

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-534032

(P2009-534032A)

(43) 公表日 平成21年9月24日(2009.9.24)

| (51) Int.Cl. | F 1 | テーマコード (参考) |
|------------------------|--------------|-------------------|
| C 12 N 15/09 (2006.01) | C 12 N 15/00 | Z N A A 4 B O 2 4 |
| C 12 P 7/64 (2006.01) | C 12 P 7/64 | 4 B O 6 4 |
| C 12 N 1/15 (2006.01) | C 12 N 1/15 | 4 B O 6 5 |
| C 12 N 1/19 (2006.01) | C 12 N 1/19 | |
| C 12 N 1/21 (2006.01) | C 12 N 1/21 | |

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 72 頁) 最終頁に続く

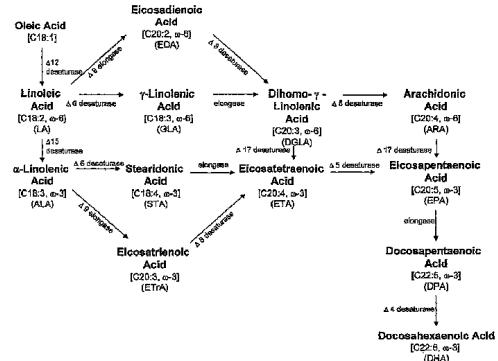
| | | | |
|---------------|------------------------------|-------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| (21) 出願番号 | 特願2009-506580 (P2009-506580) | (71) 出願人 | 390023674 イ・アイ・デュポン・ドウ・ヌムール・ アンド・カンパニー |
| (86) (22) 出願日 | 平成19年4月19日 (2007.4.19) | E. I. DU PONT DE NEMO URS AND COMPANY | |
| (85) 翻訳文提出日 | 平成20年12月1日 (2008.12.1) | アメリカ合衆国、デラウェア州、ウイルミ ントン、マーケット・ストリート 100 7 | |
| (86) 國際出願番号 | PCT/US2007/009572 | (74) 代理人 | 100127926 弁理士 結田 純次 |
| (87) 國際公開番号 | W02007/123999 | (74) 代理人 | 100140132 弁理士 竹林 則幸 |
| (87) 國際公開日 | 平成19年11月1日 (2007.11.1) | (74) 代理人 | 100091731 弁理士 高木 千嘉 |
| (31) 優先権主張番号 | 60/793,575 | | |
| (32) 優先日 | 平成18年4月20日 (2006.4.20) | | |
| (33) 優先権主張国 | 米国(US) | | |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 Δ 17 デサチュラーゼおよび多価不飽和脂肪酸の製造におけるそれらの使用

(57) 【要約】

本発明は、 - 6 脂肪酸をそれらの - 3 対応物に変換する能力 (すなわちアラキドン酸 [20 : 4, A R A] からエイコサペンタエン酸 [20 : 5, E P A]への変換) を有する 17 デサチュラーゼに関する。 17 デサチュラーゼをコードする単離された核酸断片およびこのような断片を含んでなる組み換えコンストラクト、ならびにこれらの 17 デサチュラーゼを植物および油性酵母中で使用して長鎖多価不飽和脂肪酸 (P U F A) を製造する方法が開示される。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

a .) 配列番号 3 および配列番号 7 よりなる群から選択された 17 デサチュラーゼ酵素をコードする単離されたヌクレオチド配列、または

b .) (a) に完全に相補的である単離されたヌクレオチド配列よりなる群から選択される、単離された核酸分子。

【請求項 2】

配列番号 4 で記載される 17 デサチュラーゼ酵素をコードする単離された核酸分子。

【請求項 3】

少なくとも 168 個のコドンがヤロウィア中での発現のためにコドン最適化された、配列番号 2 で記載される 17 デサチュラーゼ酵素をコードする単離された核酸分子。 10

【請求項 4】

少なくとも 160 個のコドンがヤロウィア中での発現のためにコドン最適化された、配列番号 6 で記載される 17 デサチュラーゼ酵素をコードする単離された核酸分子。

【請求項 5】

適切な制御配列と作動的に結合する、請求項 1 に記載の単離された核酸分子を含むキメラ遺伝子。

【請求項 6】

請求項 1 に記載の単離された核酸分子を含む、形質転換されたヤロウィア種。

【請求項 7】

ヤロウィア・リポリティカ A T C C # 20362、ヤロウィア・リポリティカ A T C C # 8862、ヤロウィア・リポリティカ A T C C # 18944、ヤロウィア・リポリティカ A T C C # 76982、およびヤロウィア・リポリティカ L G A M S (7) 1 よりなる群から選択される、請求項 6 に記載の形質転換されたヤロウィア種。 20

【請求項 8】

a) i) 1) クラスター W 法のアラインメントに基づいて、配列番号 2 で記載されるアミノ酸配列を有するポリペプチドと比較すると少なくとも 90.9 % の同一性を有する、 17 デサチュラーゼポリペプチドをコードする単離されたヌクレオチド分子、

2) クラスター W 法のアラインメントに基づいて、配列番号 4 で記載されるアミノ酸配列を有するポリペプチドと比較すると少なくとも 91.4 % の同一性を有する、 17 デサチュラーゼポリペプチドをコードする単離されたヌクレオチド分子、および 30

3) クラスター W 法のアラインメントに基づいて、配列番号 6 で記載されるアミノ酸配列を有するポリペプチドと比較すると少なくとも 89.5 % の同一性を有する、 17 デサチュラーゼポリペプチドをコードする単離されたヌクレオチド分子

よりなる群から選択される、 17 デサチュラーゼポリペプチドをコードする単離されたヌクレオチド分子と、

i i) アラキドン酸源

とを含む宿主細胞を提供する工程と、

b) 17 デサチュラーゼポリペプチドをコードする核酸分子が発現されてアラキドン酸がエイコサペンタエン酸に転換される条件下で、工程 (a) の宿主細胞を生育させる工程と、 40

c) 場合により工程 (b) のエイコサペンタエン酸を回収する工程とを含む、エイコサペンタエン酸を製造する方法。

【請求項 9】

a) i) 1) クラスター W 法のアラインメントに基づいて、配列番号 2 で記載されるアミノ酸配列を有するポリペプチドと比較すると少なくとも 90.9 % の同一性を有する、 17 デサチュラーゼポリペプチドをコードする単離されたヌクレオチド分子、

2) クラスター W 法のアラインメントに基づいて、配列番号 4 で記載されるアミノ酸配列を有するポリペプチドと比較すると少なくとも 91.4 % の同一性を有する、 17 デサチュラーゼポリペプチドをコードする単離されたヌクレオチド分子、および 50

3) クラスターW法のアラインメントに基づいて、配列番号6で記載されるアミノ酸配列を有するポリペプチドと比較すると少なくとも89.5%の同一性を有する、17デサチュラーゼポリペプチドをコードする単離されたヌクレオチド分子よりなる群から選択される、17デサチュラーゼポリペプチドをコードする単離されたヌクレオチド分子と、

i i) ジホモ- - リノレン酸源

とを含む宿主細胞を提供する工程と、

b) 17デサチュラーゼポリペプチドをコードする核酸分子が発現されてジホモ- - リノレン酸がエイコサテトラエン酸に変換される条件下で、工程(a)の宿主細胞を生育させる工程と、

c) 場合により工程(b)のエイコサテトラエン酸を回収する工程とを含む、エイコサテトラエン酸を製造する方法。

【請求項10】

a) i) 1) クラスターW法のアラインメントに基づいて、配列番号2で記載されるアミノ酸配列を有するポリペプチドと比較すると少なくとも90.9%の同一性を有する、17デサチュラーゼポリペプチドをコードする単離されたヌクレオチド分子、および

2) クラスターW法のアラインメントに基づいて、配列番号4で記載されるアミノ酸配列を有するポリペプチドと比較すると少なくとも91.4%の同一性を有する、17デサチュラーゼポリペプチドをコードする単離されたヌクレオチド分子

よりなる群から選択された、二機能性 17デサチュラーゼポリペプチドをコードする単離されたヌクレオチド分子と、

i i) リノール酸源

とを含む宿主細胞を提供する工程と、

b) 二機能性 17デサチュラーゼポリペプチドをコードする核酸分子が発現されてリノール酸が - リノレン酸に変換される条件下で、工程(a)の宿主細胞を生育させる工程と、

c) 場合により工程(b)の - リノレン酸を回収する工程とを含む、 - リノレン酸を製造する方法。

【請求項11】

単離された核酸分子が、配列番号2、4、および6よりなる群から選択されたアミノ酸配列を有する 17デサチュラーゼポリペプチドをコードする、請求項8または9に記載の方法。

【請求項12】

a.) 単離された核酸分子が、配列番号3および配列番号7よりなる群から選択された核酸配列を有し、

b.) 宿主細胞がヤロウイア・リポリティカである、

請求項8または9に記載の方法。

【請求項13】

宿主細胞が、藻類、細菌、酵母、卵菌綱、および真菌よりなる群から選択される、請求項8または9に記載の方法。

【請求項14】

宿主細胞が、スラウストキトリウム(Thraustochytrium)種、シゾキトリウム(Schizochytrium)種、およびモルティエラ(Mortierella)種よりなる群から選択された真菌である、請求項13に記載の方法。

【請求項15】

酵母が油性酵母である、請求項13に記載の方法。

【請求項16】

油性酵母が、ヤロウイア、カンジダ、ロドトルラ、ロドスボリジウム、クリプトコッカス、トリコスボロン、およびリポマイセスよりなる群から選択される、請求項15に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 17】

ヤロウィアが、ヤロウィア・リポリティカATCC # 20362、ヤロウィア・リポリティカATCC # 8862、ヤロウィア・リポリティカATCC # 18944、ヤロウィア・リポリティカATCC # 76982、およびヤロウィア・リポリティカL G A M S (7) 1よりなる群から選択される、請求項に16記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2006年4月20日に出願された米国仮特許出願第60/793575号
明細書の優先権の利益を主張する。 10

【0002】

本発明は、生物工学の分野にある。より具体的には、本発明は、17脂肪酸デサチュラーゼ酵素をコードする核酸断片の同定、および長鎖多価不飽和脂肪酸(PUFA)の製造におけるこれらのデサチュラーゼの使用に関する。 20

【背景技術】

【0003】

PUFAの重要性には議論の余地がない。例えば特定のPUFAは健康な細胞の重要な生物学的構成要素であり、哺乳類では新規(de novo)合成できず、その代わりに食餌中で得なくてはならず、またはリノール酸(LA、18:2 - 6)または - リノレン酸(ALA、18:3 - 3)のさらなる不飽和化および延長によって送達されなくてはならない「必須」脂肪酸として、リン脂質またはトリアシルグリセロールなどの形態であってもよい細胞の原形質膜の構成物として、(特に発達中の幼児の脳における)適切な発達、組織形成および修復のために必要なものとして、哺乳類における重要ないくつかの生物学的に活性なエイコサノイド前駆物質(例えばプロスタサイクリン、エイコサノイド、ロイコトリエン、プロスタグランジン)として認識される。さらに長鎖 - 3 PUFAの大量摂取は、心臓血管保護効果をもたらす(ダイヤーバーグ(Dyerberg), J.ら、Amer. J. Clin. Nutr. 28: 958 ~ 966頁(1975年)、ダイヤーバーグ(Dyerberg), J.ら、Lancet 2(8081): 117 ~ 119頁(1978年7月15日)、シモカワ(Shimokawa), H.、World Rev. Nutr. Diet. 88: 100 ~ 108頁(2001年)、フォンシャッキー(von Schacky), C.およびダイヤーバーグ(Dyerberg), J.、World Rev. Nutr. Diet. 88: 90 ~ 99頁(2001年))。ならびに、その他の多数の研究が、 - 3および / または - 6 PUFAの投与によって得られる、多様な症状および疾患(例えば喘息、乾癬、湿疹、糖尿病、癌)に対する多岐にわたる健康上の利点を実証している。 30

【0004】

植物、藻類、真菌、および酵母をはじめとする多様な異なる宿主が、商業的PUFA生産の手段として調査されている。遺伝子操作は、いくつかの宿主の天然能力(本来LAおよびALA脂肪酸生成に限定されるものでさえ)を実質的に改変して、アラキドン酸(ARA; 20:4 - 6)、エイコサペンタエン酸(EPA; 20:5 - 3)、およびドコサヘキサエン酸(DHA; 22:6 - 3)の高レベル生成をもたらすことができることを実証している。 - 3 / - 6 PUFA生成が天然能力または組み換え技術の結果であろうとなかろうと、どちらの戦略も - 6 PUFAのそれらの - 3 対応物への変換を必要とするかもしれない。具体的には 15 デサチュラーゼが LA から ALA への変換の役割を担うのに対し、(いくつかの 17 デサチュラーゼはまた、基質としてジホモ - - リノレン酸(DGLA; 20:3 - 6)を使用してエイコサテトラエン酸(ETA; 20:4 - 3)も生成できるが) 17 デサチュラーゼは ARA から EPA への変換の役割を担う。これらの酵素はどちらも 6 デサチュラーゼ / 6 エロンガゼ経路(主に藻類、コケ、真菌、線形動物、およびヒトに見られ、 - リノール酸(GLA; 18:3 50

- 6) および / またはステアリドン酸 (S T A ; 1 8 : 4 - 3) の生成によって特徴づけられる) 、および 9 エロンガーゼ / 8 デサチュラーゼ経路 (鞭毛虫種などのいくつかの生物中で機能し、エイコサジエン酸 (E D A ; 2 0 : 2 - 6) および / またはエイコサトリエン酸 (E T r A ; 2 0 : 3 - 3) の生成によって特徴づけられる) に関する (図 1) 。

【 0 0 0 5 】

効果的に - 3 脂肪酸合成を可能にする 17 デサチュラーゼが果たす役割に基づいて、様々な起源からこれらの酵素を同定して性質決定するかなりの努力がなされている。しかしほんのわずかな 17 デサチュラーゼだけが、現在知られている。具体的には米国特許出願公開第 2003 / 0190733 号明細書が、サプロレグニア・ディクリナ (S a p r o l e g n i a d i c l i n a) からの 17 デサチュラーゼの単離 (u s o a l t i o n) および特性決定について述べている (ジエンバンク登録番号 A Y 3 7 3 8 2 3 もまた参照されたい) 。国際公開第 2005 / 083053 号パンフレットがフィトフトラ・インフェスタンス (P h y t o p h t h o r a i n f e s t a n s) 「 3 デサチュラーゼ」の配列を提供する (ジエンバンク登録番号 C A J 3 0 8 7 0 もまた参照されたい) 一方、国際公開第 2006 / 100241 号パンフレットはフィトフトラ・ソジャ (P h y t o p h t h o r a s o j a e) 「 3 デサチュラーゼ」の配列を提供し、それらはどちらも 17 デサチュラーゼをコードするようである。また仮特許出願第 60 / 855177 を有する同一所有者の同時係属出願は、(ピシウム・アファニデルマタム (P y t h i u m a p h a n i d e r m a t u m) からの 17 デサチュラーゼのアミノ酸および核酸配列を開示している。したがって - 3 脂肪酸生産で使用するために、多様な宿主生物中の異種性発現に適した、 17 デサチュラーゼをコードするさらに別の遺伝子の同定および単離に対する必要性がある。

10

20

30

30

40

50

【 発明の開示 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 6 】

出願入らは、卵菌綱、フィトフトラ・ラモルム (P h y t o p h t h o r a r a m o r u m) およびフィトフトラ・ソジャ (P h y t o p h t h o r a s o j a e) から 17 デサチュラーゼをコードする遺伝子を単離することにより、既述の問題を解決した。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 0 7 】

本発明は、 17 デサチュラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする新しい遺伝子コンストラクト、および P U F A および特に - 3 脂肪酸を生成するための植物および酵母におけるそれらの使用に関する。

【 0 0 0 8 】

したがって本発明は、

a .) 配列番号 3 および配列番号 7 よりなる群から選択される、 17 デサチュラーゼをコードする単離されたヌクレオチド配列、または

b .) (a) に完全に相補的な単離されたヌクレオチド配列よりなる群から選択される単離された核酸分子を提供する。

【 0 0 0 9 】

別の実施態様では本発明は、ヤロウィア (Y a r r o w i a) 種中での発現のためにコドン最適化された本発明の遺伝子コンストラクトを提供する。さらに本発明は、 - 3 脂肪酸の発現および生成のための本発明の遺伝子コンストラクトで形質転換された宿主細胞を提供する。

【 0 0 1 0 】

別の実施態様では、本発明は、

a) i) 1) クラスター (C l u s t a l) 法のアラインメントに基づいて、配列番号 2 で記載されるアミノ酸配列を有するポリペプチドと比較すると少なくとも 90.9 % の同一性を有する、 17 デサチュラーゼポリペプチドをコードする単離されたヌクレオチ

ド分子、

2) クラスター(Clustal)法のアラインメントに基づいて、配列番号4で記載されるアミノ酸配列を有するポリペプチドと比較すると少なくとも91.4%の同一性を有する、17デサチュラーゼポリペプチドをコードする単離されたヌクレオチド分子、および

3) クラスター(Clustal)法のアラインメントに基づいて、配列番号6で記載されるアミノ酸配列を有するポリペプチドと比較すると少なくとも89.5%の同一性を有する、17デサチュラーゼポリペプチドをコードする単離されたヌクレオチド分子よりなる群から選択される、17デサチュラーゼポリペプチドをコードする単離されたヌクレオチド分子と、

i i) アラキドン酸源
とを含んでなる宿主細胞を提供するステップと、

b) 17デサチュラーゼポリペプチドをコードする核酸分子が発現されてアラキドン酸がエイコサペンタエン酸に転換される条件下で、ステップ(a)の宿主細胞を生育させるステップと、

c) 場合によりステップ(b)のエイコサペンタエン酸を回収するステップと
を含んでなる、エイコサペンタエン酸を製造する方法を提供する。

【0011】

別の実施態様では、本発明は、

a) i) 1) クラスター(Clustal)法のアラインメントに基づいて、配列番号2で記載されるアミノ酸配列を有するポリペプチドと比較すると少なくとも90.9%の同一性を有する、17デサチュラーゼポリペプチドをコードする単離されたヌクレオチド分子、

2) クラスター(Clustal)法のアラインメントに基づいて、配列番号4で記載されるアミノ酸配列を有するポリペプチドと比較すると少なくとも91.4%の同一性を有する、17デサチュラーゼポリペプチドをコードする単離されたヌクレオチド分子、および

3) クラスター(Clustal)法のアラインメントに基づいて、配列番号6で記載されるアミノ酸配列を有するポリペプチドと比較すると少なくとも89.5%の同一性を有する、17デサチュラーゼポリペプチドをコードする単離されたヌクレオチド分子よりなる群から選択される、17デサチュラーゼポリペプチドをコードする単離されたヌクレオチド分子と、

i i) ジホモ- -リノレン酸源
とを含んでなる宿主細胞を提供するステップと、

b) 17デサチュラーゼポリペプチドをコードする核酸分子が発現されてジホモ- -リノレン酸がエイコサテトラエン酸に変換される条件下で、ステップ(a)の宿主細胞を生育させるステップと、

c) 場合によりステップ(b)のエイコサテトラエン酸を回収するステップと
を含んでなる、エイコサテトラエン酸を製造する方法を提供する。

【0012】

別の実施態様では本発明は、

a) i) 1) クラスター(Clustal)法のアラインメントに基づいて、配列番号2で記載されるアミノ酸配列を有するポリペプチドと比較すると少なくとも90.9%の同一性を有する、17デサチュラーゼポリペプチドをコードする単離されたヌクレオチド分子、および

2) クラスター(Clustal)法のアラインメントに基づいて、配列番号4で記載されるアミノ酸配列を有するポリペプチドと比較すると少なくとも91.4%の同一性を有する、17デサチュラーゼポリペプチドをコードする単離されたヌクレオチド分子よりなる群から選択される、二機能性 17デサチュラーゼポリペプチドをコードする単離されたヌクレオチド分子と、

10

20

30

40

50

i i) リノール酸源

とを含んでなる宿主細胞を提供するステップと、

b) 二機能性 17デサチュラーゼポリペプチドをコードする核酸分子が発現されてリノール酸が -リノレン酸に変換される条件下で、ステップ(a)の宿主細胞を生育させるステップと、

c) 場合によりステップ(b)の -リノレン酸を回収するステップと
を含んでなる、 -リノレン酸を製造する方法を提供する。

【0013】

生物学的寄託

以下の生体物質が 10801ユニバーシティ・ブルヴァード、マナッサス、VA 20110-2209 の米国微生物系統保存機関 (ATCC) に寄託され、以下の命名、登録番号、および寄託日を有する。 10

【0014】

【表1】

| <u>生体物質</u> | <u>登録番号</u> | <u>寄託日</u> |
|--------------------|---------------|-------------|
| ヤロウイア・リポリティカ Y2047 | ATCC PTA-7186 | 2005年10月26日 |

【0015】

上に列挙した生体物質は、「特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約」の条項に従って寄託された。列挙した寄託物は、表示された国際受託機関に少なくとも30年間保存され、それを開示する特許の付与時に一般に公開される。寄託株の利用可能性は、政府の行動によって付与された特許権を失墜させて主題発明を実施する認可とはみなされない。 20

【0016】

本発明は、本願明細書の一部を形成する以下の詳細な説明および添付の配列説明からより完全に理解できる。

【0017】

配列一覧

次の配列は、37C.F.R.1.§821~1.825(「ヌクレオチド配列および / またはアミノ酸配列開示を含む特許出願の要件 - 配列規則」)を満たし、世界知的所有権機関 (WIPO) 標準 ST.25 (1998年)、および EPO および PCT の配列表要件 (規則 5.2 および 49.5 (aの2)、および実施細則第 208 号および附属書 C) に一致する。ヌクレオチドおよびアミノ酸配列データのために使用される記号および型式は、37C.F.R. § 1.822 で述べられる規則に従う。 30

【0018】

配列番号 1 ~ 40 は、表 1 で同定される遺伝子、タンパク質またはプラスミドをコードする ORF である。

【0019】

10

20

30

40

【表2】

表1
遺伝子およびタンパク質配列番号の要約

| 説明および略語 | 核酸 配列番号 | タンパク質 配列番号 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|---------------|
| フィトトラ・ソジャ $\Delta 17$ デサチュラーゼ(「PsD17」) | 1 (1092bp) | 2 (363AA) |
| ヤロウィア・リポリティカ中での発現のためにコドン最適化されたフィトトラ・ソジャ由来の合成 $\Delta 17$ デサチュラーゼ(「PsD17S」) | 3 (1086bp) | 4 (361AA) |
| フィトトラ・ラモルム $\Delta 17$ デサチュラーゼ(「PrD17」) | 5 (1086bp) | 6 (361AA) |
| ヤロウィア・リポリティカ中での発現のためにコドン最適化されたフィトトラ・ラモルム由来の合成 $\Delta 17$ デサチュラーゼ(「PrD17S」) | 7 (1086bp) | 6 (361AA) |
| フィトトラ・インフェスタンス $\Delta 17$ デサチュラーゼ(「PiD17」) | 8 (1086)bp | 9 (361AA) |
| プラスミド pPsD17S | 10 (3806bp) | - |
| プラスミド pKunF1-KEA | 11 (6619bp) | - |
| プラスミド pDMW214 | 12 (9513bp) | - |
| プラスミド pFmPsD17S | 13 (8727bp) | - |
| プラスミド pKUNF12T6E | 14 (12,649bp) | - |
| ヤロウィア・リポリティカ中での発現のためにコドン最適化されたスラウストキトリウム・アウレウム(<i>Thraustochytrium aureum</i>)由来の合成 C _{18/20} エロンガーゼ(米国特許第 6,677,145 号明細書)(「EL2S」) | 15 (819bp) | 16 (272AA) |
| プラスミド pDMW271 | 17 (13,034bp) | - |
| ヤロウィア・リポリティカ中での発現のためにコドン最適化されたヒト(<i>Homo sapiens</i>)由来の合成 $\Delta 5$ デサチュラーゼ(ジェンバンク登録番号 NP_037534) | 18 (1335bp) | 19 (444AA) |
| プラスミド pZP3-P7U | 20 (8867bp) | - |
| Cre リコンビナーゼ酵素により認識される大腸菌(<i>Escherichia coli</i>)LoxP 組み換え部位 | 21 (34bp) | - |
| プラスミド pZKLeuN-29E3 | 22 (14,655bp) | - |
| ミドリムシ(<i>Euglena gracilis</i>) $\Delta 9$ エロンガーゼ(米国特許出願第 11/601563 号明細書および米国特許出願第 11/601564 号明細書)(「EgD9e」) | 31 (777bp) | 24 (258AA) |

10

20

30

40

【0020】

50

【表3】

| | | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|---------------|
| ヤロウィア・リポリティカ中での発現のためにコドン最適化されたミドリムシ(<i>Euglena gracilis</i>)由来の合成△9エロンガーゼ(米国特許出願第11/601563号明細書および米国特許出願第11/601564号明細書)('EgD9eS') | 23 (777bp) | 24 (258AA) |
| ヤロウィア・リポリティカ中での発現のためにコドン最適化されたモルティエラ・アルピナ ELO3由来の合成C _{16/18} エロンガーゼ(米国特許出願第11/253882合明細書)('ME3S') | 25 (828bp) | 26 (275AA) |
| プラスミド pY116 | 27 (8739bp) | - |
| プラスミド pKO2UF8289 | 28 (15,304bp) | - |
| ミドリムシ(<i>Euglena gracilis</i>)由来の合成突然変異△8デサチュラーゼ(米国特許出願第11/635258号明細書)('突然変異 EgD8S-23') | 29 (1272bp) | 30 (422AA) |
| プラスミド pZKSL-555R | 32 (13,707bp) | - |
| ミドリムシ(<i>Euglena gracilis</i>)△5デサチュラーゼ(米国仮特許出願第60/801172号明細書)('EgD5') | 37 (1350bp) | 34 (449AA) |
| ヤロウィア・リポリティカ中での発現のためにコドン最適化されたミドリムシ(<i>Euglena gracilis</i>)由来の合成△5デサチュラーゼ(米国仮特許出願第60/801172号明細書)('EgD5S') | 33 (1350bp) | 34 (449AA) |
| ヤロウィア・リポリティカ中での発現のためにコドン最適化されたペリディニウム(<i>Peridinium</i>)CCMP626種由来の合成△5デサチュラーゼ(米国仮特許出願第60/801119号明細書)('RD5S') | 35 (1392bp) | 36 (463AA) |
| プラスミド pPrD17S | 38 (3806bp) | - |
| プラスミド pZUF17 | 39 (8165bp) | - |
| プラスミド pZUFPrD17S | 40 (8174bp) | - |

10

20

30

40

【発明を実施するための最良の形態】

【0021】

本願明細書で引用した全ての特許、特許出願、および公報は、その内容全体を参照によって組み込んだものとする。これは具体的には、以下の出願人らの譲受人の同時係属出願を含む。米国特許第7,125,672号明細書、米国特許第7,189,559号明細書、米国特許第7,192,762号明細書、米国特許出願第10/840579号明細書、および米国特許出願第10/840325号明細書(2004年5月6日出願)、米国特許出願第10/869630号明細書(2004年6月16日出願)、米国特許出願第10/882760号明細書(2004年7月1日出願)、米国特許出願第10/985691号明細書(2004年11月10日出願)、米国特許出願第10/987548号明細書(2004年11月12日出

