にクローン化した。これにより2個のクローン、pRAE-1およびpRAE-2を得た(図4Aを参照のこと)。(ブダペスト条約の条件下、1998年8月28日、プラスミドDNA pRAE-2をアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、10801ボウルバード大学、マナサス、バージニア州20110-2209に寄託し、寄託番号:ATCC 203166が付与された。)これらのベクターから20
 のエロンガーゼcDNAをEcoRIフラグメントとして切断し、EcoRI消化pYX242(ノバゲン、マジソン、カリフォルニア州)ベクターにクローン化した。pRAE-5およびpRAE-6クローン(図4Bを参照のこと)は各々pRAE-1およびpRAE-2に由来するエロンガーゼcDNAを有する。(ブダペスト条約の条件下、1998年8月28日、プラスミドDNA pRAE-5をアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、10801ボウルバード大学、マナサス、バージニア州20110-2209に寄託し、寄託番号:ATCC 203167が付与された。)pRAE-5およびpRAE-6のシーケンシングによりpRAE-5のエロンガーゼ遺伝子の5'未翻訳領域は16塩基対であり、pRAE-6のエロンガーゼ遺伝子よりも短い(図5を参照のこと)。完全なM.アルピナエロンガーゼcDNA配列はMAELOと称し、pRAE-2より得られた(図6を参照のこと)。図7はMAELOの翻訳により得られたアミノ酸である。前記したように翻訳MAELOでスイスポデータベースを再度検索した:MAELOはビール酵母菌GNS1(ELO2)と317個のアミノ酸において44.3%の同一性を有し、ビール酵母菌SUR4(ELO3)と318個のアミノ酸において44.7%の同一性を有する。3個のエロンガーゼ間のファストA整列化を図8に示す。ヌクレオチドレベルでは(図9を参照のこと)、MAELOビール酵母菌GNS1(ELO2)と549塩基対の重複において57.4%の同一性を有する。しかしながら、954塩基対の完全MAELO遺伝子およびビール酵母菌GNS1(ELO2)間の同一性は33.0%である。

【0124】

実施例III

パン酵母におけるM.アルピナエロンガーゼcDNAの発現

pRAE-5およびpRAE-6構築物をビール酵母菌334に形質転換し(Hovelandら、Gene、83:57-64(1989))、エロンガーゼ活性についてスクリーニングした。pYES2ベクター(インビトロゲン・コーポレーション、カールスバッド、カリフォルニア州)のホホバKCS遺伝子を含有するプラスミドpCGN7875(カルジーン、エルエルシー、デービス、カリフォルニア州)を陽性対照として用いた。M.アルピナエロンガーゼ(MAELO)におけるエロンガーゼ活性を検出するために用いた基質はGLAであり、ホホバKCSの基質はオレイン酸(OA)であった。陰性対照株はpYX242ベクターを含有するビール酵母菌334であった。選択培地(Aus 40
 50

ubelら、Short Protocols in Molecular Biology、13章：3-5(1992)中、特定の基質を存在させて培養物を25で40ないし48時間成長させた。pYES2にクローン化したホホバKCS遺伝子の発現はGAL1プロモーターの調節下であり、一方pYX242のプロモーターはTP1であり、これは構成要素である。従って、334(pCGN7875)および334(pYES2)培養物はガラクトースにより誘導される。各細胞ペレットの脂質分画のGC-FAME分析は前記するように実施した(Knutzonら、前記で引用)。

【0125】

異なる実験により得られたエロンガーゼ活性を図10Aおよび10Bで提供する。ホホバKCSはモノ不飽和脂肪酸18:1n-9長鎖を20:1n-9に伸長する。M.アルピナエロンガーゼ(MAELO)並びにビール酵母菌ELO2およびELO3間のアミノ酸相同性により、これらの遺伝子によりコードされたタンパク質は類似の基質特異性を有することが示唆された。M.アルピナエロンガーゼの活性、モノ不飽和脂肪酸および飽和脂肪酸長鎖の伸長(MAELO)は18:1n-9の20:1n-9への変換、また24:0の合成においても認められる。調節株、334(pYX242)では20:1および24:0の量は非常に少ししか、または全く検出されなかった(図10Aを参照のこと)。M.アルピナエロンガーゼ(MAELO)はまた少なくとも一つのPUFAに作用し、18:3n-6(GLA)を20:3n-6(DGLA)に変換する。全脂質における20:3n-6のパーセンテージは、対照334(pYX242)と比較した場合、M.アルピナエロンガーゼ(MAELO)cDNAを有する334(pRAE-5)および334(pRAE-6)において高い。製造した20:3n-6のパーセンテージは334(pYX242)で0.092%であり、対して334(pRAE-5)では0.324%であり、334(pRAE-6)で0.269%であった(図10Aおよび10Bの括弧に示す)。脂肪酸プロファイルにおけるこの差異はまた生成した20:3n-6の全量にも認められる。334(pYX242)により20:3n-6が0.226μgしか生成されなかったが、一方334(pRAE-5)および334(pRAE-6)では各々20:3n-6が2.504μg、および20:3n-6が1.006μg生成された。また、基質を加えない場合、20:3n-6のレベルは検出されなかった。

【0126】

一旦M.アルピナエロンガーゼ(MAELO)により20:3n-6を生じると、5-デサチュラーゼは望ましい発現系においてそれをAAに変換できる。この仮説を試験するために、pRAE-5およびpRAE-4構築物(プラスミドを含有する5-デサチュラーゼ)をビール酵母菌334に同時形質転換し、AA生成に関してスクリーニングした。使用した基質はGLA(18:3n-6)25μMであった。M.アルピナエロンガーゼ(MAELO)が酵母において活性である場合、次いで基質をDGLA(20:3n-6)に変換し、これを5-デサチュラーゼがAA(20:4n-6)に変換する。図11に示す結果よりAAの生成、すなわちM.アルピナエロンガーゼ(MAELO)の活性が確認される。

【0127】

エロンガーゼと共に、酵母における5-、6-および12-デサチュラーゼの発現により脂肪酸の外来性の供給を必要とせずにAAを生成(図1を参照のこと)するはずである。

【0128】

実施例IV

パン酵母におけるM.アルピナエロンガーゼcDNA MAELOおよびビール酵母菌エロンガーゼELO2の発現の比較

制限部位(下線部) BamHIおよびHindIII(各々)を組み込んだプライマー
 RO514(5'-GGC TAT GGA TCC ATG AAT TCA CTC
 GTT ACT CAA TAT G-3')およびRO515(5'-CCT GC
 C AAG CTT TTA CCT TTT TCT TCT GTG TTG AG

10

20

30

40

50

- 3) を用いて、酵母エロンガーゼをコード化する E L O 2 遺伝子をビール酵母菌ゲノムライブラリー (オリジーン、ロックビル、メリーランド州) からクローン化した。 E L O 2 遺伝子を B a m H I および H i n d I I I 部位でベクター p Y X 2 4 2 にクローン化し、これを p R E L O と称し、ビール酵母菌宿主 3 3 4 に形質転換し (H o v e l a n d ら、前記で引用)、P U F A エロンガーゼ活性に関してスクリーニングした。陰性対照としてベクタープラスミドを用い、P U F A エロンガーゼ活性を比較するために 3 3 4 (p R A E - 5) を成長させた。培地中ガラクトースを含まず、基質として 2 5 μ M G L A を添加して、前記するように培養物を成長させた。図 1 2 は 3 3 4 (p R A E - 5) により生成された 2 0 : 3 n - 6 または D G L A (1 8 : 3 n - 6 または G L A から伸長) の量を示すが、これは変化していないベクター p Y X 2 4 2 を含む陰性対照の約 4 倍になり、一方 2 個の別個のクローン 3 3 4 (p R E L O - 1) および 3 3 4 (p R E L O - 2) は陰性対照の 2 倍にしかならなかった。加えて、生成した D G L A を全脂質のパーセントとして表現した場合 (図 1 2 の括弧に示す)、クローン 3 3 4 (p R E L O - 1) および 3 3 4 (p R E L O - 2) は各々 D G L A 0 . 1 5 3 % および 0 . 2 % を生成し、一方 3 3 4 (p Y X 2 4 2) は D G L A 0 . 1 8 5 % を生成した。このようにこれらの株は全て類似のパーセンテージの D G L A を生成した。しかしながら、株 3 3 4 (p R A E - 5) は D G L A 0 . 2 7 9 % を生成し、3 3 4 (p Y X 2 4 2) (陰性対照) より 5 0 . 8 % 増加している。これらのデータは、ビール酵母菌エロンガーゼ遺伝子 E L O 2 が酵母において過剰発現する場合においてさえ、G L A を D G L A に効果的に伸長しないことを示している。対照、3 3 4 (p Y X 2 4 2) に比較して高量の D G L A が生成されることから明白であるように、M . アルピナ P U F A エロンガーゼ活性はこの変換に関して特異的である。

【 0 1 2 9 】

実施例 V

M A E L O を用いる別の供給源に由来するエロンガーゼの同定

T ファスト A アルゴリズム (P e r s o n および L i p m a n、前記で引用) を用いてクエリーペプチド配列および 6 個の読み枠の各々に翻訳されたデータベース D N A 配列間の類似性を検索した。G C G の G e n E M B L データベース (6 / 9 8) で G C G の T ファスト A 検索に翻訳された M A E L O をクエリーとして用い、翻訳 M A E L O に対するアミノ酸類似性の比較に基づいて別の潜在性エロンガーゼ配列を同定した。例えば図 1 3 および 1 4 において、2 個の整列化は染色体 I I I および M A E L O に由来する 2 個の異なるシー・エレガンス (C . e l e g a n s) 配列の翻訳の間に示されている。シー・エレガンス D N A 配列 (ジェンバンク受入番号 : Z 6 8 7 4 9) は G N S 1 (E L O 2) との類似性を意味すると注釈されており、一方さらにシー・エレガンス D N A 配列 (ジェンバンク受入番号 : U 6 1 9 5 4) は G N S 1 および S U R 4 (E L O 3) の両方に類似することが示されている。これらはスプライシングされた D N S フラグメントであり、ここではイントロンはゲノム配列から除去されており、エクソンが集められ翻訳されている。シー・エレガンスの推定 P U F A エロンガーゼおよび翻訳 M A E L O 間の同一アミノ酸の量は約 3 0 % である。これは脂肪酸代謝において共通する機能、例えば P U F A エロンガーゼを示している。図 1 5 は染色体 I I I に由来する翻訳シー・エレガンス配列 (ジェンバンク受入番号 : A F 0 0 3 1 3 4) の別の事例である。D N A 配列がビール酵母菌 E L O 2 に対して D N A 相同性を有することが同定された。この D N A 配列およびそのアミノ酸翻訳をさらに検査し、翻訳 M A E L O と相同性があることが決定された。従って、シー・エレガンスは P U F A エロンガーゼを含有し得る。

【 0 1 3 0 】

図 1 6 は各々マウスおよびヒトに由来する、翻訳 M A E L O を有する翻訳 D N A 配列の整列化を示す。マウス配列 C I G 3 0 (ジェンバンク受入番号 : U 9 7 1 0 7) を褐色脂肪組織から単離し、「酵母 S U R 4 タンパク質に類似する」と報告されている。図 1 6 に示すように、U 9 7 1 0 7 の翻訳のアミノ酸番号 1 3 0 ないし 1 5 2 は翻訳 M A E L O に対し高度の類似性を有する。染色体 4 に由来するヒト配列 (ジェンバンク受入番号 : A C

10

20

30

40

50

004050)はHTGS(ハイ・スループット・ゲノム・シーケンス)による。この配列に注釈はない。しかしながら、翻訳AC004050は翻訳MAELOと150個のアミノ酸において28.7%の相同性を有した。この遺伝子フラグメントは、翻訳MAELOに対するアミノ酸類似性に基づくと、ヒトPUFAエロンガーゼのフラグメントであり得る。

【0131】

図17は翻訳MAELOおよび哺乳動物配列(ジェンバンク受入番号: I05465、PCT番号WO88/07577)のアミノ酸整列化を示しており、これはこの配列の発現物に由来するタンパク質がポリコスリル化阻害因子であることを主張している。二つのタンパク質間のアミノ酸同一性は関連する機能、例えばPUFAエロンガーゼ活性があり得ることを意味している。

10

【0132】

別の翻訳DNA配列および翻訳MAELOに対するその相同性に関するこれらの実例は前記の実施例のいずれかが潜在的にPUFAエロンガーゼになり得ることを説明している。これらの実施例は可能なエロンガーゼ全てを包含するものではない。しかしながら、MAELOまたはそのアミノ酸翻訳をデータベース検索のクエリーとして使用してPUFAエロンガーゼ活性を有する別の遺伝子を同定することができる。

【0133】

実施例VI

ブランクハイブリダイゼーション法を用いるM.アルピナcDNAライブラリースクリーニング

20

M.アルピナに由来するさらなるPUFAエロンガーゼ遺伝子を単離するために、慣用的なブランクハイブリダイゼーション法を用いてラムダベクターに作成したM.アルピナcDNAライブラリーをスクリーニングした。MAELOヌクレオチド配列に基づいてDNAプローブを作り、これを用いてジブロックスベクター(Knutzら、J. Biol. Chem. 273: 29360-29366(1998))に作成したM7+8M.アルピナcDNAライブラリーをスクリーニングした。

【0134】

ライブラリーをスクリーニングするためのDNAプローブを作るために、MAELOcDNAをNspIおよびPvuI制限エンドヌクレアーゼで消化した。平均約300塩基対の大きさの小型DNAフラグメント3個を作り、プローブとして使用した。フラグメント化したMAELOcDNAの混合物を用いる原理はM.アルピナに存在する種々PUFAエロンガーゼに保存されているアミノ酸配列の共通の領域またはドメインがあるであろうという仮定に基づいている。標準的なプロトコル(Sambrookら、Molecular Cloning、第2版、コールド・スプリング・ハーバー(1989))に準じ、ブランクハイブリダイゼーション技術により、MAELODNAプローブを用いてcDNAライブラリーをスクリーニングした。

30

【0135】

簡単には、50000個の1次クローンをプレートし、ナイロン膜に移した。膜を変性し、20%ホルムアミド、0.2%PVP、BSA、フィコール、0.1%SDSおよび0.5MNaClを含有するハイブリダイゼーションバッファー中、アルファ³²P-dCTP標識MAELODNAプローブで一晩ハイブリダイズした。37で0.5XSSCを用いてフィルターを洗浄し、オートラジオグラフィー用にX線フィルムに曝露した。この手順を3回繰り返した。繰り返しハイブリダイズした4個のクローン(F1、F2、F3およびF4と称する)を取り、7%DMSOを含有するSMバッファー(Sambrookら、前記で引用)に懸濁した。

40

【0136】

各候補の最も大きいオープン・リーディング・フレームを酵母発現ベクターpYX242(ノバゲン・インコーポレーティッド、マジソン、ウィスコンシン州)にサブクローン化した。cDNAクローンF1およびF3をEcoRI部位でpYX242にサブクロー

50

ン化し、一方F2およびF4をNcoI/HindIII部位でサブクローン化した。酵母で発現するために、各候補を含有する組換えpYX242をSC334に形質転換した(Hovelandら、前記で引用)。エロンガーゼ活性および基質特異性を決定するために、実施例IIIに記載のGLA基質25 μ Mの存在下、ロイシンを欠く最低培地で各cDNAクローンを含有するSC334を成長させた。Knutzonら(J. Biol. Chem. 273: 29360-29366 (1998))に記載されるように脂肪酸分析を実施した。その結果、GLAのDGLAへの変換においてこれら4個のcDNAクローンはいずれも有意な活性を呈しないことが示された。このように、さらなるPUFAエロンガーゼの同定には、ハイブリダイゼーション法は成功しないようである。

【0137】

実施例VII

酵母におけるM. アルピナの直接cDNA発現ライブラリーの構築

MAELO以外のPUFAエロンガーゼ遺伝子を同定するために、異なる方法でM. アルピナcDNAライブラリーをスクリーニングした。とりわけ、パン酵母がデサチュラーゼおよびエロンガーゼの各々を欠如しているために長鎖PUFAを生成することができないので、ビール酵母菌にM. アルピナの発現cDNAライブラリーを構築する試みを行った。ビール酵母菌におけるcDNAライブラリーを発現するために、GAL1プロモーターを含有するベクターpYES2(ノバゲン・インコーポレーティッド、マジソン、ウィスコンシン州)を選択した。

【0138】

cDNAを作成する慣用的な方法(すなわちDNA混合物をライゲートしたcDNA/ベクターの宿主細胞への形質転換)は酵母においては困難である。なぜならばライゲートしたDNA混合物の直接的エレクトロポレーションによる形質転換効率は精製スーパーコイル化プラズミドDNAの効率に比較して非常に低い。しかしながらこの方法の主に優れた点は中間体として大腸菌(E. coli)にライブラリーを作成した場合に起こる1次クローンの増幅を避けられることである。スクリーニングされるコロニー数が制限されるために、cDNA/ベクターライゲーション混合物を用いて異なるビール酵母菌株において形質転換する効率を最初に最適化することが決まっている。得られた最もよい結果ではビール酵母菌株SC334におけるライゲートしたDNAの μ gあたり4ないし 5×10^5 の形質転換体を生じた(Hovelandら、前記で引用)。

