

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4781817号
(P4781817)

(45) 発行日 平成23年9月28日(2011.9.28)

(24) 登録日 平成23年7月15日(2011.7.15)

(51) Int.Cl.	F 1
C 12 P 7/64	(2006.01) C 12 P 7/64
C 12 N 15/09	(2006.01) C 12 N 15/00 Z N A A
C 12 N 9/02	(2006.01) C 12 N 9/02
C 07 K 14/405	(2006.01) C 07 K 14/405
A 01 H 5/00	(2006.01) A 01 H 5/00 A

請求項の数 17 (全 41 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2005-502538 (P2005-502538)
(86) (22) 出願日	平成15年12月11日 (2003.12.11)
(65) 公表番号	特表2006-511233 (P2006-511233A)
(43) 公表日	平成18年4月6日 (2006.4.6)
(86) 國際出願番号	PCT/EP2003/014054
(87) 國際公開番号	W02004/057001
(87) 國際公開日	平成16年7月8日 (2004.7.8)
審査請求日	平成18年12月7日 (2006.12.7)
(31) 優先権主張番号	0229578.0
(32) 優先日	平成14年12月19日 (2002.12.19)
(33) 優先権主張国	英國 (GB)
(31) 優先権主張番号	0316989.3
(32) 優先日	平成15年7月21日 (2003.7.21)
(33) 優先権主張国	英國 (GB)

(73) 特許権者	503021135 ユニバーシティ オブ ブリストル UNIVERSITY OF BRISTOL OL イギリス国、ピース8 1ティーエイチ 、ブリストル、ティンダルアベニュー、セ ネットハウス
(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔
(74) 代理人	100096183 弁理士 石井 貞次
(74) 代理人	100118773 弁理士 藤田 節

最終頁に続く

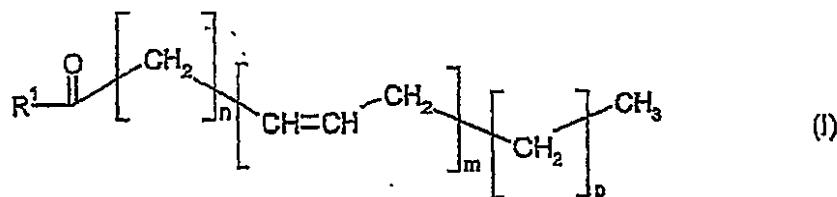
(54) 【発明の名称】多価不飽和脂肪酸類の製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

トランスジェニック非ヒト生物中で、以下の一般式 I

【化 1】



(式中、nは3、4または6、mは3、4または5、そしてpは0または3である)

で示される化合物を、該生物中の全脂質含有量を基準にして少なくとも1重量%の該化合物含有量で、製造する方法であって、

以下の工程：

a) -9-エロンガーゼをコードする少なくとも1種の核酸をトランスジェニック非ヒト生物に導入する工程と、

b) -8-デサチュラーゼをコードする少なくとも1種の第2の核酸を導入する工程と、

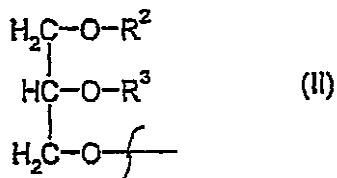
c) 該生物を生育させ、そして収穫する工程と、

を含み；

ここで、式I中の変数および置換基が、以下の意味：

R1はヒドロキシル、コエンザイムA(チオエステル)、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、ホスファチジルグリセロール、ジホスファチジルグリセロール、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、スフィンゴリピド、グリコスフィンゴリピド、または一般式II:

【化 2】



10

(R2およびR3は、互いに独立して、3つ、4つまたは5つの二重結合を有するC20-アルキルカルボニル残基である)

で示される残基であること、

を有し；ここで、

前記の -8- デサチュラーゼをコードする少なくとも1種の核酸が、a)配列番号1に示される配列からなる核酸、b)配列番号1に示される配列から遺伝暗号の縮重に基づいて誘導される核酸、及びc)配列番号2に示されるアミノ酸配列からの1つのアミノ酸基の置換、挿入、または欠失により得られるアミノ酸配列をコードし、かつそのアミノ酸配列が -8- デサチュラーゼとして機能する核酸、よりなる群から選択され、そして

20

前記の -9-エロンガーゼをコードする少なくとも1種の核酸が、a)配列番号3に示される配列からなる核酸、b)配列番号3に示される配列から遺伝暗号の縮重に基づいて誘導される核酸、c)配列番号4に示されるアミノ酸配列からの1つのアミノ酸基の置換、挿入、または欠失により得られるアミノ酸配列をコードし、かつそのアミノ酸配列が -9-エロンガーゼとして機能する核酸、よりなる群から選択される。

上記方法。

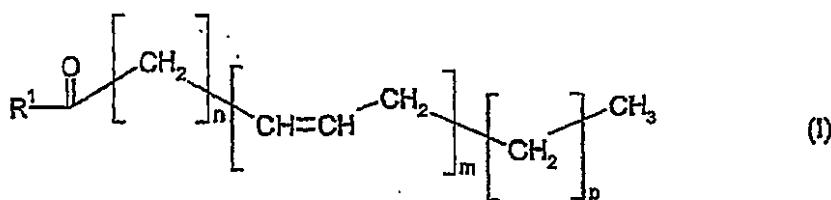
【請求項2】

前記一般式Iで示される化合物が、20:3 n-6または20:4 n-3の不飽和脂肪酸である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

トランスジェニック非ヒト生物中で、以下の一般式に

【化 3】



(式中、 n は3、4または6、 m は3、4または5、そして p は0または3である)

で示される化合物を、該生物中の全脂質含有量を基準にして少なくとも1重量%の該化合物含有量で、製造する方法であつて、

以下の工程 :

a) -9- エロンガーゼをコードする少なくとも1種の核酸をトランスジェニック非ヒト生物に導入する工程と、

b) -8- 云々サチコラニガをコードする少なくとも1種の第2の核酸を導入する工程と

c) -5- テンセキコラーゼをコードする少なくとも1種の第3の核酸を導入する工程と

d) 該生物を生育させ、そして収穫する工程と、

を含み：

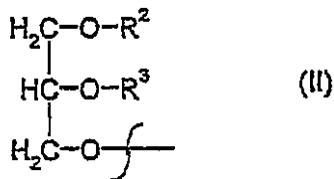
ここで、式1中の変数および置換基が、以下の意味：

R1はヒドロキシル、ヨエンザイドA(チオエステル)、杏スファチジルヨリン、杏スファチジルヨウルボン酸

50

ジルエタノールアミン、ホスファチジルグリセロール、ジホスファチジルグリセロール、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、スフィンゴリピド、グリコスフィンゴリピド、または一般式Ⅰ：

【化4】



10

(R₂およびR₃は、互いに独立して、3つ、4つまたは5つの二重結合を有するC20-アルキルカルボニル残基である)

で示される残基であること、
を有し；ここで、

前記の-8-デサチュラーゼをコードする少なくとも1種の核酸が、a)配列番号1に示される配列からなる核酸、b)配列番号1に示される配列から遺伝暗号の縮重に基づいて誘導される配列からなる核酸、及びc)配列番号2に示されるアミノ酸配列からの1つのアミノ酸基の置換、挿入、または欠失により得られるアミノ酸配列をコードし、かつそのアミノ酸配列が-8-デサチュラーゼとして機能する核酸、よりなる群から選択され、

前記の-9-エロンガーゼをコードする少なくとも1種の核酸が、a)配列番号3に示される配列からなる核酸、b)配列番号3に示される配列から遺伝暗号の縮重に基づいて誘導される配列からなる核酸、およびc)配列番号4に示されるアミノ酸配列からの1つのアミノ酸基の置換、挿入、または欠失により得られるアミノ酸配列をコードし、かつそのアミノ酸配列が-9-エロンガーゼとして機能する核酸よりなる群から選択され、そして

前記の-5-デサチュラーゼをコードする少なくとも1種の核酸が、a)配列番号5、配列番号7、もしくは配列番号9に示される配列からなる核酸、b)配列番号5、配列番号7、もしくは配列番号9に示される配列から遺伝暗号の縮重に基づいて誘導される配列からなる核酸、c)配列番号6、配列番号8、もしくは配列番号10に示されるアミノ酸配列からの1つのアミノ酸基の置換、挿入、または欠失により得られるアミノ酸配列をコードし、かつそのアミノ酸配列が-5-デサチュラーゼとして機能する核酸

30

よりなる群から選択される、

上記方法。

【請求項4】

前記一般式Ⅰで示される化合物が、20:4 n-6または20:5 n-3の不飽和脂肪酸である、請求項3に記載の方法。

【請求項5】

トランスジェニック非ヒト生物が、トランスジェニック植物である、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】

前記トランスジェニック植物が油生産植物である、請求項5に記載の方法。

40

【請求項7】

前記トランスジェニック植物が、アブラナ、ケシ、カラシ、ヘンプ、トウゴマ、ゴマ、オリーブ、キンセンカ、ザクロ、ハシバミ、アーモンド、マカダミア、アボカド、カボチャ、クルミ、ゲッケイジュ、ピスタシオ、ブリムローズ、カノーラ、ラッカセイ、アマ、ダイズ、ベニバナ、ヒマワリ、およびルリデサよりなる群から選択される、請求項5または6に記載の方法。

【請求項8】

前記一般式Ⅰで示される化合物が、その油、脂質、または遊離脂肪酸の形態で単離される、請求項1～7のいずれかに記載の方法。

【請求項9】

50

前記一般式1で示される化合物が、全脂質含有量を基準にして少なくとも5重量%の濃度で単離される、請求項1～8のいずれかに記載の方法。

【請求項10】

-8-デサチュラーゼをコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸であって、
a)配列番号1に示される配列からなる核酸、
b)配列番号1に示される配列から遺伝暗号の縮重に基づいて誘導される配列からなる核酸であり、かつその配列が-8-デサチュラーゼとして機能するタンパク質をコードする、核酸、
c)配列番号2に示されるアミノ酸配列からの1つのアミノ酸基の置換、挿入、または欠失により得られるアミノ酸配列をコードし、かつそのアミノ酸配列が-8-デサチュラーゼとして機能する、核酸

よりなる群から選択される、上記単離された核酸。

【請求項11】

請求項10に記載の単離された核酸によりコードされる、アミノ酸配列からなるタンパク質。

【請求項12】

請求項10に記載の配列番号1の配列を有する単離された核酸を含む遺伝子構築物であって、該核酸が1種以上の調節シグナルに機能的に連結されている、上記遺伝子構築物。

【請求項13】

前記調節シグナルによりその遺伝子発現が増強される、請求項12に記載の遺伝子構築物。

【請求項14】

請求項10に記載の核酸または請求項13に記載の遺伝子構築物を含む、ベクター。

【請求項15】

請求項10に記載の少なくとも1種の核酸、請求項12に記載の遺伝子構築物、または請求項14に記載のベクターが導入された、トランスジェニック非ヒト生物。

【請求項16】

微生物、非ヒト動物、または植物である、請求項15に記載のトランスジェニック非ヒト生物。

【請求項17】

トランスジェニック植物である、請求項15または16に記載のトランスジェニック非ヒト生物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、多価不飽和-3および-6脂肪酸類の改良された特異的製造方法、ならびに増加した含有量の不飽和脂肪酸類(特に、少なくとも2つの二重結合および20または22の炭素原子鎖長を有する-3および-6脂肪酸類)を有するトリグリセリド類の製造方法に関する。本発明は、植物(好ましくは、イソクリシス・ガルバナ(Isochrysis galbana)またはユーグレナ・グラシリス(Euglena gracilis)のような藻類)などの生物に由来する-8-デサチュラーゼおよび-9-エロンガーゼの発現にそれぞれ基づく、-5、7、8、10二重結合を有するC₂₀-またはC₂₂-脂肪酸類を含有する脂肪酸類、油類、または脂質類を、それぞれ増加した含有量で有するトランスジェニック生物(好ましくは、トランスジェニック植物またはトランスジェニック微生物)の作製に関する。このほか、本発明は、微生物または植物のような生物中で-8-デサチュラーゼ、-9-エロンガーゼ、および-5-デサチュラーゼの共発現によりエイコサペンタエン酸、アラキドン酸、ドコサペンタエン酸、またはドコサヘキサエン酸のような多価不飽和脂肪酸を製造する方法に関する。

【0002】

本発明はまた、-8-デサチュラーゼ活性、-9-エロンガーゼ活性、または-5-デサチュラーゼ活性を有する前述のタンパク質をコードする特定の核酸配列、該核酸配列を含

10

20

30

40

50

有する核酸構築物、ベクター、および生物の使用に関する。本発明は、さらに、不飽和脂肪酸類、および不飽和脂肪酸類を少なくとも1重量%である増加した含有量で有するトリグリセリド類ならびにそれらの使用に関する。

【背景技術】

【0003】

脂肪酸類およびトリグリセリド類は、食品工業、動物栄養、化粧品、および薬剤分野で、多くの用途を有する。それらは、遊離飽和もしくは不飽和脂肪酸類であるか、または飽和もしくは不飽和脂肪酸類を増加した含有量で有するトリグリセリド類であるかに依存して、きわめて多種多様な用途に好適である。すなわち、たとえば、多価不飽和脂肪酸類(=PUFA)は、栄養価を増大させるために乳児用調製乳に添加される。種々の脂肪酸類およびトリグリセリド類が、主に、モルティエレラ属のような微生物またはダイズ、アブラナ、ヒマワリなどのような油生産植物から得られる。その場合、それらは、通常、トリアシルグリセリドの形態で得られる。このほか、それらは、魚類などの動物から都合よく得られる。遊離脂肪酸類は、加水分解により、都合よく調製される。不飽和脂肪酸類を有する油類が好ましいか、飽和脂肪酸類を有する油類が好ましいかは、使用目的に依存する。すなわち、たとえば、ヒトの栄養においては、血中コレステロール値に対し、つまり心臓病の可能性に対しプラスの効果があるという理由で、不飽和脂肪酸類(とくに多価不飽和脂肪酸類)を有する脂質類が好ましい。それらは、さまざまな治療食または医薬に使用される。このほか、PUFAは、食品、飼料、および化粧品業界でも一般的に使用されている。多価不飽和-3および/または-6脂肪酸類は、動物用飼料およびヒト用食品の重要な一部分である。ヒト用食品の一般的な組成から、魚油の主要成分である多価不飽和-3脂肪酸類は、食品の栄養価を増大させるべくヒト用食品に添加されることが期待される。すなわち、たとえば、ドコサヘキサエン酸(=DHA, $C_{22:6}^{4,7,10,13,16,19}$)またはエイコサペンタエン酸(=EPA, $C_{20:5}^{5,8,11,14,17}$)のような多価不飽和脂肪酸は、先に述べたように栄養価を増大させるべく乳児用調製乳に添加される。他方、DHAは、新生児の脳の発達にプラスの効果を有する。アラキドン酸(=ARA, $C_{20:4}^{5,8,11,14}$)のような多価不飽和-6脂肪酸類を一般的な食品に添加すると、たとえば、関節リウマチのようなリウマチ性疾患に望ましくない影響を及ぼすので、多価不飽和-3脂肪酸類を添加することが好ましい。多価不飽和-3および-6脂肪酸類は、ジホモ-リノール酸、ARA、またはEPAの代謝産物であるプロスタグランジン類のようなエイコサノイド類と呼ばれる一群のパラクリンホルモンの前駆体である。エイコサノイド類は、脂肪分解の調節、炎症応答の開始、血液循環および血圧の調節、ならびに生体の他の中心的機能に関与する。エイコサノイド類は、プロスタグランジン類、ロイコトリエン類、トロンボキサン類、およびプロスタサイクリン類を含む。-3脂肪酸類は、主に、さまざまなエイコサノイド類のレベルを調節することにより、アテローム性動脈硬化症および心臓血管疾患を防止するように思われる。他のエイコサノイド類は、ARAまたはEPAの代謝産物であるトロンボキサン類およびロイコトリエン類である。

【0004】

主に、モルティエレラ属のような微生物、またはダイズ、アブラナ、もしくはヒマワリのようない生産植物、またはクリトコディニウム(Cryptocodium)もしくはフェオダクチルム(Phaeodactylum)のような藻類は、PUFAを含有する油(これらは通常、トリアシルグリセリドの形態で得られる)の一般的な供給源である。このほか、それらの油は、魚類などの動物から都合よく得られる。遊離脂肪酸類は、水酸化カリウムまたは水酸化ナトリウムのような強塩基で加水分解することにより、都合よく調製される。DHA、EPA、ARA、ジホモ-リノール酸($C_{20:3}^{8,11,14}$)、またはドコサペンタエン酸(=DPA, $C_{22:5}^{7,10,13,16,19}$)のようなより高級な多価不飽和脂肪酸類は、ダイズ、アブラナ、ベニバナ、またはヒマワリのようない生産植物によって生成されない。それらの脂肪酸類の天然の供給源は、たとえば、ニシン、サケ、イワシ、タイセイヨウアカウオ、ウナギ、コイ、マス、ハリバット、サバ、パイクパーチ、もしくはマグロのような魚類または藻類である。

【0005】

10

20

30

40

50

それらは好ましい特性を有することから、不飽和脂肪酸を改変した含有量で有する油類を種々の生物中で生成すべく、脂肪酸類またはトリグリセリド類の合成に関与する遺伝子を利用できるようにしようとする試みは絶え間なく行われてきた。こうして、WO 91/13972およびそのUS対応特許出願には、-9-デサチュラーゼが記載されている。WO 93/11245では-15-デサチュラーゼが特許請求され、WO 94/11516では-12-デサチュラーゼが特許請求されている。WO 00/34439には、-5-および-8-デサチュラーゼが開示されている。他のデサチュラーゼが、たとえば、EP-A-0 550 162、WO 94/18337、WO 97/30582、WO 97/21340、WO 95/18222、EP-A-0 794 250、Stukey et al., J. Biol. Chem., 265, 1990: 20144-20149、Wada et al., Nature 347, 1990: 200-203、またはHuang et al., Lipids 34, 1999: 649-659に記載されている。しかしながら、現在までのところ、膜結合型タンパク質の形態の酵素の単離および特性付けは、可能ではあっても常に非常に大きな困難を伴ったので、種々のデサチュラーゼが生化学的に不適切に特性付けされていたにすぎなかつた(McKeon et al., Methods in Enzymol. 71, 1981: 12141-12147, Wang et al., Plant Physiol. Biochem., 26, 1988: 777-792)。一般的には、膜結合型デサチュラーゼは、好適な生物中に導入してから出発物質および生成物質を分析して酵素活性を調べることにより特性付けられている。-6-デサチュラーゼ類は、WO 93/06712、US 5,614,393、US 5614393、WO 96/21022、WO 0021557、およびWO 99/27111に記載されており、またトランスジェニック生物中における製造へのそれらの応用については、たとえば、WO 9846763、WO 9846764、およびWO 9846765に記載されている。それと同時に、WO 9964616またはWO 9846776に見られるような種々の脂肪酸生合成遺伝子の発現、および多価不飽和脂肪酸類の形成についても、記載および特許請求がなされている。デサチュラーゼ類の発現の効率、および多価不飽和脂肪酸類の形成に及ぼすそれらの影響に関して、現在までに記載されたデサチュラーゼ類およびエロンガーゼ類の発現では、ごく低含有量の多価不飽和脂肪酸類/脂質類(たとえば、エイコサペンタエン酸またはアラキドン酸の例のように)が達成されたにすぎないことに注目すべきであろう。このため、産物の収率がより高い、より効果的な代替経路が望まれる。