50

願)、米国特許出願第11/024545号明細書および米国特許出願第11/024544号明細書(2004年12月29日出願)、米国特許出願第11/166993号明細書(2005年6月24日出願)、米国特許出願第11/183664号明細書(2005年7月18日出願)、米国特許出願第11/185301号明細書(2005年7月20日出願)、米国特許出願第11/190750号明細書(2005年7月27日出願)、米国特許出願第11/198975号明細書(2005年8月8日出願)、米国特許出願第11/225354号明細書(2005年9月13日出願)、米国特許出願第11/253882号明細書(2005年10月19日出願)、米国特許出願第11/264784号明細書および米国特許出願第11/264737号明細書(2005年11月1日出願)、米国特許出願第11/265761号明細書(2005年11月2日出願)、米国仮特許出願第60/795810号明細書(2006年4月28日出願)、米国仮特許出願第60/793575号明細書(2006年4月20日出願)、米国仮特許出願第60/796637号明細書(2006年5月2日出願)、米国仮特許出願第60/801172号明細書および米国仮特許出願第60/801119号明細書(2006年5月17日出願)、米国仮特許出願第60/853563号明細書(2006年10月23日出願)、米国仮特許出願第60/855177号明細書(2006年10月30日出願)、米国特許出願第11/601563号明細書および米国特許出願第11/601564号明細書(2006年11月16日出願)、米国特許出願第11/635258号明細書(2006年12月7日出願)および米国特許出願第11/613420号明細書(2006年12月20日出願)。

10

20

30

40

【0022】

主題発明に従って、出願人らは、健康的なPUFAを生成するための生化学的経路操作のために使用してもよい、新しい卵菌門(Oomyota)17デサチュラーゼ、および該酵素をコードする遺伝子を同定する。したがって主題発明には多くの用途がある。本願明細書で開示される方法によって作られるPUFA、またはその誘導体は、食事代用物、または栄養補給剤、特に乳児用調製粉乳として、静脈内栄養補給を受ける患者のために、または栄養失調を予防または治療するために使用できる。代案としては、通常の使用において受容者が所望量の食事補給を受け入れるように調合された、料理用油、脂肪またはマーガリン中に、純化されたPUFA(またはその誘導体)を組み込んでもよい。PUFAはまた、乳児用調製粉乳、栄養補給剤またはその他の食品中に組み込んでもよく、抗炎症薬またはコレステロール低下剤としての用途があるかも知れない。場合により組成物は、製薬用途(ヒトまたは獣医)のために使用してもよい。

【0023】

組み換え手段によって生成されるPUFAをヒトまたは動物に補給することは、添加PUFA、ならびにそれらの代謝子孫のレベル増大をもたらすことができる。例えばEPAによる処置は、EPAのみでなく、エイコサノイドなどのEPAの下流生成物(すなわちプロスタグランジン、ロイコトリエン、トロンボキサン)のレベル増大もまたもたらす。複雑な調節機序は、このような機序を防止、調節または克服して、個体において特定PUFAの所望のレベルを達成するために、様々なPUFAを組み合わせ、または異なるPUFA抱合体を添加することを望ましくする。

【0024】

定義

本開示では、いくつかの用語および略語を使用する。以下の定義が提供される。

「読み取り枠」はORFと略記される。

「ポリメラーゼ連鎖反応」はPCRと略記される。

「米国微生物系保存機関」はATCCと略記される。

「多価不飽和脂肪酸」はPUFAと略記される。

「トリアシルグリセロール」はTAGと略記される。

【0025】

ここでの用法では「発明」または「本発明」と言う用語は、本特許請求の範囲および本

50

願明細書で述べられる本発明の全ての態様および実施態様を指すことが意図され、いかなる特定の実施態様または態様にも限定されない。

【0026】

「脂肪酸」という用語は、(より長い、およびより短い鎖長の酸の双方も知られているが)約C₁₂~C₂₂の様々な鎖長の長鎖脂肪族酸(アルカン酸)を指す。優勢な鎖長はC₁₆~C₂₂の間である。脂肪酸の構造は単純な表記体系「X:Y」で表され、式中、Xは特定の脂肪酸中の炭素(C)原子総数であり、Yは二重結合数である。「飽和脂肪酸」対「不飽和脂肪酸」、「一価不飽和脂肪酸」対「多価不飽和脂肪酸」(または「PUFA」)、および「オメガ-6脂肪酸」(-6またはn-6)対「オメガ-3脂肪酸」(-3またはn-3)の違いについて、さらに詳しくは国際公開第2004/101757号パンフレットで規定される。

10

【0027】

本開示においてPUFAを既述するのに使用される命名法を下の表2に示す。「略記法」と題された欄では、オメガ-参照システムが使用されて炭素数、二重結合数、およびオメガ炭素(この目的では番号1)から数えて、オメガ炭素に最も近い二重結合の位置を示唆する。表の残りは、-3および-6脂肪酸およびそれらの前駆物質の一般名、本明細書全体で使用される略語、および各化合物の化学名を要約する。

【0028】

【表4】

20

表2
多価不飽和脂肪酸および前駆物質の命名法

| 一般名 | 略語 | 化学名 | 略記法 |
|-------------|-----------|------------------------------|---------|
| ミリスチン酸 | - | テトラデカン酸 | 14:0 |
| パルミチン酸 | Palmitate | ヘキサデカン酸 | 16:0 |
| パルミトレイン酸 | - | 9-ヘキサデセン酸 | 16:1 |
| ステアリン酸 | - | オクタデカン酸 | 18:0 |
| オレイン酸 | - | シス-9-オクタデセン酸 | 18:1 |
| リノール酸 | LA | シス-9,12-オクタデカジエン酸 | 18:2ω-6 |
| γ-リノール酸 | GLA | シス-6,9,12-オクタデカトリエン酸 | 18:3ω-6 |
| エイコサジエン酸 | EDA | シス-11,14-エイコサジエン酸 | 20:2ω-6 |
| ジホモ-γ-リノール酸 | DGLA | シス-8,11,14-エイコサトリエン酸 | 20:3ω-6 |
| アラキドン酸 | ARA | シス-5,8,11,14-エイコサテトラエン酸 | 20:4ω-6 |
| α-リノレン酸 | ALA | シス-9,12,15-オクタデカトリエン酸 | 18:3ω-3 |
| ステアリドン酸 | STA | シス-6,9,12,15-オクタデカテトラエン酸 | 18:4ω-3 |
| エイコサトリエン酸 | ETrA | シス-11,14,17-エイコサトリエン酸 | 20:3ω-3 |
| エイコサ-テトラエン酸 | ETA | シス-8,11,14,17-エイコサテトラエン酸 | 20:4ω-3 |
| エイコサ-ペンタエン酸 | EPA | シス-5,8,11,14,17-エイコサペンタエン酸 | 20:5ω-3 |
| ドコサ-ペンタエン酸 | DPA | シス-7,10,13,16,19-ドコサペンタエン酸 | 22:5ω-3 |
| ドコサ-ヘキサエン酸 | DHA | シス-4,7,10,13,16,19-ドコサヘキサエン酸 | 22:6ω-3 |

30

40

【0029】

「トリアシルグリセロール」、「油」、および「TAG」という用語は、グリセロール

50

分子とエステル化する3個の脂肪酸アシル残基から構成される中性脂質を指す（そしてこのような用語は、本開示の全体を通して区別なく使用される）。このような油は、長鎖PUFA、ならびにより短い飽和および不飽和脂肪酸、および鎖長のより長い飽和脂肪酸を含有できる。したがって「油生合成」は、一般に細胞中でのTAG合成を指す。「微生物油」または「単細胞油」とは、微生物がそれらの生涯において天然に産生する油である。

【0030】

「総脂質および油画分中のパーセント（%）PUFA」とは、これらの画分中の全脂肪酸に対するPUFAのパーセントを指す。「全脂質画分」または「脂質画分」という用語は、どちらも油性生物中の全脂質（すなわち中性および極性）の合計を指すので、ホスファチジルコリン（PC）画分、ホスファチジルエタノールアミン（PE）画分、およびトリアルギリセロール（TAGまたは油）画分内に位置する脂質を含む。しかし「脂質」および「油」という用語は、本明細書全体で同義的に使用される。10

【0031】

「代謝経路」または「生合成経路」は、生化学的意味において、細胞内で起きて酵素によって触媒され、細胞によって使用されまたは保存される代謝産物の形成、または別の代謝経路の開始（流束発生ステップと称される）のどちらかを達成する一連の化学反応と見なすことができる。これらの経路の多くは複雑であり、開始物質を所望の正確な化学構造を有する生成物に成形する段階を追った変化を伴う。

【0032】

「PUFA生合成経路」という用語は、オレイン酸をLA、EDA、GLA、DGLA、ARA、ALA、STA、ETrA、ETA、EPA、DPA、およびDHAに転換する代謝過程を指す。この過程は、文献で詳しく述べられる（例えば国際公開第2006/052870号パンフレットを参照されたい）。簡単に述べると、この過程は、小胞体膜中に存在する一連の特別な不飽和化酵素および延長酵素（すなわち「PUFA生合成経路酵素」）による、炭素原子の添加を通じた炭素鎖延長、および二重結合付加を通じた分子不飽和化を伴う。より具体的には、「PUFA生合成経路酵素」は、4デサチュラーゼ、5デサチュラーゼ、6デサチュラーゼ、12デサチュラーゼ、15デサチュラーゼ、17デサチュラーゼ、9デサチュラーゼ、8デサチュラーゼ、9エロンガーゼ、C₁₄/C₁₆エロンガーゼ、C₁₆/C₁₈エロンガーゼ、C₁₈/C₂₀エロンガーゼおよび/またはC₂₀/C₂₂エロンガーゼをはじめとする、PUFA生合成に関与するいずれかの酵素（および前記酵素をコードする遺伝子）を指す。2030

【0033】

「-3/-6脂肪酸生合成経路」という用語は、適切な条件下で発現すると、-3および-6脂肪酸の片方または双方の生成を触媒する酵素をコードする一組の遺伝子を指す。典型的に-3/-6脂肪酸生合成経路に関する遺伝子は、PUFA生合成経路酵素をコードする。代表的な経路を図1に示し、様々な中間体を経由するオレイン酸のDHAへの変換を提供して、-3および-6脂肪酸の双方が共通の原料からどのように生成できるかを実証する。経路は自然に2つの部分に別れ、1つの部分は-3脂肪酸、別の部分は-6脂肪酸のみを発生させる。-3脂肪酸のみを発生させる部分をここで-3脂肪酸生合成経路と称する一方、-6脂肪酸のみを発生させる部分はここで-6脂肪酸生合成経路と称する。40

【0034】

「機能性」という用語は、ここで-3/-6脂肪酸生合成経路に関する文脈で、経路中の遺伝子のいくつか（または全て）が、活性酵素を発現し、生体内触媒作用または基質変換をもたらすことを意味する。いくつかの脂肪酸生成物は、この経路の遺伝子のサブセットの発現のみを必要とするので、「-3/-6脂肪酸生合成経路」または「機能性-3/-6脂肪酸生合成経路」は、上の段落で挙げた全ての遺伝子が必要とされることを暗示しないものとする。

【0035】

「デサチュラーゼ」という用語は、不飽和化できる、すなわち1個もしくはそれ以上の

10

20

30

40

50

脂肪酸に二重結合を導入して、対象とする脂肪酸または前駆物質を生じさせるポリペプチドを指す。特定の脂肪酸を指すために、本願明細書全体を通じた 参照システムの使用にもかかわらず、デルタシステムを使用して基質のカルボキシル末端から数えることで、デサチュラーゼの活性を示す方が都合よい。ここで興味深いのは、1.) E D A から D G L A へのおよび / または E T r A から E T A への変換を触媒する 8 デサチュラーゼ、2.) D G L A から A R A へのおよび / または E T A から E P A への変換を触媒する 5 デサチュラーゼ、3.) L A から G L A へのおよび / または A L A から S T A への変換を触媒する 6 デサチュラーゼ、4.) D P A から D H A への変換を触媒する 4 デサチュラーゼ、5.) オレイン酸から L A への変換を触媒する 12 デサチュラーゼ、6.) L A から A L A へのおよび / または G L A から S T A への変換を触媒する 15 デサチュラーゼ、および 7.) パルミチン酸からパルミトレン酸 (16 : 1) および / またはステアリン酸からオレイン酸 (18 : 1) への変換を触媒する 9 デサチュラーゼである。

10

【0036】

ここで特に興味深いのは、分子のカルボキシル - 末端から数えて 17 番目と 18 番目の炭素原子間で脂肪酸を不飽和化する、17 デサチュラーゼであり、それは例えば A R A から E P A (そして場合により D G L A から E T A) への変換を触媒する。当該技術分野で、17 デサチュラーゼ (そしてまた 15 デサチュラーゼ) は、また時として -6 脂肪酸をそれらの -3 対応物に変換する能力 (例えばそれぞれ L A から A L A へのまたは D G L A から E T A へのおよび A R A から E P A への変換) に基づいて「オメガ -3 デサチュラーゼ」、「w -3 デサチュラーゼ」、および / または「-3 デサチュラーゼ」と称される。

20

【0037】

いくつかのデサチュラーゼは、2つ以上の基質に対する活性を有する。この能力に基づいて、これらの酵素は、それらのデサチュラーゼ活性について「単機能性」または「二機能性」のどちらかとしてさらに分類できる。いくつかの実施態様では、適切な宿主を脂肪酸デサチュラーゼの遺伝子で形質転換して、宿主の脂肪酸プロフィールに対するその効果を判定することで、脂肪酸デサチュラーゼの特異性を経験的に判定することが最も望ましい。

20

【0038】

より具体的には、17 デサチュラーゼは、ここで単機能性または二機能性 17 デサチュラーゼ活性を有する脂肪酸デサチュラーゼと定義され、17 デサチュラーゼ活性は A R A から E P A へのおよび / または D G L A から E T A への変換である。「単機能性 17 デサチュラーゼ」、「単機能性 17 デサチュラーゼ活性」または「排他的 17 デサチュラーゼ活性」という用語は、A R A から E P A におよび / または D G L A から E T A に変換できるが、L A から A L A には変換できない 17 デサチュラーゼを指す。対照的に「二機能性 17 デサチュラーゼ」、「二機能性 17 デサチュラーゼ活性」または「一次 17 デサチュラーゼ活性」は、A R A から E P A および / または D G L A から E T A を優先的に変換するが、さらに L A から A L A に変換する限られた能力を有する 17 デサチュラーゼを指す (したがって主として 17 デサチュラーゼ活性、および限られた 15 デサチュラーゼ活性を示す)。

30

【0039】

17 デサチュラーゼは、17 および 15 不飽和化以外の、この分類には関連性がない特異性を有することができることに留意すべきである。単機能性と二機能性 17 デサチュラーゼの間の区別は実用的なものであって、絶対的でないことにもまた留意すべきである。例えば同一酵素がその発現レベルまたは生育条件次第で、単機能性または二機能性 17 デサチュラーゼ活性のどちらを持って機能してもよい。

40

【0040】

ここでの目的で、「P s D 17」という用語は、配列番号 1 によってコードされる、フィトフトラ・ソジャ (Phytophthora sojae) から単離された 17 デサチュラーゼ (配列番号 2) を指す。対照的に「P s D 17 S」という用語は、ヤロウイ

50

ア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) 中での発現のためにコドン最適化された、フィトフトラ・ソジャ (*Phytophthora sojae*) 由来の合成 17 デサチュラーゼを指す(すなわち配列番号 3 および 4)。ここで述べられる分析に基づいて、P s D 1 7 および P s D 1 7 S はさらに二機能性 17 デサチュラーゼに分類される。

【0041】

同様に「Pr D 1 7」という用語は、配列番号 5 によってコードされる、フィトフトラ・ラモルム (*Phytophthora ramorum*) から単離された 17 デサチュラーゼ(配列番号 6)を指す。対照的に、「Pr D 1 7 S」という用語は、ヤロウイア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) 中での発現のためにコドン最適化された、フィトフトラ・ラモルム (*Phytophthora ramorum*) 由来の合成 17 デサチュラーゼを指す(すなわち配列番号 7 および 6)。ここで述べられる分析に基づいて、Pr D 1 7 および Pr D 1 7 S は、さらに単機能性 17 デサチュラーゼに分類される。

10

【0042】

「変換効率」および「% 基質変換」という用語は、それによって特定の酵素(例えばデサチュラーゼ)が基質を生成物に変換できる効率を指す。変換効率は以下の式に従って評価される。 $([\text{生成物}] / [\text{基質} + \text{生成物}]) \times 100$ 。式中、「生成物」には、直接生成物およびそれに由来する経路中の全生成物が含まれる。

20

【0043】

「エロンガーゼ」という用語は、脂肪酸炭素鎖を延長して、エロンガーゼが作用する脂肪酸基質よりも炭素 2 個分長い酸を生成できるポリペプチドを指す。この延長過程は、国際公開第 2004/101757 号パンフレットで述べられているように、脂肪酸シンターゼと関連している多段階機序で起きる。エロンガーゼ系によって触媒される反応の例は、GLA から DGLA、STA から ETA、および EPA から DPA への変換である。一般にエロンガーゼの基質選択性はいくぶん広いが、鎖長および不飽和の程度とタイプの双方によって区別される。例えば C₁₄/C₁₆ エロンガーゼは C₁₄ 基質(例えばミリスチン酸)を利用し、C₁₆/C₁₈ エロンガーゼは C₁₆ 基質(例えばパルミチン酸)を利用し、C₁₈/C₂₀ エロンガーゼ(同義的に使用できる用語として 6 エロンガーゼとしてもまた知られている)は C₁₈ 基質(例えば GLA、STA)を利用し、C₂₀/C₂₂ エロンガーゼは C₂₀ 基質(例えば EPA)を利用する。同様にして 9 エロンガーゼはまた、それぞれ LA および ALA から EDA および ETrA への変換も触媒できる。いくつかのエロンガーゼは幅広い特異性を有し、したがって単一酵素がいくつかのエロンガーゼ反応を触媒できてもよいことに留意することが重要である(例えば C₁₆/C₁₈ エロンガーゼおよび a C₁₈/C₂₀ エロンガーゼの双方として作用する)。

30

【0044】

「卵菌綱」という用語は、水生菌類およびベト病として一般に知られている一群の従属栄養生物を指す。それらは纖維状原生生物であり、周囲の水や土壌からそれらの食物を吸収しなくてはならず、または食べるために別の生物の身体に侵入するかもしれない。したがって卵菌綱は、腐敗物の分解と再循環に重要な役割を果たす。フィトフトラ (*Phytophthora*) は、59 の異なる種を含んでなる卵菌綱 (*Oomycetes*) の属である。卵菌綱は収束進化を通じて真菌との類似性を有するが、それらは(以前考えられていたように)真菌でない。そうではなく卵菌綱はストラメノパイル (*Stramenopiles*) 界の一部であり、その結果、植物、真菌、および動物とは異なる。珪藻および黄藻類および褐藻類(例えば昆布)もまた、ストラメノパイル (*Stramenopiles*) 界に含まれる。

40

【0045】

「油性」という用語は、それらのエネルギー源を脂質の形態で保存する傾向がある生物を指す(ウイーテ (*Weete*)、「真菌脂質生化学 (*Fungal Lipid Biochemistry*)」、第 2 版、Plenum、1980 年)。「油性酵母菌」と言

50

う用語は、油を生成できる酵母菌として分類される微生物を指す。一般に油性微生物の細胞油またはT A G 含量はS字形曲線に従い、対数増殖後期または定常増殖初期において脂質濃度が最大に達するまで増大し、次に定常増殖後期および死滅期において徐々に減少する（ヨンマニットチャイ（Y o n g m a n i t c h a i）およびワード（W a r d）、A p p l . E n v i r o n . M i c r o b i o l . 5 7 : 4 1 9 ~ 2 5 頁（1 9 9 1 年））。油性微生物が約25%を超えるその乾燥細胞重量を油として蓄積するのは珍しくない。油性酵母菌の例としては、ヤロウイア（Y a r r o w i a）、カンジダ（C a n d i d a）、ロドトルラ（R h o d o t o r u l a）、ロドスボリジウム（R h o d o s p o r i d i u m）、クリプトコッカス（C r y p t o c o c c u s）、トリコスボロン（T r i c h o s p o r o n）、およびリポマイセス（L i p o m y c e s）属が挙げられるが、決してこれに限定されるものではない。

10

【0046】

ここでの用法では「単離された核酸断片」または「単離された核酸分子」は同義的に使用されて、一本鎖または二本鎖で、場合により合成、非天然または改変ヌクレオチド塩基を含有するRNAまたはDNAのポリマーを指す。DNAポリマーの形態の単離された核酸断片は、c DNA、ゲノムDNAまたは合成DNAの1つ以上のセグメントを含んでなってもよい。

20

【0047】

核酸断片は、適切な温度および溶液イオン強度条件下で、核酸断片の一本鎖形態がその他の核酸断片とアニールできる場合、c DNA、ゲノムDNA、またはRNAなどの別の核酸断片と「ハイブリダイズ可能」である。ハイブリダイゼーションおよび洗浄条件については良く知られており、サムブルック（S a m b r o o k）、J.、フリッチュ（F r i t s c h）、E. F. およびマニアティス（M a n i a t i s）、T. 「分子クローニング：実験室マニュアル（M o l e c u l a r C l o n i n g : A L a b o r a t o r y M a n u a l）」、第二版、C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y、C o l d S p r i n g H a r b o r、N Y（1 9 8 9 年）の特に第11章およびその表11. 1で例証される（参照によってその内容全体を本願明細書に援用する）。温度およびイオン強度条件が、ハイブリダイゼーションの「ストリンジエンシー」を定める。ストリンジエントな条件は、（遠縁の生物からの相同意配列などの）中程度に類似の断片をスクリーニングするため、そして（近縁の生物からの機能性酵素を複製する遺伝子などの）高度に類似した断片をスクリーニングするために調節できる。ハイブリダイゼーション後の洗浄が、ストリンジエンシー条件を決定する。1つの好ましい条件のセットは、室温において $6 \times S S C$ 、0.5% SDSで15分間に始まり、次に45において $2 \times S S C$ 、0.5% SDSで30分間を反復し、次に50において $0.2 \times S S C$ 、0.5% SDSを30分間を2回反復する、一連の洗浄を使用する。より好ましいストリンジエントな条件のセットはより高い温度を使用し、そこでは洗浄は、最後の $0.2 \times S S C$ 、0.5% SDS中の2回の30分間の洗浄の温度を60に増大させること以外は上述したのと同一である。別の好ましい高度にストリンジエントな条件のセットは、65において $0.1 \times S S C$ 、0.1% SDS中の2回の最終洗浄を使用する。さらに別のストリンジエントな条件のセットは、例えば $0.1 \times S S C$ 、0.1% SDSで65、そして $2 \times S S C$ 、0.1% SDSで洗浄後、 $0.1 \times S S C$ 、0.1% SDSでのハイブリダイゼーションを含む。

30

【0048】

ハイブリダイゼーションのストリンジエンシ次第で塩基間のミスマッチは可能であるが、ハイブリダイゼーションは、2つの核酸が相補的配列を含有することを必要とする。核酸がハイブリダイゼーションする適切なストリンジエンシーは、技術分野で良く知られた变数である核酸の長さおよび相補性の程度に左右される。2つのヌクレオチド配列間の類似性または相同性の程度が高い程、これらの配列を有する核酸ハイブリッドのTm値は大きくなる。核酸ハイブリダイゼーションの相対安定性（より高いTmに対応する）は、次の順で低下する。RNA : RNA、DNA : RNA、DNA : DNA。長さがヌクレオ

40

50

チド 100 個を超えるハイブリッドでは、Tmを計算する式が導かれている（サムブルック（Sambrook）ら、前出9.50～9.51参照）。より短かい核酸、すなわちオリゴヌクレオチドによるハイブリダイゼーションのためにはミスマッチの配置がより重要になり、オリゴヌクレオチドの長さがその特異性を決定する（サムブルック（Sambrook）ら、前出11.7～11.8参照）。一実施態様では、ハイブリダイズ可能な核酸の長さは少なくともヌクレオチド約10個である。ハイブリダイズ可能な核酸の好ましい最小の長さは少なくともヌクレオチド約15個、より好ましくは少なくともヌクレオチド約20個、そして最も好ましくは長さが少なくともヌクレオチド約30個である。さらに当業者は、プローブの長さなどの要因次第で、温度および洗浄液の塩濃度を必要に応じて調節してもよいことを認識する。

10

【0049】

アミノ酸またはヌクレオチド配列の「かなりの部分」とは、当業者による配列の手動評価によって、あるいはBLAST（「基礎的局在性配列検索ツール（Basic Local Alignment Search Tool）」、アルトシュル（Altschul），S.F.ら、J.Mol.Biol.215：403～410頁（1993年））などのアルゴリズムを使用したコンピュータ自動化アラインメントおよび同定によって、遺伝子またはポリペプチドの推定上の同定を得るのに十分なポリペプチドまたは遺伝子のヌクレオチド配列のアミノ酸配列を含んでなる部分である。一般に推定的にポリペプチドまたは核酸配列が既知のタンパク質または遺伝子に相同意であると同定するためには、10個以上の隣接するアミノ酸または30個以上のヌクレオチド配列が必要である。さらにヌクレオチド配列に関して、配列依存遺伝子同定法（例えばザンハイブリダイゼーション）および単離（例えば細菌コロニーまたはバクテリオファージブラークの原位置ハイブリダイゼーション）において、20～30個の隣接するヌクレオチドを含んでなる遺伝子特異的オリゴヌクレオチドプローブを使用しても良い。さらにプライマーを含んでなる特定の核酸断片を得るために、塩基12～15個の短いオリゴヌクレオチドを増幅プライマーとしてPCRで使用しても良い。したがってヌクレオチド配列の「かなりの部分」は、配列を含んでなる核酸断片を特異的に同定、および／または単離できるようにする十分な配列を含んでなる。本願明細書は、特定の卵菌類（Oomycote）タンパク質をコードする完全なアミノ酸およびヌクレオチド配列を教示する。当業者はここで報告される配列の恩恵を被り、当業者に既知の目的のために、今や開示された配列の全てまたはかなりの部分を使用できる。したがって本発明は、添付の配列表で報告される完全な配列、ならびに上で定義される配列のかなりの部分を含んでなる。

20

【0050】

「相補的」と言う用語は、互いにハイブリダイズできるヌクレオチド塩基間の関係について述べるために使用される。例えばDNAについて、アデノシンはチミンに相補的であり、シトシンはグアニンに相補的である。したがって本発明は添付の配列表で報告される完全な配列、ならびに実質的に類似した核酸配列に相補的な単離された核酸断片も含む。

30

【0051】

「相同性」、および「相同意」という用語は、ここで区別なく使用される。これらは、その中において1個もしくはそれ以上のヌクレオチド塩基の変化が、遺伝子発現を仲介するまたは特定の表現型を生成する核酸断片の能力に影響しない核酸断片を指す。これらの用語はまた、最初の未変性断片と比べて、得られる核酸断片の機能特性を実質的に変化させない、1個もしくはそれ以上のヌクレオチドの欠失または挿入などの本発明の核酸断片の変更も指す。したがって当業者によって理解されるように、本発明は具体的な例示的配列を超えるものを包含する。

40

【0052】

さらに当業者は、本発明によって包含される相同的な核酸配列が、中程度にストリンジエントな条件下（例えば0.5×SSC、0.1%SDS、60°）において、ここで例示される配列と、またはここで開示される核酸配列のいずれかの機能的同等物であるここで開示されるヌクレオチド配列のあらゆる部分とハイブリダイズする、それらの能力によ

50

ってもまた定義されることを認識する。

【0053】

「コドン縮重」とは、コードされるポリペプチドのアミノ酸配列に影響しないヌクレオチド配列の変動を可能にする遺伝子コードの性質を指す。当業者は、特定のアミノ酸を特定化するヌクレオチドコドンの使用における、特定の宿主細胞によって示される「コドンバイアス」についてよく知っている。したがって宿主細胞中の改善された発現のために遺伝子を合成する場合、そのコドン使用頻度が、宿主細胞の好むコドン使用頻度に近くなるように遺伝子をデザインすることが望ましい。

