

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2017年1月12日(12.01.2017)



(10) 国際公開番号

WO 2017/006918 A1

- (51) 国際特許分類:
C12P 7/64 (2006.01) C12P 1/00 (2006.01)
C12N 1/13 (2006.01) C12R 1/89 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/069825
- (22) 国際出願日: 2016年7月4日(04.07.2016)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2015-134715 2015年7月3日(03.07.2015) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人九州大学(KYUSHU UNIVERSITY, NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION) [JP/JP]; 〒8128581 福岡県福岡市東区箱崎六丁目10番1号 Fukuoka (JP). 学校法人甲南学園(KONAN GAKUEN) [JP/JP]; 〒6588501 兵庫県神戸市東灘区岡本八丁目9番1号 Hyogo (JP). 日本水産株式会社(NIPPON SUISAN KAISHA, LTD.) [JP/JP]; 〒1058676 東京都港区西新橋一丁目3番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 沖田 裕司(OKITA, Yuji); 〒1920991 東京都八王子市七国一丁目32番3号 日本水産株

式会社中央研究所内 Tokyo (JP). 伊東 信(ITO, Makoto); 〒8128581 福岡県福岡市東区箱崎六丁目10番1号 国立大学法人九州大学内 Fukuoka (JP). 濱口 理恵(HAMAGUCHI, Rie); 〒8128581 福岡県福岡市東区箱崎六丁目10番1号 国立大学法人九州大学内 Fukuoka (JP). 合田 初美(GODA, Hatsumi); 〒8128581 福岡県福岡市東区箱崎六丁目10番1号 国立大学法人九州大学内 Fukuoka (JP). 持永 聖也(MOCHINAGA, Seiya); 〒8128581 福岡県福岡市東区箱崎六丁目10番1号 国立大学法人九州大学内 Fukuoka (JP). 本多大輔(HONDA, Daisuke); 〒6588501 兵庫県神戸市東灘区岡本八丁目9番1号 甲南大学内 Hyogo (JP).

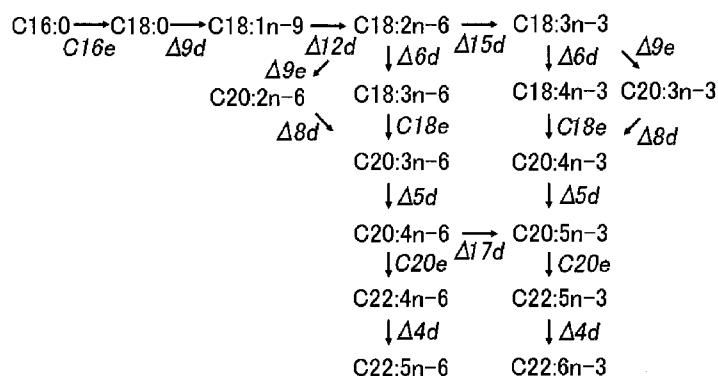
- (74) 代理人: 須藤 阿佐子, 外(SUDO, Asako et al.); 〒1840002 東京都小金井市梶野町5-6-26 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,

[続葉有]

(54) Title: LABYRINTHULID MICROORGANISM CAPABLE OF PRODUCING MICROBIAL OIL, MICROBIAL OIL, METHODS RESPECTIVELY FOR PRODUCING SAID MICROORGANISM AND FOR PRODUCING SAID MICROBIAL OIL, AND USES OF SAID MICROORGANISM AND SAID MICROBIAL OIL

(54) 発明の名称: 微生物油産生ラビリントチュラ類、微生物油、ならびにそれらの作成方法およびそれらの使用

[図1]



(57) Abstract: [Problem] To provide a *Labyrinthulid* microorganism capable of producing a PUFA only through the elongase-desaturase pathway. [Solution] A *Labyrinthulid* microorganism which does not have an ability of producing a PUFA through the endogenous PUFA-PKS pathway or has the ability at an extremely weak level and which has an ability of producing a PUFA through the endogenous elongase-desaturase pathway. The *Labyrinthulid* microorganism is a microorganism belonging to the genus *Parietichytrium* or *Parietichytrium*.

(57) 要約: 課題: エロンガーゼ/デサチュラーゼ経路のみでPUFAを生産するラビリントチュラを提供すること。解決手段: 内因性PUFA-PKS経路によるPUFAの生産能が無いあるいは極めて微弱であり、かつ内因性エロンガーゼ/デサチュラーゼ経路によるPUFA生産能を有するラビリントチュラ類。パリエティキトリウム属(*Parietichytrium*)またはシゾキトリウム属(*Schizochytrium*)のいずれかに属する微生物である。



WO 2017/006918 A1



MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 規則 13 の 2 に基づいて明細書とは別に提出された、寄託された生物材料に関する表示 (規則 13 の 2.4(d)(i)及び 48.2(a)(viii))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

明 細 書

発明の名称：

微生物油産生ラビリンチュラ類、微生物油、ならびにそれらの作成方法およびそれらの使用

技術分野

[0001] 本発明は、ラビリンチュラ類から得られる微生物油、微生物油産生ラビリンチュラ類、ならびにそれらの作成方法およびそれらの使用に関する。

より詳細には、高度不飽和脂肪酸（P U F A）、その生産に関するものであり、

脂肪酸組成が改変するように遺伝子改変されたラビリンチュラ類、好ましくはエロンガーゼ／デサチュラーゼ経路のみでP U F Aを生産するラビリンチュラ類、それらを用いたP U F Aの製造方法およびそれらを用いて製造されたP U F Aを含有する脂質（微生物油）およびそれらの使用に関する。

背景技術

[0002] ラビリンチュラ類（Labyrinthulids）はラビリンチュラ目（Order Labyrinthulales）、ヤブレツボカビ目（Order Thraustochytriales）を含むラビリンチュラ綱（Class Labyrinthulomycetes）に属する真核微生物で、海洋に普遍的に存在することが知られている。また、ヤブレツボカビ目に属する微生物はヤブレツボカビ類（Thraustochytrids）と総称されることもある。

ラビリンチュラ類は、産業的には油糧微生物として注目されており、これらラビリンチュラ類が生産するD H AはD H A含有脂質の原料や、高D H A含有飼料等が製品化されている（非特許文献1）。具体的には、例えば、トロウストキトリウム属、シゾキトリウム属の生育技術（特許文献1）、トロウストチトリアレ類、トロウストチトリアレ類から抽出される ω -3 H U F A（高度不飽和脂肪酸）の利用技術（特許文献2）等が挙げられる。

[0003] 一般に、P U F Aはエロンガーゼ／デサチュラーゼ経路（スタンダード経路と呼ばれることもある。）により生合成されることが知られているが、あ

る種のラビリンチュラ類はこれとは異なる経路、すなわちポリケチド合成酵素（ポリケチドシンターゼ、polyketide synthase、PKS）による代謝経路でPUFAを生産することが明らかにされている（非特許文献2）。以下、本発明ではこの経路をPUFA-PKS経路またはPKS経路と呼ぶ。この経路によって生産されるPUFAの組成は、そのほとんどがDHAとDPA_{n-6}という特徴を有する。

[0004] ラビリンチュラ類（特にヤブレッツボカビ類）はPUFA生合成経路としてPUFA-PKS経路のみを有し、他の生物では一般的なエロンガーゼ／デサチュラーゼ経路を有さないと考える科学者もいる（非特許文献3）。実際、ラビリンチュラ類のPUFA-PKS経路の遺伝子破壊により当該ラビリンチュラ類は致死性となり、培地中にPUFAを添加しなければ生育できなくなったとの報告を例示することができる（非特許文献3）。この結果は、当該ラビリンチュラ類の生育にはPUFAが必須であり、唯一のPUFA生合成経路であるPUFA-PKS経路の遺伝子が破壊されたため、生育のために外因性のPUFAを要求する性質に変化したことを意味する。

[0005] しかしこのような当業者の常識に反して、我々は検討の結果、PUFA生合成経路としてPUFA-PKS経路とエロンガーゼ／デサチュラーゼ経路の双方を有するラビリンチュラ類が存在することを見出した。具体的には特許文献3の明細書や非特許文献5に詳述されている。

Thraustochytrium aureum ATCC34304を例示すると、この株がエロンガーゼ／デサチュラーゼ経路のエントリー酵素である $\Delta 12$ デサチュラーゼ遺伝子を有することを明らかにした。また、この遺伝子を相同組換えにより破壊した株は、 $\Delta 12$ デサチュラーゼの基質であるオレイン酸を野生株と比較して顕著に蓄積することや、産物であるリノール酸およびその生合成系の下流に位置するPUFAの減少が見られることを明らかにした。さらに、この株はエロンガーゼ／デサチュラーゼ経路によってPUFAを生産することが可能なため、PUFA-PKS経路遺伝子を破壊しても致死性にならないことも明らかにした。この報告は、ラビリンチュラ

類でも P U F A 生合成経路としてエロンガーゼ／デサチュラーゼ経路が機能していることを初めて示したもので、非特許文献 6 でも取り上げられた。

[0006] 冒頭で、主要な脂肪酸として D H A を産生するラビリンチュラ類が産業的に広く利用されていることを述べた。これに対し、D H A 以外の所望の P U F A を主要な脂肪酸として含有するラビリンチュラ類を作出することは、P U F A－P K S 経路とエロンガーゼ／デサチュラーゼ経路の双方を有するラビリンチュラ類の発見およびこれらに対する形質転換技術（特許文献 3、非特許文献 7）の適用によって初めて可能になった。すなわち、まず相同組換えによる遺伝子破壊により P U F A－P K S 経路の遺伝子を破壊し、次いでエロンガーゼ／デサチュラーゼ経路を構成する酵素の遺伝子を適宜破壊または過剰発現することにより、D H A 以外の特定の P U F A を主要な脂肪酸として含有する株を作出することが可能である。具体的には、特許文献 3 の実施例 1 2 が例示される。この実施例には、Thraustochytrium aureum ATCC 34304 の P U F A－P K S 経路の遺伝子を破壊し、次いで C 2 0 エロンガーゼ遺伝子を破壊し、さらにミズカビ Saprolegnia diclina 由来 ω 3 デサチュラーゼ遺伝子を導入することにより、野生株と比較してアラキドン酸が約 6 倍、E P A が約 1 0 倍に増加し、かつ D H A が約 1／1 6 倍に減少した株の作出に成功したことが記載されている。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献 1：特許 3 1 2 7 1 6 1 号公報

特許文献 2：特許 3 6 6 9 3 7 2 号公報

特許文献 3：W O 2 0 1 2－0 4 3 8 2 6

特許文献 4：米国特許公開 U S 2 0 0 5／0 0 1 4 2 3 1 号公報

非特許文献

[0008] 非特許文献 1：ツヴィ・コーエン (Zvi Cohen) ら編, 「シングル セル オイルズ マイクロバイアル アンド アルガル オイルズ セカンド エディション (Single Cell Oils Microbial and Algal Oils 2nd edition)」, (米国), エイオー

シーエス・プレス(AOCS Press), 2010年, p. 88

非特許文献2: Metz JG, Roessler P, Facciotti D, et al. Production of polyunsaturated fatty acids by polyketide synthases in both prokaryotes and eukaryotes. *Science* 2001;293:290-293

非特許文献3: Ratledge C. Omega-3 biotechnology: Errors and omissions, *Biotechnology Advances* 30 (2012) 1746-1747

非特許文献4: Lippmeier J.C. et al., *Lipids*, 44(7), 621-630(2009)

非特許文献5: Matsuda T, Sakaguchi K, Hamaguchi R, Kobayashi T, Abe E, Hama Y, Hayashi M, Honda D, Okita Y, Sugimoto S, Okino N, Ito M. The analysis of delta12 fatty acid desaturase function revealed that two distinct pathways are active for the synthesis of polyunsaturated fatty acids in *Thraustochytrium aureum* ATCC34304. *J. Lipid Res.* 53(6):1210-1222 (2012)

非特許文献6: ASBMB today June 2012 p.30

非特許文献7: Sakaguchi K. et al., Versatile Transformation System That Is Applicable to both Multiple Transgene Expression and Gene Targeting for *Thraustochytrids*. *Appl. Environ. Microbiol.* 78(9):3193-3202 (2012)

非特許文献8: Yazawa K., *Lipids*, 31, Supple. 297-300 (1996)

非特許文献9: 日本農芸化学会会誌, 77, 2, 150-153(2003)

非特許文献10: 「バイオ実験イラストレイテッド 第2巻 遺伝子解析の基礎」、p63-68、秀潤社、1995年発行

非特許文献11: Sanger, F. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci*, 74, 5463 (1977)

非特許文献12: Cigan and Donahue, 1987; Romanos et al., 1992

非特許文献13: Ausubel F.M. et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Unit 13(1994)」

非特許文献14: Guthrie C., Fink G. et al., *Methods in Enzymology: Guid*

e to Yeast Genetics and Molecular Biology, Volume 194(1991)

非特許文献15: Qiu, X., et al. J. Biol. Chem., 276, 31561-6 (2001)

非特許文献16: Abe E., et al., J. Biochem, 140, 247-253 (2006)

非特許文献17: 「バイオ実験イラストレイテッド 第2巻 遺伝子解析の基礎」、p117-128、秀潤社、1995年発行

非特許文献18: DIG説明書集[日本語版] 8th, Roche Applied Science

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] 本発明は、脂肪酸組成が改変するように遺伝子改変されたラビリンチュラ類、好ましくはエロンガーゼ／デサチュラーゼ経路のみでPUFAを生産するラビリンチュラ類、それらを用いたPUFAの製造方法およびそれらを用いて製造されたPUFAを含有する脂質（微生物油）およびそれらの使用を提供することを課題とする。

PUFA-PKS経路とエロンガーゼ／デサチュラーゼ経路の双方を有するラビリンチュラ類を用いて、DHA以外の特定のPUFAを主要な脂肪酸として含有する株を作出するためには、まずPUFA-PKS経路によるDHA生産を何らかの手段で停止あるいは抑制する必要があった。具体的には相同組換えによるPUFA-PKS経路の遺伝子の破壊の他に、UV照射や薬剤処理等による突然変異株の取得、RNAi (RNA interference) によるPUFA-PKS遺伝子の発現抑制等の方法が考えられる。これらの方法のうち、相同組換えによる遺伝子破壊については先述のとおり、技術的には確立されている。しかし、マーカーとして使用可能な薬剤耐性遺伝子の数は一般に限りがあるので、PUFA-PKS経路の遺伝子の破壊にマーカーを用いると、さらなる遺伝子破壊や遺伝子導入の際に使用できるマーカーの数が減少するという問題があった。このことは、PUFA-PKS経路の遺伝子の破壊の後に実施可能な遺伝子破壊・遺伝子導入の回数の減少を意味するので、より高性能な株を作出する上での障害となる。

また、突然変異やRNAiによる発現抑制は他生物では実績がある方法だが

、ラビリンチュラ類におけるこれらの方法による所望の株の取得可能性は不明である。

本発明は、内因性 P U F A - P K S 経路による P U F A の生産能が無いあるいは極めて微弱であり、かつ内因性エロンガーゼ／デサチュラーゼ経路による P U F A 生産能を有するラビリンチュラ類、それらを用いた P U F A を含有する脂質の製造方法およびそれらを用いて製造した P U F A を含有する脂質を提供することを目的とするものである。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明者らは鋭意検討の結果、内因性 P U F A - P K S 経路による P U F A の生産能が無いあるいは極めて微弱であり、かつ内因性エロンガーゼ／デサチュラーゼ経路による P U F A 生産能を有するラビリンチュラ類が存在することを見出し、ラビリンチュラ類から得られる微生物油、微生物油産生ラビリンチュラ類、ならびに、それらの作成方法、および微生物油の使用に係る本発明を完成した。

[0011] 本発明は以下の（１）から（２９）に記載の微生物油を要旨とする。

（１）下記（ａ）～（ｇ）からなる群から選ばれる１以上を満たす、微生物油。

（ａ）A R A が全脂肪酸組成のうち、５％以上である。

（ｂ）D G L A が全脂肪酸組成のうち、２．５％以上である。

（ｃ）E T A が全脂肪酸組成のうち、０．３５％以上である。

（ｄ）E P A が全脂肪酸組成のうち、４％以上である。

（ｅ）n-6 D P A が全脂肪酸組成のうち、０．２０％以下である。

（ｆ）D H A が全脂肪酸組成のうち、０．５０％以下である。

（ｇ）D H A と n-6 D P A の合計が全脂肪酸組成のうち、０．７％以下である。

（２）前記微生物油が、下記（ｈ）～（ｌ）からなる群から選ばれる１以上を満たす、（１）に記載の微生物油。

（ｈ）G C 面積で L A / D H A の値が ０．６ 以上 １．０ 以下である。

- (i) GC面積でGLA/DHAの値が0.35以上10以下である。
 - (j) GC面積でDGLA/DHAの値が0.35以上10以下である。
 - (k) GC面積でARA/DHAの値が0.7以上50以下である。
 - (l) GC面積でEPA/DHAの値が0.35以上50以下である。
- (3) 前記微生物油が、下記(m)～(o)からなる群から選ばれる1以上を満たす、(1)または(2)に記載の微生物油。
- (m) GC面積でLA/EPAの値が0.06以上0.17以下である。
 - (n) GC面積でGLA/EPAの値が0.04以上0.12以下である。
 - (o) GC面積でDTA/EPAの値が0.01以上0.4以下である。
- (4) 前記微生物油が、GC面積でDTA/ARAの値が0.01以上0.45以下を満たす、(1)ないし(3)のいずれかに記載の微生物油。
- (5) 前記微生物油が、GC面積でDTA/DGLAの値が0.01以上1.45以下を満たす、(1)ないし(4)のいずれかに記載の微生物油。
- (6) 前記微生物油が、下記(p)～(t)からなる群から選ばれる1以上を満たす、(1)ないし(5)のいずれかに記載の微生物油。
- (p) GC面積でLA/n-6DPAの値が0.4以上20以下である。
 - (q) GC面積でGLA/n-6DPAの値が0.2以上10以下である。
 - (r) GC面積でDGLA/n-6DPAの値が0.35以上30以下である。
- 。
- (s) GC面積ARA/n-6DPAの値が0.7以上60以下である。
 - (t) GC面積でEPA/n-6DPAの値が1.0以上70以下である。
- (7) 前記微生物油が、下記(u)～(x)からなる群から選ばれる1以上を満たす、(1)ないし(6)のいずれかに記載の微生物油。
- (u) GC面積でDGLA/LAの値が1.4以上10以下である。
 - (v) GC面積でARA/LAの値が5.1以上20以下である。
 - (w) GC面積でEPA/LAの値が5.5以上30以下である。
 - (x) GC面積でDTA/LAの値が0.01以上0.4以下である。
- (8) 前記微生物油が、下記(y)および(z)からなる群から選ばれる1

以上を満たす、(1) ないし (7) のいずれかに記載の微生物油。

(y) GC面積でDGLA/GLAの値が4.5以上20以下である。

(z) GC面積でARA/GLAの値が9以上30以下である。

(9) 前記微生物油が、GC面積でn-6DPA/DTAの値が1.5以下を満たす、(1) ないし (8) のいずれかに記載の微生物油。

(10) 前記微生物油が、GC面積でDHA/n-3DPAの値が4以下を満たす、(1) ないし (9) のいずれかに記載の微生物油。

(11) 前記微生物油が、GC面積でC20PUFA/C22PUFAの値が0.5以上50以下を満たす、(1) ないし (10) のいずれかに記載の微生物油。

(12) 前記微生物油が、GC面積でn-6PUFA/n-3PUFAの値が1.8以上を満たす、(1) ないし (11) のいずれかに記載の微生物油。

[0012] (13) 下記(A)および(B)からなる群から選ばれる、脂肪酸組成が改変するように遺伝子改変されたラビリンチュラ類から得られる微生物油。

(A) 遺伝子を破壊または／および発現抑制することにより、脂肪酸組成が改変されたラビリンチュラ類。

(B) 遺伝子を破壊または／および発現抑制することに加えて、さらに遺伝子を導入することにより、脂肪酸組成が改変されたラビリンチュラ類。

(14) 破壊または／および発現抑制する遺伝子が、PKS遺伝子、脂肪酸鎖長伸長酵素遺伝子、および/または脂肪酸不飽和化酵素遺伝子である、(13)に記載の微生物油。

(15) 導入する遺伝子が、脂肪酸鎖長伸長酵素遺伝子および/または脂肪酸不飽和化酵素遺伝子である、(13)または(14)に記載の微生物油。

(16) 脂肪酸鎖長伸長酵素遺伝子がC20エロンゲース遺伝子である、(14)または(15)に記載の微生物油。

(17) 脂肪酸不飽和化酵素遺伝子が $\Delta 4$ デサチュラーゼ遺伝子および/または $\omega 3$ デサチュラーゼ遺伝子である、(13)ないし(16)のいずれかに記載の微生物油。

(18) ラビリンチュラ類の遺伝子を破壊または導入する方法が、エレクトロポレーション、遺伝子銃法またはゲノム編集によって行うことを特徴とする、(13) ないし (17) のいずれかに記載の微生物油。

(19) ラビリンチュラ類の遺伝子を発現抑制する方法が、アンチセンス法あるいはRNA干渉であることを特徴とする、(13) ないし (18) のいずれかに記載の微生物油。

[0013] (20) 下記 (C) および (D) からなる群から選ばれるラビリンチュラ類から得られる微生物油。

(C) PUFA-PKS経路によるPUFAの生産能が無いあるいは極めて微弱であるラビリンチュラ類。

(D) 元来有するPUFA-PKSを破壊あるいは極めて微弱に発現を抑制したラビリンチュラ類。

(21) PUFA-PKS経路によるPUFAの生産能が無いあるいは極めて微弱であるラビリンチュラ類が、Parietichytrium属または

Schizochytrium属に属するラビリンチュラ類である、(20) に記載の微生物油。

(22) Parietichytrium属に属するラビリンチュラ類が、Parietichytrium sarkarianumに属するラビリンチュラ類である、(21) に記載の微生物油。

(23) Schizochytrium属に属するラビリンチュラ類が、Schizochytrium aggregatumに属するラビリンチュラ類である、(21) に記載の微生物油。

(24) Parietichytrium sarkarianumに属する微生物が、

Parietichytrium sp. SEK358、FERM BP-11405、Parietichytrium sarkarianum SEK364、FERM BP-11298またはParietichyt

rium sp. SEK571、FERM BP-11406である、(22)に記載の微生物油。

(25) Schizochytrium aggregatumに属する微生物が、

Schizochytrium aggregatum ATCC28209である、(23)に記載の微生物油。

(26) 元来有するPUFA-PKSを破壊あるいは極めて微弱に発現を抑制したラビリンチュラ類が、Thraustochytrium属である、請求項20に記載の微生物油。

(27) Thraustochytrium属が、Thraustochytrium aureumである、(26)に記載の微生物油。

[0014] (28) 前記微生物油が、下記(E)～(H)からなる群から選ばれる1以上を満たす、微生物油。

(E) ARAが改変前に比較して改変後のGC面積比率が3倍以上である微生物油。

(F) DGLAが改変前に比較して改変後のGC面積比率が4倍以上である微生物油。

(G) ETAが改変前に比較して改変後のGC面積比率が7倍以上である微生物油。

(H) EPAが改変前に比較して改変後のGC面積比率が7倍以上である微生物油。

[0015] また、本発明は以下の(29)から(56)に記載の微生物油を作成する方法を要旨とする。

(29) 下記(a)～(g)からなる群から選ばれる1以上を満たす微生物油を作成する方法。

(a) ARAが全脂肪酸組成のうち、5%以上である。

(b) DGLAが全脂肪酸組成のうち、2.5%以上である。

(c) ETAが全脂肪酸組成のうち、0.35%以上である。

(d) EPAが全脂肪酸組成のうち、4%以上である。

(e) n-6DPAが全脂肪酸組成のうち、0.20%以下である。

(f) DHAが全脂肪酸組成のうち、0.50%以下である。

(g) DHAとn-6DPAの合計が全脂肪酸組成のうち、0.7%以下である。

(30) 微生物油が、下記(h)～(l)からなる群から選ばれる1以上を満たす微生物油である、(29)に記載の微生物油の作成方法。

(h) GC面積でLA/DHAの値が0.6以上1.0以下である。

(i) GC面積でGLA/DHAの値が0.35以上1.0以下である。

(j) GC面積でDGLA/DHAの値が0.35以上1.0以下である。

(k) GC面積でARA/DHAの値が0.7以上5.0以下である。

(l) GC面積でEPA/DHAの値が0.35以上5.0以下である。

(31) 微生物油が、下記(m)～(o)からなる群から選ばれる1以上を満たす微生物油である、(29)または(30)に記載の微生物油の作成方法。

(m) GC面積でLA/EPAの値が0.06以上0.17以下である微生物油。

(n) GC面積でGLA/EPAの値が0.04以上0.12以下である微生物油。

(o) GC面積でDTA/EPAの値が0.01以上0.4以下である微生物油。

(32) 微生物油が、GC面積でDTA/ARAの値が0.01以上0.45以下を満たす微生物油である、(29)ないし(31)のいずれかに記載の微生物油の作成方法。

(33) 微生物油が、GC面積でDTA/DGLAの値が0.01以上1.8以下を満たす微生物油である、(29)ないし(32)のいずれかに記載の微生物油の作成方法。

(34)