【0139】

酵母に直接的M. アルピナcDNA発現ライブラリーを作成するために、全RNAを真菌類から単離した。M. アルピナ真菌類(ATCC番号: 32221)をコーンミール寒天(ディフコ・ラボラトリーズ、デトロイト、ミシガン州)上にプレートし、室温で3ないし4日間成長させた。一度菌類の成長が可視化されると、これをジャガイモデキストロースブロス50mlに接種し、室温で非常にゆっくりと振盪して孢子を形成させる。一度孢子が可視化されると、培養物50mlをジャガイモデキストロースの培養物1lに接種し、孢子を72時間成長させた。滅菌ガーゼを通してろ過した後、さらにRNA抽出するためにすぐに細胞を液体窒素で凍結した。熱フェノール/LiCl抽出法(Sambrookら、前記で引用)を用いて細胞ペレット36gから全RNAを調製した。10mM EDTA、1% SDSおよび200mM 酢酸ナトリウムの溶液(pH4.8)中で細胞ペレットをホモジナイズした。ホモジネートにフェノールおよびクロロホルムを加え、水層を抽出した。再度フェノールおよびクロロホルムで水層を戻し抽出した。次いで4M 塩化リチウム等量を加えた。氷上で3時間サンプルをエタノール沈殿させ、遠心によりペレットを得た。RNAペレットを70%エタノールで洗浄し、DEPC処理した水に再懸濁した。分光測光法により全RNAを定量し、アガロースゲル電気泳動により可視化し、28Sおよび18Sリボソームのバンドの存在を確認した。細胞ペレット36gから全RNA約15mgを得た。

【0140】

標準的なプロトコル(Sambrookら、Molecular Cloning、第

10

20

30

40

50

2版、コールド・スプリング・ハーバー(1989))に準じてライブラリーを構築した。オリゴdTセルロース・アフィニティー精製を用いて全RNAからメッセンジャーRNAを調製した。AMV逆転写酵素を用いてXhoI制限部位を含有するオリゴdTプライマーでメッセンジャーRNAを逆転写した。cDNAの第1の鎖を合成した後、大腸菌DNAポリメラーゼ、大腸菌DNAリガーゼおよびRNAアーゼHを添加してcDNAの第2の鎖を合成した。

【0141】

T4 DNAリガーゼによりEcoRIアダプタをプラント末端化したcDNAにライゲートした。T4ポリヌクレオチドキナーゼを用いてcDNAサンプルをキナーゼ処理し、XhoIで消化し、カラムバッファーで希釈し、セファクリルS-400カラムに通した。高塩濃度バッファーによりDNAサンプルを希釈した。400ないし5000塩基対のDNAを含有するサンプルをプールし、これをpYES2ベクター(インビトロゲン・コーポレーション、カールスバッド、カリフォルニア州)へのライゲーションに用いた。T4 DNAリガーゼを用いてEcoRI/XhoI消化pYES2ベクターにcDNAをライゲートした。酵母の直接的形質転換には多量のライゲート化DNA(2ないし3µg)が必要であるので、大容量のライゲーション反応を実施した。

10

【0142】

cDNA/pYES2ライゲート化混合物で酵母細胞を直接形質転換するために、LiAc TRAF法を用いてコンピテントSC334細胞を調製した(Gietzら、Mol. Cell. Biol. 5:255-269(1995))。簡単には、プレートからのSC334の新鮮培養物をYPD培地50mlに接種した。30で振盪しながら600でのODが1.0に達するまで培養物を成長させた。この出発物質30mlをYPD液体培地300mlに接種し、培養物の細胞数が~3ないし5x10⁶セル/mlに達するまで(約3ないし4時間)振盪しながらインキュベートした。細胞を収穫し、滅菌水で洗浄した。全細胞ペレットを新しく調製した1X TE/LiAc(0.1M LiAc)1.5mlに再懸濁した。すぐにこれらの細胞を形質転換に用いた。

20

【0143】

コンピテントSC334細胞750µlを15mlファルコンチューブに等分した。cDNA/pYES2ライゲートしたDNAの約2µgを担体DNAと共に細胞に加え、穏やかに混合した。滅菌した40%PEG/LiAc3mlを細胞に加え、穏やかにしかし完全に混合した。振盪しながら30で30分間細胞をインキュベートし、続いて42で15分間熱ショックを与えた。細胞を冷却し、ペレット化し、1X TE5mlに再懸濁した。前記の細胞の100µlアリコートウラシル不含の150mm選択寒天プレート50個にプレートし(Ausubel、前記で引用)、30で3日間インキュベートした。全部で8x10⁵個の1次クローンを得た。5個のコロニーをウラシル不含の最低培地1mlにプールし(Ausubelら、前記で引用)、貯蔵用にグリセロールを添加した。全部で5000個のプールをスクリーニング用に作った。

30

【0144】

実施例VII

酵母におけるMAD(M.アルピナ直接)スクリーニング

40

ライブラリーにおけるcDNAの平均の大きさを決定することによりライブラリーの品質を分析した。ライブラリーのスクリーニングがcDNAの発現に基づいているので、ライブラリーに存在するcDNAの平均の大きさを決定することが重要である。最も長いcDNAを含有する発現ライブラリーを選択するのが、目的のcDNA全長を単離するために最も適切であろう。この目標のために、実施例VIIに記載するように、無作為に選択したプールを選択寒天プレートにプレートし、個々のコロニーを得た。40個の異なる酵母コロニーを無作為に取り、各コロニーをウラシル不含の選択液体培地5mlに接種し(実施例VIIに記載するように)、30で24時間、振盪しながら成長させた。ピース・ピーティング法(Hoffmanら、Gene、57:267(1987))を以下のように適応させてこれらのコロニーからプラスミドDNAを抽出した:

50

100 mM NaCl、10 mM トリス、pH 8.0、1 mM EDTA および 0.1 % SDS 溶液 0.5 ml 中培養物 5 ml からのペレットを溶解した。等量の滅菌 0.5 mm ガラスビーズを加え、3 分間手動で攪拌した。同じバッファー 200 μ l を加え、混合物をさらに 1 分間攪拌した。サンプルを高回転で 2 分間遠心し、次いで新しいチューブに細胞抽出物を移した。等容量のフェノール/CHCl₃ をサンプルに加え、攪拌し、再度 2 分間遠心した。水層を 2 回再抽出し、0.3 M 酢酸ナトリウムおよび約 2.5 容量のエタノールを用いて -20 で 30 分間沈殿させた。70 % エタノールで沈殿物を洗浄し、水に再懸濁した。RNA およびいかなるタンパク質夾雑物をも排除するために、製造者プロトコルに準じて QIA プレップ・スピン・ミニプレット・キットを用いて (キアゲン・インコーポレーティッド、バレンシア、カリフォルニア州)、40 個の異なるサンプルから単離したプラスミド DNA をさらに精製した。次いで EcoRI および XhoI 制限エンドヌクレアーゼでプラスミド DNA サンプルを制限して cDNA フラグメントを放出し、1 % アガロースゲル上で消化物を分析した。その結果、直接ライブラリーの cDNA の大部分が 0.8 キロ塩基対から 1.5 キロ塩基対の長さで変動することが示された。

【0145】

ライブラリーをスクリーニングするために、グリセロール保存物を解凍し、約 0.5 ml をウラシル不含 (Ausubel ら、前記で引用) の液体選択培地 5 ml に加え、30 で 24 時間成長させた。次いで培養物を 2 % ガラクトースおよび 25 μ l GLA (エロンガーゼ酵素の基質) を含むウラシル不含液体選択培地 50 ml に移して 25 で 24 時間攪拌した。各々の誘導培養物の細胞ペレット中の脂質含量の GC-FAME 分析を前記のように実施した (Knutzon ら、前記で引用)。MAELO (ウラシル不含選択培地中で成長した pYX242 の pRAE-5) を各バッチのランにおける陽性対照として用いた。MAELO は一貫して GLA の 1.5 % を DGLA に変換できる (実施例 I I I を参照のこと)。

【0146】

実施例 I X

潜在 PUFFA エロンガーゼをコードする cDNA の同定

GC-FAME 分析により約 750 個の個々のプールをスクリーニングおよび分析した後、実施例 V I I I に記載するように、5 個のコロニーからなる 1 個のプール (すなわち MAD708) が GLA の DGLA への変換における有意な酵素活性を有すると考えられた。DGLA/GLA 比率に関してこの活性は M. アルピナエロンガーゼ活性 (MAELO) よりも約 5 倍の-high ことが認められた (図 19)。同じアッセイ条件下でプールを再度試験し、最初の知見を確認した。反復試験により GLA が DGLA に 9.5 % 変換され、M. エアルピナエロンガーゼ活性 (MAELO) より約 5 倍高かった。これらの結果より MAD708 プールが、基質である GLA に特異的なエロンガーゼ候補を含有することが強く示された。MAD708 が異なる 5 個のクローンからなる 1 個のプールであるので、このプールからエロンガーゼ活性をコードする個々の cDNA クローンを単離する必要があった。そのために元来の MAD708 グリセロール貯蔵物をウラシル不含の選択培地寒天プレートにプレートした (Ausubel ら、前記で引用)。30 個の個々のコロニーを取り、実施例 V I I I に前記するように、GLA の存在下ウラシル不含で 2 % ガラクトースを含む液体選択培地で成長させた。次いで各培養物から得られた細胞ペレットを陽性対照が 334 (pRAE-5) (pYX242 の MAELO) の脂肪 GC-FAME 分析 (Knutzon ら、前記で引用) に供した。酵母の MAD708 発現プールからの 30 個の個々のクローンの脂肪酸分析により、30 個のクローンのうち 5 個が GLA の DGLA への変換においてエロンガーゼ活性を示すことが明らかにされた。活性クローン MAD708-2、MAD708-10、MAD708-18、MAD708-19 および MAD708-30 の脂肪酸プロファイルを図 20 に示す。この図に示されるように、MAD708-2、10 および 30 が最も DGLA を生成し、MAELO (pRAE-5) の約 25 倍以上である。これらの 3 個は 41 % ないし 49 % の範囲で GLA を DGLA に変換する。その他のクローン、MAD708-18 および MAD708-19 は 8 % および

10

20

30

40

50

21% GLAをDGLAに変換する。全てのMAD708クローンはエロンガーゼをコードするMAELOに関して高いパーセンテージでGLAをDGLAに変換する(3.4%)。

【0147】

実施例X

エロンガーゼをコードするcDNAの特性化

実施例VIIに記載するように、ビーズビーティング法により有意なGLA特異性エロンガーゼ活性を呈するSC334酵母クローン(MAD708プール)からプラスミドDNAを抽出した。cDNA挿入物の大きさを決定するために、陽性エロンガーゼクローンから得た各プラスミドDNAを鋳型として用いてPCRを実施した。順行プライマーRO541(5'-GAC TAC TAG CAG CTG TAA TAC-3')および逆行プライマーRO540(5'-GTG AAT GTA AGC GTG ACA TAA-3')はpYES2ベクターのマルチクローニング部位にあり、EcoRIおよびXhoI部位内のcDNA挿入物を増幅するのに使用した。プラスミドDNA 4マイクロL、各プライマー50ピコモル、10Xバッファー5μL、10μM PCRヌクレオチドミックス(ベーリンガー・マンハイム・コーポレーション、インディアナポリス、インディアナ州)1μLおよびハイ・ファイブ・Taqポリメラーゼ(ベーリンガー・マンハイム・コーポレーション、インディアナポリス、インディアナ州)0.5μL含有する50μL容量中PCRを実施した。増幅は以下のように実施した: 94 で2分間変性、次いで94 で1分間、55 で2分間、および72 で3分間、30サイクル、増幅の最後に72 で7分間延長。PCR増幅生成物を1%アガロースゲル上で分析し、エロンガーゼcDNAの大きさが約1.0ないし1.2キロ塩基対であることが示された。潜在エロンガーゼcDNAを含有するプラスミドDNAをpRPB2、pRPB10、pRPB18、pRPB19およびpRPB30と称する。pYES2ベクターのEcoRIおよびXhoI部位でcDNAライブラリーを作成したので、前記プラスミドをEcoRIおよびXhoIで消化することにより各プラスミドに存在するcDNAの大きさをさらに確認した。

【0148】

cDNAクローンの長期保存用およびDNAシーケンシング用に酵母から単離したプラスミドDNAを大腸菌で再増幅した。製造者プロトコルに従って、大腸菌TOP10(インビトロゲン・コーポレーション、カールスバッド、カリフォルニア州)細胞をpRPB組換えプラスミドで形質転換した。各プラスミドDNAから得た形質転換体をアンピシリン(50μg/ml)含有LBに接種し、振盪しながら37 で一晩成長させた。製造者プロトコルに従ってQIAブレップ・スピン・ミニブレップ(キアゲン・インコーポレーティッド、バレンシア、カリフォルニア州)を用いてこれらの培養物からプラスミドDNAを単離した。次いで精製プラスミドDNAを用いて5'および3'の両末端よりシーケンシングした。製造者プロトコルに従って373AストレッチABI自動DNAシーケンサー(パーキン・エルマー、フォスター・シティ、カリフォルニア州)を用いてDNAシーケンシングを実施した。シーケンシングに用いたプライマーはpYES2ベクターのマルチクローニング部位に含まれる順行プライマーRO541(5'-GAT TAC TAG CAG CTG TAA TAC-3')および逆行プライマーRO540(5'-GTG AAT GTA AGC GTG ACA TAA-3')である。得られたヌクレオチド配列を分析するためにシーケンサー・ソフトウェア・プログラム(ジーン・コード・コーポレーション、アン・アルボア、ミシガン州)に移した。DNA配列分析により5個のエロンガーゼcDNA全てが301ヌクレオチドの共通重複と同等のヌクレオチドを含有することが示された。各DNA配列は5'末端の初めに推定出発部位を、3'末端でポリAテールを有する停止コドンを含む。DNA配列をさらに確認するために内部の順行プライマーRO728(5'-GAG ACT TTG AGC GGT TCG-3')およびRO730(5'-TCT CTG CTG CG T TGA ACT CG-3')を逆行プライマーRO729(5'-AAA GCT

CTT GAC CTC GAA C - 3') および RO731 (5' - AAC TTG ATG AAC GAC ACG TG - 3') と共に cDNA 内に設計し、pRPB2 のシーケンシングに用いた。なぜならばこの候補は最も高いエロンガーゼ活性を有するからである。シーケンサープログラムにより全ヌクレオチド配列を分析し、pRPB2 の全 cDNA 配列から推測される最も長いオープン・リーディング・フレームは 957 塩基対の長さであると考えられた (図 22)。次いで推測されるオープン・リーディング・フレームを対応するアミノ酸配列に翻訳し、予測される配列を 図 23 に示す。M. アルピナから同定された cDNA によりコードされたエロンガーゼは 318 アミノ酸長のタンパク質であると考えられ、これは翻訳 MAELO の大きさとほとんど同等である。この新規エロンガーゼを「GLELO」と称し、そのコード化タンパク質を「GLAエロンガーゼ」と命名した。

10

【0149】

ブダペスト条約の条件下、1999年7月22日にプラスミドDNA pRPB2をアメリカン・カルチャー・コレクション、10801 ボウルバード大学、マナサス、バージニア州20110-2209に寄託した。これにはATCC寄託番号：PTA-402が付与された。

【0150】

実施例XI

GLAエロンガーゼ (GLELO) の生化学的特性

A. GLAエロンガーゼ活性の確認

20

pRPB2組換えプラスミドによりコードされたGLAエロンガーゼの活性をさらに確認するために、pRPB2プラスミドを含有する酵母クローンSC334でエロンガーゼ活性スクリーニングを繰り返した。またこの実験を行うことにより一貫した脂質抽出を確実にし、4つの別個の実験を平均化することによりGLAエロンガーゼ活性を検出できた。pRPBを含有するビール酵母菌334グリセロール貯蔵物をウアシル不含の最低培地寒天プレートにプレートした。個々のコロニーを無作為に取り、実施例VIIIIに記載するように、ウアシル不含の最低培地で成長させた。4個の別個の培養物を組み合わせ、5mlアリコートを用いて4個の別個の培養物50mlに接種した。次いでGLAの存在下培養物を成長させ、実施例VIIIIに記載するように、pYES2を含有するビール酵母菌334の陰性対照と共に脂肪酸分析に供した。25μM GLAを含む334 (pRPB2) の4個の別個の培養物の平均エロンガーゼ活性を 図 24 に示す。334 (pRPB2) の4個の別個のサンプルの各々のGLAエロンガーゼ活性は62%のGLAのDGLAへの平均変換に一致すると考えられた。

30

【0151】

B. GLAエロンガーゼに関するGLELO基質特異性の決定

GLAエロンガーゼの基質特異性を分析するために、334 (pRPB2) の培養物をGLAに加えて別の脂肪酸基質 (例えばSA (18:0)、OA (18:1)、LA (18:2 n-6)、AA (20:4 n-6)、ADA (22:4 n-6)、ALA (18:3 n-3)、STA (18:4 n-3)、およびEPA (20:5 n-3)) で試験した。同等のアッセイ条件下でエロンガーゼ酵素により利用される唯一の別の基質はn-3経路の脂肪酸、STAであった。GLAエロンガーゼは73%のSTAを20:4 n-3に変換できた (図 25)。これらの実験より、GLAエロンガーゼがGLAとSTAの両方に基質特異性を有すると結論づけられ、これはこれがn-6およびn-3経路の両方でエロンガーゼ活性を有していることを示している。

40

【0152】

C. 酵母における菌類のGLELOおよび5-デサチュラーゼ遺伝子の同時発現

望ましい同時発現系において一度GLAエロンガーゼによりDGLA (20:3 n-6) を生成すると、5-デサチュラーゼがそれをAA (20:4 n-6) に変換できる。図1で表されるように、この反応図式はEcoRI部位でクローン化されたプラスミドpRPB2およびpRPB31 (5-デサチュラーゼcDNAを含有する組換えプラスミ

50

ド p Y X 2 4 2) (図 1 8) を用いてビール酵母菌 3 3 4 を同時形質転換することにより試験できる。同時形質転換した酵母培養物に 2 5 μ M G L A を補充し、A A 合成に関して分析した。エロンガーゼおよび 5 - デサチュラーゼ酵素の両方を発現する場合、G L A 基質は D G L A に変換され、これは次いで A A に変換される。2 6 A の結果は G L A エロンガーゼおよび 5 - デサチュラーゼの G L A 基質に及ぼす一連の作用の結果、平均 2 7 % の G L A を A A に変換する。従って、G L A エロンガーゼは n - 6 P U F A 合成経路において別の酵素と働いて望ましい脂肪酸を生成することができる。