【0054】

D N A 配列に関する「化学的に合成された」とは、構成要素ヌクレオチドが、生体外で構築されたことを意味する。D N A の手動化学合成は確立された手順を使用して達成されてもよく、あるいはいくつかの市販の機器の1つを使用して自動化学合成を実施できる。「合成遺伝子」は、当業者に公知の手順を使用して化学的に合成されるオリゴヌクレオチド構成単位からアセンブルできる。これらの構成単位をライゲーションシアニールして遺伝子セグメントを形成し、次にそれを酵素的にアセンブルして遺伝子全体を構築する。したがって遺伝子をヌクレオチド配列の最適化に基づいて、最適な遺伝子発現のために個別に調整し、宿主細胞のコドンバイアスを反映させることができる。当業者は、コドン利用が宿主によって好まれるコドンに偏っている場合の遺伝子発現成功の可能性を理解する。好ましいコドンの判定は、配列情報が利用できる宿主細胞由来の遺伝子の調査に基づくことができる。

10

20

【0055】

「遺伝子」とは特定のタンパク質を発現する核酸断片を指し、それはコード領域のみを指してもよく、またはコード配列に先行する(5'非コード配列)およびそれに続く(3'非コード配列)制御配列を含んでもよい。「天然遺伝子」とは、自然界にそれ自体の制御配列と共に見られる遺伝子を指す。「キメラ遺伝子」とは、自然界に共に見られない制御およびコード配列を含んでなる天然遺伝子でないあらゆる遺伝子を指す。したがってキメラ遺伝子は、異なる起源由来の制御配列およびコード配列、あるいは同一起源由来であるが、自然界に見られるのとは異なる様式で配列される制御配列およびコード配列を含んでなってもよい。「内在性遺伝子」とは、生物ゲノム中のその天然位置にある天然遺伝子を指す。「外来性」遺伝子とは、遺伝子移入によって宿主生物に導入された遺伝子を指す。外来性遺伝子は、非天然生物中に挿入された天然遺伝子、天然宿主内の新しい位置に導入された天然遺伝子、あるいはキメラ遺伝子を含んでなることができる。「導入遺伝子」とは、形質転換によってゲノム中に導入された遺伝子である。「コドン最適化遺伝子」とは、そのコドン使用頻度が宿主細胞の好むコドン使用頻度を模倣するようにデザインされた遺伝子である。

30

【0056】

「コード配列」とは、特定のアミノ酸配列をコードするD N A 配列を指す。「適した制御配列」とは、コード配列の上流(5'非コード配列)、配列内、または下流(3'非コード配列)に位置して、転写、R N A プロセシングまたは安定性、または関連コード配列の翻訳に影響を及ぼすヌクレオチド配列を指す。制御配列は次を含んでも良い。プロモーター、翻訳リーダー配列、イントロン、ポリアデニル化認識配列、R N A プロセッシング部位、エフェクター結合部位、およびステム-ループ構造。

40

【0057】

「プロモーター」とは、コード配列または機能性R N A の発現を調節できるD N A 配列を指す。一般にコード配列はプロモーター配列に対して3'に位置する。プロモーターはその全体が天然遺伝子に由来しても良く、あるいは自然界に見られる異なるプロモーター由来の異なる要素からなっても良く、あるいは合成D N A セグメントを含んでなってさえ良い。異なるプロモーターが、異なる組織または細胞タイプ中で、あるいは異なる発育段階で、あるいは異なる環境または生理学的条件に呼応して、遺伝子の発現を導いても良いことが当業者には理解される。ほとんどの場合にほとんどの細胞タイプ中で遺伝子の発現

50

を引き起こすプロモーターは、一般に「構造プロモーター」と称される。ほとんどの場合、制御配列の正確な境界は完全に画定されていないので、異なる長さのDNA断片が、同一プロモーター活性を有してもよいこともさらに認識される。

【0058】

「3'非翻訳配列」および「転写ターミネーター」と言う用語は、コード配列下流に位置するDNA配列を指す。これには、mRNAプロセッシングまたは遺伝子発現に影響できる調節シグナルをコードするポリアデニル化認識配列、およびその他の配列が含まれる。ポリアデニル化シグナルは、通常、mRNA前駆物質の3'末端へのポリアデニル酸トライクトの付加に影響することで特徴づけられる。3'領域は、関連したコード配列の転写、RNAプロセッシングまたは安定性、または翻訳に影響できる。

10

【0059】

「RNA転写物」とは、RNAポリメラーゼが触媒するDNA配列転写から得られる生成物を指す。RNA転写物がDNA配列の完全な相補的コピーである場合、それは一次転写物と称され、あるいはそれは一次転写物の転写後プロセッシング由来のRNA配列であってもよく、成熟RNAと称される。「メッセンジャーRNA」または「mRNA」とは、インtronがなく、細胞によってタンパク質に翻訳ができるRNAを指す。「cDNA」とは、mRNAに対して相補的であり、それに由来する二重鎖DNAを指す。「センスRNA」とは、mRNAを含み、細胞によってタンパク質に翻訳ができるRNA転写物を指す。「アンチセンスRNA」とは、標的一次転写物またはmRNAの全部または一部に相補的であり、標的遺伝子の発現をブロックするRNA転写物を指す(米国特許第50,170,065号明細書、国際公開第99/28508号パンフレット)。アンチセンスRNAの相補性は、特定の遺伝子転写物のあらゆる部分、すなわち5'非コード配列、3'非コード配列、またはコード配列にあっても良い。「機能性RNA」とは、翻訳されないがそれでもなお細胞プロセスに影響するアンチセンスRNA、リボザイムRNA、またはその他のRNAを指す。

20

【0060】

「作動的に結合した」と言う用語は、1つの機能が他方の機能による影響を受けるような、単一核酸断片上の核酸配列のつながりを指す。例えばプロモーターがコード配列の発現に影響を及ぼすことができる(すなわちコード配列がプロモーターの転写調節下にある)場合、それはそのコード配列と作動的に結合する。コード配列は、センスまたはアンチセンス方向で制御配列に作動的に結合できる。

30

【0061】

「発現」という用語は、ここでの用法では、本発明の核酸断片由来のセンス(mRNA)またはアンチセンスRNAの転写と安定した蓄積を指す。発現はまた、mRNAのポリペプチドへの翻訳も指す。

【0062】

「成熟」タンパク質とは、翻訳後処理されたポリペプチド、すなわち一次翻訳生成物中に存在するあらゆるプレまたはプロペプチドがそれから除去されたものを指す。「前駆」タンパク質とは、mRNAの翻訳の一次生成物、すなわちプレまたはプロペプチドが依然として存在するものを指す。プレまたはプロペプチドは、細胞内局在化シグナルであってもよい(が、これに限定されるものではない)。

40

【0063】

「形質転換」とは、遺伝的に安定した遺伝形質をもたらす核酸分子の宿主生物中への転移を指す。核酸分子は、例えば自律的に複製するプラスミドであってもよく、またはそれは宿主生物のゲノムに組み込まれてもよい。形質転換された核酸断片を含有する宿主生物は、「遺伝子導入」または「組み換え」または「形質転換」生物と称される。

【0064】

「プラスミド」、「ベクター」、および「カセット」と言う用語は、細胞の中心的代謝の一部ではない遺伝子を運ぶことが多く、通常環状二本鎖DNA断片の形態である染色体外要素を指す。このような要素は、あらゆる供給源に由来する一本鎖または二本鎖DNA

50

またはRNAの配列、ゲノム一体化配列、直鎖または環状のファージまたはヌクレオチド配列を自律的に複製するかもしれない、そこではいくつかのヌクレオチド配列が独自の構成に結合または組み換えされ、それは選択された遺伝子産物のために、適切な3'非翻訳配列と共にプロモーター断片およびDNA配列を細胞中に導入することができる。「発現力セット」とは、外来性遺伝子を含有し、外来性遺伝子に加えて外来性宿主におけるその遺伝子の促進された発現を可能にする要素を有する特定のベクターを指す。

【0065】

当該技術分野で知られている「%同一性」と言う用語は、配列を比較して判定される2つ以上のポリペプチド配列または2つ以上のポリヌクレオチド配列の関係である。当該技術分野で「同一性」は、場合によってはこのような配列ストリング間の整合によって判定される、ポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列間の配列関連性の程度も意味する。「同一性」および「類似性」は、1)「計算分子生物学(Computational Molecular Biology)(レスク(Lesk), A.M.編)Oxford University, NY(1988年)、2)「バイオコンピューティング:情報科学およびゲノム・プロジェクト(Bio computing: Informatics and Genome Projects)」(スミス(Smith), D.W.編)Academic, NY(1993年)、3)「配列データのコンピュータ分析(Computer Analysis of Sequence Data)」、第一部、(グリフィン(Griffin), A.M.、およびグリフィン(Griffin), H.G.編)Humania, NJ(1994年)、4)「分子生物学における配列分析(Sequence Analysis in Molecular Biology)」フォン・ハインエ(von Heijne), G.編、Academic, NY(1987年)、5)「配列分析入門(Sequence Analysis Primer)」(グリブスクフ(Gribskov), M.およびデュヴルー(Devereux), J.編)Stockton, NY(1991年)で述べられているものをはじめとするが、これに限定されるものではない公知の方法によって容易に計算できる。

10

20

30

40

【0066】

同一性を判定する好ましい方法は、試験される配列間に最良の整合を与えるようにデザインされる。同一性および類似性を判定する方法は、一般に入手できるコンピュータプログラムで体系化されている。アライメントおよび同一性百分率の計算は、ウィスコンシン州マディソンのDNASTAR(DNASTAR Inc. (Madison, WI))からのレーザージーン(LASERGENE)バイオインフォマティクス計算スイートのメガライン(MegaAlign)プログラムを使用して実施してもよい。配列の多重アライメントは「クラスタル(Clustal)法のアライメント」を使用して実施され、これは「クラスタル(Clustal)V法のアライメント」をはじめとするアルゴリズムのいくつかの変種を包含して、クラスタル(Clustal)Vとラベルされたアライメント法に相当し(ヒギンズ(Higgins)およびシャープ(Sharp)、CABIOS.5:151~153頁(1989年);ヒギンズ(Higgins), D.G.ら、(1992年)Comput. Appl. Biosci. 8:189~191頁で述べられている)、ウィスコンシン州マディソンのDNASTARインコーポレーテッド(DNASTAR Inc. (Madison, WI))からのレーザージーン(LASERGENE)バイオインフォマティクス計算スイートのメガライン(MegaAlign)プログラムにある。多重アライメントでは、デフォルト値はGAP PENA LTY = 10、GAP LENGTH PENALTY = 10に相当する。クラスタル(Clustal)法を使用した、タンパク質配列のペアワイスアライメントおよび%同一性計算のデフォルトパラメーターは、KTUPLE = 1、GAP PENALTY = 3、WINDOW = 5、およびDIAGONALS SAVED = 5である。核酸ではこれらのパラメーターは、KTUPLE = 2、GAP PENALTY = 5、WINDOW = 4、およびDIAGONALS SAVED = 4である。

【0067】

50

クラスタル (C l u s t a l) V プログラムを使用したアラインメント後、同プログラムの「配列距離」表を見ることで「%同一性」を得ることが可能である。さらに「クラスタル (C l u s t a l) W 法のアラインメント」を利用でき、これはクラスタル (C l u s t a l) W とラベルされたアラインメント法に相当し (ヒギンズ (H i g g i n s) およびシャープ (S h a r p) 、 C A B I O S . 5 : 1 5 1 ~ 1 5 3 頁 (1 9 8 9 年) ; ヒギンズ (H i g g i n s) , D . G . ら、 (1 9 9 2 年) C o m p u t . A p p l . B i o s c i . 8 : 1 8 9 ~ 1 9 1 頁で述べられている) 、ウィスコンシン州マディソンの D N A S T A R インコーポレーテッド (D N A S T A R I n c . (M a d i s o n , W I)) からのレーザージーン (L A S E R G E N E) バイオインフォマティクス計算スイートのメガライン (M e g A l i g n) v 6 . 1 プログラムにある。多重アラインメントのデフォルトパラメーター (G A P P E N A L T Y = 1 0 、 G A P L E N G T H P E N A L T Y = 0 . 2 、 D e l a y D i v e r g e n S e q s (%) = 3 0 、 D N A T r a n s i t i o n W e i g h t = 0 . 5 、 P r o t e i n W e i g h t M a t r i x = G o n n e t S e r i e s 、 D N A W e i g h t M a t r i x = I U B) 。クラスタル (C l u s t a l) V プログラムを使用したアラインメント後、同プログラムの「配列距離」表を見ることで「%同一性」を得ることが可能である。

10

【 0 0 6 8 】

「 B L A S T N 法のアラインメント」は、デフォルトパラメーターを使用してヌクレオチド配列を比較する、国立バイオテクノロジー情報センター (N C B I) が提供するアルゴリズムである。

20

【 0 0 6 9 】

その他の種から同一または同様の機能または活性を有するポリペプチドを同定する上で、多くのレベルの配列同一性が有用であることを当業者はよく理解している。適切な核酸断片 (本発明の単離されたポリヌクレオチド) は、ここで報告されるアミノ酸配列と少なくとも約 7 0 % 同一、好ましくは少なくとも約 7 5 % 同一、より好ましくは少なくとも約 8 0 % 同一のポリペプチドをコードする。好ましい核酸断片は、ここで報告するアミノ酸配列と少なくとも約 8 5 % 同一のアミノ酸配列をコードする。より好ましい核酸断片は、ここで報告するアミノ酸配列と少なくとも約 9 0 % 同一のアミノ酸配列をコードする。最も好ましいのは、ここで報告するアミノ酸配列と少なくとも約 9 5 % 同一のアミノ酸配列をコードする核酸断片である。確かに本発明について述べるのに、 7 1 % 、 7 2 % 、 7 3 % 、 7 4 % 、 7 5 % 、 7 6 % 、 7 7 % 、 7 8 % 、 7 9 % 、 8 0 % 、 8 1 % 、 8 2 % 、 8 3 % 、 8 4 % 、 8 5 % 、 8 6 % 、 8 7 % 、 8 8 % 、 8 9 % 、 9 0 % 、 9 1 % 、 9 2 % 、 9 3 % 、 9 4 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % または 9 9 % などの 7 0 % ~ 1 0 0 % のあらゆる整数のアミノ酸同一性が有用かもしれない。適切な核酸断片は上の相同性を有するだけでなく、典型的に少なくとも 5 0 個のアミノ酸、好ましくは少なくとも 1 0 0 個のアミノ酸、より好ましくは少なくとも 1 5 0 個のアミノ酸、なおもより好ましくは少なくとも 2 0 0 個のアミノ酸、最も好ましくは少なくとも 2 5 0 個のアミノ酸を有するポリペプチドをコードする

30

【 0 0 7 0 】

「配列分析ソフトウェア」と言う用語は、ヌクレオチドまたはアミノ酸配列の分析のために有用なあらゆるコンピュータアルゴリズムまたはソフトウェアプログラムを指す。「配列分析ソフトウェア」は、市販のものでも、あるいは独立して開発されても良い。典型的な配列分析ソフトウェアとしては、 1 .) ウィスコンシン州マディソンのジェネティクス・コンピュータ・グループ (G e n e t i c s C o m p u t e r G r o u p (G C G) (M a d i s o n , W I)) からの G C G プログラム一式 (W i s c o n s i n P a c k a g e V e r s i o n 9 . 0) 、 2 .) B L A S T P 、 B L A S T N 、 B L A S T X (アルトシュル (A l t s c h u l) ら、 J . M o l . B i o l . 2 1 5 : 4 0 3 ~ 4 1 0 (1 9 9 0 年)) 、および 3 .) ウィスコンシン州マディソンの D N A S T A R インコーポレーテッド (D N A S T A R , I n c . (M a d i s o n , W I)) からの D N A S T A R 、 4 .) ミシガン州アンアーバーのジーンコード社 (G e n e C o d e

40

50

s Corporation (Ann Arbor, MI))からのシーケンチャー (Sequencher)、および5.)スミス・ウォーターマン・アルゴリズムを組み入れたFASTAプログラム (W.R. Pearson)、Comput. Methods Genome Res. [Proc. Int. Symp.] (1994年)、1992年会議、111~20頁、編集者：スハイ、サンドル (Suhai, Sandor)、Plenum、New York, NY) が挙げられるが、これに限定されるものではない。本願明細書の文脈では、配列分析ソフトウェアを分析のために使用する場合、分析結果は特に断りのない限り、言及されるプログラムの「デフォルト値」に基づくものと理解される。ここでの用法では、「デフォルト値」とは、最初に初期化されるときにソフトウェアに元からロードされる、あらゆる値またはパラメータの組を意味する。

10

【0071】

ここで使用される標準リコンビナントDNAおよび分子クローニング技術については技術分野で良く知られており、サムブルック (Sambrook) J.、フリッチュ (Fritsch) E. F.、およびマニアティス (Maniatis) T.、「分子クローニング：実験室マニュアル (Molecular Cloning: A Laboratory Manual)」第二版、Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989年) (下文においてマニアティス (Maniatis))；シルハビー (Silhavy) T. J.、ベンナン (Bennan) M. L. およびエンクイスト (Enquist) L. W.、「遺伝子融合実験 (Experiments with Gene Fusions)」Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY (1984年)；およびオースベル (Ausubel)、F. M. ら、「現代分子生物学プロトコル (Current Protocols in Molecular Biology)」Greene Publishing Assoc. and Wiley - Interscience, Hoboken, NJによる出版 (1987年) で述べられている。

20

【0072】

概説：脂肪酸およびトリアシルグリセロールの微生物生合成

一般に、油性微生物中の脂質蓄積は、増殖培地中に存在する全体的な炭素対窒素比に応えて誘発される。油性微生物中に遊離パルミチン酸 (16:0) の新規 (de novo) 合成をもたらすこのプロセスについては、国際公開第2004/101757号パンフレットで詳細に述べられる。パルミチン酸は、エロンガーゼおよびデサチュラーゼの作用を通じて形成される、より長鎖の飽和および不飽和脂肪酸誘導体の前駆物質である (図1)。

30

【0073】

TAG (脂肪酸の主要な貯蔵単位) は、以下が関与する一連の反応によって形成される。1.) アシルトランスフェラーゼによる1分子のアシル-CoAのグリセロール-3-リン酸塩へのエステル化がリゾホスファチジン酸を生じ、2.) アシルトランスフェラーゼによる第2のアシル-CoA分子のエステル化が1,2-ジアシルグリセロールリン酸塩 (一般にホスファチジン酸として同定される) を生じ、3.) ホスファチジン酸ホスファターゼによるリン酸塩の除去が1,2-ジアシルグリセロール (DAG) を生じ、4.) アシルトランスフェラーゼの作用による第3の脂肪酸の付加がTAGを形成する。飽和および不飽和脂肪酸および短鎖および長鎖脂肪酸をはじめとする、幅広い脂肪酸をTAGに組み込むことができる。

40

【0074】

オメガ脂肪酸の生合成

オレイン酸が -3/-6 脂肪酸に変換される代謝プロセスは、炭素原子付加を通じた炭素鎖の延長、および二重結合添加を通じた分子の不飽和化を伴う。これは、小胞体膜内に存在する一連の特別な不飽和化酵素および延長酵素を必要とする。しかし図1に示され下で述べられるように、特定 -3/-6 脂肪酸生成のための複数の代案の経路があ

50

ことが多い。

【0075】

具体的には全ての経路は、12デサチュラーゼによる、オレイン酸から第1の-6脂肪酸であるLAへの最初の変換を必要とする。次に「6デサチュラーゼ/6エロンガーゼ経路」を使用して、-6脂肪酸が次のようにして形成される。(1)6デサチュラーゼによってLAがGLAに転換され、(2)C₁₈/₂₀エロンガーゼによってGLAがDGLAに転換され、(3)5デサチュラーゼによってDGLAがARAに転換される。代案としては次のようにして、-3脂肪酸形成のために「6デサチュラーゼ/6エロンガーゼ経路」を利用することができる。(1)15デサチュラーゼによってLAが第1の-3脂肪酸であるALAに転換され、(2)6デサチュラーゼによってALAがSTAに転換され、(3)C₁₈/₂₀エロンガーゼによってSTAがETAに転換され、(4)5デサチュラーゼによってETAがEPAに転換され、(5)C₂₀/₂₂エロンガーゼによってEPAがDPAに転換され、(6)4デサチュラーゼによってDPAがDHAに転換される。場合により、-6脂肪酸が-3脂肪酸に転換されてもよい。例えば17デサチュラーゼ活性によって、ETAおよびEPAがそれぞれDGLAおよびARAから生成される。

10

【0076】

-3/-6脂肪酸合成のための代案の経路は、9エロンガーゼおよび8デサチュラーゼを利用する。より具体的には、LAおよびALAは、9エロンガーゼによってそれぞれEDAおよびETrAに変換されもよく、次に8デサチュラーゼがEDAをDGLAに、および/またはETrAをETAに変換する。

20

【0077】

-3/-6脂肪酸の生成のために特定の宿主生物中に発現することが必要とされる特定の機能性は、宿主細胞(およびその天然PUFAプロフィールおよび/またはデサチュラーゼ/エロンガーゼプロフィール)、基質の可用性、および所望の最終産物に左右されることが考察される。当業者は、-3/-6脂肪酸合成のために所望される各酵素をコードする、様々な候補遺伝子を同定できるであろう。有用なデサチュラーゼおよびエロンガーゼ配列はあらゆる供給源に由来してもよく、例えば天然供給源(細菌、藻類、真菌、卵菌綱(Oomycetes)、植物、動物など)から単離され、半合成経路によって生成され、または新規(de novo)合成される。宿主中に導入されるデサチュラーゼおよびエロンガーゼ遺伝子の特定の供給源は重大でないが、デサチュラーゼまたはエロンガーゼ活性を有する特異的ポリペプチド選択のための考慮事項としては以下が挙げられる。1.)ポリペプチドの基質特異性、2.)ポリペプチドまたはその構成要素が律速酵素であるかどうか、3.)デサチュラーゼまたはエロンガーゼが所望のPUFA合成に必須であるかどうか、および/または4.)ポリペプチドが必要とする補助因子。発現したポリペプチドは、好ましくは宿主細胞中のその位置の生化学的環境に適合したパラメーターを有する(より詳しくは国際公開第2004/101757号パンフレットを参照されたい)。

30

【0078】

追加的実施態様では、特定の各デサチュラーゼおよび/またはエロンガーゼの変換効率を考慮することもまた有用であろう。より具体的には、各酵素が基質を生成物に変換するのに100%の効率で機能することは稀なので、宿主細胞中に生成される未精製油の最終脂質プロフィールは、典型的に所望の-3/-6脂肪酸、ならびに様々な上流中間PUFAからなる様々なPUFAの混合物である。したがって所望の脂肪酸合成を最適化するに際し、各酵素の変換効率の考慮もまた有益である。

40

【0079】

上のそれぞれの考慮を念頭に、公的に入手可能な文献(例えばジェンバンク)、特許文献、およびPUFA生成能力を有する生物の実験的分析に従って、適切なデサチュラーゼおよびエロンガーゼ活性(例えば6デサチュラーゼ、C₁₈/₂₀エロンガーゼ、5デサチュラーゼ、17デサチュラーゼ、15デサチュラーゼ、9デサチュラーゼ、

50

12 デサチュラーゼ、C_{14/16} エロンガーゼ、C_{16/18} エロンガーゼ、9 エロンガーゼ、8 デサチュラーゼ、4 デサチュラーゼ、および C_{20/22} エロンガーゼ) を有する候補遺伝子を同定できる。これらの遺伝子は、特定宿主生物に導入して、生物の PUF A 合成を可能にしたまは増強するのに適する。

【0080】

17 デサチュラーゼの同定

フィトフトラ・ソジヤ (*Phytophthora sojae*) および P. ラモルム (*ramorum*) の双方から単離されて本願明細書で述べられる、本発明の 17 デサチュラーゼの配列は、最初カリフォルニア州ウォールナットクリークの米国エネルギー省共同ゲノム研究所 (U.S. Department of Energy's Joint Genome Institute (JGI) (Walnut Creek, CA)) によって報告された。しかし配列は知られていたが、17 デサチュラーゼとしてのそれらの機能は、本願明細書で研究成果が述べられる以前には解明されていなかったことに留意すべきである。出願人らが初めて、これらのポリペプチドの特異的 17 デサチュラーゼ活性を認識した。

10

【0081】

これらの配列の正確な活性の探究において、JGI データベースに対して BLAST 検索する上で、P. インフェスタンス (*infestans*) デサチュラーゼ ('PiD17'; 配列番号 9) をクエリーとして使用した。これは 2 種の PiD17 相同体、具体的にはここで 'PsD17' と称される P. ソジヤ (*sojae*) 相同体 (配列番号 1 および 2)、およびここで 'PrD17' と称される P. ラモルム (*ramorum*) 相同体 (配列番号 5 および 6) の同定をもたらす。

20

【0082】

コドン最適化を通じて、代案の宿主において使用するために、野生型 PsD17 および PrD17 デサチュラーゼを改変して各酵素の発現を最適化することが望ましかった。宿主が好むコドンの使用は、ポリペプチドをコードする外来遺伝子の発現を実質的に増強できる。一般に、タンパク質中のコドン使用頻度を調べ (好ましくは最大量で発現するもの)、どのコドンが最大頻度で使用されるのかを判定することで、対象とする特定の宿主種内で宿主が好むコドンを判定できる。引き続いて宿主種内で好まれるコドンを使用して、例えばデサチュラーゼ活性を有する、対象とするポリペプチドのためのコード配列の全体または一部を合成できる。

30

【0083】

下の表 3 に示すように、野生型 PsD17 および PrD17 デサチュラーゼをヤロウイア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) 中での発現のためにコドン最適化した。

【0084】

【表5】

表3

Y.リポリティカ中での ω -3生合成のためにコドン最適化された Δ 17デサチュラーゼ

| 野生型(WT) Δ 17 | WT Δ 17の 配列 番号 | コドン 最適化 遺伝子中 で改変 された 全塩基 | コドン 最適化 遺伝子中 で改変 された 全コドン | WTから コドン最適化 遺伝子への GC含量 変化 | コドン 最適化 Δ 17 | コドン 最適化 Δ 17の 配列 番号 |
|------------------------|--------------------------------|-----------------------------------------|------------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------|----------------------------------------|
| PsD17 (P.ソジャ) | 1、2 | 1092bp の内 175 (16.0%) | 364 コドンの 内 168 (46.2%) | 65.1% から 54.5%へ | PsD17 S | 3、4 |
| PrD17 (P.ラモルム) | 5、6 | 1086bp の内 168 (15.5%) | 362 コドンの 内 160 (44.2%) | 64.4% から 54.5%へ | PrD17 S | 7、6 |

10

【0085】

20

当業者はここで教示を使用して、野生型 PsD17 および PrD17 配列に基づいて、代案の宿主（すなわちヤロウィア・リポリティカ（Yarrowia lipolytic a）以外の）中の最適発現に適した、様々なその他のコドン最適化 17 デサチュラーゼを作り出すことができる。したがって本発明は、野生型 PsD17 および PrD17（すなわちそれぞれ配列番号 2 および 6 によってコードされる）由来のあらゆるコドン最適化 17 デサチュラーゼに関する。これとしては、ヤロウィア・リポリティカ（Yarrowia lipolytic a）中の発現のためにコドン最適化された、合成 17 デサチュラーゼタンパク質（すなわちそれぞれ配列番号 4 および 6 で記載される PsD17 S および PrD17 S）をコードする、配列番号 3 および 7 で記載されるヌクレオチド配列が挙げられるが、これに限定されるものではない。

30

【0086】

より具体的には、PsD17 S ヌクレオチド塩基および推定アミノ酸配列と公共データベースとの比較からは、最も類似した既知の配列（すなわち国際公開第 2005 / 083053 号パンフレットのフィトフトラ・インフェスタンス（Phytophthora infestans）「3 デサチュラーゼ」；ジェンバンク登録番号 CAJ30870 もまた参照されたい）が、ここで報告される、クラスタル W アラインメントアルゴリズム（DNA STAR からのメガライン（MegAlign）（商標）、前出）を使用した 361 個のアミノ酸長にわたる PsD17 S（配列番号 4）のアミノ酸配列と、約 91.4 % 同じであることが明らかにされる。対照的に P. インフェスタンス（infestans）「3 デサチュラーゼ」と PsD17（配列番号 2）のアミノ酸配列の間には、90.9 % の同一性があった。