【0006】

したがって、不飽和脂肪酸類の生合成に関与し、かつ、特に工業規模で望ましくない副産物を生成することなく特定の脂肪酸類の生成を可能にする酵素をコードする、より好適な新しい遺伝子に対して大きな需要が依然として存在する。生合成について遺伝子を選択するうえで、とりわけ2つの特性が特に重要である。一方、できるかぎり高含有量の多価不飽和脂肪酸類を取得するための改良された方法が、以前同様、必要とされている。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

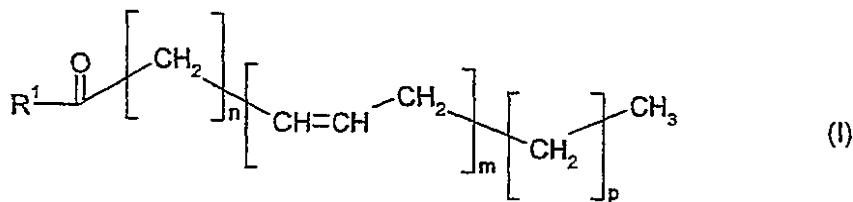
したがって、本発明の目的は、生物(好ましくは微生物および植物)中で多価不飽和脂肪酸類を合成すべくデサチュラーゼ酵素およびエロンガーゼ酵素のさらなる遺伝子を提供することならびにそれらを多価不飽和脂肪酸の商業的生産方法において利用することである。該方法は、生物(できる限り好ましくは油生産植物の種子)中のPUFA含有量を増大させることが期待される。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは、次の方法により、この目的が達成されることを見いたしました。すなわちその方法は、トランスジェニック生物中で、以下の一般式

【化1】



【0009】

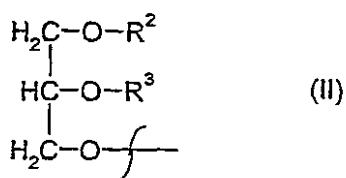
で示される化合物を、該生物中の全脂質含有量を基準にして少なくとも1重量%の該化合物含有量で、製造する方法であって、以下の工程： 10

- 9-エロンガーゼをコードする少なくとも1種の核酸配列をトランスジェニック生物に導入する工程と、
 - 8-デサチュラーゼをコードする少なくとも1種の第2の核酸配列を導入する工程と、
 - 必要に応じて、-5-デサチュラーゼをコードする少なくとも1種の第3の核酸配列を導入する工程と、
 - 該生物を生育させ、そして収穫する工程と、
- を含み；

ここで、式I中の変数および置換基は、以下の意味： 20

R^1 =ヒドロキシル、コエンザイムA(チオエステル)、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、ホスファチジルグリセロール、ジホスファチジルグリセロール、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、スフィンゴリピド、グリコスフィンゴリピド(glycoshingolipid)、または一般式II：

【化2】



【0010】

で示される残基

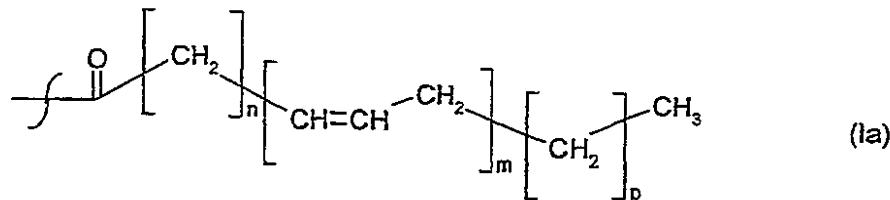
(式II中の置換基は、以下の意味：

R^2 =水素、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、ホスファチジルグリセロール、ジホスファチジルグリセロール、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、スフィンゴリピド(shingolipid)、グリコスフィンゴリピド(glycoshingolipid)、グリコスフィンゴリピド(glycoshingolipid)、または飽和もしくは不飽和 $C_2 \sim C_{24}$ -アルキルカルボニル、

R^3 =水素、飽和もしくは不飽和 $C_2 \sim C_{24}$ -アルキルカルボニル、あるいは

R^2 および R^3 は、互いに独立して、式Ia：

【化3】



【0011】

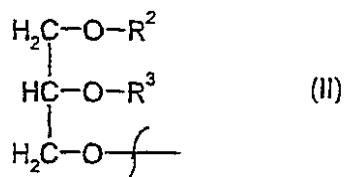
[n=3、4、または6、m=3、4、または5、そしてp=0または3、好ましくは、n=3、m=4または5、そしてp=0または3]で示される残基、を有する)を有する。

【0012】

R¹は、式I中で、ヒドロキシル、アセチル-コエンザイムA、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、ホスファチジルグリセロール、ジホスファチジルグリセロール、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、スフィンゴリピド、グリコスフィンゴリピド(glycoshingolipid)、または一般式II

【化4】

10



【0013】

で示される残基、を表す。

【0014】

R¹について上述した残基は、常に、それらのエステルまたはチオエステルの形態で、一般式Iで示される化合物に結合される。

20

【0015】

R²は、一般式IIで示される構造中で、水素、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、ホスファチジルグリセロール、ジホスファチジルグリセロール、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、スフィンゴリピド(shingolipid)、グリコスフィンゴリピド(glycoshingolipid)、グリコスフィンゴリピド(glycoshingolipid)、または飽和もしくは不飽和C₂~C₂₄-アルキルカルボニル残基を表す。

【0016】

アルキル基として挙げられうるのは、1つ以上の二重結合を含有する、エチルカルボニル、n-プロピルカルボニル、n-ブチルカルボニル、n-ペンチルカルボニル、n-ヘキシルカルボニル、n-ヘプチルカルボニル、n-オクチルカルボニル、n-ノニルカルボニル、n-デシルカルボニル、n-ウンデシルカルボニル、n-ドデシルカルボニル、n-トリデシルカルボニル、n-テトラデシルカルボニル、n-ペンタデシルカルボニル、n-ヘキサデシルカルボニル、n-ヘプタデシルカルボニル、n-オクタデシルカルボニル、n-ノナデシルカルボニル、n-エイコシルカルボニル、n-ドコサニルカルボニル、またはn-テトラコサニルカルボニルのような置換もしくは無置換の飽和もしくは不飽和C₂~C₂₄-アルキルカルボニル鎖である。1つ以上の二重結合を含有するn-デシルカルボニル、n-ウンデシルカルボニル、n-ドデシルカルボニル、n-トリデシルカルボニル、n-テトラデシルカルボニル、n-ペンタデシルカルボニル、n-ヘキサデシルカルボニル、n-ヘプタデシルカルボニル、n-オクタデシルカルボニル、n-ノナデシルカルボニル、n-エイコシルカルボニル、n-ドコサニルカルボニル、またはn-テトラコサニルカルボニルのような飽和もしくは不飽和C₁₀~C₂₂-アルキルカルボニル残基が好ましい。特に有利なのは、1つ以上の二重結合を含有するC₁₀-アルキルカルボニル残基、C₁₁-アルキルカルボニル残基、C₁₂-アルキルカルボニル残基、C₁₃-アルキルカルボニル残基、C₁₄-アルキルカルボニル残基、C₁₆-アルキルカルボニル残基、C₁₈-アルキルカルボニル残基、C₂₀-アルキルカルボニル残基、C₂₂-アルキルカルボニル残基、またはC₂₄-アルキルカルボニル残基のような飽和もしくは不飽和C₁₀~C₂₂-アルキルカルボニル残基である。特に有利なのは、1つ以上の二重結合を含有するC₁₆-アルキルカルボニル残基、C₁₈-アルキルカルボニル残基、C₂₀-アルキルカルボニル残基、またはC₂₂-アルキルカルボニル残基のような飽和もしくは不飽和C₁₆~C₂₂-アルキルカルボニル残基である。これら残基は、特に、2つ、3つ、4つ、または5つの二重結合を含有する。とりわけ好ま

30

40

50

しいのは、5つまでの二重結合、好ましくは3つ、4つ、または5つの二重結合を有する20個または22個の炭素原子の残基である。残基はすべて、前述の対応する脂肪酸に由来する。

【0017】

R^3 は、一般式IIで示される構造中で、水素、飽和もしくは不飽和 $C_2 \sim C_{24}$ -アルキルカルボニルを表す。

【0018】

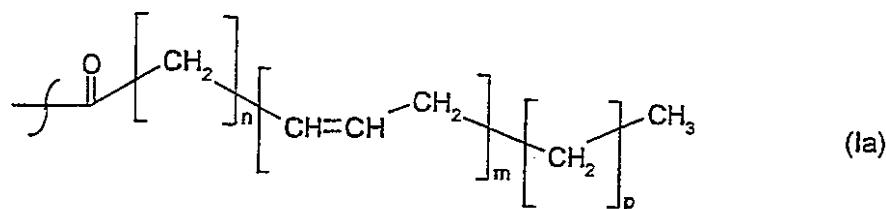
置換もしくは無置換の飽和もしくは不飽和 $C_2 \sim C_{24}$ -アルキルカルボニル残基は、たとえば、1つ以上の二重結合を有するエチルカルボニル、n-プロピルカルボニル、n-ブチルカルボニル、n-ペンチルカルボニル、n-ヘキシルカルボニル、n-ヘプチルカルボニル、n-オクチルカルボニル、n-ノニルカルボニル、n-デシルカルボニル、n-ウンデシルカルボニル、n-ドデシルカルボニル、n-トリデシルカルボニル、n-テトラデシルカルボニル、n-ペニタデシルカルボニル、n-ヘキサデシルカルボニル、n-ヘプタデシルカルボニル、n-オクタデシルカルボニル、n-ノナデシルカルボニル、n-エイコシルカルボニル、n-ドコサニルカルボニル、またはn-テトラコサニルカルボニルである。好ましいのは、1つ以上の二重結合を有するn-デシルカルボニル、n-ウンデシルカルボニル、n-ドデシルカルボニル、n-トリデシルカルボニル、n-テトラデシルカルボニル、n-ペニタデシルカルボニル、n-ヘキサデシルカルボニル、n-ヘプタデシルカルボニル、n-オクタデシルカルボニル、n-ノナデシルカルボニル、n-エイコシルカルボニル、n-ドコサニルカルボニル、またはn-テトラコサニルカルボニルのような飽和もしくは不飽和 $C_{10} \sim C_{24}$ -アルキルカルボニル残基である。

特に、1つ以上の二重結合を有する、 C_{10} -アルキルカルボニル残基、 C_{11} -アルキルカルボニル残基、 C_{12} -アルキルカルボニル残基、 C_{13} -アルキルカルボニル残基、 C_{14} -アルキルカルボニル残基、 C_{16} -アルキルカルボニル残基、 C_{18} -アルキルカルボニル残基、 C_{20} -アルキルカルボニル残基、 C_{22} -アルキルカルボニル残基、または C_{24} -アルキルカルボニル残基のような飽和もしくは不飽和 $C_{10} \sim C_{24}$ -アルキルカルボニル残基。特に好ましいのは、複数の二重結合を有する C_{16} -アルキルカルボニル残基、 C_{18} -アルキルカルボニル残基、 C_{20} -アルキルカルボニル残基、または C_{22} -アルキルカルボニル残基のような飽和もしくは不飽和 $C_{16} \sim C_{22}$ -アルキルカルボニル残基である。1つ、2つ、3つ、または4つの二重結合を含有する C_{18} -アルキルカルボニル残基はとりわけ好ましく、3つ、4つ、または5つの二重結合を有する C_{20} -アルキルカルボニル残基もとりわけ好ましい。残基はすべて、対応する脂肪酸に由来する。

【0019】

R^2 および R^3 は、一般式IIで示される構造中で、互いに独立して、一般式Ia

【化5】



【0020】

で示される残基を表す。式IおよびIa中の変数は、 $n=3, 4, \dots, 6, m=3, 4, \dots, 5, p=0, 3$ として定義される。とくに、 $n=3, m=4, p=0$ または3である。

【0021】

上述した残基 R^1, R^2 、および R^3 は、ヒドロキシル(hydroxyl)基もしくはエポキシ基で置換されていてもよく、または三重結合をも含有していてもよい。

【0022】

本発明によれば、使用される核酸配列は、 C_{20} -5-もしくは-8-デサチュラーゼ活性または C_{18} -9-エロンガーゼ活性を有するポリペプチドをコードする単離された核酸配

10

20

30

40

50

列である。

【0023】

本発明の方法に従って合成される式Iで示される物質のうち式IIで示される残基を残基R¹として含有するものは、好ましくは、異なる残基R²またはR³の混合物を含有する。その残基は、4~6個のC原子を有する短鎖脂肪酸、8~12個のC原子を有する中鎖脂肪酸、および14~24個のC原子を有する長鎖脂肪酸のようなさまざまな脂肪酸分子から誘導されるが、長鎖脂肪酸が好ましい。該長鎖脂肪酸は、有利には2~5つの二重結合を有するC₁₈-またはC₂₀-多価不飽和脂肪酸から好ましくは誘導される。このほか、式I中の主鎖もまた、有利にはR²およびR³と異なる前述の脂肪酸から誘導される。それは、本発明の方法により製造される化合物が、本発明の一態様において、異なる置換もしくは無置換の飽和もしくは不飽和脂肪酸のエステルまたはチオエステルのトリグリセリドであることを意味する。

【0024】

本発明の他の態様によれば、18、20、または22の脂肪酸炭素原子鎖長を有し、少なくとも2つの二重結合、好ましくは3つ、4つ、または5つの二重結合を有する多価不飽和脂肪酸エステル(式Iで示されるもの)がとりわけ好ましい。特に、3つ、4つ、または5つの二重結合を有する脂肪酸分子は、エイコサジエン酸、エイコサトリエン酸、エイコサテトラエン酸(eicosatetraenoic)(アラキドン酸)、およびエイコサペンタエン酸(eicosapentanoic acid)(C20:2n-6, 11,14; C20:3n-6, 8,11,14; C20:4n-6, 5,8,11,14; C20:3n-3, 11,14,17; C20:4n-3, 8,11,14,17; C20:5n-3, 5,8,11,14,17)を本発明の方法で合成するのに好ましいが、アラキドン酸およびエイコサペンタエン酸が最も好ましい。本発明者らは、次の活性を有するポリペプチド:C20- -8-デサチュラーゼ活性、C18- -9-エロンガーゼ活性、およびC20- -5-デサチュラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする本発明に係る3種の単離された核酸配列を組み合わせて発現させることにより、この目的が有利に達成されることを見いだした。この目的は、特に、本発明に係る単離された核酸配列の共発現により達成された。-9位に二重結合を有するC18脂肪酸類は、本発明の方法に有利に使用される-9-エロンガーゼにより伸長される。本方法に使用される-8-デサチュラーゼにより、-8位の二重結合がC20脂肪酸類に導入される。このほか、-5-デサチュラーゼにより、脂肪酸分子の-5位に二重結合を導入することができる。

【0025】

本発明の方法によりエステルまたはチオエステルとしてトリグリセリドの形態で有利に合成されるC₁₈-、C₂₀-、および/またはC₂₂-多価不飽和脂肪酸の脂肪酸エステルは、油、脂質、または脂質混合物の形態で、たとえば、飽和もしくは不飽和脂肪酸類、好ましくは、脂肪酸分子中に少なくとも2つ、好ましくは少なくとも3つの二重結合を有する多価不飽和脂肪酸を含有する、スフィンゴリピド類、ホスホグリセリド類、脂質類、糖脂質類(グリコスフィンゴリピド類など)、リン脂質類(ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルコリン、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、もしくはジホスファチジルグリセロールなど)として、またはモノアシルグリセリド、ジアシルグリセリド、もしくはトリアシルグリセリドとして、または他の脂肪酸エステル類(アセチル-コエンザイムAチオエステルなど)として、微生物または植物のような生産生物から単離されうる。前述のエステルの形態で結合された脂肪酸類に加えて、本発明の方法により、他の化合物中に結合された脂肪酸類を製造することも可能であり、または遊離脂肪酸類を製造することも可能である。

【0026】

一般的には、本発明の方法に使用されるたとえばトランスジェニック微生物またはトランスジェニック植物などのトランスジェニック生物は、ほぼ80~90重量%のトリアシルグリセリド類、2~5重量%のジアシルグリセリド類、5~10重量%のモノアシルグリセリド類、1~5重量%の遊離脂肪酸類、および2~8重量%のリン脂質類の配分で、脂肪酸エステル類または脂肪酸類を含有する。ただし、前述の化合物の全量は、まとめて100重量%とする。

【0027】

本発明の方法(または複数のその方法)[単数形は複数形を包含し、複数形は単数形を包

10

20

30

40

50

含するものとする]により、本方法に使用される生物中の全脂質含有量を基準にして、少なくとも1重量%、好ましくは少なくとも2、3、4、または5重量%、より好ましくは少なくとも6、7、8、または9重量%、最も好ましくは10、20、または30重量%の式1で示される化合物が生成される。本発明の方法に好ましい出発物質は、好ましい最終産物であるARAまたはEPAに変換されるリノール酸(C18:2)および/またはリノレン酸(C18:3)である。生物が使用される本発明の方法に関して、本方法の産物は、それ自体は1種の純粋な物質よりもなる産物ではない。それは、式1で示される異なる物質の混合物である。この混合物では、1種以上の化合物が主要産物であり、他の化合物は副産物として含有されるにすぎない。本方法に使用される生物中でリノール酸とリノレン酸が利用可能である場合、最終産物は、ARAとEPAとの混合物である。有利には、副産物は、生物中の全脂質含有量を基準にして20重量%を超えないものとし、好ましくは、副産物は、15重量%を超えないものとし、より好ましくは10重量%を超えないものとし、最も好ましくは5重量%を超えないものとする。好ましくは、本方法の最終産物としてARAまたはEPAだけが生成されるように出発物質としてリノール酸またはリノレン酸のいずれかを含有する生物が本方法で使用される。EPAとARAが一緒に生成される場合、それらは、少なくとも1:2(EPA:ARA)、好ましくは少なくとも1:3、より好ましくは少なくとも1:4、最も好ましくは少なくとも1:5の比で生成されることが期待される。ARAおよびEPAのような異なる脂肪酸の混合物が本発明の方法の産物である場合、蒸留、抽出、低温結晶化、クロマトグラフィー、またはそれらの方法の組合せのような当業者に公知の方法により、該脂肪酸をさらに精製することができる。