【 0 1 5 3 】

前記の変換が n - 3 経路でも真実であるかどうかを決定するために、2 5 μ M S T A の存在下同様の同時発現実験を実施した。再度両酵素を発現する場合、S T A 基質は 2 0 : 4 n - 3 に変換され、これが 5 - デサチュラーゼにより E P A (2 0 : 5 n - 3) に変換される。図 2 6 B では E P A の生成 (約 4 0 %) が観察されたことを示している。再度、G L A エロンガーゼが n - 3 経路において 5 - デサチュラーゼと共に働いて望ましい脂肪酸を生成できることが示された。

【 0 1 5 4 】

実施例 X I I

G L E L O およびその他の菌類のエロンガーゼ間の配列比較

G C G の配列分析パッケージ (実施例 I を参照のこと) を用いて G L E L O 配列を既知タンパク質配列と比較した。G L E L O オープン・リーディング・フレームのヌクレオチド配列が最初に翻訳され、これをクエリー配列として用いてファスト A アルゴリズム (実施例 I を参照のこと) を用いるスイスポートデータベース (実施例 I を参照のこと) を検索した。アミノ酸配列類似性にに基づき、ビール酵母菌 Y J T 6 (未知の注釈を付した E S T) と 1 8 9 個のアミノ酸重複において 3 3 . 9 % の同一性、ビール酵母菌 E L O 2 (G N S 1) と 2 9 5 個のアミノ酸重複において 2 5 . 8 % の同一性、およびビール酵母菌 E L O 3 (S U R 4) と 3 1 3 個のアミノ酸重複において 2 5 . 2 % の同一性で最も適合することが見出された。G L E L O の M A E L O とのファスト A 整列化により 2 7 5 個のアミノ酸において 3 0 . 9 % の同一性が示された (図 2 7) 。発展的なペア化した整列化を用い (実施例 I を参照のこと) 、前記のエロンガーゼと共に用いて G C G パイルアッププログラムにより、関連する配列群から多数の配列整列化を作った。パイルアップの結果により、エロンガーゼには推定ヒスチジンボックスを含む多くの保存領域があり、これには下線を付してある (K n u t z o n ら、J . B i o l . C h e m . 2 7 3 : 2 9 3 6 0 - 2 9 3 6 6 (1 9 9 8)) (図 2 8) 。このように、G L E L O は M A E L O と類似性を有するが、基質優先性は恐らくコード化されたエロンガーゼにおける差異によるものであろう。G L A エロンガーゼは M . アルピナよりも高いパーセンテージで G L A を D G L A に変換できる。加えてビール酵母菌における M A E L O の発現は G L A の D G L A への伸長に加え、飽和およびモノ不飽和脂肪酸の伸長を呈する (実施例 I I I を参照のこと) 。

【 0 1 5 5 】

実施例 X I I I

哺乳動物における M . アルピナ M A E L O 相同性の同定

M A E L O 翻訳配列を用いてアボット・ラボラトリーズ、1 0 0 アボット・パーク・ロード、アボット・パーク、イリノイ州 6 0 0 6 4 のユニファイド・ヒューマン・トランスクリプト・データベースを検索した。ベーシック・ローカル・整列化・サーチ・ツール (B L A S T) (A l t s c h u l ら、N u c . A c i d s . R e s . 2 5 : 3 3 8 9 - 3 4 0 2 (1 9 9 7)) を用いてデータベースを検索した。このツールは「クエリーがタンパク質であるか D N A であるかにかかわらず、全ての可能な配列データベースのすべてを探るために設計された一連の類似性検索プログラムである」。具体的には、ツブラストン (t b l a s t n) アルゴリズムを用いた (すなわち 6 個の読み枠で翻訳されたヌクレオチドデータベースに対するタンパク質クエリー検索) 。ユニファイド・ヒューマン・トランスクリプト・データベースにおけるコンティグ (C C) 配列は共通のドメインおよび発現配列タグ (E S T) の I n c y t e L I F E S E Q (登録商標) データベース (イン

サイト・ファーマシューティカルズ・インコーポレーティッド、3174ポーター・ドライブ、パロ・アルト、カリフォルニア州94304) (規定した配列相同性に基づいてクラスター化し、重複配列に基づいてアセンブルする) に由来する発現配列タグ(EST) cDNAの群を代表するコンセンサス配列である。このデータベースからの2個の配列、CC067284R1およびCC1484548T1は各々翻訳MAELO配列を有し、242個のアミノ酸重複において28%の同一性、266個のアミノ酸重複において28.6%の同一性を有した。2個の誘導および編集した配列を各々hs1およびhs2と称し、GCGの配列分析ソフトウェアパッケージにコピーした(実施例Iを参照のこと)。ファストAアルゴリズムを用いて翻訳MAELO配列を翻訳HS1(242個のアミノ酸において28.5%の同一性)および翻訳HS2(266個のアミノ酸において28.2%の同一性)cDNA配列と整列化し、各々図29および30に示した。HS1 cDNAヌクレオチド配列はまた844塩基対においてI05465ヌクレオチド配列と86.9%の同一性を有した(実施例Vを参照のこと)。翻訳HS2 cDNA配列は受入番号:W74824のジェンバンクからのアミノ酸配列と100%の同一性を有した(公開PCT出願WO9839448を参照のこと)。

【0156】

ナショナル・センター・フォー・バイオテクノロジー・インフォメーション(NCBI、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)を用いてAC004050(TファストA検索で同定されたヒト配列、実施例Vを参照のこと)から翻訳された28個のアミノ酸配列(DTIFILRKQLIFLHWYHHITVLLYSW)を有するツプラストンを用いるデータベース検索を行った。このアミノ酸配列はヒスチジンボックス(下線部)を含み、これはデサチュラーゼ(Knutzonら、前記で引用)並びにMAELOおよびGLELOの両方のPUFAエロンガーゼの注目すべきモチーフを有する(図28を参照のこと)。実施例Vにおいて前記した翻訳マウス配列(ジェンバンク受入番号:U97107)および翻訳シー・エレガンス配列(ジェンバンク受入番号:U41011)はこの28個のアミノ酸クエリーと高度に適合する。翻訳U41011をクエリーとして用いてNCBIマウスESTデータベースを再度ツプラストンで検索した。さらなるマウス配列を同定し(ジェンバンク受入番号:AF014033.1)、「脂肪酸伸長における関与が推定される」と注釈した。マウスESTデータベースを翻訳AF014033.1でツプラストン検索することによりこれらの長い配列(ジェンバンク受入番号:AA591034、AA189549、およびAA839346)を同定し、mm2と称する1個の配列と組み合わせた。翻訳mm2およびMAELOのファストA整列化(実施例Iを参照のこと)を図31に示す。関連するが同一ではない別のマウス配列(ジェンバンク受入番号:AI225632)をもAF014033.1でマウスESTデータベースのツプラストン検索において同定した。MAELOに対する翻訳AI225632のファストA整列化を図32に示す。翻訳MM2およびAI225632の両方の翻訳MAELOとの同一性パーセントは各々19.1個および11.5個のアミノ酸重複において30.4%である。これらの2個の翻訳マウス配列と翻訳MAELOとのアミノ酸同一性のレベルより、これらがPUFAエロンガーゼの推定相同体であることが確認される。

【0157】

実施例XIV

哺乳動物におけるM・アルピナGLELO相同体の同定

クエリーとして翻訳GLELOを用いて、タンパク質配列を6個の読み枠の各々において翻訳されているデータベースDNA配列と比較するTファストAアルゴリズムを使用した。GCGのジーンEMBLデータベースを用いて、翻訳GLELOに対するアミノ酸類似性に基づいて別の潜在するエロンガーゼ配列を同定した。3個のヒト配列がGLELOアミノ酸配列に適合することが解った。これらの配列はジェンバンク受入番号:1)AI815960、2)AL034374および3)AC004050を有する。AI815960、ホモ・サピエンEST配列は144個のアミノ酸重複において翻訳GLELOと

10

20

30

40

50

40.3%の同一性を有する(図33を参照のこと)。ヒトゲノムの翻訳領域、AL034374は染色体VIに由来し、60個のアミノ酸重複において翻訳GLELOと46.7%の同一性を有する(図33を参照のこと)。AL034374における相同領域は翻訳MAELOと同一性を有することが示されているHS1アミノ酸配列の一部であると考えられる(実施例XIIIを参照のこと)。従って、HS1配列はMAELO(図29を参照のこと)とGLELO(図34を参照のこと)の両方と類似性を有する。染色体IVに由来するヒトゲノム配列AC004050の翻訳領域は89個のアミノ酸重複において翻訳GLELOと34.8%の同一性を有する(図35を参照のこと)。GLELOとこれらのヒト配列間のアミノ酸同一性により、これらのヒト配列に由来するタンパク質がPUFAエロンガーゼ活性のような機能と関連し得ることが示される。

10

【0158】

GLELOに類似するマウスcDNAを同定するために、翻訳GLELOをクエリーとして用い、ジーンEMBLでTファストA検索を実施した。TファストA検索により翻訳GLELOに高度に適合する3個のマウス配列を同定した:(ジェンバンク受入番号:1)AF104033、2)AI595258および3)U97107)。AF104033には「酵母ELO3(SUR4)に相同である推定脂肪酸エロンガーゼを有するMUELタンパク質」と注釈し、これはMM2の配列の一部である。MM2配列は最初AF104033マウス配列から誘導したが、最終的にはさらなるマウスESTデータベース検索により全MM2配列を得、これもまた翻訳MAELOと相同であることが示された(実施例XIIIおよび図31を参照のこと)。ファストAを用いてこのMM2アミノ酸配列を翻訳GLELO配列と整列化した場合、211個のアミノ酸重複において34.6%の同一性が見出され(図36を参照のこと)、このことはMM2もまたGLELOと相同であることを示している。AI595258は酵母ELO3エロンガーゼと5'類似性を有するマウスcDNAクローンであり、マウスEST cDNA AI225632の一部である。AI225632マウス配列はAI595258よりも長い配列であり、翻訳MAELOと類似性を有することが示された(図32を参照のこと)。AI225632をまた翻訳GLELOとも整列化し、ファストAアルゴリズムを図37に示す。199個のアミノ酸重複において35.3%の同一性が見出された。第3の配列、U97107はマウス配列であり、「酵母ELO3(SUR4)遺伝子に類似する」と注釈されている。翻訳GLELOのU97107との整列化を図38に示すが、ここでは279個のアミノ酸重複において23.7%の同一性が見出された。前記するように、ファストA整列化に基づいてU97107の領域はまたMAELOと高度な相同性を有することも見出された(実施例Vおよび図16を参照のこと)。

20

30

【0159】

前記の検索により、クエリーとしてMAELOまたはGLELOのいずれかを用いて同一のヒトおよびマウス配列が得られることが明白に示された。

【0160】

実施例XV

別のPUFA生成生物におけるM.アルピナGLELOおよびMAELO相同体の同定
A)カエノルハブディティス・エレガンス

40

シー・エレガンスの染色体配列から推測される推定アミノ酸配列(ジェンバンク受入番号:U41011)は、GLAエロンガーゼ(GLELO)およびM.アルピナエロンガーゼ(MAELO)の両方とアミノ酸類似性を有するマウスMM2推定PUFAエロンガーゼに含まれる部分配列を同定できる。従ってGLELOまたはMAELOのシー・エレガンス相同体が線虫データベースに存在するかもしれないと考えられる。GLELOおよびMAELO配列に由来する推定アミノ酸配列をクエリーとして用いて別個に線虫データベースを検索した。BLAST検索(実施例XIIIを参照のこと)をウォームペップ16(ブラストプ(blastp))はヌクレオチド配列データベースに対してアミノ酸クエリー配列を比較する)およびウォームペップ16cDNA(ツブラストン)データベース(これはシー・エレガンスゲノムシクエンシングプロジェクトまたはESTおよびその対

50

応する cDNA 配列から得られるタンパク質および cDNA を予測する) で実施した。これらの配列データはシー・エレガンスシークエンシング群により作られ、サンガー・センターおよびゲノム・シークエンシング・センターにより統合され、ftp://ftp.sanger.ac.uk/pub/databases/wormpep/より入手できる。少なくとも7個の推定シー・エレガンス翻訳ハイブリダイゼーションを GLELO および MAELO の両方の翻訳アミノ酸配列に相同であるアミノ酸配列により同定した。推定アミノ酸を含有するこれらのゲノム配列のジェンバンク受入番号は Z19154、U68749 (2個の推定タンパク質 (F56H11.4 および F56H11.3 (ウォームペップ受入番号)))、U41011、U61954 (2個の推定タンパク質 (F41H10.7 および F41H10.8 (ウォームペップ受入番号))) および Z81058 であると同定された。これらの下線部分は翻訳 MAELO をクエリーとして用いる前記の検索において同定された (実施例 V を参照のこと)。实例として、翻訳 GLELO および MAELO を有する翻訳 U68749 (F56H11.4) のファストAアミノ酸整列化を図39および40に示す。翻訳 U68749 (F56H11.4) は約200個のアミノ酸重複において M・アルピナエロンガーゼおよび GLA エロンガーゼの両方と 25 ないし 30% の同一性を有する (図39、40 を参照のこと)。7個の翻訳推定シー・エレガンス cDNA の全てに関して、翻訳 GLELO に対するファストA整列化により 200個のアミノ酸重複で同一性が 25 ないし 30% であり、一方翻訳 MAELO に関しては同一性は少なくとも 188 個のアミノ酸重複において 26 ないし 34% であった。整列化の類似性により翻訳 GLELO または MAELO のいずれかを用いてエロンガーゼ活性を有するシー・エレガンス由来の潜在遺伝子を同定できる。

10

20

【0161】

B) ドロソフィラ・メラノガスター (*Drosophila melanogaster*)

NCBI (実施例 XIIII を参照のこと) による「その他の EST」データベースのブラストン検索 (ヌクレオチドデータベースに対してヌクレオチドクエリー配列を比較する) において、ゲノム配列 U41011 (シー・エレガンス) の翻訳推定 cDNA はドロソフィラ・メラノガスター (*Drosophila melanogaster*) EST (受入番号: AI134173) と高度に適合し、重複 DNA EST フラグメント (受入番号: AI517255) と共にアセンブルした。GCG のファストAを用いて2個の重複配列に由来する翻訳 DNA フラグメント DM1 を翻訳 GLELO および MAELO (図41および42を参照のこと) と整列化した (実施例 I を参照のこと)。整列化により206個のアミノ酸重複において GLA エロンガーゼと 27.2% の同一性が示され、237個のアミノ酸重複において M・アルピナエロンガーゼと 30% の同一性が示された。このように、アミノ酸類似性に基づいて、DM1 を PUF A エロンガーゼ様活性を有する GLELO または MAELO に対する潜在相同体であり得る。さらに、データベース検索のためのクエリーとして GLELO および MAELO の DNA 配列を用いて、ドロソフィラから PUF A エロンガーゼ活性を有する相同体を同定できる。

30

【0162】

実施例 XVI

ヒト PUF A エロンガーゼ相同体のクローニングおよび発現

翻訳 GLELO および / または MAELO に対するアミノ酸類似性に基づいて、多くの潜在 PUF A エロンガーゼを同定した。これらの配列の潜在エロンガーゼ活性を決定するために、次いで、本実施例で示すように、タンパク質全長をコードする cDNA を同定し、クローン化し、発現した。

40

【0163】

推定 HS1 配列に基づいてプライマー RO719 (5' - GGT TCT CCC ATG GAA CAT TTT GAT GCA TC - 3') および RO720 (5' - GGT TTC AAA GCT TTG ACT TCA ATC CTT CCG - 3') を設計し、これを用いてヒト肝臓マラソン・レディー cDNA (クロンテック・

50

ラボラトリーズ・インコーポレーティッド、パロ・アルト、カリフォルニア州)を増幅した。ヒト肝臓マラソン・レディー cDNA 5 µl、各プライマー50ピコモル、10 mM PCRヌクレオチドミックス(ベーリンガー・マンハイム・コーポレーション、インディアナポリス、インディアナ州)1 µl、10X バッファ5 µlおよびアドバンテージ・クレンTaq・ポリメラーゼ・ミックス(クロンテック・ラボラトリーズ・インコーポレーティッド、パロ・アルト、カリフォルニア州)を含有する50 µl容量で、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を実施した。パーキン・エルマー9600(ノーウォーク、コネチカット州)の熱循環器条件は以下のとおりであった: 94 で2分間、次いで94、1分間を30サイクル、58 で2分間、および72 で3分間。続いてさらに72 で7分間PCRのサイクルを延長した。

10

【0164】

PCR増幅生成物をゲルに流し、約960塩基対の増幅フラグメントがゲル精製され、T4 DNAポリメラーゼ(ベーリンガー・マンハイム・コーポレーション、インディアナポリス、インディアナ州)でフラグメントの末端を埋め、製造者プロトコルに従ってPCRプラントベクター(インビトロゲン・コーポレーション、カールスバッド、カリフォルニア州)にクローン化した。新規プラスミドをpRAE-52と称し、ABI 373AストレッチDNAシーケンサー(パーキン・エルマー、フォスター・シティー、カリフォルニア州)を用いて、このクローンにおける推定PUFAエロンガーゼcDNAをシーケンシングした。プラスミドpRAE-52のこの推定PUFAエロンガーゼcDNA配列を図43に示し、翻訳配列を図44に示す。

20

【0165】

次いでプラスミドpRAE-52の推定PUFAエロンガーゼcDNAをNcoI/HindIIIで消化し、ゲル精製し、pYX242(NcoI/HindIII)にライゲートした。新規プラスミドをpRAE-58-A1と称した。(ブダペスト条約の条件下、1999年8月19日にプラスミド58-A1をアメリカン・タイプ・オブ・カルチャー・コレクション、10801ポウルバード大学、マナサス、バージニア州20110-2209に寄託し、寄託番号 が付与された。)

構築物pRAE-58-A1をビール酵母菌334(Hovelandら、前記で引用)に形質転換し、エロンガーゼ活性に関してスクリーニングした。陰性対照株はpYX242ベクターを含有するビール酵母菌であった。25 µM GLAまたはAA存在下、選択培地(Ausubelら、前記で引用)で培養物を30 で24時間成長させた。この研究においてDGLAまたはアドレン酸(ADA、22:4n-6)は各々ヒトエロンガーゼ活性の生成が予測されている。基質としてGLAを用いた場合、ヒトエロンガーゼcDNAを含有する酵母細胞に含まれるDGLAレベルは上昇しており、対照細胞と比較すると各々全脂肪酸の2.75%対0.09%であった(図45を参照のこと)。基質としてAAを用いた場合、ヒトエロンガーゼcDNAを含有する酵母細胞に含まれるADAレベルは対照細胞と比較して上昇しており、各々全脂肪酸の未検出対1.21%であった。このように、ヒトエロンガーゼは18および20炭素鎖長のPUFAを共にその各々の伸長脂肪酸に変換する。

30

【0166】

ヒトエロンガーゼcDNAを含有する酵母細胞はまた対照株と比較して18:1n-7、20:1n-7、20:1n-9および18:1n-5などのモノ不飽和脂肪酸のレベルをも上昇させた。従って、これらの結果より同定されたヒトエロンガーゼはPUFAおよびモノ不飽和脂肪酸を基質として利用できることが示された。このように、このヒト配列HSEL01、およびそれにコードされるタンパク質は基質特異性とは独立してエロンガーゼ活性を有する。

40

【0167】

実施例XVII

シー・エレガンスPUFAエロンガーゼのクローニングおよび発現

いくつかの推定シー・エレガンスエロンガーゼで、翻訳GLELOおよびMAELOの

50

両方に対してアミノ酸相同性が確立されている。ヒト cDNA 配列を有するので、cDNA クローニングおよび酵母における発現により、これが本当に PUF A エロンガーゼであるかどうかを決定した。制限部位 EcoRI および SalI (下線部) を有するプライマー RO738 (5' - AAT CAG GAA TTC ATG GCT CAG CAT CCG CTC GTT CAA C - 3') および RO739 (5' - CCG CTT GTC GAC TTA GTT GTT CTT CTT CTT TGG CAC - 3') は各々、ゲノム配列 U68749 (ウォームペップ cDNA 受入番号: F56H11.4) に含まれる推定 cDNA 配列に基づいた。切除シー・エレガンスライブラリー cDNA (オリジン・テクノロジーズ・インコーポレーテッド、ロックビル、メリーランド州) 250 ng、各プライマー 50 ピコモル、10X 反応バッファー (ベーリンガー・マンハイム・コーポレーション、インディアナポリス、インディアナ州) 10 μ l、10 mM PCR ヌクレオチドミックス 1 μ l (ベーリンガー・マンハイム・コーポレーション、インディアナポリス、インディアナ州) および Taq ポリメラーゼ (ベーリンガー・マンハイム・コーポレーション、インディアナポリス、インディアナ州) 2.5 ユニットを含有する 100 μ l 容量で PCR 増幅を行った。パーキン・エルマー 9600 (ノーウォーク、コネチカット州) の熱循環器条件は以下のとおりであった: 95 で 5 分間、次いで 94、30 秒間を 25 サイクル、55 で 2 分間、および 72 で 2 分間。続いてさらに 72 で 7 分間 PCR のサイクルを延長した。

【0168】

PCR 増幅生成物をアガロースゲルから精製し、EcoRI および SalI で切断し、製造者プロトコルに従ってラピッド・ライゲーション・キット (ベーリンガー・マンハイム・コーポレーション、インディアナポリス、インディアナ州) を用いて pYX242 にライゲートし、大腸菌 Top10 細胞 (インビトロゲン・コーポレーション、カールスバッド、カリフォルニア州) に形質転換した。新規プラスミドを pRET-21 および pRET-22 (ライゲーションによる 2 個の個々のクローン) と称し、373A ストレッチ DNA シークエンサー ABI (パーキン・エルマー、フォスター・シティー、カリフォルニア州) でシークエンシングし、cDNA 配列を同定した。推定エロンガーゼを含有するプラスミド pRET-22 の 867 個の塩基の cDNA ヌクレオチド配列を図 46 に示し、288 個のアミノ酸の翻訳配列を図 47 に示す。(ブダペスト条約の条件下、1999 年 8 月 19 日にプラスミド pRET-22 をアメリカン・タイプ・オブ・カルチャー・コレクション、10801 ボウルバード大学、マナサス、バージニア州 20110-2209 に寄託し、寄託番号 が付与された。)

前記するようにプラスミド pRET-21 および -22 をビール酵母菌 334 に形質転換し (実施例 III を参照のこと)、得られた酵母培養物 (334 (pRET-21) および 334 (pRET-22)) を 50 μ M GLA および AA の存在下、ロイシン不含の選択培地 100 ml 中 (Ausubel ら、前記で引用) 20 で 48 時間成長させた。細胞ペレットを収集し、脂肪酸分析に供し、結果を図 48 に示す。GLA の伸長により生成されると予測される DGLA が 2 個のサンプルにおいて全脂質の平均 1.79% 見出され、これに対して陰性対照 (プラスミド pYX242 を含有する 334) では 0.13% であり、このことは pRET-21 および pRET-22 の両方によりコードされる酵素が GLA エロンガーゼ活性を有していることが示された。334 (pRET-21) および 334 (pRET-22) による GLA の DGLA への変換パーセントは各々 11.1% および 19.4% であり、平均 15.25% であった。興味深いことに、AA または外因性の脂肪酸はほとんど全く伸長が観察されなかった (図 48)。これらの結果によりこの新規に同定されたシー・エレガンス cDNA、CEELO1 によりコードされるエロンガーゼは GLA を DGLA に特異的に伸長でき、このことにより、これが GLA エロンガーゼのシー・エレガンス相同体であり得ることが示唆される。

【0169】

実施例 VII

AC004050 に基づく推定ヒトエロンガーゼ cDNA の単離

AC004050配列に基づいて推定エロンガーゼcDNAの全長を単離するために、プライマーRP735(5'-CCT CCT GAA TTC CAQA CAC TAT TCA GCT TTC-3')およびRO73(5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3')を用いてヒト肝臓マラソン・レディー-cDNA(クロンテック・ラボラトリーズ・インコーポレーティッド、パロ・アルト、カリフォルニア州)をPCR増幅した。製造者のプロトコルに従って、Advantage(登録商標)cDNA PCRキット(クロンテック・ラボラトリーズ・インコーポレーティッド、パロ・アルト、カリフォルニア州)を用いて、ヒト肝臓マラソン・レディー-cDNA 5µlおよび各プライマー50ピコモルでPCRを実施した。パーキン・エルマー9600(ノーウォーク、コネチカット州)の熱循環器条件は以下のとおりであった：94で2分間、次いで94、1分間を30サイクル、58で2分間、および72で3分間。続いてさらに72で7分間PCRのサイクルを延長した。

10

【0170】

PCR増幅生成物をゲルに流し、約1キロ塩基対の増幅フラグメントをゲル精製し、製造者の指示書に従って、フラグメントの末端をT4 DNAポリメラーゼ(ベーリンガー・マンハイム・コーポレーション、カールスバッド、カリフォルニア州)で埋めた。新規プラスミドをpRAE-59と称し、このプラスミドの推定PUFAエロンガーゼcDNAをHS3と称し、ABI 373Aストレッチ・シーケンサー(パーキン・エルマー、フォスター・シティー、カリフォルニア州)を用いてシーケンシングした。推定PUFAエロンガーゼcDNA配列HS3を図49に示し、翻訳配列を図50に示す。

20

【0171】

栄養組成物

発明の詳細な説明に記載のPUFAを、種々の栄養補助剤、乳児用粉乳、栄養代替剤、および他の栄養溶液に利用することができる。

【0172】

I. 特殊調製粉乳

A. Isomil(登録商標)(鉄を含むダイズ製剤)：

用途：牛乳に対してアレルギーまたは感受性を示す乳児、小児、および成人用の飲料。ラクトースを避けるべき疾患(ラクターゼ欠乏症、乳糖不耐症、およびガラクトース血症)の患者に与えるため。

30

【0173】

特徴：

- 牛乳タンパク質のアレルギーまたは過敏症の症状を予防するためのダイズタンパク質単離物。

【0174】

- ラクトース関連の下痢を予防するための無ラクトース処方物。

【0175】

- 浸透性下痢のリスクを減少させるための低浸透性(240mOsm/kg水)。

【0176】

- 炭水化物吸収を促進し、損傷した腸の過剰な吸収のリスクを減少させるように設計された2種の炭水化物(dual carbohydrates)。

40

【0177】

- 鉄欠乏症の予防を補助するための100カロリーあたり1.8mgの鉄(硫酸第一鉄として)。

【0178】

- 推奨レベルのビタミンおよびミネラル。

【0179】

- 推奨レベルの必須脂肪酸を得るための植物油。

【0180】

- 乳白色、ミルク様濃度、および好ましい香り。

50

成分：(Parave) 85%水、4.9%コーンシロップ、2.6%糖(スクロース)、2.1%ダイズ油、1.9%ダイズタンパク質単離物、1.4%ココナッツ油、0.15%クエン酸カルシウム、0.11%三塩基性リン酸カルシウム、クエン酸カリウム、塩基性リン酸カリウム、塩化カリウム、モノおよびジグリセリド、ダイズレシチン、カラゲナン、アスコルビン酸、L-メチオニン、塩化マグネシウム、二塩基性リン酸カリウム、塩化カルシウム、塩化コリン、タウリン、硫酸第一鉄、m-イノシトール、 α -酢酸トコフェロール、硫酸亜鉛、L-カルニチン、ナイアシンアミド、パントテン酸カルシウム、硫酸銅、パルミチン酸ビタミンA、チアミンクロリド塩酸塩、リボフラビン、塩酸ピリドキシン、葉酸、硫酸マンガン、ヨウ化カリウム、フィロキノン、ビオチン、セレン酸ナトリウム、ビタミンD3、およびシアノコバラミン。

10

【0181】

B. Isomil (登録商標) DF (下痢用ダイズ処方物)。

【0182】

用途：乳児および幼児の食事管理用の短期摂食

特徴：特に下痢管理用のダイズ繊維由来の添加食物繊維を含む最初の乳児の処方物。

【0183】

- 乳児の軽症または重症の下痢による軟らかい、水様便の持続期間を減少させることが臨床的に示されている。

【0184】

- 乳児の栄養必要量を栄養的に完全に満たす。

20

【0185】

- 乳児の全必須アミノ酸必要量を満たすか超える添加L-メチオニンを含むダイズタンパク質単離物。

【0186】

- ラクトース関連の下痢を予防する無ラクトース処方物。

【0187】

- 浸透圧性下痢のリスクを減少させる低浸透性(240 mOsm/kg水)。

【0188】

- 炭水化物吸収を促進し、損傷した腸の過剰な吸収のリスクを減少させるように設計された2種の炭水化物。

30

【0189】

- Committee of Nutrition of the American Academy of Pediatricsに推奨され、Infant Formula Actで必要とされるビタミンおよびミネラルレベルを満たすか超えている。

【0190】

- 鉄欠乏症の予防を補助するための100カロリーあたり1.8mgの鉄(硫酸第一鉄として)。

【0191】

- 推奨レベルの必須脂肪酸を得るための植物油。

【0192】

40

成分：(Parave) 86%水、4.8%コーンシロップ、2.5%糖(スクロース)、2.1%ダイズ油、2.0%ダイズタンパク質単離物、1.4%ココナッツ油、0.77%ダイズ食物繊維、0.12%クエン酸カルシウム、0.11%三塩基性リン酸カルシウム、0.1%クエン酸カリウム、塩化カリウム、塩基性リン酸カリウム、モノおよびジグリセリド、ダイズレシチン、カラゲナン、塩化マグネシウム、アスコルビン酸、L-メチオニン、二塩基性リン酸カリウム、塩化ナトリウム、塩化コリン、タウリン、硫酸第一鉄、m-イノシトール、 α -酢酸トコフェロール、硫酸亜鉛、L-カルニチン、ナイアシンアミド、パントテン酸カルシウム、硫酸銅、パルミチン酸ビタミンA、チアミンクロリド塩酸塩、リボフラビン、塩酸ピリドキシン、葉酸、硫酸マンガン、ヨウ化カリウム、フィロキノン、ビオチン、セレン酸ナトリウム、ビタミンD3、およびシアノコバラミン

50

。

【0193】

C. Isomil (登録商標) SF (鉄を含む無スクロースダイズ製剤)

用途：牛乳タンパク質に対してアレルギーまたは感受性を示すかスクロース不耐の乳児、小児、および成人用の飲料。ラクトースおよびスクロースを避けるべき疾患の患者に与えるため。

【0194】

特徴：

- 牛乳タンパク質のアレルギーまたは過敏症の症状を予防するためのダイズタンパク質単離物。

10

【0195】

- ラクトース関連の下痢を予防するための無ラクトース処方物 (炭水化物源は、Polycose (登録商標) Glucose Polymer である)。

【0196】

- スクロース不耐患者用にスクロースを含まない。

【0197】

- 浸透圧性下痢のリスクを減少させる低浸透性 (180 mOsm/kg 水)。

【0198】

- 鉄欠乏症の予防を補助するための100カロリーあたり1.8mgの鉄 (硫酸第一鉄として)。

20

【0199】

- 推奨レベルのビタミンおよびミネラル。

【0200】

- 推奨レベルの必須脂肪酸を得るための植物油。

【0201】

- 乳白色、ミルク様濃度、および好ましい香り。

【0202】

成分：(Pareve) 75% 水、11.8% 加水分解コーンスターチ、4.1% ダイズ油、4.1% ダイズタンパク質単離物、2.8% ココナッツ油、1.0% 改変コーンスターチ、4.9% コーンシロップ、0.38% 三塩基性リン酸カルシウム、0.17% クエン酸カリウム、0.13% 塩化カリウム、モノおよびジグリセリド、ダイズレシチン、塩化マグネシウム、アスコルビン酸、L-メチオニン、炭酸カルシウム、塩化ナトリウム、塩化コリン、カラゲナン、タウリン、硫酸第一鉄、m-イノシトール、酢酸トコフェロール、硫酸亜鉛、L-カルニチン、ナイアシンアミド、パントテン酸カルシウム、硫酸銅、パルミチン酸ビタミンA、チアミンクロリド塩酸塩、リボフラビン、塩酸ピリドキシン、葉酸、硫酸マンガン、ヨウ化カリウム、フィロキノ、ビオチン、セレン酸ナトリウム、ビタミンD3、およびシアノコバラミン。

30

【0203】

D. Isomil (登録商標) 20 (調製済みの鉄を含むダイズ処方物 (20 Cal / オンス))

40

用途：ダイズ食が望ましい場合。

【0204】

成分：(Pareve) 85% 水、4.9% コーンシロップ、2.6% 糖 (スクロース)、2.1% ダイズ油、1.9% ダイズタンパク質単離物、1.4% ココナッツ油、0.15% クエン酸カルシウム、0.11% 三塩基性リン酸カルシウム、クエン酸カリウム、塩基性リン酸カリウム、塩化カリウム、モノおよびジグリセリド、ダイズレシチン、カラゲナン、アスコルビン酸、L-メチオニン、塩化マグネシウム、二塩基性リン酸カリウム、塩化ナトリウム、塩化コリン、タウリン、硫酸第一鉄、m-イノシトール、酢酸トコフェロール、硫酸亜鉛、L-カルニチン、ナイアシンアミド、パントテン酸カルシウム、硫酸銅、パルミチン酸ビタミンA、チアミンクロリド塩酸塩、リボフラビン、塩酸ピリ

50

ドキシン、葉酸、硫酸マンガン、ヨウ化カリウム、フィロキノン、ビオチン、セレン酸ナトリウム、ビタミンD3、およびシアノコバラミン。

【0205】

E. Similac (登録商標) (乳児用処方物)

用途：乳児用処方物が必要な場合。1歳未満の乳児に母乳栄養を継続できないと診断された場合、母乳栄養の補助食品が必要な場合、または母乳栄養不適用の場合の日常の摂食。

【0206】

特徴：

- ミルク関連腸出血のリスクを減少させる、良好な成長に適切な質および量の熱変性タンパク質。

10

【0207】

- 容易に吸収される必須リノール酸が得られる植物油の混合物(2種類を均質化)由来の脂肪。

【0208】

- 人乳と類似の比率のラクトースとしての炭水化物。

【0209】

- 器官の発達に対するストレスを最小にするための低腎臓溶質負荷。

【0210】

- 粉末、濃縮液、または調製済み処方物。

20

【0211】

成分：(Parave)蒸留水、脱脂乳、ラクトース、ダイズ油、ココナッツ油、モノおよびジグリセリド、ダイズレシチン、アスコルビン酸、カラゲナン、塩化コリン、タウリン、m-イノシトール、-酢酸トコフェロール、硫酸亜鉛、ナイアシンアミド、硫酸第一鉄、パントテン酸カルシウム、硫酸銅、パルミチン酸ビタミンA、チアミンクロリド塩酸塩、リボフラビン、塩酸ピリドキシン、葉酸、硫酸マンガン、フィロキノン、ビオチン、セレン酸ナトリウム、ビタミンD3、およびシアノコバラミン。

【0212】

F. Similac (登録商標) NeoCare (鉄を含む未熟乳児用処方物)

用途：退院後の未熟幼児の特別に栄養を必要とする場合。Similac NeoCareは、成長の遅れを取り戻すのを促進し、発達を支持するために必要な付加的なカロリー、タンパク質、ビタミン、およびミネラルを未熟児が得られるように開発された栄養的に完全な処方物である。