40

【0087】

PrD17 S ヌクレオチド塩基および推定アミノ酸配列と公共データベースとの比較からは、最も類似した既知の配列（すなわち P. インフェスタンス（infestans）「3 デサチュラーゼ」、前出）が、ここで報告される、クラスタル W アラインメントアルゴリズム（前出）を使用した 361 個のアミノ酸長にわたる PrD17 S（配列番号 6）のアミノ酸配列と、約 89.5 % 同じであることが明らかにされる。

40

【0088】

本発明の文脈で、好ましいアミノ酸断片は、ここで PsD17 S および PrD17 S 配列と少なくとも約 70 % ~ 80 % 同一であり、少なくとも約 85 % ~ 90 % 同一の配列が

50

特に適切であり、少なくとも約95%同一の配列が最も好ましい。本O R Fに対応する好ましいP s D 1 7 SおよびP r D 1 7 Sをコードする核酸配列は、活性タンパク質をコードするものであり、それぞれここで報告されるP s D 1 7 SおよびP r D 1 7 S核酸配列と少なくとも約70%~80%同一であり、少なくとも85%~90%同一の配列が特に適切であり、少なくとも約95%同一の配列が最も好ましい。

【0089】

上述の卵菌類(*Oomycte*)ポリペプチドの同定に際し、適切な宿主(すなわちヤロウイア・リポリティカ(*Yarrowia lipolytica*))中への形質転換、および宿主脂肪酸プロフィールに対するその効果の判定によって、各コドン最適化された脂肪酸デサチュラーゼの特異性を判定した(実施例5、8、および12)。予測されたようにP s D 1 7 SおよびP r D 1 7 Sは、酵素がARAからEPAへの変換を触媒できるように、どちらも17デサチュラーゼ活性を有した。具体的には、P s D 1 7 SのARAからEPAへの変換効率が40%および98%であった(2つの異なる*Y.リポリティカ*(*lipolytica*)株における異なる生育条件下での判定に基づく)のに対し、P r D 1 7 SのARAからEPAへの変換効率は49%であった。変換効率は以下の式に従って評価された。 $([\text{生成物}] / [\text{基質} + \text{生成物}]) \times 100$ 。式中、「生成物」には、直接生成物およびそれに由来する経路中の全生成物が含まれる。

10

【0090】

しかし意外にも、P s D 1 7 Sが限られた15デサチュラーゼ活性をさらに有した(すなわちLAからALAへの変換効率は15%であった)のに対し、P r D 1 7 Sは有さなかつた(すなわちLAからALAへの変換効率は1%未満であった)。したがってフィトフトラ・ソジャ(*Phytophthora sojae*)デサチュラーゼがここで二機能性17デサチュラーゼと定義されるのに対し、フィトフトラ・ラモルム(*Phytophthora ramorum*)デサチュラーゼはここで単機能性17デサチュラーゼと定義される。

20

【0091】

相同体の同定および単離

配列分析ソフトウェアを使用して、本デサチュラーゼ配列(すなわちP s D 1 7、P r D 1 7、P s D 1 7 S、P r D 1 7 S)またはその部分のいずれかを使用して、同一または別の細菌、藻類、真菌、卵菌綱または植物種中で、17デサチュラーゼ相同体を検索してよい。一般には、このようなコンピューターソフトウェアは、様々な置換、欠失、およびその他の改変に相同性の程度を割り当てて同様の配列をマッチする。

30

【0092】

代案としては17デサチュラーゼ相同体の同定のために、本デサチュラーゼ配列またはその部分のいずれかをハイブリダイゼーション試薬として用いてもよい。核酸ハイブリダイゼーション試験の基本的構成要素には、プローブ、対象とする遺伝子または遺伝子断片を含有することが疑われるサンプル、および特定のハイブリダイゼーション法が含まれる。本発明のプローブは、典型的に、検出される核酸配列に相補的な一本鎖核酸配列である。プローブは、検出される核酸配列と「ハイブリダイズ可能」である。プローブの長さは、5個の塩基から数万個の塩基の間で変動してもよいが、典型的に約15個の塩基から約30個の塩基のプローブ長が適切である。プローブ分子の一部のみが、検出される核酸配列に相補的であればよい。さらにプローブと標的配列との間の相補性は完璧でなくてもよい。ハイブリダイゼーションは不完全に相補的な分子間でも生じ、その結果、ハイブリダイズした領域の特定塩基の一部は、適切な相補的塩基と対合形成しない。

40

【0093】

ハイブリダイゼーション法については、良く定義されている。典型的には、プローブおよびサンプルは、核酸ハイブリダイゼーションを可能にする条件下で混合されなくてはならない。これは適切な濃度および温度条件下において、無機または有機塩存在下で、プローブとサンプルを接触させることを伴う。プローブとサンプル核酸の間であらゆる可能なハイブリダイゼーションが起きるように、プローブおよびサンプル核酸は、十分長い時間

50

接触しなくてはならない。混合物中のプローブまたは標的濃度が、ハイブリダイゼーションが生じるのに必要な時間を決定する。プローブまたは標的濃度が高いほど、必要なハイブリダイゼーションインキュベーション時間は短くなる。場合により、カオトロピック剤を添加してもよい（塩化グアニジニウム、グアニジニウムチオシアネート、ナトリウムチオシアネート、テトラクロロ酢酸リチウム、過塩素酸ナトリウム、テトラクロロ酢酸ルビジウム、ヨウ化カリウム、およびトリフルオロ酢酸セシウム）。所望するならば、ハイブリダイゼーション混合物にホルムアミドを典型的に30～50%（v/v）添加できる。

【0094】

様々なハイブリダイゼーション溶液を用いることができる。それらは典型的に約20～60容量%、好ましくは30容量%の極性有機溶剤からなる。一般的なハイブリダイゼーション溶液は、約30～50%v/vのホルムアミドと、約0.15～1Mの塩化ナトリウムと、（例えばクエン酸ナトリウム、トリス-HCl、PIPESまたはHEPES（pH範囲約6～9）などの）約0.05～0.1Mの緩衝液と、（例えばドデシル硫酸ナトリウムなどの）約0.05～0.2%の洗剤、または0.5～20mMのEDTA、ファーマシア（Pharmacia Inc.）からのFICOLL（約300～500kDa）、ポリビニルピロリドン（約250～500kDa）、および血清アルブミンを用いる。また典型的なハイブリダイゼーション溶液には、約0.1～5mg/mLの非標識の担体核酸、（例えば仔ウシ胸腺またはサケ精子DNA、または酵母菌RNAなどの）核酸DNA断片、および場合により約0.5～2%重量/体積のグリシンも含まれる。様々な（例えばポリエチレン glycolなどの）極性水溶性または水性膨張剤、（例えばポリアクリレートまたはポリメチルアクリレートなどの）陰イオンポリマー、（例えば硫酸デキストランなどの）陰イオン糖類ポリマーをはじめとする体積排除剤などの他の添加剤を含めてよい。

10

20

30

40

50

【0095】

核酸ハイブリダイゼーションは多様なアッセイ型式に適合できる。最も適切なもの1つは、サンドイッチアッセイ型式である。サンドイッチアッセイは、特に非変性条件下でのハイブリダイゼーションに適合できる。サンドイッチタイプのアッセイの主要構成要素は、固体担体である。固体担体は、未標識で配列の一部と相補的である固定化核酸プローブをそれに吸着し、またはそれと共に結合する。

【0096】

さらに別の実施態様では、ここで述べられる17デサチュラーゼ核酸断片（または同定されたそのあらゆる相同体）のいずれかを使用して、同一または別の細菌、藻類、真菌、卵菌綱または植物種から、相同的なタンパク質をコードする遺伝子を単離してもよい。配列依存プロトコルを使用した相同的遺伝子の単離は、当該技術分野で周知である。配列依存プロトコルの例としては以下が挙げられるが、これに限定されるものではない。1.)核酸ハイブリダイゼーション法、2.)核酸增幅技術の様々な使用で例示されるようなDNAおよびRNA增幅法[例えばマリス（Mullis）らに付与された米国特許第4,683,202号明細書のポリメラーゼ連鎖反応（PCR）；タボール（Tabor）, S.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 82, 1074頁（1985年）のリガーゼ連鎖反応（LCR）；または（ウォーカー（Walker）ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 89, 392頁（1992年）の連鎖置換増幅（SDA）]、および3.)相補性によるライプラリー構築およびスクリーニング法。

【0097】

例えば本願明細書で述べられる17デサチュラーゼに類似したタンパク質またはポリペプチドをコードする遺伝子は、当業者によく知られている方法を使用して、本核酸断片の全てまたは一部をDNAハイブリダイゼーションプローブとして使用して、あらゆる所望の酵母菌または卵菌類からライプラリーをスクリーニングして直接単離できる（EPA[またはその誘導体]を产生する酵母または真菌が好ましい）。本核酸配列に基づく特異的オリゴヌクレオチドプローブは、技術分野で既知の方法によってデザインおよび合成で

きる(マニアティス(Maniatis)、前出)。さらに当業者に既知の方法(例えばランダムプライマーDNA標識、ニック翻訳または末端標識技術)によって、配列全体を直接使用してDNAプローブを合成でき、または利用できる生体外転写システムを使用してRNAプローブを合成できる。さらに特異的プライマーをデザインして使用し、本配列の一部(または全長)を増幅できる。得られた増幅生成物を増幅反応中に直接標識し、または増幅反応後に標識して、適切なストリングエンシー条件下でプローブとして使用し、完全長DNA断片を単離できる。

【0098】

典型的PCR-タイプ増幅技術では、プライマーは異なる配列を有し、互いに相補的でない。所望の試験条件次第で、プライマーの配列は、標的核酸の効率的かつ忠実な複製を提供するようにデザインされるべきである。PCRプライマーデザインの方法は当該技術分野で一般的であり、よく知られている。(K.E.デービス(Davis)編、「ヒトにおける遺伝病:実際的アプローチ(Human Genetic Diseases: A Practical Approach)」よりテイン(Thein)およびウォリス(Wallace)、「遺伝的障害診断における特異的ハイブリダイゼーションプローブとしてのオリゴヌクレオチドの使用(The use of oligonucleotide as specific hybridization probes in the Diagnosis of Genetic Disorders)」(1986年)33~50頁、IRL:Herndon, VA; およびホワイト(White), B.A.編、「分子生物学における方法(Methods in Molecular Biology)」よりライクリック(Rychlik), W.、「PCRプロトコル:最近の方法と応用(PCR Protocols: Current Methods and Applications)」(1993年)第15巻、31~39頁、ヒューマナ(Humana):ニュージャージー州トトワ(Totowa, NJ))。

10

20

30

40

【0099】

一般に本配列の2本の短い断片をPCRプロトコルで使用して、DNAまたはRNAからの相同遺伝子をコードするより長い核酸断片を増幅してもよい。またクローンされた核酸断片ライブラリーに対して、1つのプライマーの配列が本核酸断片に由来し、別のプライマーの配列が真核生物の遺伝子をコードするmRNA前駆物質の3'末端のポリアデニル酸トラクトの存在を利用する、PCRを実施してもよい。

30

【0100】

代案としては第2のプライマー配列は、クローニングベクターに由来する配列に基づいてよい。例えば当業者は、RACEプロトコル(フローマン(Frohman)ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.、85:8998頁(1988年))に従って、PCRを使用して転写物の一点と3'または5'末端との間の領域のコピーを増幅し、cDNAを作り出すことができる。3'および5'方向を向いたプライマーは、本配列からデザインできる。メリーランド州ゲーサーズバーグのギブコ/BRL(Gibco/BRL(Gaithersburg, MD))から市販される3'RACEまたは5'RACEシステムを使用して、特定の3'または5'cDNA断片を単離できる(オハラ(Obara)ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.、86:5673頁(1989年);ロー(Loh)ら、Science 243:217頁(1989年))。

40

【0101】

別の実施態様では、新しい改善された脂肪酸デサチュラーゼを作り出すために、ここで述べられるいずれの17デサチュラーゼ核酸断片(または同定されるそのいずれの相同体)を使用してもよい。当該技術分野でよく知られているように、生体外変異誘発および選択、化学的突然変異誘発、「遺伝子シャフリング」法またはその他の手段を使用して、天然のデサチュラーゼ遺伝子の突然変異を得ることができる。代案としては改善された脂肪酸がドメイン交換によって合成されてもよく、そこではここで述べられる17デサチュラーゼ核酸断片のいずれかからの機能性ドメインが代案のデサチュラーゼ遺伝子中の機

50

能性ドメインと交換され、それによって新しいタンパク質がもたらされる。

【0102】

様々な - 3 および / または - 6 脂肪酸の生成方法

ここで述べられる 17 デサチュラーゼをコードするキメラ遺伝子（すなわち P s D 17、P r D 17、P s D 17 S、P r D 17 S またはその他の突然変異酵素、コドン最適化酵素またはその相同意）の導入は、適切なプロモーター制御下において、形質転換された宿主生物体中でそれぞれ E P A の生成増大をもたらすことが期待される。したがって本発明は、基質が所望の脂肪酸生成物（すなわち E P A ）に転換されるように、脂肪酸基質（すなわち A R A ）をここで述べられるデサチュラーゼ（例えば P s D 17、P r D 17、P s D 17 S、P r D 17 S ）に曝すステップを含んでなる、P U F A の直接的生成方法を包含する。

【0103】

より具体的には、本発明の目的は、

a .) i .) クラスター (C l u s t a l) 法のアラインメントに基づいて、配列番号 2 で記載されるアミノ酸配列を有するポリペプチドと比較すると少なくとも 90 . 9 % の同一性を有する、17 デサチュラーゼポリペプチドをコードする単離されたヌクレオチド分子、

i i .) クラスター (C l u s t a l) 法のアラインメントに基づいて、配列番号 4 で記載されるアミノ酸配列を有するポリペプチドと比較すると少なくとも 91 . 4 % の同一性を有する、17 デサチュラーゼポリペプチドをコードする単離されたヌクレオチド分子、

i i i .) クラスター (C l u s t a l) 法のアラインメントに基づいて、配列番号 6 で記載されるアミノ酸配列を有するポリペプチドと比較すると少なくとも 89 . 5 % の同一性を有する、17 デサチュラーゼポリペプチドをコードする単離されたヌクレオチド分子

よりなる群から選択される 17 デサチュラーゼポリペプチドをコードする単離されたヌクレオチド分子、および

b) A R A 源

を含んでなる宿主細胞（例えば油性酵母）中で E P A を製造する方法を提供することであり、

宿主細胞を、17 デサチュラーゼ遺伝子が発現して A R A が E P A に変換されるような条件下で生育させ、E P A は場合により回収する。

【0104】

当業者は、17 デサチュラーゼの広い基質範囲が、ジホモ - - リノレン酸からエイコサテトラエン酸への変換のための酵素の使用を可能にすることを認識するであろう。したがって本発明は、

a .) i .) クラスター (C l u s t a l) 法のアラインメントに基づいて、配列番号 2 で記載されるアミノ酸配列を有するポリペプチドと比較すると少なくとも 90 . 9 % の同一性を有する、17 デサチュラーゼポリペプチドをコードする単離されたヌクレオチド分子、

i i .) クラスター (C l u s t a l) 法のアラインメントに基づいて、配列番号 4 で記載されるアミノ酸配列を有するポリペプチドと比較すると少なくとも 91 . 4 % の同一性を有する、17 デサチュラーゼポリペプチドをコードする単離されたヌクレオチド分子、および

i i i .) クラスター (C l u s t a l) 法のアラインメントに基づいて、配列番号 6 で記載されるアミノ酸配列を有するポリペプチドと比較すると少なくとも 89 . 5 % の同一性を有する、17 デサチュラーゼポリペプチドをコードする単離されたヌクレオチド分子

よりなる群から選択される、17 デサチュラーゼポリペプチドをコードする単離されたヌクレオチド分子と、

10

20

30

40

50

b.) ジホモ - - リノレン酸源

とを宿主細胞に提供するステップと、

c.) 17デサチュラーゼポリペプチドをコードする核酸分子が発現されてジホモ - - リノレン酸がエイコサテトラエン酸に変換される条件下で、ステップ(a)のヌクレオチド分子を含んでなる宿主細胞を生育させるステップと、

d.) 場合によりステップ(c)のエイコサテトラエン酸を回収するステップとを含んでなる、エイコサテトラエン酸を製造する方法を提供する。

【0105】

フィトフトラ・ソジャ(Phytophthora sojae) 17デサチュラーゼの二機能性に基づいた代案の実施態様では、本発明の目的は、

a.) i.) クラスター(Clustal)法のアラインメントに基づいて、配列番号2で記載されるアミノ酸配列を有するポリペプチドと比較すると少なくとも90.9%の同一性を有する、17デサチュラーゼポリペプチドをコードする単離されたヌクレオチド分子、および

i.) クラスター(Clustal)法のアラインメントに基づいて、配列番号4で記載されるアミノ酸配列を有するポリペプチドと比較すると少なくとも91.4%の同一性を有する、17デサチュラーゼポリペプチドをコードする単離されたヌクレオチド分子

よりなる群から選択される二機能性 17デサチュラーゼポリペプチドをコードする単離されたヌクレオチド分子と、

b) LA 源

とを含んでなる宿主細胞(例えば油性酵母)中で、ALAを製造する方法を提供することであり、

宿主細胞を、二機能性 17デサチュラーゼ遺伝子が発現してLAがALAに変換されるような条件下で生育させ、ALAは場合により回収する。

【0106】

代案としては、ここで述べられる各 17デサチュラーゼ遺伝子およびその対応する酵素生成物を、-3脂肪酸を生成するために間接的に使用できる(国際公開第2004/101757号パンフレット参照)。-3/-6PUFAの間接的生成は、中間ステップまたは経路中間体の手段を通じて、脂肪酸基質が所望の脂肪酸生成物に間接的に転換する場合に起きる。したがってここで述べられる 17デサチュラーゼ(例えば PsD17、PrD17、PsD17S、PrD17Sまたはその他の突然変異酵素、コドン最適化酵素またはそれらの相同体)をPUFA生合成経路の酵素(例えば 6デサチュラーゼ、C₁₈/2₀エロンガーゼ、5デサチュラーゼ、15デサチュラーゼ、9デサチュラーゼ、12デサチュラーゼ、C₁₄/1₆エロンガーゼ、C₁₆/1₈エロンガーゼ、9エロンガーゼ、8デサチュラーゼ、4デサチュラーゼ、C₂₀/2₂エロンガーゼ)をコードする追加的遺伝子と併せて発現して、より高いレベルのより鎖長の長い

-3脂肪酸(例えばEPA、DPA、およびDHA)の生成をもたらしてもよいことが考察された。特定発現カセット内に含まれる特定遺伝子は、宿主細胞(およびそのPUFAプロフィールおよび/またはデサチュラーゼ/エロンガーゼプロフィール)、基質可用性、および所望最終産物に左右される。

【0107】

代案の実施態様では、ここで述べられる完全な配列、これらの完全な配列の相補体、これらの配列のかなりの部分、それに由来するコドン最適化デサチュラーゼ、およびそれらと実質的に相同的な配列に基づいて、宿主生物の天然 17デサチュラーゼを中断することが有用かもしれない。例えば宿主生物における標的を定めた 17デサチュラーゼ(そして場合により 15デサチュラーゼ)の中断は、-3脂肪酸を合成する能力低下を有する突然変異株を生じる。この突然変異株は、「純粋な」-6脂肪酸(-3脂肪酸の同時合成なし)を生成するために有用であるかもしれない。

【0108】

10

20

30

40

50

発現システム、カセット、およびベクター

本願明細書で述べられる本配列の遺伝子および遺伝子生成物は、異種の宿主細胞の細胞中で発現されてもよい。組み換え宿主中の発現は、様々な P U F A 経路中間体を生成するために、または宿主を使用して従来可能でなかった新しい生成物を合成するのに宿主に既存の P U F A 経路を調節するために有用かもしれない。

【 0 1 0 9 】

外来タンパク質の高レベル発現を導く制御配列を含有する、発現システムおよび発現ベクターは、当業者によく知られている。これらのいずれも本配列の遺伝子生成物のいずれかを生成するためのキメラ遺伝子を構築するのに使用できる。次に形質転換を通じてこれらのキメラ遺伝子を適切な宿主細胞に導入して、コードされた酵素の高レベル発現を提供できる。

【 0 1 1 0 】

適切な宿主細胞の形質転換に有用なベクターまたはDNAカセットは、当該技術分野でよく知られている。コンストラクト中に存在する配列の特定の選択は、所望の発現生成物（上述）、宿主細胞の性質、および提案される形質転換細胞と非形質転換細胞とを分離する手段に左右される。しかし典型的にベクターまたはカセットは、関連遺伝子の転写および翻訳を導く配列、選択性標識、および自律性複製または染色体組み込みを可能にする配列を含有する。適切なベクターは、転写開始を制御する遺伝子の5'領域（例えばプロモーター）、および転写終結を制御するDNA断片の3'領域（すなわちターミネーター）を含んでなる。双方の制御領域が形質転換された宿主細胞の遺伝子由来であることが最も好ましいが、このような制御領域は、必ずしも生成宿主として選択された特定種に天然の遺伝子に由来しなくてよいものと理解される。

【 0 1 1 1 】

所望の宿主細胞中で、本O R Fの発現を推進するのに有用な開始制御領域またはプロモーターは多数あり、当業者にはなじみが深い。選択された宿主細胞中でこれらの遺伝子の発現を導くことができる、実質的にあらゆるプロモーターが本発明に適する。宿主細胞中の発現は、一時的または安定様式で達成できる。一時的発現は、対象とする遺伝子に作動的に結合された、調節可能プロモーターの活性を誘導することで達成できる。安定発現は、対象とする遺伝子に作動的に結合された構成的（c o n s t i t u i t i v e）プロモーターの使用によって達成できる。一例として宿主細胞が酵母菌の場合、酵母菌細胞中で機能する転写および翻訳領域は、特に宿主種から提供される（例えばヤロウイア・リポリティカ（Y a r r o w i a l i p o l y t i c a）中で使用するための好ましい転写開始調節領域については、国際公開第2006/052870号パンフレットに相当する米国特許出願第11/265761号明細書を参照されたい）。構成的または誘導的転写が所望されるかどうか、対象とするO R Fを発現するまでのプロモーター効率、構築の容易さなど次第で、いくつかの調節配列のいずれか1つを使用できる。

【 0 1 1 2 】

終結領域は、それから開始領域が得られた遺伝子の3'領域に、または異なる遺伝子に由来することができる。多数の終結領域が知られており、（それらが由来するのと同一および異なる属および種の双方で使用した際に）多様な宿主において満足に機能する。終結領域は、通常特定の特性のためと言うよりも便宜的に選択される。終結制御領域もまた、好ましい宿主に天然の様々な遺伝子に由来してもよい。場合により終結部位は不要かもしれないが、含まれることが最も好ましい。

【 0 1 1 3 】

当業者は認識しているように、遺伝子をクローニングベクターに単に挿入するだけでは、それが必要なレベルで成功裏に発現することは確証されない。高発現率の必要性に答えて、転写、翻訳、タンパク質安定性、酸素限界、および宿主細胞からの分泌の側面を制御するいくつかの異なる遺伝的要素を操作することで、多くの特殊化した発現ベクターが作り出されている。より具体的には、遺伝子発現を制御するように操作される分子の特徴のいくつかとして以下が挙げられる。1. 関連転写プロモーターおよびターミネーター配

10

20

30

40

50

列の性質、2.) クローンされる遺伝子のコピー数、および遺伝子がプラスミド上にあるかまたは宿主細胞のゲノム内に組み込まれるかどうか、3.) 合成された外来タンパク質の最終的細胞内位置、4.) 宿主生物体中の翻訳効率およびタンパク質の正しい折りたたみ、5.) 宿主細胞内のmRNAおよびクローン遺伝子タンパク質の本質的な安定性、および6.) 頻度が宿主細胞の好むコドン使用頻度に近づくようなクローン遺伝子内のコドン使用。これらの各タイプの改変は、ここで述べられる 17デサチュラーゼの発現をさらに最適化する手段として、本発明中に包含される。

【0114】

宿主細胞の形質転換

適切な宿主細胞中での発現に適したポリペプチドをコードするDNAがひとたび得られたら、それを宿主細胞中で自律複製できるプラスミドベクターに入れ、またはそれを宿主細胞のゲノムに直接組み込む。発現力セットの組み込みは、宿主ゲノム中で無作為に起きることができ、または宿主遺伝子座での遺伝子組み換えを標的とするのに十分な宿主ゲノムとの相同性領域を含有するコンストラクトの使用を通じて、標的を定めることができる。コンストラクトが内在性遺伝子座に標的を定めれば、全てまたはいくつかの転写および翻訳調節領域を内在性遺伝子座によって提供できる。

10

【0115】

別々の複製ベクターから2つ以上の遺伝子が発現する場合、各ベクターは異なる選択手段を有することが望ましく、他のコンストラクトに対する相同性を欠いて、安定した発現を維持し、コンストラクト中の要素の再集合を防止すべきである。調節領域、選択手段、および導入コンストラクト増殖方法の思慮深い選択は、全ての導入された遺伝子が必要なレベルで発現して、所望の生成物の合成を提供するように実験的に判定できる。

20

【0116】

対象とする遺伝子を含んでなるコンストラクトは、あらゆる標準的技術によって宿主細胞に導入してもよい。これらの技術としては、形質転換（例えば酢酸リチウム形質転換 [Methods in Enzymology, 194: 186 ~ 187頁(1991年)]）、プロトプラスト融合、微粒子銃衝撃、電気穿孔、マイクロインジェクション、または宿主細胞中に対象とする遺伝子を導入するその他のあらゆる方法が挙げられる。

【0117】

便宜上、DNA配列（例えば発現力セット）を取り込むように、あらゆる方法によって操作されている宿主細胞を「形質転換された」または「組み換え」とここで称する。形質転換された宿主は、遺伝子がゲノム中に組み込まれるか、増幅されるか、または複数のコピー数を有する染色体外要素上に存在するかどうか次第で、発現コンストラクトの少なくとも1つのコピーを有し、2つ以上を有してもよい。形質転換宿主細胞は、国際公開第2004/101757号パンフレットおよび国際公開第2005/003310号パンフレットで述べられるようにして、様々な選択技術によって同定できる。

30

【0118】

形質転換に続いて、本 17デサチュラーゼ（そして場合により、宿主細胞内で同時発現する他のPUFA酵素）に適した基質が、宿主によって自然にまたは遺伝子導入的に生成されてもよく、またはそれらは外来性に提供されてもよい。

40

【0119】

-3および/または -6脂肪酸生合成の代謝エンジニアリング

本 17デサチュラーゼの配列の知識は、様々な宿主細胞中での -3および/または -6脂肪酸生合成を操作するために有用であろう。これは直接にPUFA生合成経路内での代謝エンジニアリング、または炭素をPUFA生合成経路に与える経路の追加的操作を必要とするかもしれない。望ましい生化学的経路をアップレギュレートし、望ましくない生化学的経路をダウンレギュレートするのに有用な方法は、当業者にはよく知られている。例えばエネルギーまたは炭素について -3および/または -6脂肪酸生合成経路と競合する生化学的経路、または特定のPUFA最終産物の生成を妨げる天然PUFA生合成経路酵素を遺伝子中断によって排除し、またはその他の手段（例えばアンチセンスm