【0028】

10

有利には、本発明の方法は、以下の工程：

- a) -9-エロンガーゼ活性を有する酵素をコードする少なくとも1種の核酸配列を植物中で発現させる工程と、
- b) C20特異的な -8-デサチュラーゼをコードする少なくとも1種の核酸配列を発現させる工程と、
- c) 可能な限り、C20特異的な -5-デサチュラーゼをコードする第3の核酸配列を発現させる工程と、
- d) 続いて、トランスジェニック植物を生育させて、種子を収穫する工程と、
を含む。

【0029】

30

原理的には、すべての宿主生物、たとえば、蘚類；緑藻類、紅藻類、褐藻類、または藍藻類；单子葉植物または双子葉植物のような植物などのトランスジェニック生物は、本発明の方法に使用可能である。真菌類、細菌類、藻類、蘚類、または植物のような有利に油を生産するトランスジェニック生物が、本明細書に記載の本発明の方法(本発明に関して、単数形は複数形を包含し、複数形は単数形を包含するものとする)に使用される。この他の有利な生物は、動物もしくは好ましくは植物またはそれらの一部分である。好ましくは、真菌類、酵母類、または植物が使用され、とくに好ましくは、真菌類または植物が使用され、なかでもとりわけ好ましくは、アブラナ、ケシ、カラシ、ヘンプ、トウゴマ、ゴマ、オリーブ、キンセンカ、ザクロ、ハシバミ、アーモンド、マカダミア、アボカド、カボチャ、クルミ、ゲッケイジュ、ピスタシオ、プリムローズ、カノーラ、ラッカセイ、アマ、ダイズ、ベニバナ、ヒマワリ、ルリヂサのような多量の脂質化合物を含有する油糧種子植物、またはトウモロコシ、コムギ、ライムギ、オートムギ、ライコムギ、イネ、オオムギ、ワタ、マニホット、コショウ、マンジュギクのような植物、ジャガイモ、タバコ、ナス、およびトマトのようなナス科植物、ソラマメ属種、エンドウマメ、アルファルファ、灌木植物(コーヒーハー、カカオ、チャ)、ヤナギ属種、高木(アブラヤシ、ココナツ)、ならびに多年生牧草および飼料作物などの植物が使用される。本発明に係る特に好ましい植物は、油糧種子植物のアブラナ、ケシ、カラシ、ヘンプ、トウゴマ、ゴマ、オリーブ、キンセンカ、ザクロ、ハシバミ、アーモンド、マカダミア、アボカド、カボチャ、ゲッケイジュ、ピスタシオ、プリムローズ、カノーラ、ラッカセイ、アマ、ダイズ、ベニバナ、ヒマワリ、ルリヂサ、または高木(アブラヤシ、ココナツ)である。最も好ましいのは、ヘンプ

40

50

、ゴマ、アマ、ケシ、カボチャ、クルミ、タバコ、ワタ、ベニバナ、またはヒマワリのような C_{18-2} 脂肪酸および/または C_{18-3} 脂肪酸に富んだ植物である。

【0030】

本発明の方法に使用される核酸および/または生物に応じて、一般式Iで示されるさまざまな化合物を合成することができる。このほか、本方法に使用される植物または真菌に応じて、式Iで示される化合物のさまざまな混合物または単一の化合物(たとえばアラキドン酸もしくはエイコサペンタエン酸)を遊離形態または結合形態で生成することができる。脂肪酸合成の前駆体として好ましくは C_{18-2} 脂肪酸類または C_{18-3} 脂肪酸類を有する生物を本発明の方法で使用する場合、さまざまな多価不飽和脂肪酸類を合成することができる。たとえば、 C_{18-2} 脂肪酸類から出発して、-リノール酸、ジホモ-リノール酸、もしくはアラキドン酸を製造したり、または C_{18-3} 脂肪酸類から出発して、ステアリドン酸、エイコサテトラエン酸、もしくはエイコサペンタエン酸を製造したりすることができる。さまざまな遺伝子またはそれらの遺伝子産物の活性に影響を与えることにより、さまざまな単一の化合物または化合物の混合物を製造することができる。生きている生物を本発明の方法に使用した場合、好ましくは生物から単離される粗製の脂質類および/または油類を意味する粗製物質は、産物中に C_{18-2} 脂肪酸類もしくは C_{18-3} 脂肪酸類またはそれらの組合せのような少なくともいくつかの出発化合物と、核酸配列およびその遺伝子産物の活性によっては生合成系の脂肪酸中間体と、を含有する。それらの出発化合物または中間体は、使用した生物から単離される全脂肪酸の20もしくは15重量%未満、好ましくは10、9、8、7、もしくは6重量%未満、より好ましくは5、4、3、2、もしくは1重量%未満の濃度で、産物中に存在する。

【0031】

トランスジェニック植物とは、単一の植物細胞および固体培地上もしくは液体培地中のその培養物、植物の一部分および植物全体、たとえば、植物細胞培養物、植物由来のプロトプラスト、カルス培養物、または葉、シート、種子、花、根などのような植物組織を意味するものとする。該トランスジェニック植物は、たとえば、固体もしくは液体の培地上で、土壤中で、または水耕栽培で、生育させることができる。

【0032】

生育後、本発明の方法に使用されたトランスジェニック生物、好ましくはトランスジェニック植物は、一般式Iで示される化合物を単離することなく市場に出荷することができる。好ましくは、一般式Iで示される化合物は、その遊離脂肪酸、その脂質または油の形態で、生物から単離される。精製は、植物の圧搾および抽出のような従来の方法、もしくは蒸留、低温結晶化、クロマトグラフィーのような抽出に代わる他の方法、またはそれらの方法の組合せにより、行うことができる。有利には、圧搾および抽出の手順にかける前に、植物を粉碎、加熱、および/または蒸発の処理にかける。抽出用溶媒として、ヘキサンのような溶媒が使用される。単離された油類は、リン酸などで酸性化することにより、さらに精製される。遊離脂肪酸類は、上述の油類または脂質類から加水分解により生成される。流体から色素を除去するために、木炭または珪藻土が使用される。本発明の方法の他の好ましい実施形態では、酵素または従来の化学を用いてエステル交換により、脂肪酸類のアルキルエステルが油類および脂質類から生成される。好ましい方法は、対応する低級アルコール(メタノール、エタノール、プロパノール、ブタノール、ヘキサノールなどのようなC1～C10アルコール)のアルコラート(alcoholates)(たとえば、メタノラートまたはエタノラート)の存在下におけるアルキルエステルの生成である。したがって、当業者には周知のごとく、触媒量の塩基(たとえば、NaOHまたはKOH)の存在下でアルコールが油類または脂質類に添加される。

【0033】

本発明の方法の好ましい形態では、生物を生育させた後、通常の方法により脂質を得ることができる。この目的のために、生物をまず収穫し次に破壊してもよく、またはそれを直接使用してもよい。好適な溶媒、たとえば、ヘキサンのような無極性溶媒、またはエタノール、イソプロパノールのような極性溶媒、またはヘキサン/イソプロパノール、フェ

10

20

30

40

50

ノール/クロロホルム/イソアミルアルコールのような混合物を用いて、0 ~ 80 、好ましくは20 ~ 50 の温度で、脂質類を抽出することが有利である。一般に、バイオマスは、過剰量の溶媒を用いて、たとえば、バイオマスに対して1:4の過剰量の溶媒を用いて、抽出される。その後、溶媒は、蒸留などにより除去される。超臨界CO₂を用いて抽出を行うことも可能である。抽出後、バイオマスの残分は、濾過などにより除去することができる。植物および微生物から脂肪酸を抽出するための標準的方法については、Bligh et al. (Can. J. Biochem. Physiol. 37, 1959: 911-917)またはVick et al. (Plant Physiol. 69, 1982: 1103-1108)に記載されている。

【 0 0 3 4 】

次に、こうして得られた粗製油は、たとえば、アセトンのような極性溶媒またはクロロホルムのような無極性溶媒を添加してから濾過または遠心分離を行って混濁を除去することにより、さらに精製することができる。カラムまたは他の技術によるさらなる精製を行うことも可能である。

【 0 0 3 5 】

遊離脂肪酸類をトリグリセリド類から得るために、後者は、たとえばNaOHまたはKOHを用いて慣例に従って加水分解(hydrolyzed)される。

【 0 0 3 6 】

本発明の方法では、油類、脂質類、および/もしくは遊離脂肪酸類またはそれらのフラクションが生成される。それら生成物は、飼料や食品、化粧品、または医薬品を製造するために使用することができる。

【 0 0 3 7 】

原理的には、-8-デサチュラーゼ活性、-9-エロンガーゼ活性、および/または-5-デサチュラーゼ活性を有するポリペプチドをコードするすべての核酸を本発明の方法に使用することができる。好ましくは、核酸配列は、たとえば、モルティエレラ(Mortierella)のような真菌類、ユーグレナ(Euglena)、クリプテコディニウム(Cryptocodinium)、もしくはイソクリシス(Isochrysis)のような藻類、フェオダクチルム(Phaeodactylum)のような珪藻類、またはフィスコミトレラ(Physcomitrella)もしくはヤノウエノアカゴケ(Ceratodon)のような蘚類などの微生物または植物から単離可能であるが、シーノラブディテイス(Caenorhabditis)などの非ヒト動物もまた、核酸配列の供給源として利用可能である。-8-デサチュラーゼ活性、-9-エロンガーゼ活性、および/または-5-デサチュラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする本発明に係る有利な核酸配列は、微生物または植物、有利には、フェオダクチルム・トリコルヌーツム(Phaeodactylum tricornutum)、ヤノウエノアカゴケ(Ceratodon purpureus)、ヒメツリガネゴケ(Physcomitrella patens)、ユーグレナ・グラシリス(Euglena gracilis)、またはイソクリシス・ガルバナ(Isochrysis galbana)に由来する。Euglena gracilisまたはIsochrysis galbanaは、-3または-6脂肪酸類の変換に特異的である。したがって、-9-エロンガーゼとC20特異的-8-デサチュラーゼを共発現させれば、エイコサトリエン酸(C20:6n-3, 8,11,14)およびエイコサテトラエン酸(C20:3n-4, 8,11,14,17)が生成される。C20-5特異的デサチュラーゼをコードする第3の遺伝子を共発現させれば、アラキドン酸(C20:6n-4, 5,8,11,14)またはエイコサペンタエン酸(C20:3n-5, 5,8,11,14,17)が生成される。

【 0 0 3 8 】

本発明に係る配列の誘導体とは、たとえば、配列番号2または配列番号4、配列番号6、配列番号8、もしくは配列番号10によりコードされたポリペプチドまたは酵素の機能的相同体であり、その同じ特異的酵素活性を呈するものを意味する。この特異的酵素活性により、有利には、脂肪酸分子中に4つ以上の二重結合を有する不飽和脂肪酸が合成可能になる。不飽和脂肪酸とは、これ以降では、二重結合を有する二価不飽和または多価不飽和の脂肪酸類を意味する。二重結合は、共役であっても非共役であってもよい。該配列は、-9-エロンガーゼ活性、-8-デサチュラーゼ活性、または-5-デサチュラーゼ活性を呈する酵素をコードする。

【 0 0 3 9 】

10

20

30

40

50

本発明に係る酵素、すなわち、-9-エロンガーゼ、-8-デサチュラーゼ、または-5-デサチュラーゼは、有利には、18個の炭素原子を有する脂肪酸鎖を伸長させるか(配列番号2参照)、あるいはグリセロリピド類、遊離脂肪酸類、またはアシル-CoA脂肪酸類の脂肪酸残基の位置C₈-C₉(配列番号4参照)または位置C₅-C₆(配列番号6、配列番号8、もしくは配列番号10参照)に二重結合を導入する。

【0040】

本発明に係る核酸配列(または複数のその核酸配列)(本発明の目的では、単数形は複数形を包含し、複数形は単数形を包含する)またはその断片は、相同性スクリーニングにより他のゲノム配列を単離するために有利に使用可能である。

【0041】

該誘導体は、たとえば、他の生物、すなわち真核生物(たとえば、植物、とりわけ蘚類、藻類、渦鞭毛藻類)または真菌類、好ましくは、藻類および蘚類から単離可能である。

【0042】

対立遺伝子変異体としては、とくに、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、または配列番号9に示される配列におけるヌクレオチドの欠失、挿入、または置換により得られる機能的変異体であり、誘導される合成タンパク質の酵素活性が保持されているものが挙げられる。

【0043】

そのようなDNA配列は、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、もしくは配列番号9に記載されているDNA配列または該配列の一部分から出発して、たとえば、通常のハイブリダイゼーション法またはPCR法により、先に例示したような他の真核生物などから単離することができる。これらのDNA配列は、標準条件下で該配列にハイブリダイズする。ハイブリダイゼーションを行う場合、有利には、たとえば、約15～70bp、好ましくは約17～60bp、より好ましくは約19～50bp、最も好ましくは約20～40bpの平均長をもつ保存領域の短いオリゴヌクレオチドを使用する。保存領域の短いオリゴヌクレオチドは、当業者に公知の方法で他のデサチュラーゼ遺伝子またはエロンガーゼ遺伝子と比較することにより決定することができる。ヒスチジンボックス配列は有利に利用される。しかしながら、本発明に係る核酸のより長い断片またはその完全な配列をハイブリダイゼーションに使用することも可能である。利用する核酸(すなわち、オリゴヌクレオチド、より長い断片、もしくは完全な配列)に依存して、またはいかなるタイプの核酸(すなわち、DNAもしくはRNA)をハイブリダイゼーションに使用するかに依存して、これらの標準的条件は変化する。これは、たとえば、DNA:DNAハイブリッドの融解温度は、同一の長さのDNA:RNAハイブリッドの融解温度よりも約10 低い。

【0044】

標準条件とは、たとえば、対象の核酸に応じて、0.1～5×SSC(1×SSC=0.15M NaCl, 15mMクエン酸ナトリウム, pH7.2)の濃度を有する水性緩衝溶液中、42～58 の温度、または追加的に50%ホルムアミドの存在下、たとえば、5×SSC, 50%ホルムアミド中、42 を意味する。DNA:DNAハイブリッドに対するハイブリダイゼーション条件は、有利には0.1×SSCおよび約20～45 、好ましくは約30～45 の温度である。DNA:RNAハイブリッドの場合、ハイブリダイゼーション条件は、有利には0.1×SSCおよび約30～55 、好ましくは約45～55 の温度である。ハイブリダイゼーションに対するこれらの特定温度は、たとえば、ホルムアミド不在下の場合、約100ヌクレオチドの長さおよび50%のG+C含有量を有する核酸について算出される融解温度値である。DNAハイブリダイゼーションに対する実験条件は、たとえば、Sambrook et al., "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, 1989のような関連する遺伝学の書籍に記載されており、たとえば、核酸の長さ、ハイブリッドの性質、またはG+C含有量の関数として、当業者に公知の式により算出可能である。当業者であれば、次のテキスト: Ausubel et al. (eds), 1985, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York; Hames and Higgins (eds), 1985, Nucleic Acids Hybridization: A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, Oxford; Brown (ed), 1991, Essential Molecular Biology: A Practi

10

20

30

40

50

cal Approach, IRL Press at Oxford University Press, Oxfordを利用して、ハイブリダイゼーションに関するさらなる情報を得ることができよう。

【0045】

さらに、誘導体とは、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、および配列番号9の配列の相同体(たとえば真核生物相同体)、末端切断型配列、コード化DNA配列および非コード化DNA配列である一本鎖DNA、またはコード化DNA配列および非コード化DNA配列のRNAを意味する。

【0046】

このほか、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、および配列番号9の配列の相同体とは、プロモーター変異体などのような誘導体を意味する。これらの変異体は、1つ以上のヌクレオチド交換により、挿入および/または欠失により、改変可能であるが、ただし、プロモーターの機能や効率に悪影響を及ぼすものであってはならない。さらに、プロモーターは、その配列を変更することにより効率を増大させてもよいし、またはたとえ外来の生物のプロモーターであってもよいより効果的なプロモーターと完全に交換してもよい。

【0047】

誘導体とは、有利には、遺伝子発現および/またはタンパク質発現が改変されるように、好ましくは増強されるように、開始コドンの上流の-1~-2000の領域のヌクレオチド配列が変更された変異体を意味する。さらに、誘導体とは、3'末端が改変された変異体をも意味する。

【0048】

-8-デサチュラーゼ、-5-デサチュラーゼ、および/または-9-エロンガーゼをコードする本発明に係る核酸配列は、合成により生成しうるか、もしくは自然界で取得しうるか、または合成および天然のDNA成分の混合物を含有しうるか、さらにはさまざまな生物に由来する種々の異種の-8-デサチュラーゼ遺伝子セグメント、-5-デサチュラーゼ遺伝子セグメント、および/または-9-エロンガーゼ遺伝子セグメントで構成されうる。一般的には、対応する植物などの宿主生物により好まれるコドンを有する合成ヌクレオチド配列が生成される。これにより、通常、異種遺伝子の最適発現が得られる。植物によって好まれるそれらのコドンは、対象の植物種のほとんどで発現されるタンパク質頻度が最高のコドンから決定されうる。コリネバクテリウム・グルタミクム(*Corynebacterium glutamicum*)に関する例は、Wada et al. (1992) *Nucleic Acids Res.* 20:2111-2118)に提供されている。そのような実験は、標準的方法を用いて行うことが可能であり、当業者に公知である。

【0049】

-8-デサチュラーゼ遺伝子、-5-デサチュラーゼ遺伝子、および/または-9-エロンガーゼ遺伝子をコードする機能的に等価な配列は、本発明に係る配列の誘導体であって、異なるヌクレオチド配列であるにもかかわらず依然として所望の機能(すなわち、タンパク質の酵素活性および特異的選択性)を有するものである。したがって、機能的等価物には、本明細書に記載の配列の天然に存在する変異体が含まれるほかに、植物のコドン使用に適合するように化学合成により得られる人工のヌクレオチド配列のような人工の変異体も含まれる。

【0050】

このほか、上述したように、所望の特性が得られるのであれば、たとえば、好ましくは作物中で-8-および/または-5-デサチュラーゼ遺伝子を過剰発現させることにより、植物などの生物中の脂肪酸類、油類、または脂質類に含まれる-8および/または-5二重結合の含有量が増加するのであれば、人工のDNA配列が好適である。そのような人工のDNA配列、たとえば、分子モデリングを利用して構築されたタンパク質を逆翻訳することにより得られる人工のDNA配列は、-8および/もしくは-5-デサチュラーゼ活性ならびに/または-9-エロンガーゼ活性を呈しうるか、またはin vitro選択により決定しうる。DNA配列を改変または改善するようにDNAをin vitro進化させるのに利用しうる方法について

10

20

30

40

50

は、Patten, P.A. et al., Current Opinion in Biotechnology 8, 724-733(1997) or in Moore, J.C. et al., Journal of Molecular Biology 272, 336-347 (1997)に記載されている。とくに好適なのは、宿主植物に特異的なコドン使用に従ってポリペプチド配列を逆翻訳することにより得られるコード化DNA配列である。植物遺伝学の方法を熟知している当業者であれば、形質転換すべき植物の他の公知の遺伝子をコンピューター解析することにより、特異的なコドン使用を容易に決定することができる。

【0051】

他の好適な等価な核酸配列として挙げられるのは、融合タンパク質をコードする配列であり、この融合タンパク質の成分は、-8-および/もしくは-5-デサチュラーゼポリペプチドならびに/または-9-エロンガーゼポリペプチドあるいはそれらの機能的に等価な一部分である。融合タンパク質の第2の部分は、たとえば、-8-および/もしくは-5-デサチュラーゼ発現または-9-エロンガーゼ発現を実証しうる酵素活性または抗原ポリペプチド配列を有する他のポリペプチド(たとえば、mycタグまたはhisタグ)でありうる。しかしながら、好ましくは、これは調節タンパク質配列であり、その例としては、-8-および/もしくは-5-デサチュラーゼタンパク質ならびに/または-9-エロンガーゼタンパク質を所望の作用点に方向付ける小胞体(=ER)に対するシグナル配列、あるいは本発明に係る核酸配列の発現に影響を及ぼすプロモーターまたはターミネーターのような調節配列が挙げられる。他の好ましい実施形態では、融合タンパク質の第2の部分は、Napier J. A. [Targeting of foreign proteins to the chloroplast, Methods Mol. Biol., 49, 1995: 369 - 376]に記載されているようなプラスチド標的化配列である。該プラスチド標的化配列を含む好ましい使用されるベクターは、Colin Lazarus [Guerineau F., Woolston S., Brooks L., Mullineaux P. "An expression cassette for targeting foreign proteins into chloroplast; Nucleic. Acids Res., Dec 9, 16 (23), 1988: 11380]に開示されている。

【0052】

有利には、本発明に係る方法において、-8-デサチュラーゼ遺伝子および-9-エロンガーゼ遺伝子および/または-5-デサチュラーゼ遺伝子を、脂肪酸生合成の他の遺伝子と組み合わせることが可能である。そのような遺伝子の例は、アシルトランスフェラーゼ、他のデサチュラーゼまたはエロンガーゼ、たとえば、-4-、-5-、もしくは-6-デサチュラーゼ、または-12(C₁₈脂肪酸類に対して)、-15(C₁₈脂肪酸類に対して)、もしくは-19(C₂₂脂肪酸類に対して)のような-3および/もしくは-6特異的デサチュラーゼ、ならびに/あるいは-5-または-6-エロンガーゼである。in vivo合成およびとりわけin vitro合成では、還元当量の取込みまたは放出を行うことのできるNADHシトクロムB5レダクターゼなどの組合せが有利である。

【0053】

本発明に係るアミノ酸配列とは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、および配列番号10に示されるアミノ酸配列、またはそれらからの1つ以上のアミノ酸基の置換、反転、挿入、または欠失により得られる配列(そのような配列は、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、および/または配列番号10の誘導体である)を含有するタンパク質を意味するが、ただし、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、および配列番号10に示されるタンパク質の酵素活性は、保持されるかまたは実質的に減少せず、すなわち、それらは、依然として同一の酵素特異性を有するものとする。「実質的に減少しない」または「同一の酵素活性」とは、フィスコミトレラ(Physcomitrella)属、ヤノウエノアカゴケ(Ceratodon)属、ボラゴ(Borago)属、ヤブレツボカビ(Thraustochytrium)属、シゾキトリウム(Schizochytrium)属、フィトフトーラ(Phytophthora)属、モルティエレラ(Mortierella)属、シーノラブディティス(Caenorhabditis)属、アレウリティア(Aleuritia)属、ムスカリオディデス(Muscarioides)属、イソクリシス(Isochrysis)属、フェオダクチルム(Phaeodactylum)属、クリプテコディニウム(Cryptothecodium)属、またはユーグレンニア(Euglenia)属の生物のような野生型の供給源生物から得られる最初の酵素の酵素活性の少なくとも10%、好ましくは20%、とくに好ましくは30%を依然として呈するすべての酵

10

20

30

40

50

素を意味する。好ましい供給源生物は、*Euglena gracilis*種、*Isochrysis galbana*種、*Phaeodactylum tricornutum*種、*Caenorhabditis elegans*種、*Thraustochytrium*種、*Phytophtora infestans*種、*Ceratodon purpureus*種、*Isochrysis galbana*種、*Aleuritia farinosa*種、*Muscariodides viali*種、*Mortierella alpina*種、*Borago officinalis*種、または*Physcomitrella patens*種のような生物である。「実質的に減少しない」または「同一の酵素活性」を有する酵素活性を評価するために、誘導された配列の酵素活性を決定して野生型の酵素活性と比較する。これを行う場合、たとえば、特定のアミノ酸を、類似の物理化学的特性(空間充填性、塩基性度、疎水性など)を有する他のアミノ酸と置き換えることが可能である。たとえば、アルギニン残基をリシン残基と、バリン残基をイソロイシン残基と、またはアスパラギン酸残基をグルタミン酸残基と、交換する。しかしながら、1つ以上のアミノ酸を逐次的に交換、付加、もしくは除去したり、または複数のこれらの手段を互いに組み合わせたりすることも可能である。10

【0054】

誘導体とは、とくに、-8-デサチュラーゼ、-9-エロンガーゼ、および/または-5-デサチュラーゼをコードする最初に単離された配列の天然または人工の突然変異をも含有する機能的等価物であって、所望の機能を呈し続ける(すなわち、それらの酵素活性および基質選択性は、実質的に減少しない)ものを意味する。突然変異は、1つ以上のヌクレオチド残基の置換、付加、欠失、交換、または挿入を包含する。その一例を挙げると、本発明はまた、本発明の方法に使用される-8-デサチュラーゼヌクレオチド配列、-5-デサチュラーゼヌクレオチド配列、および/または-9-エロンガーゼヌクレオチド配列の改変により得られるヌクレオチド配列を包含する。そのような改変の目的は、たとえば、その中に含まれるコード配列をさらに拘束すること、またはたとえば、さらなる制限酵素との接点を挿入することである。20

【0055】

機能的等価物にはまた、上述したように最初の遺伝子もしくは遺伝子断片と比較して機能が弱められているか(=大幅には減少していない)または強められている(=最初の酵素の活性よりも高い酵素活性、すなわち、活性は、100%超、好ましくは110%超、とくに好ましくは130%超である)変異体も包含される。

【0056】

それと同時に、核酸配列は、有利には、たとえば、DNAまたはcDNAの配列であろう。本発明に係る発現力セットに挿入するのに好適なコード配列としては、先に記載した配列を有する-8-デサチュラーゼ、-5-デサチュラーゼ、および/または-9-エロンガーゼをコードし、かつ-8位および-5位に二重結合を有する脂肪酸類、油類、または脂質類を過剰生成する能力を宿主に付与するコード配列が挙げられるが、それと同時に、少なくとも4つの二重結合を有する脂肪酸類が生成される場合が有利である。これらの配列は、同種の起源を有するものであっても異種の起源を有するものであってもよい。30

【0057】

本発明に係る発現力セット(=核酸構築物もしくは断片または遺伝子構築物)とは、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、および/または配列番号9に規定された配列を意味し、それらは、有利には遺伝子発現を増大させるようにかつ宿主細胞中でコード配列の発現を制御するように1つ以上の調節シグナルと機能的に連結された遺伝暗号および/またはその誘導体から得られる。これらの調節配列は、遺伝子の選択性的発現およびタンパク質の発現を可能にするものでなければならない。宿主生物に応じて、このことは、たとえば、遺伝子が、誘導の後ではじめて発現および/もしくは過剰発現されるか、またはただちに発現および/もしくは過剰発現されることを意味しうる。これらの調節配列の例は、インダクターまたはリプレッサーが結合されることにより核酸の発現を調節する配列である。これらの新しい調節配列に加えて、またはこれらの配列の代わりに、実際の構造遺伝子の上流にあるこれらの配列の天然の調節は、依然として存在していてもよく、場合により、天然の調節のスイッチが切られて遺伝子の発現が増加するように遺伝子改変してもよい。しかしながら、遺伝子構築物をより単純に構築することもできる。すなわち、40

この場合、核酸配列またはその誘導体の上流に追加の調節シグナルが挿入されておらず、その調節を行う天然のプロモーターが除去されていない。この代わりに、天然の調節配列は、さらなる調節が行われずかつ/または遺伝子発現が強化されるように突然変異されたものである。部分配列の形態のこれらの改変プロモーター(=本発明に係る核酸配列のプロモーターを含有する一部分)を天然の遺伝子の上流に単独で配置することにより、活性を増大させることもできる。このほか、遺伝子構築物は、有利には、核酸配列の強化された発現を可能にするプロモーターに機能的に連結された1つ以上のいわゆるエンハンサー配列をも含有しうる。DNA配列の3'末端に、さらなる調節エレメントまたはターミネーターのような追加の有利な配列をも挿入しうる。-8-および/もしくは-5-デサチュラーゼ遺伝子ならびに/または-9-エロンガーゼ遺伝子は、発現カセット(=遺伝子構築物)中に1つ以上のコピーとして存在していてもよい。

【0058】

上述したように、調節配列または調節因子は、好ましくは、導入された遺伝子の遺伝子発現にプラスの影響を及ぼしてその発現を増大させることができる。すなわち、プロモーターおよび/またはエンハンサーのような強力な転写シグナルを用いて、転写レベルで有利に調節エレメントの強化を行うことが可能である。しかしながら、このほかに、たとえば、mRNAの安定性を改善することにより、翻訳の強化を行うことも可能である。

【0059】

発現カセット内の好適なプロモーターは、原理的には、生物中で、たとえば、纖毛虫類などの原生動物のような微生物、緑藻類、褐藻類、紅藻類、もしくはユーグレニア(Euglenia)などの藍藻類のような藻類、グラム陽性細菌もしくはグラム陰性細菌のような細菌類、サッカロミセス(Saccharomyces)、ピキア(Pichia)、もしくはシゾサッカロミセス(Schizosaccharomyces)のような酵母類、またはモルティエレラ(Mortierella)、トラウストキトリウム(Thraustochytrium)、もしくはシゾキトリウム(Schizochytrium)のような真菌類、あるいはアレウリティア(Aleuritia)のような植物中で、有利には、植物または真菌類中で、外来遺伝子の発現を制御できるすべてのプロモーターである。とくに好ましくは、植物プロモーターまたは植物ウイルスから誘導されるプロモーターを使用する。本発明に係る方法に有利な調節配列は、たとえば、cos、tac、trp、tet、trp-tet、Ipp、lac、Ipp-lac、lacI^q、T7、T5、T3、gal、trc、ara、SP6、-P_Rのようなプロモーター中に、またはグラム陰性細菌で有利に利用される-P_Lプロモーター中に、見いだされる。他の有利な調節配列は、たとえば、グラム陽性プロモーターamyおよびSP02中に、酵母もしくは真菌プロモーターADC1、MF、AC、P-60、CYC1、GAPDH、TEF、rp28、ADH中に、または植物プロモーターCaMV/35S[Franck et al., Cell 21(1980) 285-294]、SSU、OCS、l1b4、STLS1、B33、nos(=ノパリンシンターゼプロモーター)中に、あるいはユビキチン(ubiquitin)プロモーターまたはファセオリンプロモーター中に、見いだされる。発現カセットはまた、生物中の外因性-8-および/もしくは-5-デサチュラーゼ遺伝子ならびに/または-9-エロンガーゼ遺伝子の発現を有利には特定の時に植物中で制御するのに利用可能な化学的誘導プロモーターをも含有しうる。このタイプの有利な植物プロモーターは、たとえば、PRP1プロモーター[Ward et al., Plant. Mol. Biol. 22(1993), 361-366]、ベンゼンスルホンアミドにより誘導可能なプロモーター(EP 388 186)、テトラサイクリンにより誘導可能なプロモーター[Gatz et al., (1992) Plant J. 2, 397-404]、サリチル酸により誘導可能なプロモーター(WO 95/19443)、アブシジン酸により誘導可能なプロモーター(EP 35 528)、およびエタノールまたはシクロヘキサンにより誘導可能なプロモーター(WO93/21334)である。有利に使用することのできる植物プロモーターの他の例は、ジャガイモ由来のサイトゾルFBPaseのプロモーター、ジャガイモ由来のST-LS1プロモーター(Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989) 2445-245)、ダイズ(Glycine max)由来のホスホリボシリルピロホスフェートアミドトランスフェラーゼのプロモーター(遺伝子バンクアクセッション番号U87999をも参照されたい)、またはEP 249 676に記載されているようなノジエン(nodine)特異的プロモーターである。とりわけ有利なのは、たとえば、胚乳内または発生中の胚内のように脂肪酸生合成またはその前駆段階が行われる組織または植物部分/器官内で

10

20

30

40

50

発現を確実に引き起こす植物プロモーターである。とりわけ注目すべきなのは、たとえば、USPプロモーターもしくはその誘導体、LEB4プロモーター、ファセオリンプロモーター、またはナピンプロモーターのように、種子特異的発現を確実に行う有利なプロモーターである。本発明により引用されたとりわけ有利なUSPプロモーターまたはその誘導体は、種子発達時のごく初期の遺伝子発現を媒介する[Baeumlein et al., Mol Gen Genet, 1991, 225 (3): 459-67]。単子葉(monocotylondonous)植物または双子葉(dicotylondonous)植物に使用しうる他の有利な種子特異的プロモーターは、同様に例を引用すると、アブラナ由来のナピン遺伝子プロモーター、(US 5,608,152)、アラビドブシス由来のオレオシンプロモーター(WO 98/45461)、Phaseolus vulgaris由来のファセオリンプロモーター(US 5,504,200)、Brassica由来のBce4プロモーター(WO 91/13980)、またはマメ科B4プロモーター(LeB4, Baeumlein et al., Plant J., 2, 2, 1992: 233 - 239)のような双子葉植物(dicotyldodon)に好適なプロモーター、あるいはオオムギのIpt2もしくはIpt1遺伝子のプロモーター(WO 95/15389およびWO 95/23230)、またはWO99/16890に記載されているオオムギホルデイン(hordeine)遺伝子、イネグルテリン遺伝子、イネオリジン遺伝子、イネプロラミン遺伝子、コムギグリアジン遺伝子、ホワイト(white)グルテリン遺伝子、トウモロコシゼイン遺伝子、オートムギグルテリン遺伝子、モロコシカシリン遺伝子、またはライムギセカリソニン遺伝子のプロモーターのような単子葉植物(monocotylodon)に好適なプロモーターである。
10

【0060】

さらに、とくに好ましいのは、たとえば、脂肪酸類、油類、および脂質類の生合成またはそれらの前駆段階が行われる組織または植物部分中で発現を確実に行うプロモーターである。とりわけ注目すべきなのは、種子特異的発現を確実に行うプロモーターである。注目すべきなのは、アブラナ由来のナピン遺伝子のプロモーター(US 5,608,152)、Vicia faba由来のUSPプロモーター(USP=未知の種子タンパク質、Baeumlein et al., Mol Gen Genet, 1991, 225 (3): 459-67)、アラビドブシス由来のオレオシン遺伝子のプロモーター(WO 98/45461)、ファセオリンプロモーター(US 5,504,200)、またはレグミンB4遺伝子のプロモーター(LeB4; Baeumlein et al., 1992, Plant Journal, 2 (2): 233-9)である。他のプロモーターとして挙げられるのは、単子葉植物中で種子特異的発現を媒介するオオムギ由来のIpt2またはIpt1遺伝子のプロモーターである(WO95/15389およびWO95/23230)。他の有利な種子特異的プロモーターは、WO 99/16890に開示されているイネ、トウモロコシ、もしくはコムギ由来のプロモーター、あるいはAmy32b、Amy6-6、もしくはアレウレイン(aleurain)(US 5,677,474)、Bce4(ナタネ, US 5,530,149)、グリシニン(ダイズ, EP 571 741)、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ(phosphoenol pyruvate carboxylase)(ダイズ, JP 06/62870)、ADR12-2(ダイズ, WO 98/08962)、イソクエン酸リアーゼ(isocitrate lyase)(ナタネ, US 5,689,040)、または-アミラーゼ(オオムギ, EP 781 849)のようなプロモーターである。
20
30

【0061】

上述したように、発現構築物(=遺伝子構築物、核酸構築物)は、生物に導入すべきさらに別の遺伝子を含有しうる。これらの遺伝子は、独立した調節の支配下に置くこともできるし、-8-および/もしくは-5-デサチュラーゼ遺伝子ならびに/または-9-エロンガーゼ遺伝子と同一の調節領域の支配下に置くこともできる。これらの遺伝子は、たとえば、合成の増加を可能にする他の生合成遺伝子、有利には脂肪酸生合成の遺伝子である。例として挙げられうるのは、-15-、-12-、-9-、-5-、-4-デサチュラーゼ、-ケトアシルレダクターゼ、-ケトアシルシンターゼ、エロンガーゼ、またはさまざまヒドロキシラーゼおよびアシル-ACPチオエステラーゼに対する遺伝子である。デサチュラーゼ遺伝子は、核酸構築物中で有利に使用される。
40

【0062】

本発明に係る発現カセットおよび本発明に係る方法に関連して先に述べたように、原理的には、調節配列を有するすべての天然プロモーターを使用することができる。これに加えて、合成プロモーターもまた、有利に使用しうる。
50

【0063】

発現力セットの調製時、正しい方向にうまく読み取られかつ適正なリーディングラスターを備えるヌクレオチド配列が得られるように、さまざまなDNA断片を操作することができる。DNA断片(=本発明に係る核酸)を互いに連結するために、アダプターまたはリンカーを断片に結合させてもよい。

【0064】

この配列を挿入するための1つ以上の制限切断点を含有するリンカーまたはポリリンカーを用いて、プロモーター領域およびターミネーター領域を転写方向にうまく提供することができる。一般的には、リンカーは、1~10個、普通は1~8個、好ましくは2~6個の制限切断点を有する。一般的には、調節領域内のリンカーのサイズは、100bp未満、多くの場合60bp未満であるが、少なくとも5bpである。プロモーターは、宿主植物などの宿主生物に対して、生来のまたは同種のものであってもよいし、外来または異種のものであってもよい。発現力セットは、5'-3'転写方向に、プロモーターと、-8-デサチュラーゼ遺伝子、-5-デサチュラーゼ遺伝子、および/または-9-エロンガーゼ遺伝子をコードするDNA配列と、転写終結領域と、を含有する。さまざまな終結領域を任意の所望の方法で互いに交換することができる。

10

【0065】

さらに、好適な制限切断接点を提供するかまたは過剰のDNAもしくは制限切断接点を除去する操作を施すことができる。挿入、欠失、または置換、たとえば、トランジションおよびトランスバージョンを考慮に入れる場合、*in vitro*突然変異誘発、プライマー修復、制限切断、または連結を用いることができる。平滑末端を得るべく突出端の制限切断、チューイングバック、または充填を行うような好適な操作において、連結のために断片の相補的末端を生成させてもよい。

20

【0066】

有利な高発現を行うには、とくに、特異的ER保持シグナルSEKDELの結合が重要な可能性がある(Schouten, A. et al., *Plant Mol. Biol.* 30 (1996), 781-792)。このようにすれば、平均発現レベルは、3倍またはさらには4倍になる。カセットを構築するために、ER中に局在する植物性および動物性タンパク質中に天然に存在する他の保持シグナルを利用することも可能である。他の好ましい実施形態では、Napier J.A. [Targeting of foreign proteins to the chloroplast, *Methods Mol. Biol.*, 49, 1995: 369-376]により記載されているようにプラスチド標的化配列が使用される。該プラスチド標的化配列を含む好ましい使用ベクターは、Colin Lazarus [Guerineau F., Woolston S., Brooks L., Mulinaneaux P. 「葉緑体中に外来タンパク質をターゲティングするための発現力セット(An expression cassette for targeting foreign proteins into chloroplast)」 *Nucleic. Acids Res.*, Dec 9, 16 (23), 1988: 11380]に開示されている。

30

【0067】

好ましいポリアデニル化シグナルは、植物ポリアデニル化シグナル、好ましくはアグロバクテリウム・ツメファシエンス(*Agrobacterium tumefaciens*)由来のT-DNAポリアデニル化シグナルに実質的に対応するもの、とくに、TiプラスミドpTiACH5(Gielen et al., *EMBO J.* 3 (1984), 835 et seq.)のT-DNA(オクトピンシンターゼ)の遺伝子3、または対応する機能的等価物である。

40

【0068】

発現力セットは、たとえば、T. Maniatis, E.F. Fritsch and J. Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989)、さらにはT.J. Silhavy, M.L. Berman and L.W. Enquist, *Experiments with Gene Fusions*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984)およびAusubel, F.M. et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987)に記載されているような通常の組換え法およびクローニング法を用いて、好適なプロモーターをポリアデニル化シグナルと共に好適な-8-および/もしくは-5-デサチュラーゼDNA配列ならびに/または好適な-9-エロンガ-

50

ゼDNA配列に融合させることにより、生成される。

【0069】

発現力セットの調製において、正しい方向にうまく読み取られかつ適正なリーディングラスターを備えるヌクレオチド配列が生成されるように、さまざまなDNA断片を操作することができる。DNA断片を連結するために、アダプターまたはリンカーを断片に結合してもよい。

【0070】

この配列を挿入するための1つ以上の制限切断点を含有するリンカーまたはポリリンカーを用いて、プロモーター領域およびターミネーター領域を転写方向にうまく提供することができる。一般的には、リンカーは、1~10個、普通は1~8個、好ましくは2~6個の制限切断点を有する。一般的には、調節領域内のリンカーのサイズは、100bp未満、多くの場合60bp未満であるが、少なくとも5bpである。プロモーターは、宿主植物などの宿主生物に対して、生来のまたは同種のものであってもよいし、外来または異種のものであってもよい。発現力セットは、5'-3'転写方向に、プロモーターと、-8-および/もしくは-5-デサチュラーゼ遺伝子ならびに/または-9-エロンガーゼ遺伝子のいずれかをコードするDNA配列と、転写終結領域と、を含有する。さまざまな終結領域を任意の所望の方法で互いに交換することができる。

【0071】

発現力セットの調製において、正しい方向にうまく読み取られかつ適正なリーディングラスターを備えるヌクレオチド配列が生成されるように、さまざまなDNA断片を操作することができる。DNA断片を連結するために、アダプターまたはリンカーを断片に結合することができる。

【0072】

*Euglena gracilis*に由来する-8-デサチュラーゼ、*Isochrysis galbana*に由来する-9-エロンガーゼ、および/または*Caenorhabditis elegans*、*Mortierella alpina*、*Borage officinalis*、もしくは*Physcomitrella patens*などに由来する-5-デサチュラーゼのような本発明の方法に使用される核酸配列をコードするDNA配列は、脂肪酸、脂質、または油の生合成部位への適正な局在化を達成するのに必要な配列特性をすべて含有する。したがって、それ自体は、さらなる標的化配列を必要としない。しかしながら、そのような局在化は望ましくかつ有利でありうるので、そのような融合構築物もまた本発明の好ましい有利な実施形態になるように、人工的に改変または強化を行うことも可能である。

【0073】

とりわけ好ましいのは、プラスチド中への標的化を確実に行う配列である。特定の状況下では、他の区画中への標的化(Kermode, Crit. Rev. Plant Sci. 15, 4 (1996), 285-423に報告されている)が望ましいこともある。たとえば、液胞、ミトコンドリア、小胞体(ER)、ペルオキシソーム、脂質構造体中に標的化したり、または対応する機能配列の欠如によりもとの区画であるサイトゾル中に残留させたりする。

【0074】

有利には、本発明に係る核酸配列または遺伝子構築物を少なくとも1種のリポーター遺伝子と共に発現力セット中にクローン化し、ベクターを介して生物中にまたは直接そのゲノム中に導入する。このリポーター遺伝子は、増殖アッセイ、蛍光アッセイ、化学アッセイ、生物発光アッセイ、または耐性アッセイにより、または光度測定により、容易に検出可能になるものでなければならない。リポーター遺伝子の例として挙げられうるのは、抗生物質耐性遺伝子もしくは除草剤耐性遺伝子、ヒドロラーゼ遺伝子、蛍光タンパク質遺伝子、生物発光遺伝子、糖代謝遺伝子もしくはヌクレオチド代謝遺伝子、または生合成遺伝子、たとえば、*Ura3*遺伝子、*11v2*遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子、-ガラクトシダーゼ遺伝子、*gfp*遺伝子、2-デスオキグルコース-6-リン酸ホスファターゼ遺伝子、-グルクロニダーゼ遺伝子、-ラクタマーゼ遺伝子、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子、ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子、もしくはBASTA(=グルホシネート耐性)遺伝子である。これらの遺伝子を用いれば、遺伝子の転写活性つまり発現を容

10

20

30

40

50

易に測定および定量化できるようになる。このようにして、異なる生産性を呈するゲノム位置を特定することができる。

【0075】

好ましい実施形態では、発現力セットは、上流にすなわちコード配列の5'末端に、プロモーターを含み、下流にすなわち3'末端に、ポリアデニル化シグナルと、場合により、-8-デサチュラーゼ配列、-9-エロンガーゼ配列、および/または-5-デサチュラーゼDN A配列に対する介在コード配列に機能しうる形で連結された他の調節エレメントと、を含む。機能しうる形の連結とは、各調節エレメントがコード配列の発現において適切にその機能を発揮できるように、プロモーター、コード配列、ターミネーター、および場合により他の調節エレメントが連続的に配置されていることを意味する。機能しうる形の連結に好ましい配列は、プラスミドにおいて細胞内小器官への局在化を確実に行うための標的化配列である。しかしながら、ミトコンドリア中、小胞体(=ER)中、核中、油小体中、または他の区画中への細胞内小器官局在化を確実に行うための標的化配列を利用することも可能であり、さらにはタバコモザイクウイルス中の5'リード配列のような翻訳プロモーターを利用することも可能である(Gallie et al., Nucl. Acids Res. 15 (1987), 8693 -8711)。

10

【0076】

発現力セットは、たとえば、構成性プロモーターまたは組織特異的プロモーター(好ましくはUSPプロモーターまたはナピンプロモーター)と、発現させる遺伝子と、ER保持シグナルと、を含有しうる。ER保持シグナルに対しては、好ましくは、KDELアミノ酸配列(リシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ロイシン)またはKKXアミノ酸配列(リシン-リシン-X-停止、ここで、Xはすべての他の公知のアミノ酸を意味する)が利用される。

20

【0077】

真菌などの微生物または植物のような原核宿主生物または真核宿主生物中で発現させるために、発現力セットは、有利には、たとえば、プラスミド、ファージ、または宿主生物中において遺伝子の最適発現を可能にする他のDNAのようなベクター中に挿入される。好適なプラスミドの例は、大腸菌(*E. coli*)のpLG338、pACYC184、pBR系(たとえばpBR322など)、pUC系(たとえばpUC18もしくはpUC19)、M113mp系、pKC30、pRep4、pHS1、pHS2、pPLc 236、pMBL24、pLG200、pUR290、pIN-III¹¹³-B1、gt11、またはpBdCI；ストレプトマイセス(*Streptomyces*)のpIJ101、pIJ364、pIJ702、またはpIJ361；バシラス(*Bacillus*)のpUB110、pC194、またはpBD214；コリネバクテリウム(*Corynebacterium*)のpSA77またはpAJ667；真菌類のpALS1、pIL2、またはpBB116であり；他の有利な真菌ベクターは、Romanos, M.A. et al., [(1992) "Foreign gene expression in yeast: a review", Yeast 8: 423-488]およびvan den Hondel, C.A.M.J.J. et al. [(1991) "Heterologous gene expression in filamentous fungi"、さらにはMore Gene Manipulations in Fungi [J.W. Bennet & L.L. Lasure, eds., pp. 396-428: Academic Press: San Diego]および"Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi" [van den Hondel, C.A.M.J.J. & Punt, P.J. (1991) in: Applied Molecular Genetics of Fungi, Peberdy, J.F. et al., eds., pp. 1-28, Cambridge University Press: Cambridge]に記載されている。有利な酵母プロモーターの例は、2 μM、pAG-1、YEp6、YEp13、またはpEMBLYe23である。藻類プロモーターまたは植物プロモーターの例は、pLGV23、pGHIac⁺、pBIN19、pAK2004、pVKH、またはpDH51である(Schmidt, R. and Willmitzer, L., 1988参照)。先に明示したベクターまたは先に明示したベクターの誘導体は、可能性のあるプラスミドの中から少数を選択して示したものである。さらなるプラスミドは、当業者に周知であり、たとえば、書籍 Cloning Vectors (Eds. Pouwels P.H. et al. Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985, ISBN 0 444 904018)中に見いだしうる。好適な植物ベクターは、とくに、"Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (CRC Press), Ch. 6/7, pp. 71-119に記載されている。有利なベクターは、大腸菌(*E. coli*)およびアグロバクテリウム(Agrobacterium)中で複製されるシャトルベクターまたはバイナリーベクターとして知られるものである。

30

40

50

【0078】

ベクターとは、プラスミド以外では、当業者に公知のすべての他のベクター、たとえば、ファージ、ウイルス(SV40、CMV、バキュロウイルス、アデノウイルスなど)、トランスポゾン、ISエレメント、ファスミド、ファージミド、コスミド、線状または環状DNAを意味する。これらのベクターは、宿主生物中で自律的に複製可能であるか、または染色体により複製可能であるが、染色体複製が好ましい。

【0079】

ベクターのさらなる実施形態では、有利には、本発明に係る発現カセットを線状DNAの形態で生物中に導入し、非相同的または相同意組換えを介して宿主生物のゲノム中に組み込むことも可能である。この線状DNAは、線状化プラスミドで構成しうるか、またはベクターとしての発現カセットもしくは本発明に係る核酸配列だけで構成しうる。

10

【0080】

さらなる有利な実施形態では、本発明に係る核酸配列を生物中に単独で導入することができる。

【0081】

本発明に係る核酸配列に加えて、さらなる遺伝子を生物中に導入する場合、リポーター遺伝子と共にすべてを単一のベクター中に組み入れて生物中に導入するか、または単一の遺伝子をそれぞれリポーター遺伝子と共に個別のベクター中に組み入れて導入することができる。その際、異なるベクターは、同時にまたは逐次的に導入することができる。

20

【0082】

ベクターは、有利には、本発明に係る核酸配列および/または本発明に係る発現カセット(=遺伝子構築物)の少なくとも1つのコピーを含有する。

【0083】

たとえば、植物発現カセットをpRT形質転換ベクター中に配置することができる((a) Toepfer et al., 1993, Methods Enzymol., 217: 66-78; (b) Toepfer et al. 1987, Nucl. Acids. Res. 15: 5890 ff.)。

【0084】

他の選択肢として、たとえば、T7プロモーターおよびT7 RNAポリメラーゼを用いて、*in vitro*で組換えベクター(=発現ベクター)の転写および翻訳を行うことができる。

【0085】

30

原核生物で利用される発現ベクターでは、多くの場合、融合タンパク質または融合オリゴペプチドを含むおよび含まない誘導系を利用する。これらの融合体は、N末端およびC末端の両方に、またはタンパク質の他の有用なドメインに、存在させることができる。そのような融合体ベクターは、通常、次の目的を有する：i.)RNA発現率を増大させること；ii.)達成可能なタンパク質合成速度を増大させること；iii.)タンパク質の溶解性を増大させること；iv.)またはアフィニティークロマトグラフィーに使用可能な結合配列により精製を簡便化すること。また、多くの場合、融合タンパク質の一部分の切断および精製を可能にするタンパク質分解切断点も、融合タンパク質に導入される。プロテアーゼに対するそのような認識配列が知られており、たとえば、因子Xa、トロンビン、およびエンテロキナーゼが挙げられる。

40

【0086】

典型的な有利な融合体および発現ベクターは、pGEX[Pharmacia Biotech Inc; Smith, D.B. and Johnson, K.S. (1988) Gene 67: 31-40]、pMAL(New England Biolabs, Beverly, MA)、およびpRIT5(Pharmacia, Piscataway, NJ)であり、これらは、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)、マルトース結合タンパク質、またはプロテインAを含有する。

【0087】

大腸菌(*E. coli*)発現ベクターの他の例は、pTrcベクター[Amann et al., (1988) Gene 69:301-315]およびpETベクター[Studier et al., Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, California (1990) 60-89; Stratagene, Amsterdam, The Netherlands]である。

50

【0088】

酵母で使用するための他の有利なベクターは、pYEPsec1(Baldari, et al., (1987) *EMBO J.* 6:229-234)、pMFa(Kurjan and Herskowitz, (1982) *Cell* 30:933-943)、pJRY88(Schultz et al., (1987) *Gene* 54:113-123)、およびpYES誘導体(Invitrogen Corporation, San Diego, CA)である。糸状菌に使用するためのベクターは、van den Hondel, C.A.M.J.J. & Punt, P.J. (1991) "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi"およびApplied Molecular Genetics of Fungi, J.F. Peberdy, et al., eds., pp. 1-28, Cambridge University Press: Cambridgeに記載されている。

【0089】

他の選択肢として、たとえば、Sf 9細胞中で発現させるために、昆虫細胞発現ベクターを有利に利用することもできる。たとえば、pAc系(Smith et al. (1983) *Mol. Cell Biol.* 3:2156-2165)およびpVL系(Lucklow and Summers (1989) *Virology* 170:31-39)のベクターがある。

【0090】

さらに、植物細胞または藻類細胞を遺伝子発現に有利に使用することもできる。植物発現ベクターの例は、Becker, D., et al. (1992) "New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left border", *Plant Mol. Biol.* 20: 1195-1197またはBevan, M.W. (1984) "Binary Agrobacterium vectors for plant transformation", *Nucl. Acid. Res.* 12: 8711-8721中に見いだされる。

【0091】

さらに、哺乳動物細胞中で、有利には非ヒト哺乳動物細胞中で、核酸配列を発現させることも可能である。対応する発現ベクターの例は、pCDM8およびpMT2PCであり、Seed, B. (1987) *Nature* 329:840 or Kaufman et al. (1987) *EMBO J.* 6: 187-195)が参考になる。それと同時に、使用に好ましいプロモーターは、たとえば、ポリオーマウイルス、アデノウイルス2、サイトメガロウイルス、またはシミアンウイルス40のプロモーターのようなウイルス起源のものである。他の原核生物発現系および真核生物発現系に関しては、Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989の第16および17章が参考になる。

【0092】

宿主生物(=トランスジェニック生物)は、有利には、本発明に係る核酸および/または本発明に係る核酸構築物の少なくとも1つのコピーを含有する。

【0093】

植物などの生物中への本発明に係る核酸、発現カセット、またはベクターの導入は、原理的には、当業者に公知の方法のいずれを用いても行うことができる。核酸配列の導入を行うと、組換え生物またはトランスジェニック生物が得られる

微生物の場合、当業者であれば、Sambrook, J. et al. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, F.M. Ausubel et al. (1994) *Current protocols in molecular biology*, John Wiley and Sons, D.M. Glover et al., *DNA Cloning Vol.1*, (1995), IRL Press (ISBN 019-963476-9), Kaiser et al. (1994) *Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press、またはGuthrie et al. *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology*, *Methods in Enzymology*, 1994, Academic Pressのテキスト中に適切な方法を見いだすことができる。

【0094】

植物のゲノム中への外来遺伝子の導入は、形質転換と呼ばれる。これを行う場合、形質転換および植物組織または植物細胞からの植物の再生を行うために、記述された方法を、一過性のまたは安定な形質転換に利用する。好適な方法は、ポリエチレンギリコール誘導DNA取込み法によるプロトプラスト形質転換、粒子衝撃法と呼ばれる遺伝子砲を使用する「バイオリストイック」法、エレクトロポレーション法、DNA溶液中の乾燥胚のインキュベーション法、マイクロインジェクション法、およびアグロバクテリウムにより媒介さ

10

20

30

40

50

れる遺伝子導入法である。上述の方法は、たとえば、B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, eds. S.D. Kung and R. Wu, Academic Press (1993) 128-143 and in Potrykus Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991) 205-225)に記載されている。発現させるべき核酸または構築物は、好ましくは、pBin19(Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984) 8711)のようにアグロバクテリウム・ツメファシエンス(*Agrobacterium tumefaciens*)を形質転換するのに好適なベクター中にクローン化される。次に、そのようなベクターにより形質転換されたアグロバクテリアを公知の方法により植物(とくに、タバコ植物などのような作物)の形質転換に使用することができる。たとえば、傷つけた葉または細断された葉をアグロバクテリア溶液中に浸漬し、次に、好適な培地中で培養すればよい。アグロバクテリウム・ツメファシエンス(*Agrobacterium tumefaciens*)による植物の形質転換については、たとえば、Hoefgen and Willmitzer in Nucl. Acid Res. (1988) 16, 9877に記載されているか、またはとくに、F.F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, eds. S.D. Kung and R. Wu, Academic Press, 1993, pp. 15-38から公知である。

【0095】

本発明に係る発現ベクターにより形質転換されたアグロバクテリアは、同様に、公知の方法により、*Arabidopsis*のような試験植物、または禾穀類、トウモロコシ、オートムギ、ライムギ、オオムギ、コムギ、ダイズ、イネ、ワタ、サトウダイコン、カノーラ、ヒマワリ、アマ、ヘンプ、ジャガイモ、タバコ、トマト、ニンジン、パプリカ、アブラナ、タピオカ、キャッサバ、クズウコン、マンジュギク、アルファルファ、レタス、ならびにさまざまな高木種、堅果種、およびブドウ種、とくに、油含有作物、たとえば、ダイズ、ラッカセイ、トウゴマ、ヒマワリ、トウモロコシ、ワタ、アマ、アブラナ、ココナツ、アブラヤシ、ベニバナ(*Carthamus tinctorius*)、もしくはカカオ豆のような作物などの植物の形質転換に使用可能である。たとえば、傷つけた葉または細断された葉をアグロバクテリア溶液中に浸漬し、次に、好適な培地中で培養することができる。ステアリドン酸、エイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸などのPUFAを製造するには、ルリヂサ、アマ、ヒマワリ、ベニバナ、またはサクラソウ科が有利に好適である。-リノール酸、ジホモ-リノール酸、またはアラキドン酸などを製造するための他の好適な生物は、たとえば、アマ、ヒマワリ、またはベニバナである。

【0096】

遺伝子改変植物細胞は、当業者に公知の方法のいずれを用いても再生可能である。適切な方法は、先に参照した刊行物S.D. Kung and R. Wu, Potrykus or Hoefgen and Willmitzer中に見いだすことができる。

【0097】

したがって、本発明のさらなる態様は、本発明に係る少なくとも1種の核酸配列、発現カセット、またはベクターにより形質転換されたトランスジェニック生物、さらにはそのような生物から誘導される細胞、細胞培養物、組織、部分(たとえば、植物生物の場合、葉、根など)、または再生する材料に関する。「宿主生物」、「宿主細胞」、「組換え(宿主)生物」、および「トランスジェニック(宿主)細胞」という用語は、本明細書中では互換的に使用される。もちろん、これらの用語は、特定の宿主生物または特定の標的細胞だけに関連付けられるものではなく、これらの生物または細胞の子孫または潜在的子孫にも関連付けられる。突然変異または環境作用により、後続の世代でなんらかの改変を生じる可能性があるので、これらの子孫は、必ずしも親細胞と同等であるとはかぎらないが、依然として、本明細書で使用される用語に包含される。

【0098】

本発明の目的では、「トランスジェニック」または「組換え」とは、たとえば、本発明に係る核酸配列、該核酸配列を含有する発現カセット(=遺伝子構築物、核酸構築物)もしくはベクター、または本発明に係る核酸配列、発現カセット、もしくはベクターにより形質転換された生物に関して、遺伝子工学的方法により作製されるすべての構築物を意味す

10

20

30

40

50

る。この構築物について、

a)配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9に示される核酸配列もしくはその誘導体またはそれらの一部分、

b)(a)に記載されている核酸配列に機能的に連結された遺伝的調節配列、たとえば、プロモーターまたはターミネーターのような3'-および/または5'-遺伝的調節配列、あるいは

c)(a)および(b)

は、いずれも、天然の遺伝的環境中に見いだされないものであるか、または遺伝子工学的方法によりたとえば1つ以上のスクレオチド残基の置換、付加、欠失、反転、もしくは挿入である改変がなされたものである。天然の遺伝的環境とは、もとの生物中または宿主生物中の天然のゲノム座もしくは染色体座、あるいはゲノムライブラリー中の存在を意味する。ゲノムライブラリーの場合、核酸配列の天然の遺伝的環境は、好ましくは、少なくとも部分的に保持される。この環境は、少なくとも一方の側で当該核酸配列に隣接し、少なくとも50bp、好ましくは少なくとも500bp、とくに好ましくは少なくとも1,000bp、なかでもとくに好ましくは少なくとも5,000bpの配列長を有する。天然に存在する発現力セット(たとえば、本発明に係る核酸配列の天然プロモーターと、対応する-8-デサチュラーゼ遺伝子、-9-エロンガーゼ遺伝子、および/または-5-デサチュラーゼ遺伝子と、の天然に存在する組合せ)は、突然変異誘発法のように天然には存在しない合成方法(「人為的方法」)により後者を改変した場合、トランスジェニック発現力セットに変わる。適切な方法は、たとえば、US 5,565,350またはWO 00/15815に記載されている。

【0099】

本発明に係る核酸、発現力セット、またはベクターに好適な生物または宿主生物は、有利には、原則として、脂肪酸類(とりわけ不飽和脂肪酸)を合成することができるかまたは上述した組換え遺伝子を発現させるのに好適であるすべての生物である。さらなる例として挙げられうるのは、アラビドブシス、キク科(Asteraceae)(たとえば、キンセンカ)、または作物(たとえば、ダイズ、ラッカセイ、トウゴマ、ヒマワリ、トウモロコシ、ワタ、アマ、アブラナ、ココナツ、アブラヤシ、ベニバナ(Carthamus tinctorius)、もしくはカカオ豆)のような植物、真菌類(たとえば、モルティエレラ(Mortierella)属、サプロレジニア(Saprolegnia)属、もしくはピチウム(Pythium)属)、細菌類(たとえば、エシェリヒア(Escherichia)属)、酵母類(たとえば、サッカロミセス(Saccharomyces)属)、シアノバクテリア、纖毛虫類、藻類、または原生動物(たとえば、クリプテコジニウム(Cryptocodium)のような渦鞭毛藻類)のような微生物である。好ましいのは、比較的大量の油を天然で合成することのできる生物、たとえば、モルティエレラ・アルピナ(Mortierella alpina)、ピチウム・インシジオスム(Pythium insidiosum)のような真菌類、またはダイズ、アブラナ、ココナツ、アブラヤシ、ベニバナ、アマ、トウゴマ、キンセンカ、ラッカセイ、カカオ豆、もしくはヒマワリのような植物、あるいはサッカロミセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)のような酵母類であり、とりわけ好ましいのは、ダイズ、アマ、アブラナ、ヒマワリ、キンセンカ、モルティエレラ、またはサッカロミセス・セレビシエである。原理的には、先に明示したトランスジェニック生物のほかに、トランスジェニック動物、有利には非ヒト動物、たとえば線虫(*C. elegans*)が好適である。

【0100】

さらに有用な宿主細胞は、Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)に明示されている。

【0101】

有効な発現株(たとえば、比較的低いプロテアーゼ活性を呈する発現株)が、Gottesman, S., Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, California (1990) 119-128に記載されている。

【0102】

本発明のさらなる目的は、植物細胞、植物組織、または植物部分を形質転換するために、-8-デサチュラーゼ遺伝子、-9-エロンガーゼ遺伝子、および/もしくは-5-デサチ

10

20

30

40

50

ユラーゼ遺伝子をコードするDNA配列、またはそれらにハイブリダイズするDNA配列を含有する発現力セットの使用に関する。その使用の目的は、含有量が増加した二重結合を有する脂肪酸類、油類、または脂質類の含有量を増大させることである。

【0103】

その際、プロモーターの選択に依存して、-8-デサチュラーゼ遺伝子、-9-エロンガーゼ遺伝子、および/または-5-デサチュラーゼ遺伝子を、葉、種子、根粒、根、茎、または植物の他の部分に特異的に発現させることができる。脂肪酸分子中に少なくとも3つの二重結合を有する脂肪酸類、油類、もしくは脂質類を過剰生成するトランスジェニック植物またはその再生材料は、植物細胞、植物組織、または植物部分と共に、本発明のさらなる目的である。

10

【0104】

-8-デサチュラーゼ遺伝子配列、-9-エロンガーゼ遺伝子配列、および/または-5-デサチュラーゼ遺伝子配列を含有する本発明に係る発現力セットまたは核酸配列は、そのほかに、少なくとも3つの二重結合を有する脂肪酸類、油類、または脂質類の含有量を増大させる目的で、たとえば、細菌類、シアノバクテリア、酵母類、糸状菌類、纖毛虫類、および藻類などのような先に明示した生物を形質転換するために利用することもできる。

【0105】

本発明の枠内で、少なくとも3つの二重結合を有する脂肪酸類、油類、または脂質類の含有量を増大させるとは、たとえば、本発明に係る生物中で、有利には、本発明に係るトランスジェニック植物中で、-8-デサチュラーゼ遺伝子、-9-エロンガーゼ遺伝子、および/または-5-デサチュラーゼ遺伝子の機能的過剰発現に基づいて、少なくとも一植物世代の少なくとも存続期間にわたり、遺伝子改変していないもとの植物と比較して、増加した生合成能という人為的獲得形質が得られることを意味する。

20

【0106】

脂肪酸類、油類、または脂質類などの生合成を行うのに好ましい場所は、一般的には、種子または種子の細胞層であるので、-8-デサチュラーゼ遺伝子、-9-エロンガーゼ遺伝子、および/または-5-デサチュラーゼ遺伝子の種子特異的発現が適している。しかしながら、脂肪酸類、油類、または脂質類の生合成は、種子組織に限定される必要はなく、すべての他の植物部分(たとえば、表皮細胞または根粒)で組織特異的に行いうることは明らかである。

30

【0107】

そのほかに、外因性の-8-デサチュラーゼ、-9-エロンガーゼ、および/または-5-デサチュラーゼ遺伝子の構成的発現が有利である。しかしながら、他方では、誘導的発現が望ましいこともある。

【0108】

-8-デサチュラーゼ遺伝子、-9-エロンガーゼ遺伝子、および/または-5-デサチュラーゼ遺伝子の発現の効率は、たとえば、苗条分裂組織増殖によりin vitroで決定可能である。このほか、性質およびレベル、ならびに脂肪酸、油、または脂質の生合成能に及ぼす影響の点で改変された-8-デサチュラーゼ遺伝子、-9-エロンガーゼ遺伝子、および/または-5-デサチュラーゼ遺伝子の発現は、試験植物を用いて温室試験により試験しうる。

40

【0109】

本発明のこのほかの目的は、本発明に係る-8-デサチュラーゼ遺伝子配列、-9-エロンガーゼ遺伝子配列、および/もしくは-5-デサチュラーゼ遺伝子配列またはそれらにハイブリダイズするDNA配列を含有する発現力セットにより形質転換されたトランスジェニック植物のようなトランスジェニック生物、さらにはそのような植物のトランスジェニック細胞、組織、部分、および再生材料を包含する。この場合、とりわけ好ましいのは、トランスジェニック作物、たとえば、オオムギ、コムギ、ライムギ、オートムギ、トウモロコシ、ダイズ、イネ、ワタ、サトウダイコン、アブラナおよびカノーラ、ヒマワリ、アマ、ヘンプ、アザミ、ジャガイモ、タバコ、トマト、タピオカ、キャッサバ、クズウコン、

50

アルファルファ、レタス、ならびにさまざまな高木種、堅果種、およびブドウ種などである。

【0110】

本発明の目的では、植物は、単子葉植物および双子葉植物、蘇類、ならびに藻類である。

【0111】

本発明に係るさらなる改良物は、本発明に係る核酸配列または本発明に係る発現力セットを含有する上述したようなトランスジェニック植物である。

【0112】

本発明の他の目的は、以下のとおりである：

10

・藻類(たとえば、EugleniaもしくはIsochrysis)、真菌類(たとえば、Mortierella)、または蘇類(たとえば、Physcomitrella)から誘導される -8-デサチュラーゼ遺伝子配列、-9-エロンガーゼ遺伝子配列、および/もしくは -5-デサチュラーゼ遺伝子配列、またはそれにハイブリダイズするDNA配列を含有する本発明に係る発現力セットを、植物細胞、カルス組織、植物全体、または植物のプロトプラストに導入することを含む、植物の形質転換方法。

【0113】

・本明細書に記載の核酸、または脂肪酸分子中に少なくとも3つの二重結合を有する多価不飽和脂肪酸を特異的に合成する -8-デサチュラーゼ、-9-エロンガーゼ、および/もしくは -5-デサチュラーゼをコードするベクターを含むトランスジェニック生物を生育させることを含む、PUFAの製造方法。

20

【0114】

・植物中における -8-デサチュラーゼDNA配列、-9-エロンガーゼDNA配列、および/または -5-デサチュラーゼDNA配列の発現により、少なくとも3つの二重結合を有する脂肪酸類、油類、または脂質類を増加した含有量で有する植物を作製するための、-8-デサチュラーゼDNA遺伝子配列、-9-エロンガーゼDNA遺伝子配列、および/もしくは -5-デサチュラーゼDNA遺伝子配列、またはそれにハイブリダイズするDNA配列の使用。

【0115】

・配列番号2、配列番号8に示されるアミノ酸配列を含むタンパク質、またはその誘導体。

【0116】

30

・不飽和脂肪酸を製造するための、配列番号2または配列番号8の配列を有する上述のタンパク質の使用。

【0117】

本発明に係るさらなる目的は、本明細書に記載の少なくとも1種の当該核酸配列、または当該核酸配列を含む少なくとも1種の核酸構築物もしくはベクターを、好ましくは、植物または真菌類のような油生産生物中に導入することと；該生物を生育させることと；該生物中に含まれる油を単離することと；該油中に存在する脂肪酸類を放出させることと；を含む、不飽和脂肪酸の製造方法である。これらの不飽和脂肪酸は、有利に、脂肪酸分子中に少なくとも3つの二重結合を含有する。脂肪酸類は、たとえばNaOHもしくはKOHを用いて塩基加水分解により、または好ましくはメタノールもしくはエタノールのようなアルコールの存在下で酸加水分解により、油類または脂質類から放出されうる。この脂肪酸放出を行うと、遊離脂肪酸類または脂肪酸類の対応するアルキルエステルが得られる。原理的には、たとえば酵素としてリパーゼなどを用いる酵素加水分解を行うことも可能である。上述の遊離脂肪酸類または脂肪酸アルキルエステル類から出発して、モノ、ジ、および/またはトリグリセリド類を化学的または酵素的に合成することができる。本発明の方法の他の好ましい実施形態では、酵素または従来の化学を用いたエステル交換により、脂肪酸類のアルキルエステルが油類および脂質類から製造される。好ましい方法は、対応する低級アルコール(メタノール、エタノール、プロパノール、ブタノール、ヘキサノールなどのようなC1～C10アルコール)のアルコラート(alcoholates)(たとえば、メタノラートまたはエタノラート)の存在下におけるアルキルエステルの製造である。したがって、当業者

40

50

には周知のごとく、触媒量の塩基(たとえば、NaOHまたはKOH)の存在下でアルコールが油類または脂質類に添加される。

【0118】

本発明に係る少なくとも1種の当該核酸配列または本発明に係る少なくとも1種の発現力セットを油生産生物中に導入することと；該生物を生育させることと；該生物中に含まれる油を単離することと；を含む、含有量の増加した不飽和脂肪酸を有するトリグリセリドの製造方法もまた、本発明の目的の1つに挙げられる。

【0119】

本発明に係るさらなる目的は、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、または配列番号10の配列によりコードされたタンパク質の少なくとも1種と共に、飽和脂肪酸もしくは不飽和脂肪酸または飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸を含有するトリグリセリドをインキュベートすることにより、増加した含有量の不飽和脂肪酸を有するトリグリセリドを製造する方法である。本方法は、還元当量の取り込みまたは放出を行うことのできる化合物の存在下で有利には行われる。次に、脂肪酸類をトリグリセリド類から放出させることができることである。

【0120】

含有量の増加した不飽和脂肪酸を有するトリグリセリド、有利には含有量の増加した不飽和脂肪酸を有するトリグリセリドを製造する上記方法の本発明のさらなる目的は、当業者に公知の塩基加水分解を利用して、またはリパーゼのような酵素を用いて、トリグリセリドから脂肪酸が放出される方法である。

【0121】

以上に明記した方法により、有利には、脂肪酸分子中に少なくとも3つの二重結合を含有する脂肪酸類を増加した含有量で有する脂肪酸類またはトリグリセリド類を合成することができる。

【0122】

以上に明示した方法により、-8-デサチュラーゼ、-9-エロンガーゼ、および/または-5-デサチュラーゼの反応に使用される基質を、好ましくは、リノール酸($C_{20:2}^{9,1}$)²⁾、および/または-リノレン酸($C_{18:2}^{9,12,15}$)として、有利には、少なくとも3つの二重結合を含有する脂肪酸類を増加した含有量で有する脂肪酸類またはトリグリセリド類を合成することができる。このようにして、以上に明示した方法により、有利には、とくに、リノール酸($C_{20:2}^{9,12}$)、-リノレン酸($C_{18:2}^{9,12,15}$)、-リノール酸($C_{18:3}^{6,9,12}$)、ステアリドン酸($C_{18:4}^{6,9,12,15}$)、ジホモ-リノール酸($C_{20:3}^{8,11,14}$)、またはたとえばエイコサペンタエン酸およびアラキドン酸などから誘導される脂肪酸を合成することができる。

【0123】

上述した当該方法に供される生物の例は、アラビドプシス、サクラソウ科、ルリヂサ、オオムギ、コムギ、ライムギ、オートムギ、トウモロコシ、ダイズ、イネ、ワタ、サトウダイコン、アブラナおよびカノーラ、ヒマワリ、アマ、ヘンプ、ジャガイモ、タバコ、トマト、ナタネ、タピオカ、キヤッサバ、クズウコン、アルファルファ、ラッカセイ、トウゴマ、ココナツ、アブラヤシ、ベニバナ(*Carthamus tinctorius*)、またはカカオ豆のような植物、真菌類(たとえば、モルティエレラ(*Mortierella*)、サプロレジニア(*Saprolegnia*)、もしくはピチウム(*Pythium*))、細菌類(たとえば、エシェリヒア(*Escherichia*)属)、シアノバクテリア、酵母類(たとえば、サッカロミセス(*Saccharomyces*)属)、藻類、または原生動物(たとえば、クリプテコジニウム(*Cryptocodinium*)のような渦鞭毛藻類)のような微生物である。好ましいのは、比較的大量の油を天然で合成することのできる生物、たとえば、モルティエレラ・アルピナ(*Mortierella alpina*)、ピチウム・インシジオスム(*Pythium insidiosum*)のような真菌類、またはダイズ、アブラナ、ココナツ、アブラヤシ、ベニバナ、トウゴマ、キンセンカ、ラッカセイ、カカオ豆、もしくはヒマワリのような植物、あるいはサッカロミセス・セレビシエのような酵母類であり、とりわけ好ましいのは、ダイズ、アブラナ、ヒマワリ、アマ、サクラソウ科、ルリヂサ、キンセンカ、またはサ

10

20

30

40

50

ツカロミセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)である。

【0124】

宿主生物に応じて、本方法に使用される生物は、当業者に公知の方法により生育または培養される。真菌類または藻類のような微生物は、通常、炭素源(通常、糖質の形態で)、窒素源(通常、酵母抽出物のような有機窒素源または硫酸アンモニウムのような塩の形態で)、微量元素(たとえば、鉄塩、マンガン塩、またはマグネシウム塩)、および場合によりビタミンを含有する液体培地で、10 ~ 60 、好ましくは約15 ~ 40 の温度で、ガス状酸素に暴露した状態で生育される。その際、栄養液体のpHを一定値に保持しうる。すなわち、生育時、pHを調節することもあれば、調節しないこともある。その後、バッチ方式、セミバッチ方式、または連続方式で、生育させることができる。栄養素は、発酵の開始時に提供するかまたは半連続方式もしくは連続方式で供給することができる。 10

【0125】

形質転換後、まず最初に、先に記載したように植物を再生させ、次に、通常どおり培養または栽培を行う。

【0126】

生育後、通常の方法で脂質類を生物から単離する。この目的のために、生物を回収した後、まず最初に、消化させるかまたは直接使用する。有利には、ヘキサンのような無極性溶媒、もしくはエタノール、イソプロパノール、またはヘキサン/イソプロパノール、フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコールのような混合物などの好適な溶媒を用いて、0 ~ 80 、好ましくは20 ~ 50 の温度で、脂質類を抽出する。通常、バイオマスは、過剰量の溶媒を用いて、たとえば、バイオマスに対して1:4の過剰量の溶媒を用いて、抽出される。次に、溶媒を蒸留などにより除去する。超臨界CO₂を用いて抽出を行うこともできる。抽出後、残留するバイオマスを濾過などにより除去することが可能である。 20

【0127】

次に、たとえば、アセトンのような極性溶媒またはクロロホルムで処理してから濾過または遠心分離を行って混濁を除去することにより、このようにして単離された粗製油をさらに精製することができる。カラムによるさらなる精製を行うことも可能である。

【0128】

遊離酸類がトリグリセリド類から得られるように、通常の方法で後者を鹹化する。

【0129】

本発明のさらなる目的は、以上に明示した方法により生成される不飽和脂肪酸類および増大された含有量の不飽和脂肪酸類を有するトリグリセリド類、ならびに食品、動物用飼料、化粧品、または医薬品を製造するためのそれらの使用を包含する。この目的のために、後者は、食品、動物用飼料、化粧品、または医薬品に慣用量で添加される。 30

【0130】

以上に明示した方法により生成される本発明に係る上述の不飽和脂肪酸類および増加した含有量の不飽和脂肪酸類を有するトリグリセリド類は、さまざまな宿主生物中で本発明に係る核酸を発現させた結果として得られるものである。これにより、全体的にみて、不飽和脂肪酸を含有する宿主細胞中の化合物の組成が、該核酸を含有しない最初の出発宿主細胞の場合と比較して改変される。こうした改変は、該核酸によりコードされたタンパク質または酵素を天然に含有する宿主生物の場合よりも、該核酸によりコードされたタンパク質または酵素を天然に含有しない宿主生物(たとえば植物細胞)の場合の方が顕著である。これにより、少なくとも3つの二重結合を有するPUFAをより高含有量で有する油類、脂質類、リン脂質類、スフィンゴリピド類、糖脂質類、トリアシルグリセロール類、および/または遊離脂肪酸類を含有する宿主生物が得られる。本発明の目的では、増加した含有量とは、宿主生物が、本発明に係る核酸を含有しない最初の生物と比較して、少なくとも5%、有利には少なくとも10%、好ましくは少なくとも20%、特に好ましくは少なくとも30%、なかでも特に好ましくは少なくとも40%多く多価不飽和脂肪酸類を含有することを意味する。EPAまたはARAのような長鎖多価不飽和C20またはC22脂肪酸類を天然に含有しない植物の場合が特にこれに該当する。該核酸の発現により、上記手段により新規な脂質組成物 40

が生成される。この組成物も、本発明のさらなる態様である。

【実施例】

【0131】

以下の実施例により、本発明についてより詳細に説明する。

【0132】

実施例1：クローニング法の概略

Sambrook et al. (1989) (Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6)に記載されているようにして、制限切断、アガロースゲル電気泳動、DNA断片の精製、ニトロセルロース膜およびナイロン膜への核酸の転写、DNA断片の連結、大腸菌 (*Escherichia coli*) 細胞の形質転換、細菌の培養、ならびに組換えDNAの配列解析などのようなクローニング法を実施した。 10

【0133】

実施例2：組換えDNAの配列解析

ABI社製のレーザー蛍光DNAシークエンサーを用いて、サンガー法 (Sanger et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA74, 5463-5467)により、組換えDNA分子の配列決定を行った。発現対象の構築物中のポリメラーゼエラーを防止すべく、ポリメラーゼ連鎖反応から得られた断片を配列決定し、確認した。 20

【0134】

実施例3：ユーグレナ・グラシリス (*Euglena gracilis*) 由来の -8-デサチュラーゼ (=配列番号1) のクローニング

PCR増幅用の鋳型として、*Euglena gracilis* Z株由来のcDNAを使用した。*E. gracilis* Z株の培養物から抽出された全RNAからcDNAを合成した。詳述されるような制限部位を含む、以下に示されるような、ユーグレナ (*Euglena*) -8-デサチュラーゼの開始メチオニンおよび停止コドンに対するユニークなプライマーを合成した。 30

【0135】

プライマー1: EDELTA8BamF

ATGGATCCACCATGAAGTCAAAGCGCCAA

プライマー2: EDELTA8XhoR

ATCTCGAGTTATAGAGCCTTCCCCGC

PCRプロトコール

加温温度 : 45 で1分間

变性温度 : 94 で1分間

伸長温度 : 72 で2分間

サイクル数:30

PCR産物をアガロースゲルで分離し、1270bp断片を単離した。PCR断片をpGEM-T easyベクター (Promega) 中にクローニングし、次に、インサートの配列決定を行った。この結果、421個のアミノ酸残基のタンパク質をコードする1266塩基対のオープンリーディングフレームおよび停止コドンの存在が明らかになった。クローニング -8-デサチュラーゼのC末端は、Wallis and Browse (Archives of Biochem. and Biophysics, Vol. 365, No. 2, 1999)により発表された -8-デサチュラーゼ(422個の残基の酵素であることが報告されている)に対して高い相同性を有する。これらの著者による関連配列 [GenBank AF139720/ AAD45877] (同じ -8-デサチュラーゼに関するものであると報告されているが、419個の残基のオープンリーディングフレームが示されている)をも参照されたい。当該発明に示されているユーグレナ (*Euglena*) -8-デサチュラーゼの推定アミノ酸配列は、N末端が異質であるという点で既報のものと異なる。特に、LARS -8-デサチュラーゼの最初の25個のアミノ酸残基は、以下のとおりである:

MKSKRQALP LTIDGTTYDVS AWVN

一方、Wallis & Browseにより記載された配列は、以下のとおりである:

MKSKRQALS PLQLMEQTYDV SAWVN (ABB 1999に示される)

またはあるいは

10

20

30

40

50

MKSKRQALSPLQLMEQTYDVVNHF(GenBank AAD45877に示される)

デサチュラーゼ配列のN末端に存在する上述の異質性は、PCR增幅から生じたものでもなければプライマーから生じたものでもない。この違いは、タンパク質間の真の差異である。

【0136】

実施例4: Isochrysis galbanaエロンガーゼ成分IgASE1を発現するトランスジェニック植物の作製

IgASE1 cDNAのクローニングについては、Qi, B., Beaudoin, F., Fraser, T., Stobart, A. K., Napier, J.A. and Lazarus, C.M. 「ドコサヘキサエン酸(DHA)生産性微小藻類イソクリシス・ガルバナ(Isochrysis galbana)由来の、新規C18- -9-多価不飽和脂肪酸特異的伸長活性をコードするcDNAの同定 (Identification of a cDNA encoding a novel C18- -9-polyunsaturated fatty acid-specific elongating activity from the docosa hexaenoic acid (DHA)-producing microalga, Isochrysis galbana.)」 FEBS Letters 510, 159-165 (2002)に記載されている。KpnIで消化させることにより、プラスミドベクター-pCR2.1-TOPOからcDNAを放出させ、中間ベクターpBlueBac 4.5(Invitrogen)のKpnI部位に連結させた。組換えプラスミドをスクリーニングし、EcoRIを用いてインサートの向きを調べた。PstIとEcoRIを用いて、選択されたプラスミドからインサートを放出させ、同じ酵素を用いて切断されたバイナリーベクタープラスミドpCB302-1(Xiang et al, 1999)中に連結させた。これにより、トランスジェニック植物中で発現させたときにエロンガーゼ成分が葉緑体に標的化されるように、Rubiscoの小サブユニットの輸送ペプチド(Xiang at al., 1999)との翻訳融合体としてIgASE1コード領域をCaMV 35Sプロモーターの制御下に配置した。この組換えバイナリーベクターをpCB302-1ASEと名付けた。ミクロソーム膜を標的にするエロンガーゼ成分の発現を示す類似のベクターを作製するために、BamHIとSphIで消化させることにより中間ベクターからIgASE1コード領域を取り出して、pCB302-3(Xiang et al., 1999, ここに記載のpCB302-3の地図は正しくない。MCS2に関してCaMV 35Sプロモーター(+omega配列)領域とnosターミネーター領域とが逆になっている)の対応する部位に連結させた。この組換えバイナリーベクターをpCB302-3ASEと称した。

【0137】

実施例5: エロンガーゼの植物発現

エレクトロポレーションによりバイナリーベクターをアグロバクテリウム・ツメファシエンス(*Agrobacterium tumefaciens*)株GV3101に導入し、50 μg ml⁻¹カナマイシンを含有する培地で形質転換コロニーを選択した。選択されたコロニーを定常期になるまで28^hで増殖させ、次に、遠心分離により細胞を濃縮し、そして5%スクロース、0.03% Silwet-177、および10 mM MgCl₂を含有する浸漬溶液中に再懸濁させた。

【0138】

シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)生態型Columbia 4の種子を1/2濃度のムラシゲ-スクーゲ培地で発芽させ、苗を15cm植木鉢中のコンポストに移植した。21^hの生育箱中で23時間明所/1時間暗所のサイクルで開花期になるまで植物を生育させた。Clough and Bent (1998, 「花浸漬法: シロイヌナズナのアグロバクテリウム媒介形質転換のための簡便化された方法(Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*.)」 Plant Journal 16, 735-743 (1998)の花浸漬法により、植物形質転換を行った。この方法は、本質的には以下のとおりである。

【0139】

各構築物について、16個の植物を入れた2つの植木鉢を逆さにして、形質転換されたA. tumefaciens(先に記載したとおり)を含有する浸漬溶液中に入れた。次に、植物をプラスチックバッグで覆い、室温の暗所で一晩放置した。次に、バッグを取り除いて、植物を生育箱に移した。5日後、浸漬(新たなA. tumefaciens溶液を用いて)を繰り返し、そして植物を結実させた。浸漬された植物から得られたバルク種子(=T1種子)を収集し、種子トレー中のコンポストに約10000個の種子を蒔き、そして4^hで2日間層積埋蔵した後、生育箱中で生育させた。苗が第2~4本葉期に達したとき、それらにLiberty除草剤(Aventis, 0.5gグ

ルホシネート-アンモニウム M^{-1})を散布し、1週間後に再び散布を繰り返した。12の除草剤耐性植物を選択し、各系統(葉緑体または細胞質を標的とするエロンガーゼ成分)について鉢植えし、自家受精させた。これらの植物から収集されたT2種子のサンプルを、Liberty(5mgグルホシネート-アンモニウム M^{-1})を含有する1/2濃度のムラシゲ-スクーグ培地で発芽させた。次に、各生存植物から収集されたT3種子をLibertyプレート上で再び発芽させて、除草剤耐性に対して分離がされなくなった系統をスクリーニングした。そのような系統の葉から抽出された全脂肪酸を分析し、最大のC20含有量を有するもの(葉緑体を標的とするエロンガーゼ成分を有するCB12-4および細胞質を標的とするエロンガーゼ成分を有するCA1-9)を選択した。

【0140】

10

実施例6: Isochrysis galbanaエロンガーゼ成分IgASE1およびEuglena gracilis 8デサチユラーゼEUGD8を発現するトランスジェニック植物の作製

BamHIとXholを用いて酵母発現ベクターpESC-Trpから-8-デサチユラーゼコード領域を切り出し、pBlueBac 4.5(Invitrogen)のBamHIおよびXholの部位に連結させ、大腸菌(E. coli)株Tam1中へと形質転換した。BgIIIおよびBamHIを用いて組換えプラスミドからインサートを切り出し、pBECKS₁₉.6のBamHI部位に連結させ、大腸菌(E. coli)株Tam1中に形質転換した。6つの形質転換体コロニーの組換えプラスミドからDNAミニプレップ調製物を作製し、これらをXholで消化して、バイナリーベクター中のデサチユラーゼコード領域の挿入の方向を決定した。CaMV 35Sプロモーターからの発現に対して正しい向きのインサートを有する1種の組換えプラスミドをエレクトロポレーションによりアグロバクテリウム・ツメファシエンス(Agrobacterium tumefaciens)株GV3101に導入し、上述したように形質転換コロニーから浸漬溶液を調製した。

20

【0141】

Arabidopsis thaliana系統CB12-4およびCA1-9(上記参照)を上述したように花浸漬に付した。各系統に由来する約2000個のT1種子を、50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ カナマイシンを補充した1/2濃度のムラシゲ-スクーグ(固体)培地の入った15cmペトリ皿上に播き、生育箱中で発芽させた。カナマイシン耐性を有する12のCA1-9親系統植物および3つのCB12-4親系統植物を鉢植えコンポストに移植し、生育室中でさらに生育させた。各T2植物から採取した葉を用いて脂肪酸分析を行った。この植物は成熟させ結実させた。

【0142】

30

参考文献

McCormac, A.C., Elliott, M.C. and Chen, D-F.; pBECKS. 「アグロバクテリウム媒介植物形質転換のための適応性のあるバイナリーベクターシリーズ(A flexible series of binary vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation.)」 Molecular Biotechnology 8, 199-213 (1997).

Xiang, C., Han, P., Lutziger, I., Wang, K. and Oliver, D.J.; 「植物形質転換のためのミニバイナリーベクターシリーズ(A mini binary vector series for plant transformation.)」 Plant Molecular Biology 40, 711-717 (1999).

実施例7: イソクリシス・ガルバナ(Isochrysis galbana)エロンガーゼ成分IgASE1ならびにユーグレナ・グラシリス(Euglena gracilis) 8デサチユラーゼEUGD8および 5デサチユラーゼを発現するトランスジェニック植物の作製

40

フェオダクチルム・トリコルヌツム(Phaeodactylum tricornutum)に由来する 5デサチユラーゼを、ハイグロマイシン耐性選択マーカー遺伝子を保有するpGPTVプラスミド(Becker, D. et al.; Plant Mol. Biol. 20 (1992), 1195-1197)中にクローン化した。種子特異的発現に供すべく、ヴィキア・フェーバー(Vicia faber)に由来するUSPプロモーターを 5デサチユラーゼのATGの5'側にクローン化した。

【0143】

そのバイナリーベクターをアグロバクテリウム・ツメファシエンス(Agrobacterium tumefaciens)株GV 3101に導入し、30 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ハイグロマイシンを含有する培地で形質転換コロニーを選択した。 9エロンガーゼおよび 5デサチユラーゼと共にT-DNA挿入を有する

50

選択されたアグロバクテリアを、アラビドプシス(*Arabidopsis*)植物の形質転換(花形質転換)に使用した。

【0144】

ハイグロマイシンを含有するムラシゲ - スクーグ培地でシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)苗を発芽させ、耐性植物を温室に移した。

【0145】

各植物から収集された種子を収穫し、GC法を用いて全脂肪酸プロファイルを分析した。

【0146】

実施例8：植物中で種子特異的発現を行うための発現プラスミドのクローニング

pBin-USPは、プラスミドpBin19の誘導体である。USPプロモーターをEcoRI-BamHI断片としてpBin19(Bevan et al. (1980) *Nucl. Acids Res.* 12, 8711)中に挿入することにより、pBin19からpBin-USPを作製した。ポリアデニル化シグナルは、TiプラスミドpTiACH5(Gileen et al., (1984) *EMBO J.* 3, 835)のT-DNAの遺伝子3のポリアデニル化シグナルである。ここで、ヌクレオチド11749～11939をPvuII-HindIII断片として単離し、ベクターのSphI-HindIII境界間のPvuII境界にSphIリシンカーゼを追加した後、クローン化した。USPプロモーターは、ヌクレオチド1～684(遺伝子バンク受託番号X56240)に対応し、USP遺伝子の非コード領域の一部分がプロモーター中に含まれる。市販のT7標準プライマー(Stratagene)を利用し、かつ合成プライマーを用いて、標準的方法により、PCR反応で684塩基対に及ぶプロモーター断片を増幅した。

【0147】

プライマー配列：

5' -GTCGACCCGCGGACTAGTGGGCCCTAGACCCGGGGATCCGGATCTGCTGGCTATGAA-3'

EcoRI/SalIを用いてPCR断片を再び切断し、OCSターミネーターを有するベクターpBin19中に挿入した。pBinUSPという名称を有するプラスミドを得た。この構築物を、シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)、アブラナ、タバコ、およびアマの形質転換に使用した。

【0148】

実施例9：トランスジェニック油糧作物の作製

トランスジェニック植物の作製(Moloney et al., 1992, *Plant Cell Reports*, 8:238-242に従って改変した)

トランスジェニックアブラナ植物を作製するために、アグロバクテリウム・ツメファシエンス(*Agrobacterium tumefaciens*) C58C1:pGV2260または大腸菌(*Escherichia coli*)中のバイナリーベクターを使用した(Deblaere et al., 1984, *Nucl. Acids. Res.* 13, 4777-4788)。アブラナ植物(品種Drakkar, NPZ Nordeutsche Pflanzenzucht, Hohenlieth, Germany)の形質転換を行うために、3%のサッカロースを含有するムラシゲ - スクーグ培地(Murashige and Skoog 1962 *Physiol. Plant.* 15, 473)(3MS培地)において陽性に形質転換されたアグロバクテリアコロニーの一晩培養物を1:50稀釀して使用した。新たに発芽させた滅菌アブラナ植物の葉柄または胚軸(それぞれ約1cm²)を1:50アグロバクテリア稀釀液と共にペトリ皿中で5～10分間インキュベートした。この後、0.8%のBacto-Agarを含有する3MS培地上で25℃の暗所で3日間インキュベーション(concubation)を行った。3日後、500mg/lのClaforan(ナトリウムセフォタキシム)、50mg/lのカナマイシン、20μMのベンジルアミノプリン(BAP)、および1.6g/lのグルコースを含有するMS培地上で、16時間明所/8時間暗所および1週間サイクルの条件で培養を継続した。2%のサッカロース、250mg/lのクラフォラン(Claforan)、および0.8%のBacto-Agarを含有するMS培地に、生育中の苗条を移した。3週間後、根が形成されていなかった場合には、発根させるために2-インドリル酪酸を成長ホルモンとして培地に添加した。

【0149】

カナマイシンおよびクラフォラン(Claforan)を用いて2MS培地で再生苗条を取得し、発根後に土壤に移し、栽培後に環境制御室で2週間生育させて開花させ、そして成熟種子を収穫した後で脂質分析により-8-デサチュラーゼ発現を調べた。-8-位の二重結合の含有量が増加した系統を特定した。機能的にトランスジーンを発現する安定に形質転換され

10

20

30

40

50

たトランスジェニック系統では、形質転換されていない対照植物と比較して -8位の二重結合の含有量が増加していることが判明した。

【0150】

同じ手順を踏んで、-9-エロンガーゼ活性および/または-5-デサチュラーゼ活性を有する植物を作製した。

【0151】

a)トランスジェニックアマ植物

トランスジェニックアマ植物は、たとえば、Bell et al., 1999, *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.* 35(6):456-465に記載の方法を用いて、粒子衝撃法により、作製可能である。アグロバクテリア媒介形質転換は、たとえば、Mlynarova et al. (1994), *Plant Cell Report* 13: 282-285に記載されているように惹起することができる。

【0152】

実施例10：種子および葉材料からの脂質抽出

まず最初に、摩碎器を利用して植物材料(約200mg)を機械的にホモジナイズし、抽出しやすくした。1Mメタノール性塩酸および5%ジメトキシプロパンを用いて破壊細胞沈降物を85度1時間かけて加水分解し、脂質類をメチル基転移させた。得られた脂肪酸メチルエステル(FAME)をヘキサンで抽出した。抽出したFAMEを、キャピラリーカラム(Chrompack, WCOT溶融シリカ, CP wax 52 CB, 25 m, 0.32 mm)を用いて、170 ~ 240 の温度勾配で20分間、240度5分間の条件で、ガス液体クロマトグラフィーにかけて分析した。対応するFAME標準品(Sigma)と比較することにより、脂肪酸メチルエステルが何であるかを確認した。FAME混合物の好適な化学誘導体化を行って、たとえば、4,4-ジメトキシオキサゾリン誘導体(Christie, 1998)を形成することにより、GC-MSを利用して、二重結合の同定および位置分析をさらに行つた。

【0153】

図1は、対照としての野生型シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)から得られた葉組織の脂肪酸プロファイル(FAMes)を示している。図2は、イソクリシス(*Isochrysis*) -9-エロンガーゼを発現するトランスジェニックアラビドプシス(実施例4参照)から得られた葉組織の脂肪酸プロファイル(FAMes)を示している。続いて、このアラビドプシス系統をユーグレナ(*Euglena*) -8-デサチュラーゼで再形質転換した。該二重形質転換アラビドプシス系統(系統IsoElo x Eu D8 des)の脂肪酸プロファイル(FAMes)を図3に与える。

【0154】

さらに、続いて、この二重形質転換アラビドプシス系統(系統IsoElo x Eu D8 des)をモルティエレラ 5デサチュラーゼ(Mort 5)遺伝子で再形質転換した。該三重形質転換アラビドプシス系統(系統IsoElo x EU D8 des x Mort 5)の脂肪酸プロファイル(FAMes)を図4に与える。

【0155】

実施例11：異なるトランスジェニック生物から得られたアラビドプシス葉の脂肪酸メチルエステルのGCプロファイル

図5は、野生型(WT 5a)、イソクリシス・ガルバナ(*Isochrysis galbana*) 9エロンガーゼ遺伝子Ig ASE1を発現する単一トランスジェニック植物(5b)、Ig ASE1およびユーグレナ 8デサチュラーゼ(EU 8)遺伝子を発現する二重トランスジェニック植物(5c)、ならびにIg ASE1、Eu 8、およびモルティエレラ 5デサチュラーゼ(Mort 5)遺伝子を発現する三重トランスジェニック植物(5d)から抽出されたアラビドプシス葉の脂肪酸メチルエステルのGCプロファイルを示している。

【0156】

表1は、野生型(Wt)から作製されたアラビドプシス植物、イソクリシス・ガルバナ(*Isochrysis galbana*) IgASE1エロンガーゼ遺伝子を発現する単一トランスジェニック植物、Ig ASE1エロンガーゼ遺伝子およびユーグレナ 8デサチュラーゼ遺伝子を発現する二重トランスジェニック植物、ならびにIgASE1、ユーグレナ 8、およびモルティエレラ 5デサチュラーゼ遺伝子を発現する三重トランスジェニック植物の脂肪酸組成を示している。分析

10

20

30

40

50

は、ロゼット期のアラビドプシス植物から得られた葉組織を対象とする。各値は、2回の測定の平均を表している。

【表1】

脂肪酸 (全量に対するmol%)	植物源			
	Wt	IgASE1 トランス ジェニック	IgASE1+EuΔ8 トランス ジェニック	IgASE1+EuΔ8+MortΔ5 トランスジェニック
16:0	19.9	19.2	14.7	14.2
16:1	2.8	3.3	1.8	2.3
16:3	13.1	12.2	19.9	15.4
18:0	1.7	2.4	0.8	1.5
18:1n-9	1.7	5.1	1.6	3.4
18:2n-6	11.2	9.0	4.2	6.6
18:3n-3	50.1	31.0	36.0	31.2
20:2n-6	-	7.9	0.9	3.2
20:3, Δ5, 11, 14	-			1.5
20:3n-6	-	-	9.1	1.5
20:4n-6 (ARA)	-	-		6.6
20:3n-3	-	9.9	4.0	4.8
20:4Δ5, 11, 14, 17	-	-	-	1.6
20:4n-3	-	-	7.2	2.9
20:5n-3 (EPA)	-	-	-	3.3
合計 C20 PUFA	-	17.8	21.2	22.2

【0157】

トランスジーンはすべて、35S-CaMVウイルスプロモーターの制御下にある。SSU Rubisco輸送配列[T-DNA バスタ耐性]を有するイソクリシス 9エロンガーゼ(IgASE1)をユーブレナ 8デサチュラーゼ^{mut¹⁷⁵⁺³¹³}[T-DNA カナマイシン耐性]とともに再形質転換した。二重形質転換系統(バスタ耐性およびカナマイシン耐性に関しての両方がホモ接合である)をモルティエレラ 5デサチュラーゼ(T-DNA ハイグロマイシン耐性)で再び形質転換した。得られた三重形質転換系統は、バスタ耐性およびカナマイシン耐性の両方に関してホモ接合であるが、ハイグロマイシン耐性に関してはヘテロ接合である。

【図面の簡単な説明】

【0158】

【図1】図1は、対照としての野生型シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)から得られた葉組織の脂肪酸プロファイル(FAMes)を示している。

【図2】図2は、イソクリシス -9-エロンガーゼを発現するトランスジェニックアラビドプシス(実施例4参照)から得られた葉組織の脂肪酸プロファイル(FAMes)を示している。

【図3】図3は、二重形質転換アラビドプシス系統(系統IsoE1o × Eu D8 des)の脂肪酸プロファイル(FAMes)を示している。

【図4】図4は、三重形質転換アラビドプシス系統(系統IsoE1o × EU D8 des × Mort 5)の脂肪酸プロファイル(FAMes)を示している。

【図5 - 1】図5は、野生型(WT 5a)、イソクリシス・ガルバナ(*Isochrysis galbana*) 9エロンガーゼ遺伝子Ig ASE1を発現する単一トランスジェニック植物(5b)、Ig ASE1およびユーブレナ 8デサチュラーゼ(EU 8)遺伝子を発現する二重トランスジェニック植物(5c)、ならびにIg ASE1、EU 8、およびモルティエレラ 5デサチュラーゼ(Mort 5)遺伝子を発現する三重トランスジェニック植物(5d)から抽出されたアラビドプシス葉の脂肪酸メチルエステルのGCプロファイルを示している。

【図5 - 2】図5は、野生型(WT 5a)、イソクリシス・ガルバナ(*Isochrysis galbana*) 9エロンガーゼ遺伝子Ig ASE1を発現する単一トランスジェニック植物(5b)、Ig ASE1および

10

20

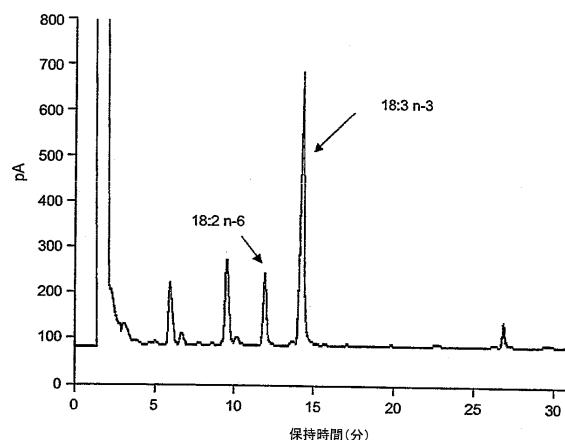
30

40

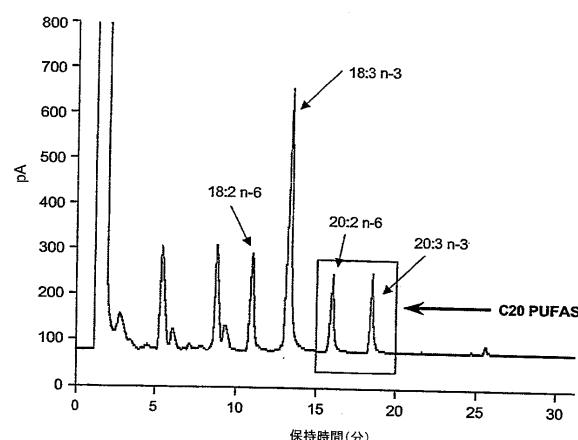
50

ユーグレナ 8デサチュラーゼ(EU 8)遺伝子を発現する二重トランスジェニック植物(5c)、ならびにIg ASE1、Eu 8、およびモルティエレラ 5デサチュラーゼ(Mort 5)遺伝子を発現する三重トランスジェニック植物(5d)から抽出されたアラビドプシス葉の脂肪酸メチルエステルのGCプロファイルを示している。

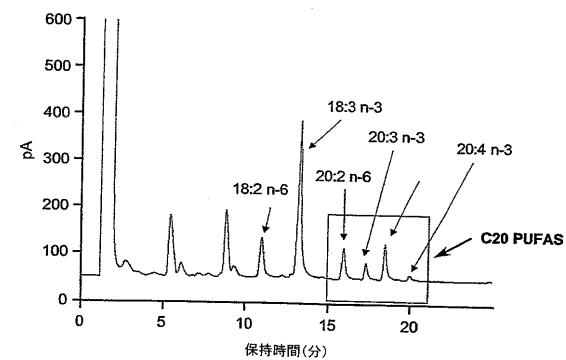
【図 1】



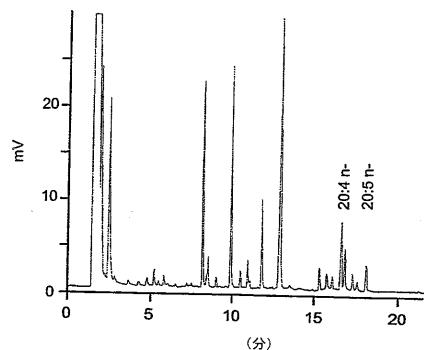
【図 2】



【図 3】

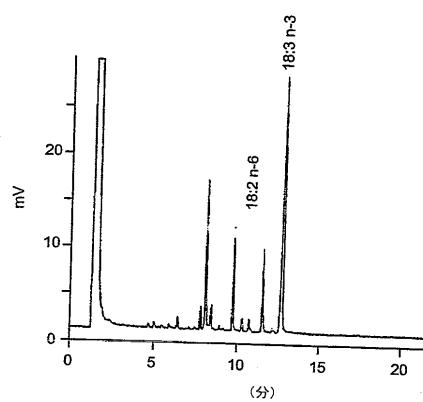


【図4】

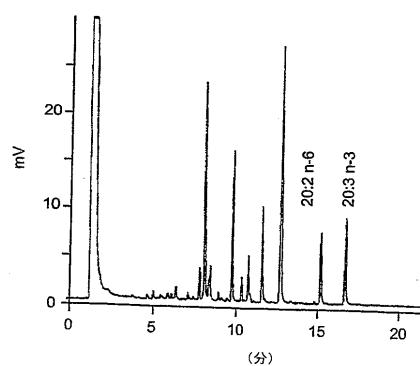


【図5-1】

5A

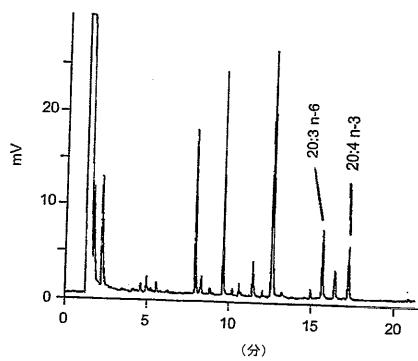


5B

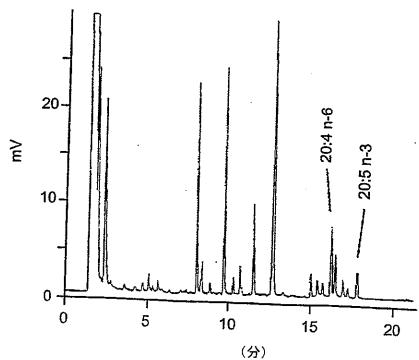


【図5-2】

5C



5D



【配列表】

0004781817000001.xml

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21	
A 0 1 K	67/027	(2006.01)	A 0 1 K	67/027	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/00	1 0 1
C 1 2 N	9/10	(2006.01)	C 1 2 N	9/10	
C 0 7 K	14/415	(2006.01)	C 0 7 K	14/415	
C 0 7 K	14/41	(2006.01)	C 0 7 K	14/41	

- (72)発明者 ナピアー, ジョナサン, エー。
 イギリス国 エーエル5 2ジェイエイチ ハーツ, ハーベンデン, ウエスト コモン, ナイニン
 グス コテージズ 8
- (72)発明者 サヤノヴァ, オルガ
 イギリス国 エーエル5 2ジェイキュー ハートフォードシャー, ハーベンデン
- (72)発明者 ラザルス, コリン, エム.
 イギリス国 ビーエス6 5キュージー ブリストル, モントペリアー, ヨーク ロード 119
- (72)発明者 キ, バオシュ
 イギリス国 ビーエーアイ 2ビージー バース, ノーフォーク クレッセント, カンバーランド
 ハウス 4
- (72)発明者 ハインツ, エルнст
 ドイツ連邦共和国 22609 ハンブルグ, ピュートカンプスヴェーク 13
- (72)発明者 ザンク, トルステン
 ドイツ連邦共和国 68165 マンハイム, セッケンハイマー シュトラーセ 4-6
- (72)発明者 ゼーリンガー, ユルリッヒ
 ドイツ連邦共和国 22926 アーレンズブルク, テオドル-シュトルム-シュトラーセ 34
 イー

審査官 中村 正展

- (56)参考文献 特表2002-531116 (JP, A)
 国際公開第02/077213 (WO, A1)
 国際公開第02/008401 (WO, A1)
 GenBank Accession AY082392, 2002年 8月23日, URL, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sviewer/viewer.fcgi?19879686:NCBI:3740674>
 Eur. J. Biochem., 2002年 9月, vol. 269, 4105-4113
 Eur. J. Lipid Sci. Technol., 2001年, vol. 103, 106-113
 GenBank Accession AF139720, 1999年 7月29日, URL, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sviewer/viewer.fcgi?5639723:NCBI:1514121>

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12P 7/64
 A01H 5/00
 A01K 67/027
 C07K 14/405-14/415
 C12N 1/00- 1/38
 C12N 5/00- 5/28
 C12N 9/00- 9/10

C12N 15/00- 15/90
JSTPlus(JDreamII)
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
CA/CONFSCI/SCISEARCH(STN)
PubMed
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
UniProt/GeneSeq