微生物油が、下記（p）～（t）のからなる群から選ばれる 1 以上を満たす微生物油である、請求項 29 ないし 33 のいずれかに記載の微生物油の作成方法。

（p）GC 面積で $LA / n-6DPA$ の値が 0.4 以上 2.0 以下である微生物油。

（q）GC 面積で $GLA / n-6DPA$ の値が 0.2 以上 1.0 以下である微生物油。

（r）GC 面積で $DGLA / n-6DPA$ の値が 0.35 以上 3.0 以下である微生物油。

（s）GC 面積で $ARA / n-6DPA$ の値が 0.7 以上 6.0 以下である微生物油。

（t）GC 面積で $EPA / n-6DPA$ の値が 0.4 以上 7.0 以下である微生物油。

（35）微生物油が、下記（u）～（x）のからなる群から選ばれる 1 以上を満たす微生物油である、（29）ないし（34）のいずれかに記載の微生物油の作成方法。

（u）GC 面積で $DGLA / LA$ の値が 1.4 以上 1.0 以下である微生物油。

（v）GC 面積で ARA / LA の値が 5.1 以上 2.0 以下である微生物油。

（w）GC 面積で EPA / LA の値が 5.5 以上 3.0 以下である微生物油。

（x）GC 面積で DTA / LA の値が 0.01 以上 0.4 以下である微生物油。

（36）微生物油が、下記（y）および（z）のからなる群から選ばれる 1 以上を満たす微生物油である、（29）ないし（35）のいずれかに記載の微生物油の作成方法。

（y）GC 面積で $DGLA / GLA$ の値が 4.5 以上 2.0 以下である微生物油。

(z) GC面積でARA/GLAの値が9以上30以下である微生物油。

(37) 微生物油が、GC面積でn-6DPA/DTAの値が1.5以下の微生物油である、(29)ないし(36)のいずれかに記載の微生物油の作成方法。

(38) 微生物油が、GC面積でDHA/n-3DPAの値が4以下の微生物油である、(29)ないし(37)のいずれかに記載の微生物油の作成方法。

(39) 微生物油が、GC面積でC20PUFA/C22PUFAの値が0.5以上50以下の微生物油である、(29)ないし(38)のいずれかに記載の微生物油の作成方法。

(40) 微生物油が、GC面積でn-6PUFA/n-3PUFAの値が1.8以上の微生物油である、(29)ないし(39)に記載の微生物油の作成方法。

[0016] (41) 下記(A)および(B)からなる群から選ばれる、脂肪酸組成が改変するように遺伝子改変されたラビリンチュラ類に微生物油を産生させることを特徴とする、微生物油を作成する方法。

(A) 遺伝子を破壊または／および発現抑制することにより、脂肪酸組成が改変されたラビリンチュラ類。

(B) 遺伝子を破壊または／および発現抑制することに加えて、さらに遺伝子を導入することにより、脂肪酸組成が改変されたラビリンチュラ類。

(42) 破壊または／および発現抑制する遺伝子が、PKS遺伝子、脂肪酸鎖長伸長酵素遺伝子、および/または、脂肪酸不飽和化酵素遺伝子である、(41)に記載の微生物油の作成方法。

(43) 導入する遺伝子が、脂肪酸鎖長伸長酵素遺伝子、および/または、脂肪酸不飽和化酵素遺伝子である、(41)または(42)に記載の微生物油の作成方法。

(44) 脂肪酸鎖長伸長酵素遺伝子が、C20エロンゲース遺伝子である、(42)または(43)に記載の微生物油の作成方法。

(45) 脂肪酸不飽和化酵素が、 $\Delta 4$ デサチュラーゼ遺伝子、および/または、 $\omega 3$ デサチュラーゼ遺伝子である、請求項41ないし44のいずれかに記

載の微生物油の作成方法。

(46) ラビリンチュラ類の遺伝子を破壊または導入する方法が、エレクトロポレーション、遺伝子銃法またはゲノム編集によって行うことを特徴とする、(41) ないし (45) に記載の微生物油の作成方法。

(47) ラビリンチュラ類の遺伝子を発現抑制する方法が、アンチセンス法あるいはRNA干渉であることを特徴とする、(41) ないし (46) のいずれかに記載の微生物油の作成方法。

[0017] (48) 下記 (C) および (D) からなる群から選ばれる、ラビリンチュラ類に微生物油を産生させることを特徴とする、微生物油を作成する方法。

(C) PUFA-PKS経路によるPUFAの生産能が無いあるいは極めて微弱であるラビリンチュラ類。

(D) 元来有するPUFA-PKSを破壊あるいは極めて微弱に発現を抑制したラビリンチュラ類。

(49) PUFA-PKS経路によるPUFAの生産能が無いあるいは極めて微弱であるラビリンチュラ類が、Parietichytrium属または

Schizochytrium属に属するラビリンチュラ類である、(48) に記載の微生物油の作成方法。

(50) Parietichytrium属に属するラビリンチュラ類が、Parietichytrium sarkarianumに属するラビリンチュラ類である、(49) に記載の微生物油の作成方法

(51) Schizochytrium属に属するラビリンチュラ類が、Schizochytrium aggregatumに属するラビリンチュラ類である、(50) に記載の微生物油の作成方法。

(52) Parietichytrium sarkarianumに属する微生物が、Parietichytrium sp. SEK358、FERM BP-11405、Parietichytrium sarkarianum SEK364、FERM BP-11298またはParie

tichytrium sp. SEK571、FERM BP-11406である、(50) に記載の微生物油の作成方法。

(53) Schizochytrium aggregatumに属する微生物が、

Schizochytrium aggregatum ATCC28209である、(51) に記載の微生物油の作成方法。

(54) 元来有するPUFA-PKSを破壊あるいは極めて微弱に発現を抑制したラビリンチュラ類が、Thraustochytrium属である、

(48) 記載の微生物油の作成方法。

(55) Thraustochytrium属が、Thraustochytrium aureumである、(54) に記載の微生物油の作成方法。

[0018] (56) 下記(E)～(H)からなる群から選ばれる1以上を満たす微生物油を作成する方法。

(E) ARAが改変前に比較して改変後のGC面積比率が3倍以上である微生物油。

(F) DGLAが改変前に比較して改変後のGC面積比率が4倍以上である微生物油。

(G) ETAが改変前に比較して改変後のGC面積比率が7倍以上である微生物油。

(H) EPAが改変前に比較して改変後のGC面積比率が7倍以上である微生物油。

[0019] また、本発明は、以下の(57)の食品、飼料、医薬または工業製品、(58)の遺伝子改変されたラビリンチュラ類、(59)の遺伝子改変されたラビリンチュラ類を作成する方法を要旨とする。

(57) 脂質組成物として、(1)ないし(28)のいずれかに記載の微生物油を含む、食品、飼料、医薬または工業製品。

(58) (1)ないし(28)のいずれかに記載の微生物油を産生する、産生する脂肪酸組成が改変するように遺伝子改変されたラビリンチュラ類。

(59) (58)に記載の産生する脂肪酸組成が改変するように遺伝子改変されたラビリンチュラ類を作成する方法。

図面の簡単な説明

[0020] [図1]エロンガーゼ／デサチュラーゼ経路およびこの生合成経路に関わる酵素を示す。(符号の簡単な説明) C16:0: パルミチン酸 (Palmitic Acid)、C18:0ステアリン酸 (Stearic Acid)、C18:1n-9: オレイン酸 (Oleic Acid)、C18:2n-6: リノール酸 (LA, Linoleic Acid)、C18:3n-3: α -リノレン酸 (ALA, α -Linolenic Acid)、C18:3n-6: γ -リノレン酸 (GLA, γ -Linolenic Acid)、C18:4n-3: ステアリドン酸 (STA, Stearidonic Acid)、C20:2n-6: エイコサジエン酸 (EDA, Eicosadienoic Acid)、C20:3n-3: エイコサトリエン酸 (ETra, Eicosatrienoic Acid)、C20:3n-6: ジホモ- γ -リノレン酸 (DGLA, Dihomo- γ -Linolenic Acid)、C20:4n-3: エイコサテトラエン酸 (ETA, Eicosatetraenoic acid)、C20:4n-6: アラキドン酸 (ARA, Arachidonic Acid)、C20:5n-3: エイコサペンタエン酸 (EPA, Eicosapentaenoic Acid)、C22:4n-6: ドコサテトラエン酸 (DTA, Docosatetraenoic Acid)、C22:5n-3: n-3ドコサペンタエン酸 (DPA n-3, Docosapentaenoic Acid)、C22:5n-6: n-6ドコサペンタエン酸 (DPA n-6, Docosapentaenoic Acid)、C22:6n-3: ドコサヘキサエン酸 (DHA, Docosahexaenoic Acid)、C16e: C16エロンガーゼ (C16 elongase)、 $\Delta 9d$: $\Delta 9$ デサチュラーゼ ($\Delta 9$ desaturase)、 $\Delta 12d$: $\Delta 12$ デサチュラーゼ ($\Delta 12$ desaturase)、 $\Delta 15d$: $\Delta 15$ デサチュラーゼ ($\Delta 15$ desaturase)、 $\Delta 9e$: $\Delta 9$ エロンガーゼ ($\Delta 9$ elongase)、 $\Delta 6d$: $\Delta 6$ デサチュラーゼ ($\Delta 6$ desaturase)、 $\Delta 8d$: $\Delta 8$ デサチュラーゼ ($\Delta 8$ desaturase)、C18e: C18エロンガーゼ (C18 elongase)、 $\Delta 5d$: $\Delta 5$ デサチュラーゼ ($\Delta 5$ desaturase)、C20e: C20エロンガーゼ (C20 elongase)、 $\Delta 17d$: $\Delta 17$ デサチュラーゼ ($\Delta 17$ desaturase)、 $\Delta 4d$: $\Delta 4$ デサチュラーゼ ($\Delta 4$ desaturase) $\Delta 15$ デサチュラーゼや $\Delta 17$ デサチュラーゼは $\omega 3$ デサチュラーゼと呼ばれることがある。

[図2]サブクローニングしたpcDNA 3.1 Myc-His vector 由来のSV40 terminat

or配列を含むプラスミドを表す。

[図3] Fusion PCR に使用したプライマーと産物の模式図を表す。最終産物は、Thraustochytrium aureum ATCC 34304 由来ubiquitin promoterと人工合成ネオマイシン耐性遺伝子の融合した配列になる。

[図4] 作製した人工合成ネオマイシン耐性遺伝子 のBglIIカセットを表す。

[図5] Fusion PCR に使用したプライマーと産物の模式図を表す。最終産物は、Thraustochytrium aureum ATCC 34304 由来ubiquitin promoterと pcDNA 3.1/ Hygro由来ハイグロマイシン耐性遺伝子の融合した配列になる。

[図6] 作製したpcDNA 3.1/ Hygro由来ハイグロマイシン耐性遺伝子のBglIIカセットを表す。

[図7] クローニングしたParietichytrium属C20エロンガーゼ配列を含むプラスミドを表す。

[図8] 図7記載プラスミドのParietichytrium属C20エロンガーゼ配列中にBglIIサイトを挿入したプラスミドを表す。

[図9] 作製したParietichytrium属C20エロンガーゼ遺伝子ターゲティングベクター(2種)を表す。薬剤耐性マーカーとして、ネオマイシン耐性遺伝子 (pRH85) もしくはハイグロマイシン耐性遺伝子 (pRH86) を有する。

[図10] Parietichytrium sarkarianum SEK364のC20エロンガーゼ遺伝子破壊株同定に用いたPCR用プライマーの位置、および予想される産物を示した模式図を表す。

[0021] [図11] Parietichytrium sarkarianum SEK364ゲノムDNAを鋳型にしたPCRによるC20エロンガーゼ遺伝子破壊の評価を表す。(符号の説明) +/+ : Parietichytrium sarkarianum SEK364 野生型株 +/− : Parietichytrium sarkarianum SEK364由来C20エロンガーゼ遺伝子1本目アリル相同組換え体 −/− : Parietichytrium sarkarianum SEK364由来C20エロンガーゼ遺伝子破壊株

[図12] Parietichytrium sarkarianum SEK364 野生型株およびC20エロンガーゼ遺伝子破壊株の脂肪酸組成の比較を表す。黒棒と白棒は、それぞれ野生型株と遺伝子破壊株の脂肪酸組成を表している。値は、平均値±標準偏差の値

である。

[図13]Parietichytrium sarkarianum SEK364 野生型株を100%とした時の、C20エロンガーゼ遺伝子破壊株の脂肪酸割合を示す。

[図14]クローニングしたParietichytrium sp. SEK571 Δ 4デサチュラーゼ遺伝子配列および周辺配列を含むプラスミドを表す。

[図15]図14記載プラスミドからParietichytrium sp. SEK571 Δ 4デサチュラーゼ遺伝子および Δ 4デサチュラーゼ遺伝子下流600bp配列を欠失させ、BglIIサイトを挿入したプラスミドを表す。

[図16]図15記載プラスミドのBglIIサイトに人工合成ネオマイシン耐性遺伝子カセットを含むDNA断片を繋いだプラスミドを表す。

[図17]作製したParietichytrium属 Δ 4デサチュラーゼ遺伝子ターゲティングベクターを表す。薬剤耐性マーカーとして、ネオマイシン耐性遺伝子を有する。

[図18]Parietichytrium属ラビリンチュラ類の Δ 4デサチュラーゼ遺伝子破壊株同定に用いたPCR用プライマーの位置、および予想される産物を示した模式図を表す（プライマーを相同組み換え領域内に設定）。

[図19]Parietichytrium sarkarianum SEK364ゲノムDNAを鋳型にしたPCRによる Δ 4デサチュラーゼ遺伝子破壊の評価結果を表す。

[図20]Parietichytrium sarkarianum SEK364野生株とその Δ 4デサチュラーゼ遺伝子破壊株の脂肪酸組成のガスクロマトグラフ分析のチャートを表す。

[図21]図20の部分拡大図を表す。

[図22]Parietichytrium sarkarianum SEK364野生株とその Δ 4デサチュラーゼ遺伝子破壊株の脂肪酸組成の比較を表す。本表は図20のチャートを数値化したものである。図中の<は続く数字以下であることを示す。

[0022] [図23]Parietichytrium sp. SEK358株ゲノムDNAを鋳型にしたPCRによるC20エロンガーゼ遺伝子破壊の評価を表す。（符号の説明） +/+ : Parietichytrium sp. SEK358野生型株 -/- : Parietichytrium sp. SEK358株由来C20エロンガーゼ遺伝子破壊株

[図24]Parietichytrium sp. SEK358野生型株および、Parietichytrium sp. SEK358株由来C20エロンガーゼ遺伝子破壊株の脂肪酸組成の比較を表す。白棒と黒棒は、それぞれ野生型株と遺伝子破壊株の脂肪酸組成を表している。

[図25]Parietichytrium sp. SEK358野生型株を100%とした時の、Parietichytrium sp. SEK358株由来C20エロンガーゼ遺伝子破壊株の脂肪酸割合を示す。Parietichytrium sp. SEK358野生型株において、該当する脂肪酸が検出限界以下の場合には斜線で表記した。

[図26]Parietichytrium属ラビリンチュラ類の $\Delta 4$ デサチュラーゼ遺伝子破壊株同定に用いたPCR用プライマーの位置、および予想される産物を示した模式図を表す（プライマーを相同組み換え領域外に設定）。

[図27]プライマーを相同組み換え領域内に設定した場合の、Parietichytrium sp. SEK358ゲノムDNAを鋳型にしたPCRによる $\Delta 4$ デサチュラーゼ遺伝子破壊の評価結果を表す。

[図28]プライマーを相同組み換え領域外に設定した場合の、Parietichytrium sp. SEK358ゲノムDNAを鋳型にしたPCRによる $\Delta 4$ デサチュラーゼ遺伝子破壊の評価結果を表す。

[図29]Parietichytrium sp. SEK358野生株とその $\Delta 4$ デサチュラーゼ遺伝子破壊株の脂肪酸組成のガスクロマトグラフ分析のチャートを表す。

[図30]図29の部分拡大図を表す。

[図31]Parietichytrium sp. SEK358野生株とその $\Delta 4$ デサチュラーゼ遺伝子破壊株の脂肪酸組成の比較を表す。本表は図29のチャートを数値化したものである。図中の<は続く数字以下であることを示す。

[図32]Parietichytrium sp. SEK571株ゲノムDNAを鋳型にしたPCRによるC20エロンガーゼ遺伝子破壊の評価を表す。（符号の説明）+/+：Parietichytrium sp. SEK571野生型株-/-：Parietichytrium sp. SEK571株由来C20エロンガーゼ遺伝子破壊株

[0023] [図33]Parietichytrium sp. SEK571野生型株および、Parietichytrium sp. SEK571株由来C20エロンガーゼ遺伝子破壊株の脂肪酸組成の比較を表す。白棒

と黒棒は、それぞれ野生型株と遺伝子破壊株の脂肪酸組成を表している。

[図34]Parietichytrium sp. SEK571野生型株を100%とした時の、Parietichytrium sp. SEK571株由来C20エロンガーゼ遺伝子破壊株の脂肪酸割合を示す。

[図35]比較例1－2における、I. aureum ATCC 34304由来エロンガーゼ遺伝子を増幅するRACEの結果を示す。(符号の簡単な説明) 1: 合成アダプター特異的なオリゴヌクレオチド、および縮重オリゴヌクレオチドelo-Rを用いた5' -RACE 2: 合成アダプター特異的なオリゴヌクレオチド、および縮重オリゴヌクレオチドelo-Fを用いた3' -RACE 3: elo-Rのみを用いた5' -RACE (negative control) 4: elo-Fのみを用いた3' -RACE (negative control) 5: 合成アダプター特異的なオリゴヌクレオチドのみを用いた5' -RACE (negative control) 6: 合成アダプター特異的なオリゴヌクレオチドのみを用いた3' -RACE (negative control)

[図36]比較例1－7における、K0Neorを導入した形質転換体の評価を示す。(A) ゲノムDNAを鋳型としたPCRによる形質転換体の評価において、用いたオリゴヌクレオチドプライマー対を示す。(符号の簡単な説明) (1) Neor検出プライマー (SNeoFおよびSNeoR) (2) K0確認1 (K0 Pro F SmaIおよびK0 Term R SmaI) (3) K0確認2 (E2 K0 ProF EcoRVおよびSNeoR) (4) K0確認3 (SNeoFおよびE2 K0 Term R EcoRV) (5) TaEL02検出 (E2 HindIIIおよびE2 XbaI) (B) ゲノムDNAを鋳型としたPCRによる形質転換体の評価における、アガロース電気泳動図を示す。(符号の簡単な説明) 1, 5, 9, 13, 17: 形質転換体 2, 6, 10, 14, 18: 野生株 3, 7, 11, 15, 19: K0Neorを鋳型としたもの 4, 8, 12, 16: 鋳型なし 尚、レーン番号の上には、用いたオリゴヌクレオチドプライマー対(1)～(5)を記載している。

[図37]比較例1－8における、サザンブロッティングによるTaEL02のコピー数の確認の結果を示す。(符号の簡単な説明) 1: ゲノムDNA (2.5 μ g), BamHI処理 2: BglIII処理 3: EcoRI処理 4: EcoRV処理 5: HindIII処理 6: KpnI処理 7: SmaI処理 8: XbaI処理 9: positive control (1 ngのE2 K0 ProF EcoRVおよびE2 K0 Term R EcoRVで増幅したPCR産物。TaEL02

を含む)

[図38]比較例 1 - 9 における、TK0Neorを導入した形質転換体のサザンブロッティングによる評価を示す。(A) 野生型アリル、もしくはTK0Neor導入による変異アリルを検出するサザンブロッティングの模式図を示す。(B) サザンブロッティングの結果を示す。(符号の簡単な説明) 1: *T. aureum*野生株 (2.5 μ gのゲノムDNA) 2, 3: TK0Neor導入形質転換体 (2.5 μ gのゲノムDNA) 4: positive control (50 ngのE2 K0 ProF EcoRVおよびE2 K0 Term R EcoRVで増幅したPCR産物。TaEL02を含む)

[図39]比較例 1 - 11 における、K0ub600Hygrの再導入によって得た形質転換体のゲノムDNAを鋳型にしたPCRによる評価を示す。(A) 用いたオリゴヌクレオチドプライマー対を示す。(符号の簡単な説明) (1) TaEL02 ORF検出 (S NeoFおよびSNeoR) (2) K0確認 (E2 K0 Pro F EcoRVおよび ubi-hygro R)(B) K0確認のオリゴヌクレオチドプライマー対(1)を用いたPCRのアガロース電気泳動図を示す。矢印は、特異的産物の増幅が確認され、TaEL02欠損ホモ接合体と推定された形質転換体を示す。(C) TaEL02欠損ホモ接合体と同定された形質転換体における、TaEL02 ORF検出のオリゴヌクレオチドプライマー対(2)を用いたPCRのアガロース電気泳動図を示す。(符号の簡単な説明) 1: K0ub600Hygrを鋳型としたもの 2: 野生株

[図40]比較例 1 - 11 における、K0ub600Hygrの再導入によって得た形質転換体のサザンブロッティングによる評価を示す。(A) 野生型アリル、K0Neor導入による変異アリル、およびK0ub600Hygr導入による変異アリルを検出するサザンブロッティングの模式図を示す。(B) サザンブロッティングの結果を示す。(符号の簡単な説明) 1, 9: 野生株 2-8および10-16: TaEL02欠損ホモ接合体

[図41]比較例 1 - 11 における、TaEL02を検出するサザンブロッティングの結果を示す。(符号の簡単な説明) 1: 野生株 2-5: TaEL02欠損ホモ接合体

[図42]比較例 1 - 11 における、TaEL02 mRNAを検出するRT-PCRのアガロース

ゲル電気泳動の結果を示す。（符号の簡単な説明） 1-4 : TaEL02欠損ホモ接合体 5 : 野生株 6-9 : TaEL02欠損ホモ接合体、total RNAを鋳型にしたもの（negative control） 10 : 野生株、total RNAを鋳型にしたもの（negative control） 11 : 野生株ゲノムDNAを鋳型にしたもの（positive control）

[0024] [図43]比較例 1 - 1 2 における、野生株、およびTaEL02欠損ホモ接合体の脂肪酸組成比較の結果を示す。

[図44]Fusion PCR に使用したプライマーと産物の模式図を表す。最終産物は、*Thraustochytrium aureum* ATCC 34304 由来18S rDNA、*Thraustochytrium aureum* ATCC 34304 由来EF1 α promoter、人工合成ネオマイシン耐性遺伝子および*Thraustochytrium aureum* ATCC 34304 由来EF1 α terminator の融合した配列になる。

[図45]図 4 2 で連結したDNA断片の一部をクローニングしたプラスミドを表す。*Thraustochytrium aureum* ATCC 34304 由来18S rDNAのEcoRIサイトより3'側の一部配列、*Thraustochytrium aureum* ATCC 34304 由来EF1 α promoter、人工合成ネオマイシン耐性遺伝子、および*Thraustochytrium aureum* ATCC 34304 由来EF1 α terminatorのNcoIサイトより5'側の一部配列を含む。

[図46]作製した*Thraustochytrium aureum* ATCC 34304 PKS経路関連遺伝子orfAのターゲティングベクターを表す。薬剤耐性マーカーとして、ネオマイシン耐性遺伝子を有する。

[図47]*Thraustochytrium aureum* ATCC 34304 PKS経路関連遺伝子orfAの上流配列、*Thraustochytrium aureum* ATCC 34304 由来ubiquitin promoter、ハイグロマイシン耐性遺伝子を含むプラスミドを表す。

[図48]作製した*Thraustochytrium aureum* ATCC 34304 PKS経路関連遺伝子orfAのターゲティングベクターを表す。薬剤耐性マーカーとして、ハイグロマイシン耐性遺伝子を有する。

[図49]*Thraustochytrium aureum* ATCC 34304のPKS経路関連遺伝子orfA破壊株同定に用いたサザンハイブリダイゼーション解析用プローブの位置、および予想される遺伝子断片のサイズを示した模式図を表す。

[図50] Thraustochytrium aureum ATCC 34304ゲノムDNAを用いたサザンハイブリダイゼーション法によるPKS経路関連遺伝子orfA遺伝子破壊の評価を表す。

(符号の簡単な説明) T.au : Thraustochytrium aureum ATCC 34304 野生型株 +/− : Thraustochytrium aureum ATCC 34304由来PKS経路関連遺伝子orfA 1本目アレル相同組換え体 −/− : Thraustochytrium aureum ATCC 34304由来PKS経路関連遺伝子orfA遺伝子破壊株

[図51] Thraustochytrium aureum ATCC 34304 野生型株およびPKS経路関連遺伝子orfA遺伝子破壊株の脂肪酸組成の比較を表す。白棒と黒棒は、それぞれ野生型株と遺伝子破壊株の脂肪酸組成を表している。値は、平均値±標準偏差の値である。

[図52] Thraustochytrium aureum ATCC 34304 野生型株を100%とした時の、PKS経路関連遺伝子orfA遺伝子破壊株の脂肪酸割合を示す。

[0025] [図53] Fusion PCR に使用したプライマーと産物の模式図を表す。最終産物は、Thraustochytrium aureum ATCC 34304 由来ubiquitin promoterと pTracer-CMV/Bsd/lacZ由来プラスチジン耐性遺伝子の融合した配列になる。