30

【0213】

特徴：

- カロリーおよびビタミン補助の必要性を減少させる。標準期間の処方物(20 Cal / オンス)よりカロリーが高い(22 Cal / オンス)。

【0214】

- 未熟児の消化を特別に補助する中鎖トリグリセリド(MCTオイル)を含む、高吸収性脂肪酸混合物。

40

【0215】

- 病院で開始される栄養補助を拡張するための100カロリーあたり高レベルのタンパク質、ビタミン、およびミネラルを含む。

【0216】

- 骨鉱化作用改良用のより大量のカルシウムおよびリンを含む。

【0217】

成分：固体コーンシロップ、脱脂乳、ラクトース、ホエイタンパク濃縮物、ダイズ油、高オレイン酸ベニバナ油、分留ココナッツ油(中鎖トリグリセリド)、ココナッツ油、クエン酸カリウム、三塩基性リン酸カルシウム、炭酸カルシウム、アスコルビン酸、塩化マグネシウム、塩化カリウム、塩化ナトリウム、タウリン、硫酸第一鉄、m-イノシトール

50

、塩化コリン、アスコルビン酸パルミテート、L-カルニチン、 α -酢酸トコフェロール、硫酸亜鉛、ナイアシンアミド、混合トコフェロール、クエン酸ナトリウム、パントテン酸カルシウム、硫酸銅、チアミンクロリド塩酸塩、ビタミンAパルミテート、 β -カロテン、リボフラビン、塩酸ピリドキシン、葉酸、硫酸マンガン、フィロキノン、ビオチン、セレン酸ナトリウム、ビタミンD3、およびシアノコバラミン。

【0218】

G. Similac Natural Care (調製済み低鉄人乳強化剤(24 Cal/オンス))。

【0219】

用途：人乳と混合するか低出生時体重の乳児に人乳と共にを与えるために設計されている。

10

【0220】

成分：蒸留水、脱脂乳、加水分解コーンスターチ、ラクトース、分留ココナッツ油(中鎖トリグリセリド)、ホエイタンパク質濃縮物、ダイズ油、ココナッツ油、三塩基性リン酸カルシウム、クエン酸カリウム、塩化マグネシウム、クエン酸ナトリウム、アスコルビン酸、炭酸カルシウム、モノおよびジグリセリド、ダイズレシチン、カラゲナン、塩化コリン、m-イノシトール、タウリン、ナイアシンアミド、L-カルニチン、 α -酢酸トコフェロール、硫酸亜鉛、塩化カリウム、パントテン酸カルシウム、硫酸第一鉄、硫酸銅、リボフラビン、ビタミンAパルミテート、チアミンクロリド塩酸塩、塩酸ピリドキシン、ビオチン、葉酸、硫酸マンガン、フィロキノン、ビタミンD3、セレン酸ナトリウム、およびシアノコバラミン。

20

【0221】

本発明の種々のPUFAを、上記の乳児用処方物および他の当業者に公知の乳児用処方物と置換するか添加することができる。

【0222】

II. 栄養処方物

A. ENSURE (登録商標)

用途：ENSUREは、主に、適切な量を食事中または食間に使用する経口栄養補助剤または食事の代わりとして用いるように設計された低残渣流動食である。ENSUREは、無ラクトースおよび無グルテンであり、低コレステロール食を含む加工食(modified diet)としての使用に適切である。主に経口補助剤であるが、チューブによって摂取させることができる。

30

【0223】

患者の健康状態：

- 加工食を摂取している患者。

【0224】

- 栄養危険性を有する高齢患者。

【0225】

- 無意識に体重減少している患者。

【0226】

- 疾患または手術から回復中の患者。

40

【0227】

- 低残渣食を必要とする患者。

【0228】

成分：蒸留水、糖(スクロース)、マルトデキストリン(トウモロコシ)、カゼイン酸カルシウムおよびカゼイン酸ナトリウム、高オレイン酸ベニバナ油、ダイズタンパク質分離物、ダイズ油、カノーラ油、クエン酸カリウム、三塩基性リン酸カルシウム、クエン酸ナトリウム、塩化マグネシウム、二塩基性リン酸マグネシウム、人工香料、塩化ナトリウム、ダイズレシチン、コリンクロリド、アスコルビン酸、カラゲナン、硫酸亜鉛、硫酸第一鉄、 α -酢酸トコフェロール、Gelganガム、ナイアシンアミド、パントテン酸カ

50

ルシウム、硫化マンガン、硫酸銅、ビタミンAパルミテート、チアミンクロリド塩酸塩、塩酸ピリドキシン、リボフラビン、葉酸、モリブデン酸ナトリウム、塩化クロム、ビオチン、ヨウ化カリウム、セレン酸ナトリウム。

【0229】

B. ENSURE (登録商標) BARS

用途：ENSURE BARSは、食間または食事中に使用される完全にバランスの取れた栄養素である。ENSURE BARSは、他のスナックより美味で、栄養豊富である。ENSURE BARSは、バーあたり1g未満のラクトースを含み、チョコレート味のブラウニー風味は、グルテンを含まない（ハニーグラハムクランチ風味は、グルテンを含む）。

10

【0230】

患者の健康状態：

- 付加的にカロリー、タンパク質、ビタミン、およびミネラルを必要とする患者。

【0231】

- 十分なカロリーおよび栄養素を摂取できない患者に特に有用である。

【0232】

- 咀嚼および嚥下することができる患者。

【0233】

- ビーナッツアレルギーまたは任意の型のナッツアレルギーを有する患者には使用しない。

20

【0234】

成分：ハニーグラハムクランチ - - 高フルクトースコーンシロップ、ダイズタンパク質、黒砂糖、ハチミツ、マルトデキストリン（トウモロコシ）、Crisp Rice（製粉したコメ、糖（スクロース）、塩（塩化ナトリウム）、および麦芽）、カラスムギのふすま、部分水素付加綿実油およびダイズ油、ダイズ多糖類、グリセリン、ホエイタンパク質濃縮物、ポリデキストリン、フルクトース、カゼイン酸カルシウム、ココ粉末、人工香料、カノーラ油、高オレイン酸ベニバナ油、脱脂粉乳、ホエイ粉末、ダイズレシチン、およびトウモロコシ油。ナッツを加工する施設で製造される。

【0235】

ビタミンおよびミネラル：三塩基性リン酸カルシウム、二塩基性リン酸カリウム、酸化マグネシウム、塩（塩化ナトリウム）、塩化カリウム、アスコルビン酸、オルトリン酸第二鉄、 - 酢酸トコフェロール、ナイアシンアミド、酸化鉛、パントテン酸カルシウム、グルコン酸銅、硫酸マンガン、リボフラン、 - カロテン、塩酸ピリドキシン、チアミン硝酸塩、葉酸、ビオチン、塩化クロム、ヨウ化カリウム、セレン酸ナトリウム、モリブデン酸ナトリウム、フィロキノン、ビタミンD3、およびシアノコバラミン。

30

【0236】

タンパク質：ハニーグラハムクランチ - タンパク質供給源は、ダイズタンパク質単離物とミルクタンパク質との混合物である。

【0237】

ダイズタンパク質単離物	74%
ミルクタンパク質	26%

40

脂肪：ハニーグラハムクランチ - 脂肪供給源は、部分的水素付加綿実油、ダイズ油、カノーラ油、高オレイン酸ベニバナ油、およびダイズレシチンとの混合物である。

部分的水素付加綿実油およびダイズ油	76%
カノーラ油	8%
高オレイン酸ベニバナ油	8%
トウモロコシ油	4%
ダイズレシチン	4%

炭水化物：ハニーグラハムクランチ - 炭素供給源は、高フルクトースコーンシロップ、黒砂糖、マルトデキストリン、ハチミツ、クリスプライス（crisp rice）、グ

50

リセリン、ダイズ多糖類、およびカラスムギふすまの組み合わせである。

【0238】

高フルクトースコーンシロップ	24%
黒砂糖	21%
マルトデキストリン	12%
ハチミツ	11%
crisp rice	9%
グリセリン	9%
ダイズ多糖類	7%
カラスムギふすま	7%

10

C. ENSURE (登録商標) HIGH PROTEIN

用途：ENSURE HIGH PROTEINは、食事で付加的なカロリー、タンパク質、ビタミン、およびミネラルを必要とする患者用に設計された濃縮高タンパク質流動食である。これは、食事中もしくは食間の経口補助剤として、または適切な量を食事の代わりとして使用することができる。ENSURE HIGH PROTEINは、無ラクトースおよび無グルテンであり、一般的な手術または臀部骨折から回復しつつある患者および圧迫潰瘍のリスクを負う患者への使用に適切である。

【0239】

患者の健康状態：

- 付加的なカロリー、タンパク質、ビタミン、およびミネラルを必要とする患者（一般的な手術または臀部骨折から回復しつつある患者および圧迫潰瘍のリスクを負う患者および低コレステロール食患者など）。

20

【0240】

特徴：

- 低飽和脂肪。

【0241】

- 1回の食事あたり全脂質の6gの脂質およびコレステロールの5mg未満を含む。

【0242】

- コクがあり、軟らかい。

【0243】

- タンパク質、カルシウム、ならびに他の必須ビタミンおよびミネラルの優れた供給源である。

30

【0244】

- 低コレステロール食用である。

【0245】

- 無ラクトースで容易に消化される。

【0246】

成分：バニラシューブレーム：蒸留水、糖（スクロース）、マルトデキストリン（トウモロコシ）、カゼイン酸カルシウムおよびカゼイン酸ナトリウム、高オレイン酸ベニバナ油、ダイズタンパク質単離物、ダイズ油、カノーラ油、クエン酸カリウム、三塩基性リン酸カルシウム、クエン酸ナトリウム、塩化マグネシウム、二塩基性リン酸マグネシウム、人工香料、塩化ナトリウム、ダイズレシチン、塩化コリン、アスコルビン酸、カラゲナン、硫酸亜鉛、硫酸第一鉄、- 酢酸トコフェロール、Gel lanガム、ナイアシンアミド、パントテン酸カルシウム、硫酸マンガン、硫酸銅、パルミチン酸ビタミンA、チアミンクロリド塩酸塩、塩酸ピリドキシン、リボフラビン、葉酸、モリブデン酸ナトリウム、塩化クロム、ピオチン、ヨウ化カリウム、セレン酸ナトリウム、フィロキノン、ビタミンD3、およびシアノコバラミン。

40

【0247】

タンパク質：タンパク質供給源は、2つの生物学的に価値の高いタンパク質（カゼインおよびダイズ）の混合物である。

50

【0248】

カゼイン酸ナトリウムおよびカゼイン酸カルシウム 85%

タンパク質単離物 15%

脂肪：脂肪供給源は、3つのオイル（高オレイン酸ベニバナ油、カノーラ油、およびダイズ油）の混合物である。

【0249】

高オレイン酸ベニバナ油 40%

カノーラ油 30%

ダイズ油 30%

ENSURE HIGH PROTEIN中の脂肪レベルは、米国心臓病協会（AHA）のガイドラインを満たす。ENSURE HIGH PROTEIN中の6gの脂肪は、全カロリーの24%を占め、そのうち2.6%の脂肪は飽和脂肪酸に由来し、7.9%はポリ不飽和脂肪酸に由来する。これらの値は、AHAガイドライン（脂肪由来の全カロリーの30%未満、飽和脂肪酸由来の10%未満のカロリー、およびポリ不飽和脂肪酸由来の全カロリーの10%未満）の範囲内である。

10

【0250】

炭水化物：ENSURE HIGH PROTEINは、マルトデキストリンとスクロースとの組み合わせを含む。ほのかに甘い、種々の風味（バニラシュプリーム、チョコレートロイヤル、ワイルドベリー、およびバナナ）ならびにペカン、チェリー、ストロベリー、レモン、およびオレンジの香りのVARI-FLAVORS（登録商標）Flavor Pacsは、風味に関する不快感を避ける一助となり、患者の服薬遵守の援助となる。

20

バニラおよび他のチョコレート以外の風味は以下である。

【0251】

スクロース 60%

マルトデキストリン 40%

チョコレート：

スクロース 70%

マルトデキストリン 30%

D. ENSURE（登録商標）LIGHT

30

用途：ENSURE LIGHTは、食事中または食間に用いる経口栄養補助剤として使用するために設計された低脂肪流動食である。ENSURE LIGHTは、無ラクトースおよび無グルテンであり、低コレステロール食を含む加工食としての使用に適切である。

【0252】

患者の健康状態：

- ENSUREより50%低い脂肪および20%低いカロリーを含む栄養補助食品中に付加的な栄養を必要とする正常な体重または超過体重の患者用。

【0253】

- 正確に必要な付加的栄養素を摂ることができない健常な成人。

40

【0254】

特徴：

- 低脂肪および低飽和脂肪

- 1回の食事あたり3gの全脂肪および5mg未満のコレステロールを含む。

【0255】

- コクがあり、軟らかい。

【0256】

- カルシウムおよび他の必須ビタミンならびにミネラルの優れた供給源である。

【0257】

- 低コレステロール食である。

50

【0258】

- 無ラクトースであり、容易に消化される。

【0259】

成分：フレンチバニラ：蒸留水、マルトデキストリン（トウモロコシ）、糖（スクロース）、カゼイン酸カルシウム、高オレイン酸ベニバナ油、カノーラ油、塩化マグネシウム、クエン酸カリウム、二塩基性リン酸カリウム、二塩基性リン酸マグネシウム、天然香料および人工香料、三塩基性リン酸カルシウム、Gel lanガム、塩化コリン、ダイズレシチン、カラゲナン、塩（塩化ナトリウム）、アスコルビン酸、セルロースガム、硫酸第一鉄、-酢酸トコフェロール、硫酸亜鉛、ナイアシンアミド、硫酸マンガン、パントテン酸カルシウム、硫酸銅、チアミンクロリド塩酸塩、パルミチン酸ビタミンA、塩酸ピリドキシン、リボフラビン、塩化クロム、葉酸、モリブデン酸ナトリウム、ビオチン、ヨウ化カリウム、セレン酸ナトリウム、フィロキノン、ビタミンD3、およびシアノコバラミン。

10

【0260】

タンパク質：

タンパク質供給源は、カゼイン酸カルシウムである。

【0261】

カゼイン酸カルシウム 100%

脂肪：脂肪供給源は、2つのオイル（高オレイン酸ベニバナ油およびカノーラ油）の混合物である。

20

【0262】

高オレイン酸ベニバナ油 70%

カノーラ油 30%

ENSURE LIGHT中の脂肪レベルは、米国心臓病協会（AHA）のガイドラインを満たす。ENSURE LIGHT中の3gの脂肪は、全カロリーの13.5%を占め、そのうち1.4%の脂肪は飽和脂肪酸に由来し、2.6%はポリ不飽和脂肪酸に由来する。これらの値は、AHAガイドライン（脂肪由来の全カロリーの30%未満、飽和脂肪酸由来の10%未満のカロリー、およびポリ不飽和脂肪酸由来の全カロリーの10%未満）の範囲内である。

30

【0263】

炭水化物：ENSURE LIGHTは、マルトデキストリンとスクロースとの組み合わせを含む。チョコレート風味はコーンシロップなどを含む。ほのかに甘い種々の風味（フレンチバニラ、チョコレートシュブリーム、ストロベリースワール）ならびにベカン、チェリー、ストロベリー、レモン、およびオレンジの香りのVARI-FLAVORS（登録商標）Flavor Pacsは、風味に関する不快感を避ける一助となり、患者の服薬遵守の援助となる。

バニラおよび他のチョコレート以外の風味は以下である。

【0264】

スクロース 51%

マルトデキストリン 49%

チョコレート

スクロース 47.0%

コーンシロップ 26.5%

マルトデキストリン 26.5%

ビタミンおよびミネラル：食事あたり8オンスのENSURE LIGHTで、24種類の重要なビタミンおよびミネラルのRDIの少なくとも24%が得られる。

40

【0265】

カフェイン：チョコレート香料には、8オンスあたり2.1mgのカフェインを含む。

【0266】

E. ENSURE PLUS（登録商標）

50

用途：ENSURE PLUSは、付加的なカロリーおよび栄養素が必要であるが、通常のタンパク質濃度が必要な場合の、高カロリーの低残渣流動食である。これは、主に、食事中または食間に使用する経口栄養補助食品としてまたは適切な量を食事の代わりとして使用するよう設計されている。ENSURE PLUSは、無ラクトースおよび無グルテンである。主に経口補助剤であるが、チューブによって摂取させることができる。

【0267】

患者の健康状態：

- 限られた体積で付加的なカロリーおよび栄養素が必要であるが、通常のタンパク質濃度が必要な患者。

【0268】

- 健常な体重に増加させるか維持することを必要とする患者。

【0269】

特徴：

- コクがあり、軟らかい。

【0270】

- 必須ビタミンおよびミネラルの良好な供給源である。

【0271】

成分：バニラ：蒸留水、コーンシロップ、マルトデキストリン（トウモロコシ）、トウモロコシ油、カゼイン酸ナトリウムおよびカゼイン酸カルシウム、糖（スクロース）、ダイズタンパク質単離物、塩化マグネシウム、クエン酸カリウム、三塩基性リン酸カルシウム、ダイズレシチン、天然香料および人工香料、クエン酸ナトリウム、塩化カリウム、塩化コリン、アスコルビン酸、カラゲナン、硫酸亜鉛、硫酸第一鉄、α-酢酸トコフェロール、ナイアシンアミド、パントテン酸カルシウム、硫酸マンガン、硫酸銅、チアミンクロリド塩酸塩、塩酸ピリドキシン、リボフラビン、パルミチン酸ビタミンA、葉酸、ピオチン、塩化クロム、モリブデン酸ナトリウム、ヨウ化カリウム、セレン酸ナトリウム、フィロキノン、シアノコバラミン、およびビタミンD3。

【0272】

タンパク質：タンパク質供給源は、2つの生物学的に価値の高いタンパク質（カゼインおよびダイズ）の混合物である。

カゼイン酸ナトリウムおよびカゼイン酸カルシウム 84%

タンパク質単離物 16%

脂肪：脂肪源はトウモロコシ油である。

【0273】

トウモロコシ油 100%

炭水化物：ENSURE PLUSは、マルトデキストリンとスクロースとの組み合わせである。ほのかに甘い、種々の風味（バニラ、チョコレート、ストロベリー、コーヒー、バターペカン、およびエッグノック）ならびにペカン、チェリー、ストロベリー、レモン、およびオレンジの香りのVARI-FLAVORS（登録商標）Flavor Packsは、風味に関する不快感を避ける一助となり、患者の服薬遵守の援助となる。

【0274】

バニラ、ストロベリー、バターペカン、およびコーヒー風味は以下を含む。

【0275】

コーンシロップ 39%

マルトデキストリン 38%

スクロース 23%

チョコレートおよびエッグノック風味は以下を含む。

【0276】

コーンシロップ 36%

マルトデキストリン 34%

スクロース 30%

10

20

30

40

50

ビタミンおよびミネラル：食事あたり 8 オンスの ENSURE PLUS で、25 種類の重要なビタミンおよびミネラルの RDI の少なくとも 15 % が得られる。

【0277】

カフェイン：チョコレート香料には、8 オンスあたり 3.1 mg のカフェインを含む。コーヒー香料には微量のカフェインを含む。

【0278】

F. ENSURE PLUS (登録商標) HN

用途：ENSURE PLUS HN は、高カロリーおよび高タンパク質を必要とするか摂取体積が制限される患者用に設計された、栄養的に完全な高カロリーおよび高窒素流動食である。これは、経口での栄養補給またはチューブによる全栄養支持に有用であり得る。ENSURE PLUS HN は、無ラクトースおよび無グルテンである。

10

【0279】

患者の健康状態：

- 手術後または損傷後などのカロリーおよびタンパク質の増加が必要な患者。

【0280】

- 摂取体積が制限され、すぐに満腹になる患者。

【0281】

特徴：

- 補助または全栄養補給に使用される。

【0282】

- 経口またはチューブによる食物摂取用。

20

【0283】

- 1.5 CaV mL。

【0284】

- 高窒素。

【0285】

- カロリー密度が高い。

【0286】

成分：バニラ：蒸留水、マルトデキストリン（トウモロコシ）、カゼイン酸ナトリウムおよびカゼイン酸カルシウム、トウモロコシ油、糖（スクロース）、ダイズタンパク質単離物、塩化マグネシウム、クエン酸カリウム、三塩基性リン酸カルシウム、ダイズレシチン、天然香料および人工香料、クエン酸ナトリウム、塩化コリン、アスコルビン酸、タウリン、L-カルニチン、硫酸亜鉛、硫酸第一鉄、酢酸トコフェロール、ナイアシンアミド、カラゲナン、パントテン酸カルシウム、硫酸マンガン、硫酸銅、チアミンクロリド塩酸塩、塩酸ピリドキシン、リボフラビン、パルミチン酸ビタミン A、葉酸、ピオチン、塩化クロム、モリブデン酸ナトリウム、ヨウ化カリウム、セレン酸ナトリウム、フィロキノン、シアノコバラミン、およびビタミン D3。

30

【0287】

G. ENSURE (登録商標) POWDER

用途：ENSURE POWDER（水で再生される）は、主に、食事中または食間に使用される経口栄養補助剤として設計された低残渣流動食である。ENSURE POWDER は、無ラクトースおよび無グルテンであり、低カロリー食を含む加工食としての使用に適切である。

40

【0288】

患者の健康状態：

- 加工食を摂取している患者。

【0289】

- 栄養危険性を有する高齢患者。

【0290】

- 疾患 / 手術から回復中の患者。

50

【0291】

- 低残渣食を必要とする患者。

【0292】

特徴：

- 便利で混合が容易。

【0293】

- 低飽和脂肪。

【0294】

- 1回の食事あたり9gの全脂肪および5mg未満のコレステロールを含む。

【0295】

- 高ビタミンおよびミネラル。

【0296】

- 低コレステロール食。

【0297】

- 無ラクトースで消化しやすい。

【0298】

成分：蒸留水、コーンシロップ、マルトデキストリン（トウモロコシ）、糖（スクロース）、トウモロコシ油、カゼイン酸ナトリウムおよびカゼイン酸カルシウム、ダイズタンパク質単離物、人工香料、クエン酸カリウム、塩化マグネシウム、クエン酸ナトリウム、三塩基性リン酸カルシウム、塩化カリウム、ダイズレシチン、アスコルビン酸、塩化コリン、硫酸亜鉛、硫酸第一鉄、酢酸トコフェロール、ナイアシンアミド、パントテン酸カルシウム、硫酸マンガン、チアミンクロリド塩酸塩、硫酸銅、塩酸ピリドキシン、リボフラビン、パルミチン酸ビタミンA、葉酸、ピオチン、モリブデン酸ナトリウム、塩化クロム、ヨウ化カリウム、セレン酸ナトリウム、フィロキノン、ビタミンD3、およびシアノコバラミン。

【0299】

タンパク質：タンパク質供給源は、2つの生物学的に価値の高いタンパク質（カゼインおよびダイズ）である。

【0300】

カゼイン酸ナトリウムおよびカゼイン酸カルシウム 84%

タンパク質単離物 16%

脂肪：脂肪供給源はトウモロコシ油である。

【0301】

トウモロコシ油 100%

炭水化物：ENSURE POWDERは、コーンシロップ、マルトデキストリンとスクロースとの組み合わせである。ENSURE POWDERのほのかに甘さならびにペカン、チェリー、ストロベリー、レモン、およびオレンジの香りのVARI-FLAVORS（登録商標）Flavor Pacsは、風味に関する不快感を避ける一助となり、患者の服薬遵守の援助となる。

【0302】

バニラ：

コーンシロップ 35%

マルトデキストリン 35%

スクロース 30%

H. ENSURE（登録商標）PUDDING

用途：ENSURE PUDDINGは、食事中および食間に使用される非液体形態のバランスのとれた栄養素を得るための栄養密度の高い補助食品である。これは、継続的な加工食（たとえば、軟らかい、ピューレ状、または完全な液体）を摂取している患者および嚥下障害患者に適切である。ENSURE PUDDINGは、無グルテンである。

【0303】

10

20

30

40

50

患者の健康状態：

- 継続的な加工食（例えば、軟らかい、ピューレ状、または完全な液体）を摂取している患者。

【0304】

- 嚥下障害患者。

【0305】

特徴：

- コクがあり、軟らかく、味がよい。

【0306】

- 必須ビタミン、およびミネラルの良好な供給源である。

10

【0307】

- 冷蔵不要で便利。

【0308】

- 無グルテン。

【0309】

5オンスあたりの栄養プロフィールは、250カロリー、タンパク質10.9%、全脂肪34.9%、炭水化物54.2%である。

【0310】

成分：脱脂乳、水、糖（スクロース）、部分的に水素負荷したダイズ油、加工食品デンプン、硫酸マグネシウム、ステアロイルラクチリン酸ナトリウム、二塩基性リン酸ナトリウム、人工香料、アスコルビン酸、硫酸亜鉛、硫酸第一鉄、酢酸トコフェロール、塩酸コリン、ナイアシンアミド、硫酸マンガン、パントテン酸カルシウム、FD&C Yellow #5、クエン酸カリウム、硫酸銅、ビタミンAパルミテート、チアミンクロリド塩酸塩、塩酸ピリドキシン、リボフラビン、FD&C Yellow #6、葉酸、ピオチン、フィロキノン、ビタミンD3、およびシアノコバラミン。

20

【0311】

タンパク質：タンパク質供給源は、脱脂乳である。

【0312】

脱脂乳 100%

脂肪：脂肪供給源は、水素付加ダイズ油である。

30

【0313】

水素付加ダイズ油 100%

炭水化物：ENSURE PUDDINGは、スクロースと加工食品デンプンの組み合わせである。ほのかな甘さおよび多種の風味（バニラ、チョコレート、バタースカッチ、およびタピオカ）は、風味に関する不快感を避ける一助となる。製品には、1回の食事あたり9.2グラムのラクトースを含む。

【0314】

バニラおよび他のチョコレート以外の風味は以下である。

【0315】

スクロース 56%

ラクトース 27%

加工食品デンプン 17%

チョコレート：

スクロース 58%

ラクトース 26%

加工食品デンプン 16%

I. ENSURE (登録商標) WITH FIBER。

【0316】

用途：ENSURE WITH FIBERは、食物繊維および栄養素を強化することに利点を有し得る患者用に設計された、食物繊維を含む栄養的に完全な流動食である。E

50

ENSURE WITH FIBERは、低残渣食を必要としない患者に適切である。これは、経口およびチューブによって摂取させることができ、通常の食事の栄養補助剤として、または適切な量を食事の代わりとして与えることができる。ENSURE WITH FIBERは、無ラクトースおよび無グルテンであり、低コレステロール食を含む加工食としての使用に適切である。

【0317】

患者の健康状態：

- 食物繊維および栄養素を強化することに利点を有しうる患者用。

【0318】

特徴：

- 低飽和脂肪酸、高ビタミンおよび高ミネラルの新規の進歩した処方物。

10

【0319】

- 1回の食事あたり6gの全脂肪および5mg未満のコレステロールを含む。

【0320】

- コクがあり、軟らかい。

【0321】

- 良好な繊維の供給源。

【0322】

- 必須ビタミンおよびミネラルの優れた供給源。

【0323】

- 低コレステロール食。

20

【0324】

- ラクトースおよびグルテンを含まない。

【0325】

成分：蒸留水、マルトデキストリン（トウモロコシ）、糖（スクロース）、カゼイン酸ナトリウムおよびカゼイン酸カルシウム、カラスムギ繊維、高オレイン酸ベニバナ油、カノーラ油、ダイズタンパク質単離物、トウモロコシ油、ダイズ繊維、三塩基性リン酸カルシウム、塩化マグネシウム、クエン酸カリウム、セルロースゲル、ダイズレシチン、二塩基性リン酸カリウム、クエン酸ナトリウム、天然および人工香料、塩化コリン、リン酸マグネシウム、アスコルビン酸、セルロースガム、塩化カリウム、カラゲナン、硫酸第一鉄、

- 酢酸トコフェロール、硫酸亜鉛、ナイアシンアミド、硫酸マンガン、パントテン酸カルシウム、硫酸銅、パルミチン酸ビタミンA、チアミンクロリド塩酸塩、塩酸ピリドキシン、リボフラビン、葉酸、塩化クロム、ピオチン、モリブデン酸ナトリウム、ヨウ化カリウム、セレン酸ナトリウム、フィロキノン、ビタミンD3、およびシアノコバラミン。

30

【0326】

タンパク質：タンパク質供給源は、2つの生物学的に価値の高いタンパク質（カゼインおよびダイズ）の混合物である。

【0327】

カゼイン酸ナトリウムおよびカゼイン酸カルシウム	80%
タンパク質単離物	20%

40

脂肪：脂肪供給源は、3つのオイル（高オレイン酸ベニバナ油、カノーラ油、およびダイズ油）の混合物である。

【0328】

高オレイン酸ベニバナ油	40%
カノーラ油	40%
ダイズ油	20%

ENSURE WITH FIBER中の脂肪レベルは、米国心臓病協会（AHA）のガイドラインを満たす。ENSURE WITH FIBER中の6gの脂肪は、全カロリーの22%を占め、そのうち2.01%の脂肪は飽和脂肪酸に由来し、6.7%はポリ不飽和脂肪酸に由来する。これらの値は、AHAガイドライン（脂肪由来の全カロリーの

50

30%以下、飽和脂肪酸由来の10%以下のカロリー、およびポリ不飽和脂肪酸由来の全カロリーの10%以下)の範囲内である。

【0329】

炭水化物：ENSURE WITH FIBERは、マルトデキストリンとスクロースとの組み合わせを含む。ほのかに甘く、種々の風味（バニラ、チョコレート、およびバターペカン）ならびにペカン、チェリー、ストロベリー、レモン、およびオレンジの香りのVARI-FLAVORS（登録商標）Flavor Pacsは、風味に関する不快感を避ける一助となり、患者の服薬遵守の援助となる。

【0330】

バニラおよび他のチョコレート以外の風味は以下である。

10

【0331】

マルトデキストリン	66%
スクロース	25%
カラスムギ繊維	7%
ダイズ繊維	2%
チョコレート	
マルトデキストリン	55%
スクロース	36%
カラスムギ繊維	7%
ダイズ繊維	2%

20

繊維：ENSURE WITH FIBERで使用される繊維混合物は、カラスムギ繊維およびダイズ繊維からなる。この混合物により、8オンス缶あたり全食物繊維の約4グラムが得られる。不溶性繊維：可溶性繊維は95：5である。

【0332】

上記および当業者に公知の種々の栄養補助剤を、本発明で作製したPUFAと置換および/または補充することができる。

【0333】

J. OxepaTM 栄養製品。

【0334】

Oxepaは、ARDS患者またはその疑いのある患者の食事管理用に設計された、低炭水化物でカロリー密度が高い経腸栄養製品である。これは、エイコサペンタエン酸（魚油由来のEPA）、 ω -リノレン酸（ルリチサ油由来のGLA）を含み、抗酸化レベルを高めた特許油混合物を含む固有の成分の組み合わせである。

30

【0335】

カロリー分布：

エネルギーの必要量を満たすために必要な体積を最小にするために、カロリー密度は高い(1.5 Cal/mL (355 Cal / 8オンス))。

【0336】

【表3】

40

表IV. Oxepaのカロリー分布

	8オンスあたり	リットルあたり	Cal %
カロリー	355	1,500	
---	22.2	93.7	55.2
炭水化物(g)	25	105.5	28.1
タンパク質(g)	14.8	62.5	16.7
水(g)	186	785	---

50

【0337】

脂肪：

- Oxepa は、8オンスの食事(93.7g/L)あたり22.2gの脂肪を含む。

【0338】

- 脂肪供給源は、31.8%カノーラ油、25%中鎖トリグリセリド(MCT)、20%ルリチサ油、20%魚油、および3.2%ダイズレシチンとのオイル混合物である。Oxepaの典型的な脂肪酸プロフィールを、表Vに示す。

【0339】

- 表VIに示すように、Oxepaによれば、バランスの取れた量のポリ不飽和脂肪酸、一不飽和脂肪酸、および飽和脂肪酸が得られる。

10

【0340】

- 中鎖トリグリセリド(MCT)(脂肪混合物の25%)は、胆汁酸によって乳化されることなく腸管によって吸収されるので、胃排出の一助となる。

【0341】

OxepaTM 栄養製品の種々の脂肪酸構成成分を、本発明で作製したPUFAと置換および/または補充することができる。

【0342】

【表4】

表V. 典型的な脂肪酸プロフィール

20

	全脂肪酸	g/8オンス	g/L*
カプロン酸(6:0)	0.2	0.04	0.18
カプリル酸(8:0)	14.69	3.1	13.07
カプリン酸(10:0)	11.06	2.33	9.87
パルミチン酸(16:0)	5.59	1.18	4.98
パルミトレイン酸	1.82	0.38	1.62
ステアリン酸	1.94	0.39	1.64
オレイン酸	24.44	5.16	21.75
リノール酸	16.28	3.44	14.49
α-リノール酸	3.47	0.73	3.09
γ-リノール酸	4.82	1.02	4.29
エイコサペンタエン酸	5.11	1.08	4.55
n-3ドコサペンタエン酸	0.55	0.12	0.49
ドコサヘキサエン酸	2.27	0.48	2.02
その他	7.55	1.52	6.72

30

脂肪酸は、全脂肪の約95%に相当する。

【0343】

40

【表5】

表VI. Oxepaの脂肪プロフィール

脂肪由来の全カロリー%	55.2
多価不飽和脂肪酸	31.44g/L
一価不飽和脂肪酸	25.53g/L
飽和脂肪酸	32.38g/L
n-6:n-3比	1.75:1
コレステロール	9.49mg/8 fl oz 40.1mg/L

10

【0344】

炭水化物：

- 炭水化物含有量は、8オンス（105.5g/L）の1回の食事あたり25.0gである。

【0345】

- 炭水化物供給源は、45%マルトデキストリン（炭水化物複合体）および55%スクロース（単糖類）であり、これらは共に容易に消化吸収される。

20

【0346】

- Oxepaの高脂肪および低炭水化物成分を、二酸化炭素（CO₂）生成が最小になるように設計する。高CO₂レベルは、人工呼吸器に依存している患者の離乳を複雑にし得る。低レベルの炭水化物はまた、ストレス誘導性高血糖症患者に有用であり得る。

【0347】

- Oxepaは、無ラクトースである。

【0348】

食物炭水化物、タンパク質由来のアミノ酸、および脂肪のグリセロール部分を、体内のグルコースと変換することができる。この過程の間中、グルコース依存性組織（中枢神経系および赤血球など）の炭水化物要求が満たされる。しかし、炭水化物を含まない食事は、ケトーシス、組織タンパク質の過剰な異化、および体液および電解質の欠乏を誘導し得る。これらの効果を、カロリー摂取が適切である場合、50gから00gの消化しやすい炭水化物の毎日の注射によって予防することができる。Oxepa中の炭水化物レベルはまた、エネルギー要求が満たされる場合、糖新生を最小にするのに十分である。

30

【0349】

タンパク質：

- Oxepaは、8オンスの1回の食事（62.5g/L）あたり14.8gのタンパク質を含む。

【0350】

- 全カロリー/窒素比（150：1）は、ストレス患者の要求を満たす。

40

【0351】

- Oxepaによれば、呼吸困難を誘発することなく同化作用の促進および除脂肪体重の維持に十分なタンパク質が得られる。高タンパク質の摂取は、胚不全患者に重要である。タンパク質は、CO₂産生に対してほとんど効果がないにもかかわらず、高タンパク質食は、人工呼吸器の運転性を向上させる。

【0352】

- Oxepaのタンパク質供給源は、86.8%のカゼイン酸ナトリウムおよび13.2%のカゼイン酸カルシウムである。

【0353】

- Oxepaにおけるタンパク質系のアミノ酸プロフィールは、科学アカデミーによっ

50

て設定された高品質のタンパク質の基準を満たすか超える。

【 0 3 5 4 】

* O x e p a は、無グルテンである。

【 0 3 5 5 】

【表 6】

分析プログラム用のデフォルト設定

GCGプログラム

FastA 検索

デフォルトパラメータ:

目的の範囲 始め=1 終わり=最後のタンパク質または核
酸

検索設定 SwissProt(タンパク質)または GenEMBL(核酸)の全て

文字列の長さ =(2)(タンパク質) =(6)(核酸)

期待値は、E()値が 2.0 に達するまでスコアを列挙する

10

TFastA 検索

デフォルトパラメータ:

目的の範囲 始め=1 終わり=最後の核酸

検索設定 GenEMBL の全て

文字列の長さ 文字列の長さ=(2)

期待値は、E()値が 2.0 に達するまでスコアを列挙する

20

Pileup

デフォルトパラメータ:

ギャップ開始ペナルティ ギャップウェイト=5

ギャップ延長ペナルティ ギャップレングスウェイト=12

プロットの形状 1[°]-ジのプロット密度=2.7

シーケンサプログラム

デフォルトパラメータ:

自動アセンブリ 汚いテータルコリスム=コンティグアセンブリはより遅いがより多
い

配列間の厳密な比較

最小適合=85%

最小重複=20

30

BLAST 2(blastp,tblastn)

デフォルトパラメータ: V=50 λ=.329 W=3
 B=50 K=0.140 X=22
 E=10 H=0.427

blast n

デフォルトパラメータ: V=100 λ=.37 W=11
 B=250 K=0.171 X=22
 E=10 H=1.31 X2=25

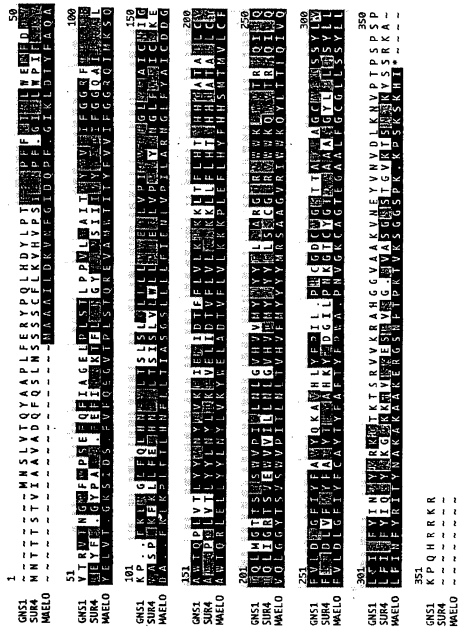
BLAST 2 コマンドの列挙

-v ヒット	表示された最高のスコア数	10
-b アラインメント	表示された最高のアラインメント数	
-e 期待値(E)	[実際]デフォルト=10.0	
-m アラインメント表示オプション	0=対の長さ 1=同一性を示すマスター-スレーブ 2=マスター-スレーブ(同一性なし) 3=フラットマスター-スレーブ(同一性を示す) 4=フラットマスター-スレーブ(同一性を示さない) 5=マスター-スレーブ(同一性および平滑末端なし) 6=マスター-スレーブ(同一性および平滑末端なし)(整数値)	20
	デフォルト=0	

- F 検索配列のフィルタリング (blastn では DUST、他は SEG) [T/F]
デフォルト=T
 - G キャップ開始のためのコスト (0 はデフォルトを呼び出す) [整数値]
デフォルト=0
 - E キャップ伸長コスト (0 はデフォルトを呼び出す) [整数値]
デフォルト=0
 - X キャップのあるアラインメントの X トロップオフ (ヒット) (0 はデフォルトを呼び出す) [整数値]
デフォルト=0
 - I デフライン中の GI を示す [T/F]
デフォルト=F 10
 - q スクレッチミスマッチのペナルティ (blastn のみ) [整数値]
デフォルト=-3
 - r スクレッチ適合のリポート (blastn のみ) [整数値]
デフォルト=1
 - f ヒット伸長用の閾値 (0 の場合デフォルト) [整数値]
デフォルト=0
 - g キャップの入ったアラインメントの実行 (tblastx では利用できない) [T/F]
デフォルト=T
 - 使用する検索遺伝子コード [整数値]
デフォルト=1 20
 - D DB 遺伝子コード (tblast[nx] のみ) [整数値]
デフォルト=1
 - J 予想される検索デフライン [T/F]
デフォルト=F
 - M 行列 [配列]
デフォルト=BLOSUM62
 - W 文字の長さ (0 の場合デフォルト) [整数値]
デフォルト=0
 - z データベースの有効な長さ (実際のサイズには 0 を使用) [整数値]
デフォルト=0
 - a 使用するフォント数 [整数値] 30
デフォルト=一致するサイト (SeqServer.conf)
- キャップ開始/キャップ伸長コスト (-G/-E) パラメータについての許容値およびデフォルト値

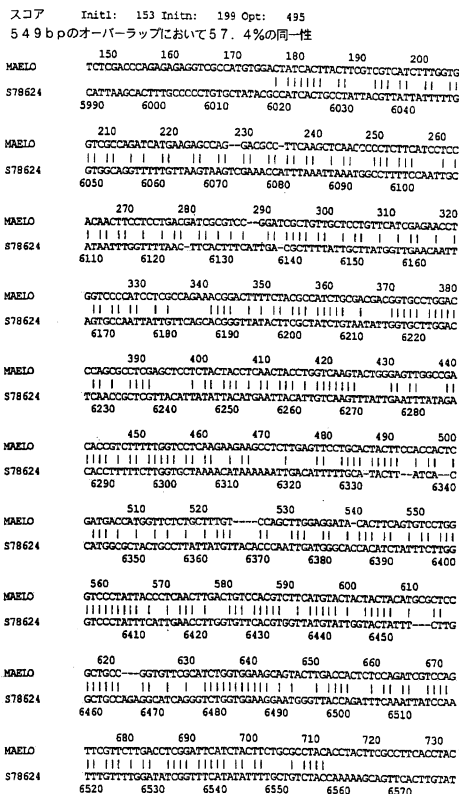
【 8 】

Figure 8



【 9 】

Figure 9



【 10 A 】

Figure 10A

種名(7/23)	334(qRAB5) 25 DIM GLA	334(qY242) 25 DIM GLA	334(qRAB5) 25 DIM GLA	334(qY242) 25 DIM GLA	334(qRAB5) 25 DIM GLA	334(qRAB5) 25 DIM GLA
脂肪酸	脂質(μg)	脂質(μg)	脂質(μg)	脂質(μg)	脂質(μg)	脂質(μg)
C16:0	11,848	35,123	83,160	83,160	16,294	25,34
C16:1	30,665	32,780	314,464	114,466	16,294	113,913
C18:0	6,185	10,515	18,879	18,879	5,535	5,535
C18:1n-9	35,340	33,989	154,368	106,881	28,388	51,259
C20:0	ND	48,856	12,434	12,434	ND	ND
C20:1n-9	(0.375%) * 0.352	0.474	0.710	0.667	ND	0.516
C20:2n-6	ND	(0.092%) * 0.226	0.324	0.460	(0.269%) * 1.006	ND
C22:0	ND	ND	0.460	0.315	ND	ND
C22:1n-9	ND	ND	0.321	1.825	ND	0.999
全脂肪	93,760	245,090	771,690	374,420	112,99	256,52
ND =検出不可						
本全脂肪組成に対する割合 (%)						

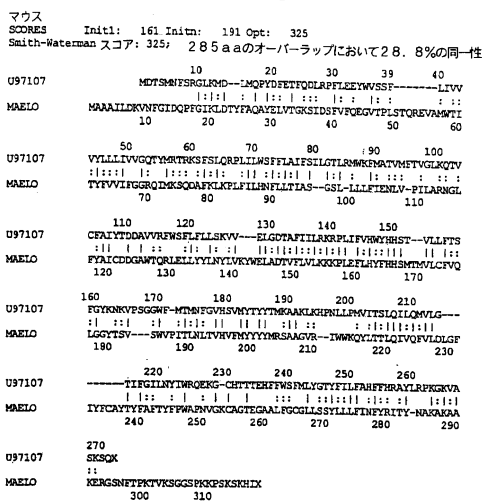
【 10 B 】

Figure 10B

種名(7/23)	334(qY242) 25 DIM GLA	334(qRAB5) 25 DIM GLA	334(qRAB5) 25 DIM GLA	334(qRAB5) 25 DIM GLA	334(qRAB5) 25 DIM GLA
脂肪酸	脂質(μg)	脂質(μg)	脂質(μg)	脂質(μg)	脂質(μg)
C16:0	60,683	61,487	100,908	96,193	66,761
C16:1	79,838	79,586	359,744	220,440	87,359
C18:0	9,784	10,106	15,317	15,165	16,744
C18:1n-9	38,536	39,936	108,472	89,637	71,631
C18:2n-6	17,974	17,833	82,866	56,596	17,766
C20:0	ND	ND	0.510	0.570	ND
C20:1n-9	(0.136%) * 0.389	(0.130%) * 0.374	(0.336%) * 3.035	(0.401%) * 2.689	(0.353%) * 1.185
C22:0	ND	ND	0.414	0.383	ND
C22:1n-9	ND	ND	1.513	1.626	ND
全脂肪	285,560	288,045	902,560	671,113	335,496
本全脂肪組成に対する割合 (%)					

【 図 16 】

Figure 16



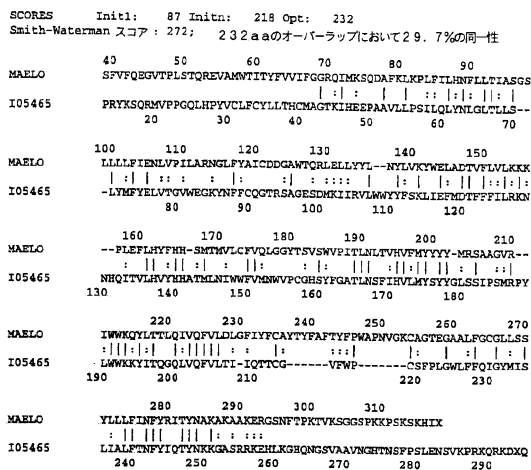
【 図 18 】

Figure 18

- 1 MGTDQGRFTT WEELAAHNTK DLLLLAIRG VYDVKFLSR HPGGVDTLLL
- 51 GAGRDTVPVF EMYHAFGAAD AIMKXYVGT LVSNELPIFF EPTVPHKTIK
- 101 TRVEFYFDR NIDPKNRPEI WGRYALLFGS LIASYAQLF VPFVVERTWL
- 151 QVFAIINGF ACAQVGLNPL HDASHPSVTH NPTWVKILGA THDFFNGASY
- 201 LVWVYQHMIG HHPYTNLAGA DEDVSTSEPD VRRKPNQKN FVNHNQHEMF
- 251 VPFLYGLLAF KVRIQDINIL YFVNTDAIR VNPISWHTV MFWGGKAFFV
- 301 WYRLIVPLQY LPLGRVLLF TVADMVSSYV LALFPQANHV VEEVQWPLPD
- 351 ENGIHQDWA AMQVETQDY AHDShLWTSI TGSlnYQAVH HLFVNVQNH
- 401 YPDILAIEN TCSEYKVPYL VKDFWQAPA SHLEHLRVLG LRPKEE*

【 図 17 】

Figure 17



【 図 19 】

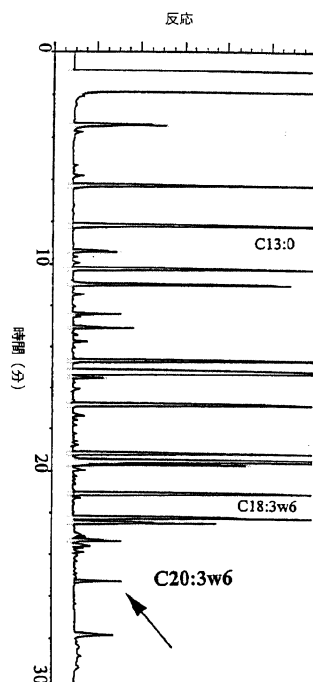


Figure 19

【 20 】

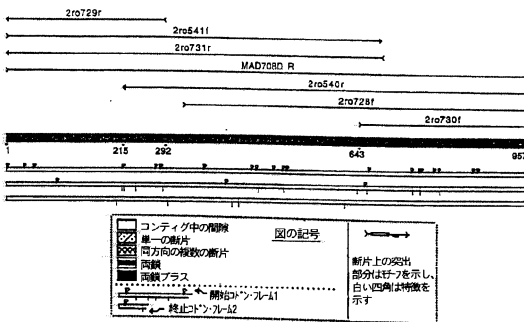
Figure 20

宿主(プラスミド) 添加された基質	334(MAD708-2) 25μM GLA		334(MAD708-10) 25μM GLA		334(MAD708-18) 25μM GLA		334(MAD708-30) 25μM GLA	
	脂質種	% 全脂質	脂質種	% 全脂質	脂質種	% 全脂質	脂質種	% 全脂質
C16:0	14.1	14.68	14.68	14.38	15.45	14.13	14.13	13.59
C16:1	42.84	43.42	43.42	41.57	38.08	43.38	43.38	43.98
C18:0	3.19	3.28	3.28	3.63	3.08	3.37	2.04	2.04
C18:1n-9	17.66	19.6	19.6	20.8	20.06	20.06	10.88	10.88
C18:3n-6	6.65	5.58	5.58	10.24	9.46	3.56	11.14	11.14
C20:0	0.26	0.3	0.3	0.32	0.4	0.46	0.57	0.57
C20:3n-6	(47.5%) 6.03	(41.2%) 3.92	(41.2%) 3.92	(8.9%) 0.91	(21.5%) 2.59	(49%) 3.43	(3.4%) 0.24	
全脂質 (μg)	238.47	307.86	307.86	186.51	167.31	207.47	466.65	

(変換率 (%)) = 生成物 / (基質 + 生成物)

【 21 】

Figure 21



【 22 】

Figure 22

```

1 ATGGAGTCGA TTGGCCGATT CTCCCATCA AAGATGCCGC AAGATCTGTT
51 TATGGACCTT GCCACGGCTA TCGGTGTCCG GCCCGCGCCC TATGTCGATC
101 CTCCTCAGGC CGCGCTGGTG GCCCAGGCCG AGAAGTACAT CCCCACGATT
151 CTCACATCA CTCCTGGGTT CCGTGTCCGG GGGGATGCGC CTTTGGCCCG
201 TCGACCTGCC TTGATGAACC CGTTCACGT GCTGTGATC GTGCTCGCTT
251 ATTGCTCAC GGCCTTATG GGCATCGACA TCATGAAGAA CTTTGGAGCG
301 TTGAGGTCAC AGACCTTTTC GCGCTCCGAC AACCTTTGTC TGGTCTCGAT
351 CAGCGCCATC ATGCGGGTG GATCTCTGTA CCGGCTTAT CAGGCCAATC
401 ATGGACTGTT TGAGAACCCT GCTGATCATA CCGGCTTAT CAGGCCAATC
451 GCCAAGATGA TCTGGCTTCT CTACTCTTCC AAGATCAGCG TCTTCTCGA
501 CACCATGATC ATGGTCTTCA AGAAGAACA CCGCAGATC TCTTCTCGA
551 ACGTTTACCA CCACAGCTCC ATCTTACCCA TGTGTGTGTT GGTCACTTCT
601 GTTGCACCCA ACGGTGAAGC CTACTCTTCT GCTGCTTGA ACTGCTTCT
651 CCATGTGATC ATGATCGGCT ACTACTTCTT GTCGGCTTGT GGTCTCAAGC
701 AGGTGTCTGT CATCAAGTTC TACATCAGC GCTCGCAGT GACACAGTTC
751 TGCATGATGT CGGTCCAGTC TTCCTGGGAC ATGTACGCCA TGAAGTCTCT
801 TGGCCGCCCC GGATACCCCT TCTTCTGCTT GGTCTGCTT TGGTCTTCT
851 TGTGACCCAT GCTCGGCTTC TTCTTCAACT TTTACAGAAA GAACGCCAAG
901 TTGGCCAAAG AGGCCAAGGC CGACGCTGCC AAGGAGAAGG CAAGGAAGCT
951 GCAGTAA

```

【 23 】

Figure 23

```

1 MESIAPFLPS KMPDQLFMDL ATAIGVRAAP YVDFLEAALV AQAKEYIPTI
51 VHTRGFLVA VESPLARELP LMNPFVLLI VLXLYTVFV GMQIMKNFER
101 FEVKTFSLLH NFLCVSISAY MCGGILYEAY QANYGLFENA ADHTFRGLPM
151 AKMIWLFYFS KIMEFVDIMI MVLKRNRRQI SFLHVVHSS IPTIWLVTVF
201 VAPNGEAYFS AALNSFIHVI MYGYFFLSAL GPKQVSPKIF YIITRSQMTQF
251 QMSVQSSWD MYAMKVLGRP GYPFFITALL WFYMWTLGL PYNFYRKNAX
301 LAKQAKADAA KEKARKLQ*

```

【 24 】

Figure 24

宿主(プラスミド) 添加された基質	334(pRPB2) 25μM GLA (n=4)	334 (pYES2) 25μM GLA
脂質種	% 全脂質	
C16:0	15.65	15.23
C16:1	35.2	38.59
C18:0	5.68	5.55
C18:1n-9	25.55	25.27
C18:3n-6	3.1	6.75
C20:0	0.36	0.14
C20:3n-6	(62.0%) 5.06	(2.6%) 0.18
全脂質 (μg)	314	247

(変換率 (%)) = 生成物 / (基質 + 生成物)

【 25 】

Figure 25

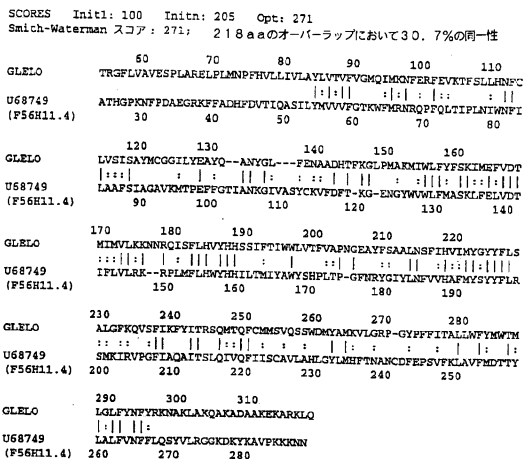
宿主(プラスミド) 添加された基質	334(pRPB2) 25μM GLA		334(pRPB2) 25μM GLA		334(pRPB2) 25μM GLA		334(pRPB2) 25μM GLA	
	脂質種	% 全脂質	脂質種	% 全脂質	脂質種	% 全脂質	脂質種	% 全脂質
C16:0	15.07	14.57	15.74	15.69	16.08	15.08	15.17	15.17
C16:1	33.7	32.7	32.8	23.65	31.65	31.65	33.36	33.36
C18:0	9.78	9.43	9.43	8.33	4.92	5.33	5.33	5.33
C18:1n-9	31.2	31.2	31.2	20.1	20.1	20.1	20.1	20.1
C18:3n-6								
C20:0								
C20:3n-6								
全脂質 (μg)	132	139	171	31	231	117	176	165

宿主(プラスミド) 添加された基質	334(pRPB2) 25μM GLA		334(pRPB2) 25μM GLA		334(pRPB2) 25μM GLA		334(pRPB2) 25μM GLA	
	脂質種	% 全脂質	脂質種	% 全脂質	脂質種	% 全脂質	脂質種	% 全脂質
C16:0	11.37	16.01	20.0	10.35	10.35	10.35	10.35	10.35
C16:1	21.6	34.31	34.31	6.4	6.4	6.4	6.4	6.4
C18:0	6.2	5.39	5.39	28.54	28.54	28.54	28.54	28.54
C18:1n-9	29.4	28.54	28.54	41.95	41.95	41.95	41.95	41.95
C18:3n-6	4.33	4.33	4.33	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
C20:0								
C20:3n-6								
全脂質 (μg)	110	196	103	20	20	20	20	20

*は基質の添加を示す。
(変換率 (%)) = 生成物 / (基質 + 生成物)

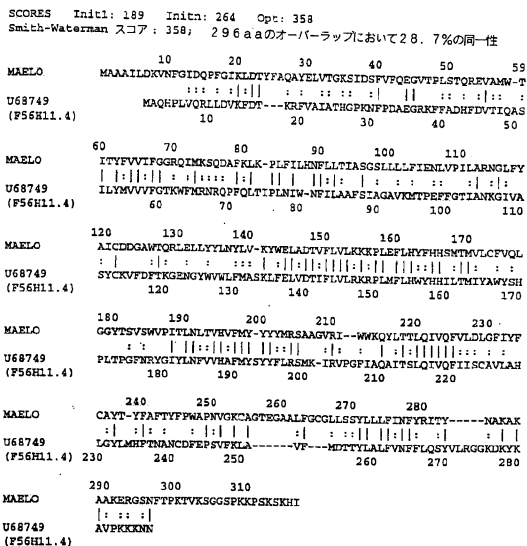
【 図 3 9 】

Figure 39



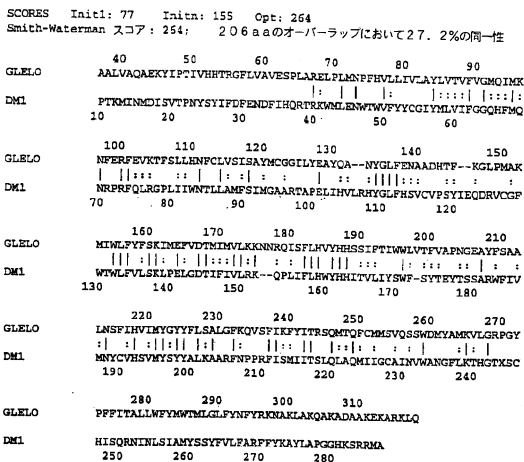
【 図 4 0 】

Figure 40



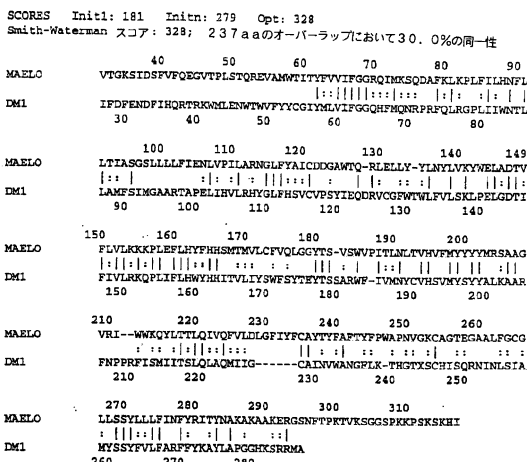
【 図 4 1 】

Figure 41



【 図 4 2 】

Figure 42



【 図 4 3 】

Figure 43

```

1 ATGGAACATT TTGATGCATC ACTTAGTACC TATTCAAGG CATTGCTAGG
51 CCTCGAGAT ACTAGAGTAA AAGGATGGT TCTCTGGAC AATTATATAC
101 CCACTTPTAT CTGCTCTGTC ATATATTAC TAATTGTATG GCTGGGACCA
151 AATACACGA GGAATAACA GCCATTCTCT TGCCGGGGGA TTTTAGTGGT
201 GTATACCTT GACTACAC ACATTTCTCT GTATATGTTG TGTGASTIAG
251 TAACAGGAGT APGGGAAGC AAATCAACT TCTCTGTCA GGGCACACG
301 ACCCGAGGAG AATCAGATAT GAAGATATC CGTGTCTCT GGTGTACTA
351 CTCTCCAAA CTCATAGAAT TTATGGACAC TTCTCTCTC ATCCTGCGCA
401 AGAACACCA CCAGATCAGG GTCCCTCAGG TCTACACCA TCCCTCGATG
451 CTGACATCT GGTGGTTGT GATGAATGG GTCCCTCGG GCCACTCTTA
501 TTTTGGTGC ACACTTAATA GCTTCATCCA CACTCCTATG TACTCTTACT
551 ATGTTTGTG GTCAGTCCCT TCCATCGCTC CATACCTCTG GTGGAAGAG
601 TACATCACT AGGGGACGT GCTTCAGTTP GTGCTGACA TCATCCAGC
651 CAGCTCGGG GTCATCTGGC CGTGCACATT CCCTCTTGGT TGGTGTATT
701 TCCAGATTGG ATACATGATT TCCTCATG CTCTCTTAC AAACCTTAC
751 ATTCAGCCT ACACACGAA AGGGGCTCC CGAAGGAAG ACCAAGCTA
801 GGACCACAG GAAATACAT TGGCTGCTG GAATGGACAC ACCAAGACT
851 TTTCAACCTT GAAATACAT GTGAAGCCAA GGAAGCTGCG GAAGGATTGA
901 AGTCAAAGAA TTGA

```

【 図 4 4 】

Figure 44

```

1 MEHFDASLST YFKALLGPRD TRVKGWLLD NYIPTFICSV IYLLIWLWGP
51 KMRNKQPPS CRGILVVVNL GLLLSLYMF CELVTVWEG KMFPCQGR
101 TAGESDMKII RVLWVYFSK LIEFMDFFF ILRQNHQIT VLVVYHASM
151 LNIWVFMWV VPCGHSYFGA TINSPIHVM YSYGLSSVP SMRPLYWKK
201 YITQGQLQF VLTIIQTSCG VIMPCTPLG WLYFQIGYI SLIALFTNPF
251 IQTYNKGAS RRKDHLDKHQ NGSMAVNGH TNSFPLENN VKPRLRKRD*

```

【 図 4 6 】

Figure 46

```

1 ATGGCTCAGC ATCCGCTCGT TCAACGGCTT CTCGATGCA AATTGACAC
51 GAAAGATTT GTGGTATTG CTACTCATGG GCCAAGAAT TTCCTGACG
101 CAGAAGTCC CAATCTCTT GCTGATCACT TTGATGTTAC TATTCAAGCT
151 TCAATCTCTG ACATGCTGT TGTATTCGGA ACAAAATGT TCAATCGTAA
201 TGTACACCA TTCCATATGA CTATCTCACT CAACATCTGG AATTCAATCC
251 TCGCGCATT TTCCATGCGA GAGCTGCTA AAATGACCC AGATGCTTT
301 GGAACCATTT CCAACAAGG AATCTGCA TCTACTTSCA AAGTGTGGA
351 TTTACAGAA GGAGAGAATG GATCACTGGT GTGCTCTTTC AAGGCTTCCA
401 AACTTTTCCA ACTTGTGATC ACCATCTCTT TGTCTCTTTC TAAAGTCCA
451 CTCACTTCC TTCACTGGTA TCACCATATP CTCACCATGA TCFAGGCTG
501 GTACTCTCAT CCATGACCC CAGGATCAA CAGATACCGA ATTTACTTA
551 ACTTTGCTG TCCAGGCTT ATGATCTCT ACTACTTCTT TCGCTGATG
601 AAGATTGCG TGCCAGGATT CATGSCCAA GCTATACAT CTCTCAAT
651 GCTCAATTC ATCATCTCTT GCGCGTTCT TGCTCATCTT GGTATCTCA
701 TGCACTTCC CAATGCCAAC TGTGATTCG AGCCATCAGT ATTCAAGCT
751 GCAATTTCA TGGACACAC ATACTGGCT CTTTGTGCA ACTTCTCTT
801 CCAATCATP GTTCTCCCG GAGGAAAGA CAAGTACAG CGACTGCCAA
851 AGAAGAAGA CAACTAA

```

【 図 4 7 】

Figure 47

```

1 MAQHLVQLR LDVFKDTRF VALATHGPKN FPDAGREKFF ADHFVDVIOA
51 SILYVVVVG TWFMRRNPQ FOLTIPLNIW NFILAASIA GAVKTPPEFF
101 GTIANKGIVA SYCKVFDPTK GENGYWVLF MASKLPELVD TIFVLKRRP
151 LMFGLWTHRI LMIYAMYSR PLTPGFNRVY IYLVVVFHAF MYSYVFLRSM
201 KIRVPGFIAQ AITSLQIVQF IISCVAHLH GYLMHFTNAN CDFEPEVFKL
251 AVFMOTTYLA LFNVNFQSY VLRGGKDRYK AVPKKRN

```

【 図 4 5 】

Figure 45

宿主(7231) 添加された基質	334(pYX242) 25 μM GLA		334(pRAE-5B-A1) 25 μM GLA		334(pRAE-5B-A1) 25 μM AA	
	脂肪酸	全脂肪酸(%)	脂肪酸	全脂肪酸(%)	脂肪酸	全脂肪酸(%)
C18:3n-6	4.40	2.71	0.03	0.04	0.04	0.04
C20:3n-6	0.09	(50.34%)* 2.75	0.02	0.02	0.02	0.02
C22:4n-6			7.84	3.97	ND	(23.37%)* 1.21
C16:1n-7	4.11	34.72	41.49	35.07		
C18:1n-7	1.85	11.33	2.01	11.57		
C20:1n-7	0.04	1.48	0.04	1.62		
C18:1n-9	15.60	15.66	15.16	14.57		
C20:1n-9	0.06	0.22	0.06	0.23		
C16:1n-5	0.11	0.62	0.12	0.58		
全脂質	370	969	359	514		

*変換率(%) = 生成物 / (基質 + 生成物)

【 図 4 8 】

【 図 4 8 】

Figure 48

宿主(7231) 添加された基質	334(pYX242) 50 μM GLA + 50 μM AA	334(pRET-21) 50 μM GLA + 50 μM AA	334(pRET-22) 50 μM GLA + 50 μM AA
脂肪酸	全脂肪酸(%)	全脂肪酸(%)	全脂肪酸(%)
C16:0	9.22	12.46	9.9
C16:1	0.09	0.18	0.13
C18:0	1.46	2.41	1.49
C18:1n-9	4.03	4.92	3.91
C18:3n-6	10.02	11.89	8.69
C20:3n-6	(1.28%)* 0.13	(11.1%)* 1.48	(19.4%)* 2.09
C22:4n-6	46.98	28.87	35.25
C22:4n-6	0	0	0
全脂質 (mg)	212	174	187

*変換率(%) = 生成物 / (基質 + 生成物)

【 図 4 9 】

【 図 4 9 】

Figure 49

```

1 ATGAACATGT CAGTGTGAC TTTACAAGAA TATGAATCG AAAAGCAGTT
51 CAACGAGAAAT GAAGCCATCC AATGGATGCA GGAAAAGCTG AAGAAATCTT
101 TCCTGTTTTC TGCTCTGTAT TACTGCTTGA TATTGCGTGG TCGGACCTTA
151 ATGAATAAAC GAGCAAAGTT TGAAGTGGG AAGCCATTAG TGCTCTGCTC
201 CTGACCCCTT GCAGTCTTCA GTATATTCCG TGCTCTTCCA ACTGGTGGCT
251 ATATGGTGTG CATTTTGTAT ACCAAAAGCC TGAAGCAGCT AGTPTGTGAC
301 CAGGGCTTTT ACAATGGACC TGTCCAGAAA TTTCTGGGCTT TTTCTGGGCTT
351 GCTAAGCAA GCACCGAAC TAGGAGATAC AATATTCATT ATTCTGAGGA
401 AGCAGAGACT GATCTCTCTG AGACATGATC ACCACATCAC TGTGCTCCTG
451 TACTCTTGGT ACTCTTACAA ACCCGTGA GTACTCTTAC GTTGGTTCAT
501 GACTATGAAC TATGGCTGTC ACCCGTGA GTACTCTTAC TATGCTTTCG
551 GGGCGGCAGG TTTCCGATCT TCCCGAAGT TTTCTGGGCTT TTTCTGGGCTT
601 TCCAGATCA CTCAGATGCT GATGGGCTGT TTGCTGATTT CATCACCTTG
651 CTGCTGATG CAGCATGACC AGTGTCACTC TCACTTACCT ACCTGGTCTT
701 GGTCTCCTCT CATGTACCTC AGTACTCTTG TGCTCTTCTG CCAATTCCTT
751 TTTGAGGCTT ACATCGGCAA AATGAGGAAA ACAACGAAAG CTGAATAG

```

【 50 】

Figure 50

```
1  MNMSVLTLQE YEPKQPNEN EAIQMMQENW KKSPLFSALY AAFIFGGRHL
51  MNKRAKFEEL KPLVLWSLTL AVESIFGALR TGAYMVYILM TKGLKQSVCD
101 QGFYNGFVSK FWAYAFVLSK APELGDVTPI ILRKKLIFL HWYHHITVLL
151 YSWYSYKDMV AGGGWFMTM YGVHVMYSY YALRAAGFRV SRKPFAMFTL
201 SQTQMLMGC VVNYLVFCWM QHDQCHSHFQ NIFWSSLMYL SYLVLFCHFF
251 FEAYIGQMRK TTRAE*
```

【 配列表 】

0005657406000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/00	1 0 1
C 1 2 N	1/14	(2006.01)	C 1 2 N	1/14	A
A 0 1 H	5/00	(2006.01)	A 0 1 H	5/00	A
A 0 1 K	67/027	(2006.01)	A 0 1 K	67/027	
A 2 3 L	1/30	(2006.01)	A 2 3 L	1/30	Z
A 6 1 K	8/36	(2006.01)	A 6 1 K	8/36	
A 6 1 K	31/201	(2006.01)	A 6 1 K	31/201	
A 6 1 K	31/202	(2006.01)	A 6 1 K	31/202	
A 6 1 K	47/36	(2006.01)	A 6 1 K	47/36	
A 6 1 P	3/02	(2006.01)	A 6 1 P	3/02	
A 6 1 K	47/02	(2006.01)	A 6 1 K	47/02	
A 6 1 K	47/26	(2006.01)	A 6 1 K	47/26	
A 6 1 K	47/18	(2006.01)	A 6 1 K	47/18	
A 6 1 K	47/12	(2006.01)	A 6 1 K	47/12	
A 6 1 K	47/24	(2006.01)	A 6 1 K	47/24	
A 6 1 K	47/10	(2006.01)	A 6 1 K	47/10	
A 2 3 K	1/16	(2006.01)	A 2 3 K	1/16	3 0 1 F
A 2 3 K	1/14	(2006.01)	A 2 3 K	1/14	
A 2 3 K	1/175	(2006.01)	A 2 3 K	1/16	3 0 4 C
			A 2 3 K	1/175	

- (72)発明者 ユン - シヨン・ホワン
アメリカ合衆国、オハイオ・4 3 2 2 0、アツパー・アーリントン、ダンバーズ・コート・2 4 6
2
- (72)発明者 ジエニファー・サーモンド
アメリカ合衆国、オハイオ・4 3 2 3 1、コロンバス、アデイロンダック・3 7 0 2
- (72)発明者 ステイブ・ジェイ・カークナー
アメリカ合衆国、オハイオ・4 3 0 8 1、ウエスタービル、スリー・フォークス・ロード・1 2 4
4
- (72)発明者 ジエニファー・エム・パーカー - バーンズ
アメリカ合衆国、オハイオ・4 3 0 5 4、ニュー・オルバニー、ベルクロス・ドライブ・1 3 1 1
- (72)発明者 タパス・ダス
アメリカ合衆国、オハイオ・4 3 0 8 5、ワージントン、リンクフィールド・ドライブ・9 3 6

審査官 濱田 光浩

- (56)参考文献 国際公開第00/055330(WO, A1)
特開平10-070992(JP, A)
欧州特許出願公開第00296751(EP, A1)
国際公開第88/007577(WO, A1)
国際公開第00/060082(WO, A1)
米国特許第07070970(US, B1)
米国特許第06403349(US, B1)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 1 2 N 1 5 / 0 0

C12N 9/00

C12P 7/40

CAplus/MEDLINE/BIOSIS(STN)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq