

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6726619号
(P6726619)

(45) 発行日 令和2年7月22日 (2020.7.22)

(24) 登録日 令和2年7月1日 (2020.7.1)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 1 C	3/00	(2006.01)	C 1 1 C	3/00
C 1 1 B	1/10	(2006.01)	C 1 1 B	1/10
C 1 1 C	1/00	(2006.01)	C 1 1 C	1/00
A O 1 H	5/10	(2018.01)	A O 1 H	5/10
C 1 2 P	7/64	(2006.01)	C 1 2 P	7/64

請求項の数 22 (全 136 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-541363 (P2016-541363)
 (86) (22) 出願日 平成26年12月18日 (2014.12.18)
 (65) 公表番号 特表2017-503053 (P2017-503053A)
 (43) 公表日 平成29年1月26日 (2017.1.26)
 (86) 国際出願番号 PCT/AU2014/050433
 (87) 国際公開番号 WO2015/089587
 (87) 国際公開日 平成27年6月25日 (2015.6.25)
 審査請求日 平成29年12月18日 (2017.12.18)
 (31) 優先権主張番号 2013905033
 (32) 優先日 平成25年12月18日 (2013.12.18)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 オーストラリア (AU)
 (31) 優先権主張番号 2014902471
 (32) 優先日 平成26年6月27日 (2014.6.27)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 オーストラリア (AU)

(73) 特許権者 590003283
 コモンウェルス サイエンティフィック
 アンド インダストリアル リサーチ オ
 ーガナイゼーション
 オーストラリア2601オーストラリアン
 ・キャピタル・テリトリー、アクトン、ク
 ルーニーズ・ロス・ストリート
 (73) 特許権者 514318725
 ヌシード ビーティーワイ リミテッド
 オーストラリア ヴィクトリア 3028
 , ラヴァトン, パイプ ロード 103-
 105

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 長鎖多価不飽和脂肪酸を含む脂質

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

エステル化された形態の脂肪酸を含み、前記脂肪酸は、

オレイン酸、

パルミチン酸、

リノール酸 (L A) を含む 6 脂肪酸、

- リノレン酸 (A L A)、ドコサヘキサエン酸 (D H A)、ステアリドン酸 (S D A)
)、エイコサペンタエン酸 (E P A)、ドコサペンタエン酸 (D P A) 及びエイコサテ
 ラエン酸 (E T A) を含む 3 脂肪酸

を含む抽出植物脂質であって、前記抽出脂質の総脂肪酸含有量におけるパルミチン酸のレ
 ベルが、2重量%から16重量%の間であり、前記抽出脂質の総脂肪酸含有量におけるミ
 リスチン酸 (C 1 4 : 0) のレベルが、存在する場合、1重量%未満であり、前記抽出脂
 質の総脂肪酸含有量における D H A のレベルが、20.1重量%から30重量%の間また
 は30重量%から35重量%の間である、抽出植物脂質。

【請求項 2】

以下の特徴：

i) 前記抽出脂質の総脂肪酸含有量におけるパルミチン酸のレベルは、3重量%から1
 0重量%の間であること、

i i) 前記抽出脂質の総脂肪酸含有量におけるミリスチン酸 (C 1 4 : 0) のレベルは
 、約0.1重量%であること、

10

20

i i i) 該抽出脂質の総脂肪酸含有量におけるオレイン酸のレベルは、1重量%から30重量%の間であること、

i v) 該抽出脂質の総脂肪酸含有量におけるリノール酸(LA)のレベルは、4重量%から35重量%の間であること、

v) 該抽出脂質の総脂肪酸含有量における - リノレン酸(ALA)のレベルは、4重量%から40重量%の間であること、

v i) 前記抽出脂質の総脂肪酸含有量における - リノレン酸(GLA)のレベルは、4重量%未満であること、

v i i) 該抽出脂質の総脂肪酸含有量におけるステアリドン酸(SDA)のレベルは、8重量%未満であること、

v i i i) 該抽出脂質の総脂肪酸含有量におけるエイコサテトラエン酸(ETA)のレベルは、4重量%未満であること、

i x) 該抽出脂質の総脂肪酸含有量におけるエイコサトリエン酸(ETrA)のレベルは、4重量%未満であること、

x) 該抽出脂質の総脂肪酸含有量におけるエイコサペンタエン酸(EPA)のレベルは、4重量%から15重量%の間であること、

x i) 前記抽出脂質の総脂肪酸含有量におけるドコサペンタエン酸(DPA)のレベルは、4重量%未満であること、

x i i) 該抽出脂質の総脂肪酸含有量におけるDHAのレベルは、21重量%から30重量%の間であること、

x i i i) 該脂質は、その脂肪酸含有物中に 6 - ドコサペンタエン酸(22:5⁴, 7, 10, 13, 16)を含むこと、

x i v) 該脂質は、その脂肪酸含有物中に0.1重量%未満の 6 - ドコサペンタエン酸(22:5⁴, 7, 10, 13, 16)を含むこと、

x v) 該脂質は、その脂肪酸含有物中に0.1重量%未満の1つ以上または全てのSDA、EPA及びETAを含むこと、

x v i) 該抽出脂質の総脂肪酸含有量における総飽和脂肪酸レベルは、4重量%から25重量%の間であること、

x v i i) 該抽出脂質の総脂肪酸含有量における総一価不飽和脂肪酸レベルは、4重量%から40重量%の間であること、

x v i i i) 該抽出脂質の総脂肪酸含有量における総多価不飽和脂肪酸レベルは、20重量%から75重量%の間であること、

x i x) 該抽出脂質の総脂肪酸含有量における総 6 脂肪酸レベルは、35重量%から50重量%の間であること、

x x) 該抽出脂質の総脂肪酸含有量における新 6 脂肪酸レベルは、10重量%未満であること、

x x i) 該抽出脂質の総脂肪酸含有量における総 3 脂肪酸レベルは、36重量%から65重量%の間であること、

x x i i) 該抽出脂質の総脂肪酸含有量における新 3 脂肪酸レベルは、21重量%から45重量%の間であること、

x x i i i) 該抽出脂質の脂肪酸含有量における総 6 脂肪酸：総 3 脂肪酸の比は、1.0から3.0の間であること、

x x i v) 該抽出脂質の脂肪酸含有量における新 6 脂肪酸：新 3 脂肪酸の比は、0.02から1の間であること、

x x v) 該脂質の脂肪酸組成は、少なくとも60重量%の 12 - デサチュラーゼによるオレイン酸からLAへの転換効率に基づくこと、

x x v i) 該脂質の脂肪酸組成は、少なくとも30重量%の 6 - デサチュラーゼによるALAからSDAへの転換効率に基づくこと、

x x v i i) 該脂質の脂肪酸組成は、少なくとも60重量%の 6 - エロンガーゼによるSDAからETA酸への転換効率に基づくこと、

10

20

30

40

50

xxviii) 該脂質の脂肪酸組成は、少なくとも60重量%の5-デサチュラーゼによるETAからEPAへの転換効率に基づくこと、

xxix) 該脂質の脂肪酸組成は、少なくとも80重量%の5-エロンガーゼによるEPAからDPAへの転換効率に基づくこと、

xxx) 前記脂質の脂肪酸組成は、少なくとも80重量%の4-デサチュラーゼによるDPAからDHAへの転換効率に基づくこと、

xxxi) 前記脂質の脂肪酸組成は、少なくとも10重量%のオレイン酸からDHAへの転換効率に基づくこと、

xxxii) 前記脂質の脂肪酸組成は、少なくとも15重量%のLAからDHAへの転換効率に基づくこと、

xxxiii) 前記脂質の脂肪酸組成は、少なくとも24重量%のALAからDHAへの転換効率に基づくこと、

xxxiv) 該抽出脂質中の総脂肪酸は、1.5重量%未満のC20:1を有すること、

xxxv) 該脂質のトリアシルグリセロール(TAG)含有率は、少なくとも80重量%であること、

xxxvi) 該脂質は、DHAを含むジアシルグリセロール(DAG)を含むこと、

xxxvii) 該脂質は、1重量%未満の遊離(非エステル化)脂肪酸及び/またはリン脂質を含むこと、

xxxviii) TAGの形態でエステル化されたDHAの少なくとも70重量%は、前記TAGのsn-1位またはsn-3位であること、

xxxix) 前記脂質において最も豊富なDHA含有TAG種は、DHA/18:3/18:3(TAG58:12)であること、

xl) 前記脂質において最も豊富なDPA含有TAG種は、DPA/18:3/18:3(TAG56:12)であること、及び

xli) 前記脂質は、トリDHA TAG(TAG66:18)を含むことの1つ以上を有する、請求項1に記載の脂質。

【請求項3】

前記脂質が油料種子から採れるオイルである、請求項1または請求項2に記載の脂質。

【請求項4】

前記脂質が、セイヨウアブラナ(*Brassica napus*)オイルまたはカラシナ(*Brassica juncea*)オイルである、請求項3に記載の脂質。

【請求項5】

前記脂質が、カメリナサティバ(*Camelina sativa*)オイルである、請求項3に記載の脂質。

【請求項6】

i) 脂質を含む植物部分を得る工程であって、前記脂質がエステル化された形態の脂肪酸を含み、前記脂肪酸がオレイン酸、パルミチン酸、リノール酸(LA)及び-リノレン酸(GLA)を含む6脂肪酸、-リノレン酸(ALA)、ステアリドン酸(SDA)、ドコサペンタエン酸(DPA)、ドコサヘキサエン酸(DHA)、エイコサペンタエン酸(EPA)及びエイコサテトラエン酸(ETA)を含む3脂肪酸を含み、前記抽出脂質の総脂肪酸含有量におけるパルミチン酸レベルが2重量%から16重量%の間であり、前記抽出脂質の総脂肪酸含有量におけるミリスチン酸(C14:0)のレベルが、存在する場合、1重量%未満であり、前記植物部分における前記抽出可能脂質の総脂肪酸含有量におけるDHAのレベルが20.1重量%から30重量%の間または30重量%から35重量%の間であり、前記植物部分が、12-デサチュラーゼ、3-デサチュラーゼ及び/又は15-デサチュラーゼ、6-デサチュラーゼ、5-デサチュラーゼ、4-デサチュラーゼ、6-エロンガーゼ、及び5-エロンガーゼをコードする外来性ポリヌクレオチドを含む前記工程、及び

ii) 前記植物部分から脂質を抽出する工程

10

20

30

40

50

を含み、前記抽出脂質の総脂肪酸含有量におけるDHAのレベルが20.1重量%から30重量%の間または30重量%から35重量%の間である、抽出植物脂質の産生方法。

【請求項7】

前記抽出脂質が請求項2～5のいずれか1項で定義された特徴の1つ以上を有する、請求項6に記載の方法。

【請求項8】

前記植物部分が、以下の特徴：

- i) 前記 12 - デサチュラーゼが、少なくとも60重量%の効率で、前記植物部分の1つ以上の細胞内で、オレイン酸をリノール酸に転換すること、
- ii) 前記 3 - デサチュラーゼが、少なくとも65重量%の効率で、前記植物部分の1つ以上の細胞内で、 6 脂肪酸を 3 脂肪酸に転換すること、
- iii) 前記 6 - デサチュラーゼが、少なくとも20重量%の効率で、前記植物部分の1つ以上の細胞内で、ALAをSDAに転換すること、
- iv) 前記 6 - デサチュラーゼが、5重量%未満の効率で、前記植物部分の1つ以上の細胞内で、リノール酸を - リノレン酸に転換すること、
- v) 前記 6 - エロンガーゼが、少なくとも60重量%の効率で、前記植物部分の1つ以上の細胞内で、SDAをETAに転換すること、
- vi) 前記 5 - デサチュラーゼが、少なくとも60重量%の効率で、前記植物部分の1つ以上の細胞内で、ETAをEPAに転換すること、
- vii) 前記 5 - エロンガーゼが、少なくとも80重量%の効率で、前記植物部分の1つ以上の細胞内で、EPAをDPAに転換すること、
- viii) 前記 4 - デサチュラーゼが、少なくとも80重量%の効率で、前記植物部分の1つ以上の細胞内で、DPAをDHAに転換すること、
- ix) 前記植物部分の1つ以上の細胞内で、オレイン酸をDHAに転換する効率が、少なくとも10重量%であること、
- x) 前記植物部分の1つ以上の細胞内で、LAをDHAに転換する効率が、少なくとも15重量%であること、
- xi) 前記植物部分の1つ以上の細胞内で、ALAをDHAに転換する効率が、少なくとも24重量%であること、
- xii) 前記植物部分の1つ以上の細胞は、前記外来性ポリヌクレオチドを含まない対応細胞より、少なくとも25重量%多い 3 脂肪酸を含むこと、
- xiii) 前記 6 - デサチュラーゼは、リノール酸(LA)と比較して - リノレン酸(ALA)を優先的に不飽和化すること、
- xiv) 前記 6 - エロンガーゼは、 9 - エロンガーゼ活性も有すること、
- xv) 前記 12 - デサチュラーゼは、 15 - デサチュラーゼ活性も有すること、
- xvi) 前記 6 - デサチュラーゼは、 8 - デサチュラーゼ活性も有すること、
- xvii) 前記 8 - デサチュラーゼは、 6 - デサチュラーゼ活性も有する、または6 - デサチュラーゼ活性を有しないこと、
- xviii) 前記 15 - デサチュラーゼは、GLAに対する 3 - デサチュラーゼ活性も有すること、
- xix) 前記 3 - デサチュラーゼは、LAに対する 15 - デサチュラーゼ活性も有すること、
- xx) 前記 3 - デサチュラーゼは、LA及び/またはGLAの両方を不飽和化すること、
- xxi) 前記 3 - デサチュラーゼは、LAと比較してGLAを優先的に不飽和化すること、
- xxii) 1つ以上または全ての前記デサチュラーゼは、対応するアシル - PC基質より、アシル - CoA基質に対して高い活性を有すること、
- xxiii) 前記 6 - デサチュラーゼは、脂肪酸基質として、LAより、ALAに対して高い 6 - デサチュラーゼ活性を有すること、

10

20

30

40

50

xxiv) 前記 6 - デサチュラーゼは、脂肪酸基質としての PC の sn - 2 位と結合した ALA に対するより、脂肪酸基質としての ALA - CoA に対して高い 6 - デサチュラーゼ活性を有すること、

xxv) 前記 6 - デサチュラーゼは、LA と比較して、基質としての ALA に対して、少なくとも 2 倍高い 6 - デサチュラーゼ活性を有すること、

xxvi) 前記 6 - デサチュラーゼは、脂肪酸基質としての PC の sn - 2 位と結合した ALA に対するより、脂肪酸基質としての ALA - CoA に対して高い活性を有すること、

xxvii) 前記 6 - デサチュラーゼは、脂肪酸基質としての PC の sn - 2 位に結合した ALA に対するより、脂肪酸基質としての ALA - CoA に対して、少なくとも 5 倍高い 6 - デサチュラーゼ活性を有すること、

xxviii) 前記デサチュラーゼは、フロントエンドデサチュラーゼであること、及び

xxix) 前記 6 - デサチュラーゼは、ETA に対する検出可能な 5 - デサチュラーゼ活性を有しないこと

の 1 つ以上または全てを有する、請求項 6 または請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記外来性ポリヌクレオチドが、前記植物部分の細胞のゲノムに組み込まれた T - DNA 分子内に共有結合しており、前記植物部分の細胞のゲノムに組み込まれたかかる DNA 分子数が、2 もしくは 3 である、請求項 6 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

前記外来性ポリヌクレオチドを含む前記植物部分の総オイル含有率が、前記外来性ポリヌクレオチドを含まない対応する植物部分の総オイル含有率の少なくとも 40 重量%である、請求項 6 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

前記脂質を処理して、総脂肪酸含有率のパーセンテージとして、DHA のレベルを増加させることをさらに含み、前記処理が、1 つ以上の分別蒸留、蒸留またはエステル交換反応を含む、請求項 6 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

油料種子植物またはその部分であって、

a) その種子中の脂質であって、前記脂質がエステル化された形態の脂肪酸を含む前記脂質、及び

b) 酵素の以下のセット；

i) 12 - デサチュラーゼ、 3 - デサチュラーゼ及び / または 15 - デサチュラーゼ、 6 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 4 - デサチュラーゼ、 6 - エロンガーゼ及び 5 - エロンガーゼ、または

ii) 12 - デサチュラーゼ、 3 - デサチュラーゼ及び / または 15 - デサチュラーゼ、 8 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 4 - デサチュラーゼ、 9 - エロンガーゼ及び 5 - エロンガーゼ

の 1 つをコードする外来性ポリヌクレオチドを含み、

各ポリヌクレオチドが前記植物の発育種子中の前記ポリヌクレオチドの発現を誘導可能である 1 つ以上の種子特異的プロモーターと作動可能に結合されており、前記脂肪酸がオレイン酸、パルミチン酸、リノール酸 (LA) 及び__ - リノレン酸 (GLA) を含む 6 脂肪酸、__ - リノレン酸 (ALA)、ステアリドン酸 (SDA)、ドコサペンタエン酸 (DPA)、ドコサヘキサエン酸 (DHA)、エイコサペンタエン酸 (EPA) 及びエイコサテトラエン酸 (ETA) を含む 3 脂肪酸を含み、及び前記種子の脂質の総脂肪酸含有量における DHA のレベルが 20 . 1 重量% から 30 重量% の間、または 30 重量% から 35 重量% の間であり、前記脂質の総脂肪酸含有量におけるパルミチン酸のレベルが 2 重量% から 16 重量% の間であり、前記脂質の総脂肪酸含有量におけるミリスチン酸 (C 1

10

20

30

40

50

4 : 0) のレベルが、存在する場合、1 重量 % 未満である、前記油料種子植物またはその部分。

【請求項 1 3】

以下の特徴：

- i) 請求項 1 2 記載の植物由来であること、
- i i) 請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の脂質を含むこと、または
- i i i) 請求項 6 ~ 1 1 のいずれか 1 項に記載の方法で使用できること

の 1 つ以上を有する植物部分。

【請求項 1 4】

セイヨウアブラナ (*Brassica napus*) もしくはカラシナ (*Brassica juncea*) 植物または植物部分である、請求項 1 2 または請求項 1 3 に記載の植物または植物部分。

10

【請求項 1 5】

カメリナサティバ (*Camelina sativa*) 植物または植物部分である、請求項 1 2 または請求項 1 3 に記載の植物または植物部分。

【請求項 1 6】

種子である、請求項 1 2 ~ 1 5 のいずれか 1 項に記載の植物部分。

【請求項 1 7】

D H A 及び 4 重量 % から 1 5 重量 % の間の水分を含む成熟して収穫されたセイヨウアブラナ (*Brassica napus*)、カラシナ (*B. juncea*) またはカメリナサティバ (*Camelina sativa*) 種子であって、前記種子の D H A 含有量が種子 1 グラム当たり少なくとも 2 8 m g

20

である、前記種子。

【請求項 1 8】

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の抽出植物脂質の製造に使用できる植物の産生方法であって、前記方法が、

a) 複数の植物からの 1 つ以上の植物部分により産生された脂質中の D H A のレベルをアッセイすることであって、各植物が、1 2 - デサチュラーゼ、3 - デサチュラーゼおよび / または 1 5 - デサチュラーゼ、6 - デサチュラーゼ、5 - デサチュラーゼ、4 - デサチュラーゼ、6 - エロンガーゼ及び 5 - エロンガーゼ

をコードする 1 つ以上の外来性ポリヌクレオチドを含み、

各ポリヌクレオチドが、植物部分の細胞内の前記ポリヌクレオチドの発現を誘導可能である 1 つ以上のプロモーターと作動可能に結合する、前記アッセイすること、と

30

b) 1 つ以上のその部分の請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の抽出植物脂質の産生に使用できる複数の植物から植物を同定すること、と

c) 場合によっては、前記同定植物、またはそれ由来の種子から後代植物を産生すること

とを含む前記方法。

【請求項 1 9】

請求項 1 6 に記載の種子から得られる、および / または請求項 1 2 に記載の植物から得られる種子ミール。

【請求項 2 0】

1 つ以上の請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の脂質またはオイル、および / または請求項 1 9 に記載の種子ミールを含む家畜飼料。

40

【請求項 2 1】

家畜飼料の製造方法であって、前記方法が、少なくとも 1 つの他の食物成分と、1 つ以上の請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の脂質もしくはオイル、および / または請求項 1 9 に記載の種子ミールを混合することを含む前記方法。

【請求項 2 2】

P U F A から利益を受けることになる症状の治療または予防に用いるための、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の脂質またはオイル。

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、植物細胞または微生物細胞から得られたドコサヘキサエン酸及び／またはドコサペンタエン酸を含む脂質、及び該脂質の産生及び使用方法に関する。

【背景技術】

【0002】

3長鎖多価不飽和脂肪酸(LC-PUFA)は、ヒト及び動物の健康のための重要な化合物として、今では広く認識されている。これらの脂肪酸を、食事供給源からまたは、その両方とも食餌の必須脂肪酸として見なされているリノール酸(LA、18:2 6)または-リノレン酸(ALA、18:3 3)脂肪酸の転換により得ることができる。ヒト及び多くの他脊椎動物は、植物源から得られたLAまたはALAをC22に転換できるが、この転換反応は、非常に遅い速度で起こる。さらに、現代社会のほとんどは、理想とされる6:3脂肪酸について4:1以下の比の代わりに、少なくとも90%の多価不飽和脂肪酸(PUFA)が6脂肪酸であるというバランスのとれていない食事をとっている(Trautwein、2001)。ヒトのためのエイコサペンタエン酸(EPA、20:5 3)及びドコサヘキサエン酸(DHA、22:6 3)などのLC-PUFAの即時型食事供給源は、ほとんど、魚または魚油からである。従って、健康専門家はヒトの食事に、LC-PUFAの有意なレベルを含む魚を定期的に含めることを推奨している。益々、魚由来LC-PUFAオイルは、例えば、食品及び調製粉乳に配合されている。しかしながら、世界的及び国の水産業の衰退のせいで、これらの有益な健康増進オイルの代替源が必要とされている。

【0003】

動物と対照的に、顕花植物類は、18個の炭素より長い長鎖を有する多価不飽和脂肪酸を合成する能力を有しない。特に、他被子植物類と共に作物及び園芸植物は、ALAから誘導されるEPA、ドコサペンタエン酸(DPA、22:5 3)及びDHAなどのより長鎖3脂肪酸を合成するために必要な酵素を有しない。従って、植物バイオ技術の重要ゴールは、実質的量のLC-PUFAを産生し、それ故、これらの化合物の代替供給源を提供する作物のエンジニアリングである。

【0004】

LC-PUFA生合成経路

微細藻類、セン類及び真菌類などの生物のLC-PUFAの生合成は、通常、一連の酸素依存性不飽和化及び伸長反応として起こる(図1)。これらの生物内でEPAを産生する最も共通の経路としては、6-不飽和化反応、6-伸長反応及び5-不飽和化反応(6-不飽和化反応経路と呼ばれる)が挙げられ、一方で、余り共通でない経路は、9-伸長反応、8-不飽和化反応及び5-不飽和化反応(9-不飽和化反応経路と呼ばれる)を使用する。これらの連続した不飽和化及び伸長反応は、図1の上左部に模式的に示した6脂肪酸基質LA(6)または図1の下右部に示したEPAに完結する3基質ALA(3)のいずれかで開始し得る。もし、最初の6-不飽和化反応が、6基質LA上で起こるならば、一連の3種の酵素のLC-PUFA産生物は、6脂肪酸ARAであろう。LC-PUFA合成生物は、アラキドン酸(ARA、20:4 6)のEPAへの転換について図1中の17-デサチュラーゼ工程として示した3-デサチュラーゼを用いて、6脂肪酸を3脂肪酸に転換し得る。3-デサチュラーゼファミリーのいくつかのメンバーは、LAからARAまでの範囲の様々な基質上で作用できる。植物3-デサチュラーゼは、しばしば、LAからALAまでの15-不飽和化反応を特異的に触媒するが、一方、真菌類及び酵母の3-デサチュラーゼは、ARAからEPAまでの17-不飽和化反応に対して特異的であり得る(Pereiraら、2004a; Zankら、2005)。広範囲の6基質をそれらの対応する3産生物に転換できる非特異的3-デサチュラーゼが存在し得ることを、いくつかの報告が示唆している(Zhangら、2008)。

【0005】

これらの生物内におけるEPAのDHAへの転換は、EPAの5-伸長反応により起こり、DPAを産生し、次いで、4-不飽和化反応によりDHAを産生する(図1)。対照的に、哺乳類は、4-デサチュラーゼと独立した3種の別反応によりDPAをDHAに転換する、いわゆる、「シュプレッヒャー」経路を使用する(Sprecherら, 1995)。

【0006】

植物、セン類、微細藻類、及び線虫(*Caenorhabditis elegans*)などの下等動物で概して見られるフロントエンドデサチュラーゼは、ホスファチジルコリン(PC)基質のsn-2位とエステル化された脂肪酸基質を支配的に受容する。従って、これらのデサチュラーゼは、アシル-PC、脂質結合、フロントエンドデサチュラーゼとして知られる(Domergrueら, 2003)。対照的に、高等動物フロントエンドデサチュラーゼは、概して、脂肪酸基質がPCよりCoAと結合しているアシル-CoA基質を受容する(Domergrueら, 2005)。いくつかの微細藻類デサチュラーゼ及び1つの植物デサチュラーゼは、CoAとエステル化された脂肪酸基質を使用することが知られている(表2)。

【0007】

各PUFA伸長反応は、他成分タンパク質複合体により触媒される4工程から成る：先ず、縮合反応の結果、マロニル-CoAから脂肪酸に2C単位が付加され、 β -ケトアシル中間体を生成する。それから、これが、NADPHにより還元され、次いで、脱水反応によりエノイル中間体を得る。この中間体は、最終的に、2回還元されて、伸長脂肪酸を生成する。他工程はそうでないが、これらの4反応の縮合工程は基質特異的であると、概して、考えられる。実際に、天然植物伸長機構は、非天然PUFA基質の伸長において天然植物伸長機構の効率が低くあり得るが、PUFAに特異的縮合酵素(通常、「エロンガーゼ」と呼ぶ)が導入されること提供するPUFAを伸長可能であることを、このことは意味している。2007年に、酵母伸長サイクルデヒドラターゼの同定及び特徴付けが発表された(DenicとWeissman, 2007)。

【0008】

伸長反応がアシル-CoAプールにおいて基質に対して起こる一方で、植物、セン類及び微細藻類のPUFA不飽和化は、アシル-PCプールにおいて優先的に脂肪酸基質に対して自然に起こる。PC担体へのアシル-CoA脂肪酸の転移がリゾホスファチジルコリンアシルトランスフェラーゼ(LPCAT)により起こる一方で、アシル-PC分子からCoA担体への脂肪酸の転移は、ホスホリパーゼ(PLA)により起こる(図9)(Singhら, 2005)。

【0009】

LC-PUFAの工学的産生

ほとんどのLC-PUFA代謝工学は、好気性6-不飽和化/伸長経路を用いて行われている。タバコ中に γ -リノレン酸(GLA, 18:3 ω 6)の生合成は、シアノバクテリア・シネコシステリス(*cyanobacterium Synechocystis*)の6-デサチュラーゼを用いて、1996年に初めて報告された(ReddyとThomas, 1996)。より近年では、GLAは、ベニバナ(種子オイル中GLA73%、WO2006/127789)及びダイズ(GLA28%; Satoら, 2004)などの作物で産生された。EPA及びDHAなどのLC-PUFAの産生は、関連する不飽和化及び伸長工程数が多いせいで、より複雑な工学操作を伴う。EPA陸上植物のEPA産生は、Qiらにより初めて報告され(2004)、イソクリシス・ガルバナ(*Isochrysis galbana*)の9-エロンガーゼ、ユーグレナ・グラシリス(*Euglena gracilis*)の8-デサチュラーゼ及びモルティエラ・アルピナ(*Mortierella alpina*)の5-デサチュラーゼをコードする遺伝子を、EPA3%までの収率で、アラビドプシス属(*Arabidopsis*)に導入した。この研究後、Abbadiri(2004)が続き、ニセツリガネゴケ(*Physcomitrella patens*)の6-デサチュラーゼ及び6-エロンガーゼ及びフェオダクチラム・トリコルヌタム

10

20

30

40

50

(*Phaeodactylum tricornutum*) の 5 - デサチュラーゼをコードする遺伝子を用いて、亜麻仁で E P A 0 . 8 % までの産生を報告した。

【 0 0 1 0 】

D H A 産生の最初の報告は、ダイズ胚芽内における D H A 3 % の産生を記載している W O 0 4 / 0 1 7 4 6 7 であったが、種子ではなく、サブロレグニア・ディクリナ (*Saprolegnia diclina*) 6 - デサチュラーゼ、モルティエラ・アルピナ (*Mortierella alpina*) 6 - デサチュラーゼ、モルティエラ・アルピナ (*Mortierella alpina*) 5 - デサチュラーゼ、サブロレグニア・ディクリナ (*Saprolegnia diclina*) 4 - デサチュラーゼ、サブロレグニア・ディクリナ (*Saprolegnia diclina*) 1 7 - デサチュラーゼ、モルティエラ・アルピナ (*Mortierella alpina*) 6 - エロンガーゼ及びパブロバ・ルセリ (*Pavlova lutheri*) 5 - エロンガーゼをコードする遺伝子導入によるものであった。D H A も産生する胚芽内の最大 E P A レベルは 1 9 . 6 % であり、E P A から D H A への転換効率は小さいことを示した (W O 2 0 0 4 / 0 7 1 4 6 7) 。この発見は、ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) 5 / 6 - デサチュラーゼ、線虫 (*Caenorhabditis elegans*) 6 - エロンガーゼ、並びにパブロバ・サリナ (*Pavlova salina*) 5 - エロンガーゼ及び 4 - デサチュラーゼを用いて、アラビドプシス属 (*Arabidopsis*) 内における E P A 3 % 及び D H A 0 . 5 % の産生について R o b e r t ら (2 0 0 5) により発表されたものと類似していた。また、2 0 0 5 年に、Wu らは、ピシリウム・イレグラレ (*Pythium irregulare*) 6 - エロンガーゼ、スラウストキトリッド (*Thraustochytrid*) 5 - デサチュラーゼ、ニセツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*) 6 - エロンガーゼ、キンセンカ (*Calendula officianalis*) 1 2 - デサチュラーゼ、スラウストキトリッド (*Thraustochytrid*) 5 - エロンガーゼ、フィトフトラ・インフェスタンス (*Phytophthora infestans*) 1 7 - デサチュラーゼ、ニジマス (*Oncorhynchus mykiss*) L C - P U F A エロンガーゼ、スラウストキトリッド (*Thraustochytrid*) 4 - デサチュラーゼ及びスラウストキトリッド (*Thraustochytrid*) L P C A T を用いて、カラシナ (*Brassica juncea*) 内において、A R A 2 5 % 、E P A 1 5 % 、及び D H A 1 . 5 % の産生を発表した (Wu ら、2 0 0 5) 。 3 L C - P U F A を合成する油料種子作物を産生する試みの総括が、V e n e g a s - C a n e l o n ら (2 0 1 0) 及び R u i z - L o p e z ら (2 0 1 2) により提供されている。R u i z - L o p e z ら (2 0 1 2) により示されたように、トランスジェニック植物内の D H A 産生について、今日までに得られた結果は魚油で見られるレベルにはほど遠いものであった。より近年、P e t r i e ら (2 0 1 2) は、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の種子内における D H A 約 1 5 % の産生を報告し、W O 2 0 1 3 / 1 8 5 1 8 4 は、7 % から 2 0 % の間の D H A を有する特定の種子オイルの産生を報告した。しかしながら、2 0 % を超える D H A を有する植物油の産生の報告はない。

【 0 0 1 1 】

D H A の同時産生なしに有意なレベルまで、組換え細胞内の D P A 産生の報告はない。実際、本発明者らは、D H A 産生なしで、組換え細胞内で D P A を産生するいかなる公になった示唆も動機づけも知らない。

【 0 0 1 2 】

従って、組換え細胞内での L C - P U F A 、特に、油料種子植物の種子内の D H A または D P A のより効率的な産生の必要性が依然として存在する。

【発明の概要】

【 0 0 1 3 】

本発明者らは、D H A 及び / または D P A の高レベルを有する脂質を産生するための方法及び植物を特定した。W O 2 0 1 3 / 1 8 5 1 8 4 に記載のように、本発明者らは、以前に、7 % から 2 0 % の間の抽出脂質の総脂肪酸含有率で D H A を含むかかる脂質を産生するための抽出植物脂質、並びに植物及び植物部分を開示した。当時、植物内で産生され得る D H A の最大量と見なされたので、2 0 % の上限が規定されていた。しかしながら、本明細書に記載のように、本発明者らは、驚くべきことに、2 0 % を超える総脂肪酸含有

率でDHAレベルを得ることができることを見いだした。本発明者らは、特に、DHAの非存在下で、7%から35%の間の抽出脂質の総脂肪酸含有率でDPAを含む脂質を産生するための植物脂質、並びに植物部分及び植物も見いだした。

【0014】

従って、第一の態様では、本発明は、抽出植物脂質であって、エステル化された形態の脂肪酸を含み、該脂肪酸は、オレイン酸、パルミチン酸、リノール酸(LA)を含む6脂肪酸、 - リノレン酸(ALA) 及びドコサヘキサエン酸(DHA)を含み、場合により、ステアリドン酸(SDA)、エイコサペンタエン酸(EPA)、ドコサペンタエン酸(DPA)及びエイコサテトラエン酸(ETA)の1つ以上を含んでもよい3脂肪酸を含み、 該抽出脂質の総脂肪酸含有率のDHAレベルが20.1%から30%の間または20.1%から35%の間、好ましくは、30%から35%の間である抽出植物脂質を提供する。

10

【0015】

別の態様では、本発明は、抽出植物脂質であって、エステル化された形態の脂肪酸を含み、該脂肪酸は、オレイン酸、パルミチン酸、リノール酸(LA)を含む6脂肪酸、 - リノレン酸(ALA) 及びドコサヘキサエン酸(DHA)を含み、場合により、ステアリドン酸(SDA)、エイコサペンタエン酸(EPA)、ドコサペンタエン酸(DPA)及びエイコサテトラエン酸(ETA)の1つ以上を含んでもよい3脂肪酸を含み、 該抽出脂質の総脂肪酸含有量におけるパルミチン酸のレベルが約2%から16%の間であり、該抽出脂質の総脂肪酸含有量におけるミリスチン酸(C14:0)のレベルが、もし存在する場合、1%未満であり、該抽出脂質の総脂肪酸含有量におけるDHAのレベルが20.1%から30%の間または20.1%から35%の間、好ましくは、30%から35%の間である抽出植物脂質を提供する。

20

【0016】

別の態様では、本発明は、抽出植物脂質であって、エステル化された形態の脂肪酸を含み、該脂肪酸は、オレイン酸、パルミチン酸、リノール酸(LA)を含む6脂肪酸、 - リノレン酸(ALA) 及びドコサペンタエン酸(DPA)を含み、場合により、ステアリドン酸(SDA)、エイコサペンタエン酸(EPA)、及びエイコサテトラエン酸(ETA)の1つ以上を含んでもよい3脂肪酸を含み、 該抽出脂質の総脂肪酸含有量におけるDPAのレベルが、約7%から35%の間である抽出脂質、好ましくは、抽出植物脂質または抽出微生物脂質を提供する。本態様の実施形態では、該抽出脂質の総脂肪酸含有量におけるDPAのレベルは、約7%、約8%、約9%、約10%、約12%、約15%、約18%、約20%、約22%、約24%、約26%、約28%、約30%、約7%から約28%の間、約7%から約25%の間、約10%から約35%の間、約10%から約30%の間、約10%から約25%の間、約10%から約22%の間、約14%から約35%の間、約16%から約35%の間、約16%から約30%の間、約16%から約25%の間、または約16%から約22%の間である。

30

【0017】

上記態様の実施形態では、DHAは、該抽出脂質の総脂肪酸含有量の0.5%未満のレベルで存在し、より好ましくは、該脂質の総脂肪酸含有物中に存在しない。

40

【0018】

別の態様では、本発明は、ドコサペンタエン酸(DPA)及び/またはドコサヘキサエン酸(DHA)を含むエステル化された形態の脂肪酸を含む抽出脂質、好ましくは、抽出植物脂質または抽出微生物脂質を提供し、トリアシルグリセロール(TAG)の形態でエステル化された少なくとも35%のDPA及び/またはDHAが、該TAGのsn-2位でエステル化されている。実施形態では、該抽出脂質は、(i)オレイン酸、パルミチン酸、リノール酸(LA)を含む6脂肪酸、 - リノレン酸(ALA)を含み、場合により、ステアリドン酸(SDA)、エイコサペンタエン酸(EPA)、及びエイコサテトラエン酸(ETA)の1つ以上を含んでもよい3脂肪酸を含むこと、(ii)少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約48%、35%から約60%の間、または

50

35%から約50%の間のトリアシルグリセロール(TAG)の形態でエステル化されたDPA及び/またはDHAが該TAGのsn-2位でエステル化されていること、及び(iii)該抽出脂質の総脂肪酸含有量におけるDPA及び/またはDHAのレベルが約1%から35%の間、または約7%から35%の間または約20.1%から35%の間であることの1つ以上または全てにより、さらに特徴付けられる。本態様の実施形態では、該抽出脂質の総脂肪酸含有量におけるDPA及び/またはDHAのレベルは、約7%、約8%、約9%、約10%、約12%、約15%、約18%、約20%、約22%、約24%、約26%、約28%、約30%、約7%から約28%の間、約7%から約25%の間、約10%から約35%の間、約10%から約30%の間、約10%から約25%の間、約10%から約22%の間、約14%から約35%の間、約16%から約35%の間、約16%から約30%の間、約16%から約25%の間、または約16%から約22%の間である。好ましい実施形態では、該抽出脂質は、(i)及び(ii)、(i)及び(iii)または(ii)及び(iii)、より好ましくは、(i)、(ii)及び(iii)の全てにより特徴付けられる。好ましくは、該抽出脂質は、約2%から16%の間である該抽出脂質の総脂肪酸含有量におけるパルミチン酸レベル、及び、もし存在する場合、1%未満である該抽出脂質の総脂肪酸含有量におけるミリスチン酸(C14:0)レベルにより、さらに特徴付けられる。

10

【0019】

上記4つの態様の各々の実施形態を、以下、さらに詳細に説明する。当業者が理解するように、上記態様の対応する特徴より広範である、記載されたいかなる実施形態もその態様に適用しない。

20

【0020】

実施形態では、抽出脂質は、以下の特徴：

i) 該抽出脂質の総脂肪酸含有量におけるパルミチン酸のレベルは、約2%から18%の間、約2%から16%の間、約2%から15%の間、または約3%から10%の間であること、

ii) 該抽出脂質の総脂肪酸含有量におけるミリスチン酸(C14:0)のレベルは、6%未満、3%未満、2%未満、1%未満、または約0.1%であること、

iii) 該抽出脂質の総脂肪酸含有量におけるオレイン酸のレベルは、約1%から約30%の間、約3%から約30%の間、約6%から約30%の間、約1%から約20%の間、約30%から約60%の間、約45%～約60%、約30%、または約15%から約30%の間であること、

30

iv) 該抽出脂質の総脂肪酸含有量におけるリノール酸(LA)のレベルは、約4%から約35%の間、約4%から約20%の間、約4%から約17%の間、または約5%から約10%の間であること、

v) 該抽出脂質の総脂肪酸含有量における - リノレン酸(ALA)のレベルは、約4%から約40%の間、約7%から約40%の間、約10%から約35%の間、約20%から約35%の間、約4%から約16%の間、または約2%から約16%の間であること、

vi) 該抽出脂質の総脂肪酸含有量における - リノレン酸(GLA)のレベルは、4%未満、約3%未満、約2%未満、約1%未満、約0.5%未満、0.05%から約7%の間、0.05%から4%の間、0.05%から約3%の間、または0.05%から約2%の間であること、

40

vii) 該抽出脂質の総脂肪酸含有量におけるステアリドン酸(SDA)のレベルは、約10%未満、約8%未満、約7%未満、約6%未満、約4%未満、約3%未満、約0.05%から約7%の間、約0.05%から約6%の間、約0.05%から約4%の間、約0.05%から約3%の間、約0.05%から約10%の間、または約0.05%から約2%の間であること、

viii) 該抽出脂質の総脂肪酸含有量におけるエイコサテトラエン酸(ETA)のレベルは、約6%未満、約5%未満、約4%未満、約1%未満、約0.5%未満、0.05%から約6%の間、0.05%から約5%の間、0.05%から約4%の間、0.05%

50

から約 3 %の間、または 0 . 0 5 %から約 2 %の間であること、

i x) 該抽出脂質の総脂肪酸含有量におけるエイコサトリエン酸 (E T r A) のレベルは、4 %未満、約 2 %未満、約 1 %未満、0 . 0 5 %から 4 %の間、0 . 0 5 %から 3 %の間、または 0 . 0 5 %から約 2 %の間、または 0 . 0 5 %から約 1 %の間であること、

x) 該抽出脂質の総脂肪酸含有量におけるエイコサペンタエン酸 (E P A) のレベルは、4 %から 1 5 %の間、4 %未満、約 3 %未満、約 2 %未満、0 . 0 5 %から 1 0 %の間、0 . 0 5 %から 5 %の間、0 . 0 5 %から約 3 %の間、または 0 . 0 5 %から約 2 %の間であること、

x i) もし、該抽出脂質の総脂肪酸含有量における D H A のレベルが、2 0 . 1 %から 3 5 %の間であるならば、該抽出脂質の総脂肪酸含有量におけるドコサペンタエン酸 (D P A) のレベルは、4 %未満、約 3 %未満、約 2 %未満、0 . 0 5 %から 8 %の間、0 . 0 5 %から 5 %の間、0 . 0 5 %から約 3 %の間、5 %から 1 5 %の間、5 %から 1 0 %の間、または 0 . 0 5 %から約 2 %の間であること、

x i i) 該抽出脂質の総脂肪酸含有量における D H A のレベルは、約 2 2 %、約 2 4 %、約 2 6 %、約 2 8 %、約 3 1 %、2 0 . 1 %から 2 9 %の間、2 0 . 1 %から 2 8 %の間、2 0 . 1 %から 2 7 %の間、2 0 . 1 %から 2 6 %の間、2 0 . 1 %から 2 5 %の間、2 0 . 1 %から 2 4 %の間、2 1 %から 3 5 %の間、2 1 %から 3 0 %の間、2 1 %から 2 8 %の間、2 1 %から約 2 6 %の間、または 2 1 %から約 2 4 %の間であること、

x i i i) 該脂質は、その脂肪酸含有物中に 6 - ドコサペンタエン酸 (2 2 : 5 4 , 7 , 1 0 , 1 3 , 1 6) を含むこと、

x i v) 該脂質は、その脂肪酸含有物中に 0 . 1 %未満の 6 - ドコサペンタエン酸 (2 2 : 5 4 , 7 , 1 0 , 1 3 , 1 6) を含むこと、

x v) 該脂質は、その脂肪酸含有物中に 0 . 1 %未満の 1 つ以上または全ての S D A 、E P A 及び E T A を含むこと、

x v i) 該抽出脂質の総脂肪酸含有量における総飽和脂肪酸レベルは、約 4 %から約 2 5 %の間、約 4 %から約 2 0 %の間、約 6 %から約 2 0 %の間、または約 6 %から約 1 2 %の間であること、

x v i i) 該抽出脂質の総脂肪酸含有量における総一価不飽和脂肪酸レベルは、約 4 %から約 4 0 %の間、約 4 %から約 3 5 %の間、約 8 %から約 2 5 %の間、8 %から約 2 2 %の間、約 1 5 %から約 4 0 %の間または約 1 5 %から約 3 5 %の間であること、

x v i i i) 該抽出脂質の総脂肪酸含有量における総多価不飽和脂肪酸レベルは、約 2 0 %から約 7 5 %の間、3 0 %から 7 5 %の間、約 5 0 %から約 7 5 %の間、約 6 0 %、約 6 5 %、約 7 0 %、約 7 5 %、または約 6 0 %から約 7 5 %の間であること、

x i x) 該抽出脂質の総脂肪酸含有量における総 6 脂肪酸レベルは、約 3 5 %から約 5 0 %の間、約 2 0 %から約 3 5 %の間、約 6 %から約 2 0 %の間、2 0 %未満、約 1 6 %未満、約 1 0 %未満、約 1 %から約 1 6 %の間、約 2 %から約 1 0 %の間、または約 4 %から約 1 0 %の間であること、

x x) 該抽出脂質の総脂肪酸含有量における新 6 脂肪酸レベルは、約 1 0 %未満、約 8 %未満、約 6 %未満、4 %未満、約 1 %から約 2 0 %の間、約 1 %から約 1 0 %の間、0 . 5 %から約 8 %の間、または 0 . 5 %から 4 %の間であること、

x x i) 該抽出脂質の総脂肪酸含有量における総 3 脂肪酸レベルは、3 6 %から約 6 5 %の間、3 6 %から約 7 0 %の間、4 0 %から約 6 0 %の間、約 3 0 %から約 6 0 %の間、約 3 5 %から約 6 0 %の間、4 0 %から約 6 5 %の間、約 3 0 %から約 6 5 %の間、約 3 5 %から約 6 5 %の間、約 3 5 %、約 4 0 %、約 4 5 %、約 5 0 %、約 5 5 %、約 6 0 %、約 6 5 %または約 7 0 %であること、

x x i i) 該抽出脂質の総脂肪酸含有量における新 3 脂肪酸レベルは、2 1 %から約 4 5 %の間、2 1 %から約 3 5 %の間、約 2 3 %から約 3 5 %の間、約 2 5 %から約 3 5 %の間、約 2 7 %から約 3 5 %の間、約 2 3 %から約 2 5 %の間、約 2 7 %、約 3 0 %、約 3 5 %、約 4 0 %または約 4 5 %であること、

x x i i i) 該抽出脂質の総脂肪酸含有量における総 6 脂肪酸：総 3 脂肪酸の比は

10

20

30

40

50

、約 1.0 から約 3.0 の間、約 0.1 から約 1 の間、約 0.1 から約 0.5 の間、約 0.50 未満、約 0.40 未満、約 0.30 未満、約 0.20 未満、約 0.15 未満、約 1.0 未満、約 0.1 未満、約 0.10 ~ 約 0.4、または約 0.2 であること、

xxiv) 該抽出脂質の総脂肪酸含有量における新 6 脂肪酸：新 3 脂肪酸の比は、約 1.0 から約 3.0 の間、約 0.02 から約 0.1 の間、約 0.1 から約 1 の間、約 0.1 から約 0.5 の間、約 0.50 未満、約 0.40 未満、約 0.30 未満、約 0.20 未満、約 0.15 未満、約 0.02、約 0.05、約 0.1、約 0.2 または約 1.0 であること、

xxv) 該脂質の脂肪酸組成は、少なくとも約 60%、少なくとも約 70%、少なくとも約 80%、約 60% から約 98% の間、約 70% から約 95% の間、または約 75% から約 90% の間の 12 - デサチュラーゼによるオレイン酸から LA への転換効率に基づくこと、

10

xxvi) 該脂質の脂肪酸組成は、少なくとも約 30%、少なくとも約 40%、少なくとも約 50%、少なくとも約 60%、少なくとも約 70%、約 30% から約 70% の間、約 35% から約 60% の間、または約 50% から約 70% の間の 6 - デサチュラーゼによる ALA から SDA への転換効率に基づくこと、

xxvii) 該脂質の脂肪酸組成は、少なくとも約 60%、少なくとも約 70%、少なくとも約 75%、約 60% から約 95% の間、約 70% から約 88% の間、または約 75% から約 85% の間の 6 - エロンガーゼによる SDA から ETA 酸への転換効率に基づくこと、

20

xxviii) 該脂質の脂肪酸組成は、少なくとも約 60%、少なくとも約 70%、少なくとも約 75%、約 60% から約 99% の間、約 70% から約 99% の間、または約 75% から約 98% の間の 5 - デサチュラーゼによる ETA から EPA への転換効率に基づくこと、

xxix) 該脂質の脂肪酸組成は、少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、約 50% から約 99% の間、約 85% から約 99% の間、約 50% から約 95% の間、または約 85% から約 95% の間の 5 - エロンガーゼによる EPA から DPA への転換効率に基づくこと、

xxx) もし、該抽出脂質の総脂肪酸含有量における DHA のレベルが、20.1% から 30% の間または 20.1% から 35% の間であるならば、該脂質の脂肪酸組成は、少なくとも約 80%、少なくとも約 90%、少なくとも約 93%、約 50% から約 95% の間、約 80% から約 95% の間、または約 85% から約 95% の間の 4 - デサチュラーゼによる DPA から DHA への転換効率に基づくこと、

30

xxxi) 該脂質の脂肪酸組成は、少なくとも約 10%、少なくとも約 15%、少なくとも約 20%、少なくとも約 25%、約 20%、約 25%、約 30%、約 10% から約 50% の間、約 10% から約 30% の間、約 10% から約 25% の間または約 20% から約 30% の間のオレイン酸から DHA 及び / または DPA への転換効率に基づくこと、

xxxii) 該脂質の脂肪酸組成は、少なくとも約 15%、少なくとも約 20%、少なくとも約 22%、少なくとも約 25%、少なくとも約 30%、少なくとも約 40%、約 25%、約 30%、約 35%、約 40%、約 45%、約 50%、約 15% から約 50% の間、約 20% から約 40% の間、または約 20% から約 30% の間の LA から DHA 及び / または DPA への転換効率に基づくこと、

40

xxxiii) 該脂質の脂肪酸組成は、少なくとも約 17%、少なくとも約 22%、少なくとも約 24%、少なくとも約 30%、約 30%、約 35%、約 40%、約 45%、約 50%、約 55%、約 60%、約 22% から約 70% の間、約 17% から約 55% の間、約 22% から約 40% の間、または約 24% から約 40% の間の ALA から DHA 及び / または DPA への転換効率に基づくこと、

xxxiv) 該抽出脂質中の総脂肪酸は、1.5% 未満の C20 : 1、1% 未満の C20 : 1 または約 1% の C20 : 1 を有すること、

xxxv) 該脂質のトリアシルグリセロール (TAG) 含有率は、少なくとも約 70%

50

、少なくとも約 80 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 95 %、約 70 % から約 99 % の間、または約 90 % から約 99 % の間であること、

x x x v i) 該脂質は、ジアシルグリセロール (D A G) を含み、D A G は好ましくは D H A 及び / または D P A を含むこと、

x x x v i i) 該脂質は、約 10 % 未満、約 5 % 未満、約 1 % 未満または約 0 . 001 % から約 5 % の間の遊離 (非エステル化) 脂肪酸及び / またはリン脂質を含む、または本質的にそれを含まないこと、

x x x v i i i) T A G の形態でエステル化された D H A 及び / または D P A の少なくとも 70 %、少なくとも 72 % または少なくとも 80 % は、該 T A G の s n - 1 位または s n - 3 位であり、

x x x i x) 該脂質中に最も豊富な D H A を含む T A G 化学種は、D H A / 18 : 3 / 18 : 3 (T A G 58 : 12) であり、該脂質はトリ D H A T A G (T A G 66 : 18) を含むこと、及び

x l) 該抽出脂質の総脂肪酸含有量における D P A のレベルが、約 7 %、約 8 %、約 9 %、約 10 %、約 12 %、約 15 %、約 18 %、約 20 %、約 22 %、約 24 %、約 26 %、約 28 %、約 31 %、約 7 % から約 31 % の間、約 7 % から約 28 % の間、約 10 % から約 35 % の間、約 10 % から約 30 % の間、約 10 % から約 25 % の間、約 10 % から約 22 % の間、約 14 % から約 35 % の間、約 16 % から約 35 % の間、約 16 % から約 30 % の間、約 16 % から約 25 % の間、または約 16 % から約 22 % の間であり、場合により、D H A レベルは、該抽出脂質の総脂肪酸含有量の 0 . 5 % 未満であること
の 1 つ以上を有する。

【 0021 】

別の実施形態では、該抽出脂質は、以下の特徴：

i) 該抽出植物脂質の総脂肪酸含有量におけるパルミチン酸のレベルは、2 % から 15 % の間であること、

i i) 該抽出植物脂質の総脂肪酸含有量におけるミリスチン酸 (C 14 : 0) のレベルは、約 0 . 1 % であること、

i i i) 該抽出植物脂質の総脂肪酸含有量におけるオレイン酸のレベルは、1 % から 30 % の間であること、

i v) 該抽出植物脂質の総脂肪酸含有量におけるリノール酸 (L A) のレベルは、4 % から 20 % の間であること、

v) 該抽出植物脂質の総脂肪酸含有量における - リノレン酸 (A L A) のレベルは、4 % から 40 % の間であること、

v i) 該抽出植物脂質の総脂肪酸含有量における - リノレン酸 (G L A) のレベルは、0 . 05 % から 7 % の間であること、

v i i) 該抽出植物脂質の総脂肪酸含有量におけるステアリドン酸 (S D A) のレベルは、0 . 05 % から 10 % の間であること、

v i i i) 該抽出植物脂質の総脂肪酸含有量におけるエイコサテトラエン酸 (E T A) のレベルは、6 % 未満であること、

i x) 該抽出植物脂質の総脂肪酸含有量におけるエイコサトリエン酸 (E T r A) のレベルは、4 % 未満であること、

x) 該抽出植物脂質は、その脂肪酸含有物中に 0 . 1 % 未満の 6 - ドコサペンタエン酸 (22 : 5 4 , 7 , 10 , 13 , 16) を含むこと、

x i) 該抽出植物脂質の総脂肪酸含有量における新 6 脂肪酸のレベルは、10 % 未満であること、

x i i) 該抽出植物脂質の脂肪酸含有物中の総 6 脂肪酸：総 3 脂肪酸の比は、1 . 0 から 3 . 0 の間、または 0 . 1 から 1 の間であること、

x i i i) 該抽出植物脂質の脂肪酸含有物中の新 6 脂肪酸：新 3 脂肪酸の比は、1 . 0 から 3 . 0 の間、または 0 . 02 から 0 . 1 の間、または 0 . 1 から 1 の間であること、

10

20

30

40

50

x i v) 該抽出植物脂質の脂肪酸組成は、少なくとも 10 % のオレイン酸から D H A への転換効率に基づくこと、

x v) 該抽出植物脂質の脂肪酸組成は、少なくとも 15 % の L A から D H A への転換効率に基づくこと、

x v i) 該抽出植物脂質の脂肪酸組成は、少なくとも 17 % の A L A から D H A への転換効率に基づくこと、

x v i i) 該抽出植物脂質中の総脂肪酸は、1.5 % 未満の C 20 : 1 であること、及び

x v i i i) 該抽出植物脂質中のトリアシルグリセロール (T A G) 含有率は、少なくとも 70 % であり、1 つ以上の以下の特徴により特徴付けられ得ること、

x i x) 該抽出植物脂質は、D H A を含むジアシルグリセロール (D A G) を含むこと、

x x) 該抽出植物脂質は、10 % 未満の遊離 (非エステル化) 脂肪酸及び / またはリン脂質を含む、または本質的にそれを含まないこと、

x x i) T A G の形態でエステル化された D H A の少なくとも 70 % は、該 T A G の s n - 1 位または s n - 3 位であること、

x x i i) 該抽出植物脂質中の最も豊富な D H A 含有 T A G 化学種は、D H A / 18 : 3 / 18 : 3 (T A G 58 : 12) であること、及び

x x i i i) 該抽出植物脂質は、トリ D H A T A G (T A G 66 : 18) を含むことの 1 つ以上を有する。

【 0 0 2 2 】

実施形態では、該抽出植物脂質の総脂肪酸含有量におけるエイコサペンタエン酸 (E P A) のレベルは、0.05 % から 10 % の間である。

【 0 0 2 3 】

別の実施形態では、D H A が 20.1 % から 35 % の間で存在する場合、該抽出植物脂質の総脂肪酸含有量におけるドコサペンタエン酸 (D P A) のレベルは、約 4 % 未満である。

【 0 0 2 4 】

さらなる実施形態では、該抽出植物脂質の総脂肪酸含有量における D H A のレベルは、20.1 % から 30 % の間である。

【 0 0 2 5 】

別の実施形態では、該抽出脂質は、オイルの形態であり、少なくとも約 90 重量 %、少なくとも約 95 重量 %、少なくとも約 98 重量 %、または約 95 重量 % から約 98 重量 % の間であるオイルは脂質である。

【 0 0 2 6 】

上記最初の 2 つの態様の好ましい実施形態では、脂質またはオイル、好ましくは、種子オイルは、次の特徴を有する：該脂質またはオイルの総脂肪酸含有量において、D H A のレベルは、約 20.1 % から 30 % の間または 20.1 % から 35 % の間であり、パルミチン酸のレベルは、約 2 % から約 16 % の間であり、ミリスチン酸のレベルは、約 6 % 未満であり、オレイン酸のレベルは、約 1 % から約 30 % の間であり、L A のレベルは、約 4 % から約 35 % の間であり、A L A は存在し、該抽出脂質の総脂肪酸含有量における総飽和脂肪酸のレベルは、約 4 % から約 25 % の間であり、該抽出脂質の脂肪酸含有量における総 6 脂肪酸：総 3 脂肪酸の比は、0.05 から約 3.0 の間であり、該脂質のトリアシルグリセロール (T A G) 含有率は、少なくとも約 70 % であり、場合により、該脂質はコレステロールを本質的に含まず、及び / または該脂質はトリ D H A T A G (T A G 66 : 18) を含んでもよい。より好ましくは、脂質またはオイル、好ましくは、種子オイルは、加えて、次の特徴の 1 つ以上または全てを有する：少なくとも 70 % の D H A はトリアシルグリセロール (T A G) の s n - 1 位または s n - 3 位でエステル化されており、A L A は総脂肪酸含有物の 4 % から 40 % の間のレベルで存在し、G L A は存在し、及び / または G L A のレベルは総脂肪酸含有物の 4 % 未満であり、S D A レベルは、

10

20

30

40

50

0.05%から約10%の間であり、E T Aレベルは約4%未満であり、E P Aレベルは0.05%から約10%の間であり、D P Aレベルは0.05%から約8%の間であり、該抽出脂質の総脂肪酸含有量における総一価不飽和脂肪酸のレベルは約4%から約35%の間であり、該抽出脂質の総脂肪酸含有量における総多価不飽和脂肪酸のレベルは約20%から約75%の間であり、該抽出脂質の脂肪酸含有物中の新 6 脂肪酸：新 3 脂肪酸の比は約0.03から約3.0の間、好ましくは、約0.50未満であり、該脂質の脂肪酸組成は：少なくとも約60%の 12 - デサチュラーゼによるオレイン酸からL Aへの転換効率、少なくとも約60%の 6 - エロンガーゼによるS D AからE T Aへの転換効率、約50%から約95%の間の 5 - エロンガーゼによるE P AからD P Aへの転換効率、約50%から約95%の間の 4 - デサチュラーゼによるD P AからD H Aへの転換効率、少なくとも約10%のオレイン酸からD H Aへの転換効率に基づく。最も好ましくは、少なくとも81%のD H Aはトリアシルグリセロール(T A G)のs n - 1位またはs n - 3位でエステル化されている。

【0027】

上記第3の態様の好ましい実施形態では、脂質またはオイル、好ましくは、種子オイルは、以下の特徴を有する：脂質またはオイルの総脂肪酸含有量において、D P Aレベルは、約7%から30%の間または約7%から35%の間であり、パルミチン酸レベルは、約2%から約16%の間であり、ミリスチン酸レベルは、1%未満であり、オレイン酸レベルは、約1%から約30%の間であり、L Aレベルは、約4%から35%の間であり、A L Aは存在し、抽出脂質の総脂肪酸含有量における総飽和脂肪酸レベルは、約4%から約25%の間であり、抽出脂質の脂肪酸含有量における総 6 脂肪酸：総 3 脂肪酸の比は、0.05から約3.0の間であり、脂質のトリアシルグリセロール(T A G)含有率は、少なくとも約70%であり、場合により、脂質は、コレステロールを本質的に含まなくてもよく、及び/または脂質は、トリ - D P A T A G(T A G 66:15)を含む。より好ましくは、脂質またはオイル、好ましくは、種子オイルは、以下の特徴の1つ以上または全てをさらに有する：少なくとも70%のD P Aは、トリアシルグリセロール(T A G)のs n - 1位またはs n - 3位でエステル化されており、A L Aは、総脂肪酸含有物の4%から40%の間のレベルで存在し、G L Aは存在し、及び/またはG L Aレベルは、総脂肪酸含有物の4%未満であり、S D Aレベルは、0.05%から約10%の間であり、E T Aレベルは、約4%未満であり、E P Aレベルは、0.05%から約10%の間であり、抽出脂質の総脂肪酸含有量における総一価不飽和脂肪酸レベルは、約4%から約35%の間であり、抽出脂質の総脂肪酸含有量における総多価不飽和脂肪酸レベルは、約20%から約75%の間であり、抽出脂質の総脂肪酸含有量における新 6 脂肪酸：新 3 脂肪酸の比は、約0.03から約3.0の間、好ましくは、約0.50未満であり、脂質の脂肪酸組成は：少なくとも約60%の 12 - デサチュラーゼによるオレイン酸からL Aへの転換効率、少なくとも約60%の 6 - エロンガーゼによるS D AからE T Aへの転換効率、約50%から約95%の間の 5 - エロンガーゼによるオレイン酸からD P Aへの転換効率、少なくとも約10%のオレイン酸からD P Aへの転換効率に基づく。最も好ましくは、少なくとも81%のD P Aはトリアシルグリセロール(T A G)のs n - 1位またはs n - 3位でエステル化されている。

【0028】

上記第4の態様の別の好ましい実施形態では脂質またはオイル、好ましくは、D H A及び/またはD P Aを含む種子オイルは、以下の特徴を有する：脂質またはオイルの総脂肪酸含有量において、パルミチン酸レベルは、約2%から約16%の間であり、ミリスチン酸レベルは、1%未満であり、オレイン酸レベルは、約1%から約30%の間であり、L Aレベルは、約4%から35%の間であり、A L Aは存在し、抽出脂質の総脂肪酸含有量における総飽和脂肪酸レベルは、約4%から約25%の間であり、抽出脂質の脂肪酸含有量における総 6 脂肪酸：総 3 脂肪酸の比は、0.05から約3.0の間であり、脂質のトリアシルグリセロール(T A G)含有率は、少なくとも約70%であり、場合により、脂質は、トリD H A T A G(T A G 66:18)及び/またはトリ - D P A T A G

10

20

30

40

50

(TAG66:15)を含んでもよく、トリアシルグリセロール(TAG)の形態でエステル化された少なくとも35%のDPA及び/またはDHAは、該TAGのsn-2位でエステル化されている。より好ましくは、脂質またはオイル、好ましくは、種子オイルは、加えて、次の特徴の1つ以上または全てを有する：ALAは総脂肪酸含有物の4%から40%の間のレベルで存在し、GLAは存在し、及び/またはGLAのレベルは総脂肪酸含有物の4%未満であり、SDAレベルは、0.05%から約10%の間であり、ETAレベルは約4%未満であり、EPAレベルは0.05%から約10%の間であり、該抽出脂質の総脂肪酸含有量における総一価不飽和脂肪酸のレベルは約4%から約35%の間であり、該抽出脂質の総脂肪酸含有量における総多価不飽和脂肪酸のレベルは約20%から約75%の間であり、該抽出脂質の脂肪酸含有物中の新6脂肪酸：新3脂肪酸の比は約0.03から約3.0の間、好ましくは、約0.50未満であり、該脂質の脂肪酸組成は：少なくとも約60%の12-デサチュラーゼによるオレイン酸からLAへの転換効率、少なくとも約60%の6-エロンガーゼによるSDAからETAへの転換効率、約50%から約95%の間の5-エロンガーゼによるEPAからDPAへの転換効率、約50%から約95%の間の4-デサチュラーゼによるDPAからDHAへの転換効率、少なくとも約10%のオレイン酸からDPAへの転換効率に基づく。

10

【0029】

本発明の抽出脂質またはオイルに関連して、該抽出脂質またはオイル中のDHA及び/またはDPAのレベルは、抽出前の植物部分または微生物の脂質またはオイル中のDHA及び/またはDPAのレベルから増加していない、または実質的に同じである。言い換えれば、他の抽出後の脂肪酸と比較して、脂質またはオイル中のDHA及び/またはDPAのレベルを増加させる処理はない。明白であるようなとき、脂質またはオイルを、分取または他の方法により、その後処理して、脂肪酸組成を変化させてもよい。

20

【0030】

さらに好ましい実施形態では、脂質またはオイル、好ましくは、種子オイルは、以下の特徴を有する：脂質またはオイルの総脂肪酸含有量におけるDHAレベルは、約20.1%から30%の間または約20.1%から35%の間であり、パルミチン酸レベルは、約2%から約16%の間であり、ミリスチン酸レベルは、約6%未満、好ましくは1%未満であり、オレイン酸レベルは、約1%から約30%の間であり、LAレベルは、約4%から約35%の間であり、ALAは存在し、GLAは存在し、SDAレベルは、約0.05%から約10%の間であり、ETAレベルは、約6%未満であり、EPAレベルは、約0.05%から約10%の間であり、DPAレベルは、約0.05%から約8%の間である。

30

【0031】

別の好ましい実施形態では、脂質またはオイル、好ましくは、種子オイル、より好ましくは、カラシ油またはキャノーラオイルなどのアブラナ(Brassica)種子オイルは、以下の特徴を有する：脂質またはオイルの総脂肪酸含有量におけるDPAレベルは、約7%から35%の間であり、パルミチン酸レベルは、約2%から約16%の間であり、ミリスチン酸レベルは、約6%未満、好ましくは1%未満であり、オレイン酸レベルは、約1%から約30%の間であり、LAレベルは、約4%から約35%の間であり、ALAは存在し、SDAレベルは、約0.05%から約10%の間であり、ETAレベルは、約6%未満であり、EPAレベルは、約0.05%から約10%の間である。DHAは、脂質またはオイル中に存在していてもしていなくてもよい。好ましくは、DHAは、もし存在するならば、脂質またはオイルの総脂肪酸含有量の0.5%未満のレベルで存在し、より好ましくは、該脂質またはオイルの総脂肪酸含有物中に存在しない。場合により、脂質は、コレステロールを本質的に含まなくてもよく、及び/または脂質はトリ-DPA TAG(TAG66:15)を含んでもよい。より好ましくは、脂質またはオイル、好ましくは、種子オイルは、以下の特徴の1つ以上または全てをさらに有する：少なくとも70%のDPAは、トリアシルグリセロール(TAG)のsn-1位またはsn-3位でエステル化されており、ALAは、総脂肪酸含有物の4%から40%の間のレベルで存在し、GLAは存在

40

50

し、及び/またはG L Aレベルは、総脂肪酸含有物の4%未満であり、S D Aレベルは、0.05%から約10%の間であり、E T Aレベルは、約4%未満であり、E P Aレベルは、0.05%から約10%の間であり、抽出脂質の総脂肪酸含有量における総一価不飽和脂肪酸レベルは、約4%から約35%の間であり、抽出脂質の総脂肪酸含有量における総多価不飽和脂肪酸レベルは、約20%から約75%の間であり、抽出脂質の総脂肪酸含有量における新6脂肪酸：新3脂肪酸の比は、約0.03から約3.0の間、好ましくは、約0.50未満であり、脂質の脂肪酸組成は：少なくとも約60%の12-デサチュラーゼによるオレイン酸からL Aへの転換効率、少なくとも約60%の6-エロンガーゼによるS D AからE T Aへの転換効率、約50%から約95%の間の5-エロンガーゼによるE P AからD P Aへの転換効率、少なくとも約10%のオレイン酸からD P Aへの転換効率に基づく。実施形態では、少なくとも81%のD P Aはトリアシルグリセロール(T A G)のs n - 1位またはs n - 3位でエステル化されている。あるいは、T A Gの形態でエステル化されたD P Aの少なくとも35%は、該T A Gのs n - 2位でエステル化されている。

10

【0032】

さらなる実施形態では、本発明の抽出脂質は、1つ以上のステロール類、好ましくは、植物ステロール類をさらに含む。

【0033】

別の実施形態では、抽出脂質はオイルの形態であり、オイル1g当たり約10mg未満のステロール類、オイル1g当たり約7mg未満のステロール類、オイル1g当たり約1.5mgから約10mgの間のステロール類、またはオイル1g当たり約1.5mgから約7mgの間のステロール類を含む。

20

【0034】

抽出脂質中のあり得るステロール類の例としては、必ずしも限定されないが、1つ以上または全てのカンベステロール/24-メチルコレステロール、5-スチグマステロール、エブリコール、シトステロール/24-エチルコレステロール、5-アベナスステロール/イソフコステロール、7-スチグマステロール/スチグマスト-7-エン-3-オール、及び7-アベナスステロールが挙げられる。