[図54] 作製したpTracer-CMV/Bsd/lacZ由来ブラストサイジン耐性遺伝子 BglI Iカセットを表す。

[図55] Fusion PCR に使用したプライマーと産物の模式図を表す。最終産物は、Thraustochytrium aureum ATCC 34304 由来ubiquitin promoterと Enhanced GFP遺伝子 (clontech社製) の融合した配列になる。

[図56] Fusion PCR に使用したプライマーと産物の模式図を表す。最終産物は、Thraustochytrium aureum ATCC 34304 由来ubiquitin promoter、 Enhanced GFP遺伝子 (clontech社製) およびpcDNA3.1 Zeo(+) 由来ゼオシン耐性遺伝子の融合した配列になる。

[図57] 作製したEnhanced GFP-ゼオシン耐性融合遺伝子のBglII Iカセットを表す。

[図58] クローニングしたThraustochytrium aureum ATCC 34304 C20エロンガーゼ配列および周辺配列を含むプラスミドを表す。

[図59]図56記載プラスミドからThraustochytrium aureum ATCC 34304 C20 エロンガーゼ配列を完全に欠失させ、BglIIサイトを挿入したプラスミドを表す。

[図60]作製したThraustochytrium aureum ATCC 34304 C20エロンガーゼ遺伝子ターゲティングベクター(2種)を表す。薬剤耐性マーカーとして、ブラストサイジン耐性遺伝子 (pRH43) もしくはEnhanced GFPーゼオシン耐性融合遺伝子 (pRH54) を有する。

[図61]Thraustochytrium aureum ATCC 34304 PKS経路 (orfA遺伝子) 破壊株の、C20エロンガーゼ遺伝子破壊株同定に用いたサザンハイブリダイゼーション解析用プローブの位置、および予想される遺伝子断片のサイズを示した模式図を表す。

[図62]Thraustochytrium aureum ATCC 34304ゲノムDNAを用いたサザンハイブリダイゼーション法によるC20エロンガーゼ遺伝子破壊の評価を表す。(符号の簡単な説明) T.au : Thraustochytrium aureum ATCC 34304 野生型株ー/ー : Thraustochytrium aureum ATCC 34304 由来PKS経路 (orfA遺伝子) とC20エロンガーゼ遺伝子の2重破壊株

[0026] [図63]Thraustochytrium aureum ATCC 34304 野生型株および、PKS経路 (orfA遺伝子) とC20エロンガーゼ遺伝子の2重破壊株の脂肪酸組成の比較を表す。白棒と黒棒は、それぞれ野生型株と遺伝子破壊株の脂肪酸組成を表している。値は、平均値±標準偏差の値である。

[図64]Thraustochytrium aureum ATCC 34304 野生型株を100%とした時の、PKS経路 (orfA遺伝子) とC20エロンガーゼ遺伝子の2重破壊株の脂肪酸割合を示す。

[図65]クローニングしたThraustochytrium aureum ATCC 34304株の $\Delta 4$ デサチュラーゼ遺伝子上流1071 bp～ $\Delta 4$ デサチュラーゼ遺伝子内1500 bpの配列を含むプラスミドを表す。

[図66]図63記載プラスミドの $\Delta 4$ デサチュラーゼ遺伝子上流60 bpおよび $\Delta 4$ デサチュラーゼ遺伝子内の開始コドンを含む556 bpの配列 (616 bp、配列番

号：205) を欠失させ、かつ、欠失部分にBglIII サイトを挿入したプラスミドを表す。

[図67]作製したThraustochytrium aureum ATCC 34304株の $\Delta 4$ デサチュラーゼ遺伝子ターゲティングベクター(2種)を表す。薬剤耐性マーカーとして、ブラスチジシン耐性遺伝子(pTM6)もしくはEnhanced GFP-ゼオシン耐性融合遺伝子(pTM8)を有する。

[図68]Thraustochytrium aureum ATCC 34304 PKS経路(orfA遺伝子)破壊株の、 $\Delta 4$ デサチュラーゼ遺伝子破壊株同定に用いたPCR用プライマーの位置、および予想される産物を示した模式図を表す。

[図69]Thraustochytrium aureum ATCC 34304株ゲノムDNAを鋳型にしたPCRによる $\Delta 4$ デサチュラーゼ遺伝子破壊の評価を表す。(符号の簡単な説明) +/+ : Thraustochytrium aureum ATCC 34304 由来PKS経路(orfA遺伝子)破壊株 +/− : Thraustochytrium aureum ATCC 34304 由来PKS経路(orfA遺伝子)破壊株由来の、 $\Delta 4$ デサチュラーゼ遺伝子1本目アリル相同組換え体 −/− : Thraustochytrium aureum ATCC 34304 由来PKS経路(orfA遺伝子)と $\Delta 4$ デサチュラーゼ遺伝子の2重破壊株

[図70]Thraustochytrium aureum ATCC 34304 野生型株および、PKS経路(orfA遺伝子)と $\Delta 4$ デサチュラーゼ遺伝子の2重破壊株の脂肪酸組成の比較を表す。白棒と黒棒は、それぞれ野生型株と遺伝子破壊株の脂肪酸組成を表している。

[図71]Thraustochytrium aureum ATCC 34304 野生型株を100%とした時の、PKS経路(orfA遺伝子)と $\Delta 4$ デサチュラーゼ遺伝子の2重破壊株の脂肪酸割合を示す。

発明を実施するための形態

[0027] ラビリンチュラ類という微生物において、高度不飽和脂肪酸(PUFA)の生合成経路として新しいパターンを見出したことが本発明の契機である。すなわち、PUFAは一般にエロンガーゼ/デサチュラーゼ経路により生合成されることが知られているが、一部の生物ではこれと別のPUFA-PK

S経路という経路で生合成するものもある。ラビリンチュラ類では (I) P U F A - P K S系路のみで生産するタイプ、(II) エロンガーゼ／デサチュラーゼ経路 + P U F A - P K S系路で生産するタイプが存在するというのが従来の知見であった、今回、(III) エロンガーゼ／デサチュラーゼ経路のみで生産するタイプを新たに見出した。要は、P U F A 生合成経路の新規の「パターン」を発見した、ということである。

たとえば、(1) 内因性P U F A - P K S経路によるP U F Aの生産能が無いあるいは極めて微弱であり、かつ内因性エロンガーゼ／デサチュラーゼ経路によるP U F A生産能を有するラビリンチュラ類。当該発明は上記 (III) エロンガーゼ／デサチュラーゼ経路のみで生産するタイプのラビリンチュラ類に関する。(III) のタイプのP U F A 生合成経路を有する野生株を単離し培養し増幅したものや、P U F A - P K S系路によるP U F A生産能が「無いあるいは極めて微弱」であるラビリンチュラ類を包含する。

(2) 内因性P U F A - P K S経路を有さないことを特徴とする、上記 (1) に記載のラビリンチュラ類。当該発明は上記 (1) を限定したもので、P U F A - P K S系路を構成する遺伝子や酵素自体を持っていないラビリンチュラ類のことである。

(3) 内因性P U F A - P K S経路の活性が無いあるいは極めて微弱であることを特徴とする、上記 (1) に記載のラビリンチュラ類。当該発明は上記 (1) を限定したもので、ゲノム上にP U F A - P K S系路を構成する酵素の遺伝子に関する情報はあがるが発現していない（したがって活性が無い）、あるいは極めて微弱にしか発現していないパターンのものを規定している。

(4) 内因性 $\Delta 4$ desaturase 遺伝子の破壊によりDHAおよび／またはDPA n-6生産能を失う、またはDHAおよび／またはDPA n-6の生産量が顕著に減少することを特徴とする、上記 (1) ないし (3) のいずれかに記載のラビリンチュラ類。

エロンガーゼ／デサチュラーゼ経路のみでP U F Aを生産する (III) のタイプのラビリンチュラ類は、P U F A - P K S系路が無いという点でP U F

A-PKS系路のみで生産する(I)のタイプやエロンガーゼ/デサチュラーゼ経路+PUFA-PKS系路で生産する(II)のタイプと異なり、当該発明はこの観点に基づいてエロンガーゼ/デサチュラーゼ経路のみで生産するタイプのラビリンチュラ類を定義したものである。つまり、上記の内因性 $\Delta 4$ desaturase遺伝子破壊は、エロンガーゼ/デサチュラーゼ経路のみで生産するタイプかどうかを判別する方法であるといえることができる。

(5) 内因性C20 elongase遺伝子の破壊によりDHAおよび/またはDPAn-6を生産能を失う、またはDHAおよび/またはDPAn-6の生産量が顕著に減少することを特徴とする、上記(1)ないし(3)に記載のラビリンチュラ類。

エロンガーゼ/デサチュラーゼ経路のみで生産する(III)のタイプのラビリンチュラ類は、PUFA-PKS系路が無いという点でPUFA-PKS系路のみで生産する(I)のタイプやエロンガーゼ/デサチュラーゼ経路+PUFA-PKS系路で生産する(II)のタイプと異なり、当該発明はこの観点に基づいてエロンガーゼ/デサチュラーゼ経路のみで生産するタイプのラビリンチュラ類を定義したものである。つまり、上記の内因性C20 elongase遺伝子破壊は、エロンガーゼ/デサチュラーゼ経路のみで生産するタイプかどうかを判別する方法であるといえることができる。

(6) ラビリンチュラ類がパリエティキトリウム属(Parietichytrium)またはシゾキトリウム属(Schizochytrium)のいずれかに属する微生物であることを特徴とする、上記(1)ないし(5)に記載のラビリンチュラ類。

Parietichytrium属やSchizochytrium属に属するラビリンチュラ類自体は本出願前から知られていたが、これらがPUFAをエロンガーゼ/デサチュラーゼ経路のみで生産する(III)のタイプのラビリンチュラ類であることは知られていなかった。

(7) 微生物がParietichytrium sp. SEK358 (FERM BP-11405)、Parietichytrium sarkar

ianum SEK364 (FERM BP-11298)、Parietichytrium sp. SEK571 (FERM BP-11406) または Schizochytrium aggregatum ATCC28209であることを特徴とする、上記(6)に記載のラビリンチュラ類。

(8) 上記(1)ないし(7)のいずれかに記載のラビリンチュラ類を培地で培養し、培養物から脂質を採取することを特徴とする、PUFAを含有する脂質の製造方法。

(9) 上記(1)ないし(7)のいずれかに記載のラビリンチュラ類を宿主として用いて、脂肪酸組成の改変および／または高度に脂肪酸を蓄積させることを目的として形質転換されたラビリンチュラ類を培地で培養し、培養物から採取することを特徴とするPUFAを含有する脂質の製造方法。

(10) 上記(8)または(9)の方法で生産された、PUFAを含有する脂質。

本発明によりエロンガーゼ／デサチュラーゼ経路のみでPUFAを生産するラビリンチュラを提供することができる。

エロンガーゼ／デサチュラーゼ経路+PUFA-PKS系路で生産する(I)のタイプから突然変異や遺伝子組換えによってエロンガーゼ／デサチュラーゼ経路のみで生産する(III)のタイプと同等のラビリンチュラ類を作出することも可能である。このようなものに、例えばトラウストキトリウム属(*Traustochytrium*)に属する微生物が挙げられる。これらを使用することにより、(III)のタイプのラビリンチュラ類と同じような高度不飽和脂肪酸を得ることができる。

[0028] [微生物]

PUFA-PKS経路によるPUFAの生産能が無いあるいは極めて微弱であるラビリンチュラ類とは、エロンガーゼ／デサチュラーゼ経路のみでPUFAを生産するラビリンチュラ類を含む。PUFAの生産能が極めて微弱とは、エロンガーゼ／デサチュラーゼ経路の遺伝子を破壊してPUFAを生産できなくなり、PUFAを培地に添加しないと培養できなくなるラビリンチ

ユラ類をいう。生体内で合成されるDHAのうち、PUFA-PKS経路を経由して合成されるDHAが1/100以下であるものをいう。内因性PUFA-PKS経路によるPUFAの生産能が無いあるいは極めて微弱であり、かつ内因性エロンガーゼ/デサチュラーゼ経路でPUFAを生産できるラビリンチュラ類であれば特に限定されないが、特に好ましくはParietichytrium属またはSchizochytrium属に属するラビリンチュラ類が例示される。その中でも特に好ましくはParietichytrium sp. SEK358 (FERM BP-11405)、Parietichytrium sarkarianum SEK364 (FERM BP-11298)、Parietichytrium sp. SEK571 (FERM BP-11406) またはSchizochytrium aggregatum ATCC28209の菌株が挙げられる。

Parietichytrium sp. SEK358は、以下に述べる方法で得た。まず、石垣島・宮良川河口域で採取した表層水10mlを試験管に入れ、松花粉を添加して室温で放置した。7日後にこれら松花粉を無菌寒天培地(2g グルコース、1g ペプトン、0.5g 酵母エキス、0.2g クロラムフェニコール、15g 寒天、蒸留水 100ml、海水900ml)に塗布し、5日後に出現したコロニーを分離し培養することを数回繰り返し、菌体を分離した。この株は独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター(茨城県つくば市東1-1-1 中央第6)に受託番号FERM BP-11405として平成23年8月11日に国際寄託されており、そこから入手可能である。

Parietichytrium sarkarianum SEK364は、石垣島・吹通川の河口域で採取した海水サンプルを、上記同様に培養し菌体を分離した。この株は独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター(茨城県つくば市東1-1-1 中央第6)に受託番号FERM BP-11298として平成22年9月24日に国際寄託されており、そこから入手可能である。

P a r i e t i c h y t r i u m s p. S E K 5 7 1 は、西表島・後良川の河口域で採取した海水サンプルを、上記同様に培養し菌体を分離した。この株は独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（茨城県つくば市東1-1-1 中央第6）に受託番号 F E R M B P - 1 1 4 0 6 とし、平成23年8月11日に国際寄託されており、そこから入手可能である。

S c h i z o c h y t r i u m a g g r e g a t u m A T C C 2 8 2 0 9 は A T C C に寄託されており、そこから入手可能である。元来有する P U F A - P K S を破壊あるいは極めて微弱に発現を抑制したラビリンチュラ類とは、エロンガーゼ／デサチュラーゼ経路＋P U F A - P K S 系路で P U F A を生産するラビリンチュラ類を含む。P U F A - P K S 系路のみで P U F A は P U F A - P K S 経路の存在が必須であり、破壊されると P U F A 要求性となる。P U F A - P K S 系路を破壊しても P U F A を産生できるエロンガーゼ／デサチュラーゼ経路＋P U F A - P K S 系路で P U F A を生産するラビリンチュラ類は P U F A 要求性とはならない点で違いがある。本発明を利用して、 $\Delta 4$ デサチュラーゼを遺伝子破壊をすることにより、全体として P U F A の生産量は維持しながら、D H A、n-6 D P A の生産量を劇的に少なくすることができる。

本発明で得られる微生物の持つ性質は、それぞれ任意に組み合わせることにより、それぞれ所望の性質を組み合わせることができる。

[0029] [微生物油]

本発明は、本発明の脂肪酸プロファイルを含む微生物油に関する。本発明の微生物は菌体 1 g 中に脂質を15重量%以上、好ましくは30重量%以上、さらに好ましくは50重量%以上、さらにさらに好ましくは70重量%以上の脂質成分が含まれる。前記脂質成分には、30重量%以上、好ましくは50%以上、さらに好ましくは70重量%以上の脂肪酸成分が含まれる。前記脂質酸成分は70重量%以上、好ましくは80重量%以上、さらに好ましくは90重量%以上トリグリセリドとして蓄積されている。本発明の微生物油は、少なくとも約35重量%のトリアシルグリセロール画分を含む「粗油」又は「精製油」である。

。「粗油」は、微生物のバイオマスから抽出された、さらなる処理がされていない油である。「精製油」は、粗油を標準的な精製、脱色、及び／又は脱臭加工により処理して得られた油である。微生物油はまた「完成油」も含み、これは、植物油で希釈されている精製油である。「微生物」には、限定はされないが「微細藻類」、「ラビリンチュラ類」及び本明細書に記載される寄託微生物のいずれかに関連する分類学上の分類が含まれる。本明細書に記載される寄託微生物の微生物油のいずれかに関連して使用されるとき用語「ラビリンチュラ類」、「Parietichytrium属」、「Schizochytrium属」、及び「Thraustochytrium属」は、利用可能な系統発生的情報を含む現在の分類学上の分類に基づいており、本願の出願日より後に分類学上の分類が改訂された場合には、限定することを意図するものではない。 [脂質]

本発明において、脂質とは、ラビリンチュラ類が生産する脂質であり、主にトリグリセリド、ジグリセリド、モノグリセリド、リン脂質、遊離脂肪酸、ステロール類、カロテノイド類、炭化水素等である。

[0030] [脂質]

本発明において、脂質とは、ラビリンチュラ類が生産する脂質であり、主にトリグリセリド、ジグリセリド、モノグリセリド、リン脂質、遊離脂肪酸、ステロール類、カロテノイド類、炭化水素等である。

[0031] [高度不飽和脂肪酸]

本発明において、高度不飽和脂肪酸（PUFA）とは、炭素数18以上、二重結合数3以上の脂肪酸であり、より好ましくは炭素数20以上、二重結合数3以上の脂肪酸である。具体的にはリノール酸（LA, 18:2n-6）、 α -リノレン酸（ALA, 18:3n-3）、 γ -リノレン酸（GLA, 18:3n-6）、ステアリドン酸（STA, 18:4n-3）、ジホモ- γ -リノレン酸（DGLA, 20:3n-6）、エイコサテトラエン酸（ETA, 20:4n-3）、アラキドン酸（ARA, 20:4n-6）、エイコサペンタエン酸（EPA, 20:5n-3）、ドコサテトラエン酸（DTA, 22:4

$n-6$)、 $n-3$ ドコサペンタエン酸 ($n-3$ DPA, $22:5n-3$)、 $n-6$ ドコサペンタエン酸 ($n-6$ DPA, $22:5n-6$)、ドコサヘキサエン酸 (DHA, $22:6n-3$) 等が例示される。本明細書において、アラキドンサンはARAとも表される。全脂肪酸組成とは、微生物を培養、凍結乾燥後、脂肪酸をメチルエステル化し、GCを用いて解析した場合に検出される脂肪酸、具体的には炭素鎖14から22の脂肪酸の組成のことをいう。本発明においてGC面積とはGCのチャートのピーク面積でをいう。全脂肪酸組成に対する割合は、全脂肪酸組成のピーク面積の合計に対する対象の脂肪酸のピーク面積の割合となり、百分率で表す。この発明でC20PUFA/C22PUFAとは、炭素鎖20の高度不飽和脂肪酸のGCピーク面積の合計を炭素鎖22の高度不飽和脂肪酸のGCピーク面積の合計で割った値をいう。この発明において $n-6$ PUFA/ $n-3$ PUFAとは炭素鎖20以上の $\omega 6$ 脂肪酸のGCのチャートのピーク面積を、炭素鎖20以上の $\omega 3$ 脂肪酸のGCのチャートのピーク面積で割った値をいう。

[0032] [PUFA生合成経路]

PUFAの生合成に関して、2種の異なる経路が知られている。一つはポリケチド合成酵素 (ポリケチドシンターゼ、polyketide synthase、PKS) によって高度不飽和脂肪酸 (PUFA) を生成する経路である。本発明において、この代謝経路をPUFA-PKS経路またはPKS経路という。本発明においてPKS遺伝子とは、ポリケチド合成酵素を構成するタンパク質をコードする遺伝子をいう。ポリケチド合成酵素はアセチルCoA等のスターター基質にマロニルCoA等の伸長鎖基質を複数回縮合する反応を触媒する酵素であり、一般に植物や真菌等の二次代謝産物の生合成に関わる酵素として知られているが、ある種の生物においてはPUFAの生合成にも関与することが報告されている。例えば海洋細菌 Shewanella はこの酵素によりエイコサペンタエン酸 (EPA) を生産する (非特許文献8)。ある種のラビリンチュラ類でもポリケチド合成酵素が同様にPUFAの生合成に関わることが知られている。

もう一つはパルミチン酸等の脂肪酸から出発し、デサチュラーゼ（脂肪酸不飽和化酵素、*desaturase*）による不飽和化、エロンガーゼ（脂肪酸鎖長伸長酵素、*elongase*）による鎖長伸長を繰り返してEPAやDHA等のPUFAを生成する経路であり、本発明において、エロンガーゼ/デサチュラーゼ経路という。この系を構成する酵素としてC20エロンガーゼ、 $\Delta 4$ デサチュラーゼなどの脂肪酸合成関連酵素が例示される。

[0033] [PUFA生合成経路の判別方法]

ラビリンチュラ類のPUFA生合成経路を判別する方法を以下に述べる。ただしこれは一例に過ぎず、必ずしもこの方法で判別しなければならない訳では無いことは言うまでもない。

先述のようにラビリンチュラ類のPUFA生合成経路として2つの経路が知られている。一つはPUFA-PKS経路であり、この経路によりDHAとDPA $n-6$ が生産される。この経路ではDHAとDPA $n-6$ 以外のPUFAはほとんど生産されないという特徴があり、この点はもう一つのPUFA生合成経路であるエロンガーゼ/デサチュラーゼ経路との大きな違いである。

もう一つの経路であるエロンガーゼ/デサチュラーゼ経路を図1に示す。この経路を構成する酵素のうち、 $\Delta 4$ デサチュラーゼはDPA $n-3$ をDHAに変換するのに関わる酵素である。また、この酵素はDTAをDPA $n-6$ に変換するのにも関わっている。したがって、この酵素の遺伝子を破壊するとこれらの変換がなされないため、この酵素の基質であるDPA $n-3$ やDTAが蓄積し、逆にこの酵素の産物であるDHAやDPA $n-6$ が減少する。この $\Delta 4$ デサチュラーゼ遺伝子を破壊したラビリンチュラ類において、もし産物であるDHAおよび/またはDPA $n-6$ が全く検出されないあるいは顕著に減少した場合には、このラビリンチュラ類は内因性PUFA-PKS経路によるPUFA（特にDHAおよび/またはDPA $n-6$ ）生産能が無いあるいはきわめて微弱であると判断される。

$\Delta 4$ デサチュラーゼの代わりにC20エロンガーゼを選択し、この酵素の

遺伝子を破壊しても良い。すなわち、C20エロンガーゼはEPAをDPA_{n-3}に変換するのに関わる酵素である。また、この酵素はARAをDTAに変換するのにも関わっている。したがって、この酵素の遺伝子を破壊するとこれらの変換がなされないため、この酵素の基質であるEPAやARAが蓄積し、逆にこの酵素の産物であるDPA_{n-3}やDTAが減少する。その結果、DPA_{n-3}やDTAを基質とするDHAやDPA_{n-6}も減少する。このC20エロンガーゼ遺伝子を破壊したラビリンチュラ類において、もし最終産物であるDHAおよび/またはDPA_{n-6}が全く検出されないあるいは顕著に減少した場合には、このラビリンチュラ類は内因性PUFA-PKS経路によるPUFA（特にDHAおよび/またはDPA_{n-6}）生産能が無いあるいはきわめて微弱であると判断される。

遺伝子破壊は、対象となる遺伝子の一部または全部に抗生物質耐性遺伝子等で遺伝子産物が活性を生じないように設計されたものを遺伝子銃、エレクトロポレーション、ゲノム編集等の方法により細胞内に導入することにより行う。遺伝子の抑制は、対象となる遺伝子の発現が抑制されるよう設計されたアンチセンス遺伝子、RNAiが発現されるようにした遺伝子を遺伝子銃、エレクトロポレーション、ゲノム編集等の方法により細胞内に導入することにより行う。遺伝子の破壊、抑制は対象の遺伝子の発現が阻害されればよく、これらの方法に制限されない。PKS遺伝子を対象として、破壊、抑制をする場合には、酵素活性を消失または抑制できる限り限定されないが、OrfAを対象とすることが好ましい。

[0034] 本発明は、内因性PUFA-PKS経路によるPUFAの生産能が無いあるいは極めて微弱であり、かつ内因性エロンガーゼ/デサチュラーゼ経路によるPUFA生産能を有するラビリンチュラ類を提供するものである。

また本発明は、ラビリンチュラ類のエロンガーゼ/デサチュラーゼ経路を構成する酵素の遺伝子を操作してラビリンチュラ類が産生する脂肪酸組成を変化させることを含むものであり、特に、（１）脂肪酸鎖長伸長酵素遺伝子の破壊または/および発現抑制、（２）脂肪酸不飽和化酵素遺伝子の破壊ま

たは／および発現抑制、（３）脂肪酸鎖長伸長酵素遺伝子の導入、（４）脂肪酸不飽和化酵素遺伝子の導入、および（５）これらの組合せによってラビリンチュラ類が産生する脂肪酸組成を改変することができる。例えばステアリドン酸（ＳＴＡ）を所望する時には、ステアリドン酸をエイコサテトラエン酸（ＥＴＡ）に変換するのに関わる脂肪酸鎖長伸長酵素の遺伝子、具体的にはＣ１８エロンガーゼ遺伝子を破壊または／および発現抑制すれば良い。また例えばエイコサペンタエン酸（ＥＰＡ）を所望する時には、エイコサペンタエン酸をドコサペンタエン酸（ＤＰＡ）に変換するのに関わる脂肪酸鎖長伸長酵素の遺伝子、具体的にはＣ２０エロンガーゼ遺伝子を破壊または／および発現抑制すれば良い。また例えばエイコサペンタエン酸を所望する時には、アラキドン酸（ＡＲＡ）をエイコサペンタエン酸に変換する脂肪酸不飽和化酵素の遺伝子、具体的には ω ３デサチュラーゼ遺伝子を導入すれば良い。エロンガーゼ／デサチュラーゼ経路＋ＰＵＦＡ－ＰＫＳ系路で生産するラビリンチュラ類についても、ＰＵＦＡ－ＰＫＳ系路を破壊及び／または抑制した微生物により（１）脂肪酸鎖長伸長酵素遺伝子の破壊または／および発現抑制、（２）脂肪酸不飽和化酵素遺伝子の破壊または／および発現抑制、

（３）脂肪酸鎖長伸長酵素遺伝子の導入、（４）脂肪酸不飽和化酵素遺伝子の導入、および（５）これらの組合せによってラビリンチュラ類が産生する脂肪酸組成を改変することができる。例えばステアリドン酸（ＳＴＡ）を所望する時には、ステアリドン酸をエイコサテトラエン酸（ＥＴＡ）に変換するのに関わる脂肪酸鎖長伸長酵素の遺伝子、具体的にはＣ１８エロンガーゼ遺伝子を破壊または／および発現抑制すれば良い。また例えばエイコサペンタエン酸（ＥＰＡ）を所望する時には、エイコサペンタエン酸をドコサペンタエン酸（ＤＰＡ）に変換するのに関わる脂肪酸鎖長伸長酵素の遺伝子、具体的にはＣ２０エロンガーゼ遺伝子を破壊または／および発現抑制すれば良い。また例えばエイコサペンタエン酸を所望する時には、アラキドン酸（ＡＲＡ）をエイコサペンタエン酸に変換する脂肪酸不飽和化酵素の遺伝子、具体的には ω ３デサチュラーゼ遺伝子を導入すれば良い。

[0035] ラビリンチュラ類の形質転換により、産生する脂肪酸組成が改変されたラビリンチュラ類（微生物）が得られる。この脂肪酸生合成関連遺伝子が導入および/または破壊されてなるラビリンチュラ類は、例えば、不飽和脂肪酸の製造に利用することができる。不飽和脂肪酸の製造には、内因性 P U F A - P K S 経路による P U F A の生産能が無いあるいは極めて微弱であり、かつ内因性エロンガーゼ／デサチュラーゼ経路による P U F A 生産能を有するラビリンチュラ類や上述の産生脂肪酸組成が改変されたラビリンチュラ類を使用すればよく、その他の工程、製造設備・器具等の諸条件については、特に限定されるものではない。不飽和脂肪酸の製造には、内因性 P U F A - P K S 経路による P U F A の生産能が無いあるいは極めて微弱であり、かつ内因性エロンガーゼ／デサチュラーゼ経路による P U F A 生産能を有するラビリンチュラ類や上述の改変方法によって産生する脂肪酸組成が改変された微生物を培養する工程を含み、微生物およびその培地を利用して、不飽和脂肪酸を製造する。

[0036] 上記細胞の培養条件（培地、培養温度、通気状態等）は、細胞の種類や、目的とする不飽和脂肪酸の種類、その量等に応じて適宜設定することができる。なお、本発明での不飽和脂肪酸とは、不飽和脂肪酸を含む物質をも意味し、その含有量、純度、形状、組成、等は特に限定されるものではない。つまり、本発明では、脂肪酸組成が改変された細胞またはその培地自体を、不飽和脂肪酸とみなしてもよい。また、この細胞または培地から不飽和脂肪酸を精製する工程をさらに含んでもよい。不飽和脂肪酸を精製する方法としては、不飽和脂肪酸を始めとする脂質（複合脂質を含む）の精製方法として公知である方法を適用することができる。

[0037] [ラビリンチュラ類に高度に不飽和脂肪酸を蓄積させる方法]

ラビリンチュラ類に不飽和脂肪酸を蓄積させるには、内因性 P U F A - P K S 経路による P U F A の生産能が無いあるいは極めて微弱であり、かつ内因性エロンガーゼ／デサチュラーゼ経路による P U F A 生産能を有するラビリンチュラ類やこれらを形質転換したラビリンチュラ類を培養することによ

り達成される。例えば、通常用いられる固体培地あるいは液体培地等で培養する。この時、用いられる培地としては、例えば炭素源としてグルコース、フルクトース、サッカロース、デンプン、グリセリン等、また窒素源として酵母エキス、コーンステープリカー、ポリペプトン、グルタミン酸ナトリウム、尿素、酢酸アンモニウム、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸ナトリウム等、また無機塩としてリン酸カリウム等、その他必要な成分を適宜組み合わせた培地であり、ラビリンチュラ類を培養するために通常用いられるものであれば特に限定されないが、特に好ましくは酵母エキス・グルコース培地（GY培地）が用いられる。培地は調製後、pHを3.0～8.0の範囲内に調整した後、オートクレーブ等により滅菌して用いる。培養は、10～40℃、好ましくは15～35℃にて、1～14日間、通気攪拌培養、振とう培養、あるいは静置培養で行えば良い。

[0038] 産生した不飽和脂肪酸を回収するには、ラビリンチュラ類を培地で生育し、その培地から得た微生物細胞を処理し、細胞内脂質（高度不飽和脂肪酸を含む油脂含有物あるいは高度不飽和脂肪酸）を放出させ、脂質を回収する。すなわち、このようにして培養したラビリンチュラ類を遠心分離等により回収し、必要に応じて乾燥や細胞破碎等の処理を施し、定法に従い適当な有機溶媒や超臨界二酸化炭素、液化ジメチルエーテル等を用いて抽出することにより、PUFAを含有する脂質を得ることができる。

本発明において得られる微生物油は、以下のいずれかの条件を満たすものである。本発明において得られる微生物油は、ARAが全脂肪酸組成のうち、5%以上、7%以上、10%以上、15%である。このようにして得られたARAが高い油脂は乳幼児用の栄養補給用途、成人向けの健康食品用途及び医薬用途に用いることができる。ARAは全脂肪酸組成の80%以下、70%以下、60%以下、50%以下とすることができる。本発明において得られる微生物油は、DGLAが全脂肪酸組成のうち、2.5%以上、5%以上、10%以上である。このようにして得られたDGLAが高い微生物油は抗炎症剤をはじめとする医薬用途に用いることができる。DGLAは全脂肪酸組

成の80%以下、70%以下、60%以下、50%以下とすることができる。本発明において得られる微生物油は、E T Aが全脂肪酸組成のうち、0.35%以上、0.5%以上、0.75%以上、1%以上である。このようにして得られたE T Aが高い微生物油は関節炎治療をはじめとする医薬用途に用いることができる。E T Aは全脂肪酸組成の50%以下、40%以下、30%以下、20%以下とすることができる。本発明において得られる微生物油は、E P Aが全脂肪酸組成のうち、4%以上、6%以上、8%以上、10%以上、12%以上である。このようにして得られたE P Aが高い微生物油は栄養補給用途及び医薬用途に用いることができる。E P Aは全脂肪酸組成の80%以下、70%以下、60%以下、50%以下とすることができる。本発明において得られる微生物油は、n-6 D P Aが全脂肪酸組成のうち、0.20%以下、0.15%以下、0.1%以下、0.05%以下である。このようにして得られたn-6 D P Aが低い微生物油は他の脂肪酸の機能を阻害しにくい。また、n-6 D P Aを精製により除去したい場合には有利である。n-6 D P Aは全脂肪酸組成の0.001%以上、0.005%以上、0.01%以上とすることができる。本発明において得られる微生物油は、D H Aが全脂肪酸組成のうち、0.50%以下、0.3%以下、0.2%以下、0.1%以下である。このようにして得られたD H Aが低い微生物油は他の脂肪酸の機能を阻害しにくい。また、D H Aを精製により除去したい場合には有利である。D H Aは全脂肪酸組成の0.005%以上、0.01%以上、0.05%以上とすることができる。本発明において得られる微生物油は、D H Aとn-6 D P Aの合計が全脂肪酸組成のうち、0.7%以下、0.8%以下、0.9%以下、1.0%以下である。このようにして得られたD H Aとn-6 D P Aが低い微生物油は他の脂肪酸の機能を阻害しにくく、酸化に安定である。また、D H Aとn-6 D P Aを精製により除去したい場合には有利である。D H Aとn-6 D P Aの合計は全脂肪酸組成の0.05%以上、0.1%以上、0.5%以上とすることができる。これらの各脂肪酸の望ましい濃度は、合計100%を限度としてそれぞれ任意に組み合わせることにより、それぞれ所望の性質を組み合

わせることができる。

また別の態様では、本発明により得られる微生物油は、以下のいずれかの条件を満たすものである。本発明において得られる微生物油は、GC面積でLA/DHAの値が0.6以上、0.7以上、0.8以上、0.9以上1.0以下、9以下、8以下、7以下、6以下である。このようにして得られた、LA/DHAの値が高い微生物油は、酸化に安定であり、DHAによるLAの機能が阻害されにくい。本発明において得られる微生物油は、GC面積でGLA/DHAの値が0.35以上、0.4以上、0.5以上、0.6以上、0.7以上1.0以下、9以下、8以下、7以下である。このようにして得られた、GLA/DHAの値が高い微生物油は、酸化に安定であり、DHAによるGLAの機能が阻害されにくい。

本発明において得られる微生物油は、GC面積でDGLA/DHAの値が0.35以上、0.4以上、0.5以上、0.6以上、0.7以上、1.0以下、9以下、8以下、7以下6以下である。このようにして得られたDGLA/DHAの値が高い微生物油は、抗炎症作用のある薬物などに利用することができる。本発明において得られる微生物油は、GC面積でARA/DHAの値が0.7以上、0.8以上、0.9以上、1.0以上、5.0以下、4.5以下、4.0以下、3.5以下、3.0以下である。このようにして得られたARA/DHAの値が高い微生物油は、乳児用調製乳に使用することができる。GC面積でEPA/DHAの値が0.35以上、0.4以上、0.5以上、0.6以上、0.7以上、5.0以下、4.5以下、4.0以下、3.5以下、3.0以下である。通常医薬品等で利用されているEPAはDHAを含むエステル体が主流であるが、このようにして得られたEPA/DHAの値の高い微生物油はEPAを高純度で含み、健康食品、医薬等に使用することができる。

これらの各脂肪酸の望ましい比率は、それぞれ任意に組み合わせることにより、それぞれ所望の性質を組み合わせることができる。本発明において得られる微生物油は、GC面積でLA/EPAの値が0.06以上、0.07以上、0.08以上、0.09以上、0.12以下、0.1以下、0.08以下0.06以下である。この

ようにして得られる LA/ EPA の値の低い微生物油は、炎症作用の低い輸液等に使用することができる。本発明において得られる微生物油は、GC面積で GLA/ EPA の値が 0.04 以上、 0.45 以上、 0.12 以下、 0.1 以下、 0.8 以下である。このようにして得られた GLA/ EPA の値の低い微生物油は、炎症性の低い輸液等に使用することができる。本発明において得られる微生物油は、GC面積で DTA/ EPA の値が 0.01 以上、 0.02 以上、 0.03 以上、 0.04 以上、 0.05 以上、 0.4 以下、 0.35 以下、 0.3 以下である。ここで得られる DTA/ EPA の値が低い微生物油は、 DTA と EPA はGCにおいて接近しているため、純度の高い EPA を分離するために有用である。これらの各脂肪酸の比率は、それぞれ任意に組み合わせることにより、それぞれ所望の性質を組み合わせることができる。

本発明において得られる微生物油は、GC面積で DTA/ ARA の値が 0.01 以上、 0.03 以上、 0.05 以上、 0.07 以上、 0.1 以上、 0.45 以下、 0.4 以下、 0.35 以下、 0.3 以下である。ここで得られる DTA/ ARA の値が低い微生物油は、乳幼児用調製乳に使用することができる。本発明において得られる微生物油は、GC面積で $DTA/ DGLA$ の値が 0.01 以上、 0.05 以上、 0.1 以上、 0.15 以上、 0.2 以上、 1.45 以下、 1.4 以下、 1.3 以下、 1.2 以下、 1.1 以下である。ここで得られる $DTA/ DGLA$ の値が低い微生物油は、抗炎症作用のある医薬品等に使用することができる。本発明において得られる微生物油は、GC面積で $LA/ n-6DPA$ の値が 0.4 以上、 0.5 以上、 0.6 以上、 0.7 以上、 0.8 以上、 20 以下、 18 以下、 16 以下、 14 以下、 12 以下である。ここで得られる $LA/ n-6DPA$ の値が高い微生物油は、食用油に使用することができる。本発明において得られる微生物油は、GC面積で $GLA/ n-6DPA$ の値が 0.2 以上、 0.4 以上、 0.6 以上、 0.8 以上、 10 以下、 8 以下、 6 以下、 4 以下である。本発明において得られる $GLA/ n-6DPA$ の値の高い微生物油は、健康食品やサプリメントに使用することができる。本発明において得られる微生物油は、GC面積で $DGLA/ n-6DPA$ の値が 0.35 以上、 0.5 以上、 0.75 以上、 1.0 以上、 3.0 以下、 2.7 以下、 2.5 以下、 2.2 以下、 2.0 以下である。

。ここで得られるDGLA/n-6DPAの値が高い微生物油は、抗炎症作用のある薬物に使用することができる。本発明において得られる微生物油は、GC面積ARA/n-6DPAの値が0.7以上、1.0以上、2.0以上、3.0以上、60以下、50以下、40以下、30以下である。ここで得られるARA/n-6DPAの値が高い微生物油は、乳幼児用調製乳に使用することができる。本発明において得られる微生物油は、GC面積でEPA/n-6DPAの値が0.4以上、0.6以上、0.8以上、1以上、2以上、5以上、70以下、60以下、50以下、40以下、30以下である。ここで得られるEPA/n-6DPAの値が高い微生物油は、健康食品、サプリメント等に使用することができる。これらの各脂肪酸の望ましい比率は、それぞれ任意に組み合わせることにより、それぞれ所望の性質を組み合わせることができる。

本発明において得られる微生物油は、GC面積でDGLA/LAの値が1.4以上、2以上、3以上、10以下、9以下、8以下、7以下である。ここで得られる微生物油は、抗炎症作用のある食品やサプリメントに使用することができる。本発明において得られる微生物油は、GC面積でARA/LAの値が5.1以上、7以上、9以上、11以上、20以下、17以下、15以下、12以下である。ここで得られるARA/LAの値が高い微生物油は、飼料や乳幼児用調製乳に使用することができる。本発明において得られる微生物油は、GC面積でEPA/LAの値が5.5以上、7以上、9以上、11以上、13以上、30以下、25以下、22以下、20以下である。ここで得られるEPA/LAの値が高い微生物油は、医薬や健康食品に使用することができる。本発明において得られる微生物油は、GC面積でDTA/LAの値が0.01以上、0.05以上、0.07以上、0.1以上、0.4以下、0.35以下、0.33以下、0.3以下、0.28以下である。ここで得られるDTA/LAの値が低い微生物油は、飼料や食品に使用することができる。これらの各脂肪酸の望ましい比率は、それぞれ任意に組み合わせることにより、それぞれ所望の性質を組み合わせることができる。

本発明において得られる微生物油は、GC面積でDGLA/GLAの値が4.

5以上、5以上、6以上、7以上、20以下、17以下、15以下、12以下である。ここで得られるDGLA/GLAの値が高い微生物油は、抗炎症作用のある医薬品等に使用することができる。本発明において得られる微生物油は、GC面積でARA/GLAの値が9以上、10以上、12以上、13以上、14以上、30以下、28以下、26以下、24以下、22以下である。ここで得られるARA/GLAの値が高い微生物油は、乳幼児用調製乳に使用することができる。これらの各脂肪酸の望ましい比率は、それぞれ任意に組み合わせることにより、それぞれ所望の性質を組み合わせることができる。

本発明において得られる微生物油は、GC面積でn-6DPA/DTAの値が0.001以上、0.01以上、0.02以上、1.5以下、1.4以下、1.3以下、1.2以下、1.1以下である。ここで得られる微生物油は、動脈硬化を予防する食品等に使用することができる。本発明において得られる微生物油は、GC面積でDHA/n-3DPAの値が0.001以上、0.01以上、0.02以上、4以下、4.5以下、4以下、3.5以下である。ここで得られる微生物油は、飼料または健康食品に使用することができる。本発明において得られる微生物油は、GC面積でC20PUFA/C22PUFAの値が0.5以上、0.7以上、1以上、1.2以上、50以下、45以下、40以下、35以下である。ここで得られるC20PUFA/C22PUFAの値が大きい微生物油は、健康食品やサプリメントに使用することができる。本発明において得られる微生物油は、GC面積でn-6PUFA/n-3PUFAの値が1.8以上、2以上、2.5以上、3以上、100以下、80以下、70以下、60以下、50以下である。ここで得られるn-6PUFA/n-3PUFAの値が高い微生物油は、食用油や飼料に使用することができる。これらの各脂肪酸の望ましい比率は、それぞれ任意に組み合わせることにより、それぞれ所望の性質を組み合わせることができる。

上記のこれらの各脂肪酸の望ましい比率はそれぞれ任意に組み合わせることにより、それぞれ所望の性質を組み合わせることができる。またこれらの比率と上記の各脂肪酸の望ましい濃度は、濃度が合計100%を限度として、任意に組み合わせることにより、それぞれ所望の性質を組み合わせることができる。

る。

[0039] また、本発明の不飽和脂肪酸は、種々の医薬品、食品、飼料、または工業製品も含まれ、その利用分野は特に限定されない。また、本発明の不飽和脂肪酸含有油脂が含まれる食品には、サプリメント等の健康食品や、食品添加物等が含まれる。また、工業製品としては、人以外の生物を対象とした飼料、フィルム、生分解性プラスチック、機能性繊維、潤滑油、洗剤等が挙げられる。

[0040] 次に、本発明を実施例に基づいて具体的に説明する。また、本明細書において、発明の各態様に関する一実施形態中で説明された各発明特定事項は、任意に組み合わせて新たな実施形態としてもよく、このような新たな実施形態も、本発明の各態様に包含され得るものとして、理解されるべきである。

実施例 1

[0041] [ラビリンチュラ類とその培養法・保存法]

(1) 本発明で使用する菌株

Parietichytrium sp. SEK358 (FERM BP-11405)、Parietichytrium sarkari anum SEK364 (FERM BP-11298)及びParietichytrium sp. SEK571 (FERM BP-11406)は甲南大学理工学部より分譲を受けた。Thraustochytrium aureum ATCC34304はATCCより分譲を受けた。

(2) 培地組成

i. 寒天平板培地組成

PDA寒天平板培地

0.78% (w/v) ポテトデキストロース寒天培地 (日水製薬社製)、1.75% (w/v) シーライフ (マリンテック社製)、1.21% (w/v) 寒天末 (ナカライテスク社製) を混合し、121℃で20分間オートクレーブ滅菌を行った。十分に冷却後に、バクテリアのコンタミネーションを防ぐために終濃度が100 µg/mlとなるようにアンピシリン酸ナトリウム (ナカライテスク社製) を添加し、シャーレに分注して平らな所に静置して固化させた。

ii. 液体培地組成

GY液体培地

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

PD液体培地

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

（3）培養方法

i. 寒天平板培養

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

i i. 液体培養

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

（4）ラビリンチュラ類の保持・保存法

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

のディープフリーザー中にて保存した。

実施例 2

[0042] [*Parietichytrium sarkarianum* SEK364のC20エロンガーゼ遺伝子の破壊および形質転換株が生産する脂質の脂肪酸組成の測定]

[実施例 2 - 1] SV40 terminator配列のサブクローニング

pcDNA 3.1 myc-His vector (invitrogen)を鋳型に、PrimeSTAR HS DNA polymerase (タカラバイオ社製)によりSV40 terminator配列を増幅した。用いたPCR primer は下記の通りで、RH058はSV40 terminator配列上に設定し、BgIIIおよびBamHIリンカー配列を含む。RH052はSV40 terminator配列上に設定し、BgIII配列を含む。[RH058: 34mer: 5' - CAG ATC TGG ATC CGC GAA ATG ACC GAC CAA GCG A-3' (配列番号1)、 RH052: 24mer: 5' - ACG CAA TTA A TG TGA GAT CTA GCT -3' (配列番号2)]。下記の条件で増幅後、pGEM-T easy vector (Promega社製)にクローニングした。[PCR cycles: 98°C 2 min/ 98°C 30 sec, 60°C 30 sec, 72°C 1 min, 30 cycles/ 72°C 1min]。大腸菌にて増幅後、Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (BECKMAN COULTER社製)を用いて配列を確認した。これをpRH27と名付けた。

サブクローニングしたSV40 terminator配列 (342 bp、配列番号3) を含むプラスミド (pRH27) を図 2 に示す。

[0043] [実施例 2 - 2] 人工合成ネオマイシン耐性遺伝子カセットの作製

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

これを鋳型に、PrimeSTAR HS DNA polymerase with GC Buffer (タカラバイオ社製)によりubiquitin promoter 配列 (619 bp、配列番号4) を増幅した。用いたPCR primer は下記の通りで、RH053はubiquitin promoter 配列上

に設定、BglIIIリンカー配列を含む。TK01はubiquitin promoter 配列と人工合成ネオマイシン耐性遺伝子配列を含む。[RH053: 36mer: 5' - CCC AGA TC T GCC GCA GCG CCT GGT GCA CCC GCC GGG -3' (配列番号5)、TK01: 58mer: 5' - CGT GAA GGC CGT CCT GTT CAA TCA TGT TGG CTA GTG TTG CTT AGG TCG CTT GCT GCT G -3' (配列番号6)]。[PCR cycles: 98°C 2min/ 98°C 10 sec , 68°C 1 min, 30 cycles/ 68°C 1min]。

人工合成ネオマイシン耐性遺伝子配列を鋳型に、PrimeSTAR HS DNA polymerase with GC Buffer (タカラバイオ社製) により人工合成ネオマイシン耐性遺伝子配列 (826 bp、配列番号7) を増幅した。用いたPCR primer は下記の通りで、TK02はubiquitin promoter 配列と人工合成ネオマイシン耐性遺伝子配列を含む。RH057は人工合成ネオマイシン耐性遺伝子配列を含み、BglIIIリンカー配列を有する。[TK02: 54mer: 5' - AGC GAC CTA AGC AAC ACT AGC CAA CAT GAT TGA ACA GGA CGG CCT TCA CGC TGG -3' (配列番号8)、RH057: 26mer: 5' - CAG ATC TCA AAA GAA CTC GTC CAG GA -3' (配列番号9)]。[PCR cycles: 98°C 2min/ 98°C 10 sec, 68°C 1 min, 30 cycles/ 68°C 1min]。

配列番号4および7を鋳型に、非特許文献9記載の方法に従ってRH053 (配列番号5) およびRH057 (配列番号9) を用いFusion PCRを行った。酵素はLA Taq Hot start version (タカラバイオ社製) を使用し、PCR cycles: 94°C 2min / 94°C 20 sec, 55°C 30 sec, 68°C 1 min, 30 cycles/ 68°C 1min (ただし55°Cから68°Cへは1°C/ 10sec とした) の条件で増幅後、BglIIIにて消化した。(図3)。

上記のようにしてFusionしたThraustochytrium aureum ATCC 34304 由来ubiquitin promoter-人工合成ネオマイシン耐性遺伝子配列 (1395 bp、配列番号10) を、BglIIIにて消化し、これを実施例2-1記載pRH27のBamHIサイトに繋いだ。出来たプラスミドを大腸菌にて増幅後、Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (BECKMAN COULTER社製) を用いて配列を確認した。これをpRH31と名付けた。

作製した人工合成ネオマイシン耐性遺伝子カセット (pRH31) を図4に示す

。

[0044] [実施例 2 - 3] ハイグロマイシン耐性遺伝子カセットの作製

Thraustochytrium aureum ATCC 34304 ゲノムDNAを鋳型に、PrimeSTAR HS DNA polymerase with GC Buffer (タカラバイオ社製) によりubiquitin promoter 配列 (617 bp、配列番号11) を増幅した。用いたPCR primer は下記の通りで、RH053はubiquitin promoter 配列上に設定、BglIIIリンカー配列を含む。KS08はubiquitin promoter 配列とハイグロマイシン耐性遺伝子配列を含む。[RH053: 36mer: 5' - CCC AGA TCT GCC GCA GCG CCT GGT GCA CCC GCC GGG -3' (実施例 2 - 2 記載。配列番号5)、KS08: 58mer: 5' - TCG CGG TGA GTT CAG GCT TTT TCA TGT TGG CTA GTG TTG CTT AGG TCG CTT GCT GCT G -3' (配列番号12)]。[PCR cycles: 98°C 2min/ 98°C 30 sec, 68°C 2 min, 30 cycles/ 68°C 2min]。

pcDNA 3.1/ Hygro(invitrogen社製) を鋳型に、PrimeSTAR HS DNA polymerase with GC Buffer (タカラバイオ社製) によりハイグロマイシン耐性遺伝子 (1058 bp、配列番号13) を増幅した。用いたPCR primer は下記の通りで、KS07はubiquitin promoter 配列とハイグロマイシン耐性遺伝子配列を含む。RH056はハイグロマイシン耐性遺伝子を含み、BglIIIリンカー配列を有する。[KS07: 56mer: 5' - AGC GAC CTA AGC AAC ACT AGC CAA CAT GAA AAA GCC TGA ACT CAC CGC GAC GTC TG -3' (配列番号14)、RH056: 36mer: 5' - CAG ATC TCT ATT CCT TTG CCC TCG GAC GAG TGC TGG -3' (配列番号15)]。[PCR cycles: 98°C 2min/ 98°C 30 sec, 68°C 2 min, 30 cycles/ 68°C 2min]。

配列番号11および13を鋳型に、非特許文献 9 記載の方法に従ってRH053 (実施例 2 - 2 記載。配列番号5) およびRH056 (配列番号15) を用いてFusion PCRを行った。酵素はLA Taq Hot start version (タカラバイオ社製) を使用し、下記の条件で増幅後、BglIIIにて消化した。[PCR cycles: 94°C 2min/ 94°C 20 sec, 55°C 30 sec, 68°C 1 min, 30 cycles/ 68°C 1min。ただし55°C から68°Cへは1°C/ 10sec とした] (図 5)。

上記のようにしてFusionしたThraustochytrium aureum ATCC 34304 由来ub

iquitin promoter—pcDNA 3.1/ Hygro(invitrogen社製)由来ハイグロマイシン耐性遺伝子 (1625 bp、配列番号16) を、BglIIにて消化し、これを実施例 2-1、図2記載pRH27のBamHIサイトに繋いだ。出来たプラスミドを大腸菌にて増幅後、Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (BECKMAN COULTER社製) を用いて配列を確認した。これをpRH32と名付けた。

作製したハイグロマイシン耐性遺伝子カセット (pRH32) を図6に示す。

[0045] [実施例2-4] Parietichytrium属C20エロンガーゼ遺伝子のクローニング
実施例2-2記載の方法でParietichytrium sarkarianum SEK364のゲノムDNAを抽出し、ゲノムを解読した。

C20エロンガーゼ遺伝子に保存される領域を標的として、正方向 (PsTaEL02 F1 ; 5' - CCT TCG GCG CTC CTC TTA TGT ATG T -3') (配列番号17)、および逆方向 (PsTaEL02 R2 ; 5' - CAA TGC AAG AGG CGA ACT GGG AGA G-3') (配列番号18) のオリゴヌクレオチドを合成した。次に、実施例2-2に記載の方法で調製したParietichytrium sarkarianum SEK364ゲノムDNAを鋳型として、オリゴヌクレオチドPsTaEL02 F1およびPsTaEL02 R2を用いたPCRを、LA Taq Hot start version (TaKaRa)を用いて行った [PCR cycles: 98°C 1 min/98°C 10 sec, 60°C 30 sec, 72°C 1 min, 30 cycles/72°C 7 min/4°C ∞]。得た特異的増幅産物をゲル精製し、ダイレクトシーケンスによってその塩基配列を解析したところ、既知のC20エロンガーゼ遺伝子の配列と有意な相同性を示すことから、Parietichytrium sarkarianum SEK364由来C20エロンガーゼ遺伝子の部分配列であることが示唆された。

続いて、後述する比較例1-2の場合と同様に、3' および5' RACEによるParietichytrium sarkarianum SEK364由来C20エロンガーゼ遺伝子のクローニングを行った。まず、正方向オリゴヌクレオチドプライマー (PsRACE F1 ; 5' - TGG GGC TCT GGA ACC GCT GCT TAC G -3') (配列番号19) および (PsRACE F2 ; 5' - CTT CCA GCT CTC CCA GTT CGC CTC T -3') (配列番号20)、逆方向オリゴヌクレオチドプライマー (PsRACE R1 ; 5' - CGG GTT GTT GAT GTT GAG CGA GGT G-3') (配列番号21) および (PsRACE R2 ; 5' - CCC ACG CCA

TCC ACG AGC ACA CCA C-3') (配列番号22) を設計した。次に、SMART™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech社製) によって作製したcDNAライブラリを鋳型に、合成アダプター特異的なオリゴヌクレオチド、および前述したオリゴヌクレオチドPsRACE F1もしくはPsRACE R1を用いた3' -および5' -RACE [PCR cycles: 94°C 30 sec 5 cycles/94°C 30 sec, 70°C 30 sec, 72°C 3 min, 5 cycles/94°C 30 sec, 68°C 30 sec, 72°C 3 min, 25 cycles /4°C ∞] を行った。続いて、得た両RACE産物を鋳型として、合成アダプター特異的なオリゴヌクレオチド、および前述したオリゴヌクレオチドPsRACE F2もしくはPsRACE R2を用いたnested PCR [PCR cycles: 94°C 1 min/94°C 30 sec, 68°C 30 sec, 72°C 3 min, 25 cycles/72°C 10 min /4°C ∞] を行った。得た特異的産物をゲル精製し、pGEM-T easy Vector (Promega社製) を使用したTA クローン化後に塩基配列を解析した結果、Parietichytrium sarkarianum SEK 364由来C20エロンガーゼ遺伝子であることが確認された。

さらに、実施例2-2に記載の方法で抽出したParietichytrium属のゲノムDNAを鋳型にし、LA Taq Hot start version (タカラバイオ社製) によりC20エロンガーゼ遺伝子配列を含む配列(957 bp、配列番号23)を増幅した。用いたPCR primerは下記のとおりで、RH0153は開始コドンを含み、リンカー配列としてBamHIサイトを有する。RH0154は終止コドンを含み、リンカー配列としてBamHIサイトを有する。[RH0153: 32 mer: 5' - CCC GGA TCC ATG GCA GC T CGC GTG GAG AAA CA -3' (配列番号24)、RH0154: 33 mer: 5' - CCC GGA TCC TTA CTG AGC CTT CTT GGA GGT CTC -3' (配列番号25)]。[PCR cycles: 98°C 2min/ 98°C 10 sec, 68°C 1 min, 30 cycles/ 68°C 2min]。

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

Parietichytrium属C20エロンガーゼ遺伝子936 bp (配列番号26) をクローニングした。これをpRH80と名付けた(図7)。アミノ酸配列を配列番号27に示す。

[0046] [実施例 2-5] Parietichytrium属C20エロンガーゼ遺伝子ターゲティングベクターの作製のための土台プラスミド作製

実施例 2-4 で作製したpRH80 (図 7) を鋳型に、C20 エロンガーゼ遺伝子配列中腹部分にBglIIサイトを挿入する様、逆向きに設定したprimer setを用意し、PrimeSTAR Max DNA Polymerase (タカラバイオ社製) にて増幅した。用いたPCR primer は下記の通りでともにBglIIリンカー配列を有する。[RH0155: 26 mer: 5' - ACA AAG ATC TCG ACT GGA CCG ACA CC -3' (配列番号28)、RH0156: 27 mer: 5' - AGT CGA GAT CTT TGT CAG GAG GTG GAC -3' (配列番号29)]。[PCR cycles: 98°C 2 min/ 98°C 10 sec, 56°C 15 sec, 72°C 1 min, 30 cycles/ 72°C 1 min]。上記条件で増幅後、BglIIにて消化したのち、セルフライゲーションした。ライゲーションしたサンプルは大腸菌にて増幅後、Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (BECKMAN COULTER社製) を用いて配列を確認した。これをpRH83と名付けた。BglIIサイトを挿入したC20エロンガーゼ遺伝子配列 935 bpを配列番号30に示す。

作製したParietichytrium属C20エロンガーゼ遺伝子ターゲティングベクターの作製のための土台プラスミド (pRH83) を図 8 に示す。

[実施例 2-6] ターゲティングベクターの作製 (人工合成ネオマイシン遺伝子およびハイグロマイシン耐性遺伝子)

実施例 2-2 記載のpRH31 (図 4) をBglIIにて消化し、人工合成ネオマイシン耐性遺伝子カセットを含むDNA断片を実施例 2-5 記載pRH83 (図 8) のBglIIサイトに繋いだ。これをpRH85と名付けた。

実施例 2-3 記載のpRH32 (図 6) をBglIIにて消化し、ハイグロマイシン耐性遺伝子カセットを含むDNA断片を実施例 2-5 記載pRH83 (図 8) のBglIIサイトに繋いだ。これをpRH86と名付けた。

作製した2種のターゲティングベクター (pRH85および86) を図 9 に示す。

[0047] [実施例 2-7] C20エロンガーゼ遺伝子ターゲティングベクター導入

実施例 2-6 で作製した2種類のターゲティングベクターを鋳型に、RH0153 (実施例 2-4 記載、配列番号24) およびRH0154 (実施例 2-4 記載、配列

番号25) をprimerとして用いて、PrimeSTAR Max DNA polymerase (タカラバイオ社製) により遺伝子を増幅した。[PCR cycles: 98°C 2min/ 98°C 30 sec, 68°C 2 min, 30 cycles/ 68°C 2min]。フェノールクロロホルム抽出、クロロホルム抽出後、DNAをエタノール沈殿させ、沈殿を0.1×TEに溶解した。A260/280を測定しDNA濃度を算出した。実施例2－6記載pRH85 (図9) を鋳型とした際に得られる導入断片は 2661 bpで、Parietichytrium属 C20エロンガーゼ遺伝子前半－SV40 terminator配列－人工合成ネオマイシン耐性遺伝子配列－ubiquitin promoter配列－Parietichytrium属 C20エロンガーゼ遺伝子後半という並びになる (配列番号31)。実施例2－6記載pRH86 (図9) を鋳型とした際に得られる導入断片は 2892 bpで、Parietichytrium属 C20エロンガーゼ遺伝子前半－SV40 terminator配列－ハイグロマイシン耐性遺伝子配列－ubiquitin promoter配列－Parietichytrium属 C20エロンガーゼ遺伝子後半という並びになる (配列番号32)。

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

[0048] [実施例2－8] C20エロンガーゼ遺伝子ジーンターゲットティング相同組換え体の同定

実施例2－2記載の方法で、Parietichytrium sarkarianum SEK364株、および、C20エロンガーゼ遺伝子ヘテロ相同組換え体、C20エロンガーゼ遺伝子ホモ相同組換え体 (遺伝子破壊株) よりゲノムDNAを抽出後、A260/280を測定しDNA濃度を算出した。これを鋳型にし、LA Taq Hot start version (タカラバイオ社製) を用いてゲノム構造確認のPCRを行った。用いたprimerの位置、増幅

に用いる組み合わせ、増幅産物の予想サイズを図10に示す。RH0184はC20 エロンガーゼ上流、RH0185は下流、RH0142およびRH0143は人工合成ネオマイシン耐性遺伝子上、RH0140およびRH0141はハイグロマイシン耐性遺伝子上に、それぞれ設定した。[RH0140: 20 mer: 5' - GGT TGA CGG CAA TTT CGA TG -3' (配列番号33)、RH0141: 22 mer: 5' - CCT CCT ACA TCG AAG CTG AAA G -3' (配列番号34)、RH0142: 21 mer: 5' - CTT CTC GGG CTT TAT CGA CTG -3' (配列番号35)、RH0143: 22 mer: 5' - TAA GGT CGG TCT TGA CAA ACA G -3' (配列番号36)、RH0184: 24 mer: 5' - AGT AGT CCC CGA TTT GGT AGT TGA -3' (配列番号37)、RH0185: 22 mer: 5' - GGC AGA GAG CAA AAA CAC G AG C-3' (配列番号38)]。[PCR cycles: 98°C 2min/ 98°C 10 sec, 68°C 4 min, 30 cycles/ 68°C 7min]。

野生型アリル (Wt allele) に増幅がなく、人工合成ネオマイシン耐性遺伝子アリル (NeoR allele) およびハイグロマイシン耐性遺伝子アリル (HygR allele) に増幅があるC20 エロンガーゼ遺伝子破壊株が得られた (図11)。

[実施例2-9] C20エロンガーゼ遺伝子破壊による脂肪酸組成の変化

Parietichytrium sarkarianum SEK364野生株やその遺伝子破壊株 (C20 エロンガーゼ遺伝子ノックアウト株、C20 -/-) をGY培地で培養した。対数増殖期後期の細胞を4°C、3,000rpm、10 min遠心してペレットにし、0.9% NaClに懸濁、洗浄した。続いて4°C、3,000rpm、10 min遠心し、ペレットを滅菌水に懸濁、洗浄した。それをさらに3,000rpm、10 min遠心し、上清を除き、凍結乾燥した。

凍結乾燥した細胞に2 mlのmethanolic KOH (7.5% KOH in 95% methanol) を加え、ボルテックス後、超音波で菌体を破碎した (80°C、30 min)。ついで、500 μ lの滅菌水を加えてボルテックスした後、2 mlのn-hexaneを加えてボルテックスした。続いて3,000 rpmで10 min遠心し、上層を捨てた。再び2 mlのn-hexaneを加えてボルテックスし、3,000 rpmで10 min遠心して、上層を捨てた。残った下層に1 mlの6N HClを添加してボルテックスした後、2 mlのn-hexaneを加えてボルテックスした。続いて3,000 rpmで10 min遠心し、上層

を回収した。再び2 mlのn-hexaneを加えてボルテックスし、3,000 rpmで10 min遠心して、上層を回収した。回収した上層を窒素ガスで濃縮乾固した。濃縮乾固したサンプルに2 mlの3N methanolic HClを添加し、80℃で一晩インキュベートした。

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

この結果、*Parietichytrium sarkarianum* SEK364においてC20エロンガーゼ遺伝子をノックアウトすると、炭素鎖長22以上の脂肪酸が減少し、炭素鎖長20の脂肪酸が増加した。（図12）。図13に野生型株を100%とした時の割合を示す。全脂肪酸組成のうちARA25.22%, DGLA8.62%, ETA0.56%, EPA 11.58% , n-6DPA1.64%, DHA1.28%を示している。GC面積でLA/DHAの値5.8, GLA/DHAの値1.5, DGLA/DHAの値6.7, ARA/DHAの値19.7, EPA/DHAの値9.0, LA/EPAの値0.64, GLA/EPAの値0.16, DTA/EPAの値0.06, DTA/ARAの値0.03, DTA/DGLAの値0.08, LA/n-6DPAの値4.5, GLA/n-6DPAの値1.2, DGLA/n-6DPAの値5.3, ARA/n-6DPAの値15.4, EPA/n-6DPAの値7.1, DGLA/LAの値1.2, ARA/LAの値3.4, EPA/LAの値1.6, DTA/LAの値0.09, DGLA/GLAの値4.5, ARA/GLAの値13.2, n-6DPA/DTAの値2.4, DHA/n-3DPAの値4.9, C20PUFA/C22PUFAの値11.94, n-6PUFA/n-3PUFAの値2.67を示している。

これらの結果、アラキドン酸が約10倍、EPAが約8倍、DGLAが約16倍に増加し、またDPAが約1/4、DHAが約1/5に減少した。

このように、PUFA-PKS経路を有さないラビリンチュラ類である*Parietichytrium sarkarianum* SEK364 を選択することにより、PUFA-PKS経路の遺伝子破壊を行うことなくDHA、DPA n-6以外のPUFAを蓄積する株を作出することができた。この株をEPAおよび/またはARA生産株として利用しても良いし、さらなるエロンガーゼやデサチュラーゼの遺伝子破壊や遺伝子導入により、所望のPUFA生産株を作出することもできる。

実施例 3

[0049] [*Parietichytrium sarkarianum* SEK364の Δ 4デサチュラーゼ遺伝子の破壊および形質転換株が生産する脂質の脂肪酸組成の測定]

[実施例 3-1] *Parietichytrium*属 Δ 4デサチュラーゼ遺伝子のクローニング

実施例 2-2 記載の方法で*Parietichytrium* sp. SEK571のゲノムDNAを抽出した。抽出したゲノムDNAを鋳型にし、LA Taq Hot Start Version (タカラバイオ社製) により Δ 4デサチュラーゼ遺伝子配列を含む配列 (5,003bp、配列番号39) を増幅した。用いたPCR primerは下記のとおりである。[RH0241: 23 mer: 5' - GTT TGA GGA GCG AGG CAT TTC TT -3' (配列番号40)、RH0242: 23 mer: 5' - AGT GCT CGT ACA ATG ACT GGC GT -3' (配列番号41)]。

得られたDNA断片はpGEM-T easy vector にクローニングし、大腸菌にて増幅後、Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (BECKMAN COULTER社製) を用いて配列を確認した。これをpRH112と名付けた (配列番号42)。

*Parietichytrium*属 Δ 4デサチュラーゼ遺伝子配列 (1,542bp、配列番号43) を含むプラスミド (pRH112) を図14に示す。

[0050] [実施例 3-2] Δ 4デサチュラーゼ遺伝子ターゲティングベクター作製のための、土台となるプラスミド作製

実施例 3-1 で作製したpRH112 (図14) を鋳型に、 Δ 4デサチュラーゼ遺伝子および Δ 4デサチュラーゼ遺伝子下流600bpを欠失させ、かつ欠失部分にBglIIサイトが生じる様に設計したprimer setを用意した。[RH0243: 26 mer: 5' - GGC AAG ATC TAA CTT TCT GAG GCT CT -3' (配列番号44)、RH0244: 26

mer: 5' - AAG TTA GAT CTT GCC TAT TCC ACG AT -3' (配列番号45)]。増幅にはPrimeSTAR Max DNA Polymerase (タカラバイオ社製) を使用した。増幅サンプルをBglIIIにて消化したのち、セルフライゲーションした。ライゲーションしたサンプルは大腸菌にて増幅後、Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (BECKMAN COULTER社製) を用いて配列を確認した。これをpRH117と名付けた。

作製した Δ 4デサチュラーゼ遺伝子ターゲティングベクター作製のための土台となるプラスミド (pRH117) を図15に示す。

[0051] [実施例3-3] Δ 4デサチュラーゼ遺伝子ターゲティングベクターの作製

実施例2-2記載のpRH31 (図4) をBglIIIにて消化し、人工合成ネオマイシン耐性遺伝子カセットを含むDNA断片を実施例3-2記載のpRH117 (図15) のBglIIIサイトに繋いだ。これをpRH124 (図16) と名付けた。このpRH124を鋳型に、PstIを欠失させる様に設定したprimer setを用意した。[RH0261: 26 mer: 5' - GTG CAG ACG CAG AAG AAG ACT GAC AA -3' (配列番号46)、RH0262: 25 mer: 5' - CTT CTG CGT CTG CAC GAG GAA TCG A -3' (配列番号47)]。増幅にはPrimeSTAR Max DNA Polymerase (タカラバイオ社製) を使用した。PCR産物を大腸菌に導入して増幅し、Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (BECKMAN COULTER社製) を用いて配列を確認した。これをpRH126 (配列番号48) と名付けた。

作製した Δ 4デサチュラーゼ遺伝子ターゲティングベクター (pRH126) を図17に示す。

[0052] [実施例3-4] Parietichytrium sarkarianum SEK364への Δ 4デサチュラーゼ遺伝子ターゲティングベクター導入

実施例3-3で作製したターゲティングベクターpRH126 (図17) を鋳型に、RH0241 (実施例3-1記載、配列番号40) およびRH0242 (実施例3-1記載、配列番号41) をprimerとして用いて、PrimeSTAR Max DNA polymerase (タカラバイオ社製) により遺伝子を増幅した。フェノールクロロホルム抽出、クロロホルム抽出後、DNAをエタノール沈殿させ、沈殿を0.1×TEに溶解

した。A260/280を測定しDNA濃度を算出した。実施例3-3記載pRH126（図17）を鋳型とした際に得られる導入断片は4,562bpとなる。

Parietichytrium sarkarianum SEK364株をGY培地中で1~2日間培養し、対数増殖期にある細胞を遺伝子導入に使用した。OD600 = 1~2相当分の細胞に対し、0.625 μ gのDNA断片を遺伝子銃法（マイクロキャリア：0.6 micronの金粒子、target distance：6 cm、chamber vacuum：26 mm Hg、Rupture disk：1,550 PSI）により導入した。遺伝子導入した細胞は24時間のリカバリータイムの後、1 mg/ml G418 含有PDA寒天平板培地に塗布した。この結果、1撃ちこみあたり0から2個の薬剤耐性株を得た。

[0053] [実施例3-5] Δ 4デサチュラーゼ遺伝子ジーンターゲットイング相同組換え体の同定

実施例2-2記載の方法で、Parietichytrium sarkarianum SEK364株および、 Δ 4デサチュラーゼ遺伝子破壊株よりゲノムDNAを抽出後、A260/280を測定しDNA濃度を算出した。これを鋳型にし、PrimeSTAR GXL DNA polymerase（タカラバイオ社製）を用いてゲノム構造確認のPCRを行った。用いたprimerの位置、増幅に用いる組み合わせ、増幅産物の予想サイズは図18（相同領域内）に示した。相同組み換え領域内に設計したプライマーセットで、Parietichytrium sarkarianum SEK364株では3,046 bp、 Δ 4デサチュラーゼ遺伝子破壊株では2,605 bpが増幅される。[RH0251: 20 mer: 5' - GTG GTC GAA GTG G AG TAT CT -3'（配列番号49）、RH0252: 20 mer: 5' - ACT CGC CAT ACA ACT TTA CA -3'（配列番号50）]。

その結果、野生型アリル（Wt allele）由来の増幅がなく、 Δ 4デサチュラーゼ遺伝子K0型アリル（NeoR allele）由来の増幅がある Δ 4デサチュラーゼ遺伝子破壊株株が得られた（図19 レーン7： Δ 4デサチュラーゼK0変異株）。

[実施例3-6] Δ 4デサチュラーゼ遺伝子破壊による脂肪酸組成の変化
実施例2-9記載の方法に準じてParietichytrium sarkarianum SEK364株野生株やその Δ 4デサチュラーゼ遺伝子破壊株を培養、凍結乾燥後、脂肪酸をメ

チルエステル化し、GCを用いて解析した。培養には実施例 1 記載のGY液体培地にビタミン溶液 (vitamin B₁ 200mg, vitamin B₂ 1mg, vitamin B₁₂ 1mgを蒸留水100mLに溶解) を0.1%、微量元素溶液 (EDTA disodium salt 30.0g, FeCl₃ · 6H₂O 1.45g, H₂BO₃ 34.2g, MnCl₂ · 4H₂O 4.3g, ZnCl₂ 1.335g, CoCl₂ · 6H₂O 0.13g, NiSO₄ · 6H₂O 0.26g, CuSO₄ · 5H₂O 0.01g, Na₂MoO₄ · 2H₂O 0.025gを蒸留水1Lに溶解) を0.2%となるよう添加した培地を用いた。GC解析にはガスクロマトグラフGC-2014 (島津製作所社製) を使用し、カラム: HR-SS-10 (30 m x 0.25 mm; 信和化工社製)、カラム温度: 150℃ → (2℃/min) → 220℃ (10 min)、キャリアガス: He (1.3 mL/min) の条件で測定を行った。

分析結果のチャートを図 20、その拡大図を図 21 に示す。また、図 20 のチャートを数値化したもの図 22 の表に示す。この表は、Parietichytrium sarkarianum SEK364野生株とそのΔ4デサチュラーゼ遺伝子破壊株の脂肪酸組成の比較を表す。本表は図 20 のチャートを数値化したものであり、全脂肪酸組成のうちARA1.59%, DGLA0.98%, ETA0.05%, EPA0.79%, n-6DPA0.00%, DHA 0.00%を示している。GC面積でLA/EPAの値5.09, GLA/EPAの値0.48, DTA/EPAの値7.44, DTA/ARAの値3.73, DTA/DGLAの値6.06, DGLA/LAの値0.24, ARA/LAの値0.39, EPA/LAの値0.20, DTA/LAの値1.46, DGLA/GLAの値2.57, ARA/GLAの値4.19, n-6DPA/DTAの値0.00を示している。

この結果、Parietichytrium sarkarianum SEK364株においてΔ4デサチュラーゼ遺伝子を破壊すると、DHAやDPA n-6をほとんど生合成できなくなり、逆にそれらの基質であるDPA n-3やDTAが増加することが明らかになった。

このように、PUFA-PKS経路を有さないラビリンチュラ類であるParietichytrium sarkarianum SEK364 を選択することにより、PUFA-PKS経路の遺伝子破壊を行うことなくDHA、DPA n-6以外のPUFAを蓄積する株を作出することができた。この株をDPA n-3および/またはDTA生産株として利用しても良いし、さらなるエロンガーゼやデサチュラーゼの遺伝子破壊や遺伝子導入により、所望のPUFA生産株を作出することもできる。

実施例 4

[0054] [Parietichytrium sp. SEK358のC20エロンガーゼ遺伝子の破壊および形質転換株が生産する脂質の脂肪酸組成の測定]

[実施例4-1] Parietichytrium sp. SEK358株へのC20エロンガーゼ遺伝子ターゲティングベクター導入

実施例2-6記載pRH85(図9)で作製したターゲティングベクターを鋳型に、RH0153(実施例2-4記載、配列番号24)およびRH0154(実施例2-4記載、配列番号25)をprimerとして用いて、PrimeSTAR Max DNA polymerase(タカラバイオ社製)により遺伝子を増幅した。[PCR cycles: 98°C 2min/ 98°C 30 sec, 68°C 2 min, 30 cycles/ 68°C 2min]。フェノールクロロホルム抽出、クロロホルム抽出後、DNAをエタノール沈殿させ、沈殿を0.1×TEに溶解した。A260/280を測定しDNA濃度を算出した。実施例2-6記載pRH85(図9)を鋳型とした際に得られる導入断片は2661 bpで、Parietichytrium属 C20エロンガーゼ遺伝子前半-SV40 terminator配列-人工合成ネオマイシン耐性遺伝子配列-ubiquitin promoter配列-Parietichytrium属 C20エロンガーゼ遺伝子後半という並びになる(実施例2-7記載、配列番号31)。

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

[0055] [実施例4-2] C20エロンガーゼ遺伝子ジーンターゲティング相同組換え体の同定

実施例2-2記載の方法で、Parietichytrium sp. SEK358株、および、C20エロンガーゼ遺伝子破壊株よりゲノムDNAを抽出後、A260/280を測定しDNA濃度を算出した。これを鋳型にし、MightyAmp DNA polymerase(タカラバイオ社製)を用いてゲノム構造確認のPCRを行った。用いたprimerの位置、増幅に

用いる組み合わせ、増幅産物の予想サイズは実施例 2－8 記載、図 10 に示した。

RH0184（実施例 2－8 記載。配列番号 37）は C20 エロンガーゼ上流、RH0185（実施例 2－8 記載。配列番号 38）は下流、RH0142（実施例 2－8 記載。配列番号：35）および RH0143（実施例 2－8 記載。配列番号：36）は人工合成ネオマイシン耐性遺伝子上に、それぞれ設定した。[PCR cycles: 98°C 2min / 98°C 10 sec, 68°C 2 min, 30 cycles/ 68°C 7min]。

野生型アリル (Wt allele) に増幅がなく、人工合成ネオマイシン耐性遺伝子アリル (NeoR allele) に増幅がある C20 エロンガーゼ遺伝子破壊株が得られた (図 23)。

[0056] [実施例 4－3] C20 エロンガーゼ遺伝子破壊による脂肪酸組成の変化

実施例 2－9 記載の方法で *Parietichytrium* sp. SEK358 株野生株やその遺伝子破壊株 (C20 エロンガーゼ遺伝子ノックアウト株、C20 K0) を培養、凍結乾燥後、脂肪酸をメチルエステル化し、GC を用いて解析した。GC 解析にはガスクロマトグラフ GC-2014 (島津製作所社製) を使用し、カラム：HR-SS-10 (30 m x 0.25 mm; 信和化工社製)、カラム温度：150°C → (5°C/min) → 220°C (10 min)、キャリアガス：He (1.3 mL/min) の条件で行った。脂肪酸組成の変化を図 24 に示す。また、図 25 に野生型株を 100% とした時の割合を示す。

全脂肪酸組成のうち ARA (ARA) 21.35%, DGLA 8.64%, ETA 2.14%, EPA 23.83%, n-6DPA 0.46%, DHA 0.94% を示している。GC 面積で LA/DHA の値 4.6, GLA/DHA の値 2.8, DGLA/DHA の値 9.19, ARA/DHA の値 22.7, EPA/DHA の値 25.4, LA/EPA の値 0.18, GLA/EPA の値 0.11, DTA/EPA の値 0.01, DTA/ARA の値 0.01, DTA/DGLA の値 0.03, LA/n-6DPA の値 9.3, GLA/n-6DPA の値 5.7, DGLA/n-6DPA の値 18.8, R/n-6DPA の値 46.4, EPA/n-6DPA の値 51.8, DGLA/LA の値 2.0, ARA/LA の値 5.0, EPA/LA の値 5.6, DTA/LA の値 0.06, DGLA/GLA の値 3.3, ARA/GLA の値 8.2, n-6DPA/DTA の値 1.8, DHA/n-3DPA の値 4.1, C20PUFA/C22PUFA の値 29.61, n-6PUFA/n-3PUFA の値 1.1 を示している。

この結果、*Parietichytrium* sp. SEK358 株において C20 エロンガーゼ遺伝子を

ノックアウトすると、炭素鎖長22以上の脂肪酸が減少し、炭素鎖長20の脂肪酸が増加した。具体的には、アラキドン酸が約7倍、EPAが約11倍に増加し、またDPAが約1/15、DHAが約1/8に減少した。

このように、PUFA-PKS経路を有さないラビリンチュラ類であるParietichytrium sp. SEK358 を選択することにより、PUFA-PKS経路の遺伝子破壊を行うことなくDHA、DPA n-6以外のPUFAを蓄積する株を作出することができた。この株をEPAおよび/またはARA生産株として利用しても良いし、さらなるエロンガーゼやデサチュラーゼの遺伝子破壊や遺伝子導入により、所望のPUFA生産株を作出することもできる。

実施例 5

[0057] [Parietichytrium sp. SEK358の Δ 4デサチュラーゼ遺伝子の破壊および形質転換株が生産する脂質の脂肪酸組成の測定]

[実施例5-1] Parietichytrium sp. SEK358への Δ 4デサチュラーゼ遺伝子ターゲティングベクター導入

実施例3-3記載pRH126(図17)で作製したターゲティングベクターを鋳型に、RH0241(実施例3-1記載、配列番号40)およびRH0242(実施例3-1記載、配列番号41)をprimerとして用いて、PrimeSTAR Max DNA polymerase(タカラバイオ社製)により遺伝子を増幅した。フェノールクロロホルム抽出、クロロホルム抽出後、DNAをエタノール沈殿させ、沈殿を0.1×TEに溶解した。A260/280を測定しDNA濃度を算出した。実施例3-3記載pRH126(図17)を鋳型とした際に得られる導入断片は4,562bpとなる。

Parietichytrium sp. SEK358株をGY培地中で1~2日間培養し、対数増殖期にある細胞を遺伝子導入に使用した。OD600 = 1~2相当分の細胞に対し、0.625 μ gのDNA断片を遺伝子銃法(マイクロキャリア:0.6 micronの金粒子、target distance:6 cm、chamber vacuum:26 mm Hg、Rupture disk:1,550 PSI)により導入した。遺伝子導入した細胞は24時間のリカバリータイムの後、1 mg/ml G418 含有PDA寒天平板培地に塗布した。この結果、1撃ちこみあたり0から2個の薬剤耐性株を得た。

[0058] [実施例 5 - 2] $\Delta 4$ デサチュラーゼ遺伝子ジーンターゲットング相同組換え体の同定

実施例 2 - 2 記載の方法で、Parietichytrium sp. SEK358株および $\Delta 4$ デサチュラーゼ遺伝子破壊株よりゲノムDNAを抽出後、A260/280を測定しDNA濃度を算出した。これを鋳型にし、PrimeSTAR GXL DNA polymerase (タカラバイオ社製)を用いてゲノム構造確認のPCRを行った。用いたprimerの位置、増幅に用いる組み合わせ、増幅産物の予想サイズは図 1 8 (相同領域内)、図 2 6 (相同領域外) に示した。相同組み換え領域内に設計したプライマーセットで、Parietichytrium sp. SEK358株では3,046 bp、 $\Delta 4$ デサチュラーゼ遺伝子破壊株では2,605 bpが増幅される。[RH0251: 20 mer: 5' - GTG GTC GAA G TG GAG TAT CT -3' (配列番号49)、RH0252: 20 mer: 5' - ACT CGC CAT ACA ACT TTA CA -3' (配列番号50)]。相同組み換え領域外に設計したプライマーセットで、Parietichytrium sp. SEK358株では5,231 bp、 $\Delta 4$ デサチュラーゼ遺伝子破壊株では4,790 bpが増幅される。[HG032: 25 mer: 5' - CGG AGC TCG GAG AAC AAC ATA GAA G -3' (配列番号51)、HG033: 23 mer: 5' - GTG CAA CCA GGT GGC AAG ATT GT -3' (配列番号52)]。

その結果、野生型アリル (Wt allele) 由来の増幅がなく、 $\Delta 4$ デサチュラーゼ遺伝子K0型アリル (NeoR allele) 由来の増幅がある $\Delta 4$ デサチュラーゼ遺伝子破壊株株が得られた (図 2 7 レーン 4、図 2 8 レーン 4 : $\Delta 4$ デサチュラーゼK0変異株)。

[0059] [実施例 5 - 3] $\Delta 4$ デサチュラーゼ遺伝子破壊による脂肪酸組成の変化

実施例 2 - 9 記載の方法に準じてParietichytrium sp. SEK358株野生株やその $\Delta 4$ デサチュラーゼ遺伝子破壊株 (SEK358 delta4 des. K0変異株) を培養、凍結乾燥後、脂肪酸をメチルエステル化し、GCを用いて解析した。培養には実施例 1 記載のGY液体培地にビタミン溶液 (vitamin B₁ 200mg, vitamin B₂ 1mg, vitamin B₁₂ 1mgを蒸留水100mLに溶解) を0.1%、微量元素溶液 (EDTA disodium salt 30.0g, FeCl₃ · 6H₂O 1.45g, H₂BO₃ 34.2g, MnCl₂ · 4H₂O 4.3g, Zn Cl₂ 1.335g, CoCl₂ · 6H₂O 0.13g, NiSO₄ · 6H₂O 0.26g, CuSO₄ · 5H₂O 0.01g, Na₂M

oO₄・2H₂O 0.025gを蒸留水1Lに溶解)を0.2%となるよう添加した培地を用いた。GC解析にはガスクロマトグラフGC-2014(島津製作所社製)を使用し、カラム:HR-SS-10(30 m x 0.25 mm;信和化工社製)、カラム温度:150°C → (2°C/min) → 220°C (10 min)、キャリアガス:He (1.3 mL/min)の条件で測定を行った。

分析結果のチャートを図29、その拡大図を図30に示す。また、図29のチャートを数値化したものを、図31の表に示す。この表は、Parietichytrium sp. SEK358野生株とそのΔ4デサチュラーゼ遺伝子破壊株の脂肪酸組成の比較を表しており、全脂肪酸組成のうちARA3.03%, DGLA1.35%, ETA0.03%, EPA1.10%, n-6DPA0.00%, DHA0.00%を示している。GC面積でLA/EPAの値4.2, GLA/EPAの値0.71, DTA/EPAの値7.19, DTA/ARAの値2.60, DTA/DGLAの値5.85, DGLA/LAの値0.29, ARA/LAの値0.66, EPA/LAの値0.24, DTA/LAの値1.71, DGLA/GLAの値1.72, ARA/GLAの値3.87, C20PUFA/C22PUFAの値0.42, n-6PUFA/n-3PUFAの値2.0を示している。

この結果、Parietichytrium sp. SEK358株においてΔ4デサチュラーゼ遺伝子を破壊すると、DHAやDPA n-6をほとんど生合成できなくなり、逆にそれらの基質であるDPA n-3やDTAが増加することが明らかになった。

このように、PUFA-PKS経路を有さないラビリンチュラ類であるParietichytrium sp. SEK358を選択することにより、PUFA-PKS経路の遺伝子破壊を行うことなくDHA、DPA n-6以外のPUFAを蓄積する株を作出することができた。この株をDPA n-3および/またはDTA生産株として利用しても良いし、さらなるエロンガーゼやデサチュラーゼの遺伝子破壊や遺伝子導入により、所望のPUFA生産株を作出することもできる。

実施例 6

[0060] [Parietichytrium sp. SEK571のC20エロンガーゼ遺伝子の破壊および形質転換株が生産する脂質の脂肪酸組成の測定]

[実施例6-1] Parietichytrium sp. SEK571株へのC20エロンガーゼ遺伝子ターゲティングベクター導入

実施例 2 - 6 記載 pRH85 (図 9) で作製したターゲティングベクターを鋳型に、RH0153 (実施例 2 - 4 記載、配列番号 24) および RH0154 (実施例 2 - 4 記載、配列番号 25) を primer として用いて、PrimeSTAR Max DNA polymerase (タカラバイオ社製) により遺伝子を増幅した。[PCR cycles: 98°C 2min/ 98°C 30 sec, 68°C 2 min, 30 cycles/ 68°C 2min]。フェノールクロロホルム抽出、クロロホルム抽出後、DNA をエタノール沈殿させ、沈殿を 0.1×TE に溶解した。A260/280 を測定し DNA 濃度を算出した。実施例 2 - 6 記載 pRH85 (図 9) を鋳型とした際に得られる導入断片は 2661 bp で、Parietichytrium 属 C20 エロンガーゼ遺伝子前半 - SV40 terminator 配列 - 人工合成ネオマイシン耐性遺伝子配列 - ubiquitin promoter 配列 - Parietichytrium 属 C20 エロンガーゼ遺伝子後半 という並びになる (実施例 2 - 7 記載、配列番号 31)。

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

[0061] [実施例 6 - 2] C20 エロンガーゼ遺伝子ジーンターゲティング相同組換え体の同定

実施例 2 - 2 記載の方法で、Parietichytrium sp. SEK571 株、および、C20 エロンガーゼ遺伝子破壊株よりゲノム DNA を抽出後、A260/280 を測定し DNA 濃度を算出した。これを鋳型にし、MightyAmp DNA polymerase (タカラバイオ社製) を用いてゲノム構造確認の PCR を行った。用いた primer の位置、増幅に用いる組み合わせ、増幅産物の予想サイズは実施例 2 - 8 記載、図 10 に示した。

RH0184 (実施例 2 - 8 記載。配列番号 37) は C20 エロンガーゼ上流、RH0185 (実施例 2 - 8 記載。配列番号 38) は下流、RH0142 (実施例 2 - 8 記載。配

列番号35) およびRH0143 (実施例2-8記載。配列番号36) は人工合成ネオマイシン耐性遺伝子上に、それぞれ設定した。[PCR cycles: 98°C 2min/ 98°C 10 sec, 68°C 2 min, 30 cycles/ 68°C 7min]。

野生型アリル (Wt allele) に増幅がなく、人工合成ネオマイシン耐性遺伝子アリル (NeoR allele) に増幅があるC20 エロンガーゼ遺伝子破壊株が得られた (図32)。

[0062] [実施例6-3] C20エロンガーゼ遺伝子破壊による脂肪酸組成の変化

実施例2-9記載の方法で Parietichytrium sp. SEK571株やその遺伝子破壊株 (C20エロンガーゼ遺伝子ノックアウト株、C20 KO) を培養、凍結乾燥後、脂肪酸をメチルエステル化し、GCを用いて解析した。GC解析にはガスクロマトグラフGC-2014 (島津製作所社製) を使用し、カラム: HR-SS-10 (30 m x 0.25 mm; 信和化工社製)、カラム温度: 150°C → (5°C/min) → 220°C (10 min)、キャリアガス: He (1.3 mL/min) の条件で行った。

脂肪酸組成の変化を図33に示す。また、図34に野生型株を100%とした時の割合を示す。

全脂肪酸組成のうちARA13.24%, DGLA1.93%, ETA 1.14%, EPA29.58%, n-6DPA 0.96%, DHA1, 17%を示している。GC面積でLA/DHAの値1.5, GLA/ DHAの値0.9, DGLA/DHAの値1.65, ARA/DHAの値11.3, EPA/DHAの値25.3, LA/EPAの値0.06, GLA/EPAの値0.04, DTA/EPAの値0.01, DTA/ARAの値0.01, DTA/DGLAの値0.08, LA/n-6DPAの値1.8, GLA/n-6DPAの値1.1, DGLA/n-6DPAの値2.0, ARA/n-6DPAの値13.8, EPA/n-6DPAの値30.8, DGLA/LAの値1.1, ARA/LAの値7.8, EPA/LAの値17.4, DTA/LAの値0.09, DGLA/GLAの値1.8, ARA/GLAの値12.4, n-6DPA/DTAの値6.4, DHA/n-3DPAの値4.7, C20PUFA/C22PUFAの値18.1, n-6PUFA/n-3PUFAの値0.51を示している。

この結果、Parietichytrium sp. SEK571株においてC20エロンガーゼ遺伝子をノックアウトすると、炭素鎖長22以上の脂肪酸が減少し、炭素鎖長20の脂肪酸が増加した。具体的には、アラキドン酸が約4倍、EPAが約8倍に増加し、またDPAが約1/12、DHAが約1/12に減少した。

このように、Parietichytrium sp. SEK571 はPUFA-PKS経路によるPUFA生産

能が無いあるいは極めて微弱であることが明らかになり、このようなラビリントンチュラ類を選択することにより、PUFA-PKS経路の遺伝子破壊を行うことなくDHA、DPA n-6以外のPUFAを蓄積する株を作出することができた。この株をEPAおよび/またはARA生産株として利用しても良いし、さらなるエロンガーゼやデサチュラーゼの遺伝子破壊や遺伝子導入により、所望のPUFA生産株を作出することもできる。

[0063] [比較例 1]

[*Thraustochytrium aureum* ATCC34304のC20エロンガーゼ遺伝子の破壊および形質転換株が生産する脂質の脂肪酸組成の測定]

[比較例 1 - 1] *I. aureum* ATCC34304由来total RNAの抽出、およびmRNAの精製

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

[0064] [比較例 1 - 2] RACE法による*I. aureum* ATCC34304由来エロンガーゼ遺伝子

の単離

エロンガーゼ遺伝子に高度に保存されるヒスチジン・ボックス (His box) を標的として、正方向 (elo-F ; 5' - TTY YTN CAY GTN TAY CAY CAY -3') (配列番号53)、および逆方向 (elo-R ; 5' - GCR TGR TGR TAN ACR TGN ARR AA -3') (配列番号54) の縮重オリゴヌクレオチドを合成した。オリゴヌクレオチドの合成は、DNA合成機 (Applied Biosystems社製) を用いて行った。次に、SMART™ RACE cDNA Amplification Kit (clontech社製) を使用して、添付のマニュアルに従って3' および5' 末端に合成アダプターを付加した3' - および5' -RACE cDNAライブラリそれぞれを作製した。それらを鋳型として、合成アダプター特異的なオリゴヌクレオチド、および前述した縮重オリゴヌクレオチドelo-Fおよびelo-Rを用いた3' -および5' -RACE [PCR cycles: 94 °C 1 min/94°C 30 sec, 60°C 30 sec, 72°C 3 min, 30 cycles/72°C 10 min/4°C ∞] を行ったところ、特異的に増幅した3' -および5' -RACE産物のバンドが確認された (図35)。次に、該当RACE産物全量を1%アガロースゲルによる電気泳動に供し、分離したDNA断片を清浄なカッター等で切り出し、非特許文献10記載の方法に従ってアガロースゲルからDNA断片を抽出した。次に、pGEM-T easy Vector (Promega社製) を使用して該当DNA断片のTAクローニングを行い、Sangerらの方法 (非特許文献11) によってそれらの塩基配列を決定した。具体的には、BigDye (登録商標) Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kitおよび3130ジェネティックアナライザ (Applied Biosystems社製) を使用し、添付マニュアルに従ったダイターミネーター法による塩基配列決定を行った。

その結果、3' -RACE産物においてはelo1 (配列番号55) およびelo2 (配列番号56) と名付けた190 bpおよび210 bpの2種の配列、5' -RACE産物においてはelo3 (配列番号57) と名付けた200 bpの1種の配列の同定に成功した。これらelo1、elo2、およびelo3の配列は、種々のエロンガーゼ遺伝子の配列と有意な相同性を示すことから、*I. aureum* ATCC 34304由来エロンガーゼ遺伝子の部分配列であることが示唆された。更に、elo1、elo2、およびelo3それぞれ

に関して再度オリゴヌクレオチドプライマーを設計し、RACEによるcDNA配列の取得を試みた。以下に作製したオリゴヌクレオチドプライマーを示す。elo1正方向オリゴヌクレオチドプライマー(e1o1-F1 ; 5' - TAT GAT CGC CAA GTA CGC CCC -3') (配列番号58) および逆方向オリゴヌクレオチドプライマー(e1o1-R1 ; 5' - GAA CTG CGT CAT CTG CAG CGA -3') (配列番号59)、elo2正方向オリゴヌクレオチドプライマー(e1o2-F1 ; 5' - TCT CGC CCT CGA CCA CC A AC -3') (配列番号60) および逆方向オリゴヌクレオチドプライマー (elo2-R1 ; 5' - CGG TGA CCG AGT TGA GGT AGC C -3') (配列番号61)、elo3正方向オリゴヌクレオチドプライマー(e1o3-F1 ; 5' - CAA CCC TTT CGG CCT CAA CAA G -3') (配列番号62) および逆方向オリゴヌクレオチドプライマー (elo3-R1 ; 5' - TTC TTG AGG ATC ATC ATG AAC GTG TC -3') (配列番号63)。

作製した正方向および逆方向オリゴヌクレオチドプライマーを用いて、前述に記載した方法と同様に、RACEおよび該増幅産物の塩基配列解析を行った。その結果、elo1に関しては特異的に増幅した3' -および5' -RACE産物が得られ、それらの重複部分が完全に一致することから、1,139 bpのelo1 cDNA配列(配列番号64)であることが明らかになった。同様に、elo3についても特異的に増幅した3' -および5' -RACE産物が得られ、それらの重複部分が完全に一致することから、1,261 bpのelo3 cDNA配列(配列番号65)であることが明らかになった。

配列解析の結果、elo1は275アミノ酸残基(配列番号66)をコードする825 bpの翻訳領域(配列番号67)から成り、BLAST検索の結果、種々のエロンガーゼ遺伝子と有意な相同性を示すのみならず、公知のI. aureum由来推定Δ5エロンガーゼ遺伝子の配列(NCBI accession No. CS486301)と完全に一致することが分かった。一方、elo3は317アミノ酸残基(配列番号: 68)をコードする951 bpの翻訳領域(配列番号: 69)から成ることが推定され、BLAST検索の結果、種々のエロンガーゼ遺伝子と有意な相同性を示すことから、I. aureum ATCC 34304由来推定エロンガーゼ遺伝子であることが確認された。尚、両遺伝子の推定アミノ酸配列中には、エロンガーゼ遺伝子に高度に保存されるHis

boxが見出された。以上の結果を受けて、elo1およびelo3遺伝子をI. aureum ATCC 34304由来推定エロンガーゼ遺伝子とし、それぞれをTaEL01、TaEL02と命名した。

[0065] [比較例 1 - 3] 出芽酵母Saccharomyces cerevisiaeを宿主としたTaEL01およびTaEL02の発現と、遺伝子導入株の脂肪酸組成の解析

TaEL01およびTaEL02を出芽酵母S. cerevisiaeを宿主として発現させるために、それぞれの発現ベクターを構築した。以降にその概略を示す。TaEL01の翻訳領域の配列を元に、1対のオリゴヌクレオチドプライマー（E1 HindIII ; 5' - ATA AGC TTA AAA TGT CTA GCA ACA TGA GCG CGT GGG GC -3' ）（配列番号70）および（E1 XbaI ; 5' - TGT CTA GAA CGC GCG GAC GGT CGC GAA A -3' ）（配列番号71）を作製した。E1 HindIIIは正方向オリゴヌクレオチドプライマーであり、5' 末端に制限酵素HindIII部位（AAGCTT）を有する。また、酵母のコンセンサス配列（（A/Y）A（A/U）A AUG UCU ; 下線部は開始コドン）（非特許文献 1 2）を参考に、TaEL01の開始コドン近傍の配列を改変している。E1 XbaIは逆方向オリゴヌクレオチドプライマーであり、5' 末端にXbaI部位（TCTAGA）を有する。

同様に、TaEL02の翻訳領域の配列を元に1対のオリゴヌクレオチドプライマー（E2 HindIII ; 5' - TAA AGC TTA AAA TGT CTA CGC GCA CCT CGA AGA GCG CTC C -3' ）（配列番号72）および（E2 XbaI ; 5' - CAT CTA GAC TCG GAC TTG GTG GGG GCG CTT G -3' ）（配列番号73）を作製した。E2 HindIIIは正方向オリゴヌクレオチドプライマーであり、5' 末端に制限酵素HindIII部位を有する。また、酵母のコンセンサス配列を参考に、TaEL02の開始コドン近傍の配列を改変している。E2 XbaIは逆方向オリゴヌクレオチドプライマーであり、5' 末端にXbaI部位を有する。

以上の2種のオリゴヌクレオチドプライマー対を用いて、比較例 1 - 2 記載の5' -RACE cDNAライブラリを鋳型にPCRを行い、5' 末端に制限酵素HindII、3' 末端に制限酵素XbaIサイトを有し、開始コドン近傍が酵母のコンセンサス配列に改変された949 bpのTaEL01翻訳領域（配列番号74）、および967 bpのT

aEL02翻訳領域（配列番号75）を増幅した。尚、PCR酵素は伸長ミス为了避免のために校正活性の高いPrimeSTAR(登録商標) DNA polymerase（タカラバイオ社製）を使用した [PCR cycles: 98°C 2 min/98°C 5 sec, 60°C 5 sec, 72°C 1.5 min, 30 cycles/72°C 7 min/4°C ∞]。

次に、増幅したPCR産物を1%アガロースゲルにて分離後、該DNA断片を切り出しアガロースゲルから抽出した。さらに、制限酵素HindIIIおよびXbaIで処理した後に再度アガロースゲルを用いた精製を行い、制限酵素HindIIIおよびXbaI処理により直鎖化した出芽酵母用発現ベクターpYES2/CT（invitrogen社製）に、DNA Ligation Kit <Mighty Mix>（タカラバイオ社製）を使用して連結することで環状化ベクターを構築した。また塩基配列を解析することで、pYES2/CTに導入したTaEL01およびTaEL02翻訳領域の配列に、PCR伸長ミスによる変異が導入されていないことを確認した。以上の結果により、TaEL01の発現ベクターpYEEL01、およびTaEL02の発現ベクターpYEEL02の構築に成功した。