50

R N A) によってダウンレギュレートしてもよい。

【 0 1 2 0 】

A R A 、 E P A または D H A を増大させる手段としての P U F A 生合成経路内の操作の詳細な考察（およびその関連技術）は、国際公開第 2 0 0 6 / 0 5 5 3 2 2 号パンフレット[米国特許出願公開第 2 0 0 6 - 0 0 9 4 0 9 2 - A 1 号明細書]、国際公開第 2 0 0 6 / 0 5 2 8 7 0 号パンフレット[米国特許出願公開第 2 0 0 6 - 0 1 1 5 8 8 1 - A 1 号明細書]、および国際公開第 2 0 0 6 / 0 5 2 8 7 1 号パンフレット[米国特許出願公開第 2 0 0 6 - 0 1 1 0 8 0 6 - A 1 号明細書]でそれぞれ示され、T A G 生合成経路および T A G 分解経路中の望ましい操作（およびその関連技術）についても同様である。

【 0 1 2 1 】

17 デサチュラーゼの組み換え発現のための好ましい宿主

本遺伝子および核酸断片の発現のための宿主細胞としては、広範な温度および pH で、単純または複合糖質、脂肪酸、有機酸、油、およびアルコール、および／または炭化水素をはじめとする多様な原材料上で生育する宿主が挙げられる。出願人らの譲受人のニーズに基づいて、本発明で述べられる遺伝子は、油性酵母菌（および特にヤロウイア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*））中の発現のために単離された。しかし転写、翻訳、およびタンパク質生合成器官は高度に保存されているので、あらゆる細菌、酵母菌、藻類、卵菌類および／または糸状菌が、本核酸断片の発現のための適切な宿主になることが考察される。

【 0 1 2 2 】

好ましい宿主は、油性酵母菌などの油性生物体である。これらの油性生物体は自然に油の合成および蓄積ができ、油は細胞乾燥重量の約 2 5 % を超え、より好ましくは細胞乾燥重量の約 3 0 % を超え、最も好ましくは細胞乾燥重量の約 4 0 % を超える量を構成できる。油性酵母菌として典型的に同定されている属としては、ヤロウイア（*Yarrowia*）、カンジダ（*Candida*）、ロドトルラ（*Rhodotorula*）、ロドスボリジウム（*Rhodosporidium*）、クリプトコッカス（*Cryptococcus*）、トリコスボロン（*Trichosporon*）、およびリポマイセス（*Lipomyces*）が挙げられるが、これに限定されるものではない。より具体的には、例証的な油合成酵母菌としては、ロドスボリジウム・トルイデス（*Rhodosporidium toruloides*）、リポマイセス・スターKEY（*Lipomyces starkeyii*）、L . リポフェラス（*L . lipoferrus*）、カンジダ・レブカウフィ（*Candida revkaufi*）、C . プルケリマ（*C . pulcherrima*）、C . トロピカリス（*C . tropicalis*）、C . ユチリス（*C . utilis*）、トリコスボロン・プランス（*Trichosporon pullans*）、T . クタネウム（*T . cutaneum*）、ロドトルラ・グルティナス（*Rhodotorula glutinosa*）、R . グラミニス（*R . graminis*）、およびヤロウイア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*）（以前はカンジダ・リポリティカ（*Candida lipolytica*）として分類されていた）が挙げられる。

【 0 1 2 3 】

最も好ましいのは油性酵母菌ヤロウイア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*）であり、さらなる実施態様で最も好ましいのは、A T C C # 7 6 9 8 2 、A T C C # 2 0 3 6 2 、A T C C # 8 8 6 2 、A T C C # 1 8 9 4 4 、および／または L G A M S (7) 1 と称される Y . リポリティカ（*lipolytica*）株である（パパニコラオウ（*Papanikolaou*）S . 、およびアゲリス（*Aggelis*）G . 、B i o r e s o u r . T e c h n o l . 8 2 (1) : 4 3 ~ 9 頁 (2 0 0 2 年) ）。

【 0 1 2 4 】

Y . リポリティカ（*lipolytica*）における E P A および D H A のエンジニアリングのために適用できる特定の教示は、それぞれ米国特許出願第 1 1 / 2 6 5 7 6 1 号明細書および米国特許出願第 1 1 / 2 6 4 7 3 7 号明細書で提供される。油性酵母（すな

10

20

30

40

50

わちヤロウイア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) 中での 17 デサチュラーゼを含んでなる発現ベクターの合成および形質転換のための詳細な手段は、国際公開第 2004 / 101757 号パンフレットおよび国際公開第 2006 / 052870 号パンフレットで提供される。この酵母中で遺伝子を発現する好ましい方法は、宿主のゲノム中への線状 DNA の組み込みによる。ゲノム中の複数位置への組み込みは、遺伝子の高レベル発現が所望される場合に特に有用であることができる [例えば Ura3 遺伝子座 (ジエンバンク登録番号 AJ306421) 、 L e u 2 遺伝子遺伝子座 (ジエンバンク登録番号 AF260230) 、 L y s 5 遺伝子遺伝子座 (ジエンバンク登録番号 M34929) 、 A co 2 遺伝子遺伝子座 (ジエンバンク登録番号 AJ001300) 、 P o x 3 遺伝子遺伝子座 (P o x 3 : ジエンバンク登録番号 X P _ 503244 ; または A c o 3 : ジエンバンク登録番号 AJ001301) 、 12 デサチュラーゼ遺伝子遺伝子座 (国際公開第 2004 / 104167 号パンフレット) 、 L i p 1 遺伝子遺伝子座 (ジエンバンク登録番号 Z50020) および / または L i p 2 遺伝子遺伝子座 (ジエンバンク登録番号 AJ012632) 中への] 。

10

【 0125 】

ヤロウイア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) において使用される好ましい選択方法は、カナマイシン、ハイグロマイシン、およびアミノグリコシド G418 に対する抵抗性、ならびにウラシル、ロイシン、リジン、トリプトファンまたはヒスチジンを欠く培地に生育する能力である。代案の実施態様では、5 - フルオロオロト酸 (5 - フルオロウラシル - 6 - カルボン酸一水和物、「 5 - F O A 」) が、酵母 Ura⁻ 突然変異体の選択のために使用される。化合物はオロチジン 5' - 一リン酸デカルボキシラーゼ (O M P デカルボキシラーゼ) をコードする機能性 U R A 3 遺伝子を有する酵母細胞に対して有毒である。したがってこの毒性に基づいて、5 - F O A は Ura⁻ 突然変異酵母株の選択および同定のために特に有用である (バーテル (B a r t e l) , P . L . およびフィールズ (F i e l d s) , S . 、「 酵母 2 - ハイブリッド・システム (Y e a s t 2 - H y b r i d S y s t e m) 」、 O x f o r d U n i v e r s i t y : N e w Y o r k 、 第 7 卷、 109 ~ 147 頁、 1997 年) 。

20

【 0126 】

その他の好ましい微生物宿主としては、油性の細菌、藻類、卵菌綱、およびその他の真菌が挙げられ、この幅広い微生物宿主群中で特に興味深いのは - 3 / - 6 脂肪酸を合成する微生物である。したがって例えば誘導性プロモーターまたは調節プロモーター制御下にある本 17 デサチュラーゼ遺伝子のいずれかによる、(商業的に A R A の生成のために使用される) モルティエラ・アルピナ (*Mortierella alpina*) の形質転換は、さらに多量の E P A を合成できる形質転換生物を生じるかもしれない。 M . アルピナ (a l p i n a) の形質転換法については、マッケンジー (M a c k e n z i e) ら、 A p p l . E n v i r o n . M i c r o b i o l . 、 66 : 4655 頁 (2000 年) で述べられている。同様にヤブレツボカビ目 (*Thraustochytriales*) 微生物の形質転換法について米国特許第 7,001,772 号明細書で開示されている。

30

【 0127 】

代案の好ましい実施態様では、本発明は、ここで述べられる 17 デサチュラーゼで形質転換するための多様な植物宿主を提供する。このように形質転換される植物は单子葉植物または双子葉植物であることができ、好ましくはそれらは油性として同定されたクラスの植物 (例えば油料種子植物) に属する。好ましい油料種子植物宿主の例としてはダイズ (グリシン (G l y c i n e) およびソヤ (S o j a) 種) 、コーン (ジー・メイズ (Z e a m a y s)) 、亜麻 (リナム (L i n u m) 種) 、アブラナ (ブラシカ (B r a s s i c a) 種) 、月見草、カノーラ、トウモロコシ、ベニバナ (カルタムス (C a r t h a m u s) 種) 、およびヒマワリ (ヘリアンタス (H e l i a n t h u s) 種) が挙げられるが、これに限定されるものではない。油料種子植物における脂肪酸デサチュラーゼの過剰発現手段 (例えば発現カセット構築、形質転換、選択など) については、国際公開第

40

50

2005/047479号パンフレットで述べられている。

【0128】

ここで述べられる 17デサチュラーゼの発現のために、どの特定の宿主が選択されようとも、所望の発現レベルおよびパターンを示す株を得るために、複数の形質転換体をスクリーンしなくてはならない。このようなスクリーニングは、DNAプロットのサザン分析（サザン（Southern）、J. Mol. Biol.、98:503頁（1975年））、mRNA発現のノーザン分析（クロチェック（Kroczeck）、J. Chromatogr. Biomed. Appl.、618（1～2）:133～145頁（1993年））、タンパク質発現のウエスタンおよび／またはエライサ分析、PUFA生成物の表現型分析またはGC分析を伴ってもよい。

10

【0129】

脂肪酸生成のための発酵過程

形質転換された宿主細胞は、キメラデサチュラーゼ遺伝子の発現を最適化する条件下で生育させて、最大かつ最も経済的な所望のPUFA収率を生じさせる。一般に、最適化されてもよい培地条件としては、炭素源のタイプおよび量、窒素源のタイプおよび量、炭素-対-窒素比、異なる無機イオンの量、酸素レベル、生育温度、pH、バイオマス生成相の長さ、油蓄積相の長さ、および細胞収穫時間および方法が挙げられる。ヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）は、一般に複合培地（例えば酵母菌抽出物-ペプトン-デキストロース液体培地（YPD））で、または生育に必要な構成要素が欠如することで所望の発現力セットの選択を強要する合成最少培地（例えばミシガン州デトロイトのディフコ・ラボラトリーズ（DIFCO Laboratories（Detroit, MI））からの酵母菌窒素ベース）上で生育させる。

20

【0130】

本発明における発酵培地は適切な炭素源を含有しなくてはならない。適切な炭素源については、国際公開第2004/101757号パンフレットで教示されている。本発明で利用される炭素源は多種多様な炭素含有源を包含してもよいことが考察されるが、好ましい炭素源は糖、グリセロール、および／または脂肪酸である。最も好ましいのはグルコースおよび／または10～22個の炭素を含有する脂肪酸である。

【0131】

窒素は、無機（例えば $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ）または有機（例えば尿素またはグルタミン酸）源から供給されてもよい。適切な炭素および窒素源に加えて、発酵培地はまた、適切なミネラル、塩、補助因子、緩衝液、ビタミン、および油性宿主の生育と、PUFA生成に必須の酵素的経路の促進とに適した、当業者に既知であるその他の構成要素を含有しなくてはならない。脂質およびPUFAの合成を促進するいくつかの金属イオン（例えば Fe^{+2} 、 Cu^{+2} 、 Mn^{+2} 、 Co^{+2} 、 Zn^{+2} 、 Mg^{+2} ）が注目されている（D. J. カイル（Kylie）およびR. コリン（Colin）編、「単細胞油の工業的応用（Ind. Appl. Single Cell Oil）」より、ナカハラ（Nakahara）T.ら、61～97頁（1992年））。

30

【0132】

本発明における好ましい増殖培地は、ミシガン州デトロイトのディフコ・ラボラトリーズ（DIFCO Laboratories（Detroit, MI））からの酵母菌窒素ベースなどの一般的な市販の調製培地である。その他の合成または人工増殖培地もまた使用されてもよく、形質転換宿主細胞の生育に適する培地は、微生物学または発酵科学の当業者に知られている。発酵に適したpH範囲は、典型的に約pH4.0～pH8.0の間であり、pH5.5～pH7.5が初期生育条件の範囲として好ましい。発酵は好気性または好気性条件下で実施されてもよく、微好気条件が好ましい。

40

【0133】

典型的に油性酵母菌細胞中のPUFAの高レベルの蓄積は、代謝状態が生育と脂肪合成／貯蔵との間で「平衡状態」でなくてはならないので、二段階過程を必要とする。したがって最も好ましくは、ヤロウイア・リポリティカ（Yarrowia lipolyti

50

c a) における P U F A 生成には、二段階発酵過程が必要である。このアプローチについては国際公開第 2 0 0 4 / 1 0 1 7 5 7 号パンフレットで述べられ、様々な適切な発酵過程デザイン（すなわちバッチ、供給バッチ、および連続）および成育中の考察事項についても同様に述べられる。

【実施例】

【0134】

以下の実施例で、本発明をさらに定義する。これらの実施例は、発明の好ましい実施様式を示しながら、あくまで例示のために提供されるものとする。上の考察およびこれらの実施例から、当業者は本発明の必須特性を把握でき、その趣旨と範囲を逸脱することなく、本発明の様々な変更および改変を行って、それを様々な使用法および条件に適合できる。
10

【0135】

一般方法

実施例で使用する標準組み換え D N A および分子クローニング技術は、当該技術分野でよく知られており、1.) サムブルック (Sambrook), J.、フリッチュ (Fritsch), E. F. およびマニアティス (Maniatis), T.、「分子クローニング：実験室マニュアル (Molecular Cloning: A Laboratory Manual)」、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリ (Cold Spring Harbor Laboratory) : ニューヨーク州コールド・スプリング・ハーバー (Cold Spring Harbor, NY) (1989年) (マニアティス (Maniatis)) ; 2.) T. J. シルハビー (Silhavy)、M. L. ベンナン (Bennan)、および L. W. エンクイスト (Enquist)、「遺伝子融合実験 (Experiments with Gene Fusions)」、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリ (Cold Spring Harbor Laboratory) : ニューヨーク州コールド・スプリング・ハーバー (Cold Spring Harbor, NY) (1984年) ; および 3.) オースベル (Ausubel), F. M. ら、「分子生物学現代プロトコル (Current Protocols in Molecular Biology)」、グリーン・パブリッシング・アソシエーツ・アンド・ウィリー・インターライエンス (Greene Publishing Association and Wiley-Interscience) による出版、ニュージャージー州ホーボーケン (Hoboken, NJ) (1987年) で述べられる。
20
30

【0136】

微生物培養の維持および生育に適した材料および方法は、技術分野でよく知られている。以下の実施例で使用するのに適した技術については、次で述べられている。フィリップス・ゲアハルト (Philipp Gerhardt)、R. G. E. マレー (Murray)、ラルフ N. コスティロウ (Ralph N. Costilow)、ユージーン W. ネスター (Eugene W. Nester)、ウィリス A. ウッド (Willis A. Wood)、ノエル R. クリーグ (Noel R. Krieg)、および G. ブリッグス・フィリップス (G. Briggs Phillips) 編、「一般微生物学方法マニュアル (Manual of Methods for General Bacteriology)」、米国微生物学会、Washington, D. C. (1994年)、またはトーマス (Thomas), D. ブロック (Brock)、「バイオテクノロジー：工業的微生物学テキストブック (Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology)」、第2版、Sinauer Associates: Sunderland, MA (1989年)。微生物細胞の生育および維持のために使用される全ての試薬制限酵素および材料は、特に断りのない限り、ウィスコンシン州ミルウォーキーのアルドリッヂ・ケミカルズ (Aldrich Chemicals (Milwaukee, WI))、ミシガン州デトロイトのディフコ・ラボラトリーズ (DIFCO Laboratories (Detroit, MI))
40
50

、メリーランド州ゲーサーズバーグのギブコ / B R L (G I B C O / B R L (Gaithersburg , MD)) 、またはミズーリ州セントルイスのシグマケミカル (Sigma Chemical Company (St . Louis , MO)) から得た。大腸菌 (E . coli) (XL1 - Blue) コンピテント細胞は、カリフォルニア州サンディエゴのストラタジーン社 (Stratagene Company (San Diego , CA)) から購入した。大腸菌 (E . coli) 株は、典型的にルリア・ベルターニ (Luria Bertani) (LB) プレート上で 37 度生育させた。

【 0137 】

一般分子クローニングは、標準法に従って実施した (サムブルック (Sambrook) ら、前出) 。 D N A 配列は、ベクターとインサート特異的プライマーとの組み合わせを使用して、染料ターミネーター技術 (米国特許第 5 , 366 , 860 号明細書、欧州特許第 272 , 007 号明細書) を使用して、 A B I 自動シーケンサー上で生成した。遺伝的配列の比較は、 D N A S T A R インコーポレーテッド (D N A S T A R Inc .) からの D N A S T A R ソフトウェアを使用して達成された。

10

【 0138 】

特に断りのない限り、 B L A S T (「基礎的局在性配列検索ツール (Basic Local Alignment Search Tool) 」アルトシュール (Altshull) , S . F . ら、 J . Mol . Biol . 215 : 403 ~ 410 頁 (1993 年) および Nucleic Acid Res . 25 : 3389 ~ 3402 頁 (1997 年)) を検索を実施して、 B L A S T 「 n r 」データベース (全ての非冗長タンパク質データバンク由来配列、スイス P R O T タンパク質配列データベース、 E M B L および D D B J データベースを含んでなる) に含まれる配列に対する類似性を有する単離配列を同定した。配列を全ての読み枠で翻訳し、国立バイオテクノロジー情報センター (N C B I) によって提供される B L A S T X アルゴリズム (ギッシュ (G i s h) , W . およびステーツ (States) , D . J . 、 N ature Genetics 3 : 266 ~ 272 頁 (1993 年)) を使用して、「 n r 」データベースに含まれる全ての公的に入手できるタンパク質配列との類似性について比較した。クエリー配列がそれに対して最も高い類似性を有する配列を要約する B L A S T 比較の結果を % 同一性、 % 類似性、および期待値に従って報告する。「 % 同一性 」は、 2 つのタンパク質間で同一のアミノ酸の百分率として定義される。「 % 類似性 」は、 2 つのタンパク質間で同一のまたは保存されたアミノ酸の百分率として定義される。「期待値 」は、この大きさのデータベース検索で期待される、絶対的に偶然の特定スコアでのマッチ数を明記して、マッチの統計学的有意さを推定する。

20

【 0139 】

略語の意味は以下の通り。「 s e c 」は秒を意味し、「 m i n 」は分を意味し、「 h 」は時間を意味し、「 d 」は日を意味し、「 μ L 」はマイクロリットルを意味し、「 m L 」はミリリットルを意味し、「 L 」はリットルを意味し、「 μ M 」はマイクロモル濃度を意味し、「 m M 」はミリモル濃度を意味し、「 M 」はモル濃度を意味し、「 m m o l 」はミリモルを意味し、「 μ m o l e 」はマイクロモルを意味し、「 g 」はグラムを意味し、「 μ g 」はマイクログラムを意味し、「 n g 」はナノグラムを意味し、「 U 」は単位を意味し、「 b p 」は塩基対を意味し、「 k B 」はキロベースを意味する。

30

【 0140 】

ヤロウィア・リポリティカ (Yarrowia lipolytica) の形質転換および培養

40

ヤロウィア・リポリティカ (Yarrowia lipolytica) 株 A T C C 登録番号 # 20362 は、メリーランド州ロックビルの米国微生物系統保存機関から購入した。 Y . リポリティカ (Y . lipolytica) 株は、通常 Y P D 寒天 (1 % 酵母菌抽出物、 2 % バクトペプトン、 2 % グルコース、 2 % 寒天) 上で 28 度生育させた。

【 0141 】

Y . リポリティカ (lipolytica) の形質転換は、特に断りのない限りチエン

50

(Chen), D. C. ら、Appl Microbiol Biotechnol. 48(2): 232~235頁(1997年)の方法に従って実施した。簡単に述べると、ヤロウイア(*Yarrowia*)をYPDプレート上に画線培養し、30度およそ18時間生育させた。いくつかの大型白金耳を満たす細胞をプレートからこすり取り、平均分子量3350の2.25mLの50%PEG、pH6.0の0.125mLの2M酢酸Li、0.125mLの2MDTT、および50μgの剪断サケ精子DNAを含有する1mLの形質転換緩衝液に再懸濁した。次に約500ngの直線化プラスミドDNAを100μLの再懸濁細胞内でインキュベートし、15分間隔でボルテックス混合しながら39度に1時間保った。細胞を選択培地プレートに蒔いて、30度に2~3日間保った。

【0142】

形質転換体の選択のためには、一般に最少培地(「MM」)を使用した。MMの組成は以下のとおり。ミシガン州デトロイトのディフコ・ラボラトリーズ(DIFCO Laboratories(Detroit, MI))からの硫酸アンモニウムまたはアミノ酸を含まない0.17%酵母窒素ベース、2%グルコース、0.1%プロリン、pH6.1。必要に応じてロイシン、リジンおよび/またはウラシルのサプリメントを最終濃度0.01%に添加した(それによってそれぞれ20g/Lの寒天で調製される「MMLe」、「MMLyS」、および「MMMU」選択培地を生成した)。

【0143】

代案としては、次を含んでなる5-フルオロオロチニ酸(「FOA」、また5-フルオロウラシル-6-カルボン酸一水和物とも)選択培地上で形質転換体を選択した。ディフコ・ラボラトリーズ(DIFCO Laboratories)からの硫酸アンモニウムまたはアミノ酸を含まない0.17%酵母窒素ベース、2%グルコース、0.1%プロリン、75mg/Lのウラシル、75mg/Lのウリジン、カリフォルニア州オレンジザイモリサーチ社(Zymo Research Corp.(Orange, CA))からの900mg/L FOA、および20g/Lの寒天。

【0144】

高グルコース培地(「HGM」)を次のように調製した。6.3g/L KH₂PO₄、27g/L K₂HPO₄、および80g/L グルコース(pH7.5)。

【0145】

ヤロウイア・リポリティカ(*Yarrowia lipolytica*)の脂肪酸分析

脂肪酸分析のために、ブライ(Bly)、E.G.およびダイヤー(Dyer)、W.J.、Can.J.Biochem.Physiol.37:911~917頁(1959年)で述べられるように、細胞を遠心分離して収集し、脂質を抽出した。ナトリウムメトキシドでの脂質抽出物のエステル交換反応によって、脂肪酸メチルエステルを調製し(ローガン(Roughan), G. およびニシダ(Nishida), I.、Arch Biochem Biophys. 276(1): 38~46頁(1990年))、引き続きヒューレットパッカード(Hewlett-Packard)からの30mx0.25mm(内径)HP-INNOWAXカラムを装着したヒューレットパッカード(Hewlett-Packard)6890 GCで分析した。オープン温度は3.5/分で、170(25分間保持)から185であった。

【0146】

直接塩基エ斯特ル交換のために、ヤロウイア(*Yarrowia*)培養物(3mL)を収集し、蒸留水で1回洗浄し、スピードバック(Speed-Vac)内で真空下において5~10分乾燥させた。ナトリウムメトキシド(100μLの1%)をサンプルに添加して、次にサンプルをボルテックスし20分間振盪した。3滴の1M NaClおよび400μLのヘキサンを添加した後、サンプルをボルテックスして遠心分離した。上層を除去して上述のようにGCで分析した。

【0147】

実施例1

17デサチュラーゼをコードするフィトフトラ・ソジヤ(*Phytophthora*

10

20

30

40

50

sojae) 遺伝子の同定

カリフォルニア州ウォールナットクリークの米国エネルギー省共同ゲノム研究所 (U.S. Department of Energy's Joint Genome Institute (JGI) (Walnut Creek, CA)) はフィトフトラ・ソジヤ (*Phytophthora sojae*) ゲノム (推定ゲノムサイズ 95 Mbp) のバージョン 1.0 を作り出した。このゲノム配列は、全ゲノムショットガンストラテジーを使用して生成され、全部で 19,276 個の遺伝子モデルを含んでなる。

【0148】

フィトフトラ・インフェスタンス (*Phytophthora infestans*) の 17 デサチュラーゼのアミノ酸配列 (jenbank 登録番号 CAJ30870; ここで「P i D 17」と称し、配列番号 9 に相当する) をクエリー配列として使用して、JGI のフィトフトラ・ソジヤ (*Phytophthora sojae*) データベースに対して、TBLASTN (BLAST タンパク質対翻訳ヌクレオチド) 検索を行った (JGI から入手できるデフォルトパラメーターを使用)。足場 17 : 338148 ~ 339167 上に位置する 1 個の P. ソジヤ (*sojae*) ORF が、P i D 17 と高度な相同意を有することが分かった (すなわち期待値 0 で 91.8% の同一性および 95.6% の類似性)。この相同意に基づいて、P. ソジヤ (*sojae*) ORF を 17 デサチュラーゼとして仮に同定し、「P s D 17」と称した。P s D 17 (配列番号 1) の 1092 bp の DNA 配列をデータベースから検索すると、それは長さが 363 個のアミノ酸のポリペプチド (配列番号 2) をコードすることが分かった。クラスタル (Clustal) W 分析 (DNASTAR ソフトウェアのメガライン (MegAlign) (商標) プログラム) を使用したアミノ酸のアラインメントは、P i D 17 と P s D 17 の間に 90.9% の同一性があったことを示し、対照的にヌクレオチド配列は 86.6% のみの同一性を有した。

【0149】

P s D 17 (配列番号 2) をクエリー配列として使用してタンパク質 - タンパク質 BLAST 検索を行うことで、「nr」データベース (一般方法参照) 中に含まれる全ての公的に入手可能なタンパク質配列に対する P s D 17 の配列相同意もまた判定した。この分析に基づいて、P s D 17 はサプロレグニア・ディクリナ (*Saprolegnia diicina*) の 3 脂肪酸デサチュラーゼ (jenbank 登録番号 AAR20444) と最も高い相同意を有することが分かった。具体的には P s D 17 は、jenbank 登録番号 AAR20444 のアミノ酸配列と、期待値 7E-117 で 60% の同一性および 74% 類似性を有した。さらに P s D 17 は、アナベナ・バリアビリス (*Anabaena variabilis*) ATCC # 29413 の脂肪酸デサチュラーゼのアミノ酸配列 (jenbank 登録番号 ABA23809) と、期待値 4E-57 で 39% の同一性および 57% の類似性を有した。

【0150】

実施例 2

ヤロウイア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) のためにコドン最適化された 17 デサチュラーゼ遺伝子 ('P s D 17 S') の合成

米国特許第 7,125,672 号明細書で述べられていると類似の様式で、ヤロウイア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) 中での発現のために、フィトフトラ・ソジヤ (*Phytophthora sojae*) の 17 デサチュラーゼ遺伝子のコドン使用頻度を最適化した。具体的には、ヤロウイア (*Yarrowia*) のコドン使用頻度パターン (国際公開第 2004/101753 号パンフレット)、「ATG」翻訳開始コドン周辺の共通配列、および RNA の安定法則 (グハニヨギ (Guhaniyogi), G. および J. ブルーアー (Brewer), Gene 265 (1~2) : 11~23 頁 (2001 年)) に従って、P s D 17 のコード配列 (配列番号 1 および 2) に基づいて、コドン最適化 17 デサチュラーゼ遺伝子 ('P s D 17 S' と称する、配列番号 3 および 4) をデザインした。翻訳開始部位の修正に加えて、1092 bp

10

20

30

40

50

のコード領域の 175 bp (16, 0%) を修正し、168 個のコドン (46.2%) を最適化した。GC 含量は、野生型遺伝子（すなわち PsD17）内の 65.1% から、合成遺伝子（すなわち PsD17S）内の 54.5% に低下した。NcoI 部位およびNotI 部位を PsD17S（配列番号 3）の翻訳開始コドン周辺、および停止コドン後にそれぞれ組み込んだ。図 2 は、PsD17 と PsD17S のヌクレオチド配列の比較を示す。アミノ酸レベルでは、野生型 PsD17 と比較して PsD17S は 3 番目および 4 番目のアミノ酸を欠いており、したがって PsD17S の全長は 361 個のアミノ酸（配列番号 4）であった。デザインされた PsD17S 遺伝子はニュージャージー州ピスカタウェイのジェンスクリプト・コーポレーション（GenScript Corporation (Piscataway, NJ)）によって合成され、pUC57（ジェンバンク登録番号 Y14837）中にクローンされて、pPsD17S（配列番号 10；図 3A）を生じさせた。
10