【0035】

実施形態では、植物種は、セイヨウアブラナなど、表14にリストしたものであり、ステロール類のレベルは、その特定の植物種について、表14にリストしたものとほぼ同じである。該植物種は、カラシナ(B. juncea)またはカンナビス・サティバ(C. sativa)であってよく、それぞれ、野生型カラシナまたはカンナビス・サティバ抽出オイル中に見られる辺りのステロール類のレベルを含む。

30

【0036】

実施形態では、抽出植物脂質は、1つ以上または全てのカンベステロール/24-メチルコレステロール、5-スチグマステロール、エブリコール、シトステロール/24-エチルコレステロール、5-アベナスステロール/イソフコステロール、7-スチグマステロール/スチグマスト-7-エン-3-オール、及び7-アベナスステロールを含む、または野生型キャノーラオイルと本質的に同じステロール含有率を有する。

40

【0037】

実施形態では、抽出脂質は、野生型キャノーラオイル、カラシナオイルまたはカンナビス・サティバオイルと本質的に同じステロール含有率を有する。

【0038】

実施形態では、抽出脂質は、オイル1g当たり約0.5mg未満のコレステロール、オイル1g当たり約0.25mg未満のコレステロール、オイル1g当たり約0mgから約0.5mgの間のコレステロール、またはオイル1g当たり約0mgから約0.25mgの間のコレステロールを含む、またはコレステロールを本質的に含まない。

【0039】

さらなる実施形態では、脂質はオイル、好ましくは、油料種子のオイルである。かか

50

るオイルの例としては、これに限定されないが、例えば、キャノーラオイルもしくはカラシナオイルなどのアブラナ属 (*Brassica* sp.) オイル、ワタ (*Gossypium hirsutum*) オイル、アマ (*Linum usitatissimum*) オイル、ヘリアンタス属 (*Helianthus* sp.) オイル、ベニバナ (*Carthamus tinctorius*) オイル、ダイズ (*Glycine max*) オイル、トウモロコシ (*Zea mays*) オイル、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) オイル、モロコシ (*Sorghum bicolor*) オイル、モロコシ (*Sorghum vulgare*) オイル、エンバク (*Avena sativa*) オイル、トリフォリウム属 (*Trifolium* sp.) オイル、ギニアアブラヤシ (*Elaeis guineensis*) オイル、ベンサミアナタバコ (*Nicotiana benthamiana*) オイル、オオムギ (*Hordeum vulgare*) オイル、アオバナルーピン (*Lupinus angustifolius*) オイル、イネ (*Oryza sativa*) オイル、アフリカイネ (*Oryza glaberrima*) オイル、カメリナサティバ (*Camelina sativa*) オイル、クランベアビシニカ (*Crambe abyssinica*) オイル、ジャイアントミスカンサス (*Miscanthus x giganteus*) オイル、またはススキ (*Miscanthus sinensis*) オイルが挙げられる。より好ましくは、オイルは、アブラナ属 (*Brassica* sp.) オイル、カメリナ・サティバ (*Camelina sativa*) オイルまたはグリシンマックス (*Glycine max*) (ダイズ) オイルである。実施形態では、脂質は、セイヨウアブラナ (*Brassica napus*) オイルまたはカラシナ (*Brassica juncea*) オイルなどのアブラナ属 (*Brassica* sp.) オイル、ワタ (*Gossypium hirsutum*) オイル、アマ (*Linum usitatissimum*) オイル、ヘリアンタス属 (*Helianthus* sp.) オイル、ベニバナ (*Carthamus tinctorius*) オイル、ダイズ (*Glycine max*) オイル、トウモロコシ (*Zea mays*) オイル、ギニアアブラヤシ (*Elaeis guineensis*) オイル、ベンサミアナタバコ (*Nicotiana benthamiana*) オイル、アオバナルーピン (*Lupinus angustifolius*) オイル、カメリナサティバ (*Camelina sativa*) オイル、クランベアビシニカ (*Crambe abyssinica*) オイル、ジャイアントミスカンサス (*Miscanthus x giganteus*) オイル、またはススキ (*Miscanthus sinensis*) オイルを含むまたはである。さらなる実施形態では、該オイルは、キャノーラオイル、カラシナ (*B. juncea*) オイル、ダイズ (*Glycine max*) オイル、カメリナサティバ (*Camelina sativa*) オイルまたはシロイヌナズナ (*A. thaliana*) オイル及び/またはカメリナサティバ (*C. sativa*) オイル以外の植物オイルである。実施形態では、植物オイルは、*G. max* (ダイズ) オイル以外のオイルである。実施形態では、該オイルを、例えば、実施例 1 に記載の標準条件下に生育した植物から、または標準条件下、畑または温室で生育した植物から得た。

【0040】

別の態様では、本発明は、

i) 脂質を含む植物部分を得る工程であって、該脂質がエステル化された形態の脂肪酸を含み、該脂肪酸がオレイン酸、パルミチン酸、リノール酸 (LA) 及び - リノレン酸 (GLA) を含む 6 脂肪酸、 - リノレン酸 (ALA)、ステアリドン酸 (SDA)、ドコサペンタエン酸 (DPA) 及びドコサヘキサエン酸 (DHA) を含み、場合により、エイコサペンタエン酸 (EPA) 及びエイコサテトラエン酸 (ETA) のうち 1 つ以上を含んでもよい 3 脂肪酸を含み、該植物部分における該抽出脂質の総脂肪酸含有量における DHA のレベルが 20.1% から 30% の間または 20.1% から 35% の間である該工程、及び

ii) 該植物部分から脂質を抽出する工程を含み、該抽出脂質の総脂肪酸含有量における DHA のレベルが 20.1% から 30% の間または 20.1% から 35% の間である、抽出植物脂質の産生方法を提供する。

【0041】

さらなる態様では、本発明は、

i) 脂質を含む植物部分を得る工程であって、前記脂質がエステル化された形態の脂肪酸を含み、前記脂肪酸がオレイン酸、パルミチン酸、リノール酸 (LA) 及び - リノレン酸 (GLA) を含む 6 脂肪酸、 - リノレン酸 (ALA)、ステアリドン酸 (SDA)、ドコサペンタエン酸 (DPA) 及びドコサヘキサエン酸 (DHA) を含み、場合によ

って、エイコサペンタエン酸（EPA）及びエイコサテトラエン酸（ETA）のうち1つ以上を含んでもよい 3 脂肪酸を含み、前記抽出脂質の総脂肪酸含有量におけるパルミチン酸レベルが約2%から16%の間であり、前記抽出脂質の総脂肪酸含有量におけるミリスチン酸（C14：0）のレベルが、存在する場合、1%未満であり、該植物部分における前記抽出脂質の総脂肪酸含有量におけるDHAのレベルが20.1%から30%の間または20.1%から35%の間である前記工程、及び

i i) 該植物部分から脂質を抽出する工程
を含み、該抽出脂質の総脂肪酸含有量におけるDHAのレベルが20.1%から30%の間または20.1%から35%の間である、抽出植物脂質の産生方法を提供する。

【0042】

さらなる態様では、本発明は、

i) 脂質を含む植物部分を得る工程であって、該脂質がエステル化された形態の脂肪酸を含み、該脂肪酸がオレイン酸、パルミチン酸、リノール酸（LA）を含む 6 脂肪酸、
- リノレン酸（ALA）、ステアリドン酸（SDA）、ドコサペンタエン酸（DPA）及びドコサヘキサエン酸（DHA）を含み、場合によって、エイコサペンタエン酸（EPA）及びエイコサテトラエン酸（ETA）のうち1つ以上を含んでもよい 3 脂肪酸を含み、該抽出脂質の総脂肪酸含有量におけるパルミチン酸レベルが約2%から16%の間であり、該抽出脂質の総脂肪酸含有量におけるミリスチン酸（C14：0）のレベルが、存在する場合、1%未満であり、該植物部分における該抽出脂質の総脂肪酸含有量におけるDHAのレベルが20.1%から30%の間または20.1%から35%の間である該工程、及び

i i) 該植物部分から脂質を抽出する工程
を含み、該抽出脂質の総脂肪酸含有量におけるDHAのレベルが20.1%から30%の間または20.1%から35%の間である、抽出植物脂質の産生方法を提供する。

【0043】

上記3つの態様の実施形態では、本発明は、

i) 脂質を含む植物部分を得る工程であって、該脂質がエステル化された形態の脂肪酸を含み、該脂質は、オレイン酸、パルミチン酸、リノール酸（LA）を含む 6 脂肪酸、
- リノレン酸（ALA）及びドコサヘキサエン酸（DHA）を含み、ステアリドン酸（SDA）、エイコサペンタエン酸（EPA）、ドコサペンタエン酸（DPA）及びエイコサテトラエン酸（ETA）のうち1つ以上を含む 3 脂肪酸を含む脂肪酸組成を有し、
(i) 該抽出脂質の総脂肪酸含有量におけるDHAレベルが20.1%から30%の間または20.1%から35%の間、好ましくは30%から35%の間であり、(i i) 該抽出脂質の総脂肪酸含有量におけるパルミチン酸レベルが2%から16%の間であり、(i i i) 該抽出脂質の総脂肪酸含有量におけるミリスチン酸（C14：0）レベルが1%未満であり、(i v) 該抽出脂質の総脂肪酸含有量におけるオレイン酸レベルが1%から30%の間であり、(v) 該抽出脂質の総脂肪酸含有量におけるリノール酸（LA）レベルが4%から35%の間であり、(v i) 該抽出脂質の総脂肪酸含有量における - リノレン酸（ALA）が4%から40%の間であり、(v i i) 該抽出脂質の総脂肪酸含有量におけるエイコサトリエン酸（ETrA）レベルが4%未満であり、(v i i i) 該抽出脂質の総脂肪酸含有量における総飽和脂肪酸レベルが4%から25%の間であり、(i x) 該抽出脂質の総脂肪酸含有量における総 6 脂肪酸：総 3 脂肪酸の比が0.05から1の間であり、(x) 該脂質のトリアシルグリセロール（TAG）含有率が少なくとも70%であり、及び(x i) TAGの形態でエステル化された少なくとも70%のDHAが該TAGのsn-1位またはsn-3位である前記工程、並びに

i i) 該植物部分から脂質を抽出する工程
を含み、該抽出脂質の総脂肪酸含有量におけるDHAのレベルが約20.1%から30%の間または20.1%から35%の間、好ましくは、30%から35%の間である、抽出植物脂質の産生方法を提供する。好ましくは、TAGの形態でエステル化されたDHAの少なくとも81%または少なくとも90%は、該TAGのsn-1位またはsn-3位で

10

20

30

40

50

ある。

【0044】

さらなる態様では、本発明は、

I) 脂質を含む植物部分または微生物細胞を得る工程であって、該脂質がエステル化された形態の脂肪酸を含み、前記脂肪酸がオレイン酸、パルミチン酸、リノール酸(LA)を含む6脂肪酸、α-リノレン酸(ALA)及びドコサペンタエン酸(DPA)を含み、場合により、ステアリドン酸(SDA)、エイコサペンタエン酸(EPA)及びエイコサテトラエン酸(ETA)のうち1つ以上を含んでもよい3脂肪酸を含み、該植物部分または微生物細胞の脂質の総脂肪酸含有量におけるDPAのレベルが約7%から35%の間である該工程、及び

ii) 該植物部分または微生物細胞から脂質を抽出する工程を含み、該抽出脂質の総脂肪酸含有量におけるDPAのレベルが約7%から35%の間である、抽出植物脂質または微生物脂質の産生方法を提供する。実施形態では、該抽出脂質の総脂肪酸含有量におけるDPAのレベルが約7%から20%の間または20.1%から35%の間である。

【0045】

上記態様の実施形態では、本発明は、

i) 脂質を含む植物部分または微生物細胞を得る工程であって、該脂質がエステル化された形態の脂肪酸を含み、該脂質は、α-リノレン酸(ALA)及びドコサヘキサエン酸(DPA)を含み、ステアリドン酸(SDA)、エイコサペンタエン酸(EPA)、及びエイコサテトラエン酸(ETA)のうち1つ以上を含む3脂肪酸を含む脂肪酸組成を有し、(i) 該抽出脂質の総脂肪酸含有量におけるDPAレベルが7%から30%の間または7%から35%の間、好ましくは30%から35%の間であり、(ii) 該抽出脂質の総脂肪酸含有量におけるパルミチン酸レベルが2%から16%の間であり、(iii) 該抽出脂質の総脂肪酸含有量におけるミリスチン酸(C14:0)レベルが6%未満、好ましくは1%未満であり、(iv) 該抽出脂質の総脂肪酸含有量におけるオレイン酸レベルが1%から30%の間であり、(v) 該抽出脂質の総脂肪酸含有量におけるリノール酸(LA)レベルが4%から35%の間であり、(vi) 該抽出脂質の総脂肪酸含有量におけるα-リノレン酸(ALA)が4%から40%の間であり、(vii) 該抽出脂質の総脂肪酸含有量におけるエイコサトリエン酸(ETrA)レベルが4%未満であり、(viii) 該抽出脂質の総脂肪酸含有量における総飽和脂肪酸レベルが4%から25%の間であり、(ix) 該抽出脂質の総脂肪酸含有量における総6脂肪酸：総3脂肪酸の比が0.05から1の間であり、(x) 該脂質のトリアシルグリセロール(TAG)含有率が少なくとも70%であり、及び(xi) TAGの形態でエステル化された少なくとも70%のDPAが該TAGのsn-1位またはsn-3位である前記工程、並びに

ii) 該植物部分から脂質を抽出する工程を含み、該抽出脂質の総脂肪酸含有量におけるDPAのレベルが約7%から30%の間または7%から35%の間、好ましくは、30%から35%の間である、抽出植物脂質または微生物脂質の産生方法を提供する。好ましくは、TAGの形態でエステル化されたDPAの少なくとも81%または少なくとも90%は、該TAGのsn-1位またはsn-3位である。

【0046】

別の態様では、本発明は、

i) 脂質を含む細胞、好ましくは、細胞を含む植物部分または微生物細胞を得る工程であって、該脂質は、エステル化された形態の脂肪酸を含み、該脂肪酸は、ドコサペンタエン酸(DPA)及び/またはドコサヘキサエン酸(DHA)を含み、トリアシルグリセロール(TAG)の形態でエステル化された少なくとも35%のDPA及び/またはDHAは、該TAGのsn-2位でエステル化されている前記工程、及び

ii) 該細胞から脂質を抽出する工程

を含み、該抽出脂質の総脂肪酸含有量におけるトリアシルグリセロール (TAG) の形態でエステル化された少なくとも 35 % の DPA 及び / または DHA は、該 TAG の sn - 2 位でエステル化されている、抽出脂質の産生方法を提供する。実施形態では、該方法により産生された抽出脂質は、(i) オレイン酸、パルミチン酸、リノール酸 (LA) を含む 6 脂肪酸、 - リノレン酸 (ALA) を含む、場合により、ステアリドン酸 (SDA)、エイコサペンタエン酸 (EPA)、及びエイコサテトラエン酸 (ETA) の 1 つ以上を含んでもよい 3 脂肪酸を含む こと、(ii) 少なくとも約 40 %、少なくとも約 45 %、少なくとも約 48 %、35 % から約 60 % の間、または 35 % から約 50 % の間のトリアシルグリセロール (TAG) の形態でエステル化された DPA 及び / または DHA が該 TAG の sn - 2 位でエステル化されていること、及び (iii) 該抽出脂質の総脂肪酸含有量における DPA 及び / または DHA のレベルが約 1 % から 35 % の間、または約 7 % から 35 % の間または約 20 . 1 % から 35 % の間であることの 1 つ以上または全てにより、さらに特徴付けられる。本態様の実施形態では、該抽出脂質の総脂肪酸含有量における DPA 及び / または DHA のレベルは、約 7 %、約 8 %、約 9 %、約 10 %、約 12 %、約 15 %、約 18 %、約 20 %、約 22 %、約 24 %、約 26 %、約 28 %、約 30 %、約 7 % から約 28 % の間、約 7 % から約 25 % の間、約 10 % から約 35 % の間、約 10 % から約 30 % の間、約 10 % から約 25 % の間、約 10 % から約 22 % の間、約 14 % から約 35 % の間、約 16 % から約 35 % の間、約 16 % から約 30 % の間、約 16 % から約 25 % の間、または約 16 % から約 22 % の間である。好ましい実施形態では、該抽出脂質は、(i) 及び (ii)、(i) 及び (iii) または (ii) 及び (iii)、より好ましくは、(i)、(ii) 及び (iii) の全てにより特徴付けられる。好ましくは、該抽出脂質は、約 2 % から 16 % の間である該抽出脂質の総脂肪酸含有量におけるパルミチン酸レベル、及び、もし存在する場合、1 % 未満である該抽出脂質の総脂肪酸含有量におけるミリスチン酸 (C14 : 0) レベルにより、さらに特徴付けられる。

【 0047 】

上記態様の実施形態では、本発明は、

i) 脂質を含む細胞、好ましくは、細胞を含む植物部分または微生物細胞を得る工程であって、該脂質がエステル化された形態の脂肪酸を含み、該脂肪酸は、ドコサペンタエン酸 (DPA) 及び / またはドコサヘキサエン酸 (DHA) を含み、オレイン酸、パルミチン酸、リノール酸 (LA) を含む 6 脂肪酸、 - リノレン酸 (ALA) を含む、ステア
リドン酸 (SDA)、エイコサペンタエン酸 (EPA)、及びエイコサテトラエン酸 (E
 T A) のうち 1 つ以上を 含む 3 脂肪酸を さらに含み、(i) 該抽出脂質の総脂肪酸含有
 量におけるパルミチン酸レベルが 2 % から 16 % の間であり、(ii) 該抽出脂質の総脂
 肪酸含有量におけるミリスチン酸 (C14 : 0) レベルが 1 % 未満であり、(iii) 該
 抽出脂質の総脂肪酸含有量におけるオレイン酸レベルが 1 % から 30 % の間であり、(i
 v) 該抽出脂質の総脂肪酸含有量におけるリノール酸 (LA) レベルが 4 % から 35 % の
 間であり、(v) 該抽出脂質の総脂肪酸含有量における - リノレン酸 (ALA) が 4 %
から 40 % の間であり、(vi) 該抽出脂質の総脂肪酸含有量におけるエイコサトリエン
酸 (ETrA) レベルが 4 % 未満であり、(vii) 該抽出脂質の総脂肪酸含有量におけ
る総飽和脂肪酸レベルが 4 % から 25 % の間であり、(viii) 該抽出脂質の総脂肪酸
含有量における総 6 脂肪酸：総 3 脂肪酸の比が 0 . 05 から 1 の間であり、(ix)
該脂質のトリアシルグリセロール (TAG) 含有率が少なくとも 70 % であり、及び (x)
トリアシルグリセロール (TAG) の形態でエステル化された少なくとも 35 % の DPA
及び / または DHA が該 TAG の sn - 2 位でエステル化されている前記工程、並びに
 i i) 該植物部分から脂質を抽出する工程

を含み、該抽出脂質の総脂肪酸含有量におけるトリアシルグリセロール (TAG) の形態でエステル化された少なくとも 35 % の DPA 及び / または DHA は、該 TAG の sn - 2 位でエステル化されている、抽出脂質の産生方法を提供する。

【 0048 】

植物部分または微生物細胞を得る工程は、該植物部分を産生する植物から植物部分、好

ましくは種子を収穫すること、かかる細胞の培養液から微生物細胞を回収すること、または製造業者もしくは供給業者から購入、または輸入により該植物部分もしくは微生物細胞を得ることを含んでもよい。方法は、植物部分もしくは微生物細胞試料中の脂質、または抽出脂質の脂肪酸組成を決定する工程を含んでもよい。

【0049】

好ましい実施形態では、本発明の方法により得られた抽出脂質は、該当する場合、本明細書で定義した通り、例えば、最初の4つの態様に関連した上記定義した通りの1つ以上の特徴を有する。

【0050】

上記5つの態様の各々の実施形態を、以下、さらに詳細に説明する。当業者が理解するように、上記態様の対応する特徴より広範である、記載されたいかなる実施形態もその態様に適用しない。

【0051】

実施形態では、植物部分は種子、好ましくは油料種子である。かかる種子の例としては、これに限定されないが、アブラナ属 (*Brassica* sp.)、ワタ (*Gossypium hirsutum*)、アマ (*Linum usitatissimum*)、ヘリアンタス属 (*Helianthus* sp.)、ベニバナ (*Carthamus tinctorius*)、ダイズ (*Glycine max*)、トウモロコシ (*Zea mays*)、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*)、モロコシ (*Sorghum bicolor*)、モロコシ (*Sorghum vulgare*)、エンバク (*Avena sativa*)、トリフォリウム属 (*Trifolium* sp.)、ギニアアブラヤシ (*Elaeis guineensis*)、ベンサミアナタバコ (*Nicotiana benthamiana*)、オオムギ (*Hordeum vulgare*)、アオバナルーピン (*Lupinus angustifolius*)、イネ (*Oryza sativa*)、アフリカイネ (*Oryza glaberrima*)、カメリナサティバ (*Camelina sativa*)、または克蘭ベアビシニカ (*Crambe abyssinica*)、好ましくは、アブラナ属 (*Brassica* sp.) の種子、カメリナサティバ (*C. sativa*) の種子または *G. max* (ダイズ) の種子、より好ましくは、セイヨウアブラナ (*Brassica napus*)、カラシナ (*B. juncea*) またはカメリナサティバ (*C. sativa*) の種子が挙げられる。実施形態では、植物部分は、種子、好ましくは、セイヨウアブラナ (*Brassica napus*) またはカラシナ (*Brassica juncea*) などのアブラナ属 (*Brassica* sp.)、ワタ (*Gossypium hirsutum*)、アマ (*Linum usitatissimum*)、ヘリアンタス属 (*Helianthus* sp.)、ベニバナ (*Carthamus tinctorius*)、ダイズ (*Glycine max*)、トウモロコシ (*Zea mays*)、ギニアアブラヤシ (*Elaeis guineensis*)、ベンサミアナタバコ (*Nicotiana benthamiana*)、アオバナルーピン (*Lupinus angustifolius*)、カメリナサティバ (*Camelina sativa*)、または克蘭ベアビシニカ (*Crambe abyssinica*)、好ましくは、セイヨウアブラナ (*Brassica napus*)、カラシナ (*B. juncea*) またはカメリナサティバ (*C. sativa*) の種子などの油料種子である。実施形態では、種子は、キャノーラ種子、カラシナ種子、ダイズ種子、カメリナサティバ (*Camelina sativa*) 種子またはシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 種子である。代替の実施形態では、該種子は、シロイヌナズナ (*A. thaliana*) の種子及び/またはカメリナサティバ (*C. sativa*) の種子以外の種子である。実施形態では、種子は、ダイズの種子以外の種子である。実施形態では、植物部分は、アブラナ属 (*Brassica* sp.) 種子である。実施形態では、該種子を、例えば、実施例1に記載の標準条件下に生育した植物から、または標準条件下、畑または温室で生育した植物から得た。

【0052】

別の実施形態では、種子は、種子1g当たり、少なくとも約18mg、少なくとも約22mg、少なくとも約26mg、約18mgから約100mgの間、約22mgから約70mgの間、約80mg、約30mgから約80mgの間、または約24mgから約50mgの間のDHA及び/またはDPAを含む。

【0053】

さらなる実施形態では、種子などの植物部分は、酵素の以下のセット；

i) 3 - デサチュラーゼ、 6 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 4 - デサチュラーゼ、 6 - エロンガーゼ及び 5 - エロンガーゼ、

10

20

30

40

50

i i) 15 - デサチュラーゼ、 6 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 4 - デサチュラーゼ、 6 - エロンガーゼ及び 5 - エロンガーゼ、

i i i) 12 - デサチュラーゼ、 6 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 4 - デサチュラーゼ、 6 - エロンガーゼ及び 5 - エロンガーゼ、

i v) 12 - デサチュラーゼ、 3 - デサチュラーゼ及び / または 15 - デサチュラーゼ、 6 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 4 - デサチュラーゼ、 6 - エロンガーゼ及び 5 - エロンガーゼ、

v) 3 - デサチュラーゼ、 8 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 4 - デサチュラーゼ、 9 - エロンガーゼ及び 5 - エロンガーゼ、

v i) 15 - デサチュラーゼ、 8 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 4 - デサチュラーゼ、 9 - エロンガーゼ及び 5 - エロンガーゼ、

v i i) 12 - デサチュラーゼ、 8 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 4 - デサチュラーゼ、 9 - エロンガーゼ及び 5 - エロンガーゼ、

v i i i) 12 - デサチュラーゼ、 3 - デサチュラーゼ及び / または 15 - デサチュラーゼ、 8 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 4 - デサチュラーゼ、 9 - エロンガーゼ及び 5 - エロンガーゼ、

の1つをコードする外来性ポリヌクレオチドを含み、各ポリヌクレオチドは、該植物部分の細胞内の前記ポリヌクレオチドの発現を誘導可能である1つ以上のプロモーターと作動可能に結合している。

【0054】

さらなる実施形態では、種子などの植物部分または微生物細胞などの組換え細胞は、酵素の以下のセット；

i) 3 - デサチュラーゼ及び / または 15 - デサチュラーゼ、 6 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 6 - エロンガーゼ及び 5 - エロンガーゼ、

i i) 12 - デサチュラーゼ、 6 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 6 - エロンガーゼ及び 5 - エロンガーゼ、

i i i) 12 - デサチュラーゼ、 3 - デサチュラーゼ及び / または 15 - デサチュラーゼ、 6 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 6 - エロンガーゼ及び 5 - エロンガーゼ、

i v) 3 - デサチュラーゼ及び / または 15 - デサチュラーゼ、 8 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 9 - エロンガーゼ及び 5 - エロンガーゼ、

v) 12 - デサチュラーゼ、 8 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 9 - エロンガーゼ及び 5 - エロンガーゼ、

v i) 12 - デサチュラーゼ、 3 - デサチュラーゼ及び / または 15 - デサチュラーゼ、 8 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 9 - エロンガーゼ及び 5 - エロンガーゼ

の1つをコードする外来性ポリヌクレオチドを含み、各ポリヌクレオチドは、該植物部分または細胞の細胞内の前記ポリヌクレオチドの発現を誘導可能である1つ以上のプロモーターと作動可能に結合している。

【0055】

実施形態では、もし、植物部分または細胞がエステル化された形態の脂肪酸を含む脂質を含み、該脂肪酸がドコサペンタエン酸 (DPA) 及び / またはドコサヘキサエン酸 (DHA) を含み、トリアシルグリセロール (TAG) の形態でエステル化された少なくとも35%のDPA及び / またはDHAが該TAGのsn-2位でエステル化されているならば、種子などの植物部分または微生物細胞などの組換え細胞は、1 - アシル - グリセロール - 3 - リン酸アシルトランスフェラーゼ (LPAAAT) をコードする外来性ポリヌクレオチドを含み、該ポリヌクレオチドは、該植物部分の細胞もしくは細胞中のポリヌクレオチドの発現を誘導可能である1つ以上のプロモーターと作動可能に結合している。さらなる実施形態では、該細胞は、酵素の以下のセット；

i) 1 - アシル - グリセロール - 3 - リン酸アシルトランスフェラーゼ (LPAAAT)

、 3 - デサチュラーゼ、 6 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 6 - エロンガーゼ、 5 - エロンガーゼ、及び場合により、 4 - デサチュラーゼ、

i i) 1 - アシル - グリセロール - 3 - リン酸アシルトランスフェラーゼ (L P A A T)、 15 - デサチュラーゼ、 6 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 6 - エロンガーゼ、 5 - エロンガーゼ、及び場合により、 4 - デサチュラーゼ、

i i i) 1 - アシル - グリセロール - 3 - リン酸アシルトランスフェラーゼ (L P A A T)、 12 - デサチュラーゼ、 6 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 6 - エロンガーゼ、 5 - エロンガーゼ、及び場合により、 4 - デサチュラーゼ、

i v) 1 - アシル - グリセロール - 3 - リン酸アシルトランスフェラーゼ (L P A A T)、 12 - デサチュラーゼ、 3 - デサチュラーゼ及び/または 15 - デサチュラーゼ、 6 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 6 - エロンガーゼ及び 5 - エロンガーゼ、及び場合により、 4 - デサチュラーゼ、

v) 1 - アシル - グリセロール - 3 - リン酸アシルトランスフェラーゼ (L P A A T)、 3 - デサチュラーゼ、 8 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 9 - エロンガーゼ、 5 - エロンガーゼ、及び場合により、 4 - デサチュラーゼ、

v i) 1 - アシル - グリセロール - 3 - リン酸アシルトランスフェラーゼ (L P A A T)、 15 - デサチュラーゼ、 8 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 9 - エロンガーゼ、 5 - エロンガーゼ、及び場合により、 4 - デサチュラーゼ、

v i i) 1 - アシル - グリセロール - 3 - リン酸アシルトランスフェラーゼ (L P A A T)、 12 - デサチュラーゼ、 8 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 9 - エロンガーゼ、 5 - エロンガーゼ、及び場合により、 4 - デサチュラーゼ、

v i i i) 1 - アシル - グリセロール - 3 - リン酸アシルトランスフェラーゼ (L P A A T)、 12 - デサチュラーゼ、 3 - デサチュラーゼ及び/または 15 - デサチュラーゼ、 8 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 9 - エロンガーゼ、 5 - エロンガーゼ、及び場合により、 4 - デサチュラーゼ、

の1つをコードする外来性ポリヌクレオチドを含み、各ポリヌクレオチドは、該細胞内の前記ポリヌクレオチドの発現を誘導可能である1つ以上のプロモーターと作動可能に結合している。好ましくは、L P A A Tは、D H A - C o A及び/またはD P A - C o AなどのC 2 2多価不飽和脂肪アシル - C o A基質を使用できる。

【 0 0 5 6 】

実施形態では、 1 2 デサチュラーゼは、 3 - デサチュラーゼ及び/または 1 5 - デサチュラーゼ活性も有する、すなわち、該活性は、1つのポリペプチドにより与えられる。あるいは、 1 2 デサチュラーゼは、 3 - デサチュラーゼ活性を有さず、かつ 1 5 - デサチュラーゼ活性を有さない、すなわち、 1 2 デサチュラーゼは、 3 - デサチュラーゼ活性及び/または 1 5 - デサチュラーゼを有するポリペプチドと別のポリペプチドである。

【 0 0 5 7 】

さらなる実施形態では、種子などの植物部分または微生物細胞などの組換え細胞は、以下の特徴；

i) 1 2 デサチュラーゼが、少なくとも約 6 0 %、少なくとも約 7 0 %、少なくとも約 8 0 %、約 6 0 % から約 9 5 % の間、約 7 0 % から約 9 0 % の間、または約 7 5 % から約 8 5 % の間の効率で、1つ以上の該植物部分の細胞内または組換え細胞内において、オレイン酸をリノール酸に転換すること、

i i) 3 デサチュラーゼが、少なくとも約 6 5 %、少なくとも約 7 5 %、少なくとも約 8 5 %、約 6 5 % から約 9 5 % の間、約 7 5 % から約 9 1 % の間、または約 8 0 % から約 9 1 % の間の効率で、1つ以上の該植物部分の細胞内または組換え細胞内において、6 脂肪酸を 3 脂肪酸に転換すること、

i i i) 6 デサチュラーゼが、少なくとも約 2 0 %、少なくとも約 3 0 %、少なくとも約 4 0 %、少なくとも約 5 0 %、少なくとも約 6 0 %、少なくとも約 7 0 %、約 3 0 % から約 7 0 % の間、約 3 5 % から約 6 0 % の間、または約 5 0 % から約 7 0 % の間の効

10

20

30

40

50

率で、1つ以上の該植物部分の細胞内または組換え細胞内において、ALAをSDAに転換すること、

i v) 6 デサチュラーゼが、約5%未満、約2.5%未満、約1%未満、約0.1%から約5%の間、約0.5%から約2.5%の間、または約0.5%から約1%の間の効率で、1つ以上の該植物部分の細胞内または組換え細胞内において、リノール酸をリノレン酸に転換すること、

v) 6 エロンガーゼが、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、約60%から約95%の間、約70%から約80%の間、または約75%から約80%の間の効率で、1つ以上の該植物部分の細胞内または組換え細胞内において、SDAをETAに転換すること、

10

vi) 5 デサチュラーゼが、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、約60%から約95%の間、約70%から約95%の間、または約75%から約95%の間の効率で、1つ以上の該植物部分の細胞内または組換え細胞内において、ETAをEPAに転換すること、

vii) 5 エロンガーゼが、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、約50%から約90%の間、または約85%から約95%の間の効率で、1つ以上の該植物部分の細胞内または組換え細胞内において、EPAをDPAに転換すること、

viii) 4 デサチュラーゼが、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約93%、約50%から約95%の間、約80%から約95%の間、または約85%から約95%の間の効率で、1つ以上の該植物部分の細胞内または組換え細胞内において、DPAをDHAに転換すること、

20

ix) 1つ以上の該植物部分の細胞または組換え細胞内において、オレイン酸をDHAまたはDPAに転換する効率が、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、約20%、約25%、約30%、約10%から約50%の間、約10%から約30%の間、または約10%から約25%の間、または約20%から約30%の間であること、

x) 1つ以上の該植物部分の細胞内または組換え細胞内において、LAをDHAまたはDPAに転換する効率が、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約22%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、約25%、約30%、約35%、約15%から約50%の間、約20%から約40%の間、または約20%から約30%の間であること、

30

xi) 1つ以上の該植物部分の細胞内または組換え細胞内において、ALAをDHAまたはDPAに転換する効率が、少なくとも約17%、少なくとも約22%、少なくとも約24%、少なくとも約30%、約30%、約35%、約40%、約17%から約55%の間、約22%から約35%の間、または約24%から約35%の間であること、

xii) 1つ以上の該植物部分の細胞または組換え細胞は、該外来性ポリヌクレオチドを含まない対応細胞より、少なくとも約25%、少なくとも約30%、約25%から約40%の間、または約27.5%から約37.5%の間で多い3脂肪酸を含むこと、

xiii) 6 - デサチュラーゼは、リノール酸(LA)と比較して - リノレン酸(ALA)を優先的に不飽和化すること、

40

xiv) 6 - エロンガーゼは、9 - エロンガーゼ活性も有すること、

xv) 12 - デサチュラーゼは、15 - デサチュラーゼ活性も有すること、

xvi) 6 - デサチュラーゼは、8 - デサチュラーゼ活性も有すること、

xvii) 8 - デサチュラーゼは、6 - デサチュラーゼ活性も有する、または6 - デサチュラーゼ活性を有しないこと、

xviii) 15 - デサチュラーゼは、GLAに対する3 - デサチュラーゼ活性も有すること、

xix) 3 - デサチュラーゼは、LAに対する15 - デサチュラーゼ活性も有すること、

50

xx) 3 - デサチュラーゼは、LA 及び / または GLA の両方を不飽和化すること、
 xxi) 3 - デサチュラーゼは、LA と比較して GLA を優先的に不飽和化すること

、
 xxi) 1 つ以上または全てのデサチュラーゼ、好ましくは 6 - デサチュラーゼ及び / または 5 - デサチュラーゼは、対応するアシル PC 基質より、アシル - CoA 基質に対して高い活性を有すること、

xxiii) 6 - デサチュラーゼは、脂肪酸基質として、LA より、ALA に対して高い 6 - デサチュラーゼ活性を有すること、

xxiv) 6 - デサチュラーゼは、脂肪酸基質としての PC の Sn - 2 位と結合した ALA に対するより、脂肪酸基質としての ALA - CoA に対して高い 6 - デサチュラーゼ活性を有すること、

xxv) 6 - デサチュラーゼは、LA と比較して、基質としての ALA に対して、少なくとも約 2 倍高い 6 - デサチュラーゼ活性、少なくとも 3 倍高い活性、少なくとも 4 倍高い活性、または少なくとも 5 倍高い活性を有すること、

xxvi) 6 - デサチュラーゼは、脂肪酸基質としての PC の sn - 2 位と結合した ALA に対するより、脂肪酸基質としての ALA - CoA に対して高い活性を有すること

、
 xxvii) 6 - デサチュラーゼは、脂肪酸基質としての PC の sn - 2 位に結合した ALA に対するより、脂肪酸基質としての ALA - CoA に対して、少なくとも約 5 倍高い 6 - デサチュラーゼ活性または少なくとも 10 倍高い活性を有すること、

xxviii) デサチュラーゼは、フロントエンドデサチュラーゼであること、及び
 xxix) 6 - デサチュラーゼは、ETA に対する検出可能な 5 - デサチュラーゼ活性を有しないこと

の 1 つ以上または全てを有する。

【0058】

さらなる実施形態では、種子などの植物部分または微生物細胞などの組換え細胞は、以下の特徴の 1 つ以上または全てを有する。

i) 12 - デサチュラーゼは、配列番号 4 で提供される配列を有するアミノ酸、その生物活性なフラグメント、または配列番号 4 と少なくとも 50 % 同一なアミノ酸配列を含むこと、

ii) 3 - デサチュラーゼは、配列番号 6 で提供される配列を有するアミノ酸、その生物活性なフラグメント、または配列番号 6 と少なくとも 50 % 同一なアミノ酸配列を含むこと、

iii) 6 - デサチュラーゼは、配列番号 9 で提供される配列を有するアミノ酸、その生物活性なフラグメント、または配列番号 9 と少なくとも 50 % 同一なアミノ酸配列を含むこと、

iv) 6 - エロンガーゼは、配列番号 16 で提供される配列を有するアミノ酸、配列番号 17 などのその生物活性なフラグメント、または配列番号 16 及び / または配列番号 17 と少なくとも 50 % 同一なアミノ酸配列を含むこと、

v) 5 - デサチュラーゼは、配列番号 20 で提供される配列を有するアミノ酸、その生物活性なフラグメント、または配列番号 20 と少なくとも 50 % 同一なアミノ酸配列を含むこと、

vi) 5 - エロンガーゼは、配列番号 25 で提供される配列を有するアミノ酸、その生物活性なフラグメント、または配列番号 25 と少なくとも 50 % 同一なアミノ酸配列を含むこと、

vii) 4 - デサチュラーゼは、配列番号 28 で提供される配列を有するアミノ酸、その生物活性なフラグメント、または配列番号 28 と少なくとも 50 % 同一なアミノ酸配列を含むこと、

【0059】

実施形態では、種子などの植物部分または微生物細胞などの組換え細胞は、ジアシルグ

リセロールアシルトランスフェラーゼ (D G A T)、モノアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ (M G A T)、グリセロール - 3 - リン酸アシルトランスフェラーゼ (G P A T)、1 - アシル - グリセロール - 3 - リン酸アシルトランスフェラーゼ (L P A A T)、好ましくは、D H A - C o A 及び / または D P A - C o A などの C 2 2 多価不飽和脂肪アシル - C o A 基質を使用できる L P A A T、アシル - C o A : リゾホスファチジルコリンアシルトランスフェラーゼ (L P C A T)、ホスホリパーゼ A 2 (P L A 2)、ホスホリパーゼ C (P L C)、ホスホリパーゼ D (P L D)、C D P - コリンジアシルグリセロールコリンホスホトランスフェラーゼ (C P T)、ホスファチジルコリンジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ (P D A T)、ホスファチジルコリン : ジアシルグリセロールコリンホスホトランスフェラーゼ (P D C T)、アシル - C o A シンターゼ (A C S)、またはその 2 つ以上の組合せをコードする外来性ポリヌクレオチドをさらに含む。

10

【 0 0 6 0 】

別の実施形態では、種子などの植物部分または微生物細胞などの組換え細胞は、F A E 1、D G A T、M G A T、G P A T、L P A A T、L P C A T、P L A 2、P L C、P L D、C P T、P D A T、F A T B などのチオエステラーゼ、もしくは 1 2 - デサチュラーゼ、またはその 2 つ以上の組合せから選択される植物部分細胞内の内在性酵素の産生及び / または活性をダウンレギュレートする導入変異体または外来性ポリヌクレオチドをさらに含む

【 0 0 6 1 】

20

さらなる実施形態では、少なくとも 1 つ、または全てのプロモーターは、種子特異的プロモーターである。実施形態では、少なくとも 1 つ、または全てのプロモーターを、オイル生合成もしくはオレオシンをコードする遺伝子などの集積遺伝子、またはコンリニンをコードする遺伝子などの種子貯蔵タンパク質遺伝子から得た。

【 0 0 6 2 】

別の実施形態では、4 - デサチュラーゼ及び 5 - エロンガーゼをコードする外来性ポリヌクレオチドの発現を誘導するプロモーターは、該プロモーターが 1 2 - デサチュラーゼ及び 3 - デサチュラーゼをコードする外来性ポリヌクレオチドの発現を誘導する前の微生物細胞などの植物もしくは組換え細胞の発育種子内のポリヌクレオチドの発現を開始、または発現をピークにする。

30

【 0 0 6 3 】

さらなる実施形態では、外来性ポリヌクレオチドは、植物部分の細胞または微生物細胞などの組換え細胞のゲノムに組み込まれた D N A 分子、好ましくは、T - D N A 分子内に共有結合しており、好ましくは、植物部分の細胞または組換え細胞のゲノムに組み込まれたかかる D N A 分子数が、1 以下、2 もしくは 3 以下であり、または 2 もしくは 3 である場合である。

【 0 0 6 4 】

さらに別の実施形態では、植物部分は、同じまたは異なるアミノ酸配列を有する 6 - デサチュラーゼを各々コードする少なくとも 2 つの異なる外来性ポリヌクレオチドを含む。

40

【 0 0 6 5 】

さらなる実施形態では、外来性ポリヌクレオチドを含む植物部分の総オイル含有率は、該外来性ポリヌクレオチドを含まない対応する植物部分の総オイル含有率の少なくとも約 4 0 %、少なくとも約 5 0 %、少なくとも約 6 0 %、少なくとも約 7 0 %、約 5 0 % から約 8 0 % の間、または約 8 0 % から約 1 0 0 % の間である。さらなる実施形態では、外来性ポリヌクレオチドを含む種子は、該外来性ポリヌクレオチドを含まない対応する種子重量の少なくとも約 4 0 %、少なくとも約 5 0 %、少なくとも約 6 0 %、少なくとも約 7 0 %、約 5 0 % から約 8 0 % の間、または約 8 0 % から約 1 0 0 % の間である。

【 0 0 6 6 】

別の実施形態では、脂質は、オイルの形態であり、好ましくは、油料種子の種子オイル

50

であり、少なくとも約 90 重量%、少なくとも約 95 重量%、少なくとも約 98 重量%、または約 95 重量%から約 98 重量%の間の脂質はトリアシルグリセロール類である。

【0067】

さらなる実施形態では、方法は、総脂肪酸含有率パーセントとして、DHA 及び/または DPA のレベルを増加するように脂質を処理することを含む。例えば、該処理は、エステル交換反応を含む。例えば、キャノーラオイルなどの脂質を、該オイル中の脂肪酸を、メチルまたはエチルエステルなどのアルキルエステルに転換してもよく、それから、DHA 及び/または DPA の脂質またはオイルが豊富になるように分取してもよい。実施形態では、かかる処理後の脂質の脂肪酸組成は、少なくとも 40%、少なくとも 50%、少なくとも 60%、少なくとも 70%、少なくとも 80%、または少なくとも 90% の DHA 及び/または DPA を含む。処理後の脂質中の DHA : DPA 比は、好ましくは、2 : 1 より大きく、あるいは、0.5 : 1 未満である。あるいは、処理後の総脂肪酸含有量における DHA レベルは、2.0% 未満または 0.5% 未満であり、好ましくは、該脂質中に存在しない。

10

【0068】

脂質、または脂質を含むオイルも提供され、本発明の方法を用いて産生される。

【0069】

別の態様では、本発明は、多価不飽和脂肪酸のメチルまたはエチルエステルを産生する方法を提供し、該方法は、抽出植物脂質中、または抽出過程中に、トリアシルグリセロール類を、それぞれ、メタノールまたはエタノールと反応させることを含み、該抽出植物脂質は、TAG の形態でエステル化された脂肪酸を含み、該脂肪酸は、オレイン酸、パルミチン酸、リノール酸 (LA) を含む 6 脂肪酸、リノレン酸 (ALA) 及びドコサヘキサエン酸 (DHA) を含み、場合により、ステアリドン酸 (SDA)、エイコサペンタエン酸 (EPA)、ドコサペンタエン酸 (DPA) 及びエイコサテトラエン酸 (ETA) のうち 1 つ以上を含んでもよい 3 脂肪酸を含み、該抽出脂質の総脂肪酸含有量における DHA レベルは約 20.1% から 30% の間、または 20.1% から 35% の間、好ましくは、30% から 35% の間であり、それにより、多価不飽和脂肪酸のメチルまたはエチルエステルを産生する。

20

【0070】

別の態様では、本発明は、多価不飽和脂肪酸のメチルまたはエチルエステルを産生する方法を提供し、該方法は、抽出植物脂質中、または抽出過程中に、トリアシルグリセロール類を、それぞれ、メタノールまたはエタノールと反応させることを含み、該抽出植物脂質は、TAG の形態でエステル化された脂肪酸を含み、該脂肪酸は、オレイン酸、パルミチン酸、リノール酸 (LA) を含む 6 脂肪酸、リノレン酸 (ALA) 及びドコサペンタエン酸 (DPA) を含み、場合により、ステアリドン酸 (SDA)、エイコサペンタエン酸 (EPA)、及びエイコサテトラエン酸 (ETA) のうち 1 つ以上を含んでもよい 3 脂肪酸を含み、該抽出脂質の総脂肪酸含有量における DPA レベルは約 7% から 35% の間、好ましくは 20.1% から 30% の間、または、20.1% から 35% の間であり、それにより、多価不飽和脂肪酸のメチルまたはエチルエステルを産生する。

30

【0071】

別の態様では、本発明は、ドコサペンタエン酸 (DPA) 及び/またはドコサヘキサエン酸 (DHA) のメチルまたはエチルエステルの産生方法を提供し、該方法は、それぞれ、メタノールまたはエタノールと抽出植物脂質中、または抽出処理中にトリアシルグリセロール類 (TAG) を反応させることを含み、該抽出植物脂質はエステル化された形態の脂肪酸を含み、該脂肪酸はドコサペンタエン酸 (DPA) 及び/またはドコサヘキサエン酸 (DHA) を含み、TAG の形態でエステル化された少なくとも 35% の DPA 及び/または DHA は該 TAG の sn - 2 位でエステル化されており、それにより、多価不飽和脂肪酸のメチルまたはエチルエステルを産生する

40

【0072】

好ましい実施形態では、上記 3 つの態様の方法で使用される脂質は、本発明の抽出脂質

50

またはオイルに関連して、本明細書で定義された 1 つ以上の特徴を有する。

【 0 0 7 3 】

別の態様では、本発明は、

a) その種子中の脂質であって、前記脂質がエステル化された形態の脂肪酸を含む前記脂質、及び

b) 酵素の以下のセット；

i) 12 - デサチュラーゼ、 3 - デサチュラーゼ及び / または 15 - デサチュラーゼ、 6 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 4 - デサチュラーゼ、 6 - エロンガーゼ及び 5 - エロンガーゼ、または

ii) 12 - デサチュラーゼ、 3 - デサチュラーゼ及び / または 15 - デサチュラーゼ、 8 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 4 - デサチュラーゼ、 9 - エロンガーゼ及び 5 - エロンガーゼ

の 1 つをコードする外来性ポリヌクレオチド

を含み、

各ポリヌクレオチドが前記植物の発育種子中の前記ポリヌクレオチドの発現を誘導可能である 1 つ以上の種子特異的プロモーターと作動可能に結合されており、前記脂肪酸がオレイン酸、パルミチン酸、リノール酸 (L A) 及び - リノレン酸 (G L A) を含む 6 脂肪酸、 - リノレン酸 (A L A) 、ステアリドン酸 (S D A)、ドコサペンタエン酸 (D P A) 及びドコサヘキサエン酸 (D H A) を含み、場合によっては、エイコサペンタエン酸 (E P A) 及び / または エイコサテトラエン酸 (E T A) を含んでもよい 3 脂肪酸 を含み、及び前記種子の脂質の総脂肪酸含有量における D H A のレベルが 20 . 1 % から 30 % の間、または 20 . 1 % から 35 % の間、好ましくは、30 % から 35 % の間である、

油料種子植物、もしくは種子などのその部分を提供する。

【 0 0 7 4 】

別の態様では、本発明は、

a) その種子中の脂質であって、前記脂質がエステル化された形態の脂肪酸を含む前記脂質、及び

b) 酵素の以下のセット；

i) 12 - デサチュラーゼ、 3 - デサチュラーゼ及び / または 15 - デサチュラーゼ、 6 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 4 - デサチュラーゼ、 6 - エロンガーゼ及び 5 - エロンガーゼ、または

ii) 12 - デサチュラーゼ、 3 - デサチュラーゼ及び / または 15 - デサチュラーゼ、 8 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 4 - デサチュラーゼ、 9 - エロンガーゼ及び 5 - エロンガーゼ

の 1 つをコードする外来性ポリヌクレオチド

を含み、

各ポリヌクレオチドが、該植物の発育種子中の前記ポリヌクレオチドの発現を誘導可能である 1 つ以上の種子特異的プロモーターと作動可能に結合されており、該脂肪酸は、オレイン酸、パルミチン酸、リノール酸 (L A) を含む 6 脂肪酸、 - リノレン酸 (A L A) 、ステアリドン酸 (S D A)、ドコサペンタエン酸 (D P A) 及びドコサヘキサエン酸 (D H A) を含み、場合により、エイコサペンタエン酸 (E P A) 及び / または エイコサテトラエン酸 (E T A) を含んでもよい 3 脂肪酸 を含み、該種子の脂質の総脂肪酸含有量における D H A のレベルが 20 . 1 % から 30 % の間または 20 . 1 % から 35 % の間、好ましくは、30 % から 35 % の間である、

油料種子植物、もしくは種子などのその部分を提供する。

【 0 0 7 5 】

別の態様では、本発明は、

a) その種子中の脂質であって、前記脂質がエステル化された形態の脂肪酸を含む前記脂質、及び

b) 酵素の以下のセット；

i) 12 - デサチュラーゼ、 3 - デサチュラーゼ及び / または 15 - デサチュラーゼ、 6 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 4 - デサチュラーゼ、 6 - エロンガーゼ及び 5 - エロンガーゼ、または

ii) 12 - デサチュラーゼ、 3 - デサチュラーゼ及び / または 15 - デサチュラーゼ、 8 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 4 - デサチュラーゼ、 9 - エロンガーゼ及び 5 - エロンガーゼ

の1つをコードする外来性ポリヌクレオチドを含み、

各ポリヌクレオチドが前記植物の発育種子中の前記ポリヌクレオチドの発現を誘導可能である1つ以上の種子特異的プロモーターと作動可能に結合されており、前記脂肪酸がオレイン酸、パルミチン酸、リノール酸 (L A) 及び - リノレン酸 (G L A) を含む 6 脂肪酸、 - リノレン酸 (A L A)、ステアリドン酸 (S D A)、ドコサペンタエン酸 (D P A) 及びドコサヘキサエン酸 (D H A) を含み、場合によっては、エイコサペンタエン酸 (E P A) 及び / またはエイコサテトラエン酸 (E T A) を含んでもよい 3 脂肪酸を含み、及び前記種子の脂質の総脂肪酸含有量における D H A のレベルが 20 . 1 % から 30 % の間、または 20 . 1 % から 35 % の間であり、前記脂質の総脂肪酸含有量におけるパルミチン酸のレベルが約 2 % から 16 % の間であり、前記種子の脂質の総脂肪酸含有量におけるミリスチン酸 (C 14 : 0) のレベルが、存在する場合、1 % 未満である、油料種子植物、もしくは種子などのその部分を提供する。

【0076】

別の態様では、本発明は、

a) エステル化された形態の脂肪酸を含む脂質、及び

b) 酵素の以下のセット；

i) 12 - デサチュラーゼ、 3 - デサチュラーゼ及び / または 15 - デサチュラーゼ、 6 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 6 - エロンガーゼ及び 5 - エロンガーゼ、

ii) 12 - デサチュラーゼ、 3 - デサチュラーゼ及び / または 15 - デサチュラーゼ、 8 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 9 - エロンガーゼ及び 5 - エロンガーゼ

iii) 3 - デサチュラーゼ及び / または 15 - デサチュラーゼ、 6 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 6 - エロンガーゼ及び 5 - エロンガーゼ、または

iv) 3 - デサチュラーゼ及び / または 15 - デサチュラーゼ、 8 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 9 - エロンガーゼ及び 5 - エロンガーゼ

の1つをコードする外来性ポリヌクレオチドを含み、

各ポリヌクレオチドが、前記植物の発育種子中の前記ポリヌクレオチドの発現を誘導可能である1つ以上の種子特異的プロモーター、または前記微生物細胞中の前記ポリヌクレオチドの発現を誘導可能である1つ以上の種子特異的プロモーターと作動可能に結合されており、前記脂肪酸が、オレイン酸、パルミチン酸、リノール酸 (L A) を含み、場合によっては、- リノレン酸 (G L A) を含んでもよい 6 脂肪酸、 - リノレン酸 (A L A)、ステアリドン酸 (S D A)、及びドコサペンタエン酸 (D P A) を含み、場合によっては、ドコサヘキサエン酸 (D H A)、エイコサペンタエン酸 (E P A) 及び / またはエイコサテトラエン酸 (E T A) を含んでもよい 3 脂肪酸を含み、及び前記種子または微生物細胞の脂質の総脂肪酸含有量における D P A のレベルが 7 % から 35 % の間である、その種子もしくは微生物細胞中に脂質を含む油料種子植物、もしくは種子などのその部分を提供する。本態様の好ましい実施形態では、D H A は、種子及び抽出脂質の脂質の総脂肪酸含有物の 0 . 5 % 未満のレベルで存在し、より好ましくは、脂質の総脂肪酸含有物中に存在しない。

【0077】

10

20

30

40

50

別の態様では、本発明は、

a) エステル化された形態の脂肪酸であって、該脂肪酸は、ドコサペンタエン酸 (DPA) 及び/またはドコサヘキサエン酸 (DHA) を含み、トリアシルグリセロール (TAG) の形態でエステル化された少なくとも 35% の DPA 及び/または DHA は、該 TAG の sn - 2 位でエステル化されている該脂肪酸、及び

b) 酵素の以下のセットのうち 1 つをコードする外来性ポリヌクレオチド；

i) 1 - アシル - グリセロール - 3 - リン酸アシルトランスフェラーゼ (LPAA T)、3 - デサチュラーゼ、6 - デサチュラーゼ、5 - デサチュラーゼ、6 - エロンガーゼ、5 - エロンガーゼ、及び場合により、4 - デサチュラーゼ、

ii) 1 - アシル - グリセロール - 3 - リン酸アシルトランスフェラーゼ (LPAA T)、15 - デサチュラーゼ、6 - デサチュラーゼ、5 - デサチュラーゼ、6 - エロンガーゼ、5 - エロンガーゼ、及び場合により、4 - デサチュラーゼ、

iii) 1 - アシル - グリセロール - 3 - リン酸アシルトランスフェラーゼ (LPAA T)、12 - デサチュラーゼ、6 - デサチュラーゼ、5 - デサチュラーゼ、6 - エロンガーゼ、5 - エロンガーゼ、及び場合により、4 - デサチュラーゼ、

iv) 1 - アシル - グリセロール - 3 - リン酸アシルトランスフェラーゼ (LPAA T)、12 - デサチュラーゼ、3 - デサチュラーゼ及び/または 15 - デサチュラーゼ、6 - デサチュラーゼ、5 - デサチュラーゼ、6 - エロンガーゼ及び 5 - エロンガーゼ、及び場合により、4 - デサチュラーゼ、

v) 1 - アシル - グリセロール - 3 - リン酸アシルトランスフェラーゼ (LPAA T)、3 - デサチュラーゼ、8 - デサチュラーゼ、5 - デサチュラーゼ、9 - エロンガーゼ、5 - エロンガーゼ、及び場合により、4 - デサチュラーゼ、

vi) 1 - アシル - グリセロール - 3 - リン酸アシルトランスフェラーゼ (LPAA T)、15 - デサチュラーゼ、8 - デサチュラーゼ、5 - デサチュラーゼ、9 - エロンガーゼ、5 - エロンガーゼ、及び場合により、4 - デサチュラーゼ、

vii) 1 - アシル - グリセロール - 3 - リン酸アシルトランスフェラーゼ (LPAA T)、12 - デサチュラーゼ、8 - デサチュラーゼ、5 - デサチュラーゼ、9 - エロンガーゼ、5 - エロンガーゼ、及び場合により、4 - デサチュラーゼ、

viii) 1 - アシル - グリセロール - 3 - リン酸アシルトランスフェラーゼ (LPAA T)、12 - デサチュラーゼ、3 - デサチュラーゼ及び/または 15 - デサチュラーゼ、8 - デサチュラーゼ、5 - デサチュラーゼ、9 - エロンガーゼ、5 - エロンガーゼ、及び場合により、4 - デサチュラーゼ、

を含む細胞、好ましくは、油料種子植物などの植物中もしくはそれからの細胞または種子などのその部分、または油料植物もしくはその部分、または微生物細胞を提供し、各ポリヌクレオチドが、該細胞内の前記ポリヌクレオチドの発現を誘導可能である 1 つ以上のプロモーターと作動可能に結合している。好ましくは、LPAA T は、DHA - CoA 及び/または DPA - CoA などの C22 多価不飽和脂肪酸アシル - CoA 基質を使用でき、抽出脂質の総脂肪酸含有量における DPA 及び/または DHA のレベルは、約 1% から 35% の間、または、約 7% から 35% の間、または約 20.1% から 35% の間である。実施形態では、トリアシルグリセロール (TAG) の形態でエステル化された、少なくとも約 40%、少なくとも約 45%、少なくとも約 48%、35% から約 60% の間、または 35% から約 50% の間の DPA 及び/または DHA は、TAG の sn - 2 位でエステル化されている。

【0078】

上記 5 つの態様の各々の実施形態では、15 - デサチュラーゼは、真菌の 15 - デサチュラーゼであり、3 - デサチュラーゼは、真菌の 3 - デサチュラーゼである。

【0079】

好ましい実施形態では、本発明の油料植物、微生物細胞または細胞は、該当する場合、本明細書で定義した、例えば、抽出植物脂質、抽出微生物脂質またはその産生方法に関連した上記定義した通りの 1 つ以上の特徴を有する。

【0080】

油料種子植物の例としては、これに限定されないが、アブラナ属 (*Brassica* sp.)、ワタ (*Gossypium hirsutum*)、アマ (*Linum usitatissimum*)、ヘリアンタス属 (*Helianthus* sp.)、ペニバナ (*Carthamus tinctorius*)、ダイズ (*Glycine max*)、トウモロコシ (*Zea mays*)、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*)、モロコシ (*Sorghum bicolor*)、モロコシ (*Sorghum vulgare*)、エンバク (*Avena sativa*)、トリフォリウム属 (*Trifolium* sp.)、ギニアアブラヤシ (*Elaeis guineensis*)、ベンサミアナタバコ (*Nicotiana benthamiana*)、オオムギ (*Hordeum vulgare*)、アオバナルーピン (*Lupinus angustifolius*)、イネ (*Oryza sativa*)、アフリカイネ (*Oryza glaberrima*)、カメリナサティバ (*Camelina sativa*)、またはクランベアビシニカ (*Crambe abyssinica*) が挙げられる。実施形態では、該植物は、アブラナ属 (*Brassica* sp.) 植物、カメリナ・サティバ (*C. sativa*) 植物またはグリシンマックス (*G. max*) (ダイズ) 植物である。実施形態では、該油料種子植物は、セイヨウアブラナ、カラシナ (*B. juncea*)、ダイズ (*Glycine max*)、カメリナサティバ (*Camelina sativa*) またはシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 植物である。代替の実施形態では、該油料種子植物は、シロイヌナズナ (*A. thaliana*) 及び / またはカメリナサティバ (*C. sativa*) 以外である。実施形態では、該油料種子植物は、*G. max* (ダイズ) 以外の植物である。実施形態では、油料種子植物は、例えば、実施例 1 に記載したような標準条件で、畑にある、または畑で生育した、または温室で生育した。

10

【0081】

20

実施形態では、本発明の方法で使用される、または本発明の細胞もしくは植物もしくはその植物部分に存在する 1 つ以上のデサチュラーゼは、アシル - CoA 基質を使用可能である。好ましい実施形態では、6 - デサチュラーゼ、5 - デサチュラーゼ、4 - デサチュラーゼ及び 8 - デサチュラーゼは、もし存在するならば、アシル - CoA 基質を使用可能であり、好ましくは、i) 6 - デサチュラーゼ、5 - デサチュラーゼ及び 4 - デサチュラーゼまたは ii) 5 - デサチュラーゼ、4 - デサチュラーゼ及び 8 - デサチュラーゼの各々は、アシル - CoA 基質を使用可能である。実施形態では、12 - デサチュラーゼ及び / または 3 - デサチュラーゼは、アシル - CoA 基質を使用可能である。該アシル - CoA 基質は、好ましくは、6 - デサチュラーゼには ALA - CoA、5 - デサチュラーゼには ETA - CoA、4 - デサチュラーゼには DPA - CoA、そして 8 - デサチュラーゼには ETrA - CoA、12 - デサチュラーゼには オレオイル - CoA、または 3 - デサチュラーゼには LA - CoA、GLA - CoA、及び ARA - CoA のうち 1 つ以上である。

30

【0082】

実施形態では、植物の収穫された種子は、種子 1 グラム当たり少なくとも約 28 mg、好ましくは、種子 1 グラム当たり少なくとも約 32 mg、種子 1 グラム当たり少なくとも約 36 mg、種子 1 グラム当たり少なくとも約 40 mg、より好ましくは、種子 1 グラム当たり少なくとも約 44 mg または少なくとも 48 mg、種子 1 グラム当たり少なくとも約 80 mg、または種子 1 グラム当たり約 30 mg から約 80 mg の間の DHA 及び / または DPA 含有量を有する。

40

【0083】

さらなる態様では、本発明は、DHA 及び / または DPA を含む種子を産生可能であるセイヨウアブラナ (*Brassica napus*)、カラシナ (*B. juncea*) またはカメリナサティバ (*C. sativa*) 植物を提供し、該植物の成熟した収穫された種子が、種子 1 グラム当たり少なくとも約 28 mg、好ましくは、種子 1 グラム当たり少なくとも約 32 mg、種子 1 グラム当たり少なくとも約 36 mg、種子 1 グラム当たり少なくとも約 40 mg、より好ましくは、種子 1 グラム当たり少なくとも約 44 mg または少なくとも 48 mg、種子 1 グラム当たり少なくとも約 80 mg、または種子 1 グラム当たり約 30 mg から約 80 mg の間の DHA 及び / または DPA 含有量を有する。

【0084】

50

別の態様では、本発明は、本明細書で定義した外来性ポリヌクレオチドを含む本発明の植物の植物細胞を提供する。

【0085】

以下の特徴：

- i) 本発明の植物由来であること、
- ii) 本明細書で定義した脂質を含むこと、または
- iii) 本発明の方法で使用できること、のうちの1つ以上を有する植物部分、好ましくは種子、または微生物細胞などの組換え細胞も提供される。

【0086】

さらに別の態様では、本発明は、DHA及び/またはDPA及び約4重量%から約15重量%の間、好ましくは、約6重量%から約8重量%の間または約4重量%から約8重量%の間、より好ましくは、約4重量%から約6重量%の水分を含む成熟して収穫されたセイヨウアブラナ (*Brassica napus*)、カラシナ (*B. juncea*) またはカメリナサティバ (*Camelina sativa*) 種子を提供し、該種子のDHA及び/またはDPA含有量が種子1グラム当たり少なくとも約28mg、好ましくは、種子1グラム当たり少なくとも約32mg、種子1グラム当たり少なくとも約36mg、種子1グラム当たり少なくとも約40mg、より好ましくは、種子1グラム当たり少なくとも約44mgまたは種子1グラム当たり少なくとも約48mg、種子1グラム当たり約80mg、または種子1グラム当たり約30mgから約80mgの間である。

【0087】

実施形態では、本発明の細胞、本発明の油料種子植物、本発明のセイヨウアブラナ (*Brassica napus*)、カラシナ (*B. juncea*) またはカメリナサティバ (*Camelina sativa*) 植物、本発明の植物部分、または本発明の種子を、本明細書で定義した特徴の1つ以上または全てを含む抽出脂質を産生するために使用できる。

【0088】

その上、さらなる態様では、本発明は、本発明の抽出脂質を産生するために使用できる植物または細胞の産生方法を提供し、該方法は、

a) 複数の植物または微生物細胞などの組換え細胞からの種子などの1つ以上の植物部分または微生物細胞などの組換え細胞により産生された脂質中のDHA及び/またはDPAのレベルをアッセイすることであって、各植物または微生物細胞などの組換え細胞が、酵素の以下のセット；

i) 3 - デサチュラーゼ、 6 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 4 - デサチュラーゼ、 6 - エロンガーゼ及び 5 - エロンガーゼ、

ii) 15 - デサチュラーゼ、 6 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 4 - デサチュラーゼ、 6 - エロンガーゼ及び 5 - エロンガーゼ、

iii) 12 - デサチュラーゼ、 6 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 4 - デサチュラーゼ、 6 - エロンガーゼ及び 5 - エロンガーゼ、

iv) 12 - デサチュラーゼ、 3 - デサチュラーゼまたは 15 - デサチュラーゼ、 6 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 4 - デサチュラーゼ、 6 - エロンガーゼ及び 5 - エロンガーゼ、

v) 3 - デサチュラーゼ、 8 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 4 - デサチュラーゼ、 9 - エロンガーゼ及び 5 - エロンガーゼ、

vi) 15 - デサチュラーゼ、 8 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 4 - デサチュラーゼ、 9 - エロンガーゼ及び 5 - エロンガーゼ、

vii) 12 - デサチュラーゼ、 8 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 4 - デサチュラーゼ、 9 - エロンガーゼ及び 5 - エロンガーゼ、

viii) 12 - デサチュラーゼ、 3 - デサチュラーゼまたは 15 - デサチュラーゼ、 8 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 4 - デサチュラーゼ、 9 - エロンガーゼ及び 5 - エロンガーゼ、

ix) 3 - デサチュラーゼ、 6 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 6

10

20

30

40

50

- エロンガーゼ及び 5 - エロンガーゼ、
 x) 15 - デサチュラーゼ、 6 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 6
 - エロンガーゼ及び 5 - エロンガーゼ、
 x i) 12 - デサチュラーゼ、 6 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、
 6 - エロンガーゼ及び 5 - エロンガーゼ、
 x i i i) 12 - デサチュラーゼ、 3 - デサチュラーゼまたは 15 - デサチュ
 ラーゼ、 6 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 6 - エロンガーゼ及び 5 -
 エロンガーゼ、または
 x i v) 12 - デサチュラーゼ、 3 - デサチュラーゼまたは 15 - デサチュラ
 ーゼ、 8 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 9 - エロンガーゼ及び 5 - エ
 ロンガーゼ

10

の1つをコードする1つ以上の外来性ポリヌクレオチドを含み、
 各ポリヌクレオチドが、植物部分または組換え細胞の細胞内の該ポリヌクレオチドの発現
 を誘導可能である1つ以上のプロモーターと作動可能に結合する、該アッセイすること、
 と

b) 1つ以上のその部分の本発明の抽出植物脂質または組換え細胞脂質の産生に使用で
 ける複数の植物または組換え細胞から植物または組換え細胞を同定すること、と

c) 場合によっては、前記同定植物または組換え細胞、またはそれ由来の種子から後代
 植物または組換え細胞を産生すること
 とを含む。

20

【0089】

実施形態では、植物または組換え細胞は、本明細書で定義したL P A A Tをコードする
 外来性ポリヌクレオチドをさらに含む。

【0090】

好ましくは、後代植物は、同定された植物から取り出された少なくとも第二または第三
 世代であり、好ましくは、1つ以上のポリヌクレオチドにとってホモ接合である。より好
 ましくは、該1つ以上のポリヌクレオチドは、1つの挿入遺伝子座のみににおいて、後代植
 物中に存在する。すなわち、本発明は、複数の形質転換候補植物または種子から植物また
 はその種子を同定するためのスクリーニング方法として使用できるような方法を提供し、
 同定された植物またはその後代植物が好ましくはその種子内で、本発明の脂質を産生する
 。かかる植物または後代植物またはその種子は、特に特定のD H A レベル及び/またはD
 P A レベルを有する本発明の脂質を産生する場合に選択され、または本発明の脂質を産生
 しない場合選択されない。

30

【0091】

実施形態では、本明細書で定義した微生物細胞、または植物もしくはその部分などの細
 胞内に存在する外来性ポリペプチドは、該細胞、植物または種子などの植物部分のゲノム
 中に安定に組み込まれる。好ましくは、外来性ポリヌクレオチドは、該ゲノム中の1つの
 遺伝子座において、該細胞、植物または種子などの植物部分のゲノム中に安定に組み込ま
 れ、好ましくは、挿入によってホモ接合である。より好ましくは、該植物、植物部分また
 は種子は、1つ以上のT - D N A 分子以外の外来性ポリヌクレオチドを欠いているという
 点でさらに特徴付けられる。すなわち、外来性ベクター配列は、T - D N A 配列以外のゲ
 ノム中に組み込まれない。

40

【0092】

実施形態では、工程a) の前に、該方法は、1つ以上の外来性ポリヌクレオチドを、植
 物の1つ以上の細胞に導入することを含む。

【0093】

本発明の方法を用いて産生した植物、及びかかる植物の種子も提供する。

【0094】

実施形態では、本発明の植物は、雌雄両方の生殖能力があり、好ましくは、対応する野
 生型植物と比較して少なくとも70%である、または好ましくはほぼ同じである雌雄両方

50

の生殖能力レベルを有する。実施形態では、本発明の植物または本発明の種子から産生された植物により産生された花粉は、生存性染色での染色により測定したとき、90～100%の生存性である。例えば、花粉の生存性を、実施例1に記載のように評価してもよい。

【0095】

別の態様では、本発明は、種子を産生する方法を提供し、該方法は、

a) 好ましくは、少なくとも1000または2000または3000のかかる植物の集合部分としての耕地または標準栽植密度で植えられた少なくとも1ヘクタールまたは2ヘクタールまたは3ヘクタールの領域、あるいは標準条件下温室内で、本発明の植物、または本発明の植物部分を産生、もしくは本発明の種子を産生する植物を生育すること、

b) 前記1つまたは複数の植物から種子を収穫すること、及び

c) 場合によっては、前記種子から脂質を抽出して、好ましくは、少なくとも60kgまたは70kgまたは80kgのDHA及び/またはDPA/ヘクタールの総DHA収率及び/またはDPA収率でオイルを産生することを含む。

【0096】

実施形態では、本発明の植物、植物細胞、植物部分もしくは種子、または組換え細胞は、次の特徴：

i) そのオイルは、本明細書で定義したものであること、または

ii) 該植物部分または種子または組換え細胞が本発明の方法で使用可能であることの1つ以上を有する。

【0097】

例えば、種子を、本発明の植物を産生するために使用できる。植物は、例えば、実施例1に記載したように、標準条件下で、畑または温室で生育してもよい。

【0098】

さらなる態様では、本発明は、本発明の方法を用いて、本発明の細胞、本発明の油料種子、本発明のアブラナ属 (*Brassica* sp.)、セイヨウアブラナ (*Brassica napus*)、カラシナ (*B. juncea*)、ダイズ (*G. max*) またはカメリナサティバ (*Camelina sativa*) 植物、本発明の植物部分、本発明の種子、または本発明の植物、植物細胞、植物部分もしくは種子により産生された、またはそれから得られた脂質、またはオイルを提供する。好ましくは、脂質またはオイルを精製して、核酸 (DNA 及び/またはRNA)、タンパク質及び/または炭水化物、またはクロロフィルなどの顔料などの夾雑物を取り除く。脂質またはオイルを精製して、例えば、遊離脂肪酸 (FFA) またはリン脂質の除去により、TAGの割合を濃縮する

【0099】

実施形態では、脂質またはオイルを、油料種子からオイルを抽出することにより得る。油料種子のオイルの例としては、これに限定されないが、キャノーラオイル (*Brassica napus*, *Brassica rapa* spp)、カラシナオイル (*Brassica juncea*)、他のブラシカオイル、ヒマワリオイル (*Helianthus annuus*)、アマニオイル (*Linum usitatissimum*)、ダイズオイル (*Glycine max*)、ベニバナオイル (*Carthamus tinctorius*)、トウモロコシオイル (*Zea mays*)、タバコオイル (*Nicotiana tabacum*)、ピーナッツオイル (*Arachis hypogaea*)、パームオイル、綿実油 (*Gossypium hirsutum*)、ココナッツオイル (*Cocos nucifera*)、アボカドオイル (*Persea americana*)、オリーブオイル (*Olea europaea*)、カシューオイル (*Anacardium occidentale*)、マカダミアオイル (*Macadamia integrifolia*)、アーモンドオイル (*Prunus amygdalus*)、またはアラビドプシス種子オイル (*Arabidopsis thaliana*) が挙げられる。

【 0 1 0 0 】

実施形態では、本発明の、または本発明で使用される細胞（組換え細胞）は、発酵に適切な細胞などの微生物細胞、好ましくは、重量基準で少なくとも25%のレベルまでトリアシルグリセロールを蓄積可能である油性微生物細胞である。好ましい発酵方法は、当技術分野で周知であるような嫌気性発酵方法である。適切な発酵細胞、通常、微生物は、発酵可能である、すなわち、グルコースまたはマルトースなどの糖類を、直接または間接的に所望の脂肪酸に転換できる。発酵する微生物の例としては、酵母などの真菌生物が挙げられる。本明細書で使用されるとき、「酵母」は、サッカロミセス属（*Saccharomyces* sp.）、サッカロミセス・セレビシア（*Saccharomyces cerevisiae*）、サッカロミセス・カールスベルゲンシス（*Saccharomyces carlbergensis*）、カンジダ属（*Candida* spp.）、クルベロミセス属（*Kluveromyces* spp.）、ピキア属（*Pichia* spp.）、ハンゼヌラ属（*Hansenula* spp.）、トリコデルマ属（*Trichoderma* spp.）、リポミセス・スターキー（*Lipomyces starkey*）、及び好ましくは、アルカン資化性酵母（*Yarrowia lipolytica*）が挙げられる。

10

【 0 1 0 1 】

さらなる態様では、本発明は、本発明の方法を用いて、本発明の細胞、本発明の油料種子、本発明のアブラナ属（*Brassica* sp.）、セイヨウアブラナ（*Brassica napus*）、カラシナ（*B. juncea*）、ダイズ（*G. max*）またはカメリナサティバ（*Camelina sativa*）植物、本発明の植物部分、本発明の種子、または本発明の植物、植物細胞、植物部分もしくは種子により産生された、またはそれから得られた脂肪酸を提供する。好ましくは、脂肪酸は、DHA及び/またはDPAである。脂肪酸は、本明細書に記載の脂肪酸組成を有する脂肪酸混合物であってよく、または脂肪酸が混合物中の脂肪酸含有物の少なくとも40%または少なくとも90%を含むように濃縮されてもよい。実施形態では、脂肪酸は、エステル化されていない。あるいは、脂肪酸は、例えば、メチル、エチル、プロピルまたはブチル基になど、エステル化されている。

20

【 0 1 0 2 】

本発明の種子から得られる、または本発明の植物から得られるシードミール（seedmeal）も提供される。好ましいシードミールとしては、これに限定されないが、アブラナ属（*Brassica* sp.）、セイヨウアブラナ（*Brassica napus*）、カラシナ（*B. juncea*）、ダイズ（*Glycine. max*）シードミールが挙げられる。実施形態では、該シードミールは、本明細書で定義した外来性ポリヌクレオチド及び/または遺伝子構築物を含む。好ましい実施形態では、該シードミールは、シードミールが得られるが、ほとんどの脂質またはオイルの抽出後低レベル（例えば、2重量%未満）である種子内で産生された脂質またはオイルのいくらかを保持する。該シードミールを、動物用飼料または食料製品の成分として使用してもよい。

30

【 0 1 0 3 】

別の態様では、本発明は、1つ以上の本発明の脂質またはオイル、本発明の脂肪酸、本発明に記載の細胞、本発明の油料種子植物、本発明のアブラナ属（*Brassica* sp.）、セイヨウアブラナ（*Brassica napus*）、カラシナ（*B. juncea*）、ダイズ（*Glycine. max*）またはカメリナサティバ（*Camelina sativa*）植物、本発明の植物部分、本発明の種子、または本発明のシードミールを含む組成物を提供する。実施形態では、該組成物は、医薬品、食物もしくは農業用途、種子処理化合物、肥料、別の食物もしくは飼料成分、または添加タンパク質もしくはビタミン類に適切な担体を含む。

40

【 0 1 0 4 】

1つ以上の本発明の脂質またはオイル、本発明の脂肪酸、本発明に記載の細胞、本発明の油料種子植物、本発明のアブラナ属（*Brassica* sp.）、セイヨウアブラナ（*Brassica napus*）、カラシナ（*B. juncea*）、ダイズ（*Glycine. max*）またはカメリナサティバ（*Camelina sativa*）植物、本発明の植物部分、本発明の種子、または本発明のシードミール、または本発明の組成物を含む飼料、化粧品または化学薬品も提供する。

【 0 1 0 5 】

50

別の態様では、本発明は、飼料の製造方法を提供し、該方法は、1つ以上の本発明の脂質またはオイル、本発明の脂肪酸、本発明に記載の細胞、本発明の油料種子植物、本発明のアブラナ属 (*Brassica* sp.)、セイヨウアブラナ (*Brassica napus*)、カラシナ (*B. juncea*)、ダイズ (*Glycine. max*) またはカメリナサティバ (*Camelina sativa*) 植物、本発明の植物部分、本発明の種子、または本発明のシードミール、または本発明の組成物を、少なくとも1つの他の食物成分と混合することを含む。該方法は、配合、料理、ベーキング、押出、乳化、さもなければ飼料の処方、または飼料の包装、または試料中の脂質もしくはオイルの量の分析の工程を含んでもよい。

【0106】

別の態様では、本発明は、PUFA、好ましくはDHA及び/またはDPAから効果を得るだろう病状の治療または予防方法を提供し、該方法は、対象に、1つ以上の本発明の脂質またはオイル、本発明の脂肪酸、本発明に記載の細胞、本発明の油料種子植物、本発明のアブラナ属 (*Brassica* sp.)、セイヨウアブラナ (*Brassica napus*)、カラシナ (*B. juncea*)、ダイズ (*Glycine. max*) またはカメリナサティバ (*Camelina sativa*) 植物、本発明の植物部分、本発明の種子、または本発明のシードミール、本発明の組成物、または本発明の飼料を投与することを含む。好ましい実施形態では、PUFAを、PUFAのエチルエステルを含む医薬組成物の形態で投与する。対象は、ヒトまたはヒト以外の動物であり得る。

【0107】

PUFAから効果を得られるだろう病状の例としては、これに限定されないが、血清トリグリセリド値上昇、LDLコレステロール値上昇などの血清コレステロール値上昇、不整脈、血管形成、炎症、喘息、乾癬、骨粗鬆症、腎臓結石、AIDS、多発性硬化症、関節リウマチ、クローン病、統合失調症、がん、胎児アルコール症候群、注意不足多動性障害、嚢胞性線維症、フェニルケトン尿症、単極性うつ病、攻撃的な敵意、アドレノロイコジストフィー、冠動脈心疾患、高血圧症、糖尿病、肥満症、アルツハイマー病、慢性閉塞性肺疾患、潰瘍性大腸炎、血管形成術後の再狭窄、湿疹、高血圧、血小板凝集、胃腸出血、子宮内膜症、月経前緊張症、筋痛性脳脊髄炎、ウイルス性感染後の慢性疲労または眼疾患が挙げられる。

【0108】

1つ以上の本発明の脂質またはオイル、本発明の脂肪酸、本発明に記載の細胞、本発明の油料種子植物、本発明のアブラナ属 (*Brassica* sp.)、セイヨウアブラナ (*Brassica napus*)、カラシナ (*B. juncea*)、ダイズ (*Glycine. max*) またはカメリナサティバ (*Camelina sativa*) 植物、本発明の植物部分、本発明の種子、または本発明のシードミール、本発明の組成物、または本発明の飼料を、PUFA、好ましくはDHA及び/またはDPAから効果を得られるだろう病状を治療用または予防用医薬品製造のための使用も提供される。

【0109】

該医薬品製造は、本明細書に記載の病状の治療のため、本発明のオイルを薬剤的に許容可能な担体と混合することを含んでもよい。該方法は、オイルを先ず精製し、及び/またはエステル交換し、及び/または該オイルの分取をしてDHA及び/またはDPAのレベルを増加することを含んでもよい。特定の実施形態では、該方法は、キャノーラオイルなどの脂質またはオイルを処理して、オイル中の脂肪酸をメチルまたはエチルなどのアルキルエステルに転換することを含む。分取または蒸留などのさらなる処理を、脂質またはオイルのDHA及び/またはDPAを濃縮するために適用してもよい。好ましい実施形態では、該医薬品は、DHA及び/またはDPAのエチルエステルを含む。さらにより好ましい実施形態では、医薬品中のDHA及び/またはDPAのエチルエステルのレベルは、30%から50%の間、または少なくとも80%、または少なくとも85%、または少なくとも90%、または少なくとも約95%である。該医薬品は、医薬品中総脂肪酸含有率の30%から50%の間、または少なくとも90%などのEPAのエチルエステルをさらに含む。かかる医薬品は、本明細書に記載の病状の治療のため、ヒトまたは動物対象に投与

10

20

30

40

50

するのに適切である。

【 0 1 1 0 】

別の態様では、本発明は、本発明の種子を得ること、及び得られた種子を金銭利益のため取引きすることを含む種子の取引き方法を提供する。

【 0 1 1 1 】

実施形態では、種子を得ることは、本発明の植物を栽培すること、及び／または該植物から種子を収穫することを含む。

【 0 1 1 2 】

別の実施形態では、種子を得ることは、該種子を容器に入れること、及び／または該種子を貯蔵することをさらに含む

10

【 0 1 1 3 】

さらなる実施形態では、種子を得ることは、該種子を異なる場所に輸送することをさらに含む。

【 0 1 1 4 】

さらに別の実施形態では、該方法は、該種子を取り引き後、該種子を異なる場所に輸送することをさらに含む。

【 0 1 1 5 】

さらなる実施形態では、該取引きを、コンピューターなどの電子的手段を用いて実行する。

【 0 1 1 6 】

20

その上、さらなる態様では、本発明は、

a) 本発明の種子を含む植物の地上部を包む、引き抜く及び／または刈り取ること

b) 植物の部分を脱穀及び／または選穀して、植物部分の残部から種子を分離すること、及び

c) 工程 b) で分離した種子を篩い分け及び／または選別し、篩い分け及び／または選別した種子を貯蔵箱に充填し、それにより、種子の箱を製造すること、を含む種子の箱の製造方法を提供する。

【 0 1 1 7 】

実施形態では、関連する場合、本発明の、または本発明に有用な脂質またはオイル、好ましくは、種子オイルは、表 10 の種子 C T 1 3 6 - 2 7 - 1 8 - 2 または C T 1 3 6 - 2 7 - 1 8 - 1 9、または表 1 2、2 0、2 2、2 3、もしくは 2 4 の種子などの実施例のセクション中の表中に提供したものについて脂肪レベルを有する。

30

【 0 1 1 8 】

本明細書中のいかなる実施形態も、特に別段の明記がない限り、いずれもの他の実施形態に対して、変更すべきところは変更して適用されるべきである。

【 0 1 1 9 】

本発明は、例証することのみを目的と意図された、本明細書に記載の特定の実施形態により、範囲を限定されない。機能的に均等な製品、組成物及び方法は、本明細書に記載のように、明白に、本発明の範囲内である。

【 0 1 2 0 】

40

本明細書を通して、特に別段の明言がない、または文脈上別の意味を必要としない限り、1つの工程、物質の組成物、工程の群または物質の組成物の群の参照は、1つ及び複数(すなわち、1つ以上)のこれらの工程、物質の組成物、工程の群または物質の組成物の群を包含すると解釈すべきである。

【 0 1 2 1 】

以下、本発明を、以下の非限定的実施例として、及び添付の図を参照して説明する。

【図面の簡単な説明】

【 0 1 2 2 】

【図 1】好氣的 D H A 生合成経路。

【図 2】 p J P 3 4 1 6 - G A 7 の左右境界領域間の T - D N A 挿入領域のマップ。 R B

50

は右境界領域を示し；L Bは左境界領域を示し、T E Rは転写ターミネーター／ポリアデニル化領域を示し、P R Oはプロモーターを示し；コード領域は矢印上に示され、プロモーター及びターミネーターは矢印の下に示される。M i c p u - 6 Dはミクロモナス・プシーラ (*Micromonas pusilla*) 6 - デサチュラーゼ；P y r c o - 6 Eはピラミモナス・コルダタ (*Pyramimonas cordata*) 6 - エロンガーゼ；P a v s a - 5 Dはパブロバ・サリナ (*Pavlova salina*) 5 - デサチュラーゼ；P i c p a - 3 Dはピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) 3 - デサチュラーゼ；P a v s a - 4 Dはパブロバ・サリナ (*P. salina*) 4 - デサチュラーゼ；L a c k l - 1 2 Dはラカンセア・クルイベリ (*Lachancea Kluyveri*) 1 2 - デサチュラーゼ、P y r c o - 5 Eはピラミモナス・コルダタ (*Pyramimonas cordata*) 5 - エロンガーゼを示す。N O Sはアグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) ノバリン合成転写ターミネーター／ポリアデニル化領域を示し；F P 1はセイヨウアブラナ (*Brassica napus*) 短縮化ナピンプロモーターを示し；F A E 1はシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) F A E 1プロモーターを示し；L e c t i nはダイス (*Glycine max*) レクチン転写ターミネーター／ポリアデニル化領域；C n l 1及びC n l 2はアマ (*Linum usitatissimum*) コンリニン1またはコンリニン2プロモーターまたはターミネーターを示す。M A Rはタバコ (*Nicotiana tabacum*) R b 7マトリックス結合領域を示す。

【図3】p J P 3 4 0 4の左右境界領域間のT - D N A挿入領域のマップ。表示は図2の通りである。

【図4】トランスジェニックシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 種子の脂質の総脂肪酸含有率パーセントとして、オイル含有率 (w / w) 対D H A含有率。

【図5】A) マグロ油及び、B) トランスジェニックD H Aアラビドプシス属種子オイルについて、N M Rによる位置分布分析。「D H A - 」と表示したピークは、T A Gのs n - 1位及びs n - 3位に存在するD H A量を示し (どの位置でも、これは総D H Aの66%に等しい)、一方、「D H A - 」は、T A Gのs n - 2位に存在するD H A量を示す (いつでも、D H Aの33%に等しい)。

【図6】トランスジェニックシロイヌナズナ (*A. thaliana*) 発育 (灰色) 及び成熟 (黒色) 種子の主にD H A含有トリアシルグリセロール化学種のL C - M S分析。D H Aに続く数字は、他の2つの脂肪酸中の炭素総数及び二重結合総数を示す。従って、D H A / 3 4 : 1は、T A G 5 6 : 7などとも呼ぶことができる。

【図7】(A) 環及び側鎖の番号付けをした基本フィトステロール構造。(B) いくつかのフィトステロール類の化学構造。

【図8】公知のL P A A Tの系統樹。

【図9】P C、C o Aプール、及びT A Gプール間の脂肪酸を転移させる様々なアシル交換酵素。出典S i n g hら (2005)。

【図10】G A 7 - m o d B構築物から、T - D N Aで形質転換されたセイヨウアブラナ (*B. napus*) の個々のT 2種子から得られた種子オイルの総脂肪酸含有量におけるD H Aレベル。各ドットは、個々のT 1植物からのT 2種子を示す各カラムで、個々の種子のD H Aレベルを示す。

【0 1 2 3】

配列表のキー

配列番号1 - p J P 3 4 1 6 - G A 7ヌクレオチド配列。

配列番号2 - p G A 7 - m o d _ Bヌクレオチド配列。

配列番号3 - 植物のラカンセア・クルイベリ (*Lachancea Kluyveri*) 1 2 デサチュラーゼの発現のコドン最適化オープンリーディングフレーム。

配列番号4 - ラカンセア・クルイベリ (*Lachancea Kluyveri*) 1 2 デサチュラーゼ。

配列番号5 - 植物のピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) 3 デサチュラーゼの発現のコドン最適化オープンリーディングフレーム。

配列番号6 - ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) 3 デサチュラーゼ。

配列番号7 - ミクロモナス・プシーラ (*Micromonas pusilla*) 6 - デサチュラーゼをコ

10

20

30

40

50

ードするオープンリーディングフレーム。

配列番号 8 - 植物のミクロモナス・プシーラ (*Micromonas pusilla*) 6 - デサチュラーゼの発現のコドン最適化オープンリーディングフレーム。

配列番号 9 - ミクロモナス・プシーラ (*Micromonas pusilla*) 6 - デサチュラーゼ。

配列番号 10 - オストレオコッカス・ルシマリヌス (*Ostreococcus lucimarinus*) 6 - デサチュラーゼをコードするオープンリーディングフレーム。

配列番号 11 - 植物のオストレオコッカス・ルシマリヌス (*Ostreococcus lucimarinus*) 6 - デサチュラーゼの発現のコドン最適化オープンリーディングフレーム。

配列番号 12 - オストレオコッカス・ルシマリヌス (*Ostreococcus lucimarinus*) 6 - デサチュラーゼ。

10

配列番号 13 - オストレオコッカス・タウリ (*Ostreococcus tauri*) 6 - デサチュラーゼ。

配列番号 14 - ピラミモナス・コルダタ (*Pyramimonas cordata*) 6 - エロンガーゼをコードするオープンリーディングフレーム。

配列番号 15 - 植物のピラミモナス・コルダタ (*Pyramimonas cordata*) 6 - エロンガーゼの発現のコドン最適化オープンリーディングフレーム (3' 末端で短縮化され、機能的エロンガーゼをコードする)。

配列番号 16 - ピラミモナス・コルダタ (*Pyramimonas cordata*) 6 - デサチュラーゼ。

配列番号 17 - 短縮化ピラミモナス・コルダタ (*Pyramimonas cordata*) 6 - デサチュラーゼ。

20

配列番号 18 - パブロバ・サリナ (*Pavlova salina*) 5 - デサチュラーゼをコードするオープンリーディングフレーム。

配列番号 19 - 植物のパブロバ・サリナ (*Pavlova salina*) 5 - デサチュラーゼの発現のコドン最適化オープンリーディングフレーム。

配列番号 20 - パブロバ・サリナ (*Pavlova salina*) 5 - デサチュラーゼ。

配列番号 21 - ピラミモナス・コルダタ (*Pyramimonas cordata*) 5 - デサチュラーゼをコードするオープンリーディングフレーム。

配列番号 22 - ピラミモナス・コルダタ (*Pyramimonas cordata*) 5 - デサチュラーゼ。

30

配列番号 23 - ピラミモナス・コルダタ (*Pyramimonas cordata*) 5 - エロンガーゼをコードするオープンリーディングフレーム。

配列番号 24 - 植物のピラミモナス・コルダタ (*Pyramimonas cordata*) 5 - エロンガーゼの発現のコドン最適化オープンリーディングフレーム。

配列番号 25 - ピラミモナス・コルダタ (*Pyramimonas cordata*) 5 - エロンガーゼ。

配列番号 26 - パブロバ・サリナ (*Pavlova salina*) 4 - デサチュラーゼをコードするオープンリーディングフレーム。

配列番号 27 - 植物のパブロバ・サリナ (*Pavlova salina*) 4 - デサチュラーゼの発現のコドン最適化オープンリーディングフレーム。

配列番号 28 - パブロバ・サリナ (*Pavlova salina*) 4 - デサチュラーゼ。

40

配列番号 29 - イソクリシス・ガルバナ (*Isochrysis galbana*) 9 - エロンガーゼ。

配列番号 30 - 植物のエミリアニア・ハクスレイ (*Emiliania huxleyi*) 9 - エロンガーゼの発現のコドン最適化オープンリーディングフレーム。

配列番号 31 - エミリアニア・ハクスレイ (*Emiliania huxleyi*) C C M P 1 5 1 6 9 - エロンガーゼ。

配列番号 32 - パブロバ・サリナ (*Pavlova salina*) 9 - エロンガーゼをコードするオープンリーディングフレーム。

配列番号 33 - パブロバ・サリナ (*Pavlova salina*) 9 - エロンガーゼ。

配列番号 34 - パブロバ・サリナ (*Pavlova salina*) 9 - エロンガーゼをコードするオープンリーディングフレーム。

50

配列番号 35 - パブロバ・サリナ (Pavlova salina) 9 - エロンガーゼ。
 配列番号 36 - パブロバ・サリナ (Pavlova salina) 8 - デサチュラーゼをコードする
 オープンリーディングフレーム。
 配列番号 37 - パブロバ・サリナ (Pavlova salina) 8 - デサチュラーゼ。
 配列番号 38 - V2 ウイルスサブレッサー。
 配列番号 39 - V2 ウイルスサブレッサーをコードするオープンリーディングフレーム。
 配列番号 40 - シロイヌナズナ (Arabidopsis thaliana) L P A A T 2。
 配列番号 41 - リムナンテス・アルバ (Limnanthes alba) L P A A T。
 配列番号 42 - サッカロミセス・セレピシア (Saccharomyces cerevisiae) L P A A T。
 配列番号 43 - ミクロモナス・プシーラ (Micromonas pusilla) L P A A T。
 配列番号 44 - モルティエレラ・アルピナ (Mortierella alpina) L P A A T。
 配列番号 45 - セイヨウアブラナ (Brassica napus) L P A A T。
 配列番号 46 - セイヨウアブラナ (Brassica napus) L P A A T。
 配列番号 47 - フィトフトラ・インフェスタンス (Phytophthora infestans) 3 - デサ
 チュラーゼ。
 配列番号 48 - タラシオシラ・シュードナナ (Thalassiosira pseudonana) 3 - デサ
 チュラーゼ。
 配列番号 49 - ピシリウム・イレグラレ (Pythium irregulare) 3 - デサチュラーゼ

10

配列番号 50 ~ 58 - オリゴヌクレオチドプライマー / プローブ。

20

【発明を実施するための形態】

【0124】

一般的方法及び定義

特に、別段の規定がない限り、本明細書で使用する全ての技術及び科学用語は、当業者
 (例えば、細胞培養、分子遺伝学、脂肪酸合成、トランスジェニック植物、組換え細胞、
 タンパク質化学、及び生化学)により共通に理解されるのと同じ意味を有すると解すべき
 である。

【0125】

別段の指示がない限り、本発明に利用するタンパク質、細胞培養、及び免疫技術は当業
 者に周知の標準的方法である。かかる技術を、J. Perbal, A Practical
 Guide to Molecular Cloning, John Wiley
 and Sons (1984), J. Sambrook et al., Molecu
 lar Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spr
 ing Harbour Laboratory Press (1989), T. A.
 Brown (editor), Essential Molecular Biolog
 y: A Practical Approach, Volumes 1 and 2, I
 RL Press (1991), D. M. Glover and B. D. Hame
 s (editors), DNA Cloning: A Practical Appr
 oach, Volumes 1-4, IRL Press (1995 and 199
 6), F. M. Ausubel et al. (editors), Current P
 rotocols in Molecular Biology, Greene Pub
 . Associates and Wiley-Interscience (1988
 , including all updates until present), Ed
 Harlow and David Lane (editors), Antibod
 ies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harb
 our Laboratory, (1988), and J. E. Coligan et
 al. (editors), Current Protocols in Immun
 ology, John Wiley & Sons (現在までの全最新版を含む)など
 の資料中の文献により記載し説明する。

30

40

【0126】

50

「及び／または」という語、例えば、「X及び／またはY」は、「X及びY」または「XまたはY」のいずれかを意味すると理解すべきであり、両方の意味またはどちらかの意味を明示的に支持すると解する。

【0127】

本明細書で使用する時、「約」という語は、そうでないと言及されない限り、指示値の $\pm 10\%$ 、より好ましくは、 $\pm 5\%$ 、より好ましくは、 $\pm 1\%$ を表す

【0128】

本明細書を通して、「含む(comprise)」という語、または「含む(comprises)」もしくは「含んでいる(comprising)」などの変化形は、言及した要素、整数もしくは工程、または要素、整数もしくは工程の群を含むが、他の要素、整数もしくは工程、または要素、整数もしくは工程の群を除外しないことを意味すると理解されるだろう。

【0129】

選択された定義

本明細書で使用する時、「抽出植物脂質」及び「単離植物脂質」という語は、例えば、植物または種子などのその部分から、例えば、圧搾により抽出された脂質組成物を表す。該抽出脂質は、例えば、植物種子の圧搾により得られた比較的粗製の組成物、または植物材料由来の水、核酸、タンパク質及び炭水化物の1つ以上または各々の、もし全部でなければ、ほとんどを取り除いたより純粋な組成物であり得る。精製方法の例を以下に記載する。実施形態では、抽出または単離植物脂質は、組成物の少なくとも約60重量%、少なくとも約70重量%、少なくとも約80重量%、少なくとも約90重量%、または少なくとも約95重量%(w/w)の脂質を含む。脂質は、室温において、固体であっても液体であってもよく、液体の時、オイルであると見なされる。実施形態では、本発明の抽出脂質を、別原料(例えば、魚油のDHA)により産生されたDHA及び／またはDPAなどの別の脂質と配合していない。実施形態では、抽出後、DHA及び／またはDPAに対するオレイン酸、DHA及び／またはDPAに対するパルミチン酸、DHA及び／またはDPAに対するリノレン酸、及び総6脂肪酸：総3脂肪酸の1つ以上または全ての比を、無処置の種子または細胞中の比と比較したとき、有意に変化しなかった(例えば、10%または5%以下の変化)。別の実施形態では、抽出植物脂質を、無処置の種子または細胞中の比と比較したとき、DHA及び／またはDPAに対するオレイン酸、DHA及び／またはDPAに対するパルミチン酸、DHA及び／またはDPAに対するリノレン酸、及び総6脂肪酸：総3脂肪酸の1つ以上または全ての比を変化させ得る水素化または分取などの方法にさらさなかった。本発明の抽出植物脂質がオイル中に含まれるとき、該オイルは、ステロール類などの非脂肪酸分子をさらに含んでもよい。

【0130】

本明細書で使用する時、「抽出植物オイル」及び「単離植物オイル」という語は、抽出植物脂質または単離植物脂質を含み、室温において液体である物質または組成物を表す。該オイルは、植物または種子などのその部分から得られる。該抽出または単離オイルは、例えば、植物種子の圧搾により得られた比較的粗製の組成物、または植物材料由来の水、核酸、タンパク質及び炭水化物の1つ以上または各々の、もし全部でなければ、ほとんどを取り除いたより純粋な組成物であり得る。該組成物は、脂質または非脂質であり得る他の成分を含んでもよい。実施形態では、該オイルは、少なくとも約60重量%、少なくとも約70重量%、少なくとも約80重量%、少なくとも約90重量%、または少なくとも約95重量%(w/w)の抽出植物脂質を含む。実施形態では、本発明の抽出オイルを、別原料(例えば、魚油のDHA)により産生されたDHA及び／またはDPAなどの別のオイルと配合していない。実施形態では、抽出後、DHA及び／またはDPAに対するオレイン酸、DHA及び／またはDPAに対するパルミチン酸、DHA及び／またはDPAに対するリノレン酸、及び総6脂肪酸：総3脂肪酸の1つ以上または全ての比を、無処置の種子または細胞中の比と比較したとき、有意に変化しなかった(例えば、10%または5%以下の変化)。別の実施形態では、抽出植物オイルを、無処置の種子または細胞中の比と比較したとき、DHA及び／またはDPAに対するオレイン酸、DHA及び／

またはD P Aに対するパルミチン酸、D H A及び/またはD P Aに対するリノレン酸、及び総 6 脂肪酸：総 3 脂肪酸の1つ以上または全ての比を変化させ得る水素化または分取などの方法にさらさなかった。本発明の抽出植物オイルは、ステロール類などの非脂肪酸分子を含んでもよい。

【0131】

本明細書で使用する時、「抽出微生物脂質」または「抽出微生物オイル」などの語は、主に異なる点が脂質またはオイルの原料であることで、それぞれ、対応する語「抽出植物脂質」及び「抽出植物オイル」と類似の意味を有する。

【0132】

本明細書で使用する時、「オイル」は、主に脂質を含み、室温において液体である組成物である。例えば、本発明のオイルは、好ましくは、少なくとも75重量%、少なくとも80重量%、少なくとも85重量%または少なくとも90重量%の脂質を含む。通常、精製オイルは、該オイル中脂質の少なくとも90重量%のトリアシルグリセロール(TAG)を含む。ジアシルグリセロール(DAG)、遊離脂肪酸(FFA)、リン脂質及びステロール類などのオイルの少量成分は、本明細書に記載のように存在し得る。

【0133】

本明細書で使用する時、「脂肪酸」という語は、飽和あるいは不飽和の長鎖脂肪族末端をしばしば有するカルボン酸(または有機酸)を表す。通常、脂肪酸は、長さが少なくとも8個の炭素原子、より好ましくは、長さが少なくとも12個の炭素の炭素-炭素結合鎖を有する。本発明の好ましい脂肪酸は、18~22個の炭素原子(C18、C20、C22脂肪酸)、より好ましくは、20~22個の炭素原子(C20、C22)及び最も好ましくは、22個の炭素原子(C22)の炭素鎖を有する。ほとんどの天然脂肪酸は、その生合成が2個の炭素原子を有するアセテートを取り込むので、偶数の炭素原子を有する。脂肪酸は、遊離状態(非エステル化)またはトリグリセリド、ジアシルグリセリド、モノアシルグリセリド、アシル-CoA(チオエステル)結合または他結合体の部分などのエステル化された形態であり得る。脂肪酸は、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジイノシトールまたはジホスファチジルグリセロール体などのリン脂質としてエステル化され得る。実施形態では、脂肪酸は、例えば、C20またはC22PUFAのメチルまたはエチルエステルなどのメチル基またはエチル基とエステル化される。好ましい脂肪酸は、EPA、DPAもしくはDHA、またはEPAとDHA、もしくはEPA、DPAとDHA、もしくはEPAとDPAの混合物のメチルまたはエチルエステルである。

【0134】

「飽和脂肪酸」は、鎖上に二重結合も他の官能基も含まない。「飽和」という語は、全ての炭素(カルボン酸[-COOH]基は別として)が可能な限り多くの水素を含むという点において、水素を表す。言い換えれば、オメガ()末端は、3個の水素(-CH3-)を含み、鎖内の各炭素は2個の水素(-CH2-)を含む。

【0135】

「不飽和脂肪酸」は、1つ以上のアルケン官能基が鎖上に存在し、各アルケンが鎖の一重結合「-CH2-CH2-」部分を二重結合「-CH=CH-」部分(すなわち、別炭素と二重結合した炭素)により置換されていることを除いて、飽和脂肪酸と類似の形態である。二重結合のどちらかの側と結合している、鎖中の2つの隣接炭素原子は、cisまたはtrans配置、好ましくは、cis配置になることができる。実施形態では、脂質またはオイルまたは本発明は、1%未満のtrans配置の炭素-炭素二重結合を有する脂肪酸(trans脂肪酸)を含む脂肪酸組成物を有する。

【0136】

本明細書で使用する時、「一価不飽和脂肪酸」という語は、その炭素鎖中少なくとも12個の炭素原子及び鎖中1個のみのアルケン基(炭素-炭素二重結合)を含む脂肪酸を表す。本明細書で使用する時、「多価不飽和脂肪酸」または「PUFA」という語は、その炭素鎖中少なくとも12個の炭素原子及び鎖中少なくとも2個のアルケン基(炭素-

炭素二重結合)を含む脂肪酸を表す。

【0137】

本明細書で使用する、「長鎖多価不飽和脂肪酸」または「LC-PUFA」という語は、その炭素鎖中少なくとも20個の炭素原子及び鎖中少なくとも2個の炭素-炭素二重結合を含む脂肪酸を表し、それ故、VLC-PUFAを含む。本明細書で使用する、「超長鎖多価不飽和脂肪酸」または「VLC-PUFA」という語は、その炭素鎖中少なくとも22個の炭素原子及び鎖中少なくとも3個の炭素-炭素二重結合を含む脂肪酸を表す。通常、脂肪酸の炭素鎖中の炭素原子数は、分岐していない炭素鎖を表す。もし、炭素鎖が分岐しているならば、炭素原子数は、側鎖基のものを除外する。1つの実施形態では、長鎖多価不飽和脂肪酸は、3脂肪酸である、すなわち、該脂肪酸のメチル末端から3つ目の炭素-炭素結合において不飽和化(炭素-炭素二重結合)を有する。別の実施形態では、長鎖多価不飽和脂肪酸は、6脂肪酸である、すなわち、該脂肪酸のメチル末端から6つ目の炭素-炭素結合において不飽和化(炭素-炭素二重結合)を有する。さらなる実施形態では、長鎖多価不飽和脂肪酸は、アラキドン酸(ARA、20:4 5、8、11、14; 6)、エイコサテトラエン酸(ETA、20:4 8、11、14、17; 3)、エイコサペンタエン酸(EPA、20:5 5、8、11、14、17; 3)、ドコサペンタエン酸(DPA、22:5 7、10、13、16、19; 3)、またはドコサヘキサエン酸(DHA、22:6 4、7、10、13、16、19; 3)から成る群から選択される。LC-PUFAは、ジホモ-リノール酸(DGLA)またはエイコサトリエン酸(ETrA、20:3 11、14、17; 3)であってもよい。本発明に従って産生されるLC-PUFAは、上記のいずれかまたは全ての混合物であってもよく、他のLC-PUFAまたはこれらのLC-PUFAのいずれかの誘導体を含んでもよいことは、容易に分かるだろう。好ましい実施形態では、3脂肪酸は、少なくともDHA及び/またはDPA、好ましくは、DPA及びDHA、またはEPA、DPA及びDHA、またはEPA及びDPAである。植物から抽出するとき、DHAは、総脂肪酸組成物の20.1~30%、または20.1%から35%の間、好ましくは、30%~35%のレベルで、脂質またはオイル中に存在する。例えば、DHAは、総脂肪酸組成物の30.1%から35%の間のレベルで存在する。実施形態では、DHAレベルは、DPAレベルより多く、より好ましくは、EPA及びDPAの各々のレベルより多く、最も好ましくは、EPA及びDPAを合わせたレベルより多い。代替の実施形態では、DPAは、総脂肪酸組成物の約7%から30%または35%の間のレベルで存在し、DHAは存在しないか、もし存在するならば、2.0%未満、好ましくは1.0%未満、より好ましくは0.5%未満のレベルで存在し、最も好ましくは、存在しないか検出不可である。これは、細胞内に4-デサチュラーゼが存在しないことにより達成され得る。実施形態では、DPAレベルは、EPAレベルより多く、より好ましくは、EPA及びDHAの各々のレベルより多く、最も好ましくは、EPA及びDHAを合わせたレベルより多い。この実施形態では、DHAは、存在しなくてよく、もし存在するならば、総脂肪酸組成物の0.5%未満のレベルで存在する。

【0138】

さらに、本明細書で使用する、「長鎖多価不飽和脂肪酸」(LC-PUFA)及び「超長鎖多価不飽和脂肪酸」(VLC-PUFA)は、遊離状態(非エステル化)またはトリグリセリド(トリアシルグリセロール)、ジアシルグリセリド、モノアシルグリセリド、アシル-CoA結合または他結合体の部分などのエステル化された形態である脂肪酸を表す。トリグリセリドでは、DHAまたはDPAなどのLC-PUFAまたはVLC-PUFAは、sn-1/3位またはsn-2位においてエステル化されていてもよく、または該トリグリセリドは、LC-PUFA及びVLC-PUFAアシル基から選択される2つまたは3つのアシル基を含んでもよい。例えば、トリグリセリドは、sn-1位及びsn-3位の両方において、DHAまたはDPAを含んでもよい。脂肪酸は、ホスファチジルコリン(PC)、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルイノシトールまたはジホスファチジルグリセロー

10

20

30

40

50

ル体などのリン脂質としてエステル化され得る。このように、LC-PUFAは、細胞の脂質または細胞、組織または生物から抽出した精製オイルもしくは脂質の形態の混合物として存在し得る。好ましい実施形態では、本発明は、LC-PUFAを含む少なくとも前記トリアシルグリセロールを含む、言及したものなどの脂質の他の形態として存在する残部と、少なくとも75%または少なくとも85%のトリアシルグリセロールを含むオイルを提供する。オイルは、引き続き、例えば、強塩基を用いて加水分解して遊離脂肪酸を遊離することにより、またはエステル交換、蒸留などにより、さらに精製または処理してもよい。

【0139】

本明細書で使用する時、「総 6 脂肪酸」または「総 6 脂肪酸含有率」などは、状況に応じて、該総脂肪酸含有物のパーセントとして表され、抽出脂質、オイル、組換え細胞、植物部分または種子中のエステル化された、及びエステル化されていない全ての 6 脂肪酸の総和を表す。これらの 6 脂肪酸は、(もし存在するならば) LA、GLA、DGLA、ARA、EDA及び 6-DPAを含み、3 脂肪酸及び一価不飽和脂肪酸を含まない。本発明の植物、種子またはオイル中に存在する 6 脂肪酸は、全て、多価不飽和脂肪酸(PUFA)の分類に含まれる。

【0140】

本明細書で使用する時、「新 6 脂肪酸」または「新 6 脂肪酸含有率」などは、状況に応じて、該総脂肪酸含有物のパーセントとして表され、抽出脂質、オイル、組換え細胞、植物部分または種子中のエステル化された、及びエステル化されていない、LAを除いた全ての 6 脂肪酸の総和を表す。これらの新 6 脂肪酸は、細胞中に導入された遺伝子構築物(外来性ポリヌクレオチド)の発現により、本発明の細胞、植物、植物部分及び種子内で産生された脂肪酸であり、(もし存在するならば)GLA、DGLA、ARA、EDA及び 6-DPAを含むが、LA及び 3 脂肪酸及び一価不飽和脂肪酸を含まない。実例となる総 6 脂肪酸含有率及び新 6 脂肪酸含有率を、実施例 1 に記載のように、試料中の脂肪酸をFAMEに転換して、GCにより分析することによって決定する。

【0141】

本明細書で使用する時、「総 3 脂肪酸」または「総 3 脂肪酸含有率」などは、状況に応じて、該総脂肪酸含有物のパーセントとして表され、抽出脂質、オイル、組換え細胞、植物部分または種子中のエステル化された、及びエステル化されていない全ての 3 脂肪酸の総和を表す。これらの 3 脂肪酸は、(もし存在するならば)ALA、SDA、ETrA、ETA、EPA、DPA及びDHAを含み、6 脂肪酸及び一価不飽和脂肪酸を含まない。本発明の植物、種子またはオイル中に存在する 3 脂肪酸は、全て、多価不飽和脂肪酸(PUFA)の分類に含まれる。

【0142】

本明細書で使用する時、「新 3 脂肪酸」または「新 3 脂肪酸含有率」などは、状況に応じて、該総脂肪酸含有物のパーセントとして表され、抽出脂質、オイル、組換え細胞、植物部分または種子中のエステル化された、及びエステル化されていない、ALAを除いた全ての 3 脂肪酸の総和を表す。これらの新 3 脂肪酸は、細胞中に導入された遺伝子構築物(外来性ポリヌクレオチド)の発現により、本発明の細胞、植物、植物部分及び種子内で産生された 3 脂肪酸であり、(もし存在するならば)SDA、ETrA、ETA、EPA、DPA及びDHAを含むが、ALA及び 6 脂肪酸及び一価不飽和脂肪酸を含まない。実例となる総 3 脂肪酸含有率及び新 3 脂肪酸含有率を、実施例 1 に記載のように、試料中の脂肪酸をFAMEに転換して、GCにより分析することによって決定する。

【0143】

当業者が認識する通り、本発明の方法の工程として「植物部分を得ること」は、該方法用途の1つ以上の植物部分を得ることを含み得る。植物部分を得ることは、機械的収穫機を用いて、または植物部分を購入、または供給者から植物部分を受け取るなどの植物からの植物部分を収穫することを含む。別の例では、植物部分を得ることは、植物部分を収穫

10

20

30

40

50

した誰か他の者から植物を取得することであってよい。

【 0 1 4 4 】

本発明で使用され得る、デサチュラーゼ、エロンガーゼ並びにアシルトランスフェラーゼタンパク質及びそれをコードする遺伝子は、当技術分野で公知のもの、またはそのホモログもしくは誘導体のいずれかである。かかる遺伝子及びコードされたタンパク質サイズの例を、表 1 にリストする。LC-PUFA 生合成に関与することが分かっているデサチュラーゼ酵素は全て、いわゆる「フロントエンド」デサチュラーゼの群に属する。好ましいタンパク質、またはタンパク質の組合せは、本明細書で提供された配列番号 1 及び 2 の遺伝子構築物によりコードされたものである。

【表 1 - 1】

表 1. LC-PUFA 生合成に関連するクローン遺伝子

酵素	生物タイプ	種	受託番号	タンパク質サイズ(aa' s)	文献
Δ 4 - デサ チュラーゼ	原生生物	ユーグレナグラシリス (<i>Euglena gracilis</i>)	AY278558	541	Meyerら, 2003
	藻類	パヴロバルテリ (Pavlova lutherii)	AY332747	445	Tononら, 2003
		イソクリシスガルバナ (<i>Isochrysis galbana</i>)	AAV33631	433	Pereiraら, 2004b
		パヴロバサリナ (Pavlova salina)	AAV15136	447	Zhouら, 2007
	スラウスト キトリッド	スラウストキトリウムア ウレウム (<i>Thraustochytrium</i> aureum)	AAN75707 AAN75708 AAN75709 AAN75710	515	該当なし
		スラウストキトリウム種 (<i>Thraustochytrium</i> sp.) ATCC21685	AAM09688	519	Qiuら 2001
Δ 5 - デサ チュラーゼ	哺乳類	スラウストキトリウム種 (<i>Homo</i> sapiens)	AF199596	444	Choら, 1999b Leonardら, 2000b
	線形動物	カエノラブディティスエ レガンス (<i>Caenorhabditis</i> elegans)	AF11440, NM_069350	447	Michaelsonら, 1998b; Watts and Browse, 1999b
	真菌	モルティエレラルピナ (<i>Mortierella alpina</i>)	AF067654	446	Michaelsonら, 1998a; Knutzonら, 1998
		ピティウムイレギュラレ (<i>Pythium irregulare</i>)	AF419297	456	Hongら, 2002a

10

20

30

【表 1 - 2】

酵素	生物タイプ	種	受託番号	タンパク質サイズ(aa' s)	文献
		キイロタマホコリカビ (Dictyostelium discoideum)	AB022097	467	Saitoら, 2000
		魚類の内臓真菌症菌 (Saprolegnia diclina)		470	W002081668
	珪藻類	フェオダクチラム (Phaeodactylum tricornutum)	AY082392	469	Domergueら, 2002
	藻類	スラウストキトリウム種 (Thraustochytrium sp)	AF489588	439	Qiuら, 2001
		スラウストキトリウムア ウレウム (Thraustochytrium aureum)		439	W002081668
		イソクリシスガルバナ (Isochrysis galbana)		442	W002081668
	蘚類	ゼニゴケ (Marchantia polymorpha)	AY583465	484	Kajikawaら, 2004
Δ 6 - デサ チュラーゼ	哺乳類	ホモサピエンス (Homo sapiens)	NM_013402	444	Choら, 1999a; Leonardら, 2000
		ハツカネズミ (Mus musculus)	NM_019699	444	Choら, 1999a
	線形動物	カエノラブディティスエ レガンス (Caenorhabditis elegans)	Z70271	443	Napierら, 1998
	植物	ボラゴオフィキナリ (Borago officinales)	U79010	448	Sayanovaら, 1997
		シャゼンムラサキ属 (Echium)	AY055117		Garcia-Marotoら, 2002

10

20

【表 1 - 3】

酵素	生物タイプ	種	受託番号	タンパク質サイズ(aa' s)	文献
			AY055118		
		プリムラビアリ (Primula vialii)	AY234127	453	Sayanovaら, 2003
		アネモネレベレイ (Anemone leveillei)	AF536525	446	Whitneyら, 2003
	蘚類	ヤノウエノアカゴケ (Ceratodon purpureus)	AJ250735	520	Sperlingら, 2000
		ゼニゴケ (Marchantia polymorpha)	AY583463	481	Kajikawaら, 2004
		ヒメツリガネゴケ (Physcomitrella patens)	CAA11033	525	Girkeら, 1998
	真菌	モルティエレラルピナ (Mortierella alpina)	AF110510 AB020032	457	Huangら, 1999; Sakuradaniら, 1999
		ピティウムイレギュラレ (Pythium irregulare)	AF419296	459	Hongら, 2002a
		ムコールシルシネロイデ ス (Mucor circinelloides)	AB052086	467	NCBI*
		クモノスカビ属種 (Rhizopus sp.)	AY320288	458	Zhangら, 2004
		魚類の内臓真菌症菌 (Saprolegnia diclina)		453	W002081668
	珪藻類	フェオダクチラム (Phaeodactylum tricornutum)	AY082393	477	Domergueら, 2002
	細菌	シネコシステイス	L11421	359	Reddyら, 1993

30

40

【表 1 - 4】

酵素	生物タイプ	種	受託番号	タンパク質サイズ(aa' s)	文献
		(Synechocystis)			
	藻類	スラウストキトリウムアウレウム (Thraustochytrium aureum)		456	W002081668
二機能性 Δ5 / Δ6 - デサチュラーゼ	魚類	ゼブラフィッシュ (Danio rerio)	AF309556	444	Hastings ら, 2001
C20 Δ8 - デサチュラーゼ	藻類	ユーグレナグラシリス (Euglena gracilis)	AF139720	419	Wallis and Browse, 1999
	植物	ボラゴオフィキナリス (Borago officinales)	AAG43277	446	Sperling ら, 2001
Δ6 - エロングアーゼ	線形動物	カエノラブディティスエレガンス (Caenorhabditis elegans)	NM_069288	288	Beaudoin ら, 2000
	蘚類	ヒメツリガネゴケ (Physcomitrella patens)	AF428243	290	Zank ら, 2002
		ゼニゴケ (Marchantia polymorpha)	AY583464	290	Kajikawa ら, 2004
	真菌	モルティエレラルピナ (Mortierella alpina)	AF206662	318	Parker-Barnes ら, 2000
	藻類	パブロバルセリ (Pavlova lutheri) **		501	W0 03078639
		スラウストキトリウム (Thraustochytrium)	AX951565	271	W0 03093482

10

20

【表 1 - 5】

酵素	生物タイプ	種	受託番号	タンパク質サイズ(aa' s)	文献
		スラウストキトリウム種 (Thraustochytrium sp) **	AX214454	271	W0 0159128
PUFA-エロングアーゼ	哺乳類	ホモサピエンス (Homo sapiens)	AF231981	299	Leonard ら, 2000b; Leonard ら, 2002
		ドブネズミ (Rattus norvegicus)	AB071985	299	Inagaki ら, 2002
		ドブネズミ (Rattus norvegicus) **	AB071986	267	Inagaki ら, 2002
		ハツカネズミ (Mus musculus)	AF170907	279	Tvrdek ら, 2000
		ハツカネズミ (Mus musculus)	AF170908	292	Tvrdek ら, 2000
	魚類	ゼブラフィッシュ (Danio rerio)	AF532782	291 (282)	Agaba ら, 2004
		ゼブラフィッシュ (Danio rerio) **	NM_199532	266	Lo ら, 2003
	寄生虫	カエノラブディティスエレガンス (Caenorhabditis elegans)	Z68749	309	Abbott ら, 1998 Beaudoin ら, 2000
	藻類	スラウストキトリウムアウレウム (Thraustochytrium aureum) **	AX464802	272	W0 0208401-A2
		パブロバルセリ (Pavlova lutheri) **		320	W0 03078639
Δ9 - エロングアーゼ	藻類	イソクリシスガルバナ (Isochrysis galbana)	AF390174	263	Qi ら, 2002

30

40

【表 1 - 6】

酵素	生物タイプ	種	受託番号	タンパク質サイズ(aa' s)	文献
		ユーグレナグラシリス (<i>Euglena gracilis</i>)		258	WO 08/128241
Δ 5 - エロ ンガーゼ	藻類	オストレオコッカスタウリ (<i>Ostreococcus tauri</i>)	AAV67798	300	Meyerら, 2004
		ピラミモナス・コルダタ (<i>Pyramimonas cordata</i>)		268	WO 2010/057246
		パヴロバ種 (Pavlova sp.) CCMP459	AAV33630	277	Pereiraら, 2004b
		パヴロバサリナ (Pavlova salina)	AAV15135	302	Robertら, 2009
	珪藻類	タラシオシーラシュード ナナ (Thalassiosira pseudonana)	AAV67800	358	Meyerら, 2004
	魚類	ニジマス (Oncorhynchus mykiss)	CAM55862	295	WO 06/008099
	蘚類	ゼニゴケ (Marchantia polymorpha)	BAE71129	348	Kajikawaら, 2006

* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

** 機能は証明されない/示されない

【0145】

本明細書で使用する時、「フロントエンドデサチュラーゼ」という語は、3つの高度に保存されたヒスチジンボックスを含む典型的脂肪酸デサチュラーゼドメインと共に、N-末端チトクロムb5ドメインの存在により、構造的に特徴付けられる、脂質のアシル鎖のカルボン酸基と既存の不飽和部分との間に二重結合を導入する酵素分類のメンバーを表す(Napierら、1997)。

【0146】

本発明に使用するためのいずれかのエロンガーゼまたはデサチュラーゼの活性を、例えば、植物細胞などの細胞内、または好ましくは、体細胞胚またはトランスジェニック植物内で、該酵素をコードする遺伝子を発現し、該細胞、胚または植物が該酵素を発現しない比較の細胞、胚または植物と比較して、LC-PUFAを産生する能力増強を有するかどうかを決定することにより試験し得る。

【0147】

1つの実施形態では、本発明に使用するための1つ以上のデサチュラーゼ及び/またはエロンガーゼを、微細藻類から精製できる、すなわち、微細藻類から精製できるポリペプチドとアミノ酸配列が同一である。

【0148】

特定の酵素を本明細書で、「二元機能性」と具体的に説明している一方、そのような語がないからといって、必ずしも、特定の酵素が具体的に定義された以外の活性を有しないと意味するわけではない。

【0149】

デサチュラーゼ

本明細書で使用する時、「デサチュラーゼ」という語は、例えば、アシル-CoAエステルなどの通常エステル化された形態の脂肪酸基質のアシル基に炭素-炭素二重結合を導入可能な酵素を表す。アシル基を、ホスファチジルコリン(PC)などのリン脂質に、またはアシルキャリアータンパク質(ACP)に、または好ましい実施形態では、CoAにエステル化してもよい。デサチュラーゼは、それによって、3つの群に通常分類され得る。1つの実施形態では、デサチュラーゼは、フロントエンドデサチュラーゼである。

【0150】

本明細書で使用する時、「4-デサチュラーゼ」は、脂肪酸基質のカルボン酸末端

から4番目の炭素 - 炭素結合に炭素 - 炭素二重結合を導入するデサチュラーゼ反応を行うタンパク質を表す。「4 - デサチュラーゼ」は、少なくとも、DPAをDHAに転換可能である。好ましくは、「4 - デサチュラーゼ」は、少なくとも、DPA - CoAをDHA - CoAに転換可能である、すなわち、アシル - CoAデサチュラーゼである。実施形態では、「4 - デサチュラーゼ」は、PCのsn - 2位においてエステル化されたDPAを、DHA - PCに転換可能である。好ましくは、4 - デサチュラーゼは、DPA - PCに対してより、DPA - CoAに対して大きな活性を有する。DPAからDHAを産生する不飽和化工程は、哺乳類以外の生物内の4 - デサチュラーゼにより触媒され、この酵素をコードする遺伝子は、淡水原生生物種ミドリムシ (*Euglena gracilis*) 及び海産種スラウストキトリウム属 (*Thraustochytrium* sp.) から単離された (Qiura, 2001; Meyerら, 2003)。1つの実施形態では、4 - デサチュラーゼは、配列番号28の配列を有するアミノ酸、またはスラウストキトリウム属 (*Thraustochytrium* sp.) 4 - デサチュラーゼ、その生物活性フラグメント、または配列番号28と少なくとも80%同一なアミノ酸配列を含む。実施形態では、総抽出可能脂肪酸含有物の5% ~ 35%がDPAであるような高レベルのDPAを産生する、本発明の、または本発明で使用する植物、植物部分 (種子など) または細胞は、機能的4 - デサチュラーゼをコードする遺伝子を含まない。

【0151】

本明細書で使用するとき、「5 - デサチュラーゼ」は、脂肪酸基質のカルボン酸末端から5番目の炭素 - 炭素結合に炭素 - 炭素二重結合を導入するデサチュラーゼ反応を行うタンパク質を表す。実施形態では、脂肪酸基質はETAであり、該酵素はEPAを産生する。好ましくは、「5 - デサチュラーゼ」は、ETA - CoAをEPA - CoAに転換可能である、すなわち、アシル - CoAデサチュラーゼである。実施形態では、「5 - デサチュラーゼ」は、PCのsn - 2位においてエステル化されたETAを転換可能である。好ましくは、5 - デサチュラーゼは、ETA - PCに対してより、ETA - CoAに対して大きな活性を有する。5 - デサチュラーゼの例は、Ruiz - Lopezら (2012) 及びPetrieら (2010a) 及び本明細書の表1にリストされている。1つの実施形態では、5 - デサチュラーゼは、配列番号20の配列を有するアミノ酸、その生物活性フラグメント、または配列番号20と少なくとも80%同一なアミノ酸配列を含む。別の実施形態では、5 - デサチュラーゼは、配列番号22の配列を有するアミノ酸、その生物活性フラグメント、または配列番号22と少なくとも53%同一なアミノ酸配列を含む。別の実施形態では、5 - デサチュラーゼは、スラウストキトリウム属 (*Thraustochytrium* sp.) またはエミリアニア・ハクスレイ (*Emiliania huxleyi*) 由来である。

【0152】

本明細書で使用するとき、「6 - デサチュラーゼ」は、脂肪酸基質のカルボン酸末端から6番目の炭素 - 炭素結合に炭素 - 炭素二重結合を導入するデサチュラーゼ反応を行うタンパク質を表す。実施形態では、脂肪酸基質はALAであり、該酵素はSDAを産生する。好ましくは、「6 - デサチュラーゼ」は、ALA - CoAをSDA - CoAに転換可能である、すなわち、アシル - CoAデサチュラーゼである。実施形態では、「6 - デサチュラーゼ」は、PCのsn - 2位においてエステル化されたALAを転換可能である。好ましくは、6 - デサチュラーゼは、ALA - PCに対してより、ALA - CoAに対して大きな活性を有する。6 - デサチュラーゼは、5 - デサチュラーゼとしての活性も有し得、ETAに対する5 - デサチュラーゼ活性より、大きなALAに対する6 - デサチュラーゼ活性を有する限り、5 / 6 - 二元機能性デサチュラーゼと呼ばれる。6 - デサチュラーゼの例は、Ruiz - Lopezら (2012) 及びPetrieら (2010a) 及び本明細書の表1にリストされている。好ましい6 - デサチュラーゼは、ミクロモナス・プシラ (*Micromonas pusilla*)、ピシウム・イレグラレ (*Pythium irregulare*) またはオストレオコッカス・タウリ (*Ostreococcus taurii*) 由来である。

【 0 1 5 3 】

実施形態では、 $\Delta 6$ -デサチュラーゼは、以下：i) 脂肪酸基質として、リノール酸 (L A、18:2^{n-9,12},ⁿ⁻⁶) より $\Delta 5$ -リノレン酸 (A L A、18:3^{n-9,12,15},ⁿ⁻³) に対して大きな $\Delta 6$ -デサチュラーゼ活性；ii) 脂肪酸基質として P C の sn-2 位と結合した A L A に対してより、脂肪酸基質として A L A - C o A に対して大きな $\Delta 6$ -デサチュラーゼ活性；及び iii) E T r A に対する $\Delta 8$ -デサチュラーゼ活性のうち少なくとも2つ、好ましくは3つ全て、及び好ましくは植物細胞内で、有することによりさらに特徴付けられる。そのような $\Delta 6$ -デサチュラーゼを表2に示す。

【表2】

表2. アシル-CoA基質に対する活性を有することを示したデサチュラーゼ

酵素	生物タイプ	種	受託番号	タンパク質 サイズ (aa's)	文献
$\Delta 6$ -デサチュラーゼ	藻類	マントニエラ・スクアマータ (<i>Mantoniella squamata</i>)	CAQ30479	449	Hoffmann ら、2008
		オストレオコッカス・タウリ (<i>Ostreococcus taurii</i>)	AAW70159	456	Domergue ら、2005
		ミクロモナス・プシラ (<i>Micromonas pusilla</i>)	EEH58637		Petrie ら、2010a (配列番号7)
$\Delta 5$ -デサチュラーゼ	藻類	マントニエラ・スクアマータ (<i>Mantoniella squamata</i>)	CAQ30478	482	Hoffmann ら、2008
	植物	アネモネ・レベイレイ (<i>Anemone leveillei</i>)	該当なし		Sayanova ら、2007
$\omega 3$ -デサチュラーゼ	真菌	ピシウム・アフアニデルマータム (<i>Pythium aphanidermatum</i>)	FW362186.1	359	Xue ら、2012; W02008/054565
	真菌 (卵菌)	フィトフトラ・ソジャエ (<i>Phytophthora sojae</i>)	FW362214.1	363	Xue ら、2012; W02008/054565
	真菌 (卵菌)	フィトフトラ・ラモルム (<i>Phytophthora ramorum</i>)	FW362213.1	361	Xue ら、2012; W02008/054565

【 0 1 5 4 】

実施形態では、 $\Delta 6$ -デサチュラーゼは、対応する $\Delta 6$ 基質より、 $\Delta 3$ 基質に対して大きな活性を有し、植物細胞などの組換え細胞内の外来性ポリヌクレオチドから発現されるとき、少なくとも30%、より好ましくは少なくとも40%、または最も好ましくは少な

10

20

30

40

50

くとも50%、または酵母細胞内で発現されるとき、少なくとも35%の効率で、ALAに対して、オクタデカテトラエン酸（ステアリドン酸、SDA、18:4 6, 9, 12, 15, 3）を産生する活性を有する。実施形態では、6-デサチュラーゼは、脂肪酸基質としてLAより、ALAに対して大きな活性、例えば、少なくとも約2倍大きな6-デサチュラーゼ活性を有する。別の実施形態では、6-デサチュラーゼは、脂肪酸基質としてPCのsn-2位と結合したALAに対してより、脂肪酸基質としてALA-CoAに対して大きな活性、例えば、少なくとも約5倍大きな6-デサチュラーゼ活性または少なくとも約10倍大きな活性を有する。さらなる実施形態では、6-デサチュラーゼは、PCのsn-2位と結合した脂肪酸基質ALA-CoA及びALAの両方に対して活性を有する。

10

【0155】

1つの実施形態では、6-デサチュラーゼは、ETAに対して、検出可能な5-デサチュラーゼ活性を有しない。別の実施形態では、6-デサチュラーゼは、配列番号9、配列番号12または配列番号13の配列を有するアミノ酸、その生物活性フラグメント、または配列番号9、配列番号12または配列番号13と少なくとも77%同一であるアミノ酸配列を含む。別の実施形態では、6-デサチュラーゼは、配列番号12または配列番号13の配列を有するアミノ酸、その生物活性フラグメント、または配列番号12または配列番号13の1つまたは両方と少なくとも67%同一であるアミノ酸配列を含む。

6-デサチュラーゼは、8-デサチュラーゼ活性も有し得る。

【0156】

20

本明細書で使用するとき、「8-デサチュラーゼ」は、脂肪酸基質のカルボン酸末端から8番目の炭素-炭素結合に炭素-炭素二重結合を導入するデサチュラーゼ反応を行うタンパク質を表す。8-デサチュラーゼは、少なくとも、ETRAをETAに転換可能である。好ましくは、8-デサチュラーゼは、ETRA-CoAをETA-CoAに転換可能である、すなわち、アシル-CoAデサチュラーゼである。実施形態では、8-デサチュラーゼは、PCのsn-2位においてエステル化されたETRAを転換可能である。好ましくは、8-デサチュラーゼは、ETRA-PCに対してより、ETRA-CoAに対して大きな活性を有する。8-デサチュラーゼは、6-デサチュラーゼとしての活性も有し得、ALAに対する6-デサチュラーゼ活性より、大きなETRAに対する8-デサチュラーゼ活性を有する限り、6/8二元機能性デサチュラーゼと呼ばれる。8-デサチュラーゼの例を、表1にリストする。1つ実施形態では、8-デサチュラーゼは、配列番号37の配列を有するアミノ酸、その生物活性フラグメント、または配列番号37と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含む。

30

【0157】

本明細書で使用するとき、「3-デサチュラーゼ」は、脂肪酸基質のメチル末端から3番目の炭素-炭素結合に炭素-炭素二重結合を導入するデサチュラーゼ反応を行うタンパク質を表す。従って、3-デサチュラーゼは、LAをALAに、GLAをSDA（全てC18脂肪酸）、またはDGLAをETAに、及び/またはARAをEPA（C20脂肪酸）に転換し得る。いくつかの3-デサチュラーゼ（グループI）は、植物及びシアノバクテリア3-デサチュラーゼなどのC18基質に対してのみ活性を有する。そのような3-デサチュラーゼは、15-デサチュラーゼでもある。他の3-デサチュラーゼは、C18基質に対して活性を有しない（グループII）または活性有して（グループIII）、C20基質に対する活性を有する。そのような3-デサチュラーゼは、17-デサチュラーゼでもある。好ましい3-デサチュラーゼは、ピキア・パストリス（*Pichia pastoris*）3-デサチュラーゼ（配列番号6）など、LAをALAに、GLAをSDAに、DGLAをETAに、及びARAをEPAに転換するグループIII型である。3-デサチュラーゼの例としては、Pereiraら（2004a）（サブロレグニア・ディクリナ（*Saprolegnia diclina*）3-デサチュラーゼ、グループII）、Horiguchiら（1998）、Berberichら（1998）及びSpychallaら（1997）（カエノラブディティス・エレガンス（*C.elegans*）3-デサ

40

50

チュラーゼ、グループ I I I) により記載されたものが挙げられる。好ましい実施形態では、 3 - デサチュラーゼは、真菌 3 - デサチュラーゼである。本明細書で使用する
とき、「真菌 3 - デサチュラーゼ」は、卵菌起源、またはアミノ酸配列が少なくとも 9 5
% 同一であるその変異体を含む真菌起源由来の 3 - デサチュラーゼを表す。多数の 3
- デサチュラーゼをコードする遺伝子は、例えば、フィトフトラ・インフェスタンス (Ph
ytophthora infestans) (受託番号 C A J 3 0 8 7 0、W O 2 0 0 5 0 8 3 0 5 3 ; 配列
番号 4 7)、サブロレグニア・ディクリナ (Saprolegnia diclina) (受託番号 A A R 2
0 4 4 4、P e r e i r a ら、2 0 0 4 a 及び U S 7 2 1 1 6 5 6)、ピシウム・イレグ
ラレ (Pythium irregulare) (W O 2 0 0 8 0 2 2 9 6 3、グループ I I ; 配列番号 4 9
)、モルティエラ・アルピナ (Mortierella alpina) (S a k u r a d a n i ら、2 0
0 5 ; 受託番号 B A D 9 1 4 9 5 ; W O 2 0 0 6 0 1 9 1 9 2)、タラッシオシラ・シュ
ードナナ (Thalassiosira pseudonana) (A r m b r u s t ら、2 0 0 4 ; 受託番号 X P
_ 0 0 2 2 9 1 0 5 7 ; W O 2 0 0 5 0 1 2 3 1 6、配列番号 4 8)、ラカンセア・クル
イベリ (Lachancea kluyveri) (サッカロマイセス・クルイベリ (Saccharomyces kluyve
ri)) としても公知 ; O u r a ら、2 0 0 4 ; 受託番号 A B 1 1 8 6 6 3) など、真菌起源
から単離された。X u e ら (2 0 1 2) は、C 2 0 基質を好んで、 6 脂肪酸基質を、対
応する 3 脂肪酸に効率的に転換できる卵菌ピシウム・アフアニデルマータム (Pythium
aphanidermatum)、フィトフトラ・ソジャエ (Phytophthora sojae)、及びフィトフトラ
・ラモルム (Phytophthora ramorum) 由来の 3 - デサチュラーゼを記載しており、すな
わち、それらは、 1 5 - デサチュラーゼ活性より、強力な 1 7 - デサチュラーゼ活性
を有した。これらの酵素は、 1 2 - デサチュラーゼ活性がないが、基質として、アシル
- C o A 及びリン脂質画分の両方の脂肪酸を使用できる。

【 0 1 5 8 】

より好ましい実施形態では、真菌 3 - デサチュラーゼは、ピキア・パストリス (Pich
ia pastoris) 3 - デサチュラーゼ / 1 5 - デサチュラーゼ (Z h a n g ら、2 0 0
8 ; 受託番号 E F 1 1 6 8 8 4 ; 配列番号 6)、または少なくとも 9 5 % 同一であるポリ
ペプチドである。

【 0 1 5 9 】

実施形態では、 3 - デサチュラーゼは、A R A から E P A、D G L A から E T A、G
L A から S D A、A R A から E P A と D G L A から E T A の両方、A R A から E P A と G
L A から S D A の両方、またはこれら 3 つ全てのうち 1 つの転換を少なくとも可能である
。

【 0 1 6 0 】

1 つの実施形態では、 3 - デサチュラーゼは、少なくとも 3 つの炭素 - 炭素二重結合
を有する C 2 0 脂肪酸、好ましくは A R A に対する 1 7 - デサチュラーゼ活性を有する
。別の実施形態では、 3 - デサチュラーゼは、3 つの炭素 - 炭素二重結合を有する C 1
8 脂肪酸、好ましくは G L A に対する 1 5 - デサチュラーゼ活性を有する。好ましくは
、両方の活性が存在する。

【 0 1 6 1 】

本明細書で使用するとき、「 1 2 - デサチュラーゼ」は、脂肪酸基質のカルボン酸末
端から 1 2 番目の炭素 - 炭素結合に炭素 - 炭素二重結合を導入するデサチュラーゼ反応を
行うタンパク質を表す。 1 2 - デサチュラーゼは、通常、オレオイル - ホスファチジル
コリンまたはオレオイル - C o A のいずれかを、それぞれ、リノレオイル - ホスファチジ
ルコリン (1 8 : 1 - P C) またはリノレオイル - C o A (1 8 : 1 - C o A) に転換す
る。P C 結合基質を使用するサブクラスは、リン脂質依存性 1 2 - デサチュラーゼと呼
ばれ、後者のサブクラスは、アシル - C o A 依存性 1 2 - デサチュラーゼと呼ばれる。
植物及び真菌 1 2 - デサチュラーゼは、概して、前者のサブクラスであり、一方、動物
1 2 - デサチュラーゼは、後者のサブクラスであり、例えば、Z h o u ら (2 0 0 8)
による、昆虫からクローンした遺伝子によりコードされた 1 2 - デサチュラーゼがある
。多くの他の 1 2 - デサチュラーゼ配列を、配列データベースの検索により容易に同定

10

20

30

40

50

できる。

【0162】

本明細書で使用するとき、「15 - デサチュラーゼ」は、脂肪酸基質のカルボン酸末端から15番目の炭素 - 炭素結合に炭素 - 炭素二重結合を導入するデサチュラーゼ反応を行うタンパク質を表す。15 - デサチュラーゼをコードする多数の遺伝子は、植物及び真菌種からクローンされた。例えば、US 5 9 5 2 5 4 4は、植物 15 - デサチュラーゼをコードする核酸について記載している (FAD3)。これらの酵素は、植物 15 - デサチュラーゼの特徴であったアミノ酸モチーフを含む。WO 2 0 0 1 1 4 5 3 8は、ダイズFAD3をコードする遺伝子について記載している。多くの他の 15 - デサチュラーゼ配列を、配列データベースの検索により容易に同定できる。

10

【0163】

本明細書で使用するとき、「17 - デサチュラーゼ」は、脂肪酸基質のカルボン酸末端から17番目の炭素 - 炭素結合に炭素 - 炭素二重結合を導入するデサチュラーゼ反応を行うタンパク質を表す。17 - デサチュラーゼは、もし、C20基質に作用して3結合に不飽和化を導入するならば、3 - デサチュラーゼとも見なされる。

【0164】

好ましい実施形態では、12 - デサチュラーゼ及び/または 15 - デサチュラーゼは、真菌 12 - デサチュラーゼまたは真菌 15 - デサチュラーゼである。本明細書で使用するとき、「真菌 12 - デサチュラーゼ」または「真菌 15 - デサチュラーゼ」は、卵菌起源を含む真菌起源、またはそのアミノ酸配列が少なくとも95%同一である変異体由来である 12 - デサチュラーゼまたは 15 - デサチュラーゼを表す。多数のデサチュラーゼをコードする遺伝子は、真菌起源から単離された。US 7 2 1 1 6 5 6は、サプロレグニア・ディクリナ (*Saprolegnia diclina*) の 12 - デサチュラーゼについて記載している。WO 2 0 0 9 0 1 6 2 0 2は、*Helobdella robusta*、*Laccaria bicolor*、*Lottia gigantea*、*Microcoleus chthonoplastes*、*Monosiga brevicollis*、*Mycosphaerella fijiensis*、*Mycosphaerella graminicola*、*Naegleria gruberi*、*Nectria haematococca*、*Nematostella vectensis*、*Phycomyces blakesleeana*、*Trichoderma reesei*、*Phycomitrella patens*、*Postia placenta*、*Selaginella moellendorffii*及び*Microdochium nivale*の真菌デサチュラーゼについて記載している。WO 2 0 0 5 / 0 1 2 3 1 6は、*Thalassiosira pseudonana*及び他の真菌の 12 - デサチュラーゼについて記載している。WO 2 0 0 3 / 0 9 9 2 1 6は、*Neurospora crassa*、*Aspergillus nidulans*、*Botrytis cinerea*及び*Mortierella alpina*から単離された真菌 12 - デサチュラーゼ及び 15 - デサチュラーゼをコードする遺伝子について記載している。WO 2 0 0 7 1 3 3 4 2 5は、*Saccharomyces kluyveri*、*Mortierella alpina*、*Aspergillus nidulans*、*Neurospora crassa*、*Fusarium graminearum*、*Fusarium moniliforme*及び*Magnaporthe oryzae*から単離された真菌 15 - デサチュラーゼについて記載している。好ましい 12 - デサチュラーゼは、*Phytophthora sojae*由来のものである (Ruiz-Lopezら、2012)。

20

30

40

【0165】

真菌 12 - デサチュラーゼ、及び真菌 15 - デサチュラーゼの別のサブクラスは、二元機能性真菌 12 / 15 - デサチュラーゼである。これらをコードする遺伝子は、*Fusarium moniliforme* (受託番号DQ 2 7 2 5 1 6、Damudeら、2006)、アcantアメーバ・カステラーニ (*Acanthamoeba castellanii*) (受託

50

番号 E F 0 1 7 6 5 6、S a y a n o v a ら、2 0 0 6)、パーキンサス・マリヌス (P e r k i n s u s m a r i n u s) (W O 2 0 0 7 0 4 2 5 1 0)、クラピセプス・プルプレア (C l a v i c e p s p u r p u r e a) (受託番号 E F 5 3 6 8 9 8、M e e s a p y o d s u k ら、2 0 0 7) 及びコプリナス・シネレウス (C o p r i n u s c i n e r e u s) (受託番号 A F 2 6 9 2 6 6、Z h a n g ら、2 0 0 7) からクローンされた。

【 0 1 6 6 】

別の実施形態では、3 - デサチュラーゼは、少なくともいくつかの活性を有し、好ましくは、対応するアシル - P C 基質より、アシル - C o A 基質に対して大きな活性を有する。本明細書で使用するとき、「対応するアシル - P C 基質」は、脂肪酸が該アシル - C o A 基質中と同じ脂肪酸であるホスファチジルコリン (P C) の s n - 2 位においてエステル化された脂肪酸を表す。例えば、アシル - C o A 基質は、A R A - C o A であってよく、対応するアシル - P C 基質は s n - 2 A R A - P C である。実施形態では、活性は、少なくとも 2 倍大きい。好ましくは、3 - デサチュラーゼは、アシル - C o A 基質とその対応するアシル - P C 基質との両方に対して少なくともいくつかの活性を有し、C 1 8 と C 2 0 基質の両方に対して活性を有する。そのような 3 - デサチュラーゼの例は、上記クローンされた真菌デサチュラーゼの中で公知である。

【 0 1 6 7 】

さらなる実施形態では、3 - デサチュラーゼは、配列番号 6 の配列を有するアミノ酸、その生物活性フラグメント、または配列番号 6 と少なくとも 6 0 % 同一である、好ましくは、配列番号 6 と少なくとも 9 0 % または少なくとも 9 5 % 同一であるアミノ酸配列を含む。

【 0 1 6 8 】

その上、さらになる実施形態では、本発明で使用するためのデサチュラーゼは、対応するアシル - P C 基質より、アシル - C o A 基質に対して大きな活性を有する。別の実施形態では、本発明で使用するためのデサチュラーゼは、対応するアシル - C o A 基質より、アシル - P C 基質に対して大きな活性を有するが、両方の基質に対していくつかの活性を有する。上記のように、「対応するアシル - P C 基質」は、脂肪酸が該アシル - C o A 基質中と同じ脂肪酸であるホスファチジルコリン (P C) の s n - 2 位においてエステル化された脂肪酸を表す。実施形態では、該より大きな活性は、少なくとも 2 倍の大きさである。実施形態では、デサチュラーゼは、5 もしくは 6 - デサチュラーゼ、または 3 - デサチュラーゼであり、この例は、これに限定されないが、表 2 にリストしたものである。デサチュラーゼがどの基質に対して作用するか、例えば、アシル - C o A またはアシル - P C 基質についてテストするため、D o m e r g u e ら (2 0 0 3 及び 2 0 0 5) に記載の酵母細胞内で、アッセイを実行できる。デサチュラーゼと一緒に発現される際、エロンガーゼが該デサチュラーゼの産生の伸長を触媒する場合に、該エロンガーゼが少なくとも約 9 0 % の植物細胞内酵素転換効率を有するとき、該デサチュラーゼに対するアシル - C o A 基質の能力も推測できる。これの基づき、G A 7 構築物 (実施例 2 及び 3) 及びその変異体 (実施例 4) から発現された 5 - デサチュラーゼ及び 4 - デサチュラーゼは、それらのそれぞれのアシル - C o A 基質、E T A - C o A 及び D P A - C o A を不飽和化可能である。

【 0 1 6 9 】

エロンガーゼ

脂肪酸伸長が 4 工程：縮合反応、還元反応、脱水反応及び第二還元反応から成ることは生化学的証拠が示唆している。本発明に関連して、「エロンガーゼ」は、適切な生理条件下、伸長複合体の他のメンバーの存在で、縮合工程を触媒するポリペプチドを表す。伸長タンパク質複合体の縮合成分 (「エロンガーゼ」) のみの細胞内非相同発現または相同的発現は、それぞれのアシル鎖の伸長に必要であることが分かっている。このように、導入されたエロンガーゼは、トランスジェニック宿主から還元及び脱水活性を首尾良く補充でき、アシル伸長を上手く実行する。脂肪酸基質の鎖長及び不飽和度に対する伸長反応の特異性は、縮合成分に属すると考えられる。この成分は、伸長反応に律速であるとも考えら

10

20

30

40

50

れる。

【0170】

本明細書で使用するとき、「5 - エロンガーゼ」は、EPAをDPAに少なくとも転換可能である。5 - エロンガーゼの例としては、WO2005/103253に開示されたものが挙げられる。1つの実施形態では、5 - エロンガーゼは、EPAに対して、少なくとも60%、より好ましくは少なくとも65%、より好ましくは少なくとも70%、最も好ましくは少なくとも80%または90%の効率でDPAを産生する活性を有する。さらなる実施形態では、5 - エロンガーゼは、配列番号25のアミノ酸配列、その生物活性フラグメント、または配列番号25と少なくとも47%同一であるアミノ酸配列を含む。さらなる実施形態では、6 - エロンガーゼは、オストレオコッカス・タウリ (*Ostreococcus taurii*) またはオストレオコッカス・ルシマリヌス (*Ostreococcus lucimarinus*) 由来である (US2010/088776)。

10

【0171】

本明細書で使用するとき、「6 - エロンガーゼ」は、SDAをETAに少なくとも転換可能である。6 - エロンガーゼの例としては、表1にリストしたものが挙げられる。1つの実施形態では、6 - エロンガーゼは、配列番号16の配列を有するアミノ酸、その生物活性フラグメント (配列番号17のフラグメントなど)、または配列番号16または配列番号17の1つまたは両方と少なくとも55%同一であるアミノ酸配列を含む。実施形態では、6 - エロンガーゼは、フィスコミトレラ・パテンス (*Physcomitrella patens*) (Zankら、2002; 受託番号AF428243) または *Thalassiosira pseudonana* (Ruiz-Lopezら、2012) 由来である。

20

【0172】

本明細書で使用するとき、「9 - エロンガーゼ」は、ALAをETRAに少なくとも転換可能である。9 - エロンガーゼの例としては、表1にリストしたものが挙げられる。1つの実施形態では、9 - エロンガーゼは、配列番号29の配列を有するアミノ酸、その生物活性フラグメント、または配列番号29と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含む。別の実施形態では、9 - エロンガーゼは、配列番号31の配列を有するアミノ酸、その生物活性フラグメント、または配列番号31と少なくとも81%同一であるアミノ酸配列を含む。別の実施形態では、9 - エロンガーゼは、配列番号33の配列を有するアミノ酸、その生物活性フラグメント、または配列番号33と少なくとも50%同一であるアミノ酸配列を含む。別の実施形態では、9 - エロンガーゼは、配列番号35の配列を有するアミノ酸、その生物活性フラグメント、または配列番号35と少なくとも50%同一であるアミノ酸配列を含む。さらなる実施形態では、9 - エロンガーゼは、対応する3基質より、6基質に対して大きな活性を有する、またはその逆である。

30

【0173】

本明細書で使用するとき、「対応する3基質より、6基質に対して大きな活性を有する」という語は、3デサチュラーゼの作用と異なる基質に対する酵素の相対的作用を表す。好ましく、6基質はLAであり、3基質はALAである。

【0174】

6 - エロンガーゼ及び9 - エロンガーゼ活性を有するエロンガーゼは、少なくとも (i) SDAをETAに転換、及び (ii) ALAをETRAに転換可能であり、9 - エロンガーゼ活性より大きな6 - エロンガーゼ活性を有する。1つの実施形態では、エロンガーゼは、SDAに対して、少なくとも50%、より好ましくは少なくとも60%であるETAを産生する転換効率、及び/またはALAに対して、少なくとも6%、より好ましくは少なくとも9%であるETRAを産生する転換効率を有する。別の実施形態では、エロンガーゼは、9 - エロンガーゼ活性より、少なくとも約6.5倍大きな6 - エロンガーゼ活性を有する。さらなる実施形態では、エロンガーゼは、検出可能な5 - エロンガーゼ活性を有しない。

40

【0175】

他の酵素

50

微生物細胞などの組換え細胞、またはトランスジェニック植物もしくはその部分に導入された導入遺伝子は、L P A A Tもコードし得る。本明細書で使用するとき、リゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼまたはアシル - C o A - リゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼとも呼ばれる「1 - アシル - グリセロール - 3 - リン酸アシルトランスフェラーゼ」(L P A A T)という語は、s n - 1 - アシル - グリセロール - 3 - リン酸 (s n - 1 G - 3 - P) を、s n - 2 位でアシル化してホスファチジン酸 (P A) を生成するタンパク質を表す。従って、「1 - アシル - グリセロール - 3 - リン酸アシルトランスフェラーゼ活性」という語は、s n - 2 位において (s n - 1 G - 3 - P) をアシル化して P A (E C 2 . 3 . 1 . 5 1) を産生することを表す。好ましい L P A A T は、基質として多価不飽和 C 2 2 アシル - C o A を使用して多価不飽和 C 2 2 アシル基を L P A の s n - 2 位に転移して P A を生成することができるものである。実施形態では、多価不飽和 C 2 2 アシル - C o A は、D H A - C o A 及び / または D P A - C o A である。そのような L P A A T を実施例 7 に例示しており、そこに記載のように試験できる。実施形態では、本発明の有用な L P A A T は、配列番号 4 0 ~ 4 6 のいずれか 1 つの配列を有するアミノ酸、その生物活性フラグメント、またはいずれか 1 つ以上の配列番号 4 0 ~ 4 6 と少なくとも 4 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む。別の実施形態では、L P A A T は、配列番号 4 4 のいずれか 1 つの配列を有するアミノ酸を有しない。好ましい実施形態では、C 2 2 多価不飽和脂肪アシル - C o A 基質、好ましくは、D H A - C o A 及び / または D P A - C o A を使用できる、本発明に有用な L P A A T は、配列番号 4 1、4 2 及び 4 4 のいずれか 1 つの配列を有するアミノ酸、その生物活性フラグメント、またはいずれか 1 つ以上の配列番号 4 1、4 2 及び 4 4 と少なくとも 4 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む。好ましい実施形態では、C 2 2 多価不飽和脂肪アシル - C o A 基質、好ましくは、D H A - C o A 及び / または D P A - C o A を使用できる、本発明に有用な L P A A T は、配列番号 4 1 または 4 2 のいずれか 1 つの配列を有するアミノ酸、その生物活性フラグメント、またはいずれか 1 つ以上の配列番号 4 1 または 4 2 と少なくとも 4 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む。遺伝子構築物がトランスジェニック細胞内で 4 - デサチュラーゼを発現し、及び / またはトランスジェニック細胞が D H A を産生する実施形態では、L P A A T は、好ましくは、そのアミノ酸配列が配列番号 4 4 で記載されるモルティエラ・アルピナ (*Mortierella alpina*) L P A A T 以外の L P A A T である。あるいは、もし、遺伝子構築物がトランスジェニック細胞内で 4 - デサチュラーゼを発現しない、及び / またはトランスジェニック細胞が D P A を産生するが D H A を産生しないならば、L P A A T は、好ましくは、そのアミノ酸配列が配列番号 4 4 で記載されるモルティエラ・アルピナ (*Mortierella alpina*) L P A A T、または基質として D P A - C o A を使用して、D P A を L P A に転移し、s n - 2 位において D P A を有する D A G を生成できる別の L P A A T である。

【 0 1 7 6 】

組換え細胞、トランスジェニック細胞、トランスジェニック植物もしくはその部分に導入された導入遺伝子は、D G A T もコードし得る。本明細書で使用するとき、「ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ」(E C 2 . 3 . 1 . 2 0 ; D G A T) という語は、脂肪アシル基を、アシル - C o A からジアシルグリセロール基質に転移してトリアシルグリセロールを産生するタンパク質を表す。従って、「ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ活性」という語は、アシル - C o A からジアシルグリセロールへ転移してトリアシルグリセロールを産生することを表す。それぞれ、D G A T 1、D G A T 2 及び D G A T 3 と呼ばれる 3 つの既知タイプの D G A T がある。D G A T 1 ポリペプチドは、通常、10 個の膜貫通型ドメインを有し、D G A T 2 は、通常、2 個の膜貫通型ドメインを有し、一方、D G A T 3 は、通常、可溶性である。D G A T 1 ポリペプチドの例としては、アスペルギルス・フミガーツス (*Aspergillus fumigatus*) (受託番号 X P _ 7 5 5 1 7 2)、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) (C A B 4 4 7 7 4)、トウモロコシ (*Ricinus communis*) (A A R 1 1 4 7 9)、シナアブラギリ (*Vernicia fordii*) (A B C 9 4 4 7 2)、ベルノニア・ガラメンシス (*Vernonia galamensis*) (A B V 2 1

9 4 5、A B V 2 1 9 4 6)、ニシキギ(*Euonymus alatus*)(A A V 3 1 0 8 3)、線虫(*Caenorhabditis elegans*)(A A F 8 2 4 1 0)、ドブネズミ(*Rattus norvegicus*)(N P __ 4 4 5 8 8 9)、ホモサピエンス(*Homo sapiens*)(N P __ 0 3 6 2 1 1)、並びにその変異体及び/または突然変異体のD G A T 1 遺伝子によりコードされたポリペプチドが挙げられる。D G A T 2 ポリペプチドの例としては、シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)(受託番号N P __ 5 6 6 9 5 2)、トウゴマ(*Ricinus communis*)(A A Y 1 6 3 2 4)、シナアブラギリ(*Vernicia fordii*)(A B C 9 4 4 7 4)、モルティエレラ・ラマニアナ(*Mortierella ramanniana*)(A A K 8 4 1 7 9)、ホモサピエンス(*Homo sapiens*)(Q 9 6 P D 7、Q 5 8 H T 5)、ウシ(*Bos taurus*)(Q 7 0 V D 8)、ハツカネズミ(*Mus musculus*)(A A K 8 4 1 7 5)、ミクロモナス属(*Micromonas*) C C M P 1 5 4 5、並びにその変異体及び/または突然変異体のD G A T 2 遺伝子によりコードされたポリペプチドが挙げられる。D G A T 3 ポリペプチドの例としては、ピーナツ(*Arachis hypogaea*、S a h a ら、2 0 0 6)並びにその変異体及び/または突然変異体のD G A T 3 遺伝子によりコードされたポリペプチドが挙げられる。

10

【0177】

ポリペプチド/ペプチド

「ポリペプチド」及び「タンパク質」という語は、概して、互換的に使用される。

【0178】

ポリペプチドまたはポリペプチドの分類を、基準アミノ酸配列に対するそのアミノ酸配列の同一性の程度(同一性%)により、または1つの基準アミノ酸配列に対して、別のものに対するより大きな%の同一性を有することにより、規定し得る。基準アミノ酸配列に対するポリペプチドの同一性%は、通常、ギャップクリエーションペナルティ=5、及びギャップエクステンションペナルティ=0.3のパラメーターを用いて、GAP解析(Needleman及びWunsch、1970; GCGプログラム)により決定される。クエリシーケンスは、少なくとも15アミノ酸長であり、GAP解析は、少なくとも15アミノ酸の領域に渡って2つの配列を配置する。より好ましくは、クエリシーケンスは、少なくとも50アミノ酸長であり、GAP解析は、少なくとも50アミノ酸の領域に渡って2つの配列を配置する。より好ましくは、クエリシーケンスは、少なくとも100アミノ酸長であり、GAP解析は、少なくとも100アミノ酸の領域に渡って2つの配列を配置する。さらにより好ましくは、クエリシーケンスは、少なくとも250アミノ酸長であり、GAP解析は、少なくとも250アミノ酸の領域に渡って2つの配列を配置する。さらにより好ましくは、GAP解析はその完全長に渡って2つの配列を配置する。ポリペプチドまたはポリペプチドの分類は、基準のポリペプチドと同じ酵素活性を有してもよく、異なる活性を有してもよく、または活性を有しなくてもよい。好ましくは、ポリペプチドは、基準のポリペプチドの少なくとも10%、少なくとも50%、少なくとも75%または少なくとも90%の酵素活性を有する。

20

30

【0179】

本明細書で使用する時、「生物活性」フラグメントは、例えば、デサチュラーゼ及び/またはエロンガーゼ活性または他の酵素活性を有する完全長基準ポリペプチドの定義された活性を維持する、本明細書で定義されたポリペプチドの部分である。本明細書で使用する時、生物活性フラグメントは、完全長ポリペプチドを除外する。生物活性フラグメントは、それらが定義された活性を維持する限り、いかなるサイズの部分でもあり得る。好ましくは、生物活性フラグメントは、完全長タンパク質の少なくとも10%、少なくとも50%、少なくとも75%または少なくとも90%の活性を維持する。

40

【0180】

定義されたポリペプチドまたは酵素に関して、本明細書で提供されたものより高い同一性の数字は、好ましい実施形態を包含することは理解されるだろう。従って、適用可能な場合、最小の同一性%の数字に照らして、ポリペプチド/酵素が、関連する指定配列番号と、少なくとも60%、より好ましくは65%、より好ましくは70%、より好ましくは

50

75%、より好ましくは76%、より好ましくは80%、より好ましくは85%、より好ましくは90%、より好ましくは91%、より好ましくは92%、より好ましくは93%、より好ましくは94%、より好ましくは95%、より好ましくは96%、より好ましくは97%、より好ましくは98%、より好ましくは99%、より好ましくは99.1%、より好ましくは99.2%、より好ましくは99.3%、より好ましくは99.4%、より好ましくは99.5%、より好ましくは99.6%、より好ましくは99.7%、より好ましくは99.8%、さらにより好ましくは99.9%同一であるアミノ酸配列を含むことは好ましい。

【0181】

本明細書で定義されたポリペプチドのアミノ酸配列変異体/突然変異体を、本明細書で定義された核酸に適切なヌクレオチド変化を導入することにより、または所望のポリペプチドのインビトロ合成により、準備できる。かかる変異体/突然変異体としては、例えば、アミノ酸配列内の残基の欠失、挿入または置換が挙げられる。欠失、挿入及び置換の組合せを行って、最終構築物に到達できるが、但し、最終ペプチド構築物は、所望の酵素活性を有する。

【0182】

突然変異(変化した)ペプチドを、当技術分野で公知のいずれかの技術を用いて、準備できる。例えば、本明細書で定義されたポリヌクレオチドに対して、インビトロ突然変異誘発またはHarayama(1998)により広範に記載されているDNAシャフリング技術を行うことができる。突然変異/変化したDNA由来の生成物を、本明細書に記載の技術を用いて容易にスクリーニングし、それらが、例えば、デサチュラーゼまたはエロンガーゼ活性を有しているかどうかを決定できる。

【0183】

アミノ酸配列突然変異体の設計では、突然変異部位の位置及び突然変異体の性質は、修飾される特徴に依存するだろう。突然変異の部位を、例えば、(1)まず、保存的アミノ酸の選択により、次いで得られた結果に依ってより多くのラジカルを選択により置換し、(2)対象の残基を欠失し、または(3)その位置に隣接して他の残基を挿入することにより、個別にまたは連続して修飾できる。

【0184】

アミノ酸配列の欠失は、概して、約1~15残基、より好ましくは約1~10残基、典型的には約1~5隣接残基の範囲である。

【0185】

置換突然変異体は、除去したポリペプチド分子中に少なくとも1つのアミノ酸残基及びその位置に挿入した異なる残基を有する。置換突然変異誘発の最も対象の部位としては、天然デサチュラーゼまたはエロンガーゼ中に保存されない部位が挙げられる。これらの部位は、好ましくは、酵素活性を維持するため、比較的保存的方法で置換される。このような保存的置換を、「実例となる置換」の表題の表3に示す。

【0186】

好ましい実施形態では、突然変異/変異ポリペプチドは、天然ポリペプチドと比較したとき、保存的アミノ酸変化のみ有する、または1つもしくは2つもしくは3つもしくは4つ以下の保存的アミノ酸変化を有する。保存的アミノ酸変化の詳細を表3に示す。当業者が認識するように、かかる少しの変化を、組換え細胞内で発現するとき、ポリペプチドの活性を変化させないで、合理的に予測できる。

【0187】

ポリヌクレオチド

本発明は、例えば、遺伝子、単離ポリヌクレオチド、T-DNA分子などのキメラ遺伝子構築物、またはキメラDNAであり得るポリヌクレオチドの使用も提供する。それは、ゲノムまたは合成起源、二本鎖もしくは一本鎖のDNAもしくはRNAであってよく、本明細書で定義された特定の活性を行うために炭水化物、脂質、タンパク質または他物質と結合していてもよい。「ポリヌクレオチド」という語は、本明細書中、「核酸分子」とい

10

20

30

40

50

う語と互換的に使用される。

【 0 1 8 8 】

実施形態では、ポリヌクレオチドは非天然である。非天然ポリヌクレオチドの例としては、これに限定されないが、突然変異したもの（本明細書に記載の方法を用いてなど）、及びタンパク質をコードするオープンリーディングフレームが自然には関連しないプロモーター（本明細書に記載の構築物など）と作動可能に結合しているポリヌクレオチドが挙げられる。

【表 3】

表 3. 代表的な置換

オリジナル残基	代表的な置換
A l a (A)	v a l ; l e u ; i l e ; g l y
A r g (R)	l y s
A s n (N)	g l n ; h i s
A s p (D)	g l u
C y s (C)	s e r
G l n (Q)	a s n ; h i s
G l u (E)	a s p
G l y (G)	p r o , a l a
H i s (H)	a s n ; g l n
I l e (I)	l e u ; v a l ; a l a
L e u (L)	i l e ; v a l ; m e t ; a l a ; p h e
L y s (K)	a r g
M e t (M)	l e u ; p h e
P h e (F)	l e u ; v a l ; a l a
P r o (P)	g l y
S e r (S)	t h r
T h r (T)	s e r
T r p (W)	t y r
T y r (Y)	t r p ; p h e
V a l (V)	i l e ; l e u ; m e t ; p h e , a l a

【 0 1 8 9 】

本明細書で使用する時、「遺伝子」という語は、広義に考えるべきであり、転写された領域を含むデオキシリボヌクレオチド配列及び、もし翻訳されたならば、構造的遺伝子のタンパク質コード領域を含み、いずれかの末端の少なくとも約 2 k b の距離に対して、5' と 3' 末端の双方上のコード領域と隣接する位置の配列を含み、該遺伝子の発現に係する。この点では、遺伝子は、プロモーター、エンハンサー、停止などの制御シグナル及び/または所与の遺伝子と自然に関連するポリアデニル化シグナル、または該遺伝子が「キメラ遺伝子」と呼ばれる場合の非相同制御シグナルを含む。タンパク質コード領域の 5' に位置し、mRNA 上に存在する配列は、5' 非翻訳配列と呼ばれる。タンパク質コード領域の 3' または下流に位置し、mRNA 上に存在する配列は、3' 非翻訳配列と呼ばれる。「遺伝子」という語は、cDNA 及び遺伝子のゲノム体の両方を包含する。遺伝子のゲノム体またはクローンは、「イントロン」または「介在領域」または「介在配列」と呼ばれる非コード配列により分断され得るコード領域を含む。イントロンは、核RNA (hnRNA) に転写される遺伝子のセグメントである。イントロンは、エンハンサーなどの調節エレメントを含み得る。イントロンを、核または一次転写産物から除去または「スプライシング」し；従って、イントロンはメッセンジャーRNA (mRNA) 転写産物中に存在しない。mRNA は、翻訳中、新生ポリペプチド中のアミノ酸の配列または順序

を指定する働きをする。「遺伝子」という語は、本明細書に記載のタンパク質の全てまたは部分をコードする合成または融合分子及び上記のいずれか1つに対する相補ヌクレオチド配列を含む。

【0190】

本明細書で使用する時、「キメラDNA」または「キメラ遺伝子構築物」または類似物は、その天然部位の天然DNA分子でないDNA分子を表し、本明細書で、「DNA構築物」と呼ぶ。通常、キメラDNAまたはキメラ遺伝子は、天然で、作動可能と一緒に結合したものが見つからない、すなわち、互いに非相同である調節及び転写またはタンパク質コード配列を含む。従って、キメラDNAまたはキメラ遺伝子は、異なる起源由来の調節配列及びコード配列、または同じ起源由来だが、天然で見られるものと異なるように配置されている調節配列及びコード配列を含んでもよい。

10

【0191】

「内在性遺伝子」は、生物のゲノム中のその天然の位置の天然遺伝子を表す。本明細書で使用する時、「組換え核酸分子」、「組換えポリヌクレオチド」またはその変異体は、組換えDNA技術により構築または修飾された核酸分子を表す。「外来性 (foreign) ポリヌクレオチド」または「外来性 (exogenous) ポリヌクレオチド」または「非相同ポリヌクレオチド」等は、実験操作により細胞のゲノム中に導入された核酸を表す。外来性 (foreign) または外来性 (exogenous) 遺伝子は、非天然生物中に挿入された遺伝子、天然宿主内の新しい位置に導入された天然遺伝子、またはキメラ遺伝子であってよい。「導入遺伝子」は、形質転換方法によりゲノム中に導入された遺伝子である。「遺伝子的修飾」、「トランスジェニック」という語及びその変化形は、形質転換または形質導入により細胞中に遺伝子を導入すること、細胞内の遺伝子を突然変異させること、及びこれらの作用が起こった細胞または生物またはその子孫内の遺伝子の調節を変更または調節することを含む。本明細書で使用する時、「ゲノム領域」は、導入遺伝子、または導入遺伝子群 (本明細書中、クラスターとも呼ばれる) が細胞、またはその祖先中に挿入されたゲノム内の位置を表す。そのような領域は、本明細書に記載の方法などにより人の介在によって組み込まれたヌクレオチドのみ含む。

20

【0192】

ポリヌクレオチドに関連した「外来性」という語は、その自然状態と比較して、変化した量で細胞内に存在するときのポリヌクレオチドを表す。1つの実施形態では、細胞は、自然に、ポリヌクレオチドを含まない細胞である。しかしながら、該細胞は、コードされたポリペプチドの変化した産生量で得られる非内在性ポリヌクレオチドを含む細胞であってよい。外来性ポリヌクレオチドは、トランスジェニック (組換え) 細胞、または存在する場合、無細胞発現系の他成分から分離していないポリヌクレオチド、及びそのような細胞または少なくともいくつかの他成分から離して引き続き精製した無細胞系で産生されたポリヌクレオチドを含む。外来性ポリヌクレオチド (核酸) は、天然に存在するヌクレオチドの隣接伸長 (contiguous stretch) であり得、または結合して一本鎖ポリヌクレオチドを生成する異なる起源 (天然及び/または合成) からのヌクレオチドの2つ以上の隣接伸長を含む。通常、このようなキメラポリヌクレオチドは、対象となる細胞内のオープンリーディングフレームの転写の駆動に適切なプロモーターと作動可能に結合したポリペプチドをコードするオープンリーディングフレームを少なくとも含む。

30

40

【0193】

定義されたポリヌクレオチドに関して、上記のものより高い同一性%の特徴は、好ましい実施形態を包含することは認識されるだろう。このように、適用可能な場合、最小の同一性%の数字に照らして、ポリヌクレオチドが、関連する指定配列番号と、少なくとも60%、より好ましくは65%、より好ましくは70%、より好ましくは75%、より好ましくは80%、より好ましくは85%、より好ましくは90%、より好ましくは91%、より好ましくは92%、より好ましくは93%、より好ましくは94%、より好ましくは95%、より好ましくは96%、より好ましくは97%、より好ましくは98%、より好ましくは99%、より好ましくは99.1%、より好ましくは99.2%、より好ましく

50

は 99.3%、より好ましくは 99.4%、より好ましくは 99.5%、より好ましくは 99.6%、より好ましくは 99.7%、より好ましくは 99.8%、さらにより好ましくは 99.9% 同一であるポリヌクレオチド配列を含むことは好ましい。

【0194】

ポリヌクレオチドは、天然分子と比較したとき、ヌクレオチド残基の欠失、挿入、または置換である 1 つ以上の突然変異を有してもよい。基準配列と比較して突然変異を有するポリヌクレオチドは、天然（すなわち、天然起源から単離）または合成（例えば、上記核酸に対して部位特異的突然変異誘発または DNA シャフリングを行うことにより）のいずれかであり得る。従って、ポリヌクレオチドが天然起源または組換えのいずれかからであり得ることは明白である。好ましいポリヌクレオチドは、当技術分野で公知の、植物細胞内の翻訳にコドン最適化したコード領域を有するものである。

【0195】

組換えベクター

組換え発現を、本発明の組換え細胞、または植物もしくは植物部分の産生するため使用できる。組換えベクターは、非相同ポリヌクレオチド配列、すなわち、好ましくは、該ポリヌクレオチド分子が誘導された種以外の種由来の、本明細書で定義されたポリヌクレオチド分子と隣接して、天然に見られないポリヌクレオチド配列を含む。ベクターは、RNA あるいは DNA のいずれかであり得、通常、プラスミドである。プラスミドベクターは、通常、原核細胞内の発現カセット、例えば、pUC 誘導ベクター、pSK 誘導ベクター、pGEM 誘導ベクター、pSP 誘導ベクター、pBS 誘導ベクター、または好ましくは、1 つ以上の T-DNA 領域を含むバイナリーベクターの容易な選択、増幅、及び形質転換を提供する付加的核酸配列を含む。付加的核酸配列は、ベクターの自律的複製を提供する複製開始点、好ましくは、抗菌剤または除草剤耐性をコードする選択可能なマーカー遺伝子、核酸配列または核酸構築物内でコードされた遺伝子を挿入する多重部位を提供する固有の多重クロニング部位、及び原核細胞及び真核細胞（特に植物）の形質転換を促進する配列を含む。組換えベクターは、好ましくは、本明細書で定義されたキメラ遺伝子構築物と組み合わせて、本明細書で定義された 1 つより多いポリヌクレオチド、例えば、3 つ、4 つ、5 つまたは 6 つの本明細書で定義されたポリヌクレオチドを含んでもよく、各ポリヌクレオチドは、対象となる細胞内で作動可能な発現制御配列と作動可能に結合している。好ましくは、該発現制御配列は、非相同プロモーターを含む、または全てである、すなわち、それらが制御するコード領域に関して非相同である。本明細書で定義された 1 つより多いポリヌクレオチド、例えば、3 つ、4 つ、5 つまたは 6 つのポリヌクレオチド、好ましくは、各々が異なるポリペプチドをコードする 7 つまたは 8 つのポリヌクレオチドを、好ましくは、1 つの T-DNA 分子内の 1 つの組換えベクター中で好適に共有結合し、それから、細胞内に 1 つの分子として導入して本発明に記載の組換え細胞を生成し、好ましくは、組換え細胞のゲノム内に、例えば、トランスジェニック植物内に組み込んでもよい。ゲノム内への組込みは、核のゲノムまたはトランスジェニック植物のプラスチドゲノム内への組込みであってよい。それにより、そのように結合したポリヌクレオチドは、組換え細胞または植物の子孫の単一遺伝子座として一緒に遺伝するだろう。組換えベクターまたは植物は、2 つ以上のそのような組換えベクターを含んでもよく、各々は、例えば、各々の組換えベクターが 3 つ、4 つ、5 つまたは 6 つのポリヌクレオチドを含む、複数のポリヌクレオチドを含む。

【0196】

本明細書で使用するとき、「作動可能に結合」は、2 つ以上の核酸（例えば、DNA）セグメント間の機能的関係性を表す。通常、転写された配列に対する転写調節エレメント（プロモーター）の機能的関係性を表す。例えば、プロモーターは、もし、適切な細胞内のコード配列の転写を刺激または調節するならば、本明細書で定義されたポリヌクレオチドなどのコード配列と作動可能に結合する。概して、転写配列と作動可能に結合しているプロモーター転写調節エレメントは、転写配列と物理的に隣接している、すなわち、それらはシス作用性である。しかしながら、エンハンサーなどのいくつかの転写調節エレメン

10

20

30

40

50

トは、それらがその転写を促進するコード配列と物理的に隣接または近接近して配置している必要がない。

【 0 1 9 7 】

複数のプロモーターが存在するとき、各プロモーターは、独立して、同じであっても異なってもよい。好ましくは、6つの異なるプロモーター配列のうち少なくとも3つから最大値までを、組換えベクター内で使用して、外来性ポリヌクレオチドの発現を制御する。

【 0 1 9 8 】

キメラDNAまたは遺伝子構築物などの組換え分子は、(a)単一ペプチド配列をコードして、本明細書で定義された発現されたポリペプチドが該ポリペプチドを産生または該発現されたポリペプチドの局在化、例えば、細胞内の小胞体(ER)中のポリペプチドの保持を提供する1つ以上の分泌シグナル、及び/または(b)融合タンパク質として核酸分子の発現をもたらす融合配列も含んでもよい。適切な単一セグメントの例としては、本明細書で定義されたポリペプチドの分泌または局在化を誘導可能ないずれかのシグナルセグメントが挙げられる。組換え分子は、本明細書で定義された核酸分子の核酸配列周囲及び/または内の介在及び/または非翻訳配列も含んでもよい。

【 0 1 9 9 】

形質転換体の同定を容易にするため、核酸構築物は、外来性(foreign)または外来性(exogenous)ポリヌクレオチドとして、またはそれに加えて、選択可能またはスクリーニング可能なマーカー遺伝子を望ましく含む。「マーカー遺伝子」は、マーカー遺伝子を発現する細胞に別のフェノタイプを付与して、それ故、そのような形質転換された細胞を、マーカーを有しない細胞と区別することを可能とする遺伝子を意味する。選択可能なマーカー遺伝子は、選択剤(例えば、除草剤、抗菌剤、放射線、熱、または形質転換していない細胞にダメージを与える他の処理)に対する耐性に基づいて「選択」できる特色を与える。スクリーニング可能なマーカー遺伝子(またはリポーター遺伝子)は、観察または試験により、すなわち、「スクリーニング」(例えば、 β -グルクロニダーゼ、ルシフェラーゼ、GFPまたは形質転換していない細胞内に存在しない他の酵素活性)により、同定できる特色を与える。マーカー遺伝子及び対象となるヌクレオチド配列は、結合している必要がない。マーカーの実際の選択は、植物細胞などの選択の細胞と組み合わせて機能的(すなわち、選択的)である限り、重大ではない。

【 0 2 0 0 】

選択可能なマーカーの例は、アンピシリン、クロラムフェニコールまたはテトラサイクリン耐性、好ましくは、カナマイシン耐性などの抗菌耐性を与えるマーカーである。植物形質転換体の選択のための実例となる選択可能なマーカーとしては、これに限定されないが、ハイグロマイシンB耐性をコードするhyg遺伝子;カナマイシン、パロモマイシン、G418に対する耐性を与えるネオマイシンホスホトランスフェラーゼ(neo^r)遺伝子;例えば、EP256223に記載のグルタチオン誘導除草剤に対する耐性を与えるラット肝臓のグルタチオンS-トランスフェラーゼ;例えば、過剰発現時、WO87/05327に記載のホスフィノトリシンなどのグルタミンスターゼインヒビターに対する耐性、例えば、EP275957に記載の選択剤ホスフィノトリシンに対する耐性を与えるストレプトミセス・ビリドクロモゲネス(*Streptomyces viridochromogenes*)のアセチルトランスフェラーゼ遺伝子、例えば、Hincheyら(1988)により記載されたN-ホスホノメチルグリシンに対する耐性を与える5-エノールシキメート-3-ホスフェートシンターゼ(EPS)をコードする遺伝子、または好ましくは、例えば、WO91/02071に記載のピアラホスに対する耐性を与えるbar遺伝子が挙げられる。

【 0 2 0 1 】

好ましくは、核酸構築物を、植物細胞などの細胞のゲノム内に安定に組み込む。従って、核酸は、分子がゲノム内に組み込まれることを可能とする適切なエレメントを含んでもよく、好ましくは、T-DNA分子または構築物の左右境界配列を、細胞の染色体中に組

10

20

30

40

50

み込むことができる適切なベクター内に配置する。

【0202】

発現

本明細書で使用する時、発現ベクターは、宿主細胞を形質転換すること及び1つ以上の特異的ポリヌクレオチド分子の発現に影響することが可能であるDNAベクターである。本発明の発現ベクターは、植物細胞内または微生物細胞などの組換え細胞内で遺伝子発現を誘導できる。本発明に有用な発現ベクターは、転写制御配列、翻訳制御配列、複製開始点、及び組換え細胞と互換性があり、本発明のポリヌクレオチド分子の発現を制御する他の調節配列などの調節配列を含む。特に、本発明に有用なポリヌクレオチドまたはベクターは、転写制御配列を含む。転写制御配列は、転写の開始、伸長、及び停止を制御する配列である。特に、重要な転写制御配列は、プロモーター及びエンハンサー配列などの転写開始を制御するものである。適切な転写制御配列は、本発明の少なくとも1つの組換え細胞内で機能できるいずれかの転写制御配列を含む。使用される調節配列の選択は、対象となる植物及び/または器官または組織などの対象生物体に依存する。かかる調節配列を、植物または植物ウイルスなどの真核生物から得てもよく、化学的に合成してもよい。様々なそのような転写制御配列は、当業者に公知である。特に、好ましい転写制御配列は、恒常的にあるいは植物もしくはその部分の使用に依存して特異的な段階及び/または組織のいずれかに、植物内の転写を誘導する活性のあるプロモーターである。

10

【0203】

植物細胞の安定なトランスフェクトまたはトランスジェニック植物の確立に適切なくつかのベクターは、例えば、Pouwelsら、Cloning Vectors: A Laboratory Manual、1985、supp. 1987; Weissbach及びWeissbach、Methods for Plant Molecular Biology、Academic Press、1989; 及びGelvinら、Plant Molecular Biology Manual、Kluwer Academic Publishers、1990に記載されている。通常、植物発現ベクターとしては、例えば、5'及び3'調節配列及び優性選択可能マーカの転写制御下の1つ以上のクローン植物遺伝子が挙げられる。かかる植物発現ベクターは、プロモーター調節領域（例えば、誘導的もしくは恒常的、環境的に調節もしくは発生的に調節、または細胞特異的もしくは組織特異的発現を制御する調節領域）、転写開始部位、リボソーム結合部位、RNAプロセシングシグナル、転写停止部位、及び/またはポリアデニル化シグナルも含み得る。

20

30

【0204】

植物細胞で活性なくつかの構成的プロモーターを説明した。植物の構成的発現に適切なプロモーターとしては、これに限定されないが、カリフラワーモザイクウイルス(CaMV) 35Sプロモーター、ゴマノハグサモザイクウイルス(FMV) 35S、及びリブロース-1、5-ニリン酸カルボキシラーゼの小サブユニットからの光誘導プロモーターが挙げられる。

【0205】

葉、種子、根または幹などの植物の源組織の発現の目的のため、本発明で利用されるプロモーターがこれらの特異的組織内で比較的高い発現を有することは好ましい。多くの例が当技術分野で周知である。環境、ホルモン、化学的、及び/または発生のシグナルにตอบสนองして調節される様々な植物遺伝子プロモーターを、植物細胞内で遺伝子発現のためにも使用でき、または器官特異的プロモーターを使用することも有利であり得る。

40

【0206】

本明細書で使用する時、「種子特異的プロモーター」という語またはその変化形は、他の植物組織と比較したとき、優先的に、植物、好ましくは、アブラナ属(*Brassica* sp.)、カメリナサティバ(*Camelina sativa*)またはダイズ(*G. max*)の植物の発育種子の遺伝子転写を誘導するプロモーターを表す。実施形態では、種子特異的プロモーターを、植物の葉及び/または幹と比較して、植物の発育種子中で、少なくとも5倍強力に発現し

50

、他の植物組織と比較して、発育種子の胚中でより強力に好適に発現する。好ましくは、プロモーターのみが、発育種子中の対象となる遺伝子の発現を誘導し、及び／または葉などの植物の他の部分中の対象となる遺伝子の発現はノーザンブロット解析及び／またはRT-PCRにより検出できない。通常、プロモーターは、種子の成長及び発育中、特に、種子内の貯蔵化合物の合成フェーズ及び蓄積中、遺伝子の発現を駆動する。かかるプロモーターは、植物貯蔵器官全体もしくは種皮、もしくは子葉などのその部分のみ、好ましくは、双子葉植物の種子中の胚、または単子葉植物の種子の胚乳もしくはアリューロン層中の遺伝子発現を駆動し得る。

【0207】

種子特異的発現のための好ましいプロモーターとしては、i) 脂肪酸デサチュラーゼ及びエロンガーゼなどの、種子内の脂肪酸生合成及び蓄積に関連する酵素をコードする遺伝子からのプロモーター、ii) 種子貯蔵タンパク質をコードする遺伝子からのプロモーター、及びiii) 種子内の炭水化物生合成及び蓄積に関連する酵素をコードする遺伝子からのプロモーターが挙げられる。適切な種子特異的プロモーターは、アブラナナピン遺伝子プロモーター(US5,608,152)、ソラマメUSPプロモーター(Baumleira, 1991)、アラビドプシス・オレオシン(Arabidopsis oleosin)プロモーター(WO98/45461)、ファセオラス・ブルガリス(Phaseolus vulgaris)ファゼオリンプロモーター(US5,504,200)、ブラシカBce4プロモーター(WO91/13980)またはソラマメからのレグミンLeB4プロモーター(Baumleira, 1992)及びトウモロコシ、オオムギ、コムギ、ライムギ、コメなどの単子葉植物中の種子特異的発現をもたらすプロモーターである。適切な注目すべきプロモーターは、オオムギlpt2またはlpt1遺伝子プロモーター(WO95/15389及びWO95/23230)またはWO99/16890に記載のプロモーター(オオムギホルディン遺伝子、コメグルテリン遺伝子、コメオリジン遺伝子、コメプロラミン遺伝子、コムギグリジン遺伝子、コムギグルテリン遺伝子、トウモロコシゼイン遺伝子、カラスムギグルテリン遺伝子、モロコシカシリン(kasirin)遺伝子、ライムギセカリン遺伝子からのプロモーター)である。他のプロモーターとしては、Brounら(1998)、Potenzaら(2004)、US20070192902及びUS20030159173に記載されたものが挙げられる。実施形態では、種子特異的プロモーターを、優先的に、胚、子葉または胚乳などの画定された種子部分内で発現する。そのような特異的プロモーターの例としては、これに限定されないが、FP1プロモーター(Ellersstromら, 1996)、エンドウマメレグミンプロモーター(Perrinら, 2000)、マメフィトヘマグルトニンプロモーター(Perrinら, 2000)、アマ2S貯蔵タンパク質をコードする遺伝子のコンリニン1及びコンリニン2プロモーター(Chengら, 2010)、シロイヌナズナ(Arabidopsis thaliana)からのFAE1遺伝子のプロモーター、セイヨウアブラナ(Brassica napus)のグロブリン様タンパク質遺伝子のBnGLPプロモーター、アマ(Linum usitatissimum)からのペルオキシレドキシン遺伝子のLPXRプロモーターが挙げられる。

【0208】

5'非翻訳リーダー配列を、本発明のポリヌクレオチドの非相同遺伝子配列を発現するため選択されたプロモーターから誘導でき、または好ましくは、産生される酵素のコード領域に関して非相同であり、mRNAの翻訳を増強するように、必要に応じて、特異的に修飾できる。導入遺伝子の最適発現をレビューするため、Kozieleら(1996)参照。5'非翻訳領域を、植物ウイルスRNA(とりわけ、タバコモザイクウイルス、タバコエッチウイルス、トウモロコシドワーフモザイクウイルス、アルファルファモザイクウイルス)から、適切な真核遺伝子、植物遺伝子(コムギ及びトウモロコシクロロフィルa/b結合タンパク質遺伝子リーダー)から、または合成遺伝子配列からも得ることができる。本発明は、非翻訳領域がプロモーター配列を付随する5'非翻訳配列から誘導される構築物に限定されない。リーダー配列を、関連しないプロモーターまたはコード配列からも誘導できる。本発明との関連で有用なリーダー配列は、トウモロコシHsp70リーダ

10

20

30

40

50

ー (US5, 362, 865 及び US5, 859, 347)、及び TMV オメガエレメントを含む。

【0209】

転写停止を、キメラベクター中で対象となるポリヌクレオチドと作動可能に結合した 3' 非翻訳 DNA 配列により実行する。組換え DNA 分子の 3' 非翻訳領域は、植物内で、アデニル酸ヌクレオチドの RNA の 3' 末端への付加を引き起こす機能をするポリアデニル化シグナルを含む。3' 非翻訳領域を、植物細胞内で発現される様々な遺伝子から得ることができる。ノパリンシンターゼ 3' 非翻訳領域、エンドウマメ小サブユニットビスコ遺伝子からの 3' 非翻訳領域は、ダイズ 7S 種子貯蔵タンパク質遺伝子またはアマコンリニン遺伝子からの 3' 非翻訳領域が、この目的で、共通に使用される。アグロバクテリウム腫瘍誘導 (Ti) プラスミドのポリアデニル化シグナルを含む 3' 転写された非翻訳領域も適切である。

10

【0210】

組換え DNA 技術を、例えば、宿主細胞内のポリヌクレオチド分子の複製数、これらのポリヌクレオチド分子が転写される効率、得られた転写産物が翻訳される効率、及び翻訳後修飾の効率の操作により、形質転換されたポリヌクレオチド分子の発現を改良するために使用できる。本明細書で定義されたポリヌクレオチド分子の発現の増加に有用な組換え技術としては、これに限定されないが、ポリヌクレオチド分子の 1 つ以上の宿主細胞染色体への組込み、mRNA への安定配列の付加、転写制御シグナルの置換または修飾 (例えば、プロモーター、オペレーター、エンハンサー)、翻訳制御シグナルの置換または修飾 (例えば、リボソーム結合部位、シャイン・ダルガノ配列)、宿主細胞のコドン使用頻度に対応するためのポリヌクレオチド分子の修飾、及び転写を不安定化する配列の欠失が挙げられる。

20

【0211】

トランスジェニック植物

本明細書で名詞として使用するとき、「植物」という語は、植物全体を表すが、形容詞として使用するとき、例えば、植物器官 (例えば、葉、幹、根、花)、1 つの細胞 (例えば、花粉)、種子、植物細胞など、植物中に存在、植物から得られる、植物由来、または植物に関連する物質を表す。「植物部分」という語は、該植物部分が本発明に記載の脂質を合成する限り、例えば、葉もしくは幹、根、花器もしくは花の構造物、花粉、種子、胚などの種子部分、胚乳、胚盤もしくは種皮、例えば、維管束組織などの植物組織、その細胞と子孫などの植物性構造物を含む植物 DNA を含む全ての植物部分を表す。

30

【0212】

概して、「トランスジェニック植物」、「遺伝子的に修飾された植物」またはその変形は、同じ種、変種または栽培品種の野生型植物に見られない遺伝子構築物 (「導入遺伝子」) を含む植物を表す。本発明に関連して定義されたトランスジェニック植物は、組換え技術を用いて遺伝子的に修飾して、所望の植物または植物器官内で本明細書中に定義された脂質または少なくとも 1 つのポリペプチドの産生を引き起こした植物またはその子孫を含む。トランスジェニック植物細胞及びトランスジェニック植物部分は、対応する意味を有する。本明細書で呼ぶ「導入遺伝子」は、バイオテクノロジーの技術分野における通常の意味を有し、組換え DNA または RNA 技術により産生または変更され、植物細胞内に導入された遺伝子配列を含む。導入遺伝子は、該導入遺伝子が植物細胞以外の細胞に導入された、または異なる種、変種もしくは栽培品種、または由来である植物細胞と同じ種、変種もしくは栽培品種であり得る植物細胞由来の遺伝子配列を含む。通常、導入遺伝子は、植物などの細胞内に、例えば、形質転換などのヒトの操作により導入されるが、いずれの方法も、当業者が認識する通りに使用できる。

40

【0213】

「種子」及び「穀物」という語は、本明細書で互換的に使用される。「穀物」は、収穫された穀物またはまだ植物上にあるがいつでも収穫する状態になっている穀物などの成熟した穀物を表すが、文脈により吸水または発芽後の穀物も表し得る。成熟した穀物または

50

種子は、通常、約 18 ~ 20 % 未満、好ましくは、10 % 未満の含水率を有する。キャノーラ種子などのアブラナ属種子は、通常、成熟時、約 4 ~ 8 % または 6 ~ 8 %、好ましくは、約 4 % ~ 約 6 % の含水率を有する。本明細書で使用するとき、「発育種子」は、成熟前、通常、受精または開花後の植物の生殖構造物内で見られる種子を表すが、植物から単離された成熟前のそのような種子も表し得る。

【0214】

本明細書で使用するとき、「植物部分を得ること」または「種子を得ること」という語は、畑または温室もしくはグロースチャンバーなどのコンテインメントの植物から植物部分または種子を収穫することを含み、または該植物部分もしくは種子の供給者から購入もしくは受け取るにより、それぞれ、植物部分または種子を得るいずれかの手段を表す。室温における標準的生育条件は、自然光の射す、22 ~ 24 の日中温度及び 16 ~ 18 の夜間温度を含む。種子は、呈色に適切であり得る、すなわち、子孫植物を発芽または産生できる、あるいは、もはや発芽できないように処理した、例えば、食物もしくは飼料用途、または本発明の脂質の抽出に有用である、粉碎、研磨もしくは製粉した種子であり得る。

10

【0215】

本明細書で使用するとき、「植物貯蔵器官」という語は、例えば、タンパク質、炭水化物、脂肪酸及び/またはオイルの形態でエネルギーを貯蔵するために特殊化した植物の部分を表す。植物貯蔵器官の例としては、種子、果実、塊根、及び塊茎が挙げられる。好ましい植物貯蔵器官は種子である。

20

【0216】

本発明のまたは本発明で使用される植物または植物部分は、好ましくは、表現型的に正常である。本明細書で使用するとき、「表現型的に正常」という語は、遺伝的に修飾された植物または植物器官、特に、未修飾の植物または植物器官と比較したとき、生育及び繁殖する能力を著しく低下していない種子、塊茎または果実などの貯蔵器官を表す。実施形態では、表現型的に正常である遺伝的に修飾された植物または植物器官は、外来性ポリヌクレオチドを含まないアイソジェニックな植物または器官と本質的に同じである生育または繁殖する能力を有する。好ましくは、バイオマス、生育速度、発芽速度、貯蔵器官サイズ、花粉生存率、雌雄受精、種子サイズ及び/または産生された生存種子数は、同一条件下で生育したとき、前記外来性ポリヌクレオチドを含まない植物の 90 % 以上である。好ましくは、本発明の植物、または本発明の種子から産生した植物の花粉生存率は、対応する野生型植物の花粉生存率と比較して約 100 % である。この語は、野生型植物と異なり得るが、例えば、子葉 (seedling leaves) のバレリーナ表現型などの商業目的用植物の有用性に影響しない、植物の特徴を包含しない。

30

【0217】

本発明により提供される、または本発明の実践での使用を考慮した植物としては、単子葉植物及び双子葉植物の両方が挙げられる。好ましい実施形態では、本発明の植物は、作物 (例えば、穀類及び豆類、トウモロコシ、コムギ、ジャガイモ、タピオカ、コメ、モロコシ、アワ、キャッサバ、オオムギ、またはエンドウマメ)、または他のマメ科植物である。植物を、食用根、塊茎、葉、幹、花または果実の産生のため生育してもよい。植物は、野菜植物または観賞植物であってよい。本発明の、または本発明に有用な植物は：トウモロコシ (*Zea mays*)、セイヨウアブラナ (*Brassica napus*、*Brassica rapa* ssp.)、カラシナ (*Brassica juncea*)、アマ (*Linum usitatissimum*)、アルファルファ (*Medicago sativa*)、コメ (*Oryza sativa*)、ライムギ (*Secale cereale*)、モロコシ (*Sorghum bicolor*、*Sorghum vulgare*) ヒマワリ (*Helianthus annuus*)、コムギ (*Triticum aestivum*)、ダイズ (*Glycine max*)、タバコ (*Nicotiana tabacum*)、ジャガイモ (*Solanum tuberosum*)、ピーナッツ (*Arachis hypogaea*)、ワタ (*Gossypium hirsutum*)

40

50

)、サツマイモ (*Lopmoea batatus*)、キャッサバ (*Manihot esculenta*)、コーヒー (*Cofea spp.*)、ココナツ (*Cocos nucifera*)、パイナップル (*Anana comosus*)、柑橘系樹木 (*citris tree*) (*Citrus spp.*)、ココア (*Theobroma cacao*)、茶 (*Camellia senensis*)、バナナ (*Musa spp.*) アボカド (*Persea americana*)、イチジク (*Ficus casica*)、グアバ (*Psidium guajava*)、マンゴ (*Mangifer indica*)、オリーブ (*Olea europaea*)、パパイア (*Carica papaya*)、カシュー (*Anacardium occidentale*)、マカダミア (*Macadamia intergrifolia*)、アーモンド (*Prunus amygdalus*)、サトウダイコン (*Beta vulgaris*)、カラスムギ、またはオオムギであってよい。

10

【0218】

好ましい実施形態では、植物は被子植物である。

【0219】

実施形態では、植物は、油料種子植物、好ましくは、油料種子作物である。本明細書で使用する時、「油料種子植物」という語は、該植物の種子からオイルの商業的産生のために使用される植物種である。油料種子植物は、油料種子用セイヨウアブラナ (*rape*) (セイヨウアブラナ (*canola*) など)、トウモロコシ、ヒマワリ、ダイズ、モロコシ、アマ (亜麻仁) またはサトウダイコンであってよい。さらに、油料種子植物は、他のアブラナ属 (*Brassicas*)、ワタ、ピーナッツ、ポピー、カラシナ、トウゴマ、ゴマ、ヒマワリ、ベニバナ、アマナズナ属 (*Camelina*)、クランベ属 (*Crambe*) または木の実を産生する植物であってよい。植物は、オリーブ、油ヤシまたはココナツなどのその果実中に高レベルのオイルを産生し得る。本発明を適用し得る園芸植物は、レタス、エンダイブ、またはキャベツ、ブロッコリー、またはカリフラワーを含む野菜のアブラナ属である。本発明を、タバコ、ウリ科植物、ニンジン、イチゴ、トマト、またはコショウに適用してもよい。

20

【0220】

さらに好ましい実施形態では、本発明のトランスジェニック植物を産生するために使用される非トランスジェニック植物は、特に種子中に、i) 20%未満、10%未満または5%未満の18:2脂肪酸及び/またはii) 10%未満または5%未満の18:3脂肪酸を有するオイルを産生する。

30

【0221】

好ましい実施形態では、トランスジェニック植物またはその部分は、その子孫が所望の表現型に対して分離しないように導入された (導入遺伝子) 各々及び全ての遺伝子 (外来性ポリヌクレオチド) について相同である。トランスジェニック植物は、導入された導入遺伝子について非相同であってもよく、好ましくは、例えば、ハイブリッド種子から生育したF1子孫など、導入遺伝子について一律に非相同であってよい。そのような植物は、当技術分野で周知の雑種強勢などの長所を備え得、または植物育種もしくは戻し交配で使用され得る。

【0222】

40

関連する場合、トランスジェニック植物またはその部分は、これに限定されないが、6 - デサチュラーゼ、9 - エロンガーゼ、8 - デサチュラーゼ、6 - エロンガーゼ、5 - デサチュラーゼ、3 - デサチュラーゼ、4 - デサチュラーゼ、5 - エロンガーゼ、ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ、LPAAT、17 - デサチュラーゼ、15 - デサチュラーゼ及び/または12 - デサチュラーゼなどLC-PUFAの産生に関連する酵素をコードする付加的導入遺伝子も含んでよい。1つ以上のこれらの活性を有するそのような酵素の例は、当技術分野で公知であり、本明細書に記載のものが挙げられる。具体例では、トランスジェニック植物は；

a) 4 - デサチュラーゼ、5 - デサチュラーゼ、6 - デサチュラーゼ、5 - エロンガーゼ、及び 6 - エロンガーゼ、

50

b) 4 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 8 - デサチュラーゼ、 5 - エロンガーゼ、及び 9 - エロンガーゼ、

c) 4 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 6 - デサチュラーゼ、 5 - エロンガーゼ、 6 - エロンガーゼ、及び 15 - デサチュラーゼ、

d) 4 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 8 - デサチュラーゼ、 5 - エロンガーゼ、 9 - エロンガーゼ、及び 15 - デサチュラーゼ、

e) 4 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 6 - デサチュラーゼ、 5 - エロンガーゼ、 6 - エロンガーゼ、及び 17 - デサチュラーゼ、

f) 4 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 8 - デサチュラーゼ、 5 - エロンガーゼ、 9 - エロンガーゼ、及び 17 - デサチュラーゼ、

10

g) 3 - デサチュラーゼまたは 15 - デサチュラーゼ、 6 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 6 - エロンガーゼ及び 5 - エロンガーゼ、

h) 3 - デサチュラーゼまたは 15 - デサチュラーゼ、 8 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 9 - エロンガーゼ及び 5 - エロンガーゼ、

i) 12 - デサチュラーゼ、 3 - デサチュラーゼまたは 15 - デサチュラーゼ、 6 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 6 - エロンガーゼ及び 5 - エロンガーゼ、

j) 12 - デサチュラーゼ、 3 - デサチュラーゼまたは 15 - デサチュラーゼ、 8 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 9 - エロンガーゼ及び 5 - エロンガーゼ、

20

k) 1 - アシル - グリセロール - 3 - リン酸アシルトランスフェラーゼ (L P A A T)、 3 - デサチュラーゼ、 6 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 6 - エロンガーゼ、 5 - エロンガーゼ及び場合により 4 - デサチュラーゼ、

l) 1 - アシル - グリセロール - 3 - リン酸アシルトランスフェラーゼ (L P A A T)、 15 - デサチュラーゼ、 6 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 6 - エロンガーゼ、 5 - エロンガーゼ及び場合により 4 - デサチュラーゼ、

m) 1 - アシル - グリセロール - 3 - リン酸アシルトランスフェラーゼ (L P A A T)、 12 - デサチュラーゼ、 6 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 6 - エロンガーゼ、 5 - エロンガーゼ及び場合により 4 - デサチュラーゼ、

n) 1 - アシル - グリセロール - 3 - リン酸アシルトランスフェラーゼ (L P A A T)、 12 - デサチュラーゼ、 3 - デサチュラーゼ及び/または 15 - デサチュラーゼ、 6 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 6 - エロンガーゼ及び 5 - エロンガーゼ及び場合により 4 - デサチュラーゼ、

30

o) 1 - アシル - グリセロール - 3 - リン酸アシルトランスフェラーゼ (L P A A T)、 3 - デサチュラーゼ、 8 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 9 - エロンガーゼ、 5 - エロンガーゼ及び場合により 4 - デサチュラーゼ、

p) 1 - アシル - グリセロール - 3 - リン酸アシルトランスフェラーゼ (L P A A T)、 15 - デサチュラーゼ、 8 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 9 - エロンガーゼ、 5 - エロンガーゼ及び場合により 4 - デサチュラーゼ、

q) 1 - アシル - グリセロール - 3 - リン酸アシルトランスフェラーゼ (L P A A T)、 12 - デサチュラーゼ、 8 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 9 - エロンガーゼ、 5 - エロンガーゼ及び場合により 4 - デサチュラーゼ、または

40

r) 1 - アシル - グリセロール - 3 - リン酸アシルトランスフェラーゼ (L P A A T)、 12 - デサチュラーゼ、 3 - デサチュラーゼ及び/または 15 - デサチュラーゼ、 8 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 9 - エロンガーゼ、 5 - エロンガーゼ及び場合により 4 - デサチュラーゼ

をコードする外来性ポリヌクレオチドのセットを少なくとも含む。

【0223】

実施形態では、外来性ポリヌクレオチドは、ピシリウム・イレグラレ (Pythium irregulare) 6 - エロンガーゼ、スラウストキトリッド (Thraustochytrid) 5 - デサチ

50

ユラーゼまたはエミリアナ・ハックスレイ (*Emiliana huxleyi*) 5 - デサチュラーゼ、ニセツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*) 6 - エロンガーゼ、スラウストキトリッド (*Thraustochytrid*) 5 - エロンガーゼまたはオストレオコッカス・タウリ (*Ostreococcus taurii*) 5 - エロンガーゼ、フィトフトラ・インフェスタンス (*Phytophthora infestans*) 3 - デサチュラーゼまたはピシリウム・イレグラレ (*Pythium irregulare*) 3 - デサチュラーゼ、及びスラウストキトリッド (*Thraustochytrid*) 4 - デサチュラーゼであるポリペプチドのセットをコードする。

【0224】

実施形態では、本発明の、または本発明に使用される植物を、畑、好ましくは、本質的に同じ、または少なくとも1ヘクタールまたは2ヘクタールの面積である少なくとも1, 000、1, 000, 000または2, 000, 000の植物の集団として生育する。栽植密度は、植物種、植物品種、天候、土壌条件、肥料割合及び当技術分野で公知の他の因子に応じて異なる。例えば、セイヨウアブラナは、通常、ヘクタール当たり1.2~1.5百万植物の栽植密度で生育される。当技術分野で公知のように、植物を収穫し、植物を刈取り (swathing)、引抜き及び/または刈取り (reaping) し、次いで、植物素材を脱穀及び/または風選して、しばしばもみ殻の形態である植物部分の残部から種子を分離することを含み得る。あるいは、種子を、1回の処理、例えば、コンバイン収穫機で、畑の植物から収穫してもよい。

【0225】

植物の形質転換

トランスジェニック植物を、A. Slaterら、*Plant Biotechnology - The Genetic Manipulation of Plants*, Oxford University Press (2003)、及びP. Christou and H. Klee, *Handbook of Plant Biotechnology*, John Wiley and Sons (2004)に全般的に記載されたものなど、当技術分野で公知の技術を用いて産生できる。

【0226】

本明細書で使用する時、「安定に形質転換すること」、「安定に形質転換された」及びその変化形は、それらの存在について積極的に選択する必要なく、細胞分裂中の子孫細胞に転移されるように、該細胞のゲノム中に、外来性核酸分子を組み込むことを表す。安定な形質転換、またはその子孫を、染色体DNAに対するサザンブロットまたはゲノムDNAのin situハイブリダイゼーションなどの当技術分野で公知のいずれかの方法により選択できる。好ましくは、植物形質転換を、本明細書の実施例で記載の通り実施する。

【0227】

アグロバクテリウム介在転移は、植物細胞ゲノム中のDNAの一過性発現または安定な組込みのいずれかのため、全植物組織または植物器官または組織培養中の移植片中の細胞に、DNAを導入できるので、植物細胞中に遺伝子を導入するために広範に応用できるシステムである。DNAを植物細胞に導入するためのアグロバクテリウム介在植物組込みベクターの使用は、アグロバクテリウムまたはDNAを植物細胞に導入できる他の細菌を用いたフローラルディップ法を含み、当技術分野で周知である (例えば、US 5 177 010、US 5 104 310、US 5 004 863またはUS 5 159 135参照)。転移されるDNA領域は、境界配列により画定され、介在DNA (T-DNA) は、通常、植物ゲノムに挿入される。さらに、T-DNAの組込みは、ほとんど再転位のない比較的正確な処理である。アグロバクテリウム介在形質転換が効率的である場合のこれらの植物品種では、遺伝子導入の容易且つ定義された性質から、選択の方法となる。好ましいアグロバクテリウム形質転換ベクターは、記載のように便利な操作を可能とする、アグロバクテリウムだけでなく大腸菌内で複製可能である (Kleeら、*In: Plant DNA Infectious Agents*, Hohn and Schell, eds., Springer-Verlag, New York, pp. 179~203 (1985))

。

【0228】

使用され得る加速法としては、例えば、微粒子銃などが挙げられる。形質転換する核酸分子を植物細胞に送達する方法の1つの例は、微粒子銃である。この方法は、Yangら、Particle Bombardment Technology for Gene Transfer, Oxford Press, Oxford, England (1994) に概説されている。非生物粒子（微粒子噴出体）を核酸で被覆し、推進力により細胞に送達し得る。例証となる粒子としては、タンゲステン、近、プラチナ等から成るものが挙げられる。単子葉植物を再現性よく形質転換する効率的手段であることに加えて、微粒子銃の特定の利点は、プロトプラストの単離もアグロバクテリウム感染の感受性も必要ないことである。

10

【0229】

別の代替の実施形態では、プラスチドを、安定に形質転換できる。高等植物のプラスチド形質転換について開示された方法としては、選択可能なマーカを含み、DNAを相同組換えによるプラスチドゲノムに標的化するDNAのパーティクルガン送達 が挙げられる (US 5,451,513、US 5,545,818、US 5,877,402、US 5,932,479、及びWO 99/05265)。

【0230】

細胞形質転換の他の方法も使用でき、これに限定されないが、花粉への直接DNA転移により、植物の生殖器中へのDNAの直接注入により、または未成熟胚の細胞中にDNAを直接注入して、次いで、乾燥胚に水分補給して戻すことにより、DNAを植物に導入することが挙げられる。

20

【0231】

単一の植物プロトプラスト形質転換から、または様々な形質転換移植片からの植物の再生、発育、及び栽培は、当技術分野で周知である (Weissbachら, In: Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, San Diego, Calif., (1988))。この再生及び生育過程としては、形質転換細胞の選択工程、定着小植物期を通して胚発育の通常期にわたるこれらの個別化細胞の培養工程を通常含む。トランスジェニック胚及び種子を同様に再生する。得られたトランスジェニック定着新芽を、その後、土壌などの適切な植物生育培地で栽培する。

30

【0232】

外来性 (foreign)、外来性 (exogenous) 遺伝子を含む植物の発育または再生は、当技術分野で周知である。好ましくは、再生された植物を、相同トランスジェニック植物を得るため自家受粉する。さもなければ、再生植物から得られた花粉を、農学的に重要な系統の種子から生育する植物と交雑する。逆に、所望の外来性核酸を含む本発明のトランスジェニック植物を、当業者に周知の方法を用いて栽培する。所望の外来性核酸を含む本発明のトランスジェニック植物を、当業者に周知の方法を用いて培養する。

【0233】

トランスジェニック細胞及び植物内の導入遺伝子の存在を確認するため、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 増幅法またはサザンブロット解析を、当業者に公知の方法を用いて実施できる。導入遺伝子の発現産生物を、該産生物の性質に依存して、様々な方法のいずれかで検出でき、ウェスタンブロット法及び酵素アッセイを含む。一旦、トランスジェニック植物を得たならば、それらを、所望の表現型を有する植物組織または部分を産生するように生育し得る。該植物組織または部分を収穫、及び/または種子を採取し得る。種子は、所望の特徴を有する組織または部分を含む追加の植物を成長源の役割をし得る。

40

【0234】

アグロバクテリウムまたは他の形質転換方法を用いて作成したトランスジェニック植物は、1つ染色体上に単一の遺伝子座を通常含む。かかるトランスジェニック植物を、付加遺伝子についてヘミ接合であると言うことができる。より好ましくは、付加遺伝子につい

50

てホモ接合であるトランスジェニック植物、すなわち、2つの付加遺伝子を含むトランスジェニック植物、染色体対の各染色体上の同じ座位に1つの遺伝子である。ホモ接合トランスジェニック植物を、ヘミ接合トランスジェニック植物の自家受粉、産生種子のいくつかの発芽、及び対象となる遺伝子のため得られた植物の分析により得ることができる。

【0235】

2つの、独立して分離する外来性遺伝子または遺伝子座を含む2つの異なるトランスジェニック植物も、遺伝子または遺伝子座の両セットを含む子孫を産生するため交雑（交配）できる。適切なF₁子孫の自家受粉は、外来性遺伝子または遺伝子座の両方についてホモ接合である植物を産生できる。親植物との戻し交配及び非トランスジェニック植物との外交配も、植物性繁殖であると考えられる。異なる特色及び作物のため通常使用される他の繁殖方法の説明を、Fehr, In: Breeding Methods for Cultivar Development, Wilcox J. ed., American Society of Agronomy, Madison Wis. (1987)に見ることができる。

【0236】

外来性RNAレベルの増強及び安定化した発現
サイレンシングサプレッサー

実施形態では、植物細胞、植物または植物部分は、サイレンシングサプレッサータンパク質をコードする外来性ポリヌクレオチドを含む。

【0237】

転写後遺伝子サイレンシング（PTGS）は、細胞及びウイルスmRNAを分解PTGSの標的にし、外来性（非相同）または内在性DNAを安定にまたは一過性に形質転換された植物または真菌内で発生し、導入された核酸と配列類似性を有するRNA分子の蓄積減少をもたらすことができるヌクレオチド配列特異的生体防御機構である。

【0238】

対象となる導入遺伝子とサイレンシングサプレッサーの同時発現が、該導入遺伝子から転写される細胞内に存在するRNAレベルを増加させるだろうと広く考えられてきた。このことがインビトロ細胞について真実であると証明した一方、著しい副作用が多くの中植物同時発現試験で観察された。より具体的には、Malloryら（2002）、Chapmanら（2004）、Chenら（2004）、Dunoyerら（2004）、Zhangら（2006）、Lewseyら（2007）及びMengら（2008）に記載のように、概して構造的プロモーター下、植物発現サイレンシングサプレッサーは、しばしば、それらが商業生産に有用でなくなる程度まで表現型的に異常である。

【0239】

近年、RNA分子レベルを増加できる、及び/またはRNA分子レベルを、サイレンシングサプレッサーの発現を植物またはその部分の種子に限定することにより、何世代にもわたって安定化できることが分かった（WO2010/057246）。本明細書で使用するとき、「サイレンシングサプレッサータンパク質」またはSSPは、特に、初めに形質転換された植物から反復世代にわたって、植物細胞内の異なる導入遺伝子からの発現産生物レベルを増強する植物細胞内で発現され得るポリペプチドである。実施形態では、SSPは、ウイルスサイレンシングサプレッサーまたはその突然変異体である。大多数のウイルスサイレンシングサプレッサーは、当技術分野で公知であり、これに限定されないが、P19、V2、P38、Pe-Po及びRPV-P0が挙げられる。実施形態では、ウイルスサイレンシングサプレッサーは、配列番号38の配列を有するアミノ酸、その生物活性フラグメント、または配列番号38と少なくとも50%同一でありサイレンシングサプレッサーとしての活性を有するアミノ酸配列を含む。

【0240】

本明細書で使用するとき、「安定発現」、「安定に発現された」、「安定化された発現」及びその変化形は、RNA分子レベルが、サイレンシングサプレッサーをコードする外来性ポリヌクレオチドを含まないアイソジェニック植物と比較したとき、反復世代、例え

ば、少なくとも3世代、少なくとも5世代または少なくとも10世代にわたって、子孫植物内で本質的に同じまたはより高いことを表す。しかしながら、この語は、反復世代にわたって、RNA分子レベルのいくらかのロス、前の世代と比較したとき、例えば、世代当たり10%以上のロスがある可能性を除外しない。

【0241】

該サプレッサーを、いずれかの起源、例えば、植物、ウイルス、哺乳類、その他から選択できる。該サプレッサーを得ることができるウイルス、及び各特定のウイルスからのサプレッサーのタンパク質（例えば、B2、P14、その他）またはコード領域指定の一覧は、WO2010/057246参照。サプレッサーの多重コピーを使用してもよい。異なるサプレッサーを一緒に使用してもよい（例えば、直列に）。

10

【0242】

RNA分子

本質的に、植物種子内で発現されるのが望ましいいずれかのRNAを、サイレンシングサプレッサーと同時に発現できる。コードされたポリペプチドは、オイル、デンプン、炭水化物、栄養素、その他の代謝と関連し得る、またはタンパク質、ペプチド類、脂肪酸類、脂質類、ワックス類、オイル類、デンプン類、糖類、炭水化物、香料、匂い、毒素類、カロテノイド類、ホルモン類、高分子類、フラボノイド類、貯蔵タンパク質、フェノール酸類、アルカロイド類、リグニン類、タンニン類、セルロース類、糖タンパク質、糖脂質、他、好ましくは、TAGの生合成または会合体の合成に関与し得る。

【0243】

特定の例では、産生された植物は、アブラナ属、例えば、セイヨウアブラナまたはヒマワリ、ベニバナ、アマ、ワタ、ダイズ、カメリナ（*Camelina*）またはトウモロコシなどの植物内のオイル産生のための酵素レベルを増加させた。

20

【0244】

産生されたLC-PUFAレベル

組換え細胞または種子などの植物部分内で産生されたLC-PUFAまたは複数のLC-PUFAの組合せのレベルは重要である。特定のLC-PUFAまたは関連するLC-PUFA群、例えば、3LC-PUFAもしくは6LC-PUFA、もしくはVLC-PUFA、もしくは当技術分野で公知の方法により決定され得るその他である総脂肪酸の組成（%）として、レベルを表してよい。例えば、組換え細胞を含む物質の乾燥重量におけるLC-PUFAのパーセント、例えば、LC-PUFAである種子の重量のパーセントなど、LC-PUFA含有率として、レベルを表してもよい。油料種子内で産生されたLC-PUFAが、オイル産生物のために生育されない野菜または穀類におけるより、LC-PUFA含有率の点でかなり高く、さらにどちらも類似のLC-PUFA組成を有し、どちらもヒトまたは動物の食用LC-PUFAの供給源として使用してもよいことは認識されるだろう。

30

【0245】

LC-PUFAレベルを、当技術分野で公知の方法のいずれかにより決定してもよい。好ましい方法では、総脂質を細胞、組織または生物体から抽出し、ガスクロマトグラフィ（GC）による分析前に、脂肪酸をメチルエステルに転換する。そのような技術を実施例1に記載している。クロマトグラフィーのピーク位置を使用して各特定の脂肪酸を同定し、各ピーク下の積算面積で量を決定し得る。本明細書で使用するとき、反対に明示されない限り、試料中の特定の脂肪酸のパーセントを、クロマトグラム中の脂肪酸の総面積パーセントとして、この脂肪酸のピーク下面積から決定する。これは本質的に重量パーセント（w/w）に対応する。脂肪酸の同定を、GC-MSにより確認し得る。総脂質を、当技術分野で公知の技術により分離してTAGフラクションなどのフラクションを精製し得る。例えば、薄層クロマトグラフィー（TLC）を、分析スケールで行って、TAGの脂肪酸組成特異的に決定するために、DAG、アシル-CoAまたはリン脂質などの他の脂質フラクションからTAGを分離し得る。

40

【0246】

50

1つの実施形態では、抽出脂質中の脂肪酸のARA、EPA、DPA及びDHAの合計は、細胞内の総脂肪酸の約21%から約40%の間である。さらなる実施形態では、細胞内の総脂肪酸は、1%未満のC20:1を有する。好ましい実施形態では、細胞内の抽出可能なTAGは、本明細書に示されたレベルで脂肪酸を含む。本明細書に記載の脂質を定義する特徴の各可能な組合せも包含する。

【0247】

組換え細胞、植物または種子などの植物部分内のLC-PUFA産生レベルを、本明細書中、「転換効率」または「酵素効率」とも呼ぶ、1つ以上の産生脂肪酸に対する特異的基質脂肪酸の転換パーセントとしても表してもよい。このパラメーターは、細胞、植物、植物部分または種子から抽出された脂質の脂肪酸組成、すなわち、1つ以上の基質脂肪酸（それ由来の全ての他脂肪酸を含む）のパーセントとして生成されたLC-PUFA（それ由来の全ての他LC-PUFAを含む）の量に基づく。転換パーセントの一般式は： $100 \times (\text{産生LC-PUFA及びそれ由来の全産生物のパーセント総和}) / (\text{基質脂肪酸及びそれ由来の全産生物のパーセント総和})$ である。DHAに関して、例えば、基質脂肪酸（例えば、OA、LA、ALA、SDA、ETRAまたはEPA）及び該基質由来のDHAを含む全産生物のレベルに対するDHAレベルの比として（脂質中の総脂肪酸含有率のパーセントとして）、これを表してよい。転換パーセントまたは転換効率を、経路内の単一酵素工程、または経路の部分もしくは全体について表すことができる。

【0248】

具体的転換効率を式に従って本明細書中算出する：

1. OAからDHA = $100 \times (\text{DHA}\%) / (\text{OA、LA、GLA、DGLA、ARA、EDA、ALA、SDA、ETRA、ETA、EPA、DPA及びDHAの}\% \text{総和})$ 。

2. LAからDHA = $100 \times (\text{DHA}\%) / (\text{LA、GLA、DGLA、ARA、EDA、ALA、SDA、ETRA、ETA、EPA、DPA及びDHAの}\% \text{総和})$ 。

3. ALAからDHA = $100 \times (\text{DHA}\%) / (\text{ALA、SDA、ETRA、ETA、EPA、DPA及びDHAの}\% \text{総和})$ 。

4. EPAからDHA = $100 \times (\text{DHA}\%) / (\text{EPA、DPA及びDHAの}\% \text{総和})$ 。

5. DPAからDHA（4-デサチュラーゼ効率） = $100 \times (\text{DHA}\%) / (\text{DPA及びDHAの}\% \text{総和})$ 。

6. 12-デサチュラーゼ効率 = $100 \times (\text{LA、GLA、DGLA、ARA、EDA、ALA、SDA、ETRA、ETA、EPA、DPA及びDHAの}\% \text{総和}) / (\text{OA、LA、GLA、DGLA、ARA、EDA、ALA、SDA、ETRA、ETA、EPA、DPA及びDHAの}\% \text{総和})$ 。

7. 3-デサチュラーゼ効率 = $100 \times (\text{ALA、SDA、ETRA、ETA、EPA、DPA及びDHAの}\% \text{総和}) / (\text{LA、GLA、DGLA、ARA、EDA、ALA、SDA、ETRA、ETA、EPA、DPA及びDHAの}\% \text{総和})$ 。

8. OAからALA = $100 \times (\text{ALA、SDA、ETRA、ETA、EPA、DPA及びDHAの}\% \text{総和}) / (\text{OA、LA、GLA、DGLA、ARA、EDA、ALA、SDA、ETRA、ETA、EPA、DPA及びDHAの}\% \text{総和})$ 。

9. 6-デサチュラーゼ効率（3基質ALA） = $100 \times (\text{SDA、ETA、EPA、DPA及びDHAの}\% \text{総和}) / (\text{ALA、SDA、ETRA、ETA、EPA、DPA及びDHAの}\% \text{総和})$ 。

10. 6-エロンガーゼ効率（3基質SDA） = $100 \times (\text{ETA、EPA、DPA及びDHAの}\% \text{総和}) / (\text{SDA、ETA、EPA、DPA及びDHAの}\% \text{総和})$ 。

11. 5-デサチュラーゼ効率（3基質ETA） = $100 \times (\text{EPA、DPA及びDHAの}\% \text{総和}) / (\text{ETA、EPA、DPA及びDHAの}\% \text{総和})$ 。

12. 5-エロンガーゼ効率（3基質EPA） = $100 \times (\text{DPA及びDHAの}\% \text{総和}) / (\text{EPA、DPA及びDHAの}\% \text{総和})$ 。

【 0 2 4 9 】

本発明の脂質、好ましくは、種子オイルの脂肪酸組成は、総 6 脂肪酸：総 3 脂肪酸または新 6 脂肪酸：新 3 脂肪酸のいずれかについて、総脂肪酸含有量における 6 脂肪酸：3 脂肪酸の比によっても特徴付けられる。総 6 脂肪酸、総 3 脂肪酸、新 6 脂肪酸及び新 3 脂肪酸という語は、本明細書で定義した意味を有する。本明細書で例証された方法で、細胞、植物、植物部分または種子から抽出された脂質の脂肪酸組成から、比を算出する。脂質中の 6 脂肪酸より大きな 3 レベルを有することが望ましく、従って、1.0 未満の 6 : 3 比は好ましい。0.0 の比は、定義された 6 脂肪酸が全く存在しないことを示し；0.03 の比を得た。このような低い比を、3 - デサチュラーゼ、特に、本明細書に例証のピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) 3 - デサチュラーゼなどの真菌 3 - デサチュラーゼと一緒に 3 基質選択性を有する 6 - デサチュラーゼの併用により達成できる。

10

【 0 2 5 0 】

種子の重量当たりの LC - PUFA の収量を、種子中の総オイル含有率及び該オイル中の DHA % 及び / または DPA % に基づいて算出してもよい。例えば、もし、キャノーラ種子のオイル含有率が約 40 % (w / w) 及びオイル中の総脂肪酸含有量の約 12 % が DHA であるならば、種子の DHA 含有率は、約 4.8 % または種子グラム当たり約 48 mg である。実施例 2 に記載したように、セイヨウアブラナより低オイル含有率であり、約 9 % の DHA を有するシロイヌナズナ (*Arabidopsis*) 種子の DHA 含有量は約 25 mg / g 種子であった。約 21 % の DHA 含有率において、キャノーラ種子またはカメリナサティバ (*Camelina sativa*) 種子は、種子グラム当たり約 84 mg の DHA 含有量を有する。従って、本発明は、セイヨウアブラナ (*Brassica napus*)、カラシナ (*B. juncea*) 及びカメリナサティバ (*Camelina sativa*) 植物、及び種子グラム当たり少なくとも約 80 mg または少なくとも約 84 mg の DHA を含む、該植物から得られた該種子を提供する。種子は、乾燥後 (4 ~ 15 % の含水) の収穫された成熟種子について標準的に、水分を含有している。本発明は、種子を得ること及び該種子からオイルを抽出することを含むオイルを得る方法、及び該オイルの使用及び本発明に記載の植物から種子を収穫することを含む種子を得る方法も提供する。

20

【 0 2 5 1 】

ヘクタール当たり産生された DHA 及び / または DPA の量も、もし、ヘクタール当たりの種子の収量が既知または推定できるならば算出できる。例えば、オーストラリアにおけるセイヨウアブラナは、通常、ヘクタール当たり約 2.5 トンの種子を産生し、40 % のオイル含有率において、約 1000 kg のオイルを産生する。総オイル中 20.1 % の DHA 及び / または DPA において、これは、ヘクタール当たり約 200 kg の DHA 及び / または DPA を得る。もし、オイル含有率が 50 % 低下すれば、これは、それでも、ヘクタール当たり約 100 kg の DHA 及び / または DPA を得る。

30

【 0 2 5 2 】

現在までの証拠は、酵母または植物内で非相同に発現された、いくつかのデサチュラーゼは、いくつかのエロンガーゼとの併用で比較的低活性であることを示唆している。これを、LC - PUFA 合成における基質としての脂肪酸のアシル - CoA 形態を使用する能力を有するデサチュラーゼの提供により軽減してもよく、これは、組換え細胞、特に、植物細胞内で利点があると思われる。効率的 DHA 及び / または DPA 合成のための特に有益な組合せは、例えば、ミクロモナス・プシーラ (*Micromonas pusilla*) 6 - デサチュラーゼ (配列番号 9)、または少なくとも 95 % のアミノ酸配列の同一性を有するその変異体と、例えば、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) 3 - デサチュラーゼ (配列番号 6) などの真菌 3 - デサチュラーゼとである。

40

【 0 2 5 3 】

本明細書で使用するとき、「本質的に含まない」という語は、組成物 (例えば、液体またはオイル) が規定の成分をほとんど (例えば、約 0.5 % 未満、約 0.25 % 未満、約 0.1 % 未満、または約 0.01 % 未満) または全く含まないことを意味する。実施形態

50

では、「本質的に含まない」は、ルーチンの分析技術、例えば、特定の脂肪酸（ 6 - ドコサペンタエン酸など）を、実施例 1 で概要を述べたガスクロマトグラフィを用いて、成分を検出できないことを意味する。

【 0 2 5 4 】

オイルの製造

当技術分野においてルーチンに実施される技術を、本発明の細胞、植物、種子、その他により産生されたオイルを抽出、処理、及び分析するために使用できる。通常、植物種子を調理し、圧力をかけ、抽出して粗オイルを製造し、それから該オイルを脱ガムし、精製し、脱色し、脱臭する。概して、種子を粉碎する技術は、当技術分野において公知である。例えば、油料種子を、水との噴霧により適度な柔らかさにして、例えば、含水率を 8 . 5 % まで上げることができ、0 . 2 3 ~ 0 . 2 7 mm のギャップ設定した平滑ローラーを用いてフレーク状にする。種子のタイプに応じて、粉碎前に水を添加しなくてもよい。加熱は酵素を不活性化させ、さらなる細胞破壊を促進し、油滴を凝集させ、タンパク質粒子を凝集させる。これらの全ては、抽出処理を促進する。

【 0 2 5 5 】

実施形態では、種子オイルの大部分を、スクリュープレスを通過させることにより遊離する。それから、スクリュープレスから追い出されたケーキを、熱追跡カラム (heat traced column) を用いて、例えば、ヘキサンで溶媒抽出する。あるいは、圧搾操作により製造された粗オイルを、溝付きワイヤー排液上蓋を有する沈降タンクを通過させて、圧搾操作中のオイルで発現された固形物を除去できる。澄ませたオイルを板枠式圧濾機を通過させて、残った微細な固形粒子を除去できる。必要に応じて、抽出処理から回収されたオイルを、澄ませたオイルと合わせて、配合粗オイルを製造できる。

【 0 2 5 6 】

一旦、溶媒を粗オイルから取り除くと、圧搾及び抽出部分を合わせたものに対して、通常のオイル処理方法を行う。本明細書で使用するとき、本発明の脂質またはオイルと組み合わせ使用されるとき、「精製された」という語は、抽出脂質またはオイルに対して、脂質 / オイル成分の純度を上げる 1 つ以上の処理工程を行うことを意味する。例えば、精製工程は、脱ガム、脱臭、脱色、乾燥及び / または抽出オイルの分取から成る群の 1 つ以上または全てを含み得る。しかしながら、本明細書で使用するとき、「精製された」という語は、総脂肪酸含有物のパーセントとして D H A 含有率を増加させるように、本発明の脂質またはオイルの脂肪酸組成を変更するエステル交換反応処理または他の処理を含まない。言い換えれば、精製された脂質またはオイルの脂肪酸組成は、未精製の脂質またはオイルと本質的に同じである。

【 0 2 5 7 】

脱ガム

脱ガムはオイル精製の初期工程であり、その主な目的は、総抽出脂質の約 1 ~ 2 % 存在し得る、該オイルからリン脂質のほとんどを除去することである。70 ~ 80 において、リン酸を通常含む、約 2 % の水を粗オイルに添加すると、微量金属及び顔料と会合したリン脂質のほとんどが分離する。除去された不溶性物質は、主に、リン脂質及びトリアシルグリセロールの混合物であり、レクチンとしても公知である。濃縮リン酸を粗種子オイルに添加することにより、脱ガムを実行し、水和可能でないホスファチド類を水和可能な形態に転換して、存在する少量の金属をキレート化できる。ガムを遠心分離により種子オイルから分離する。

【 0 2 5 8 】

アルカリ精製

アルカリ精製は、時折、中和とも呼ばれる、粗オイルの処理の精製方法の 1 つである。通常、脱ガム後、脱色前に行う。脱ガム後、十分量のアルカリ溶液の添加により、種子オイルを処理して、脂肪酸及びリン酸の全てを滴定し、こうして生成した石鹸を除去し得る。適切なアルカリ物質としては、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、炭酸ナトリウム、水酸化リチウム、水酸化カルシウム、炭酸カルシウム及び水酸化アンモニウムが挙げられ

る。この方法は、通常、室温において実行され、遊離脂肪酸部分を除去する。石鹼を遠心分離または石鹼を溶媒に抽出することにより除去し、中和オイルを水で洗浄する。必要であれば、オイル中の過剰アルカリを、塩酸または硫酸などの適切な酸で中和してもよい。

【0259】

脱色

脱色は、漂白土（0.2～2.0%）の存在下、酸素の非存在下、窒素または蒸気または真空中での操作により、90～120において、10～30分間、オイルを加熱する精製方法である。オイル処理のこの工程は、望まれない顔料（カロテノイド、クロロフィル、ゴシポール、他）を除去するように設計されており、この方法は、酸化生成物、微量金属、イオウ化合物及び微量の石鹼も除去する。

10

【0260】

脱臭

脱臭は、高温（200～260）及び低圧（0.1～1mmHg）におけるオイル及び脂肪の処理である。通常、約0.1ml/分/100mlの種子オイルの速度で種子オイル中に蒸気を導入することにより、これを実施する。約30分のスパージ後、種子オイルを真空下冷却させる。種子オイルを、通常、ガラス容器に移動して、冷蔵貯蔵する前にアルゴンを流す。この処理により、種子オイルの色を改善し、揮発性物質または残っている遊離脂肪酸、モノアシルグリセロール及び酸化生成物を含む臭気化合物の大部分を除去する。

【0261】

20

脱ろう

脱ろうは、オイル及び脂肪を、周囲以下の温度における結晶化により固体（ステアリン）及び液体（オレイン）フラクションに分離するため、オイルの商業生産で時々使用される方法である。最初に、綿実油に応用され、固形分のない製品を製造した。オイルの飽和脂肪酸含有量を減少させるために、通常使用される。

【0262】

エステル交換反応

本明細書で使用するとき、「エステル交換反応」は、TAG内及びTAG間で脂肪酸を交換または脂肪酸を別のアルコールに転移してエステルを生成する方法を意味する。これは、遊離脂肪酸としてTAGから脂肪酸を遊離することを最初に含み得る、または直接、脂肪酸エステル、好ましくは、脂肪酸メチルエステルまたはエチルエステルを生成し得る。メタノールまたはエタノールなどのアルコールとTAGとのエステル交換反応では、アルコールのアルキル基は、TAGのアシル基（DHAを含む）とのエステル結合を生成する。分取方法と合わせたとき、エステル交換反応を、脂質の脂肪酸組成の修飾のため使用できる（Marangoniら、1995）。エステル交換反応は、化学的（例えば、強酸または塩基触媒）または酵素的手段のいずれかを使用でき、後者は、TAGの脂肪酸に対して位置特異的（sn-1/3またはsn-2特異的）であり得る、または他よりいくつかの脂肪酸に対して選択性を有するリパーゼを使用する（Speranzaら、2012）。オイル中のLC-PUFA濃度を上昇させる脂肪酸分取を、例えば、凍結結晶化、尿素を用いた複合体形成、分子蒸留、超臨界流体抽出法、カウンターカレントクロマトグラフィー及び銀イオン錯体化などの、当技術分野で公知の方法のいずれかにより実施できる。尿素との複合体形成は、オイル中の飽和及び一価不飽和脂肪酸レベルを低下するのにその簡便さ及び効率のため、好ましい方法である（Gamezら、2003）。初めに、オイルのTAGを、酸または塩基触媒反応条件下のいずれかで加水分解により、しばしば、脂肪酸エステルの形態で、その構成脂肪酸に分割し、それにより、生成したアルキルエステルと生成されたまたはリパーゼによるグリセロールとの分離が可能であるように過剰のアルコールを含む、少なくとも3モルのアルコール（例えば、エチルエステルにはエタノールまたはメチルエステルにはメタノール）と、TAGの1モルを反応する。それから、処理により脂肪酸組成が通常変更されない、これらの遊離脂肪酸または脂肪酸エステルを複合体生成のため、尿素のエタノール溶液と混合してもよい。飽和及び一価不飽和脂肪

30

40

50

酸は、容易に尿素と複合体を形成し、冷却により晶出し、その後、濾過により除去してもよい。非尿素複合フラクションは、それにより、LC-PUFAが豊富となる。

【0263】

飼料

本発明は、飼料として使用できる組成物を含む。本発明の目的のため、「飼料」は、体に取り込まれたとき、(a)栄養を与えるまたは組織を蓄積するまたはエネルギーを供給する役割をし；及び/または(b)十分な栄養状態または代謝機能を維持、回復または支持するヒトまたは動物の食用の食物または製剤を含む。本発明の飼料としては、例えば、調整粉乳、及び本発明のシードミールなどの乳児及び/または幼児のための栄養組成物が挙げられる。

10

【0264】

本発明の飼料は、例えば、本発明の細胞、本発明の植物、本発明の植物部分、本発明の種子、本発明の抽出物、本発明の方法の産生物、本発明の発酵処理産生物、または適切な担体を伴う組成物を含む。「担体」という語は、栄養価値を有していても有していなくてもよいいずれかの成分を包含するという広義の意味で使用される。熟練者が認識するように、担体は、飼料を消費する生物に対して有害な影響を有しないように、該飼料中に使用に適切（または十分に低濃度で使用される）でなければならない。

【0265】

本発明の飼料は、本明細書に記載の方法の使用、細胞または植物により直接または間接的に産生されたオイル、脂肪酸エステル、または脂肪酸を含む。組成物は、固体または液体のいずれかであってよい。加えて、組成物は、特定の使用に望ましい量で、食用多量栄養素、タンパク質、炭水化物、ビタミン類、及び/またはミネラル類を含んでもよい。これらの分量は、該組成物が、正常な個体が使用するのか、代謝障害等に患っている個体などの専門的ニーズを有する個体が使用するのか、どちらを意図するかによって異なるだろう。

20

【0266】

栄養価値を有する適切な担体の例としては、これに限定されないが、食用脂肪などの多量栄養素、炭水化物及びタンパク質が挙げられる。かかる食用脂肪の例としては、これに限定されないが、ココナツオイル、ルリジサオイル、真菌オイル、黒潮オイル、ダイズオイル、及びモノ-及びジグリセリドが挙げられる。かかる炭水化物の例としては（これに限定されないが）：グルコース、食用ラクトース、及び加水分解デンプンが挙げられる。さらに、本発明の栄養組成物で利用され得るタンパク質の例としては、（これに限定されないが）ダイズタンパク質、電気透析ホエー、電気透析スキムミルク、ミルクホエー、またはこれらのタンパク質の加水分解産物が挙げられる。

30

【0267】

ビタミン類及びミネラル類に関して、本発明の飼料組成物に、以下のものを添加してもよい：カルシウム、リン、カリウム、ナトリウム、塩化物、マグネシウム、マンガン、鉄、銅、亜鉛、セレン、ヨウ素、及びビタミンA、E、D、C、及びビタミンB複合体が挙げられる。他のかかるビタミン類及びミネラル類も添加してよい。

【0268】

本発明の飼料組成物で利用される成分は、半精製または精製された原料であり得る。半精製または精製というのは、天然物質の精製またはデノボ合成により準備された物質を意味する。

40

【0269】

本発明の飼料組成物を、食事補給を必要としないときでさえ、食物に添加してもよい。例えば、該組成物を、（これに限定されないが）：マーガリン、モディファイドバター、チーズ、牛乳、ヨーグルト、チョコレート、キャンディー、スナック類、サラダオイル、料理用油、料理用油脂、肉類、魚及び野菜類を含む、いずれかのタイプの食物に添加してよい。

【0270】

50

加えて、本発明に従って産生された脂肪酸または対象遺伝子を含み発現するように形質転換された宿主細胞を、ヒトまたは動物の食用により望ましいものに、動物の蘇生器、卵または乳脂肪酸組成物を変えるための動物用栄養補助食品としても使用してよい。かかる動物の例としては、ヒツジ、ウシ、ウマ、ニワトリ等の家禽類が挙げられる。

【0271】

さらに、本発明の飼料を、例えば、ヒトまたは動物の食用エビなどの魚または甲殻類の脂肪酸レベルの増加させるように水産養殖で利用できる。好ましい魚はサケである。

【0272】

本発明の好ましい飼料は、ヒトまたは他の動物用食物または餌として直接使用され得る葉及び幹などの植物、種子及び他の植物部分である。例えば、動物は、畑で育成したそのような植物を直接食べてもよい、または制御された給餌でより計量された量を与えられてもよい。本発明は、ヒトまたは他の動物のLC-PUFAレベルを増加するために食料としてかかる植物及び植物部分の使用を含む。

【0273】

組成物

本発明は、組成物、特に、1つ以上の脂肪酸及び/または好ましくは、脂肪酸のエチルエステルの形態の、本発明の方法を用いて産生され得られたオイルを含む医薬組成物も包含する。

【0274】

医薬組成物は、標準的で周知の無毒性薬剤的に許容可能な担体、賦形剤またはリン酸緩衝食塩水、水、エタノール、ポリオール類、植物油類、湿潤剤または、水/油エマルジョンなどの、エマルジョンなどの媒体と組み合わせて、1つ以上の脂肪酸及び/またはオイルを含んでよい。組成物は、液体または固体のいずれかであってよい。例えば、組成物は、錠剤、カプセル剤、接種可能な液体もしくは散剤、注射剤、または局所軟膏剤もしくはクリーム剤の形態であってよい。適切な流動性を、例えば、分散剤の場合では必要な粒径の維持及び界面活性剤の使用により維持できる。等張剤、例えば、糖類、塩化ナトリウム等を含むことも望ましい場合がある。そのような不活性希釈剤に加えて、組成物は、湿潤剤、乳化及び懸濁剤、甘味料、香味料及び芳香剤などのアジュバントも含むことができる。

【0275】

活性化合物に加えて、懸濁剤は、エトキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシエチレンソルビトール及びソルビタンエステル、結晶セルロース、アルミニウムメタヒドロキシド、ベントナイト、寒天、及びトラガカントまたはこれらの物質の混合物を含んでよい。

【0276】

錠剤及びカプセル剤などの固体剤形を、当技術分野で周知の技術を用いて製剤できる。例えば、本発明に従って産生された脂肪酸を、アカシア、コーンスターチまたはゼラチンなどの結合剤、ジャガイモデンプンまたはアルギン酸などの崩壊剤、及びステアリン酸またはステアリン酸マグネシウムなどの潤滑剤と組み合わせて、ラクトース、ショ糖、及びコーンスターチなどの従来の錠剤用基材で打錠できる。カプセル剤を、酸化防止剤及び関連する脂肪酸と共に、ゼラチンカプセル中にこれらの賦形剤を組み込むことにより製剤できる。

【0277】

静脈内投与のため、本発明に従って産生した脂肪酸またはその誘導体を、市販製剤中に組み入れてもよい。

【0278】

特定の脂肪酸の典型的投与量は、1日1~5回の服用で、0.1mg~20g(1日100gまで)であり、好ましくは、1日約10mg~約1、2、5、または10gの範囲(1回または複数回投与で服用)である。当技術分野で公知のように、最小約300mg/日の脂肪酸、特にLC-PUFAが望ましい。しかしながら、いずれの量の脂肪酸も対

10

20

30

40

50

象に有益であろうと考えられる。

【0279】

本発明の医薬組成物の可能な投与経路としては、例えば、経腸（例えば、経口及び直腸）及び非経口が挙げられる。例えば、液体製剤を、経口または直腸投与してよい。加えて、均一混合物を無菌条件下で、生理学的に許容可能な希釈剤、防腐剤、緩衝剤またはスプレー剤もしくは吸入剤を作成するための噴霧剤と混合した水中に完全に分散できる。

【0280】

患者に投与される組成物の投与量を、当業者が決定してよく、患者の体重、患者の年齢、患者の健康全般、患者の病歴、患者の免疫状態、他に依存する。

【0281】

加えて、本発明の組成物を、化粧品目的用に利用してもよい。混合物を生成または対象となる発明に従って産生した脂肪酸を化粧品組成物中の単独「活性」成分として使用してもよいように、既に存在する化粧品組成物に添加してよい。

【実施例】

【0282】

実施例1．物質及び方法

一過性発現系の植物細胞内の遺伝子の発現

外来性遺伝子構築物を、Voignetら（2003）及びWoodら（2009）により記載されたように、本質的に一過性発現系の植物細胞内で発現した。

【0283】

脂肪酸のガスクロマトグラフィ（GC）分析

30m SGE-BPX70カラム（70%シアノプロピルポリシルフェニレン-シロキサン、内径0.25mm、膜厚0.25mm）、FID、スプリット/スプリットレスインジェクター及びAgilent Technologies 7693シリーズオートサンプラー及びインジェクターを備えたAgilent Technologies 7890A GC（米国カリフォルニア州パロアルト）を用いてガスクロマトグラフィにより、FAMEを分析した。キャリアガスとしてヘリウムを使用した。150 のオープン温度において、スプリットモード（比50：1）で試料を注入した。注入後、オープン温度を1分間150 で保持し、その後、3 /分で210 まで上昇させ、再度、50 /分で240 まで上昇させ、最終的に240 で1.4分保持した。外部標準GLC-411（Nuchek）及びC17：0-ME内部標準の既知量の応答に基づいて、Agilent Technologies ChemStationソフトウェア（Rev B.04.03（16）、米国カリフォルニア州パロアルト）を用いて、ピークを定量化した。

【0284】

脂質の液体クロマトグラフィー質量分析（LC-MS）

開花後12日目（daf）、凍結乾燥した発育種子及び内部定量標準としてトリ-C17：0-TAGの既知量を添加後の成熟種子から総脂質を抽出した。乾燥物質5mg当たりブタノール：メタノール（1：1v/v）中の10mMブチル化ヒドロキシトルエン1mL中に抽出脂質を溶解し、Agilent 1200シリーズLC及び6410bエレクトロスプレーイオン化トリプル四重極LC-MSを用いて分析した。流速0.2mL/分でバイナリーグラジエントを用いて、Ascend Express RP-アミドカラム（50mm x 2.1mm、2.7µm、Supelco）を用いて、液体をクロマトグラフィー法で分離した。移動相は：A.10mMギ酸アンモニウム水溶液：メタノール：テトラヒドロフラン（50：20：30v/v/v）；B.10mMギ酸アンモニウム水溶液：メタノール：テトラヒドロフラン（5：20：75v/v/v）。多重反応モニタリング（MRM）リストは、コリジョンエネルギー30V及びフラグメント60Vを用いて、次の主要脂肪酸：16：0、18：0、18：1、18：2、18：3、18：4、20：1、20：2、20：3、20：4、20：5、22：4、22：5、22：6に基づいた。22：6のニュートラルロスからアンモニアと化合したプリカーサ-

10

20

30

40

50

イオンとプロダクトイオンに基づいて、個々のMRM TAGを同定した。10 μMトリステアリン外部標準を用いて、TAGを定量化した。

【0285】

LC-MSを用いた脂質プロファイリング

Agilent 6410Bエレクトロスプレーイオン化QQQ-MS (Agilent、米国カリフォルニア州パロアルト)と連結したAgilent 1200シリーズLCを用いて、抽出した総脂質を分析した。流速0.2 mL/分でバイナリーグラジエントを用いたAscentis Express RP-アミド 50mm x 2.1mm、2.7 μm HPLCカラム (Sigma-Aldrich、オーストラリア、キャッスルヒル)を用いて、各総脂質抽出物5 μLを注入して、クロマトグラフィー法で分離した。移動相は：A. 10 mMギ酸アンモニウム水溶液：メタノール：テトラヒドロフラン (50：20：30 v/v/v)；B. 10 mMギ酸アンモニウム水溶液：メタノール：テトラヒドロフラン (5：20：75 v/v/v)。コリジョンエネルギー30 V及びフラグメンテーションエネルギー60 Vを用いて、多重反応モニタリング (MRM)により、選択した中性脂質 (TAG及びDAG) 及びリン脂質 (PC、PE、PI、PS、PA、PGを含むPL) を分析した。次の主要脂肪酸：16：0 (パルミチン酸)、18：0 (ステアリン酸)、18：1 (オレイン酸、OA)、18：2 (リノール酸、LA)、18：3 (α-リノレン酸、ALA)、18：4 (ステアリドン酸、SDA)、20：1、20：2、20：3、20：4、20：5、22：4、22：5、22：6 に、中性脂質を標的とし、一方、それぞれ、0-3、0-4、0-5、4-6の二重結合を有するC16、C18、C20及びC22化学種を含めてリン脂質をスキャンした。

【0286】

20：1、SDA、EPA及びDHAのニュートラルロスからアンモニアと化合したブリカーサ-イオンとプロダクトイオンに基づいて、個々のMRM TAGを同定した。外部標準として50 μMトリステアリン及びジステアリンを用いて、TAG及びDAGを定量化した。10 μMのジ-18：0-PC、ジ-17：0-PA、ジ-17：0-PE、17：0-17：1-PG、ジ-18：1-PI及びジ-17：0-PS外部標準 (Avanti Polar Lipids、米国アラバマ州アラバスター) を用いて、PLを定量化した。選択したTAG、DAG及びPL化学種を、Agilent 6520Q-TOF MS/MSによりさらに確認した。

【0287】

種子脂肪酸プロファイル及びオイル含有率の決定

種子オイル含有率を決定する場合、種子を、24時間デシケーター内で乾燥し、種子約4 mgを、テフロン (登録商標) 加工スクリューキャップを含む2 mLガラスバイアル中に移動した。トルエン0.1 mL中に溶解したトリヘプタデカノイン0.05 mgを内部標準としてバイアルに添加した。

【0288】

種子FAMEを、種子物質を含むバイアルに、1N HClメタノール溶液 (Supelco) 0.7 mLを添加することにより調製し、短時間ボルテックスし、80℃で2時間インキュベートした。室温まで冷却後、0.9% NaCl (w/v) 0.3 mL及びヘキサン0.1 mLを該バイアルに添加し、Heidolph Vibramax 110で、10分間よく混合した。FAMEを、0.3 mLガラスインサート中に集め、前述のように水素炎イオン化検出器 (FID) を備えたGCにより分析した。

【0289】

市販標準品GLC-411 (NU-CHEK PREP, INC.、米国)中に存在する同じFAMEの既知量のピーク面積応答に基づき、個々のFAMEのピーク面積を、先ず補正した。GLC-411は、C8：0～C22：6の範囲の等量の31種の脂肪酸 (重量%)を含む。標準品中に存在しなかった脂肪酸の場合、本発明者らは、最も類似のFAMEのピーク面積応答を利用した。例えば、16：1 d 9のFAMEのピーク面積応答

を 16 : 1 d 7 に使用し、C 2 2 : 6 の F A M E 応答を C 2 2 : 5 に使用した。内部標準質量との比較により、補正面積を使用して、試料中の各 F A M E の質量を算出した。オイルを、主に、T A G の形態で貯蔵し、その重量を、F A M E の重量に基づいて算出した。各 F A M E のモル数を計算し、F A M E の総モル数を 3 で割ることにより、グリセロールの総モル数を決定した。関係：オイルの重量 % = $100 \times \left((41 \times \text{F A M E 総モル数} / 3) + (\text{F A M E 総 g 数} - (15 \times \text{F A M E 総モル数})) / \text{種子 g 数} \right)$ (式中、41 及び 15 は、それぞれ、グリセロール部分とメチル基のモル重量である) を用いて、グリセロール及び脂肪アシル部分の総和として、T A G を算出した。

【0290】

オイル試料のステロール含有率の分析

10

内部標準として C 2 4 : 0 モノオールのアリコートを添加して一緒にオイル約 10 mg の試料を、80 % M e O H 中 5 % K O H 4 m L を用いてけん化し、テフロン (登録商標) 加工スクリューキャップしたガラスチューブ内で 80 2 時間加熱した。反応混合物を冷却後、ミリ Q 水 2 m L を添加し、ステロールを、振盪及びボルテックスすることにより、ヘキサン : ジクロロメタン (4 : 1 v / v) 2 m L 中に抽出した。混合物を遠心分離し、ステロール抽出物を除去し、ミリ Q 水 2 m L で洗浄した。それから、該ステロール抽出物を振盪及び遠心分離後に除去した。該抽出物を窒素ガス気流中で蒸発し、B S T F A 2 0 0 m L を用いて、ステロールをシリル化し、80 で 2 時間加熱した。

【0291】

ステロールの G C / G C - M S 分析のため、ステロール - O T M S i 誘導体を 40 においてヒートブロック上で窒素ガス気流下乾燥し、それから、G C / G C - M S 分析直前に、クロロホルムまたはヘキサン中に再溶解した。S u p e l c o E q u i t y (商標) - 1 フューズドシリカキャピラリーカラム (15 m x 0.1 mm (内径)、膜厚 0.1 μm)、F I D、スプリット / スプリットレスインジェクター及び A g i l e n t T e c h n o l o g i e s 7 6 8 3 B シリーズオートサンプラー及びインジェクターを備えた A g i l e n t T e c h n o l o g i e s 6 8 9 0 A G C (米国カリフォルニア州パロアルト) を用いたガスクロマトグラフィ (G C) により、ステロール - O T M S 誘導体を分析した。キャリアーガスはヘリウムだった。オープン温度 120 においてスプリットレスモードで試料を注入した。注入後、オープン温度を、10 / 分で 270 まで、最終的に、5 / 分で 300 まで上昇させた。A g i l e n t T e c h n o l o g i e s C h e m S t a t i o n ソフトウェア (米国カリフォルニア州パロアルト) を用いて、ピークを定量化した。G C 結果には、個々の成分面積の ± 5 % の誤差がある。

20

30

【0292】

G C - 質量分光 (G C - M S) 分析を、F i n n i g a n T h e r m o q u e s t G C Q G C = M S 及び F i n n i g a n T h e r m o E l e c t r o n C o r p o r a t i o n G C - M S で行った ; 両システムは、オンカラムインジェクター及び T h e r m o q u e s t X c a l i b u r ソフトウェア (米国テキサス州オースチン) を備えていた。各 G C は、上記のものと同様な極性のキャピラリーカラムを装着していた。質量分析データを用いて、且つ信頼ある基準及び実験室基準で得られたものと保持時間データを比較することにより、個々の成分を同定した。試料バッチと同時に、全工程のブランク分析を行った。

40

【0293】

R T - P C R 条件

順方向プライマー 10 p m o l (ピコモル) 及び逆方向プライマー 30 p m o l、最終濃度 2.5 m M までの M g S O 4、緩衝剤を含む R N A 合計 400 n g (ナノグラム) 及び製造者説明書に従ったヌクレオチド成分を用いた、体積 25 μL の S u p e r s c r i p t I I I O n e - S t e p R T - P C R システム (I n v i t r o g e n) を用いて、逆転写 P C R (R T - P C R) 増幅を通常に行った。典型的な温度状況は、45、30 分間の 1 サイクルで逆転写を起こし、 ; それから、94、2 分の 1 サイクル、次いで、94、30 秒の 40 サイクル、52、30 秒間、70、1 分間 ; それから、

50

72、2分間の1サイクル後、反応混合物を5℃まで冷却した。

【0294】

デジタルPCRによる導入遺伝子のコピー数の決定

トランスジェニック植物内の導入遺伝子のコピー数を決定するため、次のように、デジタルPCR法を使用した。この方法を、植物が、本明細書に記載の遺伝子構築物のトランスジェニックであるかどうかを決定するためにも使用できるはずである。約1平方センチメートルの葉組織を、各個々の植物から収穫し、コレクションマイクロチューブ(Qiagen)に入れた。それから、試料を24~48時間凍結乾燥した。DNA抽出物の試料を解氷のため、ステンレススチールボールベアリングを各乾燥試料に添加し、Qiagen Tissue lysis erでチューブを振盪した。抽出緩衝液375 µL(0.1 M トリス-HCl pH8、0.05 M EDTA pH8及び1.25% SDS)を各チューブに添加し、混合物を65℃で1時間インキュベートし、それから、冷却後、6 M 酢酸アンモニウム(4℃)187 µLを徹底的に混合しながら各チューブに添加した。それから、試料を3000 rpmで30分間遠心分離した。各チューブの上澄みを、室温で5分間DNA沈降のためイソプロパノール220 µLを各々含む新しいマイクロチューブ中に取り出した。DNAを、3000 rpmで30分間チューブを遠心分離することにより集め、DNAペレットを、70%エタノール320 µLで洗浄し、乾燥後、水225 µL中にDNAを再懸濁した。不溶性物質を3000 rpmで20分間遠心分離することによりペレット化し、各上澄み150 µLを長期貯蔵用96ウェルプレートに移動した。

【0295】

効率的且つ定量的デジタルPCR(ddPCR)のため、DNAを導入遺伝子または複数挿入の複数のコピーが物理的に分離していることを保証するため、増幅反応前に制限酵素で消化した。従って、DNA製剤のアリコットを10×EcoRI緩衝剤、DNA5 µL及び試料当たり各酵素4単位を用いて、20 µL体積において、EcoRI及びBamHIと一緒に、37℃で一夜インキュベートして消化した。

【0296】

これらのPCR反応で使用したプライマーを、参照及び標的遺伝子用プライマーが相互作用すると予測されない、またはかかる相互作用が使用条件下問題とならないと確認するため、Primer3ソフトウェアを用いて設計した。アッセイに使用する参照遺伝子は、セイヨウアブラナゲノム当たり1つの遺伝子に存在するアブラナHmg(高移動度群)遺伝子であった(Wengら、2004)。セイヨウアブラナは異質四倍体であるので、セイヨウアブラナ(Brassica napus)において、Hmg遺伝子の4コピー、すなわち、2つの遺伝子の各々の2つのアレルがあると分かった。参照遺伝子反応は、プライマー対及び以下の二重標識プローブを使用した：センスプライマー、Can11 GCGAAGCACATCGAGTCA(配列番号50)；アンチセンスプライマー、Can12 GGTTGAGGTGGTAGCTGAGG(配列番号51)；プローブ、Hmg-P3 5'-Hex/TCTCTAC/z en/CCGTCCTCACATGACGC/3IABkFQ/-3'(配列番号52)。増幅産生物サイズは73 bpであった。

【0297】

全てのトランスジェニック植物をスクリーニングするため、PPT選択マーカ遺伝子領域を検出した1つの標的遺伝子増幅反応では、センスプライマーは、Can17、ATACAAGCACGGTGGATGG(配列番号：53)；アンチセンスプライマーは、Can18 TGGTCTAACAGGTCTAGGAGGA(配列番号：54)；プローブは、PPT-P3 5'-/FAM/TGGCAAAGA/z en/GATTTTCGAGCTTCTGCT/3IABkFQ/-3'(配列番号：55)であった。この標的遺伝子増幅産生物は82 bpであった。時として、第二標的遺伝子アッセイを、T-DNAの部分的挿入を検出するため平行して行った。この第二アッセイはセンスプライマー、Can23 CAAGCACCGTAGTAAGAGAGCA(配列番号：56)、アンチセンスプライマー、Can24 CAGACAGCCTGAGGTTAGCA(配列番号：57)；プローブ、D6des-P3 5'-/FAM/TCCCCACTT/z e

n / C T T A G C G A A A G G A A C G A / 3 I A B k F Q / - 3 ' (配列番号: 58) を用いて、6 - デサチュラーゼ遺伝子領域を検出した。この標的遺伝子増幅産物のサイズは89 bpであった。反応は、ルーチンに消化DNA製剤2 µLを使用した。試料当たりの反応組成; 総体積25 µL中、参照センスプライマー(10 pM)、1 µL; 参照アンチセンスプライマー(10 pM)、1 µL; 参照遺伝子プローブ(10 pM)、0.5 µL; 標的遺伝子センスプライマー(10 pM)、1 µL; 標的遺伝子アンチセンスプライマー(10 pM)、1 µL; 標的遺伝子プローブ(10 pM)、0.5 µL; ddPCR試薬混合物、12.5 µL; 水5.5 µL。

【0298】

それから、各試料を20000ナノリットルサイズ液滴に分割するQX100ドロプレットジェネレーター中に入れた。全ての試料を処理して96ウェルPCRプレートに移動するまで、8ウェルカートリッジ中でこれを行った。それから、このプレートを、プレートシーラー機を用いて、突き刺し可能な箔(pierceable foil)で熱シールした。それから、試料を以下の反応条件下で処理した: 95 °C、10分間、2.5 °C/秒でランピング; その後、2.5 °C/秒でランピングしながら94 °C、30秒間を39サイクル; 2.5 °C/秒でランピングしながら61 °C、1分間; 98 °C、10分間、次いで、12 °Cに冷却。液滴中のDNAの増幅反応後、プレートを、二色検出システムを用いて個々に各液滴を分析するQX100ドロプレットリーダーに入れた(FAMまたはHex検出に設定)。液滴デジタルPCRデータを、蛍光強度グラフ上にプロットした試料の各液滴の1-Dプロット、または蛍光(FAM)を各液滴の蛍光(Hex)に対してプロットする2-Dプロットのいずれかとして見る。ソフトウェアは、各試料の各フルオロフォア(FAMまたはHex)について、正及び負の液滴の数を測定した。それから、ソフトウェアは、入力された、コピー/µLの単位で標的DNA分子濃度を決定するため、正の液滴に分画をポワソンアルゴリズムにフィットさせた。コピー数の変動を、式: $CNV = (A/B) * Nb$ (式中、A = 標的遺伝子濃度、B = 参照遺伝子濃度、及びNb = 4、ゲノム中の参照遺伝子のコピー数)を用いて算出した。

【0299】

花粉生存率の評価

フルオレセイン二酢酸エステル(FDA)を、アセトン中に2 mg/mLで溶解して原液を得た。持続的白濁の外観により示される飽和に達するまで、シヨ糖溶液(0.5 M) 2 mLにFDA原液を滴下することにより使用直前に、FDA希釈液を調製した。

【0300】

ヨウ化プロピジウム(PI)を滅菌蒸留水中1 mg/mLで溶解して原液を得た。使用直前に、原液100 µLを、滅菌蒸留水10 mLに添加して、使用液を作製した。生存花粉と非生存花粉の比をチェックするため、PI及びFDA原液を2:3の比で混合した。

【0301】

1日16時間の光周期で、22 ± 2 °Cの温室内の標準条件下、トランスジェニック及び野生型セイヨウアブラナ及びカラシナ植物を生育した。翌日開花する状態の成熟した花蕾を標識し、翌朝9 ~ 10時amに集めた。開花した花の花粉をFDA/PI混合物で染色し、Leica MZF L I I I 蛍光顕微鏡を用いて可視化した。GFP-2、480/40 nm励起フィルターを備えた510 nmロングパス発光フィルター(赤と緑の光を透過する)を使用して、生存及び非生存花粉を検出した。PI染色した非生存花粉は、蛍光顕微鏡下、赤く見えたが、生存花粉は、PI及びFDAで染色したとき、鮮緑色に見えた。

【0302】

実施例2. シロイヌナズナ(Arabidopsis thaliana)種子内のトランスジェニックDHA経路の安定発現

バイナリーベクター構築物

バイナリーベクターpJP3416-GA7(WO2013/185184に記載された、本明細書で「GA7」とも呼ぶ)及びpJP3404は各々、5つのデサチュラーゼ

及び2つのエロンガーゼをコードする7つの非相同脂肪酸生合成遺伝子、及び各ベクター中に存在するT-DNAの左右境界リピート間の植物選択マーカースを含んでいた(図2及び3)。配列番号1は、左右境界配列のpJP3416-GA7のT-DNA領域の核酸配列を提供する。両方の遺伝子構築物は、ラカンセア・クルイベリ(*Lachancea Kluyveri*) 12-デサチュラーゼ(配列番号1のヌクレオチド14143-16648を含む)、ピキア・パストリス(*Pichia pastoris*) 3-デサチュラーゼ(配列番号1のヌクレオチド7654-10156を含む)、ミクロモナス・プシーラ(*Micromonas pusilla*) 6-デサチュラーゼ(配列番号1のヌクレオチド266-2309)、パヴロバ・サリナ(*Pavlova salina*) 5-及び4-デサチュラーゼ(それぞれ、配列番号1のヌクレオチド4524-6485及び10157-14142)及びピラミモナス・コルダタ(*Pyramimonas cordata*) 6-及び5-エロンガーゼ(それぞれ、配列番号1のヌクレオチド2310-4523及び17825-19967)をコードする植物コドン最適化遺伝子を含んでいた。

【0303】

該構築物中の7つのコード領域は、各々、種子特異的プロモーターの制御下であり、3つの異なるプロモーターを使用した、すなわち、短縮化セイヨウアブラナ(*Brassica napus*) ナピンプロモーター(pBnFP1)、シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*) FAE1プロモーター(pAtFAE1)及びアマ(*Linum usitatissimum*) コンリニン1プロモーター(pLuCn11)。7つの脂肪酸生合成遺伝子は、18:1 9(オレイン酸)から22:6 4、7、10、13、16、19(DHA)に転換するように設計されているDHA合成経路全体をコードした。バイナリーベクター両方は、複製されたエンハンサー領域及びアグロバクテリウム・ツメファシエンスnos3'(*A. tumefaciens* nos3') ポリアデニル化領域-転写ターミネーターを有するカリフラワーモザイクウイルス(CaMV) 35Sプロモーターと作動可能に結合したBAR植物選択マーカースコード領域を含んでいた。植物選択マーカースは、T-DNA領域の左境界と隣接して位置しており、従って、植物細胞中へのT-DNA転移の配向に対して、T-DNA上に遠位に位置した。これは、選択マーカース遺伝子を含まなさそうであるT-DNAの部分転移が選択されないだろう可能性を増加させた。pJP3416-GA7及びpJP3404は各々、アグロバクテリウム・リゾゲネス(*Agrobacterium rhizogenes*)からの複製のRiA4オリジンを含んでいた(Hamilton, 1997)。

【0304】

GA7構築物は、Hallら(1991)により記載された、2つのタバコ(*Nicotiana tabacum*) Rb7マトリックス結合領域(MAR)配列も含んでいた。時々、核結合領域と呼ばれるMAR配列は、インビトロで核マトリックスと特異的に結合することが知られており、インビボで核マトリックスとクロマチンとの結合を介在し得る。MARは、導入遺伝子サイレンシングを減少させる機能があると思われる。pJP3416-GA7では、MARを、トランスジェニック発現カセットと遮断するDNAスパーサーとしても作用するために、T-DNA領域内に挿入し位置した。GA7領域の挿入前のpJP3416ベクターは、境界間に植物選択マーカースカセットのみを含んでいた。

【0305】

シロイヌナズナ(*A. thaliana*) 形質転換及び脂肪酸組成分析

キメラベクトルを、アグロバクテリウム・ツメファシエンス(*A. tumefaciens*)株AGL1に導入し、形質転換したアグロバクテリウムの培養細胞を使用して、形質転換のためフローラルディップ法を用いて、アグロバクテリウム・ツメファシエンス(コロンビア及びfad2突然変異体生態型)植物を処理した(Clough及びBent, 1998)。突然変異後、処理した植物のT1種子を収穫し、BAR選択マーカース遺伝子を含む植物の選択のため、PPTを含むMSプレート上に播種した。残存し、健康なT1苗を土壌に移植した。成熟するまで植物を生育し自家受粉させた後、これらの植物からT2種子を収穫して、それらの種子脂質の脂肪酸組成を実施例1に記載したように、GC分析により分析した。

【0306】

pJP3416-GA7構築物は、pJP3404より、平均で、総脂肪酸含有率パーセントとしてわずかに高いレベルのDHAを産生する結果であった。オレイン酸からDHAの産生の各酵素工程の転換効率を、 $(\text{生成物}\% \times 100) / (\text{残基質}\% + \text{生成物}\%)$ として、これによりパーセントで表して算出した。

【0307】

pJP3416-GA7 T2形質転換系統で産生されたDHAの最も高いレベルは、6.2%であり、加えて、EPA0.5%及びDPA0.2%であった(系統#14)。これらのT2種子を導入遺伝子についてさらに区別した、すなわち、まだ、均一にホモ接合でなかった。これらの種子内の導入遺伝子の結果として産生された3脂肪酸レベル(コロンビア背景で内在的に産生されたALAレベルを除外した総新3脂肪酸)は10.7%であり、一方、6脂肪酸レベル(総新6脂肪酸だが、18:2n-7、12を除外)は1.5%であった。このことは、新3脂肪酸:新6脂肪酸の極めて好適な割当量、即ち、7.3:1であることを示している。

【0308】

pJP3416-GA7で形質転換された選択された系統、即ち、コロンビア背景で、7、10、14、22及び34と命名された系統及びfad2突然変異体背景で、18、21及び25と命名された系統のT2種子を、インビトロでトランスジェニック苗の選択用PPTを含むMS培地上に播種した。各系統用の20のPPT耐性苗を土壌に移植し、自家受粉後成熟するまで生育した。これらの植物は、選択マーカー遺伝子について、従って、植物ゲノム内の少なくとも1つのT-DNAインサクションについてホモ接合である可能性が高そうである。これらの植物のT3種子を収穫し、GCによりそれらの種子オイルの脂肪酸組成について分析した。この分析は、pJP3416-GA7構築物が、分離T2種子より、ホモ接合植物のT3種子内の3LC-PUFA DHAを高レベルで生成することを明らかにした。コロンビア背景の22.2と命名されたT3 pJP3416-GA7形質転換系統で、約13.9%までのDHAが観察され、種子脂質含有物中総脂肪酸のパーセントとして、新3脂肪酸約24.3%の合計レベルで、ヘミ接合T2種子内に約5.5%から増加した。新6脂肪酸は、総脂肪酸1.1%のレベルであり、新3脂肪酸:新6脂肪酸の非常に好適な比、即ち、約22:1を示した。同様に、fad2突然変異体背景の形質転換体は、種子脂質含有物中総脂肪酸のパーセントとして、DHA11.5%を含む、新3脂肪酸の合計として20.6%を得た。

【0309】

オレイン酸からDHAの産生経路の各酵素工程の酵素転換効率を、より高いDHAレベルを有するT3種子について表4に示す。系統22.2の種子内の12-デサチュラーゼ転換効率は81.6%であり、3-デサチュラーゼの効率は89.1%であり、それら両方は著しく高く、これらの真菌(酵母)酵素が発育種子内で十分に機能可能であった。DHA経路中他の外来性酵素の活性は、42.2%の効率で作用する6-デサチュラーゼ、76.8%の6-エロンガーゼ、95.0%の5-デサチュラーゼ、88.7%の5-エロンガーゼ及び93.3%の効率の4-デサチュラーゼを用いて、3基質に対して同様に高かった。6基質LAに対する6-デサチュラーゼ活性は、LAに対して0.7%のみの転換効率で作用する6-デサチュラーゼを用いて、ずっと低かった。GLAは、0.4%のみのレベルで存在し、最も高いDHA含有率を有するT3種子内で検出された20:2n-6の他に、新6生成物のみであった。独立したトランスジェニック種子の総種子脂質プロファイルから集めたデータを表5に示す。

【表 4 - 1】

表 4. トランスジェニック T₃ アラビドプシス属種子の総種子脂質中に観察された、オレイン酸から DHA の産生のための個々の酵素工程の転換効率。

		GA7_Col_7.2	GA7_Col_34.2	GA7_Col_10.13	GA7_Col_22.2	GA7_Col_14.19	GA7_FAD2-25.10	GA7_FAD2-21.2	GA7_FAD2-18.14	T ₄ Col_22.2 (平均)	T ₄ Col_22.2 最良系統
	Δ12-デサチユラーゼ	75.4%	73.1%	75.7%	81.6%	73.4%	66.6%	78.5%	63.1%	67.6%	82.7%
	Δ15-デサチユラーゼ	85.3%	84.4%	86.2%	89.1%	70.2%	87.5%	82.2%	87.6%	81.0%	90.9%
ω-6	Δ6-デサチユラーゼ	0.3%	0.3%	0.3%	0.7%	0.3%	0.6%	1.0%	0.2%	1.3%	0.7%
	(Δ9-エロンガーゼ)	1.7%	1.7%	1.2%	1.2%	2.6%	1.1%	2.0%	1.3%	1.6%	1.5%
	Δ6-エロンガーゼ										
	Δ5-デサチユラーゼ										
	Δ5-エロンガーゼ										
	Δ4-デサチユラーゼ										

10

20

【表 4 - 2】

ω-3	Δ6-デサチユラーゼ	30.7%	29.3%	28.2%	42.2%	30.2%	38.5%	40.0%	29.2%	41.0%	45.7%
	(Δ9-エロンガーゼ)	2.7%	2.7%	2.3%	2.4%	3.0%	2.3%	2.7%	2.9%	2.8%	3.1%
	Δ6-エロンガーゼ	79.0%	81.1%	79.0%	76.8%	70.9%	79.2%	73.2%	79.1%	77.5%	77.7%
	Δ5-デサチユラーゼ	94.0%	94.6%	94.5%	95.0%	97.9%	87.8%	93.3%	91.1%	95.0%	95.8%
	Δ5-エロンガーゼ	91.9%	91.7%	93.6%	88.7%	89.5%	89.9%	92.2%	91.6%	90.8%	90.2%
	Δ4-デサチユラーゼ	93.2%	93.7%	94.4%	93.3%	93.7%	92.5%	95.0%	93.9%	92.2%	90.9%

30

【表 5 - 1】

表 5. 独立したトランスジェニック種子の総種子脂質プロファイルから集めたデータ。

パラメーター	GA7_Col_7.2	GA7_Col_34.2	GA7_Col_10.13	GA7_Col_22.2	GA7_Col_14.19	GA7_FAD2-25.10	GA7_FAD2-21.2	GA7_FAD2-18.14	T ₄ Col_22.2 (平均±標準偏差)	T ₄ Col_22.2 最良系統
総 ω3 (総 FA 中の %)	50.0	48.9	51.6	55.8	38.6	47.1	49.4	44.8	54.0	55.9
総 ω6 (総 FA 中の %)	8.7	9.1	8.3	6.7	16.3	6.7	10.7	6.3	6.7	5.7
ω3 / ω6 比	5.75	5.37	6.22	8.33	2.37	7.03	4.62	7.11	8.06	9.81
ω6 / ω3 比	0.17	0.19	0.16	0.12	0.42	0.14	0.22	0.14	0.12	0.10
総 新 ω3 (総 FA 中の %)	16.3	15.2	15.5	24.3	12.5	18.8	20.5	14.0	23.0	26.4

40

【表 5 - 2】

総新ω6（総FA中の%）	1.2	1.2	0.9	1.1	1.5	0.9	1.8	0.7	1.4	1.4
新ω3 / ω6比	13.58	12.67	17.22	22.09	8.33	20.89	11.39	20.00	16.43	18.86
新ω6 / ω3比	0.07	0.08	0.06	0.05	0.12	0.05	0.09	0.05	0.06	0.05
OAからEPAの効率	14.1%	13.3%	13.4%	21.8%	10.2%	15.0%	16.8%	11.2%	20.4%	24.5%
OAからDHAの効率	12.0%	11.4%	11.8%	18.0%	8.6%	12.6%	14.8%	9.6%	17.1%	20.1%
LAからEPAの効率	18.9%	18.4%	17.9%	26.9%	14.2%	22.9%	21.8%	18.0%	26.2%	29.9%
LAからDHAの効率	16.2%	15.9%	15.7%	22.2%	12.0%	19.1%	19.1%	15.5%	21.9%	24.5%
ALAからEPAの効率	22.2%	21.9%	20.7%	30.1%	20.2%	26.1%	26.5%	20.5%	29.4%	32.9%
ALAからDHAの効率	19.0%	18.8%	18.2%	24.9%	17.1%	21.9%	23.3%	17.6%	24.6%	27.0%
総飽和	16.0	14.7	15.4	16.0	16.2	13.4	16.5	12.9	16.0	17.8
総一価不飽和	23.7	25.8	23.4	19.2	26.5	30.9	21.3	34.3	21.1	18.1
総多価不飽和	58.7	58.0	59.9	62.5	54.9	53.8	60.1	51.1	60.7	61.6
総 C20	19	19.8	16.8	15.9	19.1	21.5	18.2	23.3	18	16.6
総 C22	11.4	11	10.8	15.5	8.6	12.1	13.2	9.9	15.4	17.5
C20/C22 比	1.67	1.80	1.56	1.03	2.22	1.78	1.38	2.35	1.17	0.95

10

【0310】

T2系統22の子孫であるコロンビア背景のpJP3416-GA7系統22.2からのT3種子を土壌に直接播種し、得られたT3植物の成熟種子の脂肪酸組成をGCにより分析した。これらの種子の平均DHAレベルは、種子脂質中の総脂肪酸のパーセントとして13.3%±1.6（n=10）であった。最も高いレベルのDHAを含む系統は、種子脂質中の総脂肪酸中、15.1%のDHAを含有していた。酵素転換効率を、オレイン酸からDHAを産生する各工程について、表4に示す。

20

【0311】

サザンブロット解析を行った。結果は、高蓄積DHA系統は、アラビドプシス属植物のゲノム内に3つのT-DNAインサクションを有するトランスジェニック系統コロンビア#22を除外して、pJP3416-GA7構築物のT-DNAの単一または二重コピーのいずれかであることを示した。T5世代種子も分析し、総種子脂質中、13.6%までのDHAを含むことが分かった。GA7構築物は、DHA産生能力の点で、何世代かにわたって安定であると分かった。

【0312】

トランスジェニックシロイヌナズナDHA系統内のオイル含有量の決定

30

様々なDHAレベルを含むトランスジェニックシロイヌナズナ種子のオイル含有量を、実施例1に記載のように、GCにより測定した。データを、DHA含有率に対するオイル含有率（種子のオイル重量%）をグラフ化した図4に示す（総脂肪酸パーセントとして）。種子グラム当たりのDHA26.5mgまでを観察した（表6）。トランスジェニックシロイヌナズナ種子のオイル含有率は、DHA含有率と負の相関関係であると分かった。種子重量当たりのDHA量は、約14%のDHAを含む種子と比較して、約9%のDHAレベルを含む形質転換種子内でより大きかった。シロイヌナズナ以外の種の順次データは、カメリナサティバまたはアブラナ種より、シロイヌナズナにおいて、負の相関がより明白であることを示した（下記実施例8）。

40

【表 6】

表 6. GA7 トランスジェニックアラビドプシス属種子内のDHAの割合及び量。

	DHA含有率 (TFA%)	オイル含有率 (オイル%/g 種子)	重量当たりDHA含有量 (mg/g 種子)
GA7/col 22.2-1	14.2	14.89	20.2
GA7/col 22.2-2	14.3	15.02	20.5
GA7/col 22.2-3	14.0	15.92	21.2
GA7/col 10.15-1	8.7	30.23	25.06
GA7/col 10.15-2	8.6	31.25	25.77
GA7/col 10.15-3	8.8	31.70	26.49

10

【0313】

実施例 3. カメリナサティバ種子内のトランスジェニック DHA 経路の安定発現

上記のバイナリーベクター pJP3416-GA7 を、アグロバクテリウム・ツメファシエンス株 AGL1 及び形質転換のためのフローラルディップ法を用いたカメリナサティバ顕花植物の処理に使用した形質転換アグロバクテリウムの培養液からの細胞中に導入した (Lu 及び Kang, 2008)。植物の生育及び成熟後、処理した植物の T1 種子を収穫し、土壌に播種し、得られた植物を、pJP3416-GA7 の T-DNA に存在する bar 選択マーカー遺伝子のトランスジェニックであり、これを発現する植物について選択するため、除草剤 BASTA をスプレー処理した。除草剤に耐性のある生存 T1 植物を、自家受粉させて後、成熟するまで生育し、得られた T2 種子を収穫した。5 種のトランスジェニック植物を得て、これらの 3 種は全部そろった T-DNA を含んでいた。

20

【0314】

脂質を、全部そろった T-DNA を含む各 3 種の植物からの約 20 個の種子プールから抽出した。プール試料の 2 種は非常に低く、かろうじて検出できるレベルの DHA を含有していたが、3 番目のプールは、約 4.7% の DHA を含有していた。従って、この植物からの 10 個の個々の T2 種子から、脂質を抽出し、脂肪酸組成を GC により分析した。この形質転換系統について個々の種子の脂肪酸組成データも表 7 に示す。総種子脂質プロファイル (表 7) から集めたデータを表 8 に示す。

30

【0315】

DHA は、10 個の個々の種子のうち 6 個中に存在した。4 個の他の種子は、DHA を含まず、親植物の T-DNA インサクションのヘミ接合に基づいて、T-DNA を有しないヌルな分離個体であると推定された。最高レベルの DHA を含む単一種子から抽出した脂質は 9.0% の DHA を含み、一方、EPA、DPA 及び DHA のパーセント合計は 11.4% であった。

【表 7 - 1】

表 7. p J P 3 4 1 6 - G A 7 の T-DNA で形質転換したトランスジェニック T₂ カメリナサティバ種子の総種子脂質の脂肪酸組成。脂肪酸組成を、貯蔵種子バッチ (FD 5. 4 6) 及び最高～最低 DHA (左～右) にランクされた 10 種の単一種子について示す。

脂肪酸	FD5.46 プール	# 2	# 4	# 8	# 7	# 9	# 1	# 3	# 5	# 6	# 10
14:0	0	0.2	0.2	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1	0.2	0.2
16:0	11.6	12.1	12.3	12.1	13.2	12.3	12.8	11.9	11.4	11.5	11.7
16:1	0.2	0.0	0.1	0.1	0.0	0.2	0.0	0.2	0.2	0.2	0.2
16:3	0.3	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
18:0	3.7	3.3	3.2	3.2	3.0	3.1	3.2	3.3	3.1	3.2	3.2
18:1	10.8	8.0	8.0	8.6	8.5	9.4	11.0	10.2	8.3	9.4	8.6
18:1d11	1.7	1.3	1.4	1.4	1.7	1.4	1.5	1.3	1.3	1.3	1.3
18:2	24.7	18.2	19.5	19.2	18.5	20.1	23.8	32.2	30.3	29.8	31.6
18:3ω3	27.4	26.7	26.6	27.3	28.9	28.2	27.4	28.3	29.2	29.5	28.2
18:3ω6	0.2	1.4	0.3	0.3	0.4	0.2	0.5	0.0	0.5	0.4	0.6
20:0	1.6	1.4	1.3	1.4	1.2	1.4	1.4	1.8	2.1	1.9	2.0
18:4ω3	2.2	6.8	6.4	5.7	7.2	5.7	4.1	0.0	0.0	0.0	0.0
20:1d11	5.3	4.4	4.6	4.8	3.3	4.1	3.5	4.4	6.1	5.8	5.5
20:1iso	0.4	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.0	0.5	0.6	0.5	0.5
20:2ω6	0.8	0.8	0.9	0.8	0.6	0.8	0.7	1.3	1.5	1.4	1.4
20:3ω3	0.6	0.8	0.8	0.8	0.7	0.8	0.7	0.6	0.7	0.7	0.6
22:0	0.4	0.5	0.5	0.5	0.4	0.5	0.5	0.6	0.6	0.6	0.6
20:4ω3	0.2	0.3	0.3	0.3	0.4	0.4	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0
22:1	1.1	1.1	1.2	1.1	0.5	0.9	0.8	1.6	2.2	1.9	2.0
20:5ω3	0.7	1.3	1.6	1.5	1.6	1.1	1.7	0.0	0.0	0.0	0.1
22:2ω6	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.3	0.2	0.2

10

20

【表 7 - 2】

22:4ω6+22:3ω3	0.3	0.2	0.3	0.3	0.0	0.3	0.0	0.4	0.6	0.5	0.5
24:0	0.3	0.3	0.3	0.3	0.0	0.3	0.0	0.4	0.4	0.4	0.4
24:1	0.3	0.4	0.4	0.3	0.0	0.3	0.0	0.5	0.6	0.5	0.5
22:5ω3	0.3	1.1	1.2	1.1	1.1	0.9	0.8	0.0	0.0	0.0	0.0
22:6ω3	4.7	9.0	8.5	8.3	8.3	7.1	4.9	0.0	0.0	0.0	0.0

【表 8 - 1】

表 8. 表 7 に示すトランスジェニック種子の総種子脂質プロファイルから集めたデータ。表 7 の少量の脂肪酸は計算に含まれない。

パラメーター	FD5.46 プール	# 2	# 4	# 8	# 7	# 9	# 1	# 3	# 5	# 6	# 10
総 ω 3 (総 F A %)	36.1	46	45.4	45	48.2	44.2	40.1	28.9	29.9	30.2	28.9
総 ω 6 総 F A %)	25.8	20.4	20.7	20.3	19.5	21.1	25	33.7	32.6	31.8	33.8
ω 3 / ω 6 比	1.40	2.25	2.19	2.22	2.47	2.09	1.60	0.86	0.92	0.95	0.86
ω 6 / ω 3 比	0.71	0.44	0.46	0.45	0.40	0.48	0.62	1.17	1.09	1.05	1.17
総新 ω 3 (総 F A 中の%)	8.1	18.5	18	16.9	18.6	15.2	12	0	0	0	0.1
総新 ω 6 (総 F A 中の%)	1.1	2.2	1.2	1.1	1	1	1.2	1.5	2.3	2	2.2
novel ω 3 / ω 6 比	7.36	8.41	15.00	15.36	18.60	15.20	10.00				0.05
novel ω 6 / ω 3 比	0.14	0.12	0.07	0.07	0.05	0.07	0.10				22.00
OA から EPA の効率	8.2%	15.6%	15.5%	15.1%	15.1%	12.8%	10.5%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%
OA から DHA の効率	6.7%	12.3%	11.6%	11.5%	11.4%	10.0%	7.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
LA から EPA の効率	9.2%	17.2%	17.1%	16.7%	16.2%	13.9%	11.4%	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%
LA から DHA の効率	7.6%	13.6%	12.9%	12.7%	12.3%	10.9%	7.5%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
ALA から EPA の効率	15.8%	24.8%	24.9%	24.2%	22.8%	20.6%	18.5%	0.0%	0.0%	0.0%	0.3%
ALA から DHA の効率	13.0%	19.6%	18.7%	18.4%	17.2%	16.1%	12.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%

30

40

【表 8 - 2】

総飽和	17.6	17.8	17.8	17.6	18	17.8	18.1	18.2	17.7	17.8	18.1
総一価不飽和	19.8	15.5	16	16.6	14.3	16.6	16.8	18.7	19.3	19.6	18.6
総多価不飽和	62.5	66.6	66.4	65.6	67.7	65.6	65.1	63	63.1	62.5	63.2
総 C20	9.6	9.3	9.8	9.9	8.1	8.9	8.5	8.6	11	10.3	10.1
総 C22	5.4	10.3	10	9.7	9.4	8.3	5.7	0.6	0.9	0.7	0.7
C20/C22 比	1.78	0.90	0.98	1.02	0.86	1.07	1.49	14.33	12.22	14.71	14.43

【 0 3 1 6 】

50

この系統からのホモ接合種子を、T4世代で得た。全部のT4世代にわたって観察された平均7.3%のDHAであったイベントFD5-46-18-110で、10.3%までのDHAが産生された。その後の世代(T5)を、何世代かにわたって、PUFA産生、特に、DHAの安定性についてさらなる試験をするため確立した。プール種子DHA含有率が、複数トランスジェニック遺伝子座の存在のため、T4世代まで安定化されなかったにもかかわらず、観察された最大DHAレベルは、5世代目で安定であると分かった。T5種子バッチも、発芽効率または速度で明らかな差が観察されない親カメリナサティバ種子と並べて、インビトロMS培地上で発芽させた。トランスジェニック系統のさらなる世代(T6、T7世代、他)は、種子DHAレベルの低下を示さなかった。トランスジェニック植物は、完全に雌雄生殖能力があり、花粉は、野生型植物同様、約100%生存率を示した。異なるレベルのDHAを含む種子のオイル含有率の分析では、シロイヌナズナで見られた相関と対照的に、DHAレベルとオイル含有率との間の相関は確認されなかった。

10

【0317】

いくつかのさらなるトランスジェニック系統では、独立イベントからの単一種子のDHA含有率は12%を超えた。これらの系統のトランスジェニック：ヌル比は、おおよそ、3:1から15:1の間であると分かった。各構築物からのトップDHA試料の代表的脂肪酸プロファイルの分析で、他の新6PUFAは検出されず、1.2~1.4%のみのGLAであると分かった。対照的に、新3PUFA(SDA)、3LC-PUFA(ETA、EPA、DPA、DHA)は、総脂肪酸含有物の9.6%のDHAレベルで18.5%まで蓄積することが分かった。6-不飽和化は32%であり、EPAは総脂肪酸含有物の0.8%であった。5-エロンゲーション効率は93%であり、6-エロンゲーション効率は60%であった。GA7系統の極性種子脂質フラクション中でDHAを検出した。

20

【0318】

なお、観察された分離比(約3:1~約15:1)は、1つまたは、高々、2つのトランスジェニック遺伝子座がカメリナサティバの魚オイルの様なDHAレベルを産生するのに必要であることを示した。このことは、トランスジェニックの体質を導入遺伝子の安定性だけでなく繁殖できる容易さについて重要な意味を有する。

【0319】

ホモ接合種子を、合計600以上の個々の植物を生成するため、いくつかの温室にわたって植え付けた。ソックスレー、アセトン及びヘキサン抽出を含む様々な方法を用いて、種子からオイルを抽出した。

30

【0320】

TAGの3LC-PUFAの位置分布を決定するため、トランスジェニックカメリナサティバ種子オイルに対して、¹³C NMR位置特異性分析を行った。おおよそ等しいEPA及びDHAでのイベントを、これらの脂肪酸に対する応答を最大にするため選択し、sn-2に対するsn-1,3の比が、EPAについて0.75:0.25であり、DHAについて0.86:0.14であり、偏りが無い分布は0.66:0.33であろうと分かった。すなわち、EPA75%及びDHA86%が、TAGのsn-1,3位に位置していた。このことは、EPAの優先度は、DHAより弱い、両方の脂肪酸は、カメリナサティバTAGのsn-1,3位に優先的に位置することを示した。DHAがsn-1,3位に優先的に見られたという発見は、シロイヌナズナの種子で以前に報告された結果と類似していた(Petrieら、2012)。

40

【0321】

少数の独立トランスジェニック系統が上記形質転換実験で得られたので、さらなるカメリナサティバ形質転換を、GA7-modB構築物を用いて行った(実施例4)。より多くの形質転換体を得て、20.1%を超えるDHAを産生するホモ接合系統を確認した。

【0322】

実施例4. 植物種子内のDHAをコードするT-DNAの修飾経路

50

WO2013/185184に記載のレベルを超えるアブラナのDHA産生レベルを改善するため、バイナリーベクターpJP3416-GA7-modA、pJP3416-GA7-modB、pJP3416-GA7-modC、pJP3416-GA7-modD、pJP3416-GA7-modE及びpJP3416-GA7-modFを、WO2013/185184に記載の通り構築し、トランスジェニック植物で試験した。これらのバイナリーベクターは、実施例2に記載のpJP3416-GA7構築物の変異体であり、特に、6-デサチュラーゼ及び6-エロンガーゼ機能の改良により、植物種子内のDHA合成をさらに増加するように設計した。SDAは、5-エロンガーゼと比較して、比較的低い6-エロンガーゼ効率のによってGA7構築物で形質転換されたいくつかの種子内に蓄積されるので、他の修飾の中で、2つのエロンガーゼ遺伝子位置をT-DNA中にスイッチすることが観察された。

10

【0323】

pJP3416-GA7中で配列をコードする2つのエロンガーゼを、T-DNAのこれらの位置でスイッチし、ピラモナス・コルダタ5-エロンガーゼカセットを置換するためにpJP3416-GA7のSbf1部位間の新ピラモナス・コルダタ6-エロンガーゼカセットを先ずクローニングすることにより、pJP3416-GA7-modAを得た。この構築物を、コンリニンCn12プロモーター(pLucn12)でミクロモナス・プシーラ6-デサチュラーゼを駆動するFP1プロモーターを交換して、pJP3416-GA7-modBを得ることによりさらに修飾した。6-デサチュラーゼ発現、それにより、酵素効率を増加する試みで、この修飾を行った。Cn12プロモーターは、短縮化ナピンプロモーターより、セイヨウアブラナの導入遺伝子のより高い発現を得る可能性があるはずである。

20

【0324】

8つのトランスジェニックpJP3416-GA7-modBシロイヌナズナイベント及び15のトランスジェニックpJP3416-GA7-modGシロイヌナズナイベントを作成した。プールされたpJP3416-GA7-modB種子内の3.4%から7.2%の間のDHAを観察し、プールされたT2pJP3416-GA7-modG種子内の0.6から4.1%の間のDHAを観察した。最も高いpJP3416-GA7-modBイベントのいくつかを、選択培地上に播種し、生存苗を次世代まで生育した。種子をDHA含有率について分析する。プールされたT1種子は、導入遺伝子について分離している集団を表し、いずれかのヌル分離個体を含んでいたため、子孫植物のホモ接合種子が、種子オイル中の総脂肪酸含有物の30%まで、DHAレベルを増加したはずだと期待される。他の修飾された構築物を、シロイヌナズナを使用して形質転換した。少数のみの形質転換系統を得たにもかかわらず、modB構築物より高いレベルのDHAを得るものはなかった。

30

【0325】

pJP3416-GA7-modB構築物も、品種オスカー及びNX002、NX003、NX005、NX050、NX052及びNX054と命名された一連の育成系統の形質転換セイヨウアブラナ植物を使用して作成した。オスカー形質転換のための77独立形質転換植物(T0)、及びFAD2遺伝子中の突然変異の効果によってその種子オイル中の高オレイン酸含有率を有する系統であるNX005のための189を含む育成系統のための1480独立植物を含む1558形質転換植物全体を得た。他の育成系統はより高いレベルのLA及びALAを有した。デジタルPCR法により決定するとき、T-DNAの4つより多いコピーを示すトランスジェニック植物(実施例1)を引抜き；T0植物の約25%をこの判断基準により処分した。T0トランスジェニック植物の約53%は、デジタルPCR法により決定するとき、T-DNAの1つまたは2つのコピーを有し、12%は約3つのコピー、24%は、4つ以上のコピーを有した。種子(T1種子)を、自家受粉後、約450のトランスジェニック系統から収穫し、異系交配を避けるために、開花中植物に袋掛けすることにより行った。T1種子を、成熟したとき、トランスジェニック植物の残りから収穫した。約1~2%の植物系統は、雄または雌繁殖不能のいずれかであ

40

50

り、生存可能な種子を産生せず、T 0 植物を処分した。

【 0 3 2 6 】

種子のプール（各ボールで20のT 1 種子）を、プールされた種子オイル中のD H A レベルについて試験し、最も高いレベルを示す系統を選択した。特に、プールされたT 1 種子内の総脂肪酸含有物の少なくとも2 %のD H A 含有率を有する系統を選択した。約15 %のトランスジェニック系統をこの方法で選択し；その他の85 %を処分した。これらのいくつかを系統C T 1 3 2 - 5（品種オスカー）、C T 1 3 3 - 1 5、- 2 4、- 6 3、- 7 7、- 1 0 3、- 1 2 9 及び- 1 3 0（N X 0 0 5）と命名した。N X 0 5 0の選択系統は、C T 1 3 6 - 4、- 8、- 1 2、- 1 7、- 1 9、- 2 5、- 2 7、- 4 9 及び- 5 1を含んだ。C T 1 3 2 . 5を含む選択系統の20種子及びC T 1 3 3 . 1 5の11種子を浸し、2日後、各個々の種子からの半分の子葉からオイルを抽出した。胚軸を含む他の半分の子葉を残し、特異子孫系統を維持するために培地で培養した。オイル中の脂肪酸組成を決定した；データをC T 1 3 2 . 5について表9に示す。分析した20種子のうち10のD H A レベルは、G C 分析により測定して、総脂肪酸含有物の7 ~ 20 %の範囲であった。他の種子は、7 %未満のD H A を含み、p J P 3 4 1 6 - G A 7 - m o d B からのT - D N A の部分（不完全）コピーを含んでいた可能性がある。トランスジェニック系統は、遺伝的に結合していない複数の導入遺伝子インサクションを含むように思われた。トランスジェニック系統C T 1 3 3 . 1 5の種子は、0 ~ 5 %の範囲のD H A レベルを示した。D H A を含まない種子は、ヌル分離個体であるようであった。これらのデータは、m o d B 構築物がキャノーラ種子内のD H A 産生に対して十分に性能を発揮することを確認した。

【 0 3 2 7 】

選択された形質転換系統から自家受粉後に各複数のT 1 植物から得られた20または40の個々の種子（T 2 種子）を、脂肪酸組成について個別に試験した。20 %より大きいレベルでD H A を含む種子を同定した（表10）。2つの代表的試料、C T 1 3 6 - 2 7 - 1 8 - 2 及びC T 1 3 6 - 2 7 - 1 8 - 1 9は、それぞれ、21 . 2 %及び22 . 7 %のD H A を含んでいた。これらの種子内の総 3 脂肪酸含有率は、総脂肪酸含有物中のパーセントで約60 %であり、 6 含有率は10 %未満であった。さらに、各T 1 植物の20または40のT 2 種子のセットを、脂肪酸組成について試験した。個々のT 2 種子の種子オイルの総脂肪酸含有物中のD H A レベルについての代表的データを図10に示す。34 . 3 %までのD H A を含む種子を、例えば、種子C T 1 3 6 - 2 7 - 4 7 - 2 5で確認した（表12）。C T 1 3 6 - 2 7 - 4 7 - 2 5から得られた種子オイルの脂肪酸組成を表12に示す。脂肪酸組成は、D P A 約1 . 5 %、E P A 0 . 6 %及びE T A 0 . 5 %と一緒にD H A 34 . 3 %を含んでいた。S D A レベルは約7 . 5 %であり、A L A は約21 . 9 %、L A は約6 . 9 %であった。新 6 P U F A はG L A 1 . 1 %を示したが、6 - C 2 0 も - C 2 2 L C - P U F A も検出されなかった。総飽和脂肪酸：9 . 6 %；一価不飽和脂肪酸、12 . 5 %；総P U F A、75 . 2 %；総 6 - P U F A（L A を含む）、7 . 2 %；総 3 - P U F A、66 . 9 %；総 6：3 脂肪酸の比、9 . 3：1；新 6：新 3 脂肪酸、37：1。オレイン酸からD H A への各酵素工程の効率は以下であった：12 - デサチュラーゼ、90 %；15 / 3 - デサチュラーゼ、89 %；6 - デサチュラーゼ、67 %；6 - エロンガーゼ、83 %；5 - デサチュラーゼ、99 %；5 - エロンガーゼ、98 %；4 - デサチュラーゼ、96 %。オレイン酸からD H A への転換の全体効率は約50 %であった。従って、種子オイルの総脂肪酸含有物の20 . 1 ~ 35 %の範囲でD H A を産生する種子が、総脂肪酸含有物中の20 . 1 %から30 %の間のD H A または30 %から35 %の間のD H A を含む種子を含み確認され、選択されるとは明白であった。

【 0 3 2 8 】

いくつかの種子内のオイル含有率は、野生型種子の約44 %から、D H A 産生種子のいくつかの約31 ~ 39 %まで低下するが、他のD H A 産生種子の野生型レベルと同様であった。

【 0 3 2 9 】

T 2 種子の少なくとも 1 0 % のレベルで D H A を産生する様々な形質転換植物系統を交配し、複数の T - D N A インサクションに対してホモ接合である F 2 子孫を産生するため、F 1 子孫を自家受粉させた。ホモ接合種子からの種子オイルを分析し、種子オイル中の 3 0 % までまたは 3 5 % の総脂肪酸含有物は D H A である。

【 0 3 3 0 】

C T 1 3 6 - 2 7 - 1 8 - 2 及び C T 1 3 6 - 2 7 - 1 8 - 1 9 から得られたオイル中の T A G を、T A G 分子のグリセロール骨格上の D H A の位置分布について、¹3 C N M R 位置特異性アッセイにより分析した。D H A は、s n - 1 , 3 位において優先的に結合していた。D H A の 7 0 % より多く、実際、9 0 % より多くが、s n - 1 , 3 位であった。

10

【 0 3 3 1 】

いくつかのさらなるトランスジェニック系統では、独立イベントからの単一種子の D H A 含有率は 1 2 % を超えた。これらの系統のトランスジェニック：ヌル比は、1 つのトランスジェニック遺伝子座に対応して約 3 : 1 であり、2 つのトランスジェニック遺伝子座に対応して 1 5 : 1 であることが分かった。最も高いレベルの D H A を有する各構築物からの試料の代表的脂肪酸プロファイルの分析では、新 6 P U F A を含まず、1 . 2 ~ 1 . 4 % のみの G L A が検出された。対照的に、新 3 P U F A (S D A) 及び 3 L C - P U F A (E T A , E P A , D P A , D H A) は、G A 7 - 形質転換種子について 1 8 . 5 % と比較して、m o d F 構築物について 2 5 . 8 % 及び m o d G 構築物について 2 1 . 9 % の合計を蓄積した。これらの種子のオイル中の D H A レベルは、それぞれ、9 . 6 % 、1 2 . 4 % 及び 1 1 . 5 % であった。6 - 不飽和化は、m o d F - 及び m o d G - 形質転換種子より G A 7 - 形質転換種子で低く (3 2 % 対 4 7 % 及び 4 3 %) 、これにより、G A 7 と比較して、m o d F 及び m o d G 内の A L A の低下をもたらすことが分かった。別の注目すべき差は、m o d F 種子内の E P A の蓄積であり (他の 2 つのトランスジェニック種子内で 3 . 3 % 対 0 . 8 %) 、これは、G A 7 及び m o d G 種子 (9 3 % 及び 9 4 %) と比較して、m o d F (8 0 %) 種子内で観察された 5 - エロンゲーションの低下に反映された。わずかにより活性な 6 - 不飽和化によって、S D A 量が実際に増加したが、これらの種子内の 6 - エロンゲーションのわずかな増加 (6 6 % 対 6 0 % 及び 6 1 %) があった。D H A を、G A 7 系統の極性種子脂質フラクションで検出した。

20

30

【 0 3 3 2 】

m o d B 構築物の T - D N A で形質転換されたセイヨウアブラナ育成系統 N X 5 4 の 7 0 の独立トランスジェニック植物の T 1 種子内の脂質の脂肪酸組成物を分析した。これらのトランスジェニック植物の 1 つが、種子オイル中に D P A を含むが、D H A を含まない種子を産生することが観察された。この系統 (C T - 1 3 7 - 2) の T 1 種子は、T 1 プール種子内に検出可能な D H A を含まないで、D P A 約 4 % を産生した。本発明者らは、このことは、たぶん、自然な突然変異により、その特定の挿入 T - D N A 中の 4 - デサチュラーゼ遺伝子の不活性化が原因であると結論した。このトランスジェニック系統からの約 5 0 の T 1 種子を発芽させ、各々からの 1 つの発生した子葉を、残りのオイル中の脂肪酸組成について分析した。それから、5 % より多い D P A を示す選択された苗を成熟するまで生育し、T 2 種子を収穫した。プール種子脂肪酸組成を、表 1 1 に示し、7 % より多い D P A を、これらの系統で観察した。

40

【 0 3 3 3 】

この実験の焦点が油料種子作物種内の D H A 産生の実証であった一方、上記の差は、構築物設計展望からも興味があった。最初、m o d F 構築物中の 6 - 及び 5 - エロンゲーション領域位置のスイッチは、より低い 5 - エロンゲーションのために蓄積されたより多い E P A を含む意図されたプロファイル変化をもたらした。6 - エロンゲーションの同時増加が観察されたが、これは、より低い S D A レベルをもたらさなかった。これは、より高活性なアマコンリニン 2 プロモーターによる短縮化ナピンプロモーター (F P 1) の置換だけでなく、余分にミクロモナス・ブシーラ 6 - デサチュラーゼ発現カセッ

50

トの付加により引き起こされた、mod F 形質転換種子内の 6 - 不飽和化の増加に起因した。mod G 構築物で観察された 6 - 不飽和化のいくらか低い増加は、GA7 中の高発現 5 - エロンガーゼカセットの利用に起因した。6 - デサチュラーゼ及び 5 - エロンガーゼコード領域の位置のスイッチは、より大きな 6 - 不飽和化をもたらした。Cn12 プロモーターによる FP1 プロモーターの置換によって、この場合では、5 - エロンガーゼ活性は減少しなかった。

【0334】

これらのデータは、mod B、mod F 及び mod G 構築物が、アラビドプシス属及びセイヨウアブラナのように、カメラナ種子内の DHA 産生に対して良い結果を出した。

【0335】

本発明者らは、概して、DHA 経路の律速酵素活性の効率が、単一コピー T - DNA 形質転換体と比較して、多コピー T - DNA 形質転換体でより大きくあり得る、または経路内で限定され得る酵素をコードする T - DNA 同義遺伝子中への挿入により増加し得ると考えた。多コピー形質転換体の可能性ある重要性に対する証拠は、GA7 構築物で形質転換されたアラビドプシス属種子内で見られ（実施例 2）、最高収率の DHA イベントは、宿主ゲノム中に挿入された 3 種の T - DNA を有した。同義遺伝子は同じであり得る、または、好適に、同じポリペプチドをコードする異なる変異体である、または重複する発現パターンを有する異なるプロモーターの制御下にある。例えば、同じタンパク質が産生される場合でも、多重 6 - デサチュラーゼコード領域の発現により、増加した発現を達成できるはずである。pJP3416 - GA7 - mod F 及び pJP3416 - GA7 - mod C では、例えば、ミクロモナス・プシーラ 6 - デサチュラーゼの 2 つの変化形が存在し、異なるプロモーターにより発現された。コード配列は、異なるコドン使用頻度、従って、異なるヌクレオチド配列を有し、可能性のあるサイレンシングまたは同時抑制効果を減少させたが、同じタンパク質の産生をもたらした。

【表 9】

表 9. mod B 構築物を含む発芽 T1 トランスジェニックセイヨウアブラナ種子の半子葉の脂肪酸プロファイル。18.1% までの DHA を、10% より多い DHA を含む多数の試料で観察した。

種子	14:0	16:0	16:1d3?	16:1	16:3	18:0	18:1	18:1d11	18:2	18:3n6	18:3n3	20:0	18:4n3	C20:1d1	20:1d13	C20:2n6	C20:3n3	C22:0	20:4n3	20:5n3	22:3n3	C24:0	C24:1	22:5n3	C22:6n3
1	0.1	4.2	0.1	0.1	0.2	1.8	29.9	2.5	9.9	0.1	38.4	0.5	0.8	1.0	0.0	0.1	2.1	0.3	2.8	0.3	0.1	0.2	0.2	0.5	3.9
2	0.1	4.7	0.1	0.1	0.2	4.0	23.0	2.3	7.4	0.3	29.3	1.0	4.3	1.1	0.0	0.1	1.9	0.4	6.9	1.0	0.0	0.3	0.1	1.7	9.5
3	0.1	3.7	0.2	0.1	0.2	1.8	55.1	1.9	4.7	0.2	15.2	0.8	1.8	1.4	0.0	0.1	0.3	0.5	11.3	0.0	0.0	0.3	0.2	0.0	0.0
4	0.1	4.6	0.2	0.2	0.2	2.9	22.1	1.8	6.6	0.4	26.5	1.0	7.2	1.0	0.0	0.1	0.8	0.5	11.2	1.9	0.0	0.2	0.2	1.7	8.7
5	0.1	4.0	0.1	0.1	0.2	1.7	27.4	2.1	8.1	0.3	26.4	0.6	2.8	1.0	0.0	0.1	1.5	0.3	7.6	1.5	0.0	0.1	0.1	1.8	12.2
6	0.1	3.5	0.1	0.1	0.2	1.6	59.8	2.0	4.3	0.1	18.5	0.6	0.5	1.3	0.0	0.0	0.7	0.3	6.0	0.0	0.0	0.2	0.1	0.0	0.0
7	0.1	6.0	0.3	0.3	0.3	1.7	16.6	2.6	23.9	1.0	23.2	0.6	5.4	0.8	0.0	0.2	0.6	0.4	2.6	1.1	0.0	0.3	0.3	1.7	9.9
8	0.1	4.9	0.1	0.1	0.2	2.7	12.9	1.4	11.7	0.3	34.3	0.9	5.0	0.9	0.0	0.2	2.4	0.5	4.1	1.3	0.0	0.2	0.2	1.8	13.8
9	0.1	3.9	0.1	0.1	0.1	2.4	41.6	1.7	21.5	0.0	23.4	0.7	0.0	1.2	0.0	0.1	2.2	0.4	0.0	0.0	0.1	0.3	0.2	0.0	0.0
10	0.1	3.7	0.2	0.1	0.1	2.1	30.9	1.7	19.2	0.4	23.6	0.7	2.1	1.1	0.0	0.1	1.5	0.4	3.6	0.6	0.0	0.2	0.1	0.7	6.9
11	0.1	5.7	0.4	0.3	0.2	3.8	41.2	2.4	26.7	2.1	7.2	1.3	0.3	1.2	0.0	0.2	0.3	0.8	4.8	0.0	0.0	0.6	0.3	0.0	0.0
12	0.1	4.6	0.0	0.1	0.2	2.4	25.5	1.7	16.1	0.3	28.9	0.8	3.9	1.1	0.0	0.1	1.9	0.4	3.9	0.6	0.0	0.2	0.0	1.1	6.2
13	0.1	4.3	0.1	0.1	0.1	4.2	19.4	1.6	9.2	0.1	45.5	1.0	0.2	1.1	0.0	0.1	5.2	0.4	2.6	0.3	0.2	0.2	0.1	0.4	3.4
14	0.1	6.3	0.2	0.2	0.2	4.0	10.5	2.3	8.4	0.3	31.1	1.3	3.9	0.8	0.0	0.1	2.3	0.6	4.6	1.8	0.1	0.3	0.2	2.5	18.1
15	0.1	5.1	0.1	0.2	0.2	3.3	16.8	2.4	11.2	0.3	28.8	1.0	4.5	0.9	0.0	0.1	2.1	0.6	3.2	1.5	0.1	0.3	0.1	1.8	15.1
16	0.1	4.4	0.1	0.1	0.2	4.0	16.2	1.5	11.6	0.2	33.5	0.9	2.8	1.1	0.0	0.2	3.7	0.4	4.6	0.7	0.1	0.3	0.1	1.3	12.1
17	0.2	7.2	0.2	0.2	0.2	4.9	15.0	2.1	8.9	0.3	25.9	1.4	5.1	0.9	0.0	0.0	1.6	0.8	4.9	2.1	0.0	0.6	0.3	2.2	15.0
18	0.1	4.0	0.1	0.1	0.2	2.3	64.8	1.2	7.2	0.1	12.5	1.0	3.5	1.5	0.0	0.1	0.0	0.7	0.0	0.0	0.5	0.2	0.0	0.0	0.0
19	0.1	3.9	0.1	0.1	0.2	4.6	36.9	1.7	7.1	0.2	28.6	1.2	1.8	1.2	0.0	0.1	1.4	0.5	4.3	0.4	0.0	0.4	0.1	0.8	4.3
20	0.1	4.8	0.1	0.1	0.2	6.0	18.5	1.2	12.8	0.2	34.8	1.4	2.4	1.1	0.0	0.1	3.4	0.6	3.2	0.4	0.1	0.3	0.1	0.7	7.6

【表 10 - 1】

表 10. mod B 構築物を含む T2 トランスジェニックセイヨウアブラナ種子の半子葉の脂肪酸プロファイル。

試料 (T2種子)	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:1d11	C18:2	C18:3n6	C18:3n3	18:4n3	C20:1d11	C20:2n6	C20:3n3	20:4n3	20:5n3	22:5n3	C22:6n3	総ω3 (%)	総ω6 (%)	比ω6からω3	総PUFA含有率(%)
CT136-27-18-1	0.1	5.0	2.6	25.4	3.6	6.7	0.2	37.5	1.4	1.0	0.1	2.1	0.8	0.4	0.9	10.2	53.4	7.1	0.13	60.5
CT136-27-18-2	0.2	7.1	2.8	16.9	4.3	5.5	0.4	29.1	5.4	0.8	0.1	1.2	0.5	0.5	1.9	21.2	59.8	6.1	0.10	66.0
CT136-27-18-3	0.1	5.4	2.5	26.5	3.8	6.4	0.4	26.4	4.7	1.0	0.1	0.7	1.1	0.6	1.2	17.3	52.0	6.9	0.13	58.9
CT136-27-18-4	0.1	5.3	2.4	34.7	4.0	5.9	0.3	30.3	1.3	1.1	0.1	1.1	1.5	0.3	0.4	9.3	44.4	6.3	0.14	50.7
CT136-27-18-5	0.1	4.8	2.7	34.5	3.8	5.6	0.3	23.5	3.9	1.2	0.1	0.7	1.1	0.5	1.1	14.2	45.1	6.0	0.13	51.1
CT136-27-18-6	0.1	5.0	2.1	54.3	3.8	5.7	0.2	18.2	0.6	1.5	0.1	1.1	0.7	0.1	0.2	4.4	25.5	6.1	0.24	31.5
CT136-27-18-7	0.1	5.3	2.1	43.8	4.2	5.6	0.4	18.3	2.2	1.3	0.2	0.6	1.5	0.4	0.5	11.6	35.2	6.2	0.18	41.4
CT136-27-18-8	0.1	5.4	2.7	25.8	4.1	6.7	0.4	26.6	5.7	1.0	0.1	0.6	1.3	0.6	1.2	15.8	51.9	7.1	0.14	59.0
CT136-27-18-9	0.1	4.6	1.6	53.8	3.7	17.5	0.5	9.2	0.5	1.6	0.3	0.6	0.4	0.1	0.1	3.7	14.5	18.3	1.26	32.8
CT136-27-18-10	0.1	4.8	2.4	44.1	3.7	5.4	0.4	19.1	2.3	1.1	0.1	0.6	1.5	0.5	0.8	11.4	36.1	5.9	0.16	42.0
CT136-27-18-11	0.1	5.1	2.2	48.3	4.1	10.9	0.7	12.5	1.2	1.3	0.2	0.5	1.5	0.3	0.3	9.1	25.3	11.8	0.47	37.1
CT136-27-18-12	0.1	5.3	2.7	23.3	3.7	6.0	0.4	27.9	4.9	0.9	0.1	0.7	1.3	0.8	1.5	18.5	55.7	6.6	0.12	62.2
CT136-27-18-13	0.1	5.5	3.4	30.7	5.6	5.1	0.4	23.1	3.5	1.1	0.1	1.2	1.1	0.6	1.2	14.9	45.8	5.5	0.12	51.3
CT136-27-18-14	0.1	5.4	2.3	23.9	3.5	6.0	0.4	30.1	3.7	1.0	0.1	1.0	0.7	0.6	1.2	18.2	55.5	6.6	0.12	62.1
CT136-27-18-15	0.1	5.0	2.3	45.4	4.0	5.3	0.4	16.2	2.3	1.2	0.1	0.5	1.9	0.6	0.7	12.3	34.4	5.8	0.17	40.3
CT136-27-18-16	0.1	4.8	2.7	37.9	4.1	6.2	0.4	22.0	2.4	1.0	0.1	0.7	1.4	0.5	0.8	13.1	41.0	6.7	0.16	47.7
CT136-27-18-17	0.1	4.5	2.3	38.8	3.3	7.6	0.3	26.8	0.9	1.4	0.2	1.6	0.9	0.2	0.7	8.6	39.9	8.0	0.20	47.9
CT136-27-18-18	0.1	5.1	2.3	29.0	3.6	5.7	0.4	26.5	3.8	1.1	0.2	0.8	0.8	0.6	1.0	17.4	50.8	6.3	0.12	57.1
CT136-27-18-19	0.1	5.8	2.3	19.7	4.2	6.7	0.7	23.7	7.7	0.9	0.1	0.4	0.7	0.6	1.7	22.7	57.6	7.5	0.13	65.1
CT136-27-18-20	0.1	5.7	2.9	23.2	4.0	5.6	0.3	35.8	2.4	1.0	0.1	1.3	1.1	0.5	1.0	13.0	55.1	6.1	0.11	61.2

10

20

【表 10 - 2】

ARA (C20:4ω6) はいずれの試料からも検出されなかった。試料は約 0.2% または 0.3% の C16:1、約 0.1~0.3% の C16:3、約 0.7% から 1.0% の間の C20:0、約 0.3% の C22:0 を含有し、いくつかの試料は微量レベル (< 0.1%) の C20:1Δ13、C22:3ω3、C24:0 及び C24:1 を含有していた。

【表 11】

表 11. Δ4-デサチュラーゼ遺伝子中の推定される突然変異を有する mod B 構築物の T-DNA で形質転換された T2 トランスジェニックセイヨウアブラナ種子内の脂質の脂肪酸組成。脂質は、約 0.1% の 14:0、0.2% の 16:3、0.2~0.4% の GLA、0.1% の 20:1Δ13、0.3~0.4% の 22:0 も含有し、16:2 及び 22:1 は検出しなかった。

	16:0	16:1ω13t	16:1	18:0	18:1	18:1d11	18:2	18:3n3	20:0	18:4n3	20:1d11	20:2n6	20:3n6	20:4n6	20:3n3	20:4n3	20:5n3	22:2n6	22:3n3	24:0	24:1	22:5n3	22:6n3
CT-137-2-34	5.3	0.0	0.2	3.7	26.8	3.1	12.4	29.1	0.8	2.5	0.8	0.1	0.0	0.0	1.1	1.7	0.8	0.0	0.1	0.1	0.1	10.0	0.0
CT-137-2-38	5.3	0.0	0.2	4.2	24.4	3.0	12.6	29.4	0.9	2.5	0.8	0.1	0.0	0.0	1.3	2.2	0.9	0.0	0.1	0.2	0.1	10.8	0.0
CT-137-2-48	5.0	0.0	0.2	4.2	24.1	3.1	11.9	31.0	0.9	2.4	0.9	0.1	0.0	0.0	1.5	2.0	1.0	0.0	0.1	0.1	0.1	10.5	0.0
CT-137-2-51	5.7	0.0	0.2	4.6	22.3	3.4	12.3	34.5	1.0	2.0	0.8	0.1	0.0	0.0	1.9	1.2	0.5	0.0	0.1	0.2	0.2	7.9	0.0
CT-137-2-59	5.4	0.0	0.2	3.9	25.7	3.4	12.9	27.8	0.9	2.6	0.8	0.1	0.0	0.0	1.0	1.9	0.9	0.0	0.1	0.2	0.1	11.0	0.0

30

【表 12】

表 12. GA7-mod B の T-DNA で形質転換されたセイヨウアブラナの T2 種子の種子オイルの脂肪酸組成。

C16:0	C18:0	C18:1n9	C18:1n7	C18:2n6	C18:3n6	C18:3n3	C20:0	C18:4n3	C20:1n9c	C20:2n6 + C21:0	C20:3n3	C20:4n3	C20:5n3	C22:5n6	C22:5n3	C22:6n3
6.3	2.4	8.4	3.1	6.9	1.1	21.9	0.7	7.5	0.7	0.1	0.5	0.5	0.6	0.2	1.5	34.3

種子オイル試料は、0.1% の C14:0；0.2% の C16:1；0.1% の C20:3ω6 も含有し；C22:1 及び C22:2 ω6 を含有せず；0.1% の C24:0 及び 0.2% の C24:1、2.6% の他の脂肪酸も含有していた。

【0336】

実施例 5. DHA を産生するトランスジェニックシロイヌナズナ種子の TAG の分析

50

形質転換シロイヌナズナ種子のTAG上のDHAの位置分布を、NMRにより測定した。総脂質を、ヘキサン10mLを含むガラスチューブに粉碎種子を移動する前に、ヘキサン下に、種子を先ず粉碎することにより約200mgの種子から抽出した。チューブを水浴で約55℃に温めて、それから、ボルテックスして遠心分離した。ヘキサン溶液を取り出し、さらに4×10mLでこの手順を繰り返した。抽出物を合わせて、ロータリーエバポレーターで濃縮し、抽出脂質中のTAGを、20mLのヘキサン中7%ジエチルエーテルを用いて、短いシリカカラムを通過させることにより極性脂質から分離して精製した。精製TAG上のアシル基位置分布を前述のように定量的に測定した(Petrieら、2010a及びb)。

【0337】

分析は、総種子オイル中のDHAの大部分がTAGのsn-1/3位に位置しており、sn-2位においてはほとんど見られなかったことを示した(図5)。このことは、ARA(20:4 Δ 5,8,11,14)の50%がトランスジェニックキャノーラオイルのsn-2位に位置する一方、33%のみランダムな分布で期待されることを示したARA産生種子からのTAGと対照的であった(Petrieら、2012)。

【0338】

トランスジェニックシロイヌナズナ種子の総脂質を、主要なDHA含有トリアシルグリセロール(TAG)化学種を測定するため、トリプル四重極LC-MSによっても分析した(図6)。最も豊富なDHA含有TAG化学種は、DHA-18:3-18:3(TAG58:12;位置分布を表現できない命名法)であり、2番目に最も豊富なのはDHA-18:3-18:2(TAG58:11)であることが分かった。トリDHA TAG(TAG66:18)を、たとえ低くても、検出可能レベルで、総種子オイル中に観察された。他の主要DHA含有TAG種は、DHA-34:3(TAG56:9)、DHA-36:3(TAG58:9)、DHA-36:4(TAG58:10)、DHA-36:7(TAG58:13)及びDHA-38:4(TAG60:10)を含んでいた。2つの主要DHA含有TAG種を、Q-TOF MS/MSによりさらに確認した。

【0339】

実施例6. オイルのステロール含有量及び組成のアッセイ

オーストラリアの商業的給源から購入した12種の植物オイルからのフィトステロールは、実施例1に記載のO-トリメチルシリルエーテル(OTMSi-エーテル)誘導体としてGC及びGC-MSにより特徴付けられた。ステロールを、保持データ、質量スペクトル解析及び文献と実験標準質量スペクトルデータとの比較により同定した。ステロールを5(H)-コラン-24-オール内部標準の使用により定量化した。同定されたステロールのフィトステロール基本構造及び化学構造を、図7及び表13に示す。

【0340】

分析された植物オイルは：ゴマ(*Sesamum indicum*)、オリーブ(*Olea europaea*)、ヒマワリ(*Helianthus annuus*)、ヒマ(*Ricinus communis*)、セイヨウアブラナ(*Brassica napus*)、ベニバナ(*Carthamus tinctorius*)、ピーナッツ(*Arachis hypogaea*)、アマ(*Linum usitatissimum*)及びダイズ(*Glycine max*)からであった。オイル試料全部にわたって、相対的存在比の減少では、主要フィトステロールは： Δ 5-シトステロール(総ステロール含有物中28~55%の範囲)、 Δ 5-アベナスステロール(イソフコステロール)(3~24%)、カンペステロール(2~33%)、 Δ 5-スチグマステロール(0.7~18%)、 Δ 7-スチグマステロール(1~18%)及び Δ 7-アベナスステロール(0.1~5%)であった。いくつかの他の少量ステロールを同定し、これらは：コレステロール、ブラシカステロール、カリナスステロール、カンペスタノール及びエブリコールであった。4種のC29:2及び2種のC30:2ステロールも検出されたが、これらの少量成分の同定を完了するには、さらなる調査が必要である。加えて、いくつかの他の同定されたステロールは、オイルのいくつか中に存在したが、その非常に低存在量のために、質量スペクトルは、そ

10

20

30

40

50

の構造を同定するには十分な強度でなかった。

【表 1 3】

表 1 3. 同定ステロール類の IUPAC/系統名。

ステロール番号	慣用名	IUPAC/系統名
1	コレステロール	コレスタ-5-エン-3 β -オール
2	ブラシカステロール	24-メチルコレスタ-5, 22E-ジエン-3 β -オール
3	カリナステロール/24-メチレンコレステロール	24-メチルコレスタ-5, 24(28)E-ジエン-3 β -オール
4	カンペステロール/24-メチルコレステロール	24-メチルコレスタ-5-エン-3 β -オール
5	カンペスタノール/24-メチルコレスタノール	24-メチルコレスタ-3 β -オール
7	Δ 5-スチグマステロール	24-エチルコレスタ-5, 22E-ジエン-3 β -オール
9	エルゴスタ-7-エン-3 β -オール	24-メチルコレスタ-7-エン-3 β -オール
11	エブリコール	4, 4, 14-トリメチルエルゴスタ-8, 14(28)-ジエン-3 β -オール
12	β -シトステロール/24-エチルコレステロール	24-エチルコレスタ-5-エン-3 β -オール
13	D5-アベナステロール/イソフコステロール	24-エチルコレスタ-5, 24(28)Z-ジエン-3 β -オール
19	D7-スチグマステロール/スチグマスト-7-エン-3 β -オール	24-エチルコレスタ-7-エン-3 β -オール
20	D7-アベナステロール	24-エチルコレスタ-7, 24(28)-ジエン-3 β -オール

【0341】

減少量のオイルmg/gとして表現したステロール含有量は：キャノーラオイル（6.8mg/g）、ゴマオイル（5.8mg/g）、アマオイル（4.8~5.2mg/g）、ヒマワリオイル（3.7~4.1mg/g）、ピーナッツオイル（3.2mg/g）、ベニバナオイル（3.0mg/g）、ダイズオイル（3.0mg/g）、オリーブオイル（2.4mg/g）、ヒマシオイル（1.9mg/g）であった。ステロール組成%及び総ステロール含有率を表14に示す。

【0342】

全ての種子オイル試料の中で、主要フィトステロールは、概して、 β -シトステロールであった（総ステロール含有物の30~57%の範囲）。他の腫瘍ステロール：カンペステロール（2~17%）、 Δ 5-スチグマステロール（0.7~18%）、 Δ 5-アベナステロール（4~23%）、 Δ 7-スチグマステロール（1~18%）の割合のオイルの中で広範囲であった。異なる種のオイルは、全く異なるプロファイルを有するいくつかを含む異なるステロールプロファイルを有した。キャノーラオイルの場合、カンペステロールの最も高い比率（33.6%）を有したが、他種の試料は、概して、ピーナッツオイル中、例えば、17%までの低レベルを有した。ベニバナオイルは、比較的高い割合の Δ 7-スチグマステロール（18%）を有したが、このステロールは、ヒマワリオイル中9%まで、他種オイル中、通常低かった。それらは、各種について特徴的であったので、従っ

て、ステロールプロファイルを特異的植物 (vegetable) または植物 (plant) オイルの同定の助け及びその真実性または他のオイルによる不純物混和のチェックのため使用できる。

【 0 3 4 3 】

種子の冷間圧縮により製造され精製されていない各場合において、2つの試料の各ヒマワリとベニバナを比較したが、一方、その他は冷間圧縮をせず精製した。いくつかの異なる点が観察されたが、オイルの2つの源は、類似のステロール組成及び総ステロール含有率を有し、処理及び精製がこれらの2つのパラメーターに対してほとんど影響がないことを示唆した。試料中のステロール含有量は、3倍変わり、1.9 mg / g ~ 6.8 mg / g の範囲であった。キャノーラオイルは、最も高く、ヒマシオイルは最も低いステロール含有率であった。

【 0 3 4 4 】

実施例 7 . T A G の s n - 2 位における D H A の蓄積増加

本発明は、T A G の s n - 2 位における D H A 及び / または D P A 蓄積を、1 - アシル - グリセロール - 3 - リン酸アシルトランスフェラーゼ (L P A A T) を G A 7 構築物またはその変異体により与えられるなど、D H A または D P A 生合成経路と一緒に同時発現することにより増加できた。好ましい L P A A T は、基質として多価不飽和 C 2 2 脂肪アシル - C o A、好ましくは、内在性 L P A A T と比較して、P A を生成するため、L P A の s n - 2 位における多価不飽和 C 2 2 鎖の挿入増加をもたらす D H A - C o A 及び / または D P A - C o A に対して作用できるものである。細胞質内 L P A A T 酵素は、特に、該種が合成及び T A G 中の異常な脂肪酸を蓄積する場合、しばしば、多様な基質選択性を示す。リムナンテス・ダグラスィ (Limnanthes douglasii) からの L P A A T 2 を、C 2 2 基質を利用できない同じ種からの L P A A T 1 との対照で、P A 合成の基質として、エルコイル C o A (C 2 2 : 1 - C o A) を使用することが分かった (B r o w n ら、2 0 0 2) 。

【表 1 4 - 1】

表 1 4 . アッセイした植物オイルのステロール含有量及び組成。

ステロール番号*	ステロール慣用名	ゴマ	オリーブ	ヒマワリ	ヒマワリ	トウモロコシ	アブラナ	ベニバナ	ベニバナ	ピーナッツ	アマ (亜麻仁)	アマ (亜麻仁)	ダイズ
					冷間圧造				冷間圧造				
1	コレステロール	0.2	0.8	0.2	0.0	0.1	0.3	0.2	0.1	0.2	0.4	0.4	0.2
2	ブランスステロール	0.1	0.0	0.0	0.0	0.3	0.1	0.0	0.0	0.0	0.2	0.2	0.0
3	カリナステロール / 24-メチレンコレステロール	1.5	0.1	0.3	0.1	1.1	2.4	0.2	0.1	0.9	1.5	1.4	0.8
4	カンベステロール / 24-メチルコレステロール	16.2	2.4	7.4	7.9	8.4	33.6	12.1	8.5	17.4	15.7	14.4	16.9
5	カンベスタノール / 24-メチルコレスタノール	0.7	0.3	0.3	0.1	0.9	0.2	0.8	0.8	0.3	0.2	0.2	0.7
6	C29:2*	0.0	0.0	0.1	0.2	0.0	0.1	0.5	0.5	0.0	1.2	1.3	0.1
7	Δ5-スチグマステロール	6.4	1.2	7.4	7.2	18.6	0.7	7.0	4.6	6.9	5.1	5.8	17.6
8	未知	0.5	1.3	0.7	0.6	0.8	0.7	0.7	1.3	0.4	0.7	0.6	1.3
9	エルゴステール-7-エン-3β-オール	0.1	0.1	1.9	1.8	0.2	0.4	2.7	4.0	1.4	1.4	1.4	1.0
10	未知	0.0	1.3	0.9	0.8	1.2	0.9	1.8	0.7	1.2	0.7	0.5	0.7
11	エブリコール	1.6	1.8	4.1	4.4	1.5	1.0	1.9	2.9	1.2	3.5	3.3	0.9
12	β-シトステロール / 24-エチルコレステロール	55.3	45.6	43.9	43.6	37.7	50.8	40.2	35.1	57.2	29.9	28.4	40.2
13	Δ5-アベナステロール	8.6	16.9	7.2	4.1	19.3	4.4	7.3	6.3	5.3	23.0	24.2	3.3

【表 14 - 2】

	ル/イソフコステロール												
14	トリテルペノイドアルコール	0.0	2.4	0.9	1.1	0.0	0.0	1.6	1.9	0.0	0.0	0.0	0.9
15	トリテルペノイドアルコール	0.0	0.0	0.7	0.6	0.0	0.0	2.8	1.8	0.0	0.0	0.3	0.0
16	C29:2*	0.0	0.5	0.7	0.7	1.5	1.2	2.8	1.9	2.0	1.0	0.7	0.5
17	C29:2*	1.0	0.9	2.3	2.4	0.6	0.4	1.3	1.9	0.9	1.0	1.0	1.0
18	C30:2*	0.0	0.0	0.0	0.0	1.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
19	Δ^7 -ステリグマステロール/ステリグマステ-7-エン-3 β -オール	2.2	7.1	9.3	10.9	2.3	0.9	10.5	18.3	1.1	7.9	8.7	5.6
20	Δ^7 -アベナスステロール	1.3	0.1	4.0	3.6	0.6	0.2	2.0	4.7	0.7	0.4	0.4	0.6
21	未知	0.7	7.1	0.9	0.8	0.0	0.4	0.3	0.4	0.0	3.0	3.6	0.0
22	未知	0.3	0.0	0.3	0.9	0.0	0.0	1.2	1.3	0.2	0.1	0.0	0.3
23	未知	0.2	0.2	0.3	0.3	0.2	0.1	0.3	0.2	0.2	0.1	0.2	0.5
24	未知	0.0	3.1	0.9	1.3	0.6	0.4	0.2	0.4	0.7	1.7	1.9	0.8
25	未知	0.9	0.4	0.3	0.5	0.3	0.1	0.5	0.7	0.3	0.1	0.1	0.6
26	C30:2	2.2	6.0	4.6	5.7	1.4	0.6	1.0	1.2	1.2	1.2	1.1	5.2
27	未知	0.0	0.4	0.4	0.3	0.3	0.2	0.1	0.2	0.3	0.1	0.0	0.3
	合計	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
	総ステロール (mg/gオイル)	5.8	2.4	4.1	3.7	1.9	6.8	3.2	3.0	3.2	4.8	5.2	3.0

C 2 9 : 2 * 及び C 3 0 : 2 * は、それぞれ、2つの二重結合を有するC 2 9 ステロール及び2つの二重結合を有するC 3 0 ステロールを示す。

【 0 3 4 5 】

既知 L P A A T を考慮し、コントロールとして、s n - 2 位における D H A の組み込みを増加すると期待されないいくつかを含み、試験のため数を選択した。既知の L P A A T は：シロイヌナズナ L P A A t 2 : (配列番号 4 0 、受託番号 A B G 4 8 3 9 2 、 K i m ら、2 0 0 5) 、リムナンテス・アルバ L P A A T (配列番号 4 1 、受託番号 A A C 4 9 1 8 5 、 L a s s n e r ら、1 9 9 5) 、サッカロミセス・セレピシア S l c 1 p (配列番号 4 2 、受託番号 N P _ 0 1 0 2 3 1 、 Z o u ら、1 9 9 7) 、モルティエレラ・アルピナ L P A A T 1 (配列番号 4 4 、受託番号 A E D 3 3 3 0 5 ; U S 7 8 7 9 5 9 1) 及びセイヨウアブラナ L P A A T (配列番号 4 5 及び配列番号 4 6 、それぞれ、受託番号 A D C 9 7 4 7 9 及び A D C 9 7 4 7 8) を含んでいた。

【 0 3 4 6 】

アラビドプシス属 L P A A T 2 (L P A T 2 と命名) は、C 1 6 及び C 1 8 基質に対する活性を有することが分かっている小胞体局在酵素であるが、しかしながら、C 2 0 または C 2 2 基質に対する活性は試験されなかった (K i m ら、2 0 0 5) 。リムナンテス・アルバ L P A A T 2 は、基質として D H A または D P A を使用する能力は試験されなかったが、P A の s n - 2 位中に C 2 2 : 1 アシル鎖を挿入することが示された (L a s s n e r ら、1 9 9 5) 。選択されたサッカロミセス・セレピシア L P A A T S l c 1 p は、鎖長に関する広い基質特異性を示す、基質として 1 8 : 1 - C o A に加えて、2 2 : 1 - C o A を用いた活性を有することが分かった (Z o u ら、1 9 9 7) 。また、D H A - C o A 、 D P A - C o A 及び他の L C - P U F A は、基質として試験されなかった。モルティエレラ属 L P A A T は、アルカン資化性酵母 (Yarrowia lipolytica) 中で E P A 及び D H A 脂肪酸基質に対する活性を有することが以前に分かっている (U S 7 8 7 9 5 9 1) が、植物細胞のその活性は未知であった。

【 0 3 4 7 】

さらなる L P A A T は、本発明者らにより同定された。ミクロモナス・プシーラは、この種の T A G 上の D H A の位置分布を確認しなかったが、そのオイル中の D H A を産生し蓄積する微細藻類である。ミクロモナス・プシーラ L P A A T (配列番号 4 3 、受託番号 X P _ 0 0 2 5 0 1 9 9 7) を、B L A S T クエリー配列として、アラビドプシス L P A A T 2 を用いた、ミクロモナス・プシーラゲノム配列の調査により同定した。いくつかの

候補配列が明らかになり、配列 X P _ 0 0 2 5 0 1 9 9 7 を、C 2 2 L C - P U F A についての試験のため合成した。トウゴマ L P A A T を、ヒマシゲノム配列中の推定 L P A A T としてアノテートした (Chandra, 2010)。ヒマシゲノムからの候補 4 つの L P A A T を合成し、湿潤されたベンサミアナタバコ葉組織の粗葉ライセートで試験した。本明細書に記載の候補配列は、L P A A T 活性を示した。

【0348】

いくつかの候補 L P A A T を、系統樹上の既知 L P A A T で配置した (図 8)。なお、推定ミクロモナス L P A A T は、推定 C 2 2 L P A A T とクラスター形成しなかったが、分岐 (divergent) 配列であった。

【0349】

基質として D H A - C o A を使用するその能力について様々な L P A A T の最初の試験として、キメラ遺伝子構築物を、ベンサミアナタバコ葉内の外来性 L P A A T の構成的発現のため作成し、35S プロモーターの制御下、各々は次のものであった：35S : A r a t h - L P A A T 2 (シロイヌナズナ E R L P A A T) ; 35S : L i m a l - L P A A T (リムナンテス・アルバ L P A A T) ; 35S : S a c c e - S l c 1 p (サッカロミセス・セレピシア L P A A T) ; 35S : M i c p u - L P A A T (ミクロモナス・プシーラ L P A A T) ; 35S : M o r a l - L P A A T 1 (モルティエレラ・アルピナ L P A A T) ; 35S : B r a n a - L P A A T 1 . 1 3 (セイヨウアブラナ L P A A T 1 . 1 3) ; 35S : B r a n a - L P A A T 1 . 5 (セイヨウアブラナ L P A A T 1 . 5)。外来性 L P A A T を含まない 35S : p 1 9 構築物を、実験のコントロールとして使用した。これらの構築物の各々を、実施例 1 に記載のように、アグロバクテリウムによりベンサミアナタバコ葉中に導入し、浸潤後 5 日目、処理した葉のゾーンを切り取り粉砕して葉ライセートを作成した。各ライセートは、L P A を合成する内在性酵素だけでなく、外来性 L P A A T を含有した。該ライセートに、14C 標識 - O A 及び - D H A を別々に添加することにより、インビトロ反応を行った。反応物を 25 でインキュベートし、14C 標識脂肪酸を P A に組み込んだレベルを T L C により決定した。A R A 及び C 1 8 脂肪酸と比較した各 L P A A T が D H A を使用する能力を評価した。メドウフォーム (リムナンテス・アルバ)、モルティエレラ及びサッカロミセス L P A A T は、これらは見えるが、他の L P A A T は見えない放射標識 P A を用いて、D H A 基質に対する活性を有することが分かった。全ての L P A A T を、オレイン酸コントロールフィールドにより確認した。

【0350】

種子中の L P A A T 活性を試験するため、いくつかのタンパク質コード配列または L P A A T を、コンリニン (p L u C n l 1) プロモーターの制御下、バイナリーベクター中に挿入した。それから、それぞれ、キメラ遺伝子、C n l 1 : A r a t h - L P A A T (ネガティブコントロール)、C n l 1 : L i m a l - L P A A T、C n l : S a c c e - S l c 1 p、及び C n l 1 : M o r a l - L P A A T を含む得られた遺伝子構築物を、それらの種子内で D H A を産生するシロイヌナズナ植物を使用し形質転換使用し、L P A A T 及び T A G の s n - 2 位への D H A の組み込みが増加するかどうかを試験するため、種子特異的方法のトランスジェニック D H A 経路を発現する安定な形質転換体を生成する。G A 7 構築物及びその変異体 (実施例 2 ~ 4) を既に含むセイヨウアブラナ及びカメリナサティバ植物を使用し形質転換し、親及び L P A A T 遺伝子構築物の両方を保有する子孫を生成する。T A G の s n - 2 位への D H A の組み込みの増加を、導入遺伝子をコードする L P A A T を含まない植物での組み込みと比較して試験した。オイル含有率も、特に、より高いレベルの D H A を産生する種子に、種子内で改善し、実施例 2 に記載のようにアラビドプシス種子内で見られる傾向を相殺する。

【0351】

35S : M o r a l - L P A A T 1 構築物を使用して、G A 7 構築物からの T - D N A に対してホモ接合であり、その種子が種子脂質中に D H A 約 15% をは含有する既にトランスジェニックなシロイヌナズナ系統を形質転換した (P e t r i e ら、2012)。こ

10

20

30

40

50

れのため、トランスジェニック系統中に既に存在する *bar* 選択マーカー遺伝子と異なる 35S:Moral-LPAA T1 構築物中のカナマイシン選択マーカー遺伝子を使用した。カナマイシンに耐性があり、温室内で成熟するまで生育したトランスジェニック苗を選択した。T2 種子を収穫し、その総種子脂質の脂肪酸組成を GC により分析した (表 15)。33 種の独立した形質転換された系統の中から、3 種の表現型を観察した。第一の群 (6/33 系統) では、DPA は、総種子脂質の約 10.6% まで、DHA レベルより実質的に大きいレベルで増加した。これは、この系統群の中で、強く減少する DHA の犠牲によって生じた。この第一の群の 2 つの系統では、DPA + DHA の合計は減少したが、他の 4 系統では減少しなかった。第二の群 (5/33) では、DPA と DHA のレベルはほぼ等しく、DPA + DHA の合計は親種子とほぼ同じであった。第三の群では、DPA と DHA のレベルは親種子のものと類似していた。第一及び第二群で DPA レベルの増加についての 1 つの可能な説明は、LPAA T が DPA-CoA 基質に対する 4-デサチュラーゼとの競合に勝って、4-デサチュラーゼと比較して、優先的に、DPA を PA 中に、それから、TAG 中に組み込むというものである。2 番目の可能な説明は、4-不飽和化が部分的に阻害されているものである。

【0352】

Cn11:Moral-LPAA T ベクターでさらに形質転換された GA7 構築物の T-DNA で形質転換されたアラビドプシス植物の種子を収穫し、オイルを種子から抽出した。それから、TAG フラクシオンを TLC 法により、抽出オイルから単離し、TLC プレートから回収した。これらの TAG 試料及び分取前の種子オイルの試料を、リゾース属リパーゼで消化することにより分析し、DHA の位置分布を決定した。該リパーゼは、TAG の sn-1 位または sn-3 位においてエステル化されたアシル基に対して特異的である。5 mM の CaCl₂ を含む 0.1 M のトリス HCl pH 7.7 中のリゾース属リパーゼ溶液を添加して、超音波を用いて、5% アラビアゴム中の各脂質試料を乳化し、混合物を振盪し続けながら、30 でインキュベートすることによりこれを行った。各反応を、クロロホルム:メタノール (2/1、v/v) 及び 1 体積の 0.1 M の KCl を各混合物に添加することにより停止した。脂質をクロロホルムフラクション中に抽出し、ヘキサン/ジエチルエーテル/酢酸 (50/50/1、v/v) を用いて 2.3% ホウ酸含浸 TLC での分離により得られた脂質の sn-2 MAG、sn-1/3 FFA、DAG 及び TAG 成分の相対量を決定した。脂質バンドを、TLC プレート上にアセトン/水 (80/20、v/v) 中の 0.01% プリムリンの噴霧により可視化し、UV 光下で可視化した。個々の脂質バンドを、同じ TLC プレート上に溶解された脂質の標準スポットに基づいて同定した。TLC 脂質バンドをガラスバイアル中に集め、それらの脂肪酸メチルエステルを、1 N メタノール性 HCl (Supelco) を用いて合成し、80 で 2 時間インキュベートした。個々の脂質の脂肪酸組成を GC により分析した。

【0353】

このアッセイは、GA7 (系統 22-2-1-1 及び 22-2-38-7) で形質転換された親種子内の DHA は、TAG の sn-1 位または sn-3 位において優先的にエステル化したことを示した。対照的に、GA7 構築物及び LPAA T をコードする導入遺伝子の両方で形質転換された NY11 及び NY15 種子内の DHA は、該系統の 1 つの DHA の 35% 及び TAG の sn-2 位においてエステル化される他系統の DHA の 48% で、sn-2 位で、DHA は濃縮されていた、すなわち、リパーゼ消化後、DHA は、sn-2-MAG として存在していた (表 16)。GA7-mod B 構築物からの T-DNA 及び LPAA T コード遺伝子の両方で形質転換し、DHA を産生するセイヨウアブラナ及びカラシナ種子について、類似の結果を得る。

【0354】

モルティエレラ LPAA T または別の LPAA T が DPA-CoA または DHA-CoA のいずれかに対して優先的であるかいないかを決定するため、上記構成的プロモーターの制御下候補 LPAA T を一過性に発現するベンサミアナタバコ葉のライセートに 14C 標識 DPA-CoA または DHA-CoA を別々に添加することによりインビトロ反応を

10

20

30

40

50

行った。反応物を25 でインキュベートし、PAへの14C標識脂肪酸の組み込みレベルを脂質のTLC分析により決定した。DPA-CoAと比較して、各LPAAのDHA-CoAを使用する能力を評価する。有効なDHAを有し、LPAA活性を組み込んでいることが確認されているLPAAをコードする遺伝子を使用し、形質転換DHA産生セイウアブラナ植物及び種子を産生する。

【0355】

DPA-CoAを用いて強い活性を有するLPAAをコードする遺伝子を使用し、DPA産生植物及び種子を形質転換し、TAGのsn-2位においてエステル化されたDPAの量を増加させる。

【表15-1】

表15. DHA産生のためのGA7構築物だけでなく、LPAA1構築物で形質転換したトランスジェニックシロイヌナズナ種子の脂肪酸組成（総脂肪酸中の%）。

	C16:0	C18:0	C18:1	C18:1d1	C18:2	C18:3n6	C18:3n3	C20:0	18:4n3	C20:1d1	20:1d13	C20:2n6	C20:4n6	C20:3n3	C22:0	20:4n3	C22:1	20:5n3	22:5n3	C22:6n3
NY-1	9.3	3.2	9.1	6.8	9.4	0.5	23.8	1.6	4.1	7.9	5.1	0.6	0.0	0.9	0.4	0.6	0.6	1.2	7.9	4.5
NY-2	10.7	3.3	6.5	4.4	7.6	0.3	28.1	1.9	4.3	8.5	3.7	0.7	0.0	1.1	0.5	1.1	0.8	1.4	1.1	11.6
NY-3	9.3	2.8	6.3	3.4	10.3	0.2	32.8	2.2	2.7	6.2	3.6	1.1	0.0	1.9	0.5	1.4	0.9	0.7	1.0	10.7
NY-4	11.4	3.5	4.5	3.1	7.0	0.3	32.5	2.1	4.7	5.5	2.3	1.0	0.0	1.9	0.6	0.8	0.6	1.1	0.9	14.3
NY-5	14.6	4.5	7.0	7.7	6.7	0.3	20.7	2.2	5.7	5.4	4.8	0.4	0.0	0.9	0.9	0.8	0.4	1.2	1.0	11.7
NY-6	7.8	2.7	12.5	2.2	18.0	0.1	24.9	1.8	0.7	15.5	3.1	1.4	0.0	1.2	0.3	0.5	1.5	0.3	3.0	0.8
NY-7	9.3	2.9	6.7	3.8	9.2	0.2	31.5	2.1	3.2	7.5	3.7	0.9	0.0	1.6	0.5	1.3	0.8	0.8	1.1	10.9
NY-8	8.8	3.2	8.2	5.5	11.0	0.3	25.3	1.9	3.0	8.3	5.4	1.0	0.0	1.2	0.5	0.8	0.8	0.8	6.1	6.0
NY-9	12.3	3.7	5.0	4.6	7.1	0.2	28.3	2.3	4.2	5.6	3.8	0.8	0.0	1.6	0.7	0.7	0.6	1.1	1.2	13.8
NY-10	8.6	3.2	8.5	3.1	9.7	0.3	31.5	1.6	3.4	8.7	2.8	1.0	0.0	1.3	0.3	0.9	0.6	1.1	10.6	1.0
NY-11	11.5	3.2	4.5	2.5	7.1	0.3	33.3	2.1	3.9	5.7	1.9	0.9	0.0	2.0	0.5	0.7	0.7	0.8	1.0	15.6
NY-12	8.7	3.2	7.5	5.1	8.5	0.2	26.8	2.0	3.7	8.7	5.1	0.9	0.0	1.2	0.5	1.1	0.8	1.2	10.0	2.6
NY-13	11.5	3.4	5.2	3.4	8.3	0.3	30.0	2.2	5.0	6.2	3.2	0.9	0.0	1.7	0.6	1.5	0.8	1.1	1.0	11.6
NY-14	9.2	2.9	6.6	2.0	10.3	0.2	34.7	1.9	3.3	7.7	1.6	1.2	0.0	1.8	0.4	1.2	0.8	0.9	0.8	11.1
NY-15	10.9	3.3	4.6	2.7	7.0	0.3	34.1	1.9	5.1	5.5	2.0	0.9	0.0	1.8	0.5	0.8	0.5	1.0	1.0	14.7
NY-16	10.5	3.4	6.0	4.6	7.8	0.3	30.3	1.8	4.4	5.4	2.9	0.7	0.0	1.5	0.5	0.9	0.5	1.1	1.3	14.2
NY-17	9.1	2.4	5.9	2.5	10.4	0.2	35.4	1.6	3.6	6.4	2.1	1.1	0.0	1.9	0.4	1.2	0.7	1.0	0.9	11.7
NY-18	9.7	3.6	8.8	6.2	12.1	0.3	21.0	1.9	4.0	8.3	5.9	0.8	0.0	0.9	0.5	0.6	0.9	1.0	5.7	5.1
NY-19	8.4	3.1	12.0	3.1	14.6	0.2	28.8	1.7	1.6	11.3	3.2	1.0	0.0	1.4	0.4	0.6	1.0	0.6	3.9	1.2
NY-20	10.1	3.2	5.4	3.3	8.9	0.3	32.8	2.1	4.1	5.5	2.8	1.0	0.0	1.9	0.5	1.1	0.7	0.9	1.1	12.1
NY-21	10.5	3.6	5.6	3.8	8.2	0.3	31.9	2.0	4.6	5.9	2.8	0.9	0.0	1.7	0.5	0.8	0.6	1.0	0.9	12.5

【表15-2】

	C16:0	C18:0	C18:1	C18:1d1	C18:2	C18:3n6	C18:3n3	C20:0	18:4n3	C20:1d1	20:1d13	C20:2n6	C20:4n6	C20:3n3	C22:0	20:4n3	C22:1	20:5n3	22:5n3	C22:6n3
NY-22	8.4	3.3	7.4	2.3	9.4	0.2	33.5	1.8	3.4	8.8	2.2	1.2	0.0	1.7	0.4	1.3	0.7	1.0	5.5	6.1
NY-23	8.3	2.8	7.0	1.9	11.0	0.2	34.6	1.9	2.6	9.3	1.7	1.4	0.0	2.0	0.4	1.2	1.0	0.7	0.7	9.9
NY-24	9.0	3.3	7.0	4.3	9.9	0.2	30.0	1.8	3.2	7.7	4.3	1.0	0.0	1.6	0.4	0.6	0.8	0.8	3.4	8.8
NY-25	9.4	3.3	6.0	3.6	8.2	0.2	32.6	1.8	4.0	6.8	3.6	1.0	0.0	1.7	0.4	0.6	0.7	0.9	4.8	8.7
NY-26	10.4	4.2	8.0	3.8	16.0	0.4	18.7	2.5	2.5	10.1	4.0	1.0	0.0	0.8	0.8	1.9	1.0	1.4	1.4	8.4
NY-27	9.4	3.2	7.5	5.3	11.4	0.2	28.6	2.0	2.3	7.5	5.5	1.0	0.0	1.8	0.5	0.6	0.9	0.6	1.5	7.6
NY-28	9.4	3.4	6.5	3.6	8.8	0.3	32.4	1.8	3.9	6.7	3.3	0.9	0.0	1.6	0.4	0.7	0.6	1.0	10.1	2.7
NY-29	10.2	3.7	7.6	4.3	8.0	0.4	28.8	1.7	4.8	7.6	2.9	0.7	0.0	1.1	0.4	0.7	0.5	1.4	1.9	11.6
NY-30	11.1	3.5	5.4	4.1	7.3	0.3	30.2	2.0	4.7	6.0	3.0	0.8	0.0	1.7	0.5	0.7	0.7	1.1	1.0	13.7
NY-31	9.6	3.0	5.6	2.1	8.5	0.2	35.4	2.0	3.9	7.1	1.7	1.2	0.0	2.1	0.4	0.9	0.8	0.8	0.8	12.3
NY-32	8.5	3.1	8.0	1.9	9.5	0.3	31.7	1.5	3.3	12.9	1.4	1.0	0.1	1.1	0.3	1.2	0.8	1.2	0.8	9.8
NY-33	10.3	3.8	7.7	6.3	8.1	0.3	24.4	2.0	4.4	7.5	4.8	0.7	0.0	1.1	0.5	0.6	0.6	1.1	2.8	10.7

【表 16 - 1】

表 16. TAG中のDHAの存在と比較して、GA7構築物のT-DNAだけでなく、Cn11::Moral (モルティエレラ・アルピナ) -L P A A Tベクターで形質転換した脂質トランスジェニックシロイヌナズナ種子内のTAGのsn-2位におけるDHAの存在。TAG及びsn-2 MAG脂肪酸組成物は、0~0.4%の各14:0、16:1 ω13t、16:2、16:3、22:0、及び24:0を含有していた。

実施例	C16:0	16:1d9	C18:0	C18:1	C18:1d11	C18:2	C18:3n6	C18:3n3	C20:0	18:4	C20:1d11	20:1d13	C20:2n6	C20:3n6	C20:4n6	C20:5n3	20:4n3	C22:1	20:5n3	C22:4n6	22:5n6	22:4n3	22:5n3	C22:6n3
22-2-1 -1 TAG	12.2	0.4	4.4	6.4	3.9	7.2	0.8	28.8	1.6	4.3	9.7	2.3	0.7	0.1	0.1	1.3	1.0	0.6	2.1			0.0	0.7	10.1
2-MAG	0.6	0.1	0.3	8.3	2.5	10.1	0.7	53.9	0.2	6.5	0.3	0.1	0.1	0.0	0.0	0.3	0.2	0.0	3.8			0.0	2.3	9.1

sn-2におけるDHA = 30%

10

【表 16 - 2】

22-2-3 8-7 オイル	10.0	0.2	3.7	6.0	2.7	6.4	0.4	33.8	1.6	3.7	11.3	1.8	0.8			1.3	0.9	0.6	1.2	0.1			0.7	11.6
2-MAG	0.5	0.1	0.3	9.7	2.4	11.1	0.6	60.0	0.1	3.6	0.3	0.1	0.1	0.0	0.0	0.4	0.2	0.0	2.1			0.1	1.3	6.7

sn-2におけるDHA = 19%

モルティエレラ・アルピナ-L P A A Tをコードする遺伝子でさらに形質転換

NY11-TAG	11.0	0.2	3.4	6.0	2.8	9.2	0.3	34.8	1.6	3.6	6.3	1.8	1.0	0.0	0.0	1.8	0.7	0.6	0.9		0.0	0.1	0.6	12.2
2-MAG	0.7	0.1	0.2	6.7	1.1	11.8	0.3	49.8	0.2	3.7	0.5	1.5	0.3	0.0	0.0	1.6	0.6	0.1	0.8		0.1	0.2	1.6	17.8

sn-2におけるDHA = 48%

NY-15-オイル	11.0	0.0	3.3	4.6	2.8	6.9	0.3	33.6	2.0	5.1	5.5	2.1	0.9	0.0	0.0	1.9	0.7	0.6	0.9	0.1	0.4		0.9	14.9
2-MAG	0.8	0.1	0.3	6.4	1.3	11.4	0.3	50.2	0.2	4.9	0.4	1.4	0.2	0.0	0.0	1.5	0.6	0.1	0.9	0.0	0.0	0.2	1.6	16.7

sn-2におけるDHA = 37%

20

【0356】

実施例 8 . トランスジェニックカメリナサティバ種子のさらなる分析

総脂質含有率

GA7構築物のT-DNAに対してホモ接合である及び総脂肪酸含有物中にDHAを含むカメリナサティバ種子を、以下の総脂質含有率及び組成について分析した。2つの連続した溶媒抽出工程を、初め、ヘキサンを用いて、次に、クロロホルム/メタノールを用いて、種子に対して行った。抽出または分析中、酸化防止剤は添加しなかった。脂質/溶媒混合物の長時間加熱及び還流により種子脂質を抽出するために通常に使用されるソックスレー抽出法は、DHAなどの3PUFAの分解または酸化の可能性があるので、使用しない。

30

【0357】

油料種子に対して業界標準であるので、最初の抽出で、溶媒としてヘキサンを使用した。また、ヘキサンは、その溶媒特性及び、特に室温において、極性脂質のその比較的貧溶性のおかげでTAG含有オイルを優先的に抽出する。形質転換及びコントロールカメリナ種子(それぞれ、130g及び30g)をヘキサンで濡らし、電気めこの乳鉢と乳棒を用いて粉碎した(Retsch Muhle、ドイツ)。混合物を、分液ロートに移動し、総量800mLのヘキサンを用いて4回抽出し、3番目の抽出では、一夜静置して抽出した。各抽出では、微粉を取り除くため、真空下GFCガラス繊維フィルターを通して、抽出物を濾過し、それから、真空下40においてロータリーエバポレーターで蒸発させた。抽出物はプールされ、TAGリッチなヘキサン抽出物であった。

40

【0358】

ヘキサンでの抽出後、残った種子ミールを、ヘキサン抽出と同様な方法で、クロロホルム-メタノール(CM、1:1v/v)を用いてさらに抽出した。それから、ミールを濾過により取り除き、合わせた抽出物をロータリーエバポレーターで蒸発させた。それから、プールされたCM総粗脂質抽出物を一相メタノール-クロロホルム-水混合物(2:1

50

： 0.8 v / v / v) を用いて溶解した。クロロホルム - 水の添加により相を分離した (最終溶媒比、 1 : 1 : 0.9 v / v / v メタノール - クロロホルム - 水) 。各抽出物の精製脂質を下層のクロロホルム相中に分配し、ロータリーエバポレーターで濃縮して、極性脂質リッチ C M 抽出物とした。これら各抽出物中の脂質含有物を重量測定法で決定した。

【 0 3 5 9 】

脂肪酸組成分析では、ヘキサンと C M の抽出物のアプリコットを、Christie ら (1982) の方法に従って、トランスメチル化し、メタノール - クロロホルム - 濃塩酸 (3 mL、10 : 1 : 1、80、2 時間) を用いて脂肪酸メチルエステル (F A M E) を生成した。F A M E を、ヘキサン - クロロホルム (4 : 1、3 x 1.8 mL) 中に抽出した。ヘキサンと C M の抽出後の残った種子ミール試料 (1 ~ 2 g) もトランスメチル化して、重量測定法により F A M E として残渣の脂質を測定した。種子の総脂質含有率を、ヘキサン及び C M 抽出物の脂質含有率及び溶媒抽出後のトランスメチル化したミールの F A M E 含有率を足すことにより算出した。

【 0 3 6 0 】

トランスジェニック種子は、種子重量中 40.9 % である野生型カメリナサティバ種子と比較して、種子重量中 36.2 % であり、わずかに少ない総脂質を含有していた。油料種子を含む種子では、ヘキサン、それから、クロロホルム - メタノールを用いた連続抽出により得られた溶媒抽出可能な脂質、及び本明細書に例証の溶媒抽出後の抽出ミールのメチル基転移により放出された残渣の脂質の合計として、総脂質を決定した。この総脂質は、主に、トリアシルグリセロールなどの脂肪酸含有脂質及び極性脂質及び少量の非脂肪酸脂質、例えば、フィステロール及び遊離した非エステル化形態で存在または脂肪酸とのエステル化された脂肪アルコールから成った。加えて、いずれかのステロールエステル類またはワックスエステル類及びカロテノイド、例えば、 β -カロテンなどの炭化水素も、存在するならば、溶媒抽出可能な脂質中に含まれていた。これらは、全体的に重量測定に含まれ、T L C - F I D 分析に含まれていた (表 17) 。

【 0 3 6 1 】

総脂質の種子重量当たりの脂質の 31 ~ 38 % を、ヘキサンにより抽出し、トランスジェニック及びコントロール種子について、それぞれ、種子の総脂質の 86 % 及び 92 % の割合であった。C M 抽出は、トランスジェニック及びコントロール種子から、それぞれ、さらに 4.8 % 及び 2.4 % (種子重量の) の主に極性な脂質リッチ抽出物を回収した。残りの溶媒抽出された油料種子ミールのメチル基転移反応により遊離された残渣の脂質は、それぞれ、種子重量の 0.3 % 及び 0.4 % であった。すなわち、第一及び第二の溶媒抽出は一緒に、種子の総脂質含有物の 99 % を抽出した (すなわち、トリグリセリドなどの脂質及び糖脂質及びリン脂質から成る極性脂質を含む大部分脂肪酸であった、種子重量の 36.2 % または 40 % (次セクション - 脂質分類分析参照)) 。

【 0 3 6 2 】

脂質分類分析

ヘキサン及び C M 抽出物の脂質分類を、石英ロッド上の Chromarod S - I I シリカと組み合わせて、展開溶媒系としてヘキサン / ジエチルエーテル / 氷酢酸 (70 : 10 : 0.1、v / v / v) を用いて、水素炎イオン化検出器を備えた薄層クロマトグラフィー (T L C - F I D ; I a t r o s c a n M a r k V . I a t r o n L a b o r a t o r i e s、日本、東京) により分析した。適切な補正曲線を、Nu - C h e k P r e p . I n c . (米国ミネソタ州エリジアン) から得た代表的基準を用いて作成した。S I C - 480 I I ソフトウェア (S I S C バージョン : 7.0 - E) を用いて、データを処理した。リン脂質化学種をシリカカラムクロマトグラフィーから得られた精製リン脂質フラクションの適用及び F I D 検出前のクロロホルム / メタノール / 氷酢酸 / 水 (85 : 17 : 5 : 2、v / v / v) 中、ロッドの展開により分離した。

【 0 3 6 3 】

C M 抽出物から T A G、糖脂質及びリン脂質フラクションを分離するため、短いガラスカラム中のシリカゲル 60 (100 ~ 200 メッシュ) (0.3 ~ 1 g) またはグラスウ

ールを詰めたパスツールピペットを使用して、10 mgの精製CM脂質抽出物を精製した。CM抽出物の残渣のTAGフラクションを、ヘキサン中10%ジエチルエーテル20 mLで溶離し、糖脂質を、アセトン20 mLで溶離し、リン脂質を、最初メタノール10 mL、次いでメタノール-クロロホルム-水(5:3:2)10 mLの2工程で溶離した。この第二の溶離はリン脂質の回収を増加させた。各フラクションの収量を重量測定法により決定し、純度をTLC-FIDにより確認した。全抽出物及びフラクションを、さらにGC及びGC-MS分析するまで、-20℃においてジクロロメタン中で保管した。

【0364】

各トランスジェニック及びコントロール種子からのTAGリッチヘキサン抽出物は、約96%のTAGを含有していた。CM抽出物は、トランスジェニック及び野生型種子について、それぞれ、該CM抽出物の44重量%及び13重量%になる残渣TAGを含有していた。ヘキサン抽出物と対照的に、CM抽出物は、トランスジェニック及びコントロール種子について、それぞれ、該CM抽出物の50重量%及び76重量%になる極性脂質、即ち、リン脂質及び糖脂質に富んでいた(表17)。主なリン脂質は、ホスファチジルコリン(PC)であり、総リン脂質の70%~79%を占め、次いで、ホスファチジルエタノールアミン(PE、7%~13%)、比較的低レベルのホスファチジン酸(PA、2%~5%)及びホスファチジルセリン(PS、<2%)であった。

【0365】

脂肪酸組成

概して、DHA及び/またはDPAを産生する種子では、本発明者らは、種子中の全脂質の直接的メチル基転移反応により決定したとき、種子中の総脂質の脂肪酸組成が、TAGフラクショと類似していることを観察した。このことは、種子中に存在する総脂質の90%より多くが、TAGの形態で起こることに起因した。

【0366】

ヘキサン及びCM抽出物の異なる脂質分類の脂肪酸組成を、Supelco Equity(商標)-1フューズドシリカキャピラリーカラム(15m x 内径0.1mm、膜厚0.1µm、米国ペンシルベニア州ペルフォント)、FID、スプリット/スプリットレスインジェクター及びAgilent Technologies 7683Bシリーズオートサンプラー及びインジェクターを備えたAgilent Technologies 6890A GC装置(米国カリフォルニア州パロアルト)を用いて、ガスクロマトグラフィ(GC)及びGC-MS分析により決定した。キャリアーガスはヘリウムであった。試料を120℃のオープン温度において、スプリットレスモードで注入した。注入後、オープン温度を、10℃/分で270℃まで上昇させ、最終的に5℃/分で300℃まで上昇させた。溶離した化合物を、Agilent Technologies ChemStationソフトウェア(米国カリフォルニア州パロアルト)で定量化した。GC結果には、個々の成分面積の±5%以下の誤差があった。

10

20

30

【表 17】

表 17. トランスジェニック及びコントロールカメリナサティバ種子からのヘキサン及びCM抽出物の脂質分類組成（各抽出工程で得られる総脂質中の％）。SE、WE及びHCを互いに分離しなかった。

脂質分類	トランスジェニック種子		コントロール種子	
	ヘキサン	CM	ヘキサン	CM
SE/WE/HC*	1.0	1.4	1.0	1.4
TAG	95.6	44.2	96.0	13.1
FFA	0.9	1.3	0.8	1.4
UN**	0.9	1.1	0.8	1.2
ST	0.5	0.7	0.4	0.4
MAG	0.7	1.1	0.8	6.2
PL	0.3	50.3	0.3	76.3
合計	100.0	100.0	100.0	100.0

略語：ステロールエステル（SE）、ワックスエステル（WE）、炭化水素（HC）、トリアシルグリセロール（TAG）、遊離脂肪酸（FFA）、未知（UN）、ステロール（ST）、モノアシルグリセロール（MAG）、糖脂質及びリン脂質から成る極性脂質（PL）；* この系とSE、WE、HC共溶出；**脂肪アルコール及びジアシルグリセロール（DAG）を含む可能性がある。

【0367】

GC質量分光測定（GC-MS）分析を、Finnigan Trace ultra Quadrupole GC-MS（モデル：ThermoQuest Trace DSQ、Thermo Electron Corporation）で行った。ThermoQuest Xcaliburソフトウェア（米国テキサス州オースチン）でデータを処理した。GCにオンカラムインジェクター及び上記と類似極性のキャピラリーHP-5 Ultra Agilent J&Wカラム（50m x 内径0.32mm、膜厚0.17µm、Agilent Technologies、米国カリフォルニア州サンタクララ）を装着した。個々の成分を、質量分析データを用いて、及び信頼できる標準及び実験室基準として得たものを用いた保持時間データとの比較により同定した。試料バッチと同時に、全過程のブランク分析を行った。

【0368】

抽出物中の異なる脂質分類の脂肪酸組成データを表18に示す。DHA産生カメリナ種子では、DHAは、DHA及びALAの比率と逆相関で、1.6％から6.8％の間の範囲の比率で主要脂質フラクション（TAG、リン脂質及び糖脂質）中に分布していた。トランスジェニック種子からのTAGリッチヘキサン抽出物は、6.8％のDHA及び41％のALAを含有していた（表18）。極性脂質リッチCM抽出物は、4.2％のDHA及び50％のALA、すなわち、比較的より少ないDHA及びより多いALAを含有していた。極性脂質リッチCM抽出物からの残渣TAGは、6％のDHA及び40％のALAを含有していた。CM抽出物から単離された糖脂質フラクションは、3％のDHA及び39％のALAを含有し、リン脂質フラクションは、最低レベルのDHA（1.6％）及び最高レベルのALA（54％）を含有していた。トランスジェニックカメリナ種子は、主要脂質分類（TAG、糖脂質及びリン脂質）のコントロール種子と比較して、より高いレベルのALA及びより低いレベルのLA（リノール酸、18：2 n-6）を含有していた。ALA及びLAの比率は：トランスジェニック種子についてALA 39～54％及びLA 4％～9％、並びに、コントロール種子についてALA 12％～32％及びLA 20％～29％であった。エルカ酸（22：1 n-9）の相対レベルは、コントロール種子より、トランスジェニック種子内の全フラクションで低く、例えば、ヘキサン抽出物では、1.3％対2.7％であった（表18）。

【 0 3 6 9 】

種子内のステロール組成

抽出脂質中のステロール含有率及び組成を決定するため、TAGリッチヘキサン抽出物及び極性脂質リッチCM抽出物からの約10mgの総脂質試料を、80%MeOH中5%KOH4mLを用いてけん化し、テフロン（登録商標）加工スクリーキャップしたガラス試験チューブ内で80℃2時間加熱した。反応混合物を冷却後、ミリQ水2mLを添加し、ステロール及びアルコールを、振盪及びボルテックスすることにより、ヘキサン：ジクロロメタン（4：1v/v）2mL中に抽出した。混合物を遠心分離し、有機相の各抽出物を、振盪及び遠心分離によりミリQ水2mLで洗浄した。上層のステロール含有有機層を抜き出した後、溶媒を、窒素気流を用いて蒸発させ、ステロール及びアルコールを、ビス（トリメチルシリル）-トリフルオロアセトアミド（BSTFA、Sigma-Aldrich）200μLを用いて、密封GCバイアル内で80℃2時間加熱によりシリル化した。この方法により、遊離ヒドロキシル基をトリメチルシリルエーテルに転換した。ステロール-及びアルコール-OTMS誘導体を、窒素気流下、加熱ブロック（40℃）で乾燥し、上記GC/GC-MS分析直前に、ジクロロメタン（DCM）に再溶解した。

【表 1 8 - 1】

表 1 8 . トランスジェニック及びコントロールカメリナサティバ種子の脂質抽出物及びフラクションの脂肪酸組成（総脂肪酸中の％）。

	トランスジェニック種子						コントロール種子					
	ヘキサン	CM				Meal	ヘキサン	CM				Meal
脂肪酸	TAG	合計	TAG	GL	PL	残渣	TAG	合計	TAG	GL	PL	残渣
16:1ω7	0.1	0.2	0.1	0.2	0.1	0.2	0.1	0.2	0.2	-	-	0.3
16:0	6.2	12.8	6.8	21.3	19.4	10.4	6.7	12.8	7.8	29.6	13.7	10.3
18:4ω3	3.7	3.3	3.4	2.1	2.9	3.6	-	-	-	-	-	-
18:2ω6	7.1	3.9	8.8	7.2	3.7	8.8	22.2	28.4	29.4	20.8	29.3	27.9
18:3ω3	41.9	50.3	39.9	38.6	54.1	38.9	32.0	20.6	19.7	13.0	12.3	20.0
18:1ω9	11.1	4.7	9.6	7.2	2.8	8.1	14.0	25.4	13.3	14.7	35.7	14.3
18:1ω7	1.4	2.3	2.1	3.7	3.4	2.8	1.0	1.5	2.2	4.0	2.8	2.2
18:0	3.2	4.0	3.0	4.5	5.7	3.1	3.0	2.7	2.9	5.7	3.6	2.7
20:5ω3	0.4	0.2	0.3	-	-	0.3	-	-	-	-	-	-
20:4ω3	0.4	0.4	0.4	-	0.2	0.3	-	-	-	-	-	-
20:2ω6	0.7	0.7	0.8	0.6	0.4	0.7	1.8	0.8	2.1	1.2	-	1.8
20:3ω3	0.8	1.2	0.9	0.6	1.3	0.5	0.9	0.3	-	-	-	0.4
20:1ω9/11	11.6	6.1	10.9	5.1	1.3	8.4	12.5	3.0	11.1	4.2	1.7	9.4
20:1ω7	0.6	0.8	1.4	0.6	0.2	1.1	0.6	0.6	2.0	1.3	-	1.8
20:0	1.3	0.8	1.4	0.6	0.1	1.4	1.5	0.7	2.0	1.4	-	1.8
22:6ω3	6.8	4.2	6.1	3.0	1.6	5.4	-	-	-	-	-	-
22:5ω3	0.3	1.1	0.4	0.6	1.4	0.3	-	-	-	-	-	-
22:1ω9	1.3	1.0	1.8	0.6	0.1	1.5	2.7	0.7	3.6	0.9	-	2.9
22:0	0.3	0.2	0.3	0.6	0.1	0.7	0.3	0.2	0.7	0.8	-	0.8
24:1ω9	0.3	0.4	0.4	0.6	0.3	0.6	0.3	0.6	0.7	0.9	0.5	1.0
24:0	0.1	0.4	0.2	0.9	0.4	1.1	0.1	0.4	0.5	1.4	0.4	1.3
その他 *	0.4	1.0	1.0	1.4	0.5	1.8	0.3	1.1	0.9	0.1	-	1.1

【表 1 8 - 2】

合計	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

略語：トリアシルグリセロール（TAG）、糖脂質（GL）、リン脂質（PL）；合計：CM抽出からのGL及びPLを含む極性脂質リッチ抽出物；TAG、GL及びPLを、CM抽出物のシリカカラムクロマトグラフィー法により分離した；*少量脂肪酸の合計。

【 0 3 7 0 】

トランスジェニック及びコントロール種子両方の主要ステロールは、24-エチルコレステロール（システロール、総ステロールの43%～54%）、24-メチルコレステロール（カンペステロール、20%～26%）であり、より低レベルのコレステロール（5%～8%）では、ブラシカステロール（2%～7%）、イソフコステロール（5-アベナスステロール、4%～6%）、スチグマステロール（0.5%～3%）、コレスタ-7-エン-3-オール（0.2%～0.5%）、24-メチルコレスタノール（カンペスタノール、0.4%～1%）及び24-デヒドロコレステロール（0.5%～2%）であ

った(表19)。これらの9つのステロールは、総ステロールの86%~95%を占め、残りの成分は、炭素及び二重結合数について部分的のみ同定されたステロールであった。全ステロールプロファイルは、ヘキサン及びCM抽出物両方について、トランスジェニック及びコントロール種子間で類似していた。

【0371】

脂肪アルコール分析

抽出物中の脂肪アルコールを誘導体化し、ステロールと同様に分析した。イソ分岐脂肪アルコールを伴ったC16~C22の一連の脂肪アルコールを、ヘキサン及びCM抽出物両方で同定した。トランスジェニック及びコントロール種子について、観察された個々の成分の比率のいくらかの差異を含む類似のプロファイルが観察された。クロロフィル由来のフィトールは主要脂肪族アルコールであり、それぞれ、トランスジェニック及びコントロール種子中のヘキサフラクションの総脂肪アルコールの47%及び37%を占める。奇数鎖アルコールは、ヘキサン抽出物中(16%~23%)より、CM抽出物中で高いレベルで存在する(総脂肪アルコール含有物の37%~38%)。イソ-17:0(16%~38%)は、17:0(0.3%~5.7%)に対して優勢であった。存在する別の奇数鎖アルコールは、19:0であった(4.5%~6.5%)。検出された他のアルコールは、イソ-16:0、16:0、イソ-18:0、18:1、18:0を含み、少量レベルのイソ-20:0、20:1、20:0、イソ-22:0、22:1及び22:0も存在した。

【0372】

考察

結果は、室温においてヘキサンで複数回抽出と電動式乳鉢及び乳棒を用いた粉碎は、トランスジェニック種子からTAG含有オイルの大部分を回収するのに効果的であることを示した。中程度レベルのDHAを含むトランスジェニック種子からのオイルに加えて、トランスジェニック種子は、コントロール種子と比較して、大部分の脂質分類(トリアシルグリセロール、糖脂質及びリン脂質)中に著しく高いレベルのALAも含んでいた。このことは、15-デサチュラーゼ活性が、種子発育中に、トランスジェニック種子内で著しく増強されることを示した。興味深いことに、様々な抽出物及びフラクション中の脂肪酸組成及びDHAの比率においていくらかのわずかな差があり、DHAレベルは、TAGリッチヘキサン抽出物及びCM抽出からのTAG中でより高く(6%~6.8%)、極性脂質フラクション中でより低かった(糖脂質中3%及びリン脂質中1.6%)。16:0のレベルは、TAGリッチヘキサン抽出物及びCM抽出からのTAG(6%~7%)と比較して、CM抽出物中の糖脂質及びリン脂質の極性脂質フラクション中でより高かった(19%~21%)。

【表 19】

表 19. トランスジェニック及びコントロールアマナズナ属種子のステロール組成（総ステロール中の%）

ステロール類	トランスジェニック種子		コントロール種子	
	ヘキサシ	CM	ヘキサシ	CM
24-デヒドロコレステロール	0.8	1.8	0.5	1.4
コレステロール	5.7	7.6	4.7	7.2
ブラシカステロール	4.4	6.5	1.9	4.2
コレスター7-エン-3β-オール	0.2	0.5	0.3	0.4
カンペステロール	24.5	20.8	25.7	21.7
カンペスタノール	0.4	1.1	0.4	0.9
スチグマステロール	1.0	2.6	0.5	1.6
シトステロール	54.3	43.7	53.8	42.9
Δ5-アベナステロール(イソフコステロール)	4.2	5.2	4.7	5.5
合計	95.5	89.6	92.6	85.9
その他				
UN1 C28 1db	0.6	1.2	0.7	1.2
UN2 C29 1db	1.2	2.0	1.2	2.4
UN3 C29 2db	0.9	1.8	1.3	2.4
UN4 C28 1db	0.3	0.9	0.6	1.1
UN5 C30 2db	1.2	1.8	1.4	1.8
UN6 C29 1db + C30 2db	0.3	2.7	2.2	5.2
その他の合計	4.5	10.4	7.4	14.1
合計	100	100	100	100

略語：UNは未知ステロールを示し、Cの後の数字は炭素原子数を示し、dbは二重結合の数をしめす。

【0373】

トランスジェニック種子及びコントロール種子のステロール組成は、同じ大部分のステロールが存在する精製カメリナオイル（Shuklaら、2002）中で見られたものと同様であり、付加遺伝子が種子内のステロール合成に影響を及ぼさないことを示した。カメリナオイル中のコレステロールレベルは、大部分の植物オイルで生じるより高かった。カメリナサティバを含むアブラナ科（Brassicaceae）ファミリー内で見られる特徴的ステロールであるブラシカステロールが存在していた。

【0374】

実施例9．カラシナ種子内のLC-PUFAの産生

トランスジェニックセイヨウアブラナ植物を、以下のように、DHAの産生のため、GA7-modB構築物（実施例4）を用いて産生した。長日反応性変種のカラシナ種子を、Keresztら（2007）に記載のように塩素ガスを用いて滅菌した。滅菌種子を、pH5.8に調節した、0.8%寒天で固形化した1/2強化MS培地（Murashige及びSkoog、1962）で発芽させ、6～7日間、16/8時間（明/暗）光周期で、蛍光灯下（50μE/m²s）、24℃において生育した。2～4mm柄の子葉柄を、これらの苗から無菌的に単離し、移植片として使用した。アグロバクテリウム・ツメファシエンス（Agrobacterium tumefaciens）株AGL1を、バイナリーベクターGA7で形質転換した。アグロバクテリウム培養を開始し、Belideら（2013）に記

載のように感染処理した。全形質転換のため、約50の新たに単離した子葉柄を、6分間、アグロバクテリウム・ツメファシエンス10mlで感染させた。感染葉柄を、滅菌フィルターペーパー上で吸い取り、過剰なアグロバクテリウム・ツメファシエンスを除去して、共培養培地(1, 5mg/LのBA、0.01mg/LのNAA及び100µMアセトシリンゴンを含み、L-システイン(50mg/L)、アスコルビン酸(15mg/L)及びMES(250mg/L)を添加したMS)に移動した。全プレートをマイクロポアテープで密封し、共培養48時間24において、暗所でインキュベートした。それから、移植片を、事前選択培地(1.5mg/LのBA、0.01mg/LのNAA、3mg/LのAgNO₃、250mg/Lのセフトキシム及び50mg/Lのチメンチンを含むMS-寒天)に移動し、16/8時間光周期で、24において4~5日間培養した後、移植片を、事前選択培地(1.5mg/LのBA、0.01mg/LのNAA、3mg/LのAgNO₃、250mg/Lのセフトキシム、50mg/Lのチメンチン及び5mg/LのPPTを含むMS-寒天)に移動し、16/8時間光周期で、24において4週間培養した。緑色のカルスを有する移植片を、シュート形成培地(2.0mg/LのBA、3mg/LのAgNO₃、250mg/Lのセフトキシム、50mg/Lのチメンチン及び5mg/LのPPTを含むMS-寒天)に移動し、さらに2週間培養した。小さな再分化シュート芽を、ホルモンフリーMS培地(3mg/LのAgNO₃、250mg/Lのセフトキシム、50mg/Lのチメンチン及び5mg/LのPPTを含むMS-寒天)に移動し、さらに2~3週間培養した。

10

【0375】

20

少なくとも1.5cmのサイズの可能性のあるトランスジェニックシュートを単離し、発根誘導培地(0.5mg/LのNAA、3mg/LのAgNO₃、250mg/Lのセフトキシム及び50mg/Lのチメンチンを含むMS-寒天)に移動し、2~3週間培養した。PCRにより確認し、繁茂した根を有するトランスジェニックシュートを、温室内の土壤に移植し、22において16/8時間(明/暗)光周期下生育した。3つの確認されたトランスジェニック植物を得た。形質転換植物を温室で生育し、自家受粉させて、T1種子を収穫した。各T0形質転換植物からのT1種子のプールの脂質の脂肪酸組成を分析し、JT1-4と命名された1つの系統で、2.8%のDPA及び7.2%のDHAの存在を示したが、JT1-6と命名された別の系統は2.6%のDPAを示した。

【0376】

30

個々のT1種子の種子オイルを、脂肪酸組成について分析した；データのいくつかを表20に示す。JT1-4-A-13、JT1-4-A-5及びJT1-4-B-13を含むいくつかのT1種子は、総脂肪酸含有物の10%~約21%のレベルでDHAを産生した。驚くべきことに且つ予想外に、T1種子のいくつかは、総脂肪酸含有物の10%~約18%のレベルでDPAを含み、検出可能なDHAを含んでいなかった(<0.1%)。これらの種子についての1つの可能性ある説明は、これらの植物中に挿入されたT-DNAの4-デサチュラーゼ遺伝子が、たぶん、自然な突然変異により不活性であったというものである。T1種子を発芽し、各々からの1つの発生子葉を残りのオイル中の脂肪酸組成について分析した。各苗の残りを維持し、成熟するまで生育しT2種子を得た。

【0377】

40

1つのT-DNAインサクションに対してホモ接合であるトランスジェニック植物を同定し選択した。JT1-4-17と命名された1つの選択系統の植物は、1つのT-DNAインサクションを有し、DHAを産生し、同時に低レベルのみのDPAを産生するが、JT1-4-34と命名された第二選択系統も1つのT-DNAインサクションを有するが、DPAを産生し、DHAを産生しなかった。本発明者らは、最初の形質転換体は2つの別々のT-DNAを含んでいたが、1つはDHA産生を与えられ、他方はDHAでなくDPAの産生を与えられたと結論した。その種子内でDHAを産生するカラシナ植物を、その種子内でDPAを産生する植物と交配した。F1子孫は、双方のT-DNAインサクションに対してヘテロ接合である植物を含んでいた。これらの子孫植物からの種子を観察し、26%の総DHA+DPA含有率に対して、約20%のDHA及び約6%のDPAを

50

産生した。F 1 植物を自家受粉し、双方の T - D N A インサクションに対してホモ接合である子孫は、3 5 % までの D H A 及び D P A を産生すると期待される。

【 0 3 7 8 】

約 1 8 % の D P A を、J T 1 - 4 - 3 4 - 1 1 と命名された T 3 子孫のプール種子の脂質で観察した。同様に、約 1 7 . 5 % の D H A を、T 3 J T 1 - 4 - 1 7 - 2 0 の子孫のプール種子の脂質で観察した。J T 1 - 4 T 1 プール種子、T 1 単一種子、T 2 プール種子、T 2 単一種子、及び T 3 プール種子、T 3 単一種子の脂肪酸組成を、表 2 1 ~ 2 4 に示す。J T 1 - 4 T 3 分離個体 J T - 1 - 4 - 3 4 - 1 1 は、1 8 % のプール T 3 種子 D P A 含有率を有し、この特定の分離個体からの単一種子は、各々、総脂肪酸含有物のパーセントとして、約 2 6 % の D P A 含有率を有した。

10

【 0 3 7 9 】

1 7 . 9 % の D P A を有する種子のオイルについて、次のパラメーターを算出した：総飽和脂肪酸、6 . 8 % ；総一価不飽和脂肪酸、3 6 . 7 % ；総多価不飽和脂肪酸、5 6 . 6 % ；総 6 脂肪酸、7 . 1 % ；新 6 脂肪酸、0 . 4 % ；その全ては G L A であった；総 3 脂肪酸、4 6 . 5 % ；新 3 脂肪酸、2 4 . 0 % ；総 6 ：総 3 脂肪酸の比、6 . 5 ；新 6 ：新 3 脂肪酸の比、6 0 ； 1 2 - デサチュラーゼによるオレイン酸から L A への転換効率、6 1 % ； 6 - デサチュラーゼによる A L A から S D A への転換効率、5 1 % ； 6 - エロンガーゼによる S D A から E T A への転換効率、9 0 % ； 5 - デサチュラーゼによる E T A から E P A への転換効率、8 7 % ； 5 - エロンガーゼによる E P A から D P A への転換効率、9 8 % 。

20

【 0 3 8 0 】

m o d B 構築物で、カラシナのより多くのトランスジェニック植物を産生するため、形質転換を 5 回繰り返し、3 5 の推定トランスジェニックシュート / 苗を再生した。T 1 種子分析を実行し、D P A 及び D H A 含有率を決定する。

【 0 3 8 1 】

D P A を含み、D H A を含まないさらなる種子を産生するため、 4 - デサチュラーゼ遺伝子を、m o d B 構築物から欠失させて、得られた構築物を使用し、カラシナ及びセイヨウアブラナを形質転換した。種子脂質の総脂肪酸含有物中 3 5 % までの D P A を含む子孫種子を産生する。

【 0 3 8 2 】

D H A を産生する植物の種子から抽出されたオイルを N M R により検査し、少なくとも 9 5 % の D H A は、T A G 分子の s n - 1 , 3 位に存在していることが観察された。

30

【表 20 - 1】

表 20. GA7からのT-DNAで形質転換されたカラシナのT1種子の種子オイルの脂肪酸組成

T1種子No.	C16:0	16:1d9	C18:0	C18:1	C18:1d11	C18:2	C18:3n6	C18:3n3	C20:0	18:4n3	C20:1d11	C20:2n6	C20:3n3	20:4n3	20:5n3	22:5n3	C22:6n3
JT1-4-A-1	5.0	0.2	2.7	23.5	3.4	17.0	0.7	24.8	0.7	2.0	1.1	0.2	0.8	4.0	0.6	2.4	9.9
JT1-4-A-2	4.3	0.3	2.6	37.2	3.2	11.0	0.3	22.1	0.7	0.9	1.3	0.2	1.4	3.2	0.3	9.4	0.0
JT1-4-A-3	5.6	0.3	2.7	20.8	3.7	16.0	0.6	24.4	0.7	2.0	0.9	0.2	1.1	4.5	0.7	3.1	11.4
JT1-4-A-4	4.6	0.4	2.8	36.2	3.4	10.6	0.3	24.5	0.8	9.9	1.7	0.2	0.3	0.5	0.0	2.5	0.0
JT1-4-A-5	5.0	0.2	3.2	20.3	3.6	13.7	0.7	25.9	0.7	2.0	0.9	0.2	1.3	4.4	1.5	1.6	13.5
JT1-4-A-6	4.8	0.4	3.4	37.9	3.7	7.4	0.4	19.9	0.9	1.4	1.4	0.1	0.8	1.9	0.4	13.9	0.0
JT1-4-A-7	5.6	0.3	3.0	26.2	4.0	8.9	0.3	26.6	0.6	1.8	1.0	0.1	1.8	3.7	1.3	2.2	11.3
JT1-4-A-8	4.8	0.4	2.9	40.3	3.4	7.8	0.3	22.2	0.8	1.4	1.3	0.1	0.8	2.4	0.4	9.6	0.0
JT1-4-A-9	7.1	0.3	3.6	17.7	4.3	17.9	0.7	23.1	1.0	2.1	0.8	0.2	1.5	3.6	0.8	2.0	11.9
JT1-4-A-10	5.1	0.2	4.2	22.3	3.4	19.5	0.7	21.7	0.8	1.5	0.9	0.2	1.7	7.8	0.9	1.0	6.5
JT1-4-A-11	5.0	0.5	2.8	37.6	4.0	7.1	0.4	19.2	0.7	1.9	1.4	0.2	0.5	1.6	0.3	15.5	0.0
JT1-4-A-12	5.2	0.3	3.0	28.2	4.0	9.2	0.3	27.4	0.6	1.9	0.9	0.1	1.5	3.2	1.1	1.8	10.2
JT1-4-A-13	5.4	0.2	3.0	16.7	4.1	9.9	0.6	29.9	0.7	2.2	1.0	0.2	1.7	2.0	1.1	2.0	17.9
JT1-4-A-14	5.1	0.4	3.1	30.0	4.0	11.5	0.3	27.7	0.7	2.2	1.0	0.1	0.6	2.4	0.8	1.3	7.8
JT1-4-A-15	5.1	0.4	2.5	34.2	3.6	6.9	0.6	20.4	0.7	1.6	1.1	0.2	0.6	4.7	0.9	15.2	0.0
JT1-4-B-1	5.5	0.2	2.7	18.9	4.0	17.6	0.8	24.1	0.8	2.2	1.0	0.2	1.2	4.6	0.9	2.2	11.5
JT1-4-B-2	5.5	0.2	2.7	20.2	4.0	14.3	0.5	25.5	0.7	1.7	0.9	0.2	1.6	8.7	1.3	2.2	8.5
JT1-4-B-3	5.3	0.3	3.6	34.1	3.5	35.0	0.6	9.3	0.8	0.2	1.4	0.4	0.6	0.9	0.1	0.3	2.1
JT1-4-B-4	5.3	0.3	3.1	25.2	3.6	17.0	0.7	24.1	0.7	1.9	1.0	0.2	0.8	4.3	0.5	2.3	7.8
JT1-4-B-5	5.5	0.5	2.2	30.1	4.6	10.2	0.5	21.7	0.6	1.4	1.1	0.2	0.9	2.4	0.5	16.1	0.0
JT1-4-B-6	5.6	0.3	2.5	19.5	3.8	15.2	0.5	27.7	0.6	2.1	0.9	0.2	1.1	3.7	0.6	3.3	11.1

10

20

【表 20 - 2】

JT1-4-B-7	5.9	0.5	2.0	29.9	4.0	11.2	0.3	26.2	0.6	11.5	1.4	0.2	0.3	0.4	0.0	4.1	0.1
JT1-4-B-8	6.2	0.5	1.9	33.1	4.0	30.0	0.5	12.7	0.6	0.3	1.3	0.4	1.4	0.9	0.1	4.4	0.0
JT1-4-B-9	4.9	0.2	3.4	24.6	3.0	18.5	0.3	26.2	0.8	1.3	1.1	0.2	2.0	5.5	0.6	0.8	5.2
JT1-4-B-10	5.2	0.3	2.7	19.0	4.0	12.0	0.6	30.5	0.7	1.6	1.0	0.2	1.7	4.9	1.1	3.0	10.2
JT1-4-B-11	4.8	0.2	3.0	23.7	3.1	18.1	0.6	23.5	0.7	1.6	1.2	0.2	1.5	4.5	0.8	1.6	9.6
JT1-4-B-12	5.0	0.2	2.6	19.6	3.4	12.5	0.6	26.9	0.8	3.1	1.1	0.2	0.9	5.6	0.9	3.5	11.7
JT1-4-B-13	5.6	0.3	2.8	20.9	3.9	11.9	0.4	27.0	0.7	2.0	1.0	0.2	1.7	2.3	0.7	4.1	13.5
JT1-4-B-14	5.1	0.3	3.1	25.5	3.3	16.7	0.7	23.9	0.8	1.8	1.2	0.2	0.9	2.6	0.4	2.9	9.2
JT1-4-B-15	5.6	0.3	2.7	19.5	4.1	14.0	0.8	24.6	0.7	2.7	0.9	0.2	0.7	9.4	1.3	2.5	8.5

種子オイル試料は、0.1%のC14:0; 0.1~0.2%のC16:3; 0.0~0.1%の各C20:1Δ13、C20:3ω6及びC20:4ω6; 0.3~0.4%のC22:0も含み、C22:1とC22:2ω6を含まず; 0.2%のC24:0及び0.2~0.4%のC24:1を含む。

30

【表 21】

表 21. GA7-modBからのT-DNAで形質転換されたカラシナのT1種子(プール)の脂質の脂肪酸組成。脂質は、約0.1%の各14:0、16:3、20:1Δ13、及び16:2も含み、22:1は検出されなかった。

	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:1d11	C18:2	C18:3n6	C18:3n3	C20:0	18:4n3	C20:1d11	C20:2n6	C20:3n6	C20:4n6	C20:3n3	C22:0	20:4n3	20:5n3	C22:2n6	22:3n3	C24:0	C24:1	22:5n3	C22:6n3
JT1-2	4.2	0.3	2.5	42.4	3.2	27.7	0.1	16.4	0.6	0.0	1.2	0.1	0.0	0.0	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0	0.2	0.4	0.0	0.0	0.0
JT1-3	4.5	0.3	2.7	44.6	3.1	26.8	0.1	14.8	0.7	0.0	1.2	0.1	0.0	0.0	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0	0.2	0.4	0.0	0.0	0.0
JT1-4	5.1	0.3	3.2	26.8	3.5	17.4	0.5	22.8	0.7	2.5	1.1	0.2	0.0	0.0	1.2	0.3	2.9	0.7	0.0	0.1	0.2	0.3	2.8	7.2
JT1-5	4.7	0.4	2.4	41.6	3.4	28.4	0.1	15.8	0.7	0.0	1.2	0.1	0.0	0.0	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0	0.2	0.4	0.0	0.0	0.0
JT1-6	4.8	0.4	2.3	37.3	3.3	30.2	0.4	13.2	0.7	0.2	1.4	0.3	0.0	0.0	0.7	0.3	0.6	0.1	0.0	0.3	0.2	0.5	2.6	0.0

40

【表 2 2 - 1】

表 2 2. GA7-m o d BからのT-DNAで形質転換されたカラシナのT1種子(単一)の種子オイルの脂肪酸組成。

T1種子No.	C16:0	16:1d9	C18:0	C18:1	C18:1d11	C18:2	C18:3n6	C18:3n3	C20:0	18:4n3	C20:1d11	C20:2n6	C20:3n3	20:4n3	20:5n3	22:5n3	C22:6n3
JT1-4-A-1	5.0	0.2	2.7	23.5	3.4	17.0	0.7	24.8	0.7	2.0	1.1	0.2	0.8	4.0	0.6	2.4	9.9
JT1-4-A-2	4.3	0.3	2.6	37.2	3.2	11.0	0.3	22.1	0.7	0.9	1.3	0.2	1.4	3.2	0.3	9.4	0.0
JT1-4-A-3	5.6	0.3	2.7	20.8	3.7	16.0	0.6	24.4	0.7	2.0	0.9	0.2	1.1	4.5	0.7	3.1	11.4
JT1-4-A-4	4.6	0.4	2.8	36.2	3.4	10.6	0.3	24.5	0.8	9.9	1.7	0.2	0.3	0.5	0.0	2.5	0.0
JT1-4-A-5	5.0	0.2	3.2	20.3	3.6	13.7	0.7	25.9	0.7	2.0	0.9	0.2	1.3	4.4	1.5	1.6	13.5
JT1-4-A-6	4.8	0.4	3.4	37.9	3.7	7.4	0.4	19.9	0.9	1.4	1.4	0.1	0.8	1.9	0.4	13.9	0.0
JT1-4-A-7	5.6	0.3	3.0	26.2	4.0	8.9	0.3	26.6	0.6	1.8	1.0	0.1	1.8	3.7	1.3	2.2	11.3
JT1-4-A-8	4.8	0.4	2.9	40.3	3.4	7.8	0.3	22.2	0.8	1.4	1.3	0.1	0.8	2.4	0.4	9.6	0.0
JT1-4-A-9	7.1	0.3	3.6	17.7	4.3	17.9	0.7	23.1	1.0	2.1	0.8	0.2	1.5	3.6	0.8	2.0	11.9
JT1-4-A-10	5.1	0.2	4.2	22.3	3.4	19.5	0.7	21.7	0.8	1.5	0.9	0.2	1.7	7.8	0.9	1.0	6.5
JT1-4-A-11	5.0	0.5	2.8	37.6	4.0	7.1	0.4	19.2	0.7	1.9	1.4	0.2	0.5	1.6	0.3	15.5	0.0
JT1-4-A-12	5.2	0.3	3.0	28.2	4.0	9.2	0.3	27.4	0.6	1.9	0.9	0.1	1.5	3.2	1.1	1.8	10.2
JT1-4-A-13	5.4	0.2	3.0	16.7	4.1	9.9	0.6	29.9	0.7	2.2	1.0	0.2	1.7	2.0	1.1	2.0	17.9
JT1-4-A-14	5.1	0.4	3.1	30.0	4.0	11.5	0.3	27.7	0.7	2.2	1.0	0.1	0.6	2.4	0.8	1.3	7.8
JT1-4-A-15	5.1	0.4	2.5	34.2	3.6	6.9	0.6	20.4	0.7	1.6	1.1	0.2	0.6	4.7	0.9	15.2	0.0
JT1-4-B-1	5.5	0.2	2.7	18.9	4.0	17.6	0.8	24.1	0.8	2.2	1.0	0.2	1.2	4.6	0.9	2.2	11.5
JT1-4-B-2	5.5	0.2	2.7	20.2	4.0	14.3	0.5	25.5	0.7	1.7	0.9	0.2	1.6	8.7	1.3	2.2	8.5
JT1-4-B-3	5.3	0.3	3.6	34.1	3.5	35.0	0.6	9.3	0.8	0.2	1.4	0.4	0.6	0.9	0.1	0.3	2.1
JT1-4-B-4	5.3	0.3	3.1	25.2	3.6	17.0	0.7	24.1	0.7	1.9	1.0	0.2	0.8	4.3	0.5	2.3	7.8
JT1-4-B-5	5.5	0.5	2.2	30.1	4.6	10.2	0.5	21.7	0.6	1.4	1.1	0.2	0.9	2.4	0.5	16.1	0.0
JT1-4-B-6	5.6	0.3	2.5	19.5	3.8	15.2	0.5	27.7	0.6	2.1	0.9	0.2	1.1	3.7	0.6	3.3	11.1

【表 2 2 - 2】

JT1-4-B-7	5.9	0.5	2.0	29.9	4.0	11.2	0.3	26.2	0.6	11.5	1.4	0.2	0.3	0.4	0.0	4.1	0.1
JT1-4-B-8	6.2	0.5	1.9	33.1	4.0	30.0	0.5	12.7	0.6	0.3	1.3	0.4	1.4	0.9	0.1	4.4	0.0
JT1-4-B-9	4.9	0.2	3.4	24.6	3.0	18.5	0.3	26.2	0.8	1.3	1.1	0.2	2.0	5.5	0.6	0.8	5.2
JT1-4-B-10	5.2	0.3	2.7	19.0	4.0	12.0	0.6	30.5	0.7	1.6	1.0	0.2	1.7	4.9	1.1	3.0	10.2
JT1-4-B-11	4.8	0.2	3.0	23.7	3.1	18.1	0.6	23.5	0.7	1.6	1.2	0.2	1.5	4.5	0.8	1.6	9.6
JT1-4-B-12	5.0	0.2	2.6	19.6	3.4	12.5	0.6	26.9	0.8	3.1	1.1	0.2	0.9	5.6	0.9	3.5	11.7
JT1-4-B-13	5.6	0.3	2.8	20.9	3.9	11.9	0.4	27.0	0.7	2.0	1.0	0.2	1.7	2.3	0.7	4.1	13.5
JT1-4-B-14	5.1	0.3	3.1	25.5	3.3	16.7	0.7	23.9	0.8	1.8	1.2	0.2	0.9	2.6	0.4	2.9	9.2
JT1-4-B-15	5.6	0.3	2.7	19.5	4.1	14.0	0.8	24.6	0.7	2.7	0.9	0.2	0.7	9.4	1.3	2.5	8.5

種子オイル試料は、0.1%のC14:0; 0.1~0.2%のC16:3; 0.0~0.1%の各C20:1Δ13、C20:3ω6及びC20:4ω6; 0.3~0.4%のC22:0も含み、C22:1とC22:2ω6を含まず; 0.2%のC24:0及び0.2~0.4%のC24:1を含む。

【表 2 3 - 1】

表 2 3. GA7-m o d BからのT-DNAで形質転換されたカラシナのT2単一種子の種子オイルの脂肪酸組成。

単一	C16:0	16:1d9	16:3	C18:0	C18:1	C18:1d11	C18:2	C18:3n6	C18:3n3	C20:0	18:4	C20:1d11	C20:2n6	C20:3n6	C20:4n6	C20:5n3	C22:0	20:4n3	20:5n3	C22:2n6	C22:3n3	C24:0	22:5n6	22:4n3?	C24:1	22:5n3	C22:6n3
JT-1-4-19	4.4	0.3	0.2	1.7	36.3	2.9	8.3	0.5	22.0	0.5	1.4	1.2	0.1	0.0	0.0	0.4	0.3	4.2	0.6	0.0	0.1	0.1	0.0	1.8	0.3	12.1	0.0
JT-1-4-19	5.6	0.4	0.1	1.9	39.1	3.1	8.4	0.4	18.9	0.6	1.2	1.3	0.1	0.0	0.0	0.5	0.3	2.5	0.4	0.0	0.1	0.2	0.0	1.5	0.4	12.6	0.0
JT-1-4-19	5.5	0.4	0.2	1.8	42.3	3.2	9.9	0.3	24.0	0.6	5.9	1.5	0.2	0.0	0.0	0.2	0.4	0.5	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0	0.4	0.4	1.5	0.0
JT-1-4-19	4.7	0.3	0.1	2.3	42.1	2.8	10.0	0.2	27.1	0.6	4.1	1.6	0.2	0.0	0.0	0.2	0.3	0.5	0.0	0.0	0.1	0.2	0.0	0.6	0.3	1.4	0.0
JT-1-4-19	5.6	0.4	0.1	1.5	36.8	3.7	9.4	0.3	19.6	0.5	0.6	1.4	0.2	0.0	0.0	1.4	0.3	1.9	0.3	0.0	0.2	0.2	0.0	1.6	0.4	13.1	0.0
JT-1-4-19	4.6	0.3	0.1	1.7	36.3	2.7	7.2	0.3	22.6	0.5	1.0	1.5	0.1	0.0	0.0	0.7	0.3	2.1	0.3	0.0	0.1	0.2	0.0	2.2	0.3	14.4	0.0
JT-1-4-19	4.9	0.3	0.1	1.8	38.3	3.1	7.4	0.3	20.2	0.5	0.8	1.3	0.1	0.0	0.0	0.8	0.3	2.7	0.5	0.0	0.2	0.2	0.0	1.7	0.3	13.7	0.0
JT-1-4-19	4.7	0.3	0.1	1.7	36.2	3.0	8.2	0.4	20.9	0.5	0.7	1.3	0.2	0.0	0.0	0.9	0.3	2.9	0.5	0.0	0.2	0.2	0.0	2.0	0.3	14.2	0.0
JT-1-4-19	4.8	0.3	0.1	2.2	41.0	3.0	9.8	0.2	27.0	0.5	4.2	1.8	0.2	0.0	0.0	0.3	0.3	0.5	0.0	0.0	0.1	0.2	0.0	0.7	0.3	2.2	0.0
JT-1-4-19	5.8	0.5	0.1	1.7	36.6	3.7	9.1	0.3	21.3	0.6	0.9	1.4	0.2	0.0	0.0	0.8	0.3	1.5	0.3	0.0	0.1	0.2	0.0	1.2	0.4	12.7	0.0
JT-1-4-19	4.8	0.4	0.1	2.1	47.1	2.9	7.4	0.2	23.9	0.6	4.8	1.7	0.1	0.0	0.0	0.2	0.3	0.5	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0	0.5	0.3	1.5	0.0
JT-1-4-19	5.1	0.4	0.1	1.7	37.4	3.3	7.7	0.3	20.7	0.6	0.9	1.4	0.1	0.0	0.0	0.8	0.3	2.5	0.4	0.0	0.1	0.2	0.0	1.6	0.4	13.6	0.0
JT-1-4-19	4.7	0.3	0.1	1.8	37.3	2.7	7.9	0.4	20.6	0.5	1.1	1.3	0.1	0.0	0.0	0.5	0.3	4.3	0.6	0.0	0.1	0.1	0.0	2.2	0.3	12.3	0.0
JT-1-4-19	4.9	0.3	0.2	2.0	37.9	3.0	7.1	0.4	20.1	0.5	1.1	1.3	0.1	0.0	0.0	0.6	0.3	4.1	0.5	0.0	0.1	0.1	0.0	2.1	0.3	12.6	0.0
JT-1-4-19	4.7	0.3	0.1	1.6	35.7	3.2	6.9	0.3	22.4	0.5	0.7	1.4	0.1	0.0	0.0	1.3	0.3	3.0	0.5	0.0	0.2	0.1	0.0	1.9	0.3	14.0	0.0
JT-1-4-34	4.7	0.4	0.1	1.8	37.6	3.4	7.8	0.3	23.7	0.5	0.6	1.5	0.2	0.0	0.0	1.2	0.2	1.7	0.3	0.0	0.2	0.1	0.0	1.8	0.3	11.4	0.0
JT-1-4-34	5.3	0.4	0.1	1.6	35.3	3.5	8.1	0.5	21.1	0.5	0.8	1.2	0.1	0.0	0.0	0.7	0.3	3.1	0.5	0.0	0.2	0.1	0.0	1.9	0.3	13.9	0.0
JT-1-4-34	4.9	0.3	0.1	1.7	39.4	3.3	7.7	0.3	21.1	0.5	0.7	1.4	0.2	0.0	0.0	0.8	0.3	2.0	0.3	0.0	0.2	0.1	0.0	1.7	0.3	12.3	0.0

【表 2 3 - 2】

JT-1-4-34	5.0	0.3	0.1	1.8	38.5	3.1	7.8	0.4	20.5	0.5	0.8	1.3	0.2	0.0	0.0	0.8	0.2	2.3	0.3	0.0	0.2	0.1	0.0	2.0	0.3	13.1	0.0
JT-1-4-34	5.1	0.3	0.1	1.8	39.5	2.9	9.0	0.2	22.2	0.6	0.6	1.5	0.2	0.0	0.0	1.0	0.3	1.7	0.2	0.0	0.1	0.2	0.0	1.6	0.3	10.2	0.0
JT-1-4-34	4.8	0.3	0.1	1.8	38.2	3.2	7.8	0.4	21.1	0.5	0.7	1.4	0.2	0.0	0.0	0.7	0.3	2.1	0.4	0.0	0.2	0.1	0.0	1.7	0.3	13.3	0.0
JT-1-4-34	5.0	0.3	0.1	2.0	39.7	2.9	7.9	0.4	20.2	0.5	0.7	1.3	0.1	0.0	0.0	0.7	0.3	2.3	0.3	0.0	0.2	0.1	0.0	1.9	0.3	12.2	0.0
JT-1-4-34	4.7	0.3	0.1	1.6	36.0	3.3	8.3	0.3	23.7	0.5	0.6	1.5	0.2	0.0	0.0	1.2	0.3	1.7	0.3	0.0	0.2	0.1	0.0	1.8	0.3	12.7	0.0
JT-1-4-34	6.2	0.5	0.2	2.1	32.0	4.4	7.2	0.6	19.4	0.6	1.2	1.2	0.2	0.0	0.0	0.6	0.4	2.2	0.5	0.0	0.3	0.2	0.0	1.6	0.4	17.6	0.0

【表 2 4 - 1】

表 2 4 . G A 7 - m o d B からの T - D N A で形質転換されたカラシナの T 3 単一種子の種子オイルの脂肪酸組成。

	C16:0	16:1n9	16:3	C18:0	C18:1	C18:1n7	C18:2	C18:3n6	C18:3n3	C20:0	18:4	C20:1n11	20:1n3	C20:2n6	C20:3n6	C20:4n6	C20:5n3	C22:0	20:4n3	20:5n3	C22:2n6	C22:3n3	22:5n6	22:4n3	C24:1	22:5n3	C22:6n3
JT-1-4-34-11	4.8	0.4	0.1	2.8	38.4	3.7	5.7	0.4	18.0	0.7	1.0	1.5	0.1	0.1	0.0	0.0	1.1	0.3	1.4	0.4	0.0	0.3	0.0	1.4	0.5	16.3	0.
JT-1-4-34-11	4.3	0.4	0.1	3.0	43.3	3.6	5.2	0.2	18.5	0.7	0.8	1.7	0.1	0.1	0.0	0.0	1.4	0.3	1.2	0.3	0.0	0.2	0.0	1.2	0.3	12.4	0.
JT-1-4-34-11	4.6	0.4	0.1	2.8	33.1	4.1	5.1	0.4	18.5	0.7	1.2	1.4	0.1	0.1	0.0	0.0	1.1	0.3	1.6	0.5	0.0	0.3	0.0	1.4	0.4	20.8	0.
JT-1-4-34-11	4.5	0.4	0.1	2.9	39.5	3.3	6.3	0.4	18.5	0.8	1.2	1.5	0.1	0.1	0.0	0.0	1.0	0.3	1.7	0.3	0.0	0.2	0.0	1.8	0.3	14.2	0.
JT-1-4-34-11	4.9	0.5	0.2	2.8	32.2	3.9	4.7	0.3	20.7	0.8	1.2	1.4	0.1	0.2	0.0	0.0	2.0	0.3	1.4	0.5	0.0	0.3	0.0	1.2	0.4	19.4	0.
JT-1-4-34-11	4.3	0.3	0.1	3.0	38.1	3.2	5.8	0.3	19.4	0.7	1.1	1.5	0.1	0.1	0.0	0.0	1.2	0.3	1.5	0.4	0.0	0.2	0.0	1.3	0.4	16.0	0.
JT-1-4-34-11	5.4	0.5	0.2	3.2	29.3	4.0	4.6	0.4	18.6	0.9	1.7	1.3	0.1	0.1	0.0	0.0	1.2	0.4	1.6	0.7	0.0	0.3	0.0	1.4	0.5	22.9	0.
JT-1-4-34-11	5.2	0.5	0.2	3.7	34.5	4.1	4.5	0.3	17.2	1.0	1.4	1.4	0.1	0.1	0.0	0.0	1.5	0.4	1.4	0.6	0.0	0.3	0.0	1.2	0.5	19.4	0.
JT-1-4-34-11	5.3	0.5	0.1	3.4	33.4	3.7	4.6	0.3	17.6	0.9	1.7	1.2	0.1	0.1	0.0	0.0	1.1	0.4	1.5	0.6	0.0	0.2	0.0	1.2	0.5	20.7	0.
JT-1-4-34-11	4.6	0.4	0.1	3.0	39.5	3.5	5.1	0.3	17.8	0.8	0.8	1.6	0.1	0.1	0.0	0.0	1.4	0.4	1.3	0.4	0.0	0.3	0.0	1.3	0.4	16.1	0.
JT-1-4-34-11	4.3	0.4	0.1	3.1	41.7	3.5	5.6	0.2	19.0	0.7	0.9	1.6	0.1	0.1	0.0	0.0	1.3	0.3	1.4	0.3	0.0	0.2	0.0	1.5	0.3	12.7	0.
JT-1-4-34-11	4.8	0.5	0.2	2.8	33.8	4.0	5.3	0.4	18.2	0.7	1.4	1.3	0.1	0.1	0.0	0.0	1.2	0.3	1.6	0.6	0.0	0.3	0.0	1.3	0.4	20.1	0.
JT-1-4-34-11	4.4	0.4	0.1	3.5	40.3	3.5	5.2	0.2	19.1	0.7	1.0	1.5	0.1	0.1	0.0	0.0	1.6	0.3	1.4	0.4	0.0	0.2	0.0	1.4	0.3	13.8	0.
JT-1-4-34-11	4.8	0.4	0.1	3.2	36.1	3.7	5.9	0.3	19.9	0.7	1.4	1.3	0.1	0.1	0.0	0.0	1.1	0.3	1.9	0.5	0.0	0.2	0.0	1.7	0.3	15.4	0.

【表 2 4 - 2】

JT-1-4-34-11	4.0	0.3	0.1	2.8	37.2	3.2	4.9	0.3	19.6	0.8	0.9	1.6	0.1	0.1	0.0	0.0	1.5	0.4	1.3	0.5	0.0	0.3	0.0	1.1	0.4	17.9	0.
JT-1-4-34-11	4.5	0.4	0.1	3.8	36.7	3.2	4.5	0.2	19.0	0.9	1.1	1.4	0.1	0.1	0.0	0.0	1.8	0.4	1.2	0.5	0.0	0.2	0.0	1.0	0.5	17.8	0.
JT-1-4-34-11	5.2	0.4	0.2	2.8	27.8	3.7	5.3	0.5	18.3	0.8	1.7	1.3	0.1	0.1	0.0	0.0	1.0	0.4	1.9	0.7	0.0	0.3	0.0	1.7	0.5	24.7	0.
JT-1-4-34-11	5.4	0.6	0.2	2.8	31.7	4.1	4.6	0.3	18.5	0.8	1.3	1.3	0.1	0.1	0.0	0.0	1.4	0.4	1.4	0.6	0.0	0.2	0.0	1.3	0.4	21.8	0.
JT-1-4-34-11	6.4	0.6	0.1	2.7	30.3	3.5	4.1	0.4	16.1	0.8	2.1	1.1	0.1	0.1	0.0	0.0	0.9	0.4	1.4	0.7	0.0	0.2	0.0	1.1	0.5	25.8	0.
JT-1-4-34-11	4.3	0.3	0.1	3.2	39.2	3.3	5.7	0.2	20.1	0.7	0.9	1.6	0.1	0.1	0.0	0.0	1.7	0.3	1.3	0.3	0.0	0.2	0.0	1.3	0.3	14.1	0.
JT-1-4-34-21	4.2	0.4	0.1	2.3	39.9	3.9	5.9	0.3	20.2	0.6	0.9	1.6	0.1	0.1	0.0	0.0	1.1	0.3	1.5	0.3	0.0	0.3	0.0	1.8	0.4	13.3	0.
JT-1-4-34-21	4.4	0.4	0.1	2.7	38.8	3.9	5.7	0.4	18.5	0.6	1.3	1.3	0.1	0.1	0.0	0.0	0.8	0.3	1.8	0.4	0.0	0.3	0.0	1.7	0.3	15.6	0.
JT-1-4-34-21	4.2	0.4	0.1	2.0	42.4	3.6	6.0	0.4	19.1	0.5	1.0	1.6	0.1	0.1	0.0	0.0	0.9	0.2	1.5	0.3	0.0	0.3	0.0	1.6	0.3	12.9	0.

【 0 3 8 3 】

実施例 1 0 . 形質転換植物のさらなる分析及び実地試験

サザンブロットハイブリダイゼーション解析を、G A 7 - m o d B 構築物からの T - D N A で形質転換された選択 T 2 セイヨウアブラナ植物に対して実行した。植物組織試料から抽出された D N A を、サザンブロットハイブリダイゼーション解析のためいくつかの制限酵素で消化した。T - D N A 部分に対応する放射活性プローブを、該ブロットにハイブリダイズし、ストリンジェントな条件下洗浄し、ブロットを膜に暴露してハイブリダイズするバンドを検出した。試料のいくつかは、植物の 1 つの T - D N A インサージョンに対応する各制限酵素の単一ハイブリダイズバンドを示したが、他は、2 本のバンドを示し、また、他は、4 つ～6 つのインサージョンに対応する複数の T - D N A バンドを示した。サザンブロット解析により観察されたハイブリダイズバンド数は、デジタル P C R 法により決定されるとき、約 3 または 4 のコピー数まで、トランスジェニック植物の T - D N A コピー数とよく相関した。約 5 より大きいコピー数においては、デジタル P C R 法はあまり信頼性ができなかった。

【 0 3 8 4 】

選択系統のいくつかを、異なる遺伝子背景の一連の約 3 0 種の異なるセイヨウアブラナ変種との交配において花粉ドナーとして使用した。さらに、戻し交配を実行し、複数の T - D N A インサージョンが遺伝的に連鎖しているかどうかを示し、遺伝的に連鎖していないトランスジェニック遺伝子座の分離個体を可能とする。それにより、単一トランスジェニック遺伝子座を含む系統を選択する。

【 0 3 8 5 】

単一プライマー P C R 反応を、T - D N A の左右境界と隣接するプライマーを用いて、

トランスジェニック系統に対して実行し、T-DNAの逆方向反復の存在を示すいずれも
の系統を処分する。

【0386】

トランスジェニック系統のいくつかは、遅い開花を示し、一方、他は結実を減少し、従
って、温室での生育後の植物当たりの種子収率が低下し、雌または雄生殖能力の低下と一
致していた。花の形態をこれらの植物で調査し、いくつかの場合、葯から花粉の裂開及び
放出が遅いので、裂開が起こる前に花柱が伸びて、それ故、柱頭から葯まで距離が遠ざか
った。完全な受精率は人為的受粉により回復できる。さらに、裂開におけるは分生存率を
、生体染色FDA及びPIでの染色(実施例1)により決定し、系統のいくつかで減少し
ているが、トランスジェニック系統の大部分では、花粉生存率は、野生型コントロールの
ほぼ100%であることが分かった。いくつかの植物での種子収率低下の可能性のある原因
についてさらなる試験として、いくつかのT3及びT4の葯及び柱頭/花柱を含む花芽
の脂肪酸含有率及び組成を試験した。抽出脂質中でDHAは検出されず、遺伝子構築物の
遺伝子が植物の生育中に花芽内で発現されなかったことを示し、種子収率低下の原因とし
て、これを除外した。

10

【0387】

オイル含有率をNMRにより測定し、総脂肪酸含有物中のDHAレベルを、T2種子に
ついて決定した。6%未満のDHAを含むトランスジェニック系統を処分した。T1、T
2及びT3世代の植物からの葉試料のT-DNAコピー数を、デジタルPCR法(実施例
1)により決定した。

20

【0388】

選択T3及びT4種子ロットを、オーストラリア、ビクトリアの2カ所の場所において
、各々、約10種子/mの播種密度で、10m作条で、畑に播種した。選択種子ロットは
、約8~11%のプール種子DHAレベル、約19%までの個々のT2種子DHAレベル
を示し、T0植物T-DNAコピー数が3であるB003-5-14由来系統を含んでいた。
選択種子ロットは、20%を超えるT2種子DHAレベル、及び1または2のT2植物
T-DNAコピー数を示したB0050-27由来系統も含んでいた。畑に播種された
種子は発芽し、小植物は、野生型種子と同じ速度で発生した。大部分だが、全てではない
播種された種子ロットから生育した植物は、表現的に正常であり、例えば、形態、生育速
度、草高、雌雄生殖能力、花粉生存率(100%)、結実、長角果サイズ及び同条件下生
育した野生型コントロール植物と本質的に同じである形態を有した。植物当たりの種子収
率は、同条件下生育した野生型コントロールと同様であった。他の種子試料を、より大き
な面積で播種し、選択トランスジェニック系統を大きくした。収穫した種子中の総DHA
含有量は、少なくとも30mg/種子gであった。

30

【0389】

広範に記載された本発明の精神または範囲から逸脱することなく、具体的実施形態で示
したように、本発明に多数の変化形及び/または修飾が成され得ることを、当業者は認識
するであろう。従って、本実施形態は、あらゆる点で、例証であって、制限されるもので
はないと見なすべきである。

【0390】

本願は、2013年12月18日に出願されたAU2013905033、及び201
4年6月27日に出願されたAU2014902471の優先権を主張し、これら両方の
全内容は、参照することにより、本明細書に組み入れられるものとする。本明細書におい
て述べた及び/または参照した全出版物は、その全文において、本明細書に組み入れられ
るものとする。

40

【0391】

本明細書中に含まれた文書、行為、物質、装置、物品などのいかなる考察も、本発明の
ための状況を提供するためのものだけのものである。本願の各請求範囲の優先日前に存在
したので、いずれかまたは全てのこれらの物質が先行技術の基礎の部分形成するまたは
本発明に関連する分野で共通する一般知識であったとの承認であると解釈するべきでない

50

。

本発明は以下の態様を包含し得る。

[1] エステル化された形態の脂肪酸を含み、前記脂肪酸は、オレイン酸、パルミチン酸、リノール酸 (L A) を含む 6 脂肪酸、 - リノレン酸 (A L A) 及びドコサヘキサエン酸 (D H A) を含み、場合により、ステアリドン酸 (S D A) 、エイコサペンタエン酸 (E P A) 、ドコサペンタエン酸 (D P A) 及びエイコサテトラエン酸 (E T A) のうち 1 つ以上を含んでもよい 3 脂肪酸を含み、前記抽出脂質の総脂肪酸含有量におけるパルミチン酸のレベルが、約 2 % から 1 6 % の間であり、前記抽出脂質の総脂肪酸含有量におけるミリスチン酸 (C 1 4 : 0) のレベルが、存在する場合、1 % 未満であり、前記抽出脂質の総脂肪酸含有量における D H A のレベルが、2 0 . 1 % から 3 0 % の間または 2 0 . 1 % から 3 5 % の間である、抽出植物脂質。

10

[2] エステル化された形態の脂肪酸を含み、前記脂肪酸は、オレイン酸、パルミチン酸、リノール酸 (L A) を含む 6 脂肪酸、 - リノレン酸 (A L A) 及びドコサペンタエン酸 (D P A) を含み、場合により、ステアリドン酸 (S D A) 、エイコサペンタエン酸 (E P A) 、及びエイコサテトラエン酸 (E T A) のうち 1 つ以上を含んでもよい 3 脂肪酸を含み、前記抽出脂質の総脂肪酸含有量における D P A のレベルが、7 % から 3 5 % の間である、抽出植物脂質または微生物脂質。

[3] 以下の特徴：

i) 前記抽出脂質の総脂肪酸含有量におけるパルミチン酸のレベルは、約 2 % から 1 5 % の間、または約 3 % から 1 0 % の間であること、

20

i i) 前記抽出脂質の総脂肪酸含有量におけるミリスチン酸 (C 1 4 : 0) のレベルは、約 0 . 1 % であること、

i i i) 該抽出脂質の総脂肪酸含有量におけるオレイン酸のレベルは、約 1 % から約 3 0 % の間、約 3 % から約 3 0 % の間、約 6 % から約 3 0 % の間、約 1 % から約 2 0 % の間、約 3 0 % から約 6 0 % の間、約 4 5 % ~ 約 6 0 % 、約 3 0 % 、または約 1 5 % から約 3 0 % の間であること、

i v) 該抽出脂質の総脂肪酸含有量におけるリノール酸 (L A) のレベルは、約 4 % から約 3 5 % の間、約 4 % から約 2 0 % の間、約 4 % から約 1 7 % の間、または約 5 % から約 1 0 % の間であること、

30

v) 該抽出脂質の総脂肪酸含有量における - リノレン酸 (A L A) のレベルは、約 4 % から約 4 0 % の間、約 7 % から約 4 0 % の間、約 1 0 % から約 3 5 % の間、約 2 0 % から約 3 5 % の間、約 4 % から約 1 6 % の間、または約 2 % から約 1 6 % の間であること、

v i) 前記抽出脂質の総脂肪酸含有量における - リノレン酸 (G L A) のレベルは、4 % 未満、約 3 % 未満、約 2 % 未満、約 1 % 未満、約 0 . 5 % 未満、0 . 0 5 % から 7 % の間、0 . 0 5 % から 4 % の間、0 . 0 5 % から約 3 % の間、または 0 . 0 5 % から約 2 % の間であること、

v i i) 該抽出脂質の総脂肪酸含有量におけるステアリドン酸 (S D A) のレベルは、約 1 0 % 未満、約 8 % 未満、約 7 % 未満、約 6 % 未満、約 4 % 未満、約 3 % 未満、約 0 . 0 5 % から約 7 % の間、約 0 . 0 5 % から約 6 % の間、約 0 . 0 5 % から約 4 % の間、約 0 . 0 5 % から約 3 % の間、約 0 . 0 5 % から約 1 0 % の間、または約 0 . 0 5 % から約 2 % の間であること、

40

v i i i) 該抽出脂質の総脂肪酸含有量におけるエイコサテトラエン酸 (E T A) のレベルは、約 6 % 未満、約 5 % 未満、約 4 % 未満、約 1 % 未満、約 0 . 5 % 未満、0 . 0 5 % から約 6 % の間、0 . 0 5 % から約 5 % の間、0 . 0 5 % から約 4 % の間、0 . 0 5 % から約 3 % の間、または 0 . 0 5 % から約 2 % の間であること、

i x) 該抽出脂質の総脂肪酸含有量におけるエイコサトリエン酸 (E T r A) のレベルは、4 % 未満、約 2 % 未満、約 1 % 未満、0 . 0 5 % から 4 % の間、0 . 0 5 % から 3 % の間、または 0 . 0 5 % から約 2 % の間、または 0 . 0 5 % から約 1 % の間であること、

x) 該抽出脂質の総脂肪酸含有量におけるエイコサペンタエン酸 (E P A) のレベルは

50

、4%から15%の間、4%未満、約3%未満、約2%未満、0.05%から10%の間、0.05%から5%の間、0.05%から約3%の間、または0.05%から約2%の間であること、

x i) もし、前記抽出脂質の総脂肪酸含有量におけるDHAのレベルが、20.1%から30%の間または20.1%から35%の間であるならば、前記抽出脂質の総脂肪酸含有量におけるドコサペンタエン酸(DPA)のレベルは、4%未満、約3%未満、約2%未満、0.05%から8%の間、0.05%から5%の間、0.05%から約3%の間、5%から15%の間、5%から10%の間、または0.05%から約2%の間であること、

x i i) 該抽出脂質の総脂肪酸含有量におけるDHAのレベルは、約22%、約24%、約26%、約28%、約31%、20.1%から29%の間、20.1%から28%の間、20.1%から27%の間、20.1%から26%の間、20.1%から25%の間、20.1%から24%の間、21%から35%の間、21%から30%の間、21%から28%の間、21%から約26%の間、または21%から約24%の間であること、

x i i i) 該脂質は、その脂肪酸含有物中に 6 - ドコサペンタエン酸(22:5⁴, 7, 10, 13, 16)を含むこと、

x i v) 該脂質は、その脂肪酸含有物中に0.1%未満の 6 - ドコサペンタエン酸(22:5⁴, 7, 10, 13, 16)を含むこと、

x v) 該脂質は、その脂肪酸含有物中に0.1%未満の1つ以上または全てのSDA、EPA及びETAを含むこと、

x v i) 該抽出脂質の総脂肪酸含有量における総飽和脂肪酸レベルは、約4%から約25%の間、約4%から約20%の間、約6%から約20%の間、または約6%から約12%の間であること、

x v i i) 該抽出脂質の総脂肪酸含有量における総一価不飽和脂肪酸レベルは、約4%から約40%の間、約4%から約35%の間、約8%から約25%の間、8%から約22%の間、約15%から約40%の間または約15%から約35%の間であること、

x v i i i) 該抽出脂質の総脂肪酸含有量における総多価不飽和脂肪酸レベルは、約20%から約75%の間、30%から75%の間、約50%から約75%の間、約60%、約65%、約70%、約75%、または約60%から約75%の間であること、

x i x) 該抽出脂質の総脂肪酸含有量における総 6 脂肪酸レベルは、約35%から約50%の間、約20%から約35%の間、約6%から約20%の間、20%未満、約16%未満、約10%未満、約1%から約16%の間、約2%から約10%の間、または約4%から約10%の間であること、

x x) 該抽出脂質の総脂肪酸含有量における新 6 脂肪酸レベルは、約10%未満、約8%未満、約6%未満、4%未満、約1%から約20%の間、約1%から約10%の間、0.5%から約8%の間、または0.5%から4%の間であること、

x x i) 該抽出脂質の総脂肪酸含有量における総 3 脂肪酸レベルは、36%から約65%の間、36%から約70%の間、40%から約60%の間、約30%から約60%の間、約35%から約60%の間、40%から約65%の間、約30%から約65%の間、約35%から約65%の間、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%または約70%であること、

x x i i) 該抽出脂質の総脂肪酸含有量における新 3 脂肪酸レベルは、21%から約45%の間、21%から約35%の間、約23%から約35%の間、約25%から約35%の間、約27%から約35%の間、約23%、約25%、約27%、約30%、約35%、約40%または約45%であること、

x x i i i) 該抽出脂質の総脂肪酸含有量における総 6 脂肪酸：総 3 脂肪酸の比は、約1.0から約3.0の間、約0.1から約1の間、約0.1から約0.5の間、約0.50未満、約0.40未満、約0.30未満、約0.20未満、約0.15未満、約1.0、約0.1、約0.10～約0.4、または約0.2であること、

x x i v) 該抽出脂質の総脂肪酸含有量における新 6 脂肪酸：新 3 脂肪酸の比は、

10

20

30

40

50

約 1.0 から約 3.0 の間、約 0.02 から約 0.1 の間、約 0.1 から約 1 の間、約 0.1 から約 0.5 の間、約 0.50 未満、約 0.40 未満、約 0.30 未満、約 0.20 未満、約 0.15 未満、約 0.02、約 0.05、約 0.1、約 0.2 または約 1.0 であること、

xxv) 該脂質の脂肪酸組成は、少なくとも約 60%、少なくとも約 70%、少なくとも約 80%、約 60% から約 98% の間、約 70% から約 95% の間、または約 75% から約 90% の間の 12 - デサチュラーゼによるオレイン酸から LA への転換効率に基づくこと、

xxvi) 該脂質の脂肪酸組成は、少なくとも約 30%、少なくとも約 40%、少なくとも約 50%、少なくとも約 60%、少なくとも約 70%、約 30% から約 70% の間、約 35% から約 60% の間、または約 50% から約 70% の間の 6 - デサチュラーゼによる ALA から SDA への転換効率に基づくこと、

10

xxvii) 該脂質の脂肪酸組成は、少なくとも約 60%、少なくとも約 70%、少なくとも約 75%、約 60% から約 95% の間、約 70% から約 88% の間、または約 75% から約 85% の間の 6 - エロンガーゼによる SDA から ETA 酸への転換効率に基づくこと、

xxviii) 該脂質の脂肪酸組成は、少なくとも約 60%、少なくとも約 70%、少なくとも約 75%、約 60% から約 99% の間、約 70% から約 99% の間、または約 75% から約 98% の間の 5 - デサチュラーゼによる ETA から EPA への転換効率に基づくこと、

20

xxix) 該脂質の脂肪酸組成は、少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、約 50% から約 99% の間、約 85% から約 99% の間、約 50% から約 95% の間、または約 85% から約 95% の間の 5 - エロンガーゼによる EPA から DPA への転換効率に基づくこと、

xxx) もし、前記抽出脂質の総脂肪酸含有量における DHA のレベルが、20.1% から 30% の間または 20.1% から 35% の間であるならば、前記脂質の脂肪酸組成は、少なくとも約 80%、少なくとも約 90%、少なくとも約 93%、約 50% から約 95% の間、約 80% から約 95% の間、または約 85% から約 95% の間の 4 - デサチュラーゼによる DPA から DHA への転換効率に基づくこと、

xxxi) 前記脂質の脂肪酸組成は、少なくとも約 10%、少なくとも約 15%、少なくとも約 20%、少なくとも約 25%、約 20%、約 25%、約 30%、約 10% から約 50% の間、約 10% から約 30% の間、約 10% から約 25% の間または約 20% から約 30% の間のオレイン酸から DPA 及び / または DHA への転換効率に基づくこと、

30

xxxii) 前記脂質の脂肪酸組成は、少なくとも約 15%、少なくとも約 20%、少なくとも約 22%、少なくとも約 25%、少なくとも約 30%、少なくとも約 40%、約 25%、約 30%、約 35%、約 40%、約 45%、約 50%、約 15% から約 50% の間、約 20% から約 40% の間、または約 20% から約 30% の間の LA から DPA 及び / または DHA への転換効率に基づくこと、

xxxiii) 前記脂質の脂肪酸組成は、少なくとも約 17%、少なくとも約 22%、少なくとも約 24%、少なくとも約 30%、約 30%、約 35%、約 40%、約 45%、約 50%、約 55%、約 60%、約 22% から約 70% の間、約 17% から約 55% の間、約 22% から約 40% の間、または約 24% から約 40% の間の ALA から DPA 及び / または DHA への転換効率に基づくこと、

40

xxxiv) 該抽出脂質中の総脂肪酸は、1.5% 未満の C20:1、1% 未満の C20:1 または約 1% の C20:1 を有すること、

xxxv) 該脂質のトリアシルグリセロール (TAG) 含有率は、少なくとも約 70%、少なくとも約 80%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、約 70% から約 99% の間、または約 90% から約 99% の間であること、

xxxvi) 該脂質は、ジアシルグリセロール (DAG) を含み、DAG は好ましくは DHA 及び / または DPA を含むこと、

50

x x x v i i) 該脂質は、約 10 % 未満、約 5 % 未満、約 1 % 未満または約 0 . 001 % から約 5 % の間の遊離 (非エステル化) 脂肪酸及び / またはリン脂質を含む、または本質的にそれを含まないこと、

x x x v i i i) T A G の形態でエステル化された D H A 及び / または D P A の少なくとも 70 % 、少なくとも 72 % または少なくとも 80 % は、前記 T A G の s n - 1 位または s n - 3 位であること、

x x x i x) 前記脂質において最も豊富な D H A 含有 T A G 化学種は、D H A / 18 : 3 / 18 : 3 (T A G 58 : 12) であること、

x l) 前記脂質において最も豊富な D P A 含有 T A G 種は、D P A / 18 : 3 / 18 : 3 (T A G 56 : 12) であること、

x l i) 前記脂質は、トリ D H A T A G (T A G 66 : 18) を含むこと、及び

x l i i) 該抽出脂質の総脂肪酸含有量における D P A のレベルが、約 7 % 、約 8 % 、約 9 % 、約 10 % 、約 12 % 、約 15 % 、約 18 % 、約 20 % 、約 22 % 、約 24 % 、約 26 % 、約 28 % 、約 31 % 、約 7 % から約 31 % の間、約 7 % から約 28 % の間、約 10 % から約 35 % の間、約 10 % から約 30 % の間、約 10 % から約 25 % の間、約 10 % から約 22 % の間、約 14 % から約 35 % の間、約 16 % から約 35 % の間、約 16 % から約 30 % の間、約 16 % から約 25 % の間、または約 16 % から約 22 % の間であり、場合により、D H A レベルは、該抽出脂質の総脂肪酸含有量の 0 . 5 % 未満であることの 1 つ以上を有する、上記 [1] または上記 [2] 記載の脂質。

[4] 前記脂質がオイル、好ましくは、油料種子から採れるオイルであり、より好ましくは、前記脂質が、セイヨウアブラナ (Brassica napus) オイルまたはカラシナ (Brassica juncea) オイルなどのアブラナ属 (Brassica sp.) オイル、ワタ (Gossypium hirsutum) オイル、アマ (Linum usitatissimum) オイル、ヘリアントス属 (Helianthus sp.) オイル、ベニバナ (Carthamus tinctorius) オイル、ダイズ (Glycine max) オイル、トウモロコシ (Zea mays) オイル、ギニアアブラヤシ (Elaeis guineensis) オイル、ベンサミアナタバコ (Nicotiana benthamiana) オイル、アオバナルーピン (Lupinus angustifolius) オイル、カメリナサティバ (Camelina sativa) オイル、クランベアビシニカ (Crambe abyssinica) オイル、ジャイアントミスカンサス (Miscanthus x giganteus) オイル、またはススキ (Miscanthus sinensis) オイルを含むまたはである、上記 [1] ~ [3] のいずれか 1 項に記載の脂質。

[5] i) 脂質を含む植物部分を得る工程であって、前記脂質がエステル化された形態の脂肪酸を含み、前記脂肪酸がオレイン酸、パルミチン酸、リノール酸 (L A) 及び - リノレン酸 (G L A) を含む 6 脂肪酸、 - リノレン酸 (A L A) 、ステアリドン酸 (S D A) 、ドコサペンタエン酸 (D P A) 及びドコサヘキサエン酸 (D H A) を含み、場合によって、エイコサペンタエン酸 (E P A) 及びエイコサテトラエン酸 (E T A) のうち 1 つ以上を含んでもよい 3 脂肪酸を含み、前記抽出脂質の総脂肪酸含有量におけるパルミチン酸レベルが約 2 % から 16 % の間であり、前記抽出脂質の総脂肪酸含有量におけるミリスチン酸 (C 14 : 0) のレベルが、存在する場合、1 % 未満であり、前記植物部分における前記抽出脂質の総脂肪酸含有量における D H A のレベルが 20 . 1 % から 30 % の間または 20 . 1 % から 35 % の間である前記工程、及び

i i) 前記植物部分から脂質を抽出する工程を含み、前記抽出脂質の総脂肪酸含有量における D H A のレベルが 20 . 1 % から 30 % の間または 20 . 1 % から 35 % の間である、抽出植物脂質の産生方法。

[6] i) 脂質を含む植物部分または微生物細胞を得る工程であって、前記脂質がエステル化された形態の脂肪酸を含み、前記脂肪酸がオレイン酸、パルミチン酸、リノール酸 (L A) を含む 6 脂肪酸、 - リノレン酸 (A L A) 、ステアリドン酸 (S D A) 、ドコサペンタエン酸 (D P A) を含み、場合により、1 つ以上のエイコサペンタエン酸 (E P A) 及びエイコサテトラエン酸 (E T A) を含んでもよい 3 脂肪酸を含み、前記植物部分における前記抽出脂質の総脂肪酸含有量における D P A のレベルが 7 % から 35 % の間である前記工程、及び

10

20

30

40

50

i i) 前記植物部分または微生物細胞から脂質を抽出する工程を含み、前記抽出脂質の総脂肪酸含有量におけるD P Aのレベルが7 %から35 %の間である抽出植物脂質または微生物脂質の産生方法。

[7] 前記抽出脂質が上記[3]または上記[4]で定義された特徴の1つ以上を有する、上記[5]または上記[6]記載の方法。

[8] 前記植物部分が種子、好ましくは、セイヨウアブラナ (*Brassica napus*) またはカラシナ (*Brassica juncea*) などのアブラナ属 (*Brassica* sp.)、ワタ (*Gossypium hirsutum*)、アマ (*Linum usitatissimum*)、ヘリアンタス属 (*Helianthus* sp.)、ベニバナ (*Carthamus tinctorius*)、ダイズ (*Glycine max*)、トウモロコシ (*Zea mays*)、ギニアアブラヤシ (*Elaeis guineensis*)、ベンサミアナタバコ (*Nicotiana benthamiana*)、アオバナルーピン (*Lupinus angustifolius*)、カメリナサティバ (*Camelina sativa*)、またはクランベアビシニカ (*Crambe abyssinica*)、好ましくは、セイヨウアブラナ (*Brassica napus*)、カラシナ (*B. juncea*) またはカメリナサティバ (*C. sativa*) の種子などの油料種子である、上記[5] ~ [7] のいずれか1項に記載の方法。

[9] 前記植物部分または微生物細胞が、酵素の以下のセット：

i) 3 - デサチュラーゼ、 6 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 4 - デサチュラーゼ、 6 - エロンガーゼ及び 5 - エロンガーゼ、

i i) 15 - デサチュラーゼ、 6 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 4 - デサチュラーゼ、 6 - エロンガーゼ及び 5 - エロンガーゼ、

i i i) 12 - デサチュラーゼ、 6 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 4 - デサチュラーゼ、 6 - エロンガーゼ及び 5 - エロンガーゼ、

i v) 12 - デサチュラーゼ、 3 - デサチュラーゼ及び / または 15 - デサチュラーゼ、 6 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 4 - デサチュラーゼ、 6 - エロンガーゼ及び 5 - エロンガーゼ、

v) 3 - デサチュラーゼ、 8 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 4 - デサチュラーゼ、 9 - エロンガーゼ及び 5 - エロンガーゼ、

v i) 15 - デサチュラーゼ、 8 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 4 - デサチュラーゼ、 9 - エロンガーゼ及び 5 - エロンガーゼ、

v i i) 12 - デサチュラーゼ、 8 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 4 - デサチュラーゼ、 9 - エロンガーゼ及び 5 - エロンガーゼ、

v i i i) 12 - デサチュラーゼ、 3 - デサチュラーゼ及び / または 15 - デサチュラーゼ、 8 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 4 - デサチュラーゼ、 9 - エロンガーゼ及び 5 - エロンガーゼ、

i x) 3 - デサチュラーゼまたは 15 - デサチュラーゼ、 6 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 6 - エロンガーゼ及び 5 - エロンガーゼ、

x) 3 - デサチュラーゼまたは 15 - デサチュラーゼ、 8 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 9 - エロンガーゼ及び 5 - エロンガーゼ、

x i) 12 - デサチュラーゼ、 3 - デサチュラーゼまたは 15 - デサチュラーゼ、 6 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 6 - エロンガーゼ及び 5 - エロンガーゼ、または

x i i) 12 - デサチュラーゼ、 3 - デサチュラーゼまたは 15 - デサチュラーゼ、 8 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 9 - エロンガーゼ及び 5 - エロンガーゼ

の1つをコードする外来性ポリヌクレオチドを含み、各ポリヌクレオチドは、前記植物部分または微生物細胞の細胞内の前記ポリヌクレオチドの発現を誘導可能である1つ以上のプロモーターと作動可能に結合している、上記[5] ~ [8] のいずれか1項に記載の方法。

[10] 前記植物部分または微生物細胞が、以下の特徴：

i) 前記 12 - デサチュラーゼが、少なくとも約60 %、少なくとも約70 %、少なくとも約80 %、約60 %から約95 %の間、約70 %から約90 %の間、または約75

10

20

30

40

50

%から約85%の間の効率で、前記植物部分または微生物細胞の1つ以上の細胞内で、オレイン酸をリノール酸に転換すること、

i i) 前記 3 デサチュラーゼが、少なくとも約65%、少なくとも約75%、少なくとも約85%、約65%から約95%の間、約75%から約91%の間、または約80%から約91%の間の効率で、前記植物部分または微生物細胞の1つ以上の細胞内で、6脂肪酸を 3脂肪酸に転換すること、

i i i) 前記 6 デサチュラーゼが、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、約30%から約70%の間、約35%から約60%の間、または約50%から約70%の間の効率で、前記植物部分または微生物細胞の1つ以上の細胞内で、ALAをSDAに転換すること、

10

i v) 前記 6 デサチュラーゼが、約5%未満、約2.5%未満、約1%未満、約0.1%から約5%の間、約0.5%から約2.5%の間、または約0.5%から約1%の間の効率で、前記植物部分または微生物細胞の1つ以上の細胞内で、リノール酸を リノレン酸に転換すること、

v) 前記 6 エロンガーゼが、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、約60%から約95%の間、約70%から約80%の間、または約75%から約80%の間の効率で、前記植物部分または微生物細胞の1つ以上の細胞内で、SDAをETAに転換すること、

v i) 前記 5 デサチュラーゼが、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、約60%から約95%の間、約70%から約95%の間、または約75%から約95%の間の効率で、前記植物部分または微生物細胞の1つ以上の細胞内で、ETAをEPAに転換すること、

20

v i i) 前記 5 エロンガーゼが、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、約50%から約90%の間、または約85%から約95%の間の効率で、前記植物部分または微生物細胞の1つ以上の細胞内で、EPAをDPAに転換すること、

v i i i) 前記 4 デサチュラーゼが、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約93%、約50%から約95%の間、約80%から約95%の間、または約85%から約95%の間の効率で、前記植物部分または微生物細胞の1つ以上の細胞内で、DPAをDHAに転換すること、

30

i x) 前記植物部分または微生物細胞の1つ以上の細胞内で、オレイン酸をDHAまたはDPAに転換する効率が、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、約20%、約25%、約30%、約10%から約50%の間、約10%から約30%の間、または約10%から約25%の間、または約20%から約30%の間であること、

x) 前記植物部分または微生物細胞の1つ以上の細胞内で、LAをDHAまたはDPAに転換する効率が、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約22%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、約25%、約30%、約35%、約15%から約50%の間、約20%から約40%の間、または約20%から約30%の間であること

40

x i) 前記植物部分または微生物細胞の1つ以上の細胞内で、ALAをDHAまたはDPAに転換する効率が、少なくとも約17%、少なくとも約22%、少なくとも約24%、少なくとも約30%、約30%、約35%、約40%、約17%から約55%の間、約22%から約35%の間、または約24%から約35%の間であること、

x i i) 前記植物部分または微生物細胞の1つ以上の細胞は、前記外来性ポリヌクレオチドを含まない対応細胞より、少なくとも約25%、少なくとも約30%、約25%から約40%の間、または約27.5%から約37.5%の間で多い 3脂肪酸を含むこと、

x i i i) 前記 6 - デサチュラーゼは、リノール酸(LA)と比較して - リノレン酸(ALA)を優先的に不飽和化すること、

50

- x i v) 前記 6 - エロンガーゼは、 9 - エロンガーゼ活性も有すること、
- x v) 前記 12 - デサチュラーゼは、 15 - デサチュラーゼ活性も有すること、
- x v i) 前記 6 - デサチュラーゼは、 8 - デサチュラーゼ活性も有すること、
- x v i i) 前記 8 - デサチュラーゼは、 6 - デサチュラーゼ活性も有する、または 6 - デサチュラーゼ活性を有しないこと、
- x v i i i) 前記 15 - デサチュラーゼは、 G L A に対する 3 - デサチュラーゼ活性も有すること、
- x i x) 前記 3 - デサチュラーゼは、 L A に対する 15 - デサチュラーゼ活性も有すること、
- x x) 前記 3 - デサチュラーゼは、 L A 及び / または G L A の両方を不飽和化すること、 10
- x x i) 前記 3 - デサチュラーゼは、 L A と比較して G L A を優先的に不飽和化すること、
- x x i i) 1 つ以上または全ての前記デサチュラーゼは、対応するアシル P C 基質より、アシル - C o A 基質に対して高い活性を有すること、
- x x i i i) 前記 6 - デサチュラーゼは、脂肪酸基質として、L A より、A L A に対して高い 6 - デサチュラーゼ活性を有すること、
- x x i v) 前記 6 - デサチュラーゼは、脂肪酸基質としての P C の S n - 2 位と結合した A L A に対するより、脂肪酸基質としての A L A - C o A に対して高い 6 - デサチュラーゼ活性を有すること、 20
- x x v) 前記 6 - デサチュラーゼは、L A と比較して、基質としての A L A に対して、少なくとも約 2 倍高い 6 - デサチュラーゼ活性、少なくとも 3 倍高い活性、少なくとも 4 倍高い活性、または少なくとも 5 倍高い活性を有すること、
- x x v i) 前記 6 - デサチュラーゼは、脂肪酸基質としての P C の s n - 2 位と結合した A L A に対するより、脂肪酸基質としての A L A - C o A に対して高い活性を有すること、
- x x v i i) 前記 6 - デサチュラーゼは、脂肪酸基質としての P C の s n - 2 位に結合した A L A に対するより、脂肪酸基質としての A L A - C o A に対して、少なくとも約 5 倍高い 6 - デサチュラーゼ活性または少なくとも 10 倍高い活性を有すること、
- x x v i i i) 前記デサチュラーゼは、フロントエンドデサチュラーゼであること、及び 30
- x x i x) 前記 6 - デサチュラーゼは、E T A に対する検出可能な 5 - デサチュラーゼ活性を有しないこと
- の 1 つ以上または全てを有する、上記 [9] 記載の方法。
- [11] 前記植物部分または微生物細胞が、ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ (D G A T)、モノアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ (M G A T)、グリセロール - 3 - リン酸アシルトランスフェラーゼ (G P A T)、1 - アシル - グリセロール - 3 - リン酸アシルトランスフェラーゼ (L P A A T)、好ましくは、D H A - C o A 及び / または D P A - C o A などの C 22 多価不飽和脂肪アシル - C o A 基質を使用できる L P A A T、アシル - C o A : リゾホスファチジルコリンアシルトランスフェラーゼ (L P C A T)、ホスホリパーゼ A₂ (P L A₂)、ホスホリパーゼ C (P L C)、ホスホリパーゼ D (P L D)、C D P - コリンジアシルグリセロールコリンホスホトランスフェラーゼ (C P T)、ホスファチジルコリンジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ (P D A T)、ホスファチジルコリン : ジアシルグリセロールコリンホスホトランスフェラーゼ (P D C T)、アシル - C o A シンターゼ (A C S)、またはその 2 つ以上の組合せをコードする外来性ポリヌクレオチドをさらに含む、上記 [9] または上記 [10] 記載の方法。 40
- [12] 前記外来性ポリヌクレオチドが、前記植物部分または微生物細胞の細胞のゲノムに組み込まれた D N A 分子、好ましくは、T - D N A 分子内に共有結合しており、好ましくは、前記植物部分または微生物細胞の細胞のゲノムに組み込まれたかかる D N A 分子 50

数が、1以下、2もしくは3以下であり、または2もしくは3である、上記[9]～[11]のいずれか1項に記載の方法。

[13] 前記外来性ポリヌクレオチドを含む前記植物部分または微生物細胞の総オイル含有率が、前記外来性ポリヌクレオチドを含まない対応する植物部分または微生物細胞の総オイル含有率の少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、約50%から約80%の間、または約80%から約100%の間である、上記[5]～[12]のいずれか1項に記載の方法。

[14] 前記脂質を処理して、総脂肪酸含有率のパーセンテージとして、DHA及び/またはDPAのレベルを増加させることをさらに含み、前記処理が、1つ以上の分別蒸留、蒸留またはDHA及び/またはDPAのメチルエステルまたはエチルエステルの生成などのエステル交換反応を含む、上記[5]～[13]のいずれか1項に記載の方法。

[15] 油料種子植物またはその部分であって、

a) その種子中の脂質であって、前記脂質がエステル化された形態の脂肪酸を含む前記脂質、及び

b) 酵素の以下のセット；

i) 12 - デサチュラーゼ、 3 - デサチュラーゼ及び/または 15 - デサチュラーゼ、 6 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 4 - デサチュラーゼ、 6 - エロンガーゼ及び 5 - エロンガーゼ、または

ii) 12 - デサチュラーゼ、 3 - デサチュラーゼ及び/または 15 - デサチュラーゼ、 8 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 4 - デサチュラーゼ、 9 - エロンガーゼ及び 5 - エロンガーゼ

の1つをコードする外来性ポリヌクレオチドを含み、

各ポリヌクレオチドが前記植物の発育種子中の前記ポリヌクレオチドの発現を誘導可能である1つ以上の種子特異的プロモーターと作動可能に結合されており、前記脂肪酸がオレイン酸、パルミチン酸、リノール酸(LA)を含み、場合によって、リノレン酸(GLA)を含む 6 脂肪酸、 リノレン酸(ALA)、 ステアリドン酸(SDA)、 ドコサペンタエン酸(DPA)及びドコサヘキサエン酸(DHA)を含み、 場合によっては、エイコサペンタエン酸(EPA)及び/またはエイコサテトラエン酸(ETA)を含んでもよい 3 脂肪酸を含み、 及び前記種子の脂質の総脂肪酸含有量におけるDHAのレベルが20.1%から30%の間、または20.1%から35%の間であり、前記脂質の総脂肪酸含有量におけるパルミチン酸のレベルが約2%から16%の間であり、前記脂質の総脂肪酸含有量におけるミリスチン酸(C14:0)のレベルが、存在する場合、1%未満である、

前記油料種子植物またはその部分。

[16] その種子中に脂質を含む油料種子植物、もしくはその部分、または微生物細胞であって、

a) エステル化された形態の脂肪酸を含む脂質、及び

b) 酵素の以下のセット；

i) 12 - デサチュラーゼ、 3 - デサチュラーゼ及び/または 15 - デサチュラーゼ、 6 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 6 - エロンガーゼ及び 5 - エロンガーゼ、

ii) 12 - デサチュラーゼ、 3 - デサチュラーゼ及び/または 15 - デサチュラーゼ、 8 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 9 - エロンガーゼ及び 5 - エロンガーゼ

iii) 3 - デサチュラーゼ及び/または 15 - デサチュラーゼ、 6 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 6 - エロンガーゼ及び 5 - エロンガーゼ、または

iv) 3 - デサチュラーゼ及び/または 15 - デサチュラーゼ、 8 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 9 - エロンガーゼ及び 5 - エロンガーゼ

の1つをコードする外来性ポリヌクレオチド

10

20

30

40

50

を含み、

各ポリヌクレオチドが、前記植物の発育種子中の前記ポリヌクレオチドの発現を誘導可能である1つ以上の種子特異的プロモーター、または前記微生物細胞中の前記ポリヌクレオチドの発現を誘導可能である1つ以上のプロモーターと作動可能に結合されており、前記脂肪酸が、オレイン酸、パルミチン酸、リノール酸(LA)を含む6脂肪酸、リノレン酸(ALA)、ステアリドン酸(SDA)、及びドコサペンタエン酸(DPA)を含み、場合によっては、ドコサヘキサエン酸(DHA)、エイコサペンタエン酸(EPA)及び/またはエイコサテトラエン酸(ETA)を含んでもよい3脂肪酸を含み、及び前記種子または微生物細胞の脂質の総脂肪酸含有量におけるDPAのレベルが7%から35%の間である、

10

前記油料種子植物、もしくはその部分、または微生物細胞。

[17] DHA及び/またはDPAを含む種子を産生可能であるセイヨウアブラナ(*Brassica napus*)、カラシナ(*B. juncea*)またはカメリナサティバ(*Camelina sativa*)植物であって、前記植物の成熟した収穫された種子が、種子1グラム当たり少なくとも約28mg、好ましくは、種子1グラム当たり少なくとも約32mg、種子1グラム当たり少なくとも約36mg、種子1グラム当たり少なくとも約40mg、より好ましくは、種子1グラム当たり少なくとも約44mgまたは少なくとも約48mg、種子1グラム当たり少なくとも約80mg、または種子1グラム当たり約30mgから約80mgの間のDHA及び/またはDPA含有量を有する、前記植物。

[18] 前記外来性ポリヌクレオチドを含む上記[15]または上記[16]記載の植物細胞。

20

[19] 以下の特徴：

i) 上記[15]～[17]のいずれか1項に記載の植物由来であること、

ii) 上記[1]～[4]のいずれか1項に記載の脂質を含むこと、

iii) 上記[5]～[14]のいずれか1項に記載の方法で使用できること

の1つ以上を有する植物部分、好ましくは種子、または微生物細胞。

[20] DHA及び/またはDPA及び約4重量%から約15重量%の間、好ましくは、約6重量%から約8重量%の間または約4重量%から約8重量%の間の水分を含む成熟して収穫されたセイヨウアブラナ(*Brassica napus*)、カラシナ(*B. juncea*)またはカメリナサティバ(*Camelina sativa*)種子であって、前記種子のDHA及び/またはDPA含有量が種子1グラム当たり少なくとも約28mg、好ましくは、種子1グラム当たり少なくとも約32mg、種子1グラム当たり少なくとも約36mg、種子1グラム当たり少なくとも約40mg、より好ましくは、種子1グラム当たり少なくとも約44mgまたは種子1グラム当たり少なくとも約48mg、種子1グラム当たり約80mg、または種子1グラム当たり約30mgから約80mgの間である、前記種子。

30

[21] 上記[1]～[4]のいずれか1項に記載の抽出植物脂質または抽出微生物脂質の製造に使用できる植物または微生物細胞の産生方法であって、前記方法が、

a) 複数の植物または微生物細胞からの1つ以上の植物部分または微生物細胞により産生された脂質中のDHA及び/またはDPAのレベルをアッセイすることであって、各植物または微生物細胞が、酵素の以下のセット；

40

i) 3-デサチュラーゼ、6-デサチュラーゼ、5-デサチュラーゼ、4-デサチュラーゼ、6-エロンガーゼ及び5-エロンガーゼ、

ii) 15-デサチュラーゼ、6-デサチュラーゼ、5-デサチュラーゼ、4-デサチュラーゼ、6-エロンガーゼ及び5-エロンガーゼ、

iii) 12-デサチュラーゼ、6-デサチュラーゼ、5-デサチュラーゼ、4-デサチュラーゼ、6-エロンガーゼ及び5-エロンガーゼ、

iv) 12-デサチュラーゼ、3-デサチュラーゼまたは15-デサチュラーゼ、6-デサチュラーゼ、5-デサチュラーゼ、4-デサチュラーゼ、6-エロンガーゼ及び5-エロンガーゼ、

v) 3-デサチュラーゼ、8-デサチュラーゼ、5-デサチュラーゼ、4-デ

50

サチュラーゼ、 9 - エロンガーゼ及び 5 - エロンガーゼ、
 v i) 15 - デサチュラーゼ、 8 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 4
 - デサチュラーゼ、 9 - エロンガーゼ及び 5 - エロンガーゼ、
 v i i) 12 - デサチュラーゼ、 8 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、
 4 - デサチュラーゼ、 9 - エロンガーゼ及び 5 - エロンガーゼ、
 v i i i) 12 - デサチュラーゼ、 3 - デサチュラーゼまたは 15 - デサチュラ
 ーゼ、 8 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 4 - デサチュラーゼ、 9 - エ
 ロンガーゼ及び 5 - エロンガーゼ、
 i x) 3 - デサチュラーゼまたは 15 - デサチュラーゼ、 6 - デサチュラーゼ、
 5 - デサチュラーゼ、 6 - エロンガーゼ及び 5 - エロンガーゼ、
 x) 3 - デサチュラーゼまたは 15 - デサチュラーゼ、 8 - デサチュラーゼ、
 5 - デサチュラーゼ、 9 - エロンガーゼ及び 5 - エロンガーゼ、
 x i) 12 - デサチュラーゼ、 3 - デサチュラーゼまたは 15 - デサチュラーゼ
 、 6 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 6 - エロンガーゼ及び 5 - エロン
 ガーゼ、または
 x i i) 12 - デサチュラーゼ、 3 - デサチュラーゼまたは 15 - デサチュラー
 ーゼ、 8 - デサチュラーゼ、 5 - デサチュラーゼ、 9 - エロンガーゼ及び 5 - エロ
 ンガーゼ

10

の1つをコードする1つ以上の外来性ポリヌクレオチドを含み、
 各ポリヌクレオチドが、植物部分または微生物細胞の細胞内の前記ポリヌクレオチドの発
 現を誘導可能である1つ以上のプロモーターと作動可能に結合する、前記アッセイすること、と

20

b) 1つ以上のその部分の上記 [1] ~ [4] のいずれか1項に記載の抽出植物脂質ま
 たは微生物脂質の産生に使用できる複数の植物または微生物細胞から植物または微生物細胞
 を同定すること、と

c) 場合によっては、前記同定植物または微生物細胞、またはそれ由来の種子から後代
 植物または微生物細胞を産生すること
 とを含む前記方法。

[2 2] 種子の産生方法であって、前記方法が、

a) 好ましくは、少なくとも1000または2000または3000のかかる植物の集
 合部分としての耕地または標準栽植密度で植えられた少なくとも1ヘクタールまたは2ヘ
 クタールまたは3ヘクタールの領域で、上記 [1 5] ~ [1 7] のいずれか1項に記載の
 植物、または上記 [1 9] の植物部分を産生、もしくは上記 [2 0] 記載の種子を産生す
 る植物を生育すること、

30

b) 前記1つまたは複数の植物から種子を収穫すること、及び

c) 場合によっては、前記種子から脂質を抽出して、好ましくは、少なくとも60kg
 または70kgまたは80kgのDHA及び/またはDPA/ヘクタールの総DHA及び
 /またはDPA収率でオイルを産生すること
 を含む、前記方法。

[2 3] 次の特徴：

40

i) 上記 [3] または上記 [4] 記載のオイルを含むこと、及び

i i) 前記植物部分または種子または微生物細胞が上記 [5] ~ [1 4] のいずれか1
 項に記載の方法で使用可能であること

の1つ以上を有する、上記 [1 5] ~ [2 0] のいずれか1項に記載の植物、植物細胞、
 植物部分もしくは種子、または微生物細胞。

[2 4] 上記 [5] ~ [1 4] のいずれか1項に記載の方法を用いて、上記 [1 8] 記
 載の細胞、上記 [1 5] もしくは上記 [1 6] 記載の油料種子植物、上記 [1 6] 記載の
 微生物細胞、上記 [1 7] 記載のセイヨウアブラナ (Brassica napus)、カラシナ (B. j
 uncea) もしくはカメリナサティバ (Camelina sativa) 植物、上記 [1 9] 記載の植物部
 分、または上記 [2 0] 記載の種子により産生、またはから得られる脂質、またはオイル

50

。

[2 5] 上記 [2 0] 記載の種子から得られる、または上記 [1 5] ~ [1 7] のいずれか 1 項記載の植物から得られる種子ミール。

[2 6] 1 つ以上の上記 [2 4] 記載の脂質またはオイル、上記 [1 8] 記載の細胞、上記 [2 3] 記載の植物細胞または微生物細胞、上記 [2 0] 記載の種子、または上記 [2 5] 記載の種子ミールを含む組成物。

[2 7] 1 つ以上の上記 [2 4] 記載の脂質またはオイル、上記 [1 8] 記載の細胞、上記 [1 5] もしくは上記 [1 6] 記載の油料種子植物、上記 [2 3] 記載の植物細胞もしくは微生物細胞、上記 [1 7] 記載のセイヨウアブラナ (*Brassica napus*)、カラシナ (*B. juncea*) もしくはカメリナサティバ (*Camelina sativa*) 植物、上記 [2 3] 記載の植物部分、上記 [2 0] 記載の種子、上記 [2 5] 記載の種子ミール、または上記 [2 6] 記載の組成物を含む家畜飼料、化粧品または化学薬品。

10

[2 8] 家畜飼料の製造方法であって、前記方法が、少なくとも 1 つの他の食物成分と、1 つ以上の上記 [1] ~ [4] のいずれか 1 項に記載の脂質もしくはオイル、上記 [1 8] 記載の細胞、上記 [1 5] もしくは上記 [1 6] 記載の油料種子植物、上記 [2 3] 記載の植物細胞もしくは微生物細胞、上記 [1 7] 記載のセイヨウアブラナ (*Brassica napus*)、カラシナ (*B. juncea*) もしくはカメリナサティバ (*Camelina sativa*) 植物、上記 [2 3] 記載の植物部分、上記 [2 0] 記載の種子、上記 [2 5] 記載の種子ミール、または上記 [2 6] 記載の組成物を混合することを含む前記方法。

[2 9] P U F A から利益を受けることになる症状の治療または予防用医薬品製造のための、上記 [1] ~ [4] のいずれか 1 項に記載の 1 つ以上の脂質またはオイル、上記 [1 8] 記載の細胞、上記 [2 3] 記載の植物細胞もしくは微生物細胞、上記 [2 3] 記載の植物部分、上記 [2 0] 記載の種子、上記 [2 5] 記載の種子ミール、または上記 [2 6] 記載の組成物の使用。

20

【 0 3 9 2 】

参考文献

Ab b a d i ら (2 0 0 4) P l a n t C e l l 1 6 : 2 7 3 4 ~ 2 7 4 8 。

A b b o t t ら (1 9 9 8) S c i e n c e 2 8 2 : 2 0 1 2 ~ 2 0 1 8 。

A g a b a ら (2 0 0 4) M a r i n e B i o t e c h n o l . (N Y) 6 : 2 5 1 ~ 2 6 1 。

30

A l v a r e z ら (2 0 0 0) T h e o r A p p l G e n e t 1 0 0 : 3 1 9 ~ 3 2 7 。

A r m b r u s t ら (2 0 0 4) S c i e n c e 3 0 6 : 7 9 ~ 8 6 。

B a u m l e i n ら (1 9 9 1) M o l . G e n . G e n e t . 2 2 5 : 4 5 9 ~ 4 6 7 。

B a u m l e i n ら (1 9 9 2) P l a n t J . 2 : 2 3 3 ~ 2 3 9 。

B e a u d o i n ら (2 0 0 0) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U . S . A . 9 7 : 6 4 2 1 ~ 6 4 2 6 。

B e l i d e ら (2 0 1 3) P l a n t C e l l T i s s O r g a n C u l t . 1 1 3 : 5 4 3 ~ 5 5 3 。

40

B e r b e r i c h ら (1 9 9 8) P l a n t M o l . B i o l . 3 6 : 2 9 7 ~ 3 0 6 。

B r o u n ら (1 9 9 8) P l a n t J . 1 3 : 2 0 1 ~ 2 1 0 。

B r o w n ら (2 0 0 2) B i o c h e m J . 3 6 4 : 7 9 5 ~ 8 0 5 。

C h a n ら (2 0 0 6) N a t u r e B i o t e c h n o l o g y 2 8 : 9 5 1 ~ 9 5 6 。

C h a p m a n ら (2 0 0 4) G e n . D e v . 1 8 : 1 1 7 9 ~ 1 1 8 6 。

C h e n ら (2 0 0 4) T h e P l a n t C e l l 1 6 : 1 3 0 2 ~ 1 3 1 3 。

C h e n g ら (1 9 9 6) P l a n t C e l l R e p . 1 5 : 6 5 3 ~ 6 5 7 。

C h e n g ら (2 0 1 0) T r a n s g e n i c R e s 1 9 : 2 2 1 ~ 2 2 9 。

50

- Choi (1999a) J. Biol. Chem. 274:471~477.
- Choi (1999b) J. Biol. Chem. 274:37335~37339.
- Christie (1982) J. Lipid Res. 23:1072~1075.
- Clough 及び Bent (1998) Plant J. 16:735~43.
- Damude (2006) Proc Natl Acad Sci USA 103:9446~9451.
- Denic 及び Weissman (2007) Cell 130:663~677.
- Domergue (2002) Eur. J. Biochem. 269:4105~4113.
- Domergue (2003) J. Biol. Chem. 278:35115~35126. 10
- Domergue (2005) Biochem. J. 389:483~490.
- Dunoyer (2004) The Plant Cell 16:1235~1250.
- Ellerstrom (1996) Plant Mol. Biol. 32:1019~1027.
- Gamez (2003) Food Res International 36:721~727.
- Garcia-Maroto (2002) Lipids 37:417~426.
- Girke (1998) Plant J. 15:39~48. 20
- Hall (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:9320~9324.
- Hamilton (1997) Gene 200:107~16.
- Harayama (1998) Trends Biotechnol. 16:76~82.
- Hastings (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98:14304~14309.
- Hinchee (1988) Biotechnology 6:915~922.
- Hoffmann (2008) J Biol. Chem. 283:22352~22362. 30
- Hong (2002a) Lipids 37:863~868.
- Horiguchi (1998) Plant Cell Physiol. 39:540~544.
- Huang (1999) Lipids 34:649~659.
- Inagaki (2002) Biosci. Biotechnol. Biochem. 66:613~621.
- Kajikawa (2004) Plant Mol. Biol. 54:335~52.
- Kajikawa (2006) FEBS Lett 580:149~154.
- Kereszt (2007) Nature Protoc 2:948~952.
- Kim (2005) Plant Cell. 2005 1073~89. 40
- Knutzon (1998) J. Biol. Chem. 273:29360~6.
- Koziele (1996) Plant Mol. Biol. 32:39~405.
- Lassner (1995) Plant Physiol. 109:1389~94.
- Leonard (2000) Biochem. J. 347:719~724.
- Leonard (2000b) Biochem. J. 350:765~770.
- Leonard (2002) Lipids 37:733~740.
- Lewsey (2007) Plant J. 50:240~252.
- Lo (2003) Genome Res. 13:455~466.
- Lu 及び Kang (2008) Plant Cell Rep. 27:273~8.
- Mallory (2002) Nat. Biotech. 20:622~625. 50

- Marangoni (1995) Trends in Food Sci. Technol. 6: 329 ~ 335.
- Meesapyodsuk (2007) J Biol Chem 282: 20191 ~ 20199.
- Meng (2008) J. Gen. Virol. 89: 2349 ~ 2358.
- Meyer (2003) Biochem. 42: 9779 ~ 9788.
- Meyer (2004) Lipid Res 45: 1899 ~ 1909.
- Michaelson (1998a) J. Biol. Chem. 273: 19055 ~ 19059.
- Michaelson (1998b) FEBS Lett. 439: 215 ~ 218. 10
- Murashige 及び Skoog (1962) Physiologia Plantarum 15: 473 ~ 497.
- Napier (1998) Biochem. J. 330: 611 ~ 614.
- Needleman 及び Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48: 443 ~ 453.
- Parker - Barnes (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97: 8284 ~ 8289.
- Pereira (2004a) Biochem. J. 378: 665 ~ 671.
- Pereira (2004b) Biochem. J. 384: 357 ~ 366.
- Perrin (2000) Mol Breed 6: 345 ~ 352. 20
- Petrie (2010a) Metab. Eng. 12: 233 ~ 240.
- Petrie (2010b) Plant Methods 11: 6: 8.
- Petrie (2012) Transgenic Res. 21: 139 ~ 147.
- Potenza (2004) In Vitro Cell Dev Biol - Plant 40: 1 ~ 22.
- Qi (2002) FEBS Lett. 510: 159 ~ 165.
- Qi (2004) Nat. Biotech. 22: 739 ~ 745.
- Qiu (2001) J. Biol. Chem. 276: 31561 ~ 31566.
- Reddy 及び Thomas (1996) Nat. Biotech. 14: 639 ~ 642. 30
- Reddy (1993) Plant Mol. Biol. 22: 293 ~ 300.
- Robert (2005) Func. Plant Biol. 32: 473 ~ 479.
- Robert (2009) Marine Biotech 11: 410 ~ 418.
- Ruiz - Lopez (2012) Transgenic Res. 21: 139 ~ 147.
- Saha (2006) Plant Physiol. 141: 1533 ~ 1543.
- Saito (2000) Eur. J. Biochem. 267: 1813 ~ 1818.
- Sakuradani (1999) Gene 238: 445 ~ 453.
- Sato (2004) Crop Sci. 44: 646 ~ 652. 40
- Sakuradani (2005) Appl. Microbiol. Biotechnol. 66: 648 ~ 654.
- Sayanova (2006) J Biol Chem 281: 36533 ~ 36541.
- Sayanova (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94: 4211 ~ 4216.
- Sayanova (2003) FEBS Lett. 542: 100 ~ 104.
- Sayanova (2006) Planta 224: 1269 ~ 1277.
- Sayanova (2007) Plant Physiol 144: 455 ~ 467.
- 50

- Shukla Ā (2002) J. Amer. Oil Chem. Soc. 79:965~969。
- Singh Ā (2005) Curr. Opin. in Plant Biol. 8:197~203。
- Speranza Ā (2012) Process Biochemistry (印刷中)。
- Sperling Ā (2000) Eur. J. Biochem. 267:3801~3811。
- Sperling Ā (2001) Arch. Biochem. Biophys. 388:293~8。 10
- Sprecher Ā (1995) J. Lipid Res. 36:2471~2477。
- Spychalla Ā (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94:1142~1147。
- Tonon Ā (2003) FEBS Lett. 553:440~444。
- Trautwein (2001) European J. Lipid Sci. and Tech. 103:45~55。
- Tvrđik (2000) J. Cell Biol. 149:707~718。
- Venegas-Caleron Ā (2010) Prog. Lipid Res. 49:108~119。
- Voinnet Ā (2003) Plant J. 33:949~956。 20
- Wallis 及び Browse (1999) Arch. Biochem. Biophys. 365:307~316。
- Watts 及び Browse (1999b) Arch. Biochem. Biophys. 362:175~182。
- Weiss Ā (2003) Int. J. Med. Microbiol. 293:95:106。
- Weng Ā (2004) Plant Molecular Biology Reporter 22:289~300。
- Whitney Ā (2003) Planta 217:983~992。
- Wood (2009) Plant Biotechnol J. 7:914~24。 30
- Wu Ā (2005) Nat. Biotech. 23:1013~1017。
- Yang Ā (2003) Planta 216:597~603。
- Zank Ā (2002) Plant J. 31:255~268。
- Zank Ā (2005) WO 2005/012316。
- Zhang Ā (2004) FEBS Lett. 556:81~85。
- Zhang Ā (2006) 20:3255~3268。
- Zhang Ā (2007) FEBS Letters 581:315~319。
- Zhang Ā (2008) Yeast 25:21~27。
- Zhou Ā (2007) Phytochem. 68:785~796。
- Zhou Ā (2008) Insect Mol Biol 17:667~676。 40
- Zou Ā (1997) Plant Cell. 9:909~23。

【図 1】

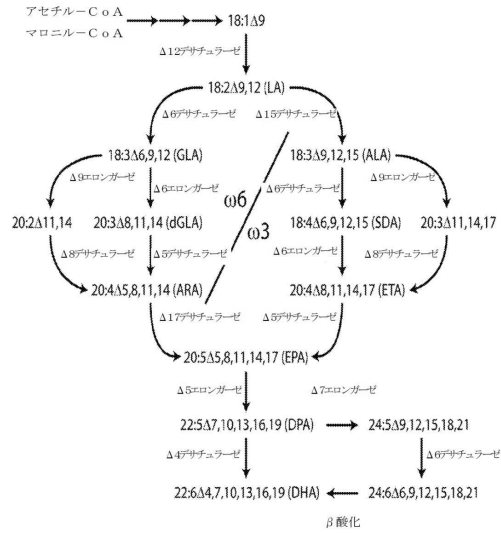


図 1

【図 2】

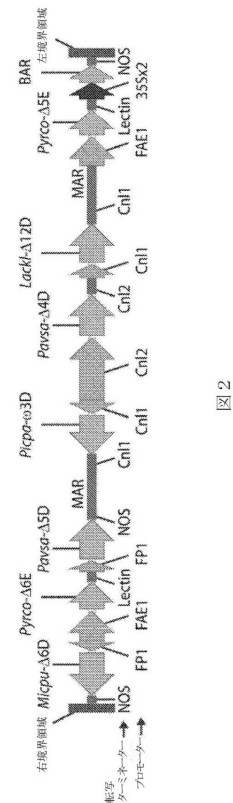


図 2

【図 3】

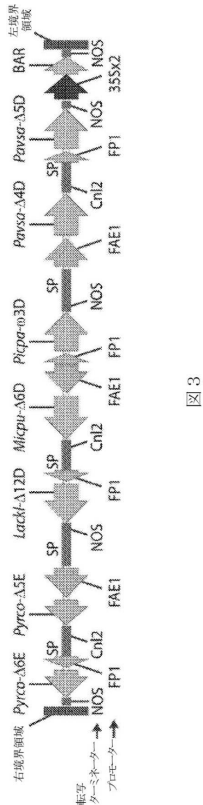


図 3

【図 4】

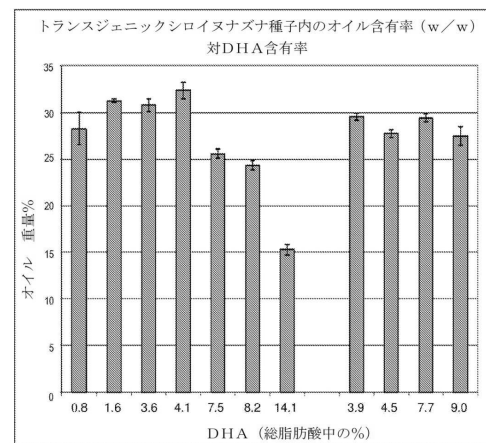


図 4

【図 5】

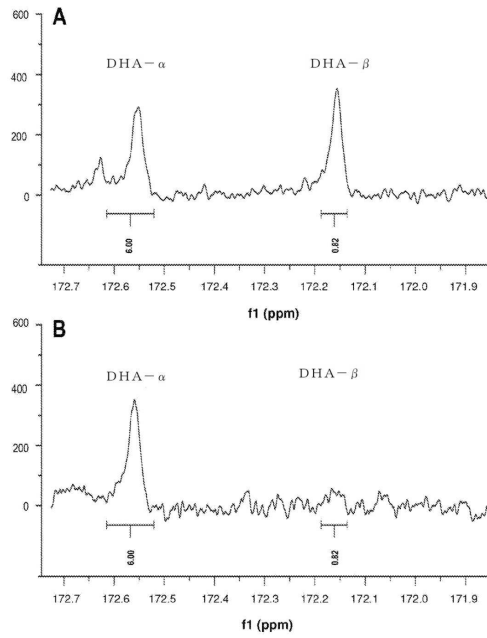


図 5

【図 6】

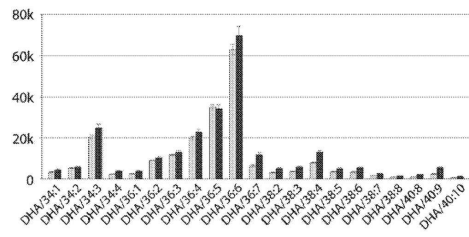


図 6

【図 7】

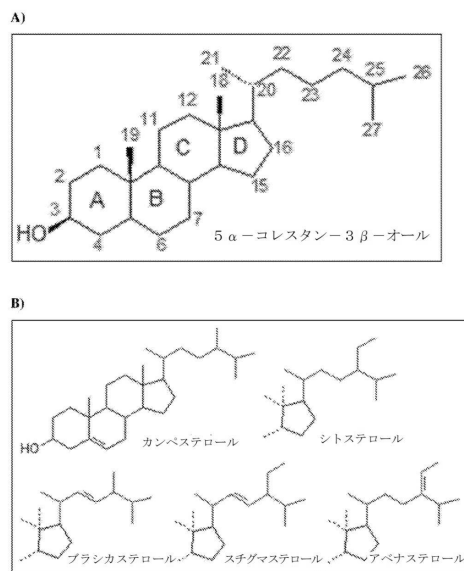


図 7

【図 8】

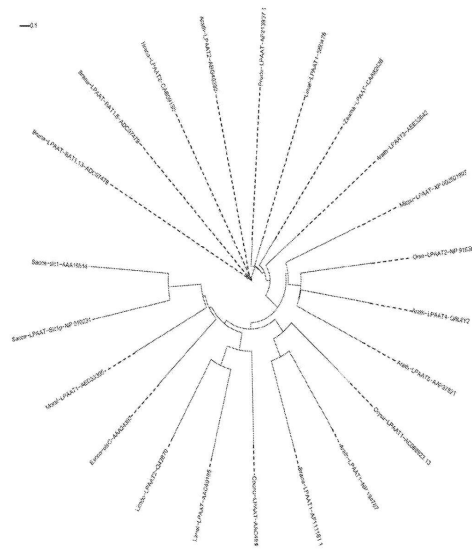


図 8

【図 9】

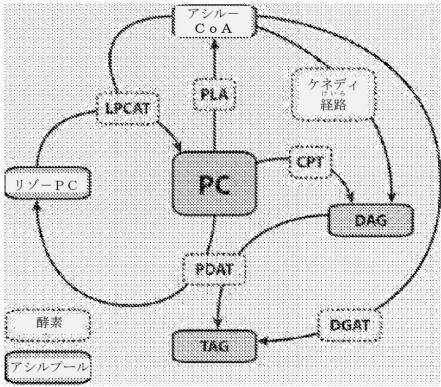


図 9

【図 10】

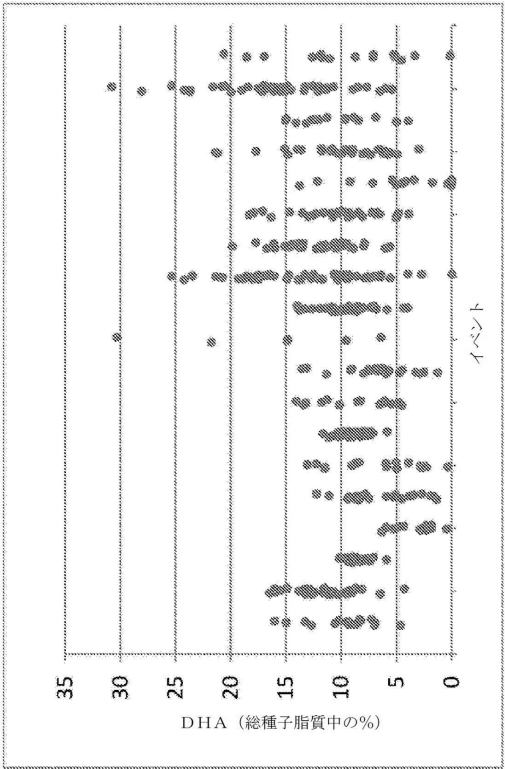


図 10

【配列表】

0006726619000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I	
A 6 1 K	8/97	(2017.01)	A 6 1 K	8/97
A 6 1 K	31/23	(2006.01)	A 6 1 K	31/23
A 6 1 K	31/231	(2006.01)	A 6 1 K	31/231
A 6 1 K	31/232	(2006.01)	A 6 1 K	31/232
A 6 1 K	8/37	(2006.01)	A 6 1 K	8/37
A 6 1 K	36/31	(2006.01)	A 6 1 K	36/31
A 2 3 K	10/30	(2016.01)	A 2 3 K	10/30
A 2 3 K	20/158	(2016.01)	A 2 3 K	20/158
C 1 2 N	15/00	(2006.01)	C 1 2 N	15/00
C 1 2 N	9/02	(2006.01)	C 1 2 N	9/02
C 1 2 N	5/04	(2006.01)	C 1 2 N	5/04
C 1 2 P	7/62	(2006.01)	C 1 2 P	7/62
C 0 7 C	51/48	(2006.01)	C 0 7 C	51/48
C 0 7 C	53/50	(2006.01)	C 0 7 C	53/50
C 0 7 C	57/03	(2006.01)	C 0 7 C	57/03
C 0 7 C	57/12	(2006.01)	C 0 7 C	57/12
A 6 1 P	9/06	(2006.01)	A 6 1 P	9/06
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/00
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00
A 6 1 P	11/06	(2006.01)	A 6 1 P	11/06
A 6 1 P	17/06	(2006.01)	A 6 1 P	17/06
A 6 1 P	19/10	(2006.01)	A 6 1 P	19/10
A 6 1 P	13/12	(2006.01)	A 6 1 P	13/12
A 6 1 P	31/18	(2006.01)	A 6 1 P	31/18
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/00
A 6 1 P	1/00	(2006.01)	A 6 1 P	1/00

(73)特許権者 511119798

グレインズ リサーチ アンド デヴェロップメント コーポレイション
 オーストラリア国 オーストラリアン キャピタル テリトリリー 2 6 0 0 , バルトン , ナショナル
 ル サーキット 4 , レベル 4

(74)代理人 100092783

弁理士 小林 浩

(74)代理人 100120134

弁理士 大森 規雄

(74)代理人 100149010

弁理士 星川 亮

(74)代理人 100104282

弁理士 鈴木 康仁

(72)発明者 ペトリ , ジェームズ ロバートソン

オーストラリア国 ニュー サウス ウェールズ 2 5 8 0 , ゴールバーン , ヘンリー ストリート 1 6

(72)発明者 シング , スリンダー パル

オーストラリア国 オーストラリアン キャピタル テリトリリー 2 6 0 2 , ダウナー , ルーカス
 ブレイス 1 0

(72)発明者 シュレスト , プシュカール

オーストラリア国 オーストラリアン キャピタル テリトリリー 2 6 1 7 , ローソン , セレクシ

ヨン ストリート 3

(72)発明者 マカリスター, ジェイソン ティモシー

オーストラリア国 ビクトリア 3223, ポーターリントン, ギーロン ロード 114

(72)発明者 ディバイン, マルコム デイビッド

カナダ国 ブリティッシュ コロンビア, ブイ1エイチ 1ワイ5, バーノン, ドーミー プレイス 219

(72)発明者 デ フェイター, ロバート チャールズ

オーストラリア国 オーストラリアン キャピタル テリトリー 2904, モナシュ, ストービー プレイス 10

審査官 井上 恵理

(56)参考文献 特表2012-509059(JP, A)

特表2012-529912(JP, A)

特表2011-519552(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C11B 1/00 - 15/00

C11C 1/00 - 5/02

C12N15/00 - 15/90

A01H 1/00 - 17/00

C12P 1/00 - 41/00

C12N 9/00 - 9/99

A61K31/00 - 31/327

A61K36/00 - 36/9068

A61K 8/00 - 8/99

A61Q 1/00 - 90/00

CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

FSTA(STN)