構築した2種の発現ベクター、およびpYES2/CTを非特許文献13および非特許文献14記載の方法に従い、酢酸リチウム法によって出芽酵母*S. cerevisiae*に導入し形質転換体の選別を行った。次に、得た形質転換体（pYEEL01導入株、pYEEL02導入株、およびmock導入株）をQiuらの方法（非特許文献15）に準じて培養し、菌体由来脂肪酸の抽出とメチルエステル化を行った。ただし、培地にはΔ9エロンガーゼの基質としてα-linolenic acid (ALA, C18:3Δ9, 12, 15) およびlinoleic acid (LA, C18:2Δ9, 12) を、Δ6エロンガーゼの基質としてstearidonic acid (STA, C18:4Δ6, 9, 12, 15) およびγ-linolenic acid (GLA, C18:3Δ6, 9, 12) を、Δ5エロンガーゼの基質として、eicosapentaenoic acid (EPA, C20:5Δ5, 8, 11, 14, 17) および arachidonic acid (AA, C20:4Δ5, 8, 11, 14) を、それぞれ終濃度で0.2 mM添加した上で培養を行っている。引き続き、Abeらの方法（非特許文献16）に従い、メチルエステル化脂肪酸のガスクロマトグラフィー（GC）解析を行った。GC解析にはガスクロマトグラフGC-2014（島津製作所社製）を使用し、カラム：

HR-SS-10 (30 m x 0.25 mm ; 信和化工社製) 、カラム温度 : 150°C → (5°C/min) → 220°C (10 min) 、キャリアガス : He (1.3 mL/min) の条件で行った。

その結果、pYEEL01導入株においては、ステアリドン酸 (STA) をエイコサテトラエン酸 (ETA, C20:4 Δ 8, 11, 14, 17)に、 γ -リノレン酸 (GLA) をジホモ γ -リノレン酸(DGLA, C20:3 Δ 8, 11, 14) にそれぞれ変換する、宿主 (mock導入株) にはない Δ 6エロンガーゼ活性を示す一方で、 α -リノレン酸 (ALA) をエイコサテトリエン酸(ETrA, C20:3 Δ 11, 14, 17)に、リノール酸 (LA) をエイコサジエン酸(EDA, C20:3 Δ 11, 14) にそれぞれ変換する Δ 9エロンガーゼ活性、エイコサペンタエン酸 (EPA) を ω 3ドコサペンタエン酸(ω 3DPA, C22:5 Δ 7, 10, 13, 16, 19)に、アラキドン酸 (ARA) をドコサテトラエン酸 (DTA, C22:4 Δ 7, 10, 13, 16) にそれぞれ変換する Δ 5エロンガーゼ (=C20エロンガーゼ) 活性をも示すことが分かった (表1)。

またpYEEL02導入株においては、EPAを ω 3 DPA (C22:5 Δ 7, 10, 13, 16, 19)、ARAをDTAに変換する、宿主にはない Δ 5エロンガーゼ (=C20エロンガーゼ) 活性を示す一方で、STAをETA、GLAをDGLAに変換する僅かな Δ 6エロンガーゼ活性を示すことが分かった (表1)。以上の結果により、TaEL01は Δ 6/ Δ 9/ Δ 5エロンガーゼであり、TaEL02は Δ 5/ Δ 6エロンガーゼであることが確認された。

[0066] [表1]

LA添加 (0.2 mM)				ALA添加 (0.2 mM)			
	mock	TaEL01	TaEL02		mock	TaEL01	TaEL02
LA	39.5	23.5	36.3	ALA	49.1	25.8	47.1
EDA	0.2	8.9	0.2	ETrA	0.2	17.9	0.2
変換効率 (%)		27.4		変換効率 (%)		41	
GLA添加 (0.2 mM)				STA添加 (0.2 mM)			
	mock	TaEL01	TaEL02		mock	TaEL01	TaEL02
GLA	34.0	7.8	35.6	STA	46.2	8.2	46.5
DGLA	0.2	29.0	0.8	ETA	0.3	28.1	1.7
変換効率 (%)		79.3	1.9	変換効率 (%)		77.2	4.6
ARA添加 (0.2 mM)				EPA添加 (0.2 mM)			
	mock	TaEL01	TaEL02		mock	TaEL01	TaEL02
ARA	30.9	23.2	8.6	EPA	42.0	31.2	13.1
DTA	0	5.8	13.8	DPA	0.1	16.6	24.5
変換効率 (%)		20.1	66.3	変換効率 (%)		25.3	65.1

変換効率 (%) = 100 x product (area) / substrate (area) + product (area) (n=1)

[0067] [比較例 1 - 4] PCRゲノムウォーキング法によるTaEL02 ORF上流および下流領域の取得

TaEL02を破壊するためのターゲッティングベクターにおいて、相同組換え部位となるTaEL02 ORF上流および下流領域の取得を、PCRゲノムウォーキング法によって行った。以下その概要を示す。

GY 液体培地を用いた培養3日目の*I. aureum* ATCC 34304菌体を液体窒素で急速凍結して乳鉢中で粉末状になるまで搗り潰し、非特許文献 17 に記載の方法に従ってゲノムDNAを抽出後に適量のTEに溶解した。ゲノムDNAの量と純度の検定は、0.D.260および0.D.280測定によって行った。次に、TaKaRa LA PCR™ in vitro Cloning Kit (タカラバイオ社製)を用いて、添付のプロトコールに従い各種制限酵素で切断したゲノムDNAに、制限酵素サイトを有するカセット配列を付加したゲノムDNAライブラリを構築した。次に、作製したゲノムDNAライブラリを鋳型にして、TaEL02の配列を元に作製した正方向オリゴヌクレオチドプライマーE2 XbaI (比較例 1 - 3 記載。配列番号73) およびelo3-F1 (比較例 1 - 2 記載。配列番号62)、もしくは逆方向オリゴヌクレオチドプライマーE2 HindIII (比較例 1 - 3 記載。配列番号72) およびelo3-R1 (比較例 1 - 2 記載。配列番号63) を使用して、キット付属のカセット配列に相補的なオリゴヌクレオチドプライマーと共に添付のプロトコールに従ったnested PCRを行った。その結果、1,122 bpのTaEL02 ORF上流配列 (配列番号76)、および1,204 bpのTaEL02 ORF下流配列 (配列番号77) の取得に成功した。

[0068] [比較例 1 - 5] Neorを選択マーカーとしたTaEL02ターゲッティングベクターの構築

fusion PCRによってTaEL02 ORF上流配列/人工合成Neor/ TaEL02 ORF下流配列を連結したDNA断片を作製した。使用したオリゴヌクレオチドプライマーを以下に示す。

・K0 Pro F SmaI (31 mer: 5' - CTC CCG GGT GGA CCT AGC GCG TGT GTC ACC

T-3') (配列番号78)

・Pro R (25 mer: 5' -GGT CGC GTT TAC AAA GCA GCG CAG C -3') (配列番号79)

・SNeo F (52 mer; 5' - GCT GCG CTG CTT TGT AAA CGC GAC CAT GAT TGA AC A GGA CGG CCT TCA CGC T -3') (配列番号80)

・SNeo R (52 mer; 5' -TCG GGA GCC AGC CGG AAA CAG GTT CAA AAG AAC TCG TCC AGG AGG CGG TAG A-3') (配列番号81)

・Term F (23 mer: 5' - ACC TGT TTC CGG CTG GCT CCC GA -3') (配列番号: 82)

・K0 Term R SmaI (27 mer: 5' - ATC CCG GGG CCG AGA ACG GGG TCG CCC -3') (配列番号83)

これらのオリゴヌクレオチドプライマーのうち、K0 Pro F SmaI/ Pro Rは比較例1-4に記載したI. aureum ATCC 34304ゲノムDNAを鋳型にしたTaEL02 ORF上流配列の増幅、SNeo F/SNeo Rは人工合成Neorを鋳型にした人工合成Neorの増幅、Term F/ K0 Term R SmaIは比較例1-4に記載したI. aureum ATCC 34304ゲノムDNAを鋳型にしたTaEL02 ORF下流配列の増幅に使用した。尚、PCR反応条件は変性温度を98℃10秒とし、アニーリングおよび伸長反応はプライマーのTmおよび増幅産物の長さによって適宜調節して行った。

その結果、2,696 bp (配列番号84) のTaEL02 ORF上流配列/人工合成Neor/ TaEL02 ORF下流配列の連結に成功し、これをpGEM-T easy Vector (Promega社製) を使用してTAクローン化したものをノックアウトベクターとし、pTK0Neorと名付けた。

[0069] [比較例1-6] I. aureum ATCC34304へのTK0Neorの導入

比較例1-5で作製した人工合成Neorを選択マーカーとしたTaEL02ターゲティングベクター、pTK0Neorを鋳型とし、1対のオリゴヌクレオチドプライマーK0 Pro F SmaI (比較例1-5、配列番号78) /K0 Term R SmaI (比較例1-5、配列番号83)、およびPrimeSTAR(登録商標) HS DNA polymerase (タカラバイオ社製) を用いて、TaEL02 ORF上流配列/人工合成Neor/ TaEL02 ORF下

流配列を増幅し [PCR cycles: 98°C 2 min/98°C 10 sec, 68°C 3 min, 30 cycles/68°C 10 min/4°C ∞]、1%アガロースゲルを用いた電気泳動後に該DNA断片を抽出し、エタノール沈殿後に適量のTEに溶解した。DNA断片の量と純度の検定は、0.D.260および0.D.280測定によって行った。得られたDNA断片を、以降TK0Neorと呼称する。

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

[0070] [比較例 1 - 7] TK0Neorを導入した形質転換体のゲノムDNAを鋳型としたPCR

形質転換体7コロニーを爪楊枝で釣菌後に、0.5 mg/ml G418 (ナカライテスク社製)を含有するGY液体培地に植菌した。複数回継代後に、比較例 1 - 4 記載の方法で菌体からゲノムDNAを抽出し、エタノール沈殿後に適量のTEに溶解した。抽出したゲノムDNAの量と純度の検定は0.D.260および0.D.280測定によって行った。次に、得た形質転換体および野生株のゲノムDNAを鋳型として、様々なオリゴヌクレオチドプライマー対を用いてPCRを行った。使用したオリゴヌクレオチドプライマー対は、

(1)Neor検出 - Sneo F (比較例 1 - 5 記載。配列番号80) およびSNeo R (比較例 1 - 5 記載。配列番号81)

(2)K0確認1 - K0 Pro F SmaI (比較例 1 - 5 記載。配列番号78) およびK0 Te

rm R SmaI (比較例 1 - 5 記載。配列番号83)

(3)K0確認2 - E2 K0 ProF EcoRV(30 mer: 5' - GGA TAT CCC CCG CGA GGC GA
T GGC TGC TCC -3') (配列番号85)およびSNeo R (比較例 1 - 5 記載。配列
番号81)

(4)K0確認3 - Sneo F (比較例 1 - 5 記載。配列番号80)およびE2 K0 Term R
EcoRV (30 mer: 5' - TGA TAT CGG GCC GCG CCC TGG GCC GTA GAT -3') (配
列番号86)

(5)TaEL02増幅 - E2 HindIII (比較例 1 - 3 記載。配列番号72) およびE2 Xb
aI (比較例 1 - 3 記載。配列番号73)

である (図 3 6 A)。

その結果、解析した7クローンのうち6クローンはランダムインテグレーションによる形質転換体であったが、1クローンは相同組換えによってTaEL02 0
RFがNeorへ置き換わっていることが確認された (図 3 6 B, レーン9, 13)。し
かし同時に、TaEL02 0RFが増幅する (図 3 6 B, レーン17) ことが分かった。
以上のことから、*I. aureum* ATCC 34304は2倍体以上であるか、もしくはTaEL
02がマルチコピー遺伝子である可能性が示唆された。

[0071] [比較例 1 - 8] サザンブロッティングによるTaEL02のコピー数の確認

以下の実験は「DIG説明書集[日本語版] 8th, Roche Applied Science」 (非特許文献 1 8) 記載の方法に準じて行った。すなわち、野生株のゲノムDNAを各種制限酵素で切断後、1 レーンあたり2.5 μ gずつ0.7% のSeaKem(登録商標) GTG™ agarose (タカラバイオ社製) を使用した電気泳動に供した。これをナイロンメンブラン (Hybond™-N+, GEヘルスケア社製) にトランスファーし、PCR DIG Probe Synthesis Kit(Roche Applied Science社製) を使用して作製したDIGラベルプローブと48 °C、16 hr でハイブリダイズさせた。DIGラベルプローブ作製に用いた1対のオリゴヌクレオチドプライマーは、TaEL02 det F (25 mer: 5' - GTA CGT GCT CGG TGT GAT GCT GCT C -3') (配列番号87) およびTaEL02 det R (24 mer: 5' - GCG GCG TCC GAA CAG GTA GAG CA T-3') (配列番号88) である[PCR cycles: 98°C 2min/ 98°C 30 sec, 65°C 3

0 sec, 72°C 1 min, 30 cycles/ 72°C 7 min/4°C ∞]。ハイブリダイズしたプローブの検出は発色法（NBT/BCIP溶液）を用いて行った。

その結果、各種制限酵素で処理したレーン全てにシングルバンドが検出されることから（図37）、TaEL02はシングルコピー遺伝子であることが示された。このことから、*I. aureum* ATCC 34304が2倍体以上であることが示唆された。

[0072] [比較例1－9] TK0Neorを遺伝子導入した形質転換体のサザンブロッティングによる評価

比較例1－8記載の方法でサザンブロッティングを行った。すなわち、1対のオリゴヌクレオチドプライマーuprobe F（35 mer: 5' - ATC CGC GTA TAT ATC CGT AAA CAA CGG AAC ATT CT-3'）（配列番号89）およびuprobe R（26 mer: 5' -CTT CGG GTG GAT CAG CGA GCG ACA GC-3'）（配列番号90）を用いてPCR [PCR cycles: 98°C 2min/ 98°C 30 sec, 65°C 30 sec, 72°C 1 min, 30 cycles/ 72°C 7 min/4°C ∞] で増幅したDIGラベルプローブを用いて、EcoRVおよびPstIで消化した野生株と形質転換体のゲノムDNAに対する発色法（NBT/BCIP溶液）を用いたサザンブロッティングを行った。この場合、野生型アリルでは約1.2 kbpのDNA断片が検出されるが、相同組換えによってTaEL02 ORFがNeorへ置き換わっている変異アリルでは、約2.5 kbpのDNA断片が検出される（図38A）。

解析の結果、形質転換体においては変異アリルと同時に野生型アリルのバンドも検出される（図38B）ことから、*I. aureum* ATCC 34304は2倍体以上であることが示された。

[0073] [比較例1－10] Hygrを選択マーカーとしたTaEL02ターゲティングベクターの構築

残存した野生型アリルを破壊するために、Hygrを選択マーカーとしたTaEL02ターゲティングベクターの構築を行った。

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

以下に示す。

・ ubi-600p F (27 mer: 5' - GCC GCA GCG CCT GGT GCA CCC GCC GGG-3') (配列番号91)

・ ubi-hygro R (59 mer: 5' -TCG CGGG TGA GTT CAG GCT TTT TCA TGT TGG CTA GTG TTG CTT AGG TCG CTT GCT GCT G-3') (配列番号92)

・ ubi-hygro F (57 mer; 5' -AGC GAC CTA AGC AAC ACT AGGC CAA CAT GAA AAA GCC TGA ACT CAC CGC GAC GTC TG-3') (配列番号93)

・ hygro R (29 mer; 5' -CTA TTC CTT TGC CCT CGG ACG AGT GCT GG-3') (配列番号94)

これらのオリゴヌクレオチドプライマーのうち、ubi-600p F/ubi-hygro R は比較例 1 - 4 に記載した *I. aureum* ATCC 34304 ゲノム DNA を鋳型にした *I. aureum* ATCC 34304 由来 ユビキチンプロモーター配列の増幅に使用した。ubi-hygro F/ hygro R は pcDNA 3.1 Zeo (Invitrogen) を鋳型にした人工合成 Hygr の増幅に使用した。尚、PCR 反応条件は変性温度を 98°C 10 秒とし、アニーリングおよび伸長反応はプライマーの T_m および増幅産物の長さによって適宜調節して行った。

その結果、1,636 bp (配列番号95) の *I. aureum* ATCC 34304 由来 ユビキチンプロモーター配列/ Hygr の連結に成功し、これを pGEM-T easy Vector (Promega 社製) を使用して TA クローン化したものを pTub600Hygr と名付けた。

続いて、pTub600Hygr を鋳型とし、PrimeSTAR HS DNA polymerase (タカラバイオ社製) を使用して、1 対のオリゴヌクレオチドプライマー ubi-600p F NheI (33 mer: 5' -GTG CTA GCC GCA GCG CCT GGT GCA CCC GCC GGG-3') (配列番号96) および hygro R XbaI (37 mer: 5' -GTT CTA GAC TAT TCC TTT GCC CTC GGA CGA GTG CTG G-3') (配列番号97) を用いて PCR [PCR cycles: 98°C 2min/ 98°C 10 sec, 68°C 3 min, 30 cycles/ 68°C 10 min/4°C ∞] を行い、5' 末端に NheI、3' 末端に XbaI サイトを付加した *I. aureum* ATCC 34304 由来 ユビキチンプロモーター配列/ Hygr DNA 断片を調製した。また、比較例 1 - 5 記載の pTK0Neor を鋳型とし、PrimeSTAR HS DNA polymerase (タカラバ

イオ社製) を使用して、1対のオリゴヌクレオチドプライマーK0 vec F XbaI (37 mer: 5' -GTT CTA GAC CTG TTT CCG GCT GGC TCC CGA GCC ATG C -3') (配列番号98) およびK0 vec R NheI (40 mer: 5' -GTG CTA GCG GTC GCG TTT ACA AAG CAG CGC AGC AAC AGA A -3') (配列番号99) を用いてPCR [PCR cycles: 98°C 2min/ 98°C 10 sec, 68°C 3 min, 30 cycles/ 68°C 10 min/4°C ∞] を行い、比較例1－5記載の pTK0NeorのNeorを除去し3' 末端にNheI、5' 末端にXbaIサイトを付加した直鎖状ベクターを調製した。両DNA断片を制限酵素NheIおよびXbaIで消化後にアガロースゲルを用いた精製を行い、Ligation Convenience Kit (ニッポンジーン社製) を用いて環状ベクターを構築した。

構築したHygrを選択マーカーとしたTaEL02ターゲティングベクターは、p GEM-T easy Vector (Promega社製) を基本骨格とし、挿入配列として3,537 bp (配列番号100)のTaEL02 ORF上流配列/I. aureum ATCC 34304由来ユビキチンプロモーター配列/ Hygr /TaEL02 ORF下流配列を有している。これをpTK0ub600Hygrと命名した。

[0074] [比較例1－11] K0ub600Hygrの再導入とゲノムDNAを鋳型にしたPCR、サザンブロッティング、RT-PCRによる形質転換体の評価

構築したHygrを選択マーカーとしたTaEL02ターゲティングベクターpTK0ub600Hygr(比較例1－10記載) を鋳型として、1対のオリゴヌクレオチドプライマーK0 Pro F SmaI (比較例1－5、配列番号78) /K0 Term R SmaI (比較例1－5、配列番号83) 、およびPrimeSTAR HS DNA polymerase (タカラバイオ社製) を用いて、TaEL02 ORF上流配列/I. aureum ATCC 34304由来ユビキチンプロモーター配列/ Hygr /TaEL02 ORF下流配列を増幅し[PCR cycles: 98°C 2 min/98°C 10 sec, 68°C 3.5 min, 30 cycles/68°C 10 min/4°C ∞]、得られたDNA断片をK0ub600Hygrと名付けた。これを比較例1－7で得た形質転換体に対して同様の手法で導入し、1 mg/ml G418 (ナカライテスク社製) 含有PDA寒天平板培地上で24時間静置培養後、菌体を回収して1 mg/ml G418 (ナカライテスク社製) および2 mg/ml ハイグロマイシンB (和光純薬工業社製) を

含有するPDA寒天平板培地上で静置培養を続けたところ、多数の形質転換体が得られた（導入効率： 1.02×10^3 cfu/ μ g DNA）。

そのうち50クローンを釣菌し、1 mg/ml G418（ナカライテスク社製）および2 mg/ml ハイグロマイシンB（和光純薬工業社製）含有GY液体培地中で複数回継代培養後に、比較例1－4記載と同様の手法でゲノムDNAを抽出し、エタノール沈殿後に適当量のTEに溶解した。抽出したゲノムDNAの量と純度の検定は0.D.260および0.D.280測定によって行った。次に、得た形質転換体および野生株のゲノムDNAを鋳型として、様々なオリゴヌクレオチドプライマー対を用いてPCR [PCR cycles: 98°C 2 min/98°C 10 sec, 68°C 1 min, 30 cycles/68°C 10 min/4°C ∞] を行った。使用したオリゴヌクレオチドプライマー対は、

(1) TaEL02 ORF検出 - Sneo F（比較例1－5記載。配列番号80）およびSNeo R（比較例1－5記載。配列番号81）、

(2) K0確認 - E2 K0 Pro F EcoRV（比較例1－7記載。配列番号85）および ubi-hygro R（比較例1－10記載。配列番号92）

である（図39A）。

その結果、解析した50クローンのうち、14クローンがTaEL02 ORFを置換する形での相同組み換えを起こした形質転換体であることが示唆された（図39B，矢印）。またそれらのクローンに関しては、TaEL02 ORFが増幅しないこと（図39C）が確認された。

引き続き、比較例1－9記載の手法を用いたサザンブロッティングを行った。すなわち、1対のオリゴヌクレオチドプライマーuprobe F（配列番号89）およびuprobe R（配列番号90）を用いて調製したDIGラベルプローブを用いて、EcoRVおよびPstIで消化した野生株と形質転換体のゲノムDNAに対する発色法（NBT/BCIP溶液）を用いたサザンブロッティングを行った。この場合、野生型アリルでは約1.2 kbpのDNA断片、相同組換えによってTaEL02 ORFがNeorへ置き換わっている変異アリルでは約2.5 kbpのDNA断片、相同組換えによってTaEL02 ORFがHygrへ置き換わっている変異アリルでは約1.9 kbpのDNA断片が

検出される (図 4 OA)。

解析の結果、得た形質転換体では約2.5 kbpの野生型アリのバンドが消失し、代わりにTaEL02 ORFがHygrへ置き換わっている約1.9 kbpの変異アリのバンドが新たに検出された (図 4 OB)。

同様に、1対のオリゴヌクレオチドプライマーTaEL02 probe F (30 mer: 5' - ATG GCG ACG CGC ACC TCG AAG AGC GCT CCG-3') (配列番号101) およびTaEL02 probe R (30 mer: 5' -AGG ATC ATC ATG AAC GTG TCG CTC CAG TCG-3') (配列番号102) を用いて、PCR [PCR cycles: 98°C 2min/ 98°C 30 sec, 65°C 30 sec, 72°C 1 min, 30 cycles/ 72°C 7 min/4°C ∞] でTaEL02を検出するDIGラベルプローブを調製し、EcoRVで消化した野生株と形質転換体 (クローン1, 8, 9, 10) のゲノムDNAに対する発色法 (NBT/BCIP溶液) を用いたザンブロットングを行った。この場合、TaEL02は約2.5 kbpのDNA断片として検出される (図 3 8A)。

解析の結果、野生株ではTaEL02 が検出される (図 4 1, レーン1) のに対し、形質転換体では全く検出されないことが分かった (図 4 1, レーン2-5)。

さらに、TaEL02破壊をmRNAレベルで検証するために、RT-PCRによるTaEL02 mRNAの検出を行った。GY 液体培地を用いた培養3日目の野生株、および形質転換体 (クローン1, 8, 9, 10) の菌体から比較例 1 - 1 の場合と同様にセパゾールRNA I Super (ナカライテスク社製) を使用してtotal RNAを抽出した。引き続き、RNeasy Mini Kit (QIAGEN社製) を使用して添付のプロトコールに従いクリーンアップしたtotal RNA 50 µgを、50 UのRecombinant DNase I (タカラバイオ社製) を使用して37°Cで1時間処理し、コンタミしたゲノムDNAの分解除去を行った。続いて、得たtotal RNAを鋳型として、oligo(dT) primer (Novagen社製) およびPrimeScript Reverse Transcriptase (タカラバイオ社製) を使用し、添付のマニュアルに従い1本鎖cDNAライブラリを調製した。さらに、得た1本鎖cDNAライブラリを鋳型として、1対のオリゴヌクレオチドプライマーE2 HindIII (比較例 1 - 3 記載。配列番号72) およびE2 XbaI (

比較例 1－3 記載。配列番号73)、およびLA Taq Hot Start Version (タカラバイオ社製) を使用し、TaEL02 ORFを増幅 [PCR cycles: 98°C 2 min/98°C 10 sec, 68°C 1 min, 30 cycles/68°C 10 min/4°C ∞]した。

その結果、野生株では検出されるTaEL02 mRNAが (図 4 2, レーン5)、形質転換体(クローン1, 8, 9, 10) では全く検出されないことが分かった(図 4 2, レーン1-4)。

以上の結果から、TaEL02を完全に破壊したTaEL02欠損ホモ接合体の取得に成功したことが分かった。またこの結果から、*I. aureum* ATCC 34304が2倍体であることが判明した。

[0075] [比較例 1－1 2] 野生株、およびTaEL02欠損ホモ接合体の脂肪酸組成の比較

比較例 1－1 1 で得たTaEL02欠損ホモ接合体と野生株の脂肪酸組成を、メチルエステル化した脂肪酸のGC解析によって行った。すなわち、GY液体培地で培養5日後のTaEL02欠損ホモ接合体と野生株の菌体を回収し、比較例 1－3 記載の方法で菌体由来脂肪酸の抽出とメチルエステル化、およびGC解析を行った。GC解析にはガスクロマトグラフGC-2014 (島津製作所社製) を使用し、カラム: HR-SS-10 (30 m x 0.25 mm; 信和化工社製)、カラム温度: 150°C → (5°C/min) → 220°C (10 min)、キャリアガス: He (1.3 mL/min) の条件で行った。

その結果、TaEL02欠損ホモ接合体 (TaEL02 K0) では、TaEL02の基質となるEPA量が野生株 (Wild type) の2倍程度まで増加すると共に、下流の代謝産物であるDHA量の減少が観察された (図 4 3)。

以上のように、*I. aureum* ATCC34304でも *Parietichytrium* 属ラビリンチュラ類と同様、C20エロンガーゼ遺伝子K0により、野生株と比較してC20エロンガーゼの基質であるEPAが増加し、逆に下流の代謝産物であるDHA等が減少することが確認された。しかし、*Parietichytrium* 属ラビリンチュラ類と異なり、C20エロンガーゼ遺伝子をK0しても *I. aureum* ATCC34304ではDHAの割合はあまり減少しなかった。具体的には、野生株におけるDHAの割合が54.38%である

のに対し、C20エロンガーゼ遺伝子K0株におけるDHAの割合は48.77%と、若干の減少にとどまった。DPA n-6も同様の傾向だった。

比較例1-2に記載のとおり、I. aureum ATCC34304には今回K0したTaEL02の他にTaEL01が存在し、比較例1-3でいずれも Δ 5エロンガーゼ活性(=C20エロンガーゼ活性)を有することを示した。しかし、TaEL01の Δ 5エロンガーゼ活性はTaEL02の Δ 5エロンガーゼ活性と比較してかなり低いことも明らかになっており、今回のTaEL02欠損ホモ接合体(TaEL02 K0)においてDHAとDPA n-6があまり減少しなかった原因をTaEL01の Δ 5エロンガーゼ活性(=C20エロンガーゼ活性)で説明することは難しい。以上から、Thraustochytrium aureum ATCC34304ではDHAとDPA n-6はエロンガーゼ/デサチュラーゼ経路に加え、それ以外の生合成経路でも生産される可能性が示唆された。

このようなラビリンチュラ類を選択すると、実施例2、4、6とは異なり、C20エロンガーゼ遺伝子をK0してもDHA、DPA n-6以外のPUFAを蓄積する株を作ることが出来ない。したがって、そのような株を作するためにはエロンガーゼ/デサチュラーゼ経路以外のDHA、DPA n-6を生合成経路の関連遺伝子をK0する必要がある。

[0076] [比較例2]

[Thraustochytrium aureum ATCC34304のPUFA-PKS遺伝子の破壊および形質転換株が生産する脂質の脂肪酸組成の測定]

[比較例2-1] PUFA-PKS経路関連遺伝子: OrfAの上流配列のクローニング
実施例2-2記載の方法でThraustochytrium aureum ATCC 34304よりゲノムDNAを抽出後、A260/280を測定しDNA濃度を算出した。これを用い、LA PCR™ in vitro Cloning Kit (タカラバイオ社製)を使用して、ゲノムカセットライブラリを作製した。特許文献4に記載のPUFA-PKS経路関連遺伝子: OrfA上にPCR lower primer [RH020: 23mer: 5' - CGA TGA AAG GTC ACA GAA GAG TC -3' (配列番号103)]を設定し、上記記載のKit付属カセットプライマーと組み合わせてDNAを増幅した[1st PCR cycles: 98°C 2min/ 98°C 30 sec, 56°C 30 sec, 72°C 4 min, 30 cycles/ 72°C 5min]。つづいて、1st PCR 増幅

産物を100倍希釈し、PCR lower primer [RH020] および上記記載のKit付属ネステッド プライマーを組み合わせでDNAを増幅した[2nd PCR cycles: 98°C 2min/ 98°C 30 sec, 56°C 30 sec, 72°C 4 min, 30 cycles/ 72°C 5min]。得られたDNA断片はpGEM-T easy vector にクローニングし、大腸菌にて増幅後、Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (BECKMAN COULTER社製) を用いて配列を確認した。

OrfAの上流3,181 bp (配列番号104) を含む3,377 bp (配列番号105) のDNA断片をクローニングした。OrfAの上流DNA配列情報として3,181 bpが明らかになった。

[0077] [比較例 2 - 2] PUFA-PKS経路関連遺伝子: OrfAの下流配列のクローニング
比較例 2 - 1 で作製したゲノムカセットライブラリを鋳型として使用した。特許文献 4 に記載のPUFA PKS経路関連遺伝子: OrfA上にPCR upper primer [RH021: 21mer: 5' - CAG GGC GAG CGA GTG TGG TTC -3' (配列番号106)] を設定し、比較例 2 - 1 記載の方法でDNAを増幅した。得られたDNA断片をpGEM-T easy vector にクローニングし、大腸菌にて増幅後、Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (BECKMAN COULTER社製) を用いて配列を確認した。OrfAの下流1,160 bp (配列番号107) を含む1,204 bpのDNA断片 (配列番号108) をクローニングした。

配列番号94上に再度PCR upper primer [RH028: 20mer: 5' - TGA TGC CGA TGC TAC AAA AG -3' (配列番号109)] を作製し、比較例 2 - 1 記載の方法でDNAを増幅した。得られたDNA断片をpGEM-T easy vector にクローニングし、大腸菌にて増幅後、Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (BECKMAN COULTER社製) を用いて配列を確認した。

さらに下流配列を含む1,488 bpのDNA断片 (配列番号110) をクローニングした。OrfAの下流DNA配列情報として通算2,551 bp (配列番号111) が明らかになった。

[0078] [比較例 2 - 3] PUFA-PKS経路関連遺伝子: OrfAターゲティングベクターの作製

Thraustochytrium aureum ATCC 34304のゲノムDNAを鋳型に、PrimeSTAR HS DNA polymerase (タカラバイオ社製) により18S rDNA 配列 (1835 bp、配列番号: 112) を増幅した。用いたPCR primer は下記の通りで、TM030は18S rDNA 配列上に設定した。TM031は18S rDNA配列とEF1 α promoter配列を含む。 [TM030: 30mer: 5' - CGA ATA TTC CTG GTT GAT CCT GCC AGT AGT -3' (配列番号113)、 TM031: 46mer: 5' - GTA ACG GCT TTT TTT GAA TTG CAG GT T CAC TAC GCT TGT TAG AAA C -3' (配列番号114)]。 [PCR cycles: 98°C 10 sec/ 98°C 10 sec, 58°C 30 sec, 72°C 2 min, 30 cycles/ 72°C 2min]。また、Thraustochytrium aureum ATCC 34304 ゲノムDNAを鋳型に、PrimeSTAR HS DNA polymerase (タカラバイオ社製) によりEF1 α promoter配列 (661 bp、配列番号115) を増幅した。用いたPCR primer は下記の通りで、TM032は18S rDNA配列とEF1 α promoter配列を含む。TM033はEF1 α promoter配列と人工合成ネオマイシン耐性遺伝子配列を含む。 [TM032: 46mer: 5' - GGT TT C CGT AGT GAA CCT GCA ATT CAA AAA AAG CCG TTA CTC ACA T -3' (配列番号116)、 TM033: 46mer: 5' - GCG TGA AGG CCG TCC TGT TCA ATC ATC TAG CCT TCC TTT GCC GCT G-3' (配列番号117)]。 [PCR cycles: 98°C 10 sec/ 98°C 10 sec, 58°C 30 sec, 72°C 1 min, 30 cycles/ 72°C 1min]。

人工合成ネオマイシン耐性遺伝子を鋳型に、PrimeSTAR HS DNA polymerase (タカラバイオ社製) により人工合成ネオマイシン耐性遺伝子配列 (835 bp、配列番号118) を増幅した。用いたPCR primer は下記の通りで、TM034はEF1 α promoter配列と人工合成ネオマイシン耐性遺伝子配列を含む。TM035は人工合成ネオマイシン耐性遺伝子配列とEF1 α terminator 配列を含む。 [TM034: 45mer: 5' - CAT CGG CAA AGG AAG GCT AGA TGA TTG AAC AGG ACG GCC TTC ACG -3' (配列番号119)、 TM035: 46mer: 5' - GCG CAT AGC CGG CGC GGA TCT CAA AAG AAC TCG TCC AGG AGG CGG T -3' (配列番号120)]。 [PCR cycles: 98°C 10 sec/ 98°C 10 sec, 58°C 30 sec, 72°C 1 min, 30 cycles/ 72°C 1min]。

また、Thraustochytrium aureum ATCC 34304 ゲノムDNAを鋳型に、PrimeSTAR

HS DNA polymerase (タカラバイオ社製) によりEF1 α terminator配列 (1249 bp、配列番号121) を増幅した。用いたPCR primer は下記の通りで、TM036は人工合成ネオマイシン耐性遺伝子配列とEF1 α terminator 配列を含む。TM037はEF1 α terminator 中に設定した。[TM036: 46mer: 5' - TCC TGG ACG AGT TCT TTT GAG ATC CGC GCC GGC TAT GCG CCC GTG C -3' (配列番号122)、TM037: 30mer: 5' - CAC TGC AGC GAA AGA CGG GCC GTA AGG ACG -3' (配列番号123)]。[PCR cycles: 98°C 10 sec/ 98°C 10 sec, 58°C 30 sec, 72°C 2 min, 30 cycles/ 72°C 2min]。

配列番号112、115、118、121を鋳型に、非特許文献9記載の方法に従ってFusion PCRを行った。酵素にはLA Taq Hot start version (タカラバイオ社製) を用いた。初回の増幅には、TM030 (配列番号113) およびTM033 (配列番号117)のset、TM034 (配列番号119) およびTM037 (配列番号123) のsetを用いた。2度目の増幅はTM030 (配列番号113) およびTM037 (配列番号123) のsetを用いた。PCR反応の条件は変性温度を98°C 10 sec とし、アニーリングおよび伸長反応はプライマーのT_m値および増幅断片の長さによって適宜調節した(図42)。

上記のようにして連結したDNA断片 (図44、配列番号124、4453 bp) を *I. aureum* 18S rDNA 中のEcoRIサイト、および、*I. aureum* EF1 α terminator 中のNcoI サイトで切り出し、pGEM-T easy vector由来のvectorにつなぎ換えた。これをpRH5と名付けた (図45)。

Thraustochytrium aureum ATCC 34304 ゲノムDNAを鋳型にし、比較例2-1で明らかにした上流配列 (配列番号104) および特許文献4に記載のPUFA-PKS経路関連遺伝子: OrfA 中にPCR primerを設定し、PrimeSTAR HS DNA polymerase with GC Buffer (タカラバイオ社製) によりDNAを増幅した。この増幅により、1218 bp のDNA断片 (配列番号125) が得られた。これをターゲティングベクターの5' 相同領域とした。用いたPCR primer は下記の通りで、それぞれリンカー配列としてEcoRIサイト、もしくはHindIIIサイトを付加した。[RH033: 32mer: 5' - CCC GAA TTC GGA CGA TGA CTG ACT GAC TGA TT -3'

(配列番号126)、RH034: 28mer: 5' - CCC AAG CTT GTC TGC CTC GGC TCT TG G T -3' (配列番号127)]。[PCR cycles: 98°C 2min/ 98°C 30 sec, 57°C 30 sec, 72°C 1 min, 30 cycles/ 72°C 3min]。

Thraustochytrium aureum ATCC 34304 ゲノムDNAを鋳型にし、比較例 2 - 2 で明らかにした下流配列 (配列番号111) 中にPCR primerを設定し、PrimeSTAR HS DNA polymerase with GC Buffer (タカラバイオ社製) によりDNAを増幅した。この増幅により、1000 bp のDNA断片 (配列番号128) が得られた。これをターゲティングベクターの3' 相同領域とした。用いたPCR primer は下記の通りで、ともにリンカー配列NcoIサイトを付加した。[RH029: 28mer: 5' - CCC CCA TGG TGT TGC TGT GGG ATT GGT C -3' (配列番号129)、RH030: 30mer: 5' - CCC CCA TGG CTC GGT TAC ATC TCT GAG GAA -3' (配列番号130)]。[PCR cycles: 98°C 2min/ 98°C 30 sec, 57°C 30 sec, 72°C 1 min, 30 cycles/ 72°C 3min]。

増幅した上流配列を図 4 3 記載 pRH5中のEcoRIサイトおよびHindIIIサイトに連結した。増幅した下流配列をNcoIサイトに連結した。このベクターをpRH 21と名付けた。

作製した人工合成ネオマイシン耐性遺伝子を使用したターゲティングベクター (pRH21) を図 4 4 に示す。

[0079] [比較例 2 - 4] PUFA-PKS経路関連遺伝子: OrfAターゲティングベクターの作製 (ハイグロマイシン耐性遺伝子)

実施例 2 - 3 記載pRH32 (図 6) を鋳型にし、PrimeSTAR HS DNA polymerase with GC Buffer (タカラバイオ社製) によりubiquitin promoter-ハイグロマイシン耐性遺伝子断片 (1632 bp、配列番号131) を増幅した。用いたPCR primer は下記の通りで、RH059はubiquitin promoter上に設定し、リンカー配列HindIIIサイトを付加した。RH060はハイグロマイシン耐性遺伝子配列を終止codon含み、リンカー配列SphI、SalIを有する。[RH059: 36mer: 5' - CCC AAG CTT GCC GCA GCG CCT GGT GCA CCC GCC GGG -3' (配列番号132)、RH060: 43mer: 5' - CCC GCA TGC GTC GAC TAT TCC TTT GCC CTC GGA CGA GTG CTG G -3

' (配列番号133)]。[PCR cycles: 98°C 2min/ 98°C 30 sec, 68°C 2 min, 30 cycles/ 68°C 2min]。

増幅した断片を比較例 2 - 3 記載pRH21 (図 4 6) のHindIIIおよびSphIサイトに連結した (図 4 7、pRH30)。

Thraustochytrium aureum ATCC 34304ゲノムDNAを鋳型にし、比較例 2 - 2 で明らかにした下流配列 (配列番号111) 中に作製したPCR primer を用いて、PrimeSTAR HS DNA polymerase with GC Buffer (タカラバイオ社製) により遺伝子を増幅した。この増幅により、1000 bp のDNA断片 (配列番号134) が得られた。これをターゲティングベクターの3' 相同領域とした。用いたPCR primer は下記の通りで、ともにリンカー配列SalIサイトを付加した。[RH061: 29mer: 5' - CCC GTC GAC GTG TTG CTG TGG GAT TGG TC -3' (配列番号135)、RH062: 29mer: 5' - CCC GTC GAC TCG GTT ACA TCT CTG AGG AA -3' (配列番号136)]。[PCR cycles: 98°C 2min/ 98°C 30 sec, 57°C 30 sec, 72°C 1 min, 30 cycles/ 72°C 3min]。

増幅した下流配列をpRH30 (図 4 5) のSalIサイトに連結した。これをpRH3と名付けた。作製したハイグロマイシン耐性遺伝子を使用したターゲティングベクター (pRH33) を図 4 8 に示す。

[0080] [比較例 2 - 5] PUFA-PKS経路関連遺伝子: OrfAターゲティングベクター導入

比較例 2 - 3 および 2 - 4 で作製したターゲティングベクターを鋳型に、RH030 (比較例 2 - 3 記載。配列番号130) およびRH033 (比較例 2 - 3 記載。配列番号126) をprimerとして用いて、PrimeSTAR Max DNA polymerase (タカラバイオ社製) により遺伝子を増幅した。[PCR cycles: 98°C 2min/ 98°C 30 sec, 60°C 30 sec, 72°C 1 min, 30 cycles/ 72°C 3min]。フェノールクロロホルム抽出、クロロホルム抽出後、DNAをエタノール沈殿させ、沈殿を0.1×TEに溶解した。A260/280を測定しDNA濃度を算出した。比較例 2 - 3 記載pRH21 (図 4 6) を鋳型とした際に得られる導入断片は 3705 bpで、Thraustochytrium aureum OrfA遺伝子上流-EF1 α promoter配列-人工合成ネオマイシン耐

性遺伝子配列—Thraustochytrium aureum OrfA 遺伝子下流という並びになる (配列番号137)。比較例2—4記載pRH33 (図46) を鋳型とした際に得られる導入断片は 3826 bpで、Thraustochytrium aureum OrfA遺伝子上流—ubiquitin promoter配列—ハイグロマイシン耐性遺伝子配列—Thraustochytrium aureum OrfA 遺伝子下流という並びになる (配列番号138)。

Thraustochytrium aureum ATCC 34304株をGY培地中で4日間培養し、対数増殖期にある細胞を遺伝子導入に使用した。OD600 = 1~1.5相当分の細胞に対し、0.625 µgのDNA断片を遺伝子銃法 (マイクロキャリア: 0.6 micronの金粒子、target distance: 6 cm、chamber vacuum: 26 mmHg、Rupture disk: 1,100 PSI) により導入した。遺伝子導入した細胞は4~6時間のリカバリータイムの後、PDA寒天平板培地 (2 mg/ml G418 含有もしくは2 mg/ml ハイグロマイシン含有) に塗布した。この結果、1撃ちこみあたり100から200個の薬剤耐性株を得た。

[0081] [比較例2—6] PUFA-PKS経路関連遺伝子: OrfAジーンターゲティング相同組換え体の同定

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

ゲノムDNAを制限酵素で切断後、1ウェルあたり約2~3 µgずつ0.7% SeaKem GTG アガロースゲル (タカラバイオ社製) に電気泳動した。これをナイロンメンブレンにトランスファーし、DIGシステム (Roche Applied Science社製) を使用して作製したprobeと54 °C、16 hr でハイブリダイズさせた。probe作製に用いたprimerは下記の通り。5' 側[RH037: 22mer: 5' - GAA GCG TCC CGT AGA TGT GGT C -3' (配列番号139)、RH038: 21mer: 5' - GCC CGA GAG GTC AAA GTA CGC -3' (配列番号140)]、3' 側[RH039: 20mer: 5' - GCG A GC CCA GGT CCA CTT GC -3' (配列番号141)、RH040: 22mer: 5' - CAG CCC GAT GAA AAA CTT GGT C -3' (配列番号142)]。[PCR cycles: 98°C 2min/ 98°C 30 sec, 60°C 30 sec, 72°C 2 min, 30 cycles/ 72°C 3min]。使用した

制限酵素およびprobeの位置を図49に示した。ハイブリダイズしたプローブの検出は、発色法（NBT/BCIP溶液）を用いて行った。

5' 側および3' 側の解析いずれにおいても、薬剤耐性遺伝子が相同組換えをおこした際あらかじめ予想されるサイズに、バンドが観察された（図50）。

[0082] [比較例2-7]

実施例2-9記載の方法でThraustochytrium aureum ATCC 34304および遺伝子破壊株を培養、凍結乾燥後、脂肪酸をメチルエステル化し、GCを用いて解析した。

脂肪酸組成の変化を図51に示す。図52に野生型株を100%とした時の割合を示した。全脂肪酸組成のうちARA3.10%, DGLA0.23%, ETA0.04%, EPA6.82%, n-6DPA10.66, DHA22.58%を示している。GC面積でLA/DHAの値0.05, GLA/DHAの値0.03, DGLA/DHAの値0.01, ARA/DHAの値0.1, EPA/DHAの値0.3, LA/EPAの値0.16, GLA/EPAの値0.11, DTA/EPAの値0.29, DTA/ARAの値0.65, DTA/DGLAの値8.7, LA/n-6DPAの値0.1, GLA/n-6DPAの値0.07, DGLA/n-6DPAの値0.02, ARA/n-6DPAの値0.3, EPA/n-6DPAの値0.6, DGLA/LAの値0.2, ARA/LAの値2.9, EPA/LAの値6.4, DTA/LAの値1.9, DGLA/GLAの値0.3, ARA/GLAの値4.0, n-6DPA/DTAの値5.3, DHA/n-3DPAの値20.0, C20PUFA/C22PUFAの値0.3, n-6PUFA/n-3PUFAの値0.52を示している。この結果、Thraustochytrium aureumにおいてPUFA PKS経路関連遺伝子：OrfAを破壊すると、DPA（C22: 5n-6）に増加傾向、DHA（C22: 6n-3）に減少傾向が見られた。

シゾキトリウム属（Schizochytrium）やオーランチオキトリウム属（Aurantiochytrium）ではPUFA-PKS経路の遺伝子の破壊により外因性のPUFA要求性となり、外因性PUFAの供給が無ければ生育できないことが知られている（非特許文献4）。しかしThraustochytrium aureum ATCC34304はこれらとは異なり、PUFA-PKS経路関連遺伝子の破壊により外因性のPUFAを培地に添加することなく培養可能であった。また、PUFA-PKS経路関連遺伝子の破壊により、野生株と比較してDHAは約2/3程度しか減少せず、DPA（C22: 5n-6）は若干増加し

た。

これらの結果から、*Thraustochytrium aureum* ATCC34304ではDHAとDPA n-6はPUFA-PKS経路に加え、それ以外の生合成経路でも生産される可能性が示唆された。*Thraustochytrium aureum* ATCC34304が外因性のPUFAを培地に添加することなく培養可能な理由は、このPUFA-PKS経路以外の生合成経路によって内因性のPUFAが供給されるためと推察される。

[0083] [比較例3]

[*Thraustochytrium aureum* ATCC34304のPUFA-PKS遺伝子とC20エロンガーゼ遺伝子の破壊および形質転換株が生産する脂質の脂肪酸組成の測定]

[比較例3-1] *Thraustochytrium aureum* C20エロンガーゼ遺伝子上流配列のクローニング

比較例2-1で作製したゲノムカセットライブラリを鋳型として使用した。比較例1-4記載のC20エロンガーゼ遺伝子上流配列（配列番号76）上にPCR lower primer [RH071: 22mer: 5' - GGG AGC GCA GGG AAA ACG GTC T -3' （配列番号143）] を作製し、比較例2-1記載のKit付属カセットプライマーと組み合わせて遺伝子を増幅した[1st PCR cycles: 98°C 2min/ 98°C 30 sec, 56°C 30 sec, 72°C 4 min, 30 cycles/ 72°C 5min]。続いて、1st PCR 増幅産物を100倍希釈し、PCR lower primer [RH072: 20mer: 5' - CCA GCC CAC GTC GTC GGA GC -3' （配列番号144）] および比較例2-1記載のKit付属ネスティッド プライマーを組み合わせて遺伝子を増幅した[2nd PCR cycles: 98°C 2min/ 98°C 30 sec, 56°C 30 sec, 72°C 4 min, 30 cycles/ 72°C 5min]。得られたDNA断片はpGEM-T easy vector にクローニングし、大腸菌にて増幅後、Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (BECKMAN COULTER社製) を用いて配列を確認した。

C20エロンガーゼ遺伝子上流-3277 bp~-981 bpの領域を含む2297 bpのDNA断片（配列番号145）をクローニングした。

[0084] [比較例3-2] C20エロンガーゼ遺伝子下流配列のクローニング

比較例2-1で作製したゲノムカセットライブラリを鋳型として使用した。

比較例 1 – 4 記載のC20エロンガーゼ遺伝子下流配列（配列番号77）上にPCR upper primer [RH087: 23 mer: 5' – GCC GCT CAT GCC CAC GCT CAA AC –3'（配列番号146）] を作製し、比較例 2 – 1 記載のKit付属カセットプライマーと組み合わせて遺伝子を増幅した[1st PCR cycles: 98°C 2min/ 98°C 30 sec, 56°C 30 sec, 72°C 4 min, 30 cycles/ 72°C 5min]。続いて、1st PCR 増幅産物を100倍希釈し、PCR lower primer [RH073: 23 mer: 5' – CTT TCG GCT GCC AGG AAT CTA CG –3'（配列番号147）] および比較例 2 – 1 記載のKit付属ネスティッド プライマーを組み合わせて遺伝子を増幅した[2nd PCR cycles: 98°C 2min/ 98°C 30 sec, 56°C 30 sec, 72°C 4 min, 30 cycles/ 72°C 5min]。得られたDNA断片はpGEM-T easy vector にクローニングし、大腸菌にて増幅後、Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (BECKMAN COULTER社製) を用いて配列を確認した。

C20エロンガーゼ遺伝子の下流1,106 bp～3,294 bpの領域を含む2,189 bpのDNA断片(配列番号148) をクローニングした。

[0085] [比較例 3 – 3] ブラストサイジン耐性遺伝子カセットの作製

Thraustochytrium aureum ATCC 34