【0151】

実施例 3

コンストラクト pFmPsD17S の発生

本実施例は、キメラの FBAINm :: PsD17S :: XPR 遺伝子を含んでなるプラスミド pFmPsD17S の構築について述べる。プラスミド pFmPsD17S（配列番号 13；図 3D）は、プラスミド pKUNF1-KEA、pDMW214、および pPsD17S からの断片を使用して、三元ライゲーションによって構築された。プラスミド pFmPsD17S を利用して、下記の実施例 5 で述べるように PsD17S の機能性発現を試験した。
20

【0152】

プラスミド pKUNF1-KEA

pKUNF1-KEA（配列番号 11；図 3B）は、キメラ FBAINm :: E1S :: Pex20 遺伝子を含んでなる。このキメラ遺伝子内の「FBAINm」プロモーターは（国際公開第 05/049805 号パンフレット；また図 3B で「Fba1+ イントロン」としても同定されている）「FBAIN」プロモーター由来の合成プロモーターを指し、FBAIN プロモーターは、発現に必要な fba1 遺伝子によってコードされるフルクトース - ビスリン酸アルドラーーゼ酵素（E.C.4.1.2.13）の「ATG」翻訳開始コドンの前の 5' 上流非翻訳領域と、fba1 遺伝子のイントロンを有する 5' コード領域の一部とを指す。FBAINm プロモーターは FBAIN から改変され、FBAINm は FBAIN プロモーターの ATG 翻訳開始コドンとイントロンの間に 52 bp の欠失があり（それによって N-末端の 22 個のアミノ酸のみを含む）、イントロン後の新しい翻訳コンセンサスモチーフを有する。さらに FBAIN プロモーターは発現する遺伝子コード領域と縮合した際に、融合タンパク質を生じる一方、FBAINm プロモーターはこのような融合タンパク質を生じない。
30

【0153】

表 4 はプラスミド pKUNF1-KEA の構成要素を要約する。

【0154】

【表6】

表4
プラスミド pKUNF1-KEA(配列番号 11)の説明

| 配列番号 11 中の RE 部位および ヌクレオチド | 断片およびキメラ遺伝子構成要素の説明 |
|----------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Pmel/Pacl (360～2596) | 次を含んでなる FBAINm::EL1S::Pex20 • FBAINm: ヤロウィア・リポリティカ FBAINm プロモーター (国際公開第 2005/049805 号パンフレット) • EL1S: モルティエラ・アルピナ由来のコドン最適化エロンガーゼ 1 遺伝子(ジェンバンク登録番号 AX464731) (国際公開第 2004/101753 号パンフレット)、 • Pex20: ヤロウィア Pex20 遺伝子(ジェンバンク登録番号 AF054613)の Pex20 ターミネーター配列 |
| Ascl/BsiWI 3387～2596 | ヤロウィア Ura3 遺伝子(ジェンバンク登録番号 AJ306421)の 5'部分 |
| Pacl/SphI 6617～6095 | ヤロウィア Ura3 遺伝子(ジェンバンク登録番号 AJ306421)の 3'部分 |

10

20

30

40

【0155】

プラスミド pDMW214

pDMW214(配列番号 12; 図 3C)は、大腸菌(E. coli)およびヤロウィア・リポリティカ(Yarrowia lipolytica)の双方の中で複製するシャトルプラスミドである。それは次の構成要素を含有した。

【0156】

【表7】

表5
プラスミド pDMW214(配列番号 12)の説明

| 配列番号 12 中の RE 部位および ヌクレオチド | 断片およびキメラ遺伝子構成要素の説明 |
|----------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1150～270 | ColE1 プラスミド複製起点 |
| 2080～1220 | アンピシリン-抵抗性遺伝子(Amp ^R) |
| 2979～4256 | ヤロウィア自律複製配列(ARS18; ジェンバンク登録番号 A17608) |
| Pmel/SphI 6501～4256 | ヤロウィア Leu2 遺伝子(ジェンバンク登録番号 AF260230) |
| 6501～1 | 次を含んでなる FBAIN::GUS::XPR • FBAIN: ヤロウィア・リポリティカ FBAIN プロモーター (国際公開第 2005/049805 号パンフレット) • GUS: β-グルクロニダーゼをコードする大腸菌(E.coli)遺伝子 (ジェファーソン(Jefferson), R.A.著, Nature, 14; 342: 837～838 頁(1989 年)) • XPR: ヤロウィア Xpr 遺伝子(ジェンバンク登録番号 M17741)の 約 100bp の 3'領域 |

50

【0157】

プラスミド pFmPsD17S の最終構築

プラスミド pKUNF1-KEA (図3B; FBAINm プロモーターを含んでなる) の PmeI / NcoI 断片、およびプラスミド pPsD17S (図3A; 合成 17デサチュラーゼ遺伝子 PsD17S を含んでなる) の NcoI / NotI 断片を一方向性に使用して、pDMW214 (図3C) の PmeI / NotI 断片を置き換えた。これはキメラ FBAINm : : PsD17S : : XPR 遺伝子を含んでなる、pFmPsD17S (配列番号 13; 図3D) の発生をもたらした。したがって pFmPsD17S の構成要素は、下の表6で述べられるようであった。

【0158】

【表8】

10

表6
プラスミド pFmPsD17S(配列番号 13)の説明

| 配列番号 13 中の RE 部位および ヌクレオチド | 断片およびキメラ遺伝子構成要素の説明 |
|----------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 5551~1305 | ヤロウィア自律複製配列(ARS18; ジェンバンク登録番号 A17608) |
| 7769~1269 | 次を含んでなる FBAINm : : PsD17S : : XPR • FBAINm: ヤロウィア・リポリティカ FBAINm プロモーター (国際公開第 2005/049805 号パンフレット) • PsD17S: P.ソジャ由来のコドン最適化 Δ17 デサチュラーゼ遺伝子(配列番号 3) • XPR: ヤロウィア Xpr 遺伝子(ジェンバンク登録番号 M17741)の約 100bp の 3'領域 |
| 2418~1538 | ColE1 プラスミド複製起点 |
| 3348~2488 | アンピシリン-抵抗性遺伝子(Amp ^R) |
| Pmel/Sphi 7769~5524 | ヤロウィア Leu2 遺伝子(ジェンバンク登録番号 AF260230) |

20

30

【0159】

実施例 4

6デサチュラーゼ / 6エロンガーゼ経路を通じて総脂質の約 11% のARAを生成するヤロウィア・リポリティカ (Yarrowia lipolytica) Y2047 株の発生

本実施例は、6デサチュラーゼ / 6エロンガーゼ経路の発現を通じて総脂質に対して 11% の ARA を生成できる、ヤロウィア・リポリティカ (Yarrowia lipolytica) ATCC #20362 由来の Y2047 株の構築について述べる (図4A)。Y2047 は、ブダペスト条約の取り決めの元に寄託されており、ATCC 番号 PTA-7186 を有する。さらに Y2047 の構築については、ここで参照によって援用する同時係属米国特許出願第 11/265761 号明細書で述べられている。

【0160】

Y2047 株の発生には、最初に M4 株 (8% の DGLA を生成する) の構築を必要とする。

【0161】

総脂質の約 8% の DGLA を生成するための M4 株の発生

コンストラクト pKUNF12T6E (図4B; 配列番号 14) を発生させて 4 個のキメラ遺伝子 (12デサチュラーゼ、6デサチュラーゼ、および 2 個の C₁₈/20 エ

40

50

ロンガーゼを含んでなる)を野生型ヤロウイア(Yarrowia)ATCC#20362株のUra3遺伝子座に組み込み、それによってDGLAの生成を可能にした。pKUNF12T6Eプラスミドは、以下の構成要素を含有した。

【0162】

【表9】

表7
プラスミドpKUNF12T6E(配列番号14)の説明

| 配列番号14中のRE部位およびヌクレオチド | 断片およびキメラ遺伝子構成要素の説明 |
|----------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Ascl/BsiWI (9420~8629) | ヤロウイア Ura3 遺伝子(ジェンバンク登録番号 AJ306421)の784bpの5'部分 |
| SphI/PacI (12128~1) | ヤロウイア Ura3 遺伝子(ジェンバンク登録番号 AJ306421)の516bpの3'部分 |
| Swal/BsiWI (6380~8629) | <p>次を含んでなる FBAIN::EL1S::Pex20</p> <ul style="list-style-type: none"> • FBAIN: ヤロウイア・リポリティカ FBAIN プロモーター(国際公開第 2005/049805 号パンフレット) • EL1S: モルティエラ・アルピナ由来のコドン最適化ロンガーゼ1 遺伝子(ジェンバンク登録番号 AX464731)(国際公開第 2004/101753 号パンフレット) • Pex20: ヤロウイア Pex20 遺伝子(ジェンバンク登録番号 AF054613)からの Pex20 ターミネーター配列 |
| BglIII/Swal (4221~6380) | <p>次を含んでなる TEF::Δ6S::Lip1</p> <ul style="list-style-type: none"> • TEF: ヤロウイア・リポリティカ TEF プロモーター(ジェンバンク登録番号 AF054508) • Δ6S: モルティエラ・アルピナ由来のコドン最適化 Δ6 デサチュラーゼ遺伝子(ジェンバンク登録番号 AF465281)(国際公開第 2004/101753 号パンフレット) • Lip1: ヤロウイア Lip1 遺伝子(ジェンバンク登録番号 Z50020)からの Lip1 ターミネーター配列 |
| Pmel/Clal (4207~1459) | <p>次を含んでなる FBA::F.Δ12::Lip2</p> <ul style="list-style-type: none"> • FBA: ヤロウイア・リポリティカ FBA プロモーター(国際公開第 2005/049805 号パンフレット) • F.Δ12: フザリウム・モニリフォルメ(Fusarium moniliforme)Δ12 デサチュラーゼ遺伝子(国際公開第 2005/047485 号パンフレット) • Lip2: ヤロウイア Lip2 遺伝子(ジェンバンク登録番号 AJ012632)からの Lip2 ターミネーター配列 |
| Clal/PacI (1459~1) | <p>次を含んでなる TEF::EL2S::XPR</p> <ul style="list-style-type: none"> • TEF: ヤロウイア・リポリティカ TEF プロモーター(ジェンバンク登録番号 AF054508) • EL2S: スラウストキトリウム・アウレウム(Thraustochytrium aureum)(米国特許第 6,677,145 号明細書)由来のコドン最適化エロンガーゼ遺伝子(配列番号 15) • XPR: ヤロウイア Xpr 遺伝子(ジェンバンク登録番号 M17741)の約 100bp の 3'領域 |

【0163】

一般方法に従って pKUNF12T6E プラスミドを Asci / Sphi で消化し、次

10

20

30

40

50

に野性型 Y. リポリティカ (l i p o l y t i c a) ATCC # 2 0 3 6 2 の形質転換のために使用した。形質転換体細胞を F O A 選択培地プレート上に播種し、 3 0 ℃ に 2 ~ 3 日間保った。 F O A 抵抗性コロニーを拾って、 M M および M M U 選択プレート上に画線培養した。 M M U プレート上に生育できたが、 M M プレート上には生育できなかったコロニーを U r a - 株として選択した。次に U r a - 株の單一コロニーを 3 0 ℃ の液体 M M U に接種して、 2 5 0 r p m / 分で 2 日間振盪した。遠心分離によって細胞を収集し、 脂質を抽出してエステル交換により脂肪酸メチルエステルを調製して、 引き続いてヒューレットパッカード (H e w l e t t - P a c k a r d) 6 8 9 0 G C で分析した。

【 0 1 6 4 】

G C 分析は、 p K U N F 1 2 T 6 E の 4 個のキメラ遺伝子を含有する形質転換体中に D G L A の存在を示したが、 野性型ヤロウィア (Y a r r o w i a) 対照株では示されなかった。選択された 3 2 個の U r a - 株のほとんどが総脂質の約 6 % の D G L A を生成した。総脂質の約 8 % の D G L A を生成した 2 株 (すなわち M 4 株および 1 3 - 8) があった。

10

【 0 1 6 5 】

総脂質の約 1 1 % A R A を生成する Y 2 0 4 7 株の発生

コンストラクト p D M W 2 7 1 (図 4 C ; 配列番号 1 7) を発生させて、 3 個の 5 キメラ遺伝子をヤロウィア (Y a r r o w i a) M 4 株の L e u 2 遺伝子に組み込んだ。表 8 で述べられるように、 プラスミド p D M W 2 7 1 は以下の構成要素を含有した。

【 0 1 6 6 】

20

【表10】

表8
プラスミド pDMW271(配列番号 17)の説明

| | |
|----------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 番号 17 中の RE 部位および ヌクレオチド配列 | 断片およびキメラ遺伝子構成要素の説明 |
| Ascl/BsiWI (5520~6315) | ヤロウイア Leu2 遺伝子(ジェンバンク登録番号 AF260230)の 788bp の 5'部分 |
| SphI/Pacl (2820~2109) | ヤロウイア Leu2 遺伝子(ジェンバンク登録番号 AF260230)の 703bp の 3'部分 |
| Swal/BsiWI (8960~6315) | 次を含んでなる FBAIN::MAΔ5::Pex20 • FBAIN: ヤロウイア・リポリティカ FBAIN プロモーター(国際公開第 2005/049805 号パンフレット) • MAΔ5: モルティエラ・アルピナ Δ5 デサチュラーゼ遺伝子(ジェンバンク登録番号 AF067654) • Pex20: ヤロウイア Pex20 遺伝子(ジェンバンク登録番号 AF054613)の Pex20 ターミネーター配列 |
| Swal/Clal (8960~11055) | 次を含んでなる TEF::MAΔ5::Lip1 • TEF: ヤロウイア・リポリティカ TEF プロモーター(ジェンバンク登録番号 AF054508) • MAΔ5: モルティエラ・アルピナ Δ5 デサチュラーゼ遺伝子(ジェンバンク登録番号 AF067654) • Lip1: ヤロウイア Lip1 遺伝子(ジェンバンク登録番号 Z50020)の Lip1 ターミネーター配列 |
| Pmel/Clal (12690~11055) | ヤロウイア Ura3 遺伝子(ジェンバンク登録番号 AJ306421) |
| Clal/Pacl (1~2109) | 次を含んでなる TEF::HΔ5S::Pex16 • TEF: ヤロウイア・リポリティカ TEF プロモーター(ジェンバンク登録番号 AF054508) • HΔ5S: ヒト(Homo sapiens)由来のコドン最適化 Δ5 デサチュラーゼ遺伝子(配列番号 18)(ジェンバンク登録番号 NP_037534) • Pex16: ヤロウイア Pex16 遺伝子(ジェンバンク登録番号 U75433)の Pex16 ターミネーター配列 |

【0167】

一般方法に従ってプラスミド pDMW271 を Ascl / SphI で消化し、次に M4 株に形質転換した。形質転換に続いて、細胞を MMLe プレート上に播種し、30℃ に 2 ~ 3 日間保った。MMLe プレートの上で生育した個々のコロニーを拾って、MM および MMLe プレート上に画線培養した。MMLe プレート上では生育できたが、MM プレート上では生育できなかったコロニーを Leu2+ 株として選択した。次に Leu2+ 株の單一コロニーを 30℃ の液体 MMLe 培地に接種して、250 rpm / 分で 2 日間振盪した。遠心分離によって細胞を収集し、脂質を抽出してエステル交換により脂肪酸メチルエステルを調製して、引き続いてヒューレットパッカード (Hewlett - Packard) 6890 GC で分析した。

【0168】

GC 分析は pDMW271 形質転換体中の ARA の存在を示したが、親 M4 株中には示されなかった。具体的には、pDMW271 がある 48 個の選択された Leu2+ 形質転換体中に、変更されたヤロウイア (Yarrowia) 中の総脂質の 5 % 未満の ARA を

10

20

30

40

50

生成した 35 株、6 ~ 8 % の A R A を生成した 12 株、および総脂質の約 11 % の A R A を生成した 1 株があった。11 % の A R A を生成した株を「Y 2 0 4 7」と命名した。

【 0 1 6 9 】

実施例 5

ヤロウイア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) Y 2 0 4 7 株におけるコドン最適化 17 デサチュラーゼ遺伝子(「P s D 1 7 S」)の発現

一般方法で述べられるように、プラスミド p F m P s D 1 7 S (図 3 D ; 実施例 3) をヤロウイア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) Y 2 0 4 7 株 (実施例 4) に形質転換した。形質転換細胞を MM 選択培地プレート上に播種し、2 ~ 3 日間 30 ℃ に保った。MM プレート上に生育した 8 個の形質転換体を拾って、新鮮な MM プレート上に再度画線培養した。生育したらこれらの株を 30 ℃ の 3 ml の液体 MM 中に個別に接種して、250 rpm / 分で 2 日間振盪した。細胞を遠心分離によって収集し、脂質を抽出してエステル交換によって脂肪酸メチルエステルを調製し、引き続いてヒューレットパッカード (Hewlett-Packard) 6890 GC で分析した。

【 0 1 7 0 】

GC 結果は、全 8 個の形質転換体において、生成した総脂質の約 3 % の A R A および 2 % の E P A があったことを示した。これらの 8 株中で P s D 1 7 S が A R A を E P A に変換する変換効率は、平均率で約 40 % であった。変換効率は次の式に従って測定された。 $([\text{生成物}] / [\text{基質} + \text{生成物}]) \times 100$ 。式中、「生成物」には、直接生成物およびそれに由来する経路中の全生成物が含まれる。したがってこの実験データは、P. ソジャ (sojae) 由来のコドン最適化 17 デサチュラーゼ遺伝子 (配列番号 3) が、A R A を E P A に効率的に不飽和化したことを実証する。

【 0 1 7 1 】

実施例 6

コンストラクト p Z P 3 - P 7 U の発生

本実施例は、ヤロウイア (*Yarrowia*) ゲノムの P o x 3 遺伝子座 (ジェンバンク登録番号 X P _ 5 0 3 2 4 4) に組み込むようにデザインされた、キメラの Y A T : : P s D 1 7 S : : L i p 1 遺伝子を含んでなるプラスミド p Z P 3 - P 7 U の構築について述べる。下記の実施例 8 で述べられるように、プラスミド p Z P 3 - P 7 U を利用して P s D 1 7 S の機能性発現を試験した。p Z P 3 - P 7 U の構成要素は、下の表 9 で述べられるようであった。

【 0 1 7 2 】

10

20

30

【表11】

表9
プラスミド pZP3-P7U(配列番号 20)の説明

| 番号 20 中の RE 部位および ヌクレオチド配列 | 断片およびキメラ遺伝子構成要素の説明 |
|----------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Ascl/BsiWI (4030~4800) | ヤロウイア Pox3 遺伝子(ジェンバンク登録番号 AJ001301)の 770bp の 5'部分 |
| Pacl/SphI (504~1300) | ヤロウイア Pox3 遺伝子(ジェンバンク登録番号 AJ001301)の 826bp の 3'部分 |
| Clal/Swal 7133~4960 | 次を含んでなる YAT::PsD17S::Lip1 • YAT: ヤロウイア YAT プロモーター(国際公開第 2006/052754 号 パンフレット) • PsD17S: P. ソジヤ由来のコドン最適化 Δ17 デサチュラーゼ遺伝子 (配列番号 3) • Lip1: ヤロウイア Lip1 遺伝子(ジェンバンク登録番号 Z50020) の Lip1 ターミネーター配列 |
| Clal/EcoRI 7133~1 | 次を含んでなる LoxP::Ura3::LoxP • LoxP 配列(配列番号 21) • ヤロウイア Ura3 遺伝子(ジェンバンク登録番号 AJ306421) • LoxP 配列(配列番号 21) |

10

20

30

40

50

【0173】

実施例 7

9 エロンガーゼ / 8 デサチュラーゼ経路を通じて総脂質の約 12 % の A R A を生成するためのヤロウイア・リポリティカ (Yarrowia lipolytica) Y4070 株の発生

本実施例は、9 エロンガーゼ / 8 デサチュラーゼ経路(図 6A)の発現を通じて、総脂質に対して約 12 % の A R A を生成できるヤロウイア・リポリティカ (Yarrowia lipolytica) ATCC # 20362 由来の Y4070 株の構築について述べる。Y4070 株を利用して、下記の実施例 8 の P s D 1 7 S および実施例 12 の P r D 1 7 S の機能性発現を試験した。

【0174】

Y4070 株の発生には、Y2224 株(野生型ヤロウイア (Yarrowia) ATCC # 20362 株の Ura3 遺伝子の自律性変異からの F O A 抵抗性突然変異体)、Y4001 株(Leu - フェノタイプで 17 % の E D A を生成する)、Y4001U 株(Leu - および Ura - フェノタイプで 17 % の E D A を生成する)、Y4036 株(Leu - フェノタイプで 18 % の D G L A を生成する)、および Y4036U 株(Leu - および Ura - フェノタイプで 18 % の D G L A を生成する)の構築が必要であった。

【0175】

Y2224 株の発生

Y2224 株を次の様式で単離した。Y P D 寒天プレート(1 % 酵母抽出物、2 % バクトペプトン、2 % グルコース、2 % 寒天)からのヤロウイア・リポリティカ (Yarrowia lipolytica) ATCC # 20362 細胞を 250 mg / L の 5 - F O A (ザイモ・リサーチ (Zymo Research)) を含有する MM プレート(各 7.5 mg / L のウラシルおよびウリジン、6.7 g / L 硫酸アンモニア添加 Y N B、アミノ酸無添加、および 20 g / L グルコース)上に画線培養した。プレートを 28 °C でインキュベートし、得られたコロニーの内 4 つを 200 mg / mL 5 - F O A 含有 MM プレ-

ト上、およびウラシルおよびウリジンを欠くMMプレート上に別々にパッチして、ウラシルUra3栄養要求性を確認した。

【0176】

総脂質の約17%のEDAを生成するY4001株の発生

コンストラクトpZKLeuN-29E3(図6B)の組み込みを通じて、Y4001株を作り出した。4個のキメラ遺伝子(すなわち12デサチュラーゼ、C_{16/18}エロンガーゼ、および2個の9エロンガーゼ)を含んでなるこのコンストラクトをY2224株のLeu2遺伝子座に組み込み、それによってEDAの生成を可能にした。

【0177】

コンストラクトpZKLeuN-29E3は、表10に示す構成要素を含有した。

10

【0178】

【表12】

表10
プラスミド pZKLeuN-29E3(配列番号 22)の説明

| | | |
|-----------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 配列番号 22 中の RE 部位および ヌクレオチド | 断片およびキメラ遺伝子構成要素の説明 | |
| BsiWI/Ascl (7797~7002) | ヤロウイア Leu2 遺伝子(ジェンバンク登録番号 AF260230)の 788bp の 3'部分 | 10 |
| SphI/PacI (4302~3591) | ヤロウイア Leu2 遺伝子(ジェンバンク登録番号 AF260230)の 703bp の 5'部分 | |
| Swal/BsiWI (10500~7797) | <p>次を含んでなる GPD::F.D12::Pex20</p> <ul style="list-style-type: none"> ● GPD: ヤロウイア・リポリティカ GPD プロモーター (国際公開第 2005/003310 号パンフレット) ● F.D12: フザリウム・モニリフォルメ(<i>Fusarium moniliforme</i>)Δ12 デサチュラーゼ遺伝子(国際公開第 2005/047485 号パンフレット) ● Pex20: ヤロウイア Pex20 遺伝子(ジェンバンク登録番号 AF054613)からの Pex20 ターミネーター配列 | |
| BglII/Swal (12526~10500) | <p>次を含んでなる Exp pro::EgD9E::Lip1</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Exp pro: ヤロウイア・リポリティカエクスポートタンパク質(EXP1) プロモーター(国際公開第 2006/052870 号パンフレットおよび米国特許出願第 11/265761 号明細書) ● EgD9E: ミドリムシ(<i>Euglena gracilis</i>)由来のコドン最適化 Δ9 エロンガーゼ(配列番号 23)(「EgD9eS」; 米国特許出願第 11/601563 号明細書および米国特許出願第 11/601564 号明細書) ● Lip1: ヤロウイア Lip1 遺伝子(ジェンバンク登録番号 Z50020)からの Lip1 ターミネーター配列 | 20 |
| Pmel/Clal (12544~1) | <p>次を含んでなる FBAINm::EgD9S::Lip2</p> <ul style="list-style-type: none"> ● FBAINm: ヤロウイア・リポリティカ FBAINm プロモーター (国際公開第 2005/049805 号パンフレット) ● EgD9S: ミドリムシ(<i>Euglena gracilis</i>)由来のコドン最適化 Δ9 エロンガーゼ遺伝子(配列番号 23)(「EgD9eS」; 米国特許出願第 11/601563 号明細書および米国特許出願第 11/601564 号明細書) ● Lip2: ヤロウイア Lip2 遺伝子(ジェンバンク登録番号 AJ012632)からの Lip2 ターミネーター配列 | 30 |
| Clal/EcoRI (1~1736) | <p>次を含んでなる LoxP::Ura3::LoxP</p> <ul style="list-style-type: none"> ● LoxP 配列(配列番号 21) ● ヤロウイア Ura3 遺伝子(ジェンバンク登録番号 AJ306421) ● LoxP 配列(配列番号 21) | |
| EcoRI/PacI (1736~3591) | <p>次を含んでなる NT::ME3S::Pex16</p> <ul style="list-style-type: none"> ● NT: ヤロウイア・リポリティカ YAT1 プロモーター(米国特許出願公開第 2006/0094102-A1 号明細書) ● ME3S: M.アルピナ(<i>alpina</i>)由来のコドン最適化 C_{16/18} エロンガーゼ遺伝子(配列番号 25)(米国特許出願第 11/253882 号明細書および国際公開第 2006/052870 号パンフレット) ● Pex16: ヤロウイア Pex16 遺伝子(ジェンバンク登録番号 U75433)の Pex16 ターミネーター配列 | 40 |

【0179】

50

一般方法に従って、プラスミド pZKLeuN - 29E3 を AscI / SphI で消化し、次に Y. リポリティカ (lipolytica) Y2224 株 (すなわち ATCC # 20362 Ura3-) の形質転換のために使用した。形質転換細胞を MMLeu 培地プレート上に播種して 30 日に 2 ~ 3 日間保った。コロニーを拾って、MM および MMLeu 選択プレート上に画線培養した。MMLeu プレート上では生育できたが、MM プレートでは生育できなかったコロニーを Leu- 株として選択した。次に Leu- 株の単一コロニーを 30 μl の液体 MMLeu に接種して、250 rpm / 分で 2 日間振盪した。遠心分離によって細胞を収集し、脂質を抽出してエステル交換により脂肪酸メチルエステルを調製して、引き続いてヒューレットパッカード (Hewlett-Packard) 6890 GC で分析した。

10

【0180】

GC 分析は、pZKLeuN - 29E3 の 4 個のキメラ遺伝子を含有する形質転換体中のEDA の存在を示したが、ヤロウイア (Yarrowia) Y2224 対照株中には示されなかった。選択された 36 個の Leu- 株のほとんどは総脂質の約 12 ~ 16.9% のEDA を生成した。総脂質の約 17.4%、17%、および 17.5% のEDA を生成した 3 株 (すなわち株 # 11、# 30、および # 34) があり、それらをそれぞれ Y4001、Y4002、および Y4003 株と称した。

【0181】

総脂質の約 17% EDA を生成するための Y4001U 株 (Leu-、Ura-) の発生 Y4001 株において、プラスミド pY116 中での Cre リコンビナーゼ酵素の一時的な発現を通じて Y4001U 株を作り出し (図 6C)、Leu- および Ura- フェノタイプを生成した。コンストラクト pY116 は次の構成要素を含有した。

20

【0182】

【表 13】

表 11
プラスミド pY116(配列番号 27)の説明

| 配列番号 27 中の RE 部位および ヌクレオチド | 断片およびキメラ遺伝子構成要素の説明 |
|----------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1328~448 | ColE1 プラスミド複製起点 |
| 2258~1398 | 大腸菌 (E.coli) 中の選択のためのアンピシリン-抵抗性遺伝子 (Amp ^R) |
| 3157~4461 | ヤロウイア自律複製配列 (ARS18; ジェンバンク登録番号 A17608) |
| PacI/SawI 6667~4504 | ヤロウイア Leu2 遺伝子 (ジェンバンク登録番号 AF260230) |
| Swal/Pmel(6667 ~218 | 次を含んでなる GPAT::Cre::XPR2 ● GPAT: ヤロウイア・リポリティカ GPAT プロモーター (国際公開第 2006/031937 号パンフレット) ● Cre: リコンビナーゼタンパク質のためのエンテロバクテリア (Enterobacteria) ファージ P1 Cre 遺伝子 (ジェンバンク登録番号 X03453) ● XPR2: ヤロウイア Xpr 遺伝子 (ジェンバンク登録番号 M17741) の約 100bp の 3'領域 |

30

40

【0183】

一般方法に従って、新鮮に生育させた Y4001 細胞の形質転換のためにプラスミド pY116 を使用した。形質転換細胞を 280 μg / mL スルホニル尿素を含有する MM

50

L e u + U r a プレート(ロイシン添加M M U)上に播種して、30に3~4日間保った。4個のコロニーを拾って30の3mLの液体YPD培地に接種し、250r p m /分で1日間振盪した。培養を液体M M L e u + U r a 培地で1:50,000に希釈し、100μLを新しいYPDプレート上に播種して30に2日間保った。コロニーを拾ってM M L e u およびM M L e u + U r a 選択プレート上に画線培養した。M M L e u + U r a プレート上では生育できたが、M M L e u プレートでは生育できなかったコロニーを選択し、G Cによって分析してC 2 0 : 2 (E D A)の存在を確認した。L e u - およびU r a - フェノタイプを有する1株は総脂質の約17%のE D Aを生成し、Y 4 0 0 1 Uと称された。

【0184】

10

総脂質の約18%のD G L Aを生成するためのY 4 0 3 6 株の発生

コンストラクトp K O 2 U F 8 2 8 9(図7A;配列番号28)を発生させて、4個のキメラ遺伝子(1個の12デサチュラーゼ、1個の9エロンガーゼ、および2個の突然変異8デサチュラーゼを含んでなる)をY 4 0 0 1 U 1株の12遺伝子座に組み込み、それによってD G L Aの生成を可能にした。コンストラクトp K O 2 U F 8 2 8 9は以下の構成要素を含有した。

【0185】

【表14】

表12
プラスミド pKO2UF8289(配列番号 28)の説明

| | |
|-----------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 配列番号 28 中の RE 部位および ヌクレオチド | 断片およびキメラ遺伝子構成要素の説明 |
| Ascl/BsiWI (10304~9567) | ヤロウィア Δ12 デサチュラーゼ遺伝子 (国際公開第 2004/104167 号パンフレット) の 5'部分 |
| EcoRI/SphI (13568~13012) | ヤロウィア Δ12 デサチュラーゼ遺伝子 (国際公開第 2004/104167 号パンフレット) の 3'部分 |
| Swal/BsiWI (7055~9567) | 次を含んでなる FBAINm::EgD8M::Pex20 ● FBAINm: ヤロウィア・リポリティカ FBAINm プロモーター (国際公開第 2005/049805 号パンフレット) ● EgD8M: ミドリムシ (<i>Euglena gracilis</i>) 由来の合成 Δ8 デサチュラーゼ突然変異体 EgD8S-23(配列番号 29) (米国特許出願第 11/635258 号明細書) ● Pex20: ヤロウィア Pex20 遺伝子(ジェンバンク登録番号 AF054613)からの Pex20 ターミネーター配列 |
| Swal/Pmel (7055~4581) | 次を含んでなる YAT::F.D12::OCT ● YAT: ヤロウィア・リポリティカ YAT1 プロモーター (米国特許出願公開 2006/0094102-A1 号明細書) ● F.D12: フザリウム・モニリフォルメ (<i>Fusarium moniliforme</i>) Δ12 デサチュラーゼ遺伝子(国際公開第 2005/047485 号パンフレット) ● OCT: ヤロウィア OCT 遺伝子(ジェンバンク登録番号 X69988)のターミネーター配列 |
| Pmel/Pacl (4581~2124) | 次を含んでなる EXP::EgD8M::Pex16 ● EXP: ヤロウィア・リポリティカエキスポートタンパク質 (EXP1) プロモーター(国際公開第 2006/052870 号パンフレットおよび米国特許出願第 11/265761 号明細書) ● EgD8M: ミドリムシ (<i>Euglena gracilis</i>) 由来の合成 Δ8 デサチュラーゼ突然変異体 EgD8S-23(配列番号 29)(米国特許出願第 11/635258 号明細書) ● Pex16: ヤロウィア Pex16 遺伝子(ジェンバンク登録番号 U75433)の Pex16 ターミネーター |
| Pmel/Clal (2038~1) | 次を含んでなる GPAT::EgD9e::Lip2 ● GPAT: ヤロウィア・リポリティカ GPAT プロモーター (国際公開第 2006/031937 号パンフレット) ● EgD9e: ミドリムシ (<i>Euglena gracilis</i>) Δ9 エロンガーゼ遺伝子(配列番号 31)(米国特許出願第 11/601563 号明細書および米国特許出願第 11/601564 号明細書) ● Lip2: ヤロウィア Lip2 遺伝子(ジェンバンク登録番号 AJ012632)からの Lip2 ターミネーター配列 |
| Clal/EcoRI (13568~1) | 次を含んでなる LoxP::Ura3::LoxP ● LoxP 配列(配列番号 21) ● ヤロウィア Ura3 遺伝子(ジェンバンク登録番号 AJ306421) ● LoxP 配列(配列番号 21) |

【0186】

一般方法に従って、pKO2UF8289 プラスミドを Asci / Sphi で消化し、

10

20

30

40

50

次に Y 4 0 0 1 U 1 株の形質転換のために使用した。形質転換体細胞を M M L e u プレート上に播種し、30¹⁰ に 2 ~ 3 日間保った。コロニーを拾って M M L e u 選択プレート上において 30¹⁰ で 2 日間画線培養した。次にこれらの細胞を 30¹⁰ の液体 M M L e u に接種して、250 rpm / 分で 2 日間振盪した。遠心分離によって細胞を収集し、脂質を抽出してエステル交換により脂肪酸メチルエステルを調製して、引き続いてヒューレットパッカード (Hewlett - Packard) 6890 GC で分析した。

【 0 1 8 7 】

GC 分析は、p K O 2 U F 8 2 8 9 の 4 キメラ遺伝子を含有する形質転換体中の D G L A の存在を示したが、親 Y 4 0 0 1 U 1 株中には示さなかった。選択された 9 6 株のほとんどは、総脂質の 7 ~ 13 % の D G L A を生成した。総脂質の約 15 %、13.8 %、18.2 %、13.1 %、15.6 %、および 13.9 % の D G L A を生成した 6 株 (すなわち # 32、# 42、# 60、# 68、# 72、および # 94) があった。これらの 6 株をそれぞれ Y 4 0 3 4、Y 4 0 3 5、Y 4 0 3 6、Y 4 0 3 7、Y 4 0 3 8、および Y 4 0 3 9 と称した。¹⁰

【 0 1 8 8 】

総脂質の約 18 % の D G L A を生成するための Y 4 0 3 6 U 株 (L e u - 、U r a 3 -) の発生

コンストラクト p Y 1 1 6 (図 6 C ; 配列番号 27) を利用して、Y 4 0 3 6 株中で一時的に C r e リコンビナーゼ酵素を発現した。これはゲノムから L o x P に挟まれた U r a 3 遺伝子を放出した。²⁰

【 0 1 8 9 】

一般方法に従って、プラスミド p Y 1 1 6 を使用して Y 4 0 3 6 株を形質転換した。形質転換に続いて細胞を M M L e u + U r a プレート (ロイシン添加 M M U) 上に播種し、30²⁰ に 2 ~ 3 日間保った。M L e u + U r a プレート上で生育した個々のコロニーを拾って Y P D 液体培地に画線培養し、30²⁰ および 250 rpm / 分で 1 日間振盪して p Y 1 1 6 プラスミドをキュアリングした。生育した培養物を M M L e u + U r a u プレート上に画線培養した。30²⁰ で 2 日後、個々のコロニーを M M L e u + U r a 、M M U 、および M M L e u プレート上に再度画線培養した。M M L e u + U r a 上では生育できたが M M U または M M L e u プレート上では生育できなかったコロニーを選択した。L e u - および U r a - フェノタイプがあるこれらの株の 1 つを Y 4 0 3 6 U (U r a - 、L e u -) と称した。³⁰

【 0 1 9 0 】

総脂質の約 12 % の A R A を生成するための Y 4 0 7 0 株の発生

コンストラクト p Z K S L - 5 5 5 R (図 7 B ; 配列番号 32) を発生させ、3 個の 5 デサチュラーゼ遺伝子を Y 4 0 3 6 U 株の L y s 遺伝子座に組み込み、それによって A R A の生成を可能にした。p Z K S L - 5 5 5 R プラスミドは次の構成要素を含有した。

【 0 1 9 1 】

【表15】

表13
プラスミド pZKSL-555R(配列番号32)の説明

| | |
|---------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 配列番号32中のRE部位およびヌクレオチド | 断片およびキメラ遺伝子構成要素の説明 |
| Ascl/BsiWI (3321~2601) | ヤロウイア Lys5 遺伝子(ジェンバンク登録番号 M34929)の 720bp の 5'部分 |
| Pacl/SphI (6716~6029) | ヤロウイア Lys5 遺伝子(ジェンバンク登録番号 M34929)の 687bp の 3'部分 |
| BglII/BsiWI (15~2601) | 次を含んでなる EXP::EgD5S::Pex20 ● EXP: ヤロウイア・リポリティカエキスポートタンパク質(EXP1) プロモーター(国際公開第 2006/052870 号パンフレットおよび 米国特許出願第 11/265761 号明細書) ● EgD5S: ミドリムシ(<i>Euglena gracilis</i>)由来のコドン最適化 Δ5 デサチュラーゼ(配列番号 33)、(米国仮出願第 60/801172 号明 細書) ● Pex20: ヤロウイア Pex20 遺伝子からの Pex20 ターミネーター 配列(ジェンバンク登録番号 AF054613) |
| Clal/Pmel (11243~1) | 次を含んでなる YAT::RD5S::OCT ● YAT: ヤロウイア・リポリティカ YAT1 プロモーター (米国特許出願公開第 2006/0094102-A1 号明細書) ● RD5S: ペリディニウム(<i>Peridinium</i>)種 CCMP626 由来のコドン最 適化 Δ5 デサチュラーゼ(配列番号 35)(米国仮出願第 60/ 801119 号明細書) ● OCT: ヤロウイア OCT 遺伝子(ジェンバンク登録番号 X69988)の OCT ターミネーター配列 |
| EcoRI/Pacl (9500~6716) | 次を含んでなる FBAIN::EgD5WT::Aco ● FBAIN: ヤロウイア・リポリティカ FBAIN プロモーター (国際公開第号パンフレット 2005/049805) ● EgD5WT: 内部 BglII、HindIII、および Ncol 制限酵素部位の 消失があるミドリムシ(<i>Euglena gracilis</i>)Δ5 デサチュラーゼ(配列 番号 35; 米国仮出願第 60/801172 号明細書) ● Aco: ヤロウイア Aco 遺伝子(ジェンバンク登録番号 AJ001300) の Aco ターミネーター |
| EcoRIClal (9500~11243) | ヤロウイア Leu2 遺伝子(ジェンバンク登録番号 M37309) |

10

20

30

40

【0192】

一般方法に従って、pZKSL-555R プラスミドを Ascl / SphI で消化し、次に Y4036U 株の形質転換のために使用した。形質転換体細胞を MMLeuLys ブレート(リジン添加 MMLeu) 上に播種して、30℃ に 2 ~ 3 日間保った。次に単一コロニーを MMLeuLys ブレート上に再度画線培養し、次に 30℃ の液体 MMLeuLys に接種して 250 rpm / 分で 2 日間振盪した。遠心分離によって細胞を収集し、脂質を抽出してエステル交換により脂肪酸メチルエステルを調製して、引き続いてヒューレットパッカード (Hewlett-Packard) 6890 GC で分析した。

【0193】

GC 分析は pZKSL-555R の 3 個のキメラ遺伝子を含有する形質転換体中の AR

50

Aの存在を示したが、親Y4036株中には示されなかった。選択された96株のほとんどは総脂質の約10%のARAを生成した。総脂質の約11.7%、11.8%、11.9%、および11.7%のARAを生成した4株（すなわち#57、#58、#69、および#75）があった。これらの4株をそれぞれY4068、Y4069、Y4070、およびY4071と称する。さらなる分析は、pZKSL-555Rの3個のキメラ遺伝子が、Y4068、Y4069、Y4070、およびY4071株のLys5部位に組み込まれなかつたことを示した。全ての株はLys+フェノタイプを有した。

【0194】

野生型ヤロウイア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) ATCC #20362に関してY4070株の最終遺伝子型は、Ura3-、Leu+、Lys+、GPD::F.D12::Pex20、YAT::F.D12::OCT、YAT::ME3S::Pex16、GPAT::EgD9e::Lip2、Exp::EgD9eS::Lip1、FBAINm::EgD9eS::Lip2、FBAINm::EgD8M::Pex20、EXP::EgD8M::Pex16、FBAIN::EgD5WT::Acc、EXP::EgD5S::Pex20、YAT::RD5S::OCTであった。

10

【0195】

実施例8

ヤロウイア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) Y4070株におけるコドン最適化 17デサチュラーゼ遺伝子（「PsD17S」）の発現

20

一般方法に従ってプラスミドpZP3-P7U（図5；実施例6）をAscI/SphIで消化し、次にヤロウイア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) Y4070株を形質転換するのに使用した。形質転換に続いて細胞をMMプレート上に播種し、30℃に2~3日間保った。MMプレート上で生育した12個の形質転換体を拾って新鮮なMMプレート上に再度画線培養した。生育したら、これらの株を30℃の3mL液体MMに個々に接種し、250rpm/分で2日間振盪した。遠心分離によって細胞を収集し、高グルコース培地に再懸濁して、次に30℃で5日間生育させて、250rpm/分で振盪した。遠心分離によって細胞を収集し、脂質を抽出してエステル交換により脂肪酸メチルエステルを調製して、引き続いてヒューレットパッカード (Hewlett-Packard) 6890GCで分析した。

30

【0196】

GC結果を下の表14に示す。脂肪酸は、16:0、16:1、18:0、18:1（オレイン酸）、LA（18:2）、ALA、EDA（20:2）、DGLA、ARA、ETrA（20:3）、ETA、およびEPAと同定され、それぞれの組成は総脂肪酸の%として表される。「17活性」は以下の式に従って計算され、EPAへの%基質変換を表す。 $([EPA]/[ARA+EPA]) \times 100$ 。「15活性」は以下の式に従って計算され、ALAへの%基質変換を表す。 $([ALA]/[LA+ALA]) \times 100$ 。

【0197】

【表16】

表14
ヤロウイア・リポリテイカ Y4070 株中の PsD17S の機能解析

| Y4070 中の pZP3-P7U 形質転換体 | | 16:0 | 16:1 | 18:0 | 18:1 | LA | ALA | EDA | DGLA | ARA | ETrA | ETA | EPA | Δ17 活性 % | Δ15 活性 % |
|-------------------------------|------------|------------|------------|-------------|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|-----------|----------------|----------------|
| 1 | 5.0 | 1.7 | 5.0 | 25.1 | 26.8 | 4.8 | 5.7 | 0.4 | 0.0 | 3.9 | 1.1 | 11.6 | 100 | 15 | |
| 2 | 5.2 | 1.9 | 5.3 | 25.1 | 28.1 | 5.1 | 5.5 | 0.3 | 0.0 | 3.9 | 1.2 | 11.7 | 100 | 15 | |
| 3 | 4.8 | 2.0 | 6.7 | 24.4 | 29.6 | 3.5 | 6.2 | 0.5 | 0.5 | 2.5 | 0.9 | 11.8 | 96 | 10 | |
| 4 | 5.0 | 2.2 | 5.6 | 24.5 | 28.4 | 5.4 | 5.2 | 0.3 | 0.0 | 3.6 | 1.1 | 11.3 | 100 | 16 | |
| 5 | 5.1 | 2.3 | 5.4 | 23.3 | 29.2 | 5.5 | 5.1 | 0.4 | 0.2 | 3.5 | 1.1 | 11.3 | 98 | 16 | |
| 6 | 5.8 | 2.1 | 5.8 | 21.1 | 31.0 | 4.1 | 5.8 | 0.5 | 0.6 | 3.1 | 1.0 | 11.5 | 95 | 12 | |
| 7 | 4.9 | 2.3 | 5.5 | 23.7 | 29.1 | 5.4 | 5.3 | 0.4 | 0.0 | 3.6 | 1.2 | 11.4 | 100 | 16 | |
| 8 | 4.9 | 2.1 | 5.6 | 25.0 | 28.2 | 5.3 | 5.2 | 0.3 | 0.0 | 3.6 | 1.1 | 11.3 | 100 | 16 | |
| 9 | 4.9 | 2.0 | 5.7 | 27.0 | 26.9 | 4.9 | 5.6 | 0.3 | 0.0 | 3.9 | 1.1 | 11.3 | 100 | 15 | |
| 10 | 4.6 | 2.1 | 5.8 | 23.8 | 29.1 | 5.0 | 5.6 | 0.4 | 0.5 | 3.4 | 1.2 | 11.5 | 96 | 15 | |
| 11 | 4.9 | 1.9 | 5.6 | 21.5 | 31.8 | 4.2 | 5.6 | 0.6 | 1.8 | 2.7 | 1.0 | 11.6 | 87 | 12 | |
| 12 | 5.0 | 2.7 | 4.8 | 21.1 | 31.1 | 6.4 | 4.8 | 0.4 | 0.0 | 3.7 | 1.4 | 11.5 | 100 | 17 | |
| 平均 | 5.0 | 2.1 | 5.6 | 23.8 | 29.1 | 5.0 | 5.5 | 0.4 | 0.3 | 3.5 | 1.1 | 11.5 | 98 | 15 | |
| STD | 0.3 | 0.3 | 0.5 | 1.8 | 1.6 | 0.8 | 0.4 | 0.1 | 0.5 | 0.5 | 0.1 | 0.2 | | | |

【0 1 9 8】

G C 結果は、12個の形質転換体中で平均で総脂質の0.3%のARAおよび11.5%のEPAが生成されたことを実証した。これらの12株中でP s D 1 7 SがARAをEPAに変換する変換効率は、平均率で約98%であった。変換効率は次の式に従って測定された。（[生成物] / [基質 + 生成物]）× 100。式中、「生成物」には、直接生成物およびそれに由来する経路中の全生成物が含まれる。したがってこの実験データは、P.ソジヤ(s o j a e)由来のコドン最適化 17デサチュラーゼ遺伝子（配列番号3）が、ARAをEPAに効率的に不飽和化したことを実証する。

【0199】

平均で総脂質の5%のALAおよび29.1%のLAもまた、12個の形質転換体中で生成された。これらの12株中でP s D 1 7 SがLAをALAに変換する変換効率は、平均率で約15%であった。さらに全12株中でE tr AおよびETAも生成され、P s D 1 7 がEDAをE tr Aに、DGLAをETAに変換できるかもしれないことが示唆された。しかしY 4 0 7 0 株中の 9 エロンガーゼはALAをE tr Aに、8デサチュラーゼはE tr AをETAに変換し得るので、これらの2つの場合の変換効率を計算することは困難である。

10

【0200】

P s D 1 7 が 17 および 15 デサチュラーゼ活性の双方を有したことは明らかであり、したがってここで定義される二機能性デサチュラーゼとして機能する。

【0201】

実施例9

20

17デサチュラーゼをコードするフィトフトラ・ラモルム(*Phytophthora ramorum*)遺伝子の同定

カリフォルニア州ウォールナットクリークの米国エネルギー省共同ゲノム研究所(U.S. Department of Energy's Joint Genome Institute (JGI) (Walnut Creek, CA))はフィトフトラ・ラモルム(*Phytophthora ramorum*)ゲノム(推定ゲノムサイズ65Mb p)のバージョン1.0を作り出した。このゲノム配列は、全ゲノムショットガンストラテジーを使用して生成され、全部で16,066個の遺伝子モデルを含んでなる。

【0202】

実施例1で述べられるのと類似した様式で、P i D 1 7 (配列番号9)のアミノ酸配列をクエリー配列として使用し、JGIのフィトフトラ・ラモルム(*Phytophthora ramorum*)データベースに対してTBLASTN検索を実施した(JGIから入手できるデフォルトパラメーターを使用)。

30

【0203】

2個のORFが、フィトフトラ・ラモルム(*Phytophthora ramorum*)のゲノム配列中のP i D 1 7 と高度な相同意を有することが分かった。具体的にはORF 8 0 2 2 2 は、期待値0で配列番号9と89%の同一性および94%の類似性を有する。同様にORF 4 8 7 9 0 は、期待値6E-44で配列番号9と40%までの同一性および61%の類似性(similarity)を有する。これらの結果に基づいて、ORF 8 0 2 2 2 を 17デサチュラーゼと仮に同定し、「P r D 1 7」と称した。

40

【0204】

P r D 1 7 (配列番号5)の1086bpのDNA配列をデータベースから検索すると、それは長さが361個のアミノ酸のポリペプチド(配列番号6)をコードすることが分かった。クラスタル(Clustal)W分析(DNA STARソフトウェアからのメガライン(Megaalign)(商標)プログラム)を使用したアミノ酸のアラインメントは、P i D 1 7 と P r D 1 7 の間に89.5%の同一性があったことを示し、対照的に又クレオチド配列は85.7%の同一性のみを有した。

【0205】

次にP r D 1 7 (配列番号6)をクエリー配列として使用してタンパク質-タンパク質BLAST検索を行うことで、「nr」データベース(一般方法参照)中に含まれる全て

50

の公的に入手可能なタンパク質配列に対する PrD17 の配列相同性もまた判定した。最高度の類似性を示した配列はサプロレグニア・ディクリナ (Saprolegnia dicalina) の -3 脂肪酸デサチュラーゼ (ジェンバンク登録番号 AAR20444) であり、期待値 E - 124 で 59% の同一性および 74% の類似性を有した。さらに PrD17 はアナベナ・バリアビリス (Anabaena variabilis) ATCC #29413 の脂肪酸デサチュラーゼのアミノ酸配列 (ジェンバンク登録番号ABA23809) と、期待値 6E - 61 で 38% の同一性および 57% の類似性を有した。

【0206】

実施例 10

ヤロウイア・リポリティカ (Yarrowia lipolytica) のためにコドン最適化された 17 デサチュラーゼ遺伝子 (「PrD17S」) の合成

実施例 2 で述べられたのと類似の様式で、ヤロウイア・リポリティカ (Yarrowia lipolytica) 中での発現のために、フィトフトラ・ラモルム (Phytophthora ramorum) の 17 デサチュラーゼ遺伝子のコドン使用頻度を最適化した。具体的には、ヤロウイア (Yarrowia) のコドン使用頻度パターン (国際公開第 2004 / 101753 号パンフレット)、「ATG」翻訳開始コドン周辺の共通配列、および RNA の安定法則 (グハニヨギ (Guhaniyogi), G. および J. ブルーアー (Brewer)、Gene 265 (1~2) : 11~23 頁 (2001 年)) に従って、PrD17 のコード配列 (配列番号 5 および 6) に基づいて、コドン最適化 17 デサチュラーゼ遺伝子 (「PrD17S」と称する、配列番号 7) をデザインした。翻訳開始部位の修正に加えて、1086 bp のコード領域の 168 bp (15.5%) を修正し、160 個のコドン (44.2%) を最適化した。GC 含量は、野性型遺伝子 (すなわち PrD17) 内の 64.4% から、合成遺伝子 (すなわち PrD17S) 内の 54.5% に低下した。NcoI 部位および NotI 部位を PrD17S (配列番号 7) の翻訳開始コドン周辺、および停止コドン後にそれぞれ組み込んだ。図 8 は、PrD17 および PrD17S のヌクレオチド配列の比較を示す。コドン最適化遺伝子内の変更は、いずれもタンパク質 (配列番号 6) をコードするアミノ酸配列を変化させなかった。デザインされた PrD17S 遺伝子はニュージャージー州ピスカタウェイのジェンスクリプト・コーポレーション (GenScript Corporation (Piscataway, NJ)) によって合成され、pUC57 (ジェンバンク登録番号 Y14837) 中にクローンされて、pPrD17S (図 9A; 配列番号 38) を生じた。

【0207】

実施例 11

コンストラクト pZuFPPrD17S の発生

本実施例は、キメラの FBAIN :: PrD17S :: Pex20 遺伝子を含んでなるプラスミド pZuFPPrD17S (図 9B) の構築について述べる。プラスミド pZuFPrD17S を利用して、下記の実施例 12 で述べられるように PrD17S の機能性発現を試験した。

【0208】

具体的には、プラスミド pPrD17S の PrD17S コード領域を含有する NcoI / NotI 断片を使用して、pZuF17 (図 9C; 配列番号 39) の NcoI / NotI 断片を置き換え、プラスミド pZuFPPrD17S を構築した。したがって pZuFPPrD17S の構成要素は、下の表 15 で述べられるようである。

【0209】

10

20

30

40

【表17】

表15
プラスミド pZuFPrD17S(配列番号40)の説明

| | |
|--------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 配列番号40中のRE部位およびヌクレオチド | 断片およびキメラ遺伝子構成要素の説明 |
| EcoRI/Clal 4203～5599 | ヤロウィア自律複製配列(ARS18; ジェンバンク登録番号A17608) |
| EcoRI/BsiWI 7152～1407 | 次を含んでなるFBAIN::PrD17S::Pex20 FBAIN: ヤロウィア・リポリティカ FBAINm プロモーター (国際公開第2005/049805号パンフレット) PrD17S: P.ラモルム由来のコドン最適化△17デサチュラーゼ 遺伝子(配列番号7) Pex20: ヤロウィア Pex20 遺伝子(ジェンバンク登録番号AF054613)のPex20ターミネーター配列 |
| 2443～1563 | ColE1 プラスミド複製起点 |
| 3373～2513 | アンピシリン-抵抗性遺伝子(Amp ^R) |
| EcoRI/PacI 7130～5619 | ヤロウィア Ura3 遺伝子(ジェンバンク登録番号 AJ306421) |

10

20

30

40

【0210】

実施例12

ヤロウィア・リポリティカ(Yarrowia lipolytica)Y4070株におけるコドン最適化△17デサチュラーゼ遺伝子PrD17Sの発現

一般方法で述べられるようにして、プラスミドpZuFPrD17S(図9B; 実施例11)をヤロウィア・リポリティカ(Yarrowia lipolytica)Y4070株(実施例8)に形質転換した。形質転換細胞をMM選択培地プレート上に播種し、2～3日間30℃に保った。MMプレート上に生育した10個の形質転換体を拾って、新鮮なMMプレート上に再度画線培養した。生育したらこれらの株を30℃の3mlの液体MM中に個別に接種して、250rpm/分で2日間振盪した。細胞を遠心分離によって収集し、高グルコース培地に再懸濁し、次に30℃で5日間生育させて250rpm/分で振盪した。遠心分離によって細胞を収集し、脂質を抽出してエステル交換により脂肪酸メチルエステルを調製して、引き続いてヒューレットパッカード(Hewlett-Packard)6890GCで分析した。

【0211】

GC結果を下の表16に示す。脂肪酸は16:0、16:1、18:0、18:1(オレイン酸)、LA(18:2)、ALA、EDA(20:2)、DGLA、ARA、ETA(20:3)、ETA、およびEPAと同定されて、それぞれの組成は総脂肪酸の%として表される。「17活性」は以下の式に従って計算され、EPAへの%基質変換を表す。 $([EPA]/[ARA+EPA]) \times 100$ 。「15活性」は以下の式に従って計算され、ALAへの%基質変換を表す。 $([ALA]/[LA+ALA]) \times 100$ 。

【0212】

【表18】

表16
ヤロウイア・リボリティカY4070株中のPrD17Sの機能解析

| Y4070 中の pZUFPtD17S 形質転換体 | 16:0 | 16:1 | 18:0 | 18:1 | LA | ALA | DGLA | ARA | ETrA | ETA | EPA | Δ17 活性 % | Δ15 活性 % |
|---------------------------------|------------|------------|------------|-------------|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|----------------|----------------|
| 1 | 6.2 | 2.3 | 5.3 | 15.3 | 38.3 | 0.5 | 7.5 | 2.4 | 7.3 | 0.6 | 0.4 | 7.6 | 51 |
| 2 | 6.5 | 2.3 | 5.0 | 14.0 | 40.2 | 0.5 | 7.2 | 2.5 | 7.6 | 0.5 | 0.4 | 7.7 | 50 |
| 3 | 5.7 | 2.1 | 5.5 | 15.3 | 38.7 | 0.5 | 7.8 | 2.5 | 7.5 | 0.5 | 0.5 | 7.4 | 50 |
| 4 | 7.8 | 2.8 | 3.8 | 13.8 | 40.0 | 0.3 | 7.4 | 2.0 | 7.7 | 0.4 | 0.0 | 6.3 | 45 |
| 5 | 5.5 | 2.0 | 5.6 | 15.7 | 38.0 | 0.5 | 8.0 | 2.5 | 7.1 | 0.5 | 0.5 | 7.3 | 51 |
| 6 | 7.7 | 3.0 | 4.1 | 13.2 | 41.0 | 0.3 | 6.7 | 1.8 | 7.7 | 0.4 | 0.0 | 7.2 | 48 |
| 7 | 6.1 | 1.7 | 4.8 | 15.3 | 38.5 | 0.4 | 7.7 | 2.4 | 7.7 | 0.5 | 0.4 | 7.3 | 49 |
| 8 | 6.9 | 2.2 | 4.6 | 15.5 | 39.7 | 0.5 | 7.2 | 2.4 | 7.1 | 0.5 | 0.4 | 7.2 | 50 |
| 9 | 7.4 | 2.7 | 4.1 | 14.4 | 41.0 | 0.3 | 7.2 | 2.3 | 7.5 | 0.4 | 0.0 | 6.9 | 48 |
| 10 | 7.1 | 2.6 | 4.4 | 13.7 | 40.6 | 0.5 | 6.7 | 2.5 | 7.7 | 0.5 | 0.4 | 7.3 | 48 |
| 平均 | 6.7 | 2.4 | 4.7 | 13.4 | 39.6 | 0.4 | 7.3 | 2.3 | 7.5 | 0.5 | 0.3 | 7.2 | 49 |
| STD | 0.8 | 0.4 | 0.6 | 4.3 | 1.1 | 0.1 | 0.4 | 0.2 | 0.2 | 0.1 | 0.2 | 0.4 | |

【0 2 1 3】

表16は、10個の形質転換体中で平均で総脂質の7.5%のARAおよび7.2%のEPAが生成されたことを示した。これらの10株中でPrD17SがARAをEPAに変換する変換効率は、平均率で約49%であった。変換効率は実施例8で述べられるようにして測定された。したがってこの実験的データは、P.ラモルム(*ramorum*)由来のコドン最適化17デサチュラーゼ遺伝子(配列番号5)が、ARAをEPAに効率的に不飽和化することを実証した。

【0214】

10個の形質転換体中で、平均で総脂質の0.4%のALAおよび39.6%のLA(C18:2)が生成された。これらの10株中でPrD17SがLAをALAに変換する変換効率は、平均率で約1%のみであった。

10

【0215】

したがってPrD17Sは、ここでARAからEPAへの変換を触媒する単機能性17デサチュラーゼとして同定される。

1

【図面の簡単な説明】

【0216】

【図1】-3/-6脂肪酸合成経路を図示する。

【図2A】フィトフトラ・ソジャ(*Phytophthora sojae*)17デサチュラーゼ遺伝子('PsD17' と称される; 配列番号1)と、Y.リポリティカ(*lipolytica*)中の発現のためにコドン最適化された合成遺伝子('PsD17S' と称される; 配列番号3)とのDNA配列の比較を示す。

20

【図2B】フィトフトラ・ソジャ(*Phytophthora sojae*)17デサチュラーゼ遺伝子('PsD17' と称される; 配列番号1)と、Y.リポリティカ(*lipolytica*)中の発現のためにコドン最適化された合成遺伝子('PsD17S' と称される; 配列番号3)とのDNA配列の比較を示す。

20

【図2C】フィトフトラ・ソジャ(*Phytophthora sojae*)17デサチュラーゼ遺伝子('PsD17' と称される; 配列番号1)と、Y.リポリティカ(*lipolytica*)中の発現のためにコドン最適化された合成遺伝子('PsD17S' と称される; 配列番号3)とのDNA配列の比較を示す。

20

【図3A】pPsD17Sのプラスミドマップを提供する。

30

【図3B】pKUNF1-KEAのプラスミドマップを提供する。

30

【図3C】pDMW214のプラスミドマップを提供する。

【図3D】pFmPs17Sのプラスミドマップを提供する。

【図4A】総脂質画分中に11%のARAを生成するヤロウイア・リポリティカ(*Yarrowia lipolytica*)Y2047株の開発を図示する。

30

【図4B】pKUNF12T6Eのプラスミドマップを提供する。

【図4C】pDMW271のプラスミドマップを提供する。

【図5】pZP3-P7Uのプラスミドマップを提供する。

【図6A】総脂質画分中に12%のARAを生成するヤロウイア・リポリティカ(*Yarrowia lipolytica*)Y4070株の開発を図示する。

40

【図6B】pZKLeuN-29E3のプラスミドマップを提供する。

【図6C】pY116のプラスミドマップを提供する。

【図7】(A)pKO2UF8289および(B)pZKSL-555Rのプラスミドマップを提供する。

40

【図8A】フィトフトラ・ラモルム(*Phytophthora ramorum*)17デサチュラーゼ遺伝子('PrD17' と称される; 配列番号5)と、Y.リポリティカ(*lipolytica*)中の発現のためにコドン最適化された合成遺伝子('PrD17S' と称される; 配列番号7)とのDNAアラインメントを示す。

40

【図8B】フィトフトラ・ラモルム(*Phytophthora ramorum*)17デサチュラーゼ遺伝子('PrD17' と称される; 配列番号5)と、Y.リポリティカ(*lipolytica*)中の発現のためにコドン最適化された合成遺伝子('Pr

50

D 17S」と称される；配列番号7)とのDNAアライメントを示す。

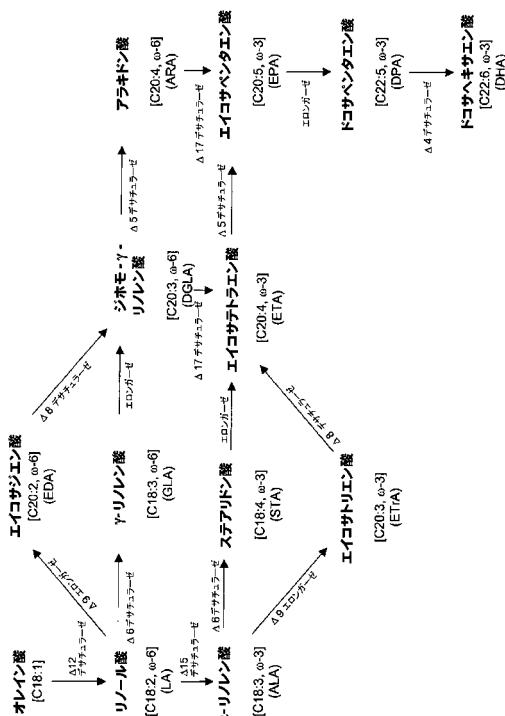
【図 8 C】フィトフトラ・ラモルム (*Phytophthora ramorum*) 17デサチュラーゼ遺伝子（「PrD17」と称される；配列番号5）と、Y.リポリティカ (*lipolytica*) 中での発現のためにコドン最適化された合成遺伝子（「PrD17S」と称される；配列番号7）とのDNAアラインメントを示す。

【図 9 A】 pPrD17S のプラスミドマップを提供する。

【図 9B】 pZUFPrD17S のプラスミドマップを提供する。

【図 9C】 pZUF17 のプラスミドマップを提供する。

【 义 1 】



【図2A】

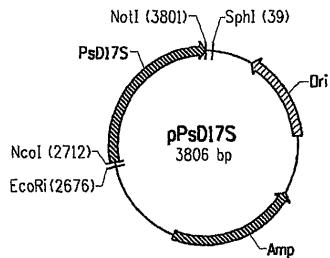
【 図 2 B 】

| | | | |
|------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|----------------------|
| 42.1 | ATTCCTTACCCGCAAGGGCAGAACCCCTCTCGUGTACCTCATCCGGG ATTCCTTACCCGCAAGGGCAGAACCCCTCTCGUGTACCTCATCCGGG | 4810 | (配列番号:1) (配列番号:3) |
| 48.1 | CTGGGGCCCGCGCGTGCTACCGCGTCCGCGAGGTCAACAC TTGGGGCAAGCCCTGTTGGCTACCTGGTGAAGGTTCCTGCCGAAAGTCACCC TTCAACCCCTTCAGACGCTCTTCAGCTGAGGTTCTGGCTGGTCTTCGCTGGCT | 540 | (配列番号:1) (配列番号:3) |
| 54.1 | TTCACCGGTTCAGCGCTTGCGCGCTACCTGGTCACTGGCTGGTATCTGGTGGC TTCAACCCCTTCAGACGCTCTTCAGCTGAGGTTCTGGCTGGTCTTCGCTGGCT | 600 | (配列番号:1) (配列番号:3) |
| 60.1 | GCGGACTTCGGCTGGCGCTGTCATGAGCTGGCTGAGTTGGCTTCAGAGCT GCGGACTTCGGCTGGCGCTGTCATGAGCTGGCTGAGTTGGCTTCAGAGCT | 660 | (配列番号:1) (配列番号:3) |
| 66.1 | ATGCCCTATCTACTACTATGCTGGGGCGCTGTTGGGAGTGGTCAACCC ATGCCCTATCTACTACTATGCTGGGGCGCTGTTGGGAGTGGTCAACCC | 720 | (配列番号:1) (配列番号:3) |
| 72.1 | TTCGCTGACCAACAGCAGAAGCCCGTGTACCGGACTCGGAGTGCCTAC TTTCCTCATACAGCAGAAGCAGACCTGTTGGCTGATGAGCTGAGCTAC | 780 | (配列番号:1) (配列番号:3) |
| 78.1 | ATAGGGCAACTGTCGTTGGTGACGACGCTTACGGCGCTTACGACACCTGACCCAC ATAGGGCAACTGTCGTTGGTGACGACGCTTACGACACCTGACCCAC | 840 | (配列番号:1) (配列番号:3) |

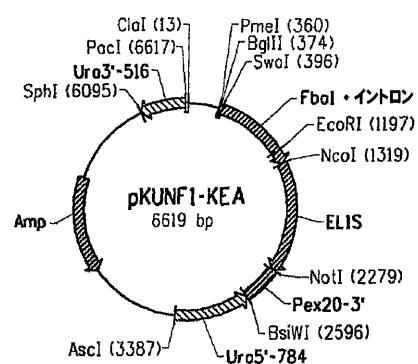
【 図 2 C 】

| | | |
|------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|
| 900 | AACATCGGACGCCGCCRATCCACACCTCTTCCCCATATCCGGACTATATGGCTCAG AACATCGGACGCCGCCRATCCACACCTCTTCCCCATATCCGGACTATACGCTACAGCAG | (配列番号 1) (配列番号 3) |
| 960 | CGCCCAACCGAGGCCTTCACCGGGCTTCCCGAGGTCTGGCTGCAAGAGCAGACGCC CGAGCTTCAGGGCTTCATCAAGCTTCCGGGTCTGAGGTGTTGAGGTGCGAACCC | (配列番号 1) (配列番号 3) |
| 1020 | ATCATCAAGGGCTTTCATCAAGTGCGACTCTACCAAACACTACGCTGGCGACTCG ATCATCAAGGGCTTTCATCAAGTGCGACTCTACCAAACACTACGCTGGCGACTCG | (配列番号 1) (配列番号 3) |
| 1080 | GACGCCAAGGCTTCATCAAGGGCCAAAGGCCGCTCCAGGGGCAAGCTTCCGACGACT GATGCCAAGGCTTCATCAAGGGCCAAAGGCCGCTCCAGGGGCAAGCTTCCGACGACT | (配列番号 1) (配列番号 3) |
| 1081 | AAGGCCAAACTAA AAGGCCAAACTAA | (配列番号 1) (配列番号 3) |

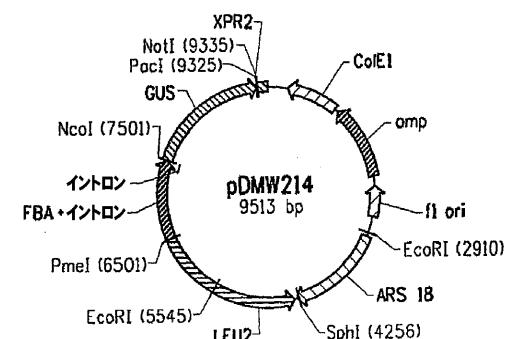
【 図 3 A 】



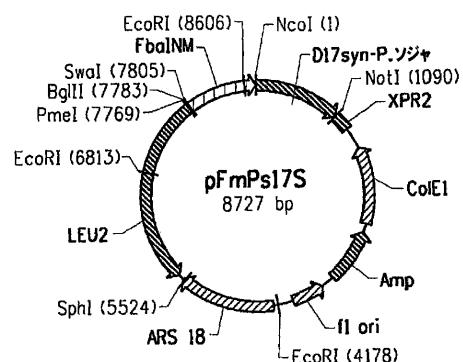
【図3B】



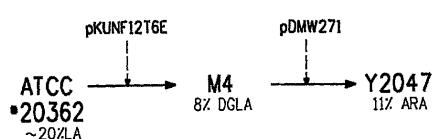
【図3C】



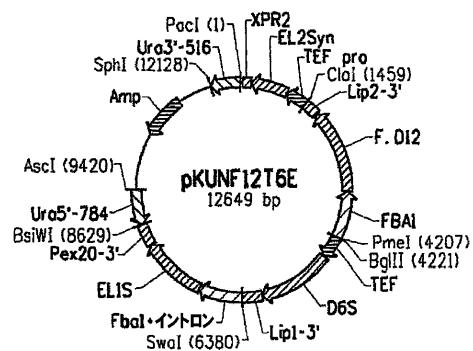
【 図 3 D 】



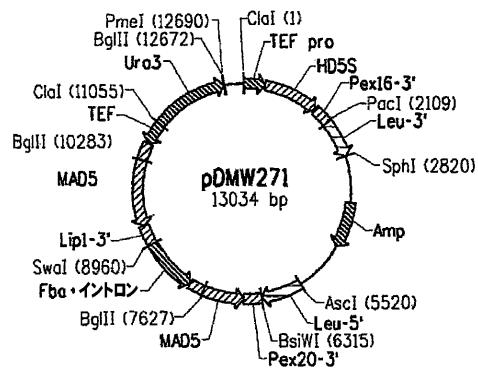
【図 4 A】



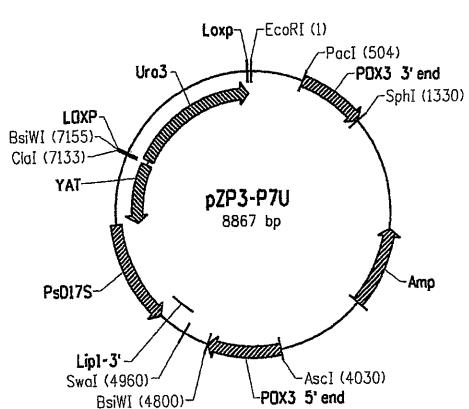
【図 4 B】



【図 4 C】



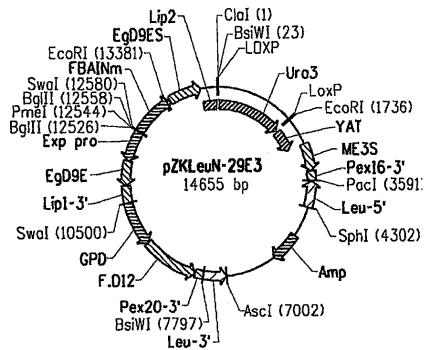
【図 5】



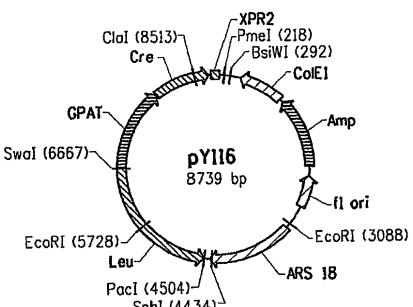
【図 6 A】



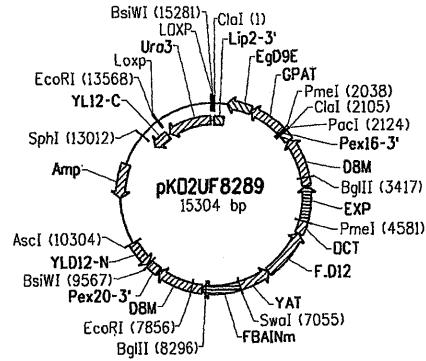
【 図 6 B 】



【 図 6 C 】



【 図 7 】



A

〔 8 A 〕

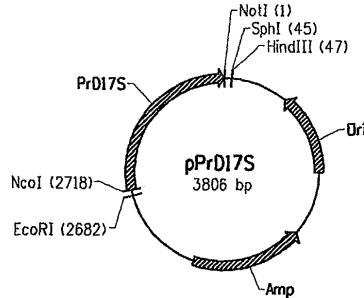
8A

【 8 B 】

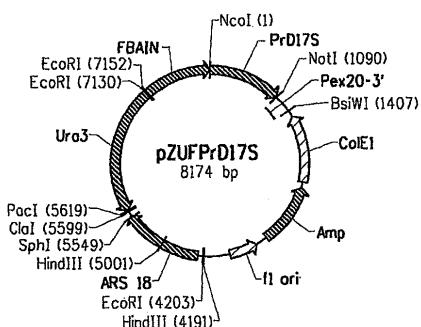
(8 C)

| | | | |
|------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|-----------|
| 841 | GGACGACAGATTGCCACCCCTTCCTCCATCATCCGACTACAGCTAACCGGT GGGACACACAGGTTTCAACATCCTACATCAGCTTCCATCATCCTACATCAGCTAACCGGT | 900 | (配列番号: 5) |
| 901 | GGGGCGGCGATTCACGGGCTTCCCGACTCTGGCGAAGCGCGGCGGATTC ACCCGCGCTTCAACAGGCTTTCGGACTCTGGCGAAGCGCGGCGGATTC | 960 | (配列番号: 5) |
| 961 | AAGCCTTCGCGCACATTACGCCAATTAACGGCAACTTACCGAATCTGGCGTGGCGCGGAGCG AAGCCTTCGCGCACATTACGCCAATTAACGGCAACTTACCGAATCTGGCGTGGCGCGGAGCG | 1020 | (配列番号: 5) |
| 1021 | AACTCTTACGCTTACGGAGCCAAAGGGCGGCTCCAGGCGGCAACAGACCAAGGCC AACTCTTACGCTTACGGAGCCAAAGGGCGGCTCCAGGCGGCAACAGACCAAGGCC | 1080 | (配列番号: 5) |
| 1081 | ACTAA | | (配列番号: 5) |

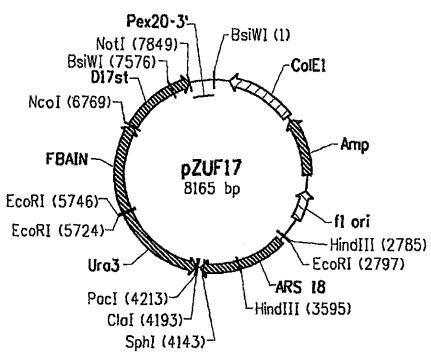
【 9 A 】



【図9B】



【図 9 C】



【配列表】

2009534032000001.app

【国際調査報告】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | | | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|------------------------------|-------------------|
| <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 2px;">International application No</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">PCT/US2007/009572</td> </tr> </table> | | | International application No | PCT/US2007/009572 |
| International application No | | | | |
| PCT/US2007/009572 | | | | |
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N9/02 | | | | |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | | | |
| B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N | | | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | | | | |
| Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS, CHEM ABS Data, Sequence Search. | | | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. | | |
| X | WO 2005/083093 A (BASF PLANT SCIENCE GMBH [DE]; CIRPUS PETRA [DE]; BAUER JOERG [DE]; QIU) 9 September 2005 (2005-09-09) SEQ ID 2claims 1-55 | 1-3,5-17 | | |
| X | WO 2005/083053 A (BASF PLANT SCIENCE GMBH [DE]; CIRPUS PETRA [DE]; BAUER JOERG [DE]; ZAN) 9 September 2005 (2005-09-09) SEQ ID Nos 1 and 2, claims 1-24 | 1-3,5-17 | | |
| X | WO 2005/012316 A (BASF PLANT SCIENCE GMBH [DE]; ZANK THORSTEN [DE]; BAUER JOERG [DE]; CI) 10 February 2005 (2005-02-10) seq ID 88 figure 1 | 1-3,5-17 -/-/ | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. | | <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex. | | |
| * Special categories of cited documents : | | | | |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance | | | | |
| "E" earlier document but published on or after the International filing date | | | | |
| "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | | | | |
| "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means | | | | |
| "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | | | | |
| Date of the actual completion of the International search 27 February 2008 | | Date of mailing of the International search report 07/03/2008 | | |
| Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 661 epo nl Fax: (+31-70) 340-3016 | | Authorized officer Vollbach, Silke | | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2007/009572

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| P,X | DE 10 2005 013779 A1 (BASF PLANT SCIENCE GMBH [DE]) 28 September 2006 (2006-09-28) SEQ ID Nos 1,2,3,4 figure 1 | 1-3,5-17 |
| P,X | WO 2006/052870 A (DU PONT [US]; DAMUDE HOWARD G [US]; GILLIES PETER JOHN [US]; MACOOL DA) 18 May 2006 (2006-05-18) claims 1-53; table 1 | 1-3,5-17 |
| X | JURETZEK T ET AL: "VECTORS FOR GENE EXPRESSION AND AMPLIFICATION IN THE YEAST XARROWIA LIPOLYTICA" YEAST, CHICHESTER, SUSSEX, GB, vol. 18, no. 2, 30 January 2001 (2001-01-30), pages 97-113, XP008025954 ISSN: 0749-503X the whole document | 1-3,5-17 |
| P,X | WO 2006/100241 A (BASF PLANT SCIENCE GMBH [DE]; CIRPUS PETRA [DE]; BAUER JOERG [DE]) 28 September 2006 (2006-09-28). see SEQ ID No. 24 | 1,4-9, 11-17 |
| X | WO 2004/101757 A (DU PONT [US]; PICATAGGIO STEPHEN K [US]; YADAV NARENDRA S [US]; ZHU QU) 25 November 2004 (2004-11-25) page 11; claims 1-32 page 30 - page 31 page 27 - page 31 | 1-17 |
| A | PEREIRA S L ET AL: "A novel omega3-fatty acid desaturase involved in the biosynthesis of eicosapentaenoic acid" BIOCHEMICAL JOURNAL, THE BIOCHEMICAL SOCIETY, LONDON, GB, vol. 378, no. 2, 2004, pages 665-671, XP002334258 ISSN: 0264-6021 the whole document | 1-17 |
| A | SAYANOVA ET AL: "Eicosapentaenoic acid: biosynthetic routes and the potential for synthesis in transgenic plants" PHYTOCHEMISTRY, vol. 65, October 2004 (2004-10), pages 147-158, XP018002556 the whole document | 1-17 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2007/009572

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out; specifically:

3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2007/009572

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1,5-9,11-17 partially, 2,3,10 completely

SEQ ID Nos. 1-4 corresponding to Phytophthora sojae delta 17 desaturases

2. claims: 1,5-9,11-17 partially, 4, completely

SEQ ID Nos. 5-7 corresponding to Phytophthora ramorum delta 17 deaturases

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

| |
|------------------------------|
| International application No |
| PCT/US2007/009572 |

| Patent document cited in search report | Publication date | | Patent family member(s) | Publication date |
|----------------------------------------|------------------|----------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| WO 2005083093 | A 09-09-2005 | AU CA | 2005217079 A1 2559360 A1 | 09-09-2005 09-09-2005 |
| WO 2005083053 | A 09-09-2005 | AU CA EP US | 2005217080 A1 2558726 A1 1720988 A2 2007224661 A1 | 09-09-2005 09-09-2005 15-11-2006 27-09-2007 |
| WO 2005012316 | A 10-02-2005 | BR CA EP JP | PI0413073 A 2533613 A1 1654344 A2 2007500504 T | 03-10-2006 10-02-2005 10-05-2006 18-01-2007 |
| DE 102005013779 A1 | 28-09-2006 | AU CA EP WO | 2006226338 A1 2600286 A1 1866417 A2 2006100241 A2 | 28-09-2006 28-09-2006 19-12-2007 28-09-2006 |
| WO 2006052870 | A 18-05-2006 | CA CA CA CN EP EP EP KR KR KR WO WO | 2584719 A1 2585178 A1 2585235 A1 101111601 A 1807526 A2 1809756 A2 1807527 A2 20070085649 A 20070085665 A 20070085669 A 2006052871 A2 2006055322 A2 | 18-05-2006 26-05-2006 18-05-2006 23-01-2008 18-07-2007 25-07-2007 18-07-2007 27-08-2007 27-08-2007 27-08-2007 18-05-2006 26-05-2006 |
| WO 2006100241 | A 28-09-2006 | AU CA DE EP | 2006226338 A1 2600286 A1 102005013779 A1 1866417 A2 | 28-09-2006 28-09-2006 28-09-2006 19-12-2007 |
| WO 2004101757 | A 25-11-2004 | BR CA CN CN CN EP JP KR | PI0410688 A 2526935 A1 1816559 A 1816630 A 1852986 A 1620543 A2 2007504839 T 20060018832 A | 20-06-2006 25-11-2004 09-08-2006 09-08-2006 25-10-2006 01-02-2006 08-03-2007 02-03-2006 |

フロントページの続き

(51) Int.Cl. F I テーマコード(参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01) C 1 2 N 5/00 A

(81) 指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MT,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72) 発明者 ジシオン・シュー

アメリカ合衆国ペンシルベニア州 19317 - 9728 . チャッズフォード . ハーヴィーレーン 1
11

(72) 発明者 クイン・クン・ズュー

アメリカ合衆国ペンシルベニア州 19382 . ウエストチェスター . リヴィアロード 544

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA03 AA05 BA80 CA01 DA11 DA12 GA11 HA01
4B064 AD88 AD89 AD90 CA06 CA19 CB14 CC24 CD07 DA01 DA10
4B065 AA57Y AA72X AB01 AC14 BA01 BB10 CA13 CA41 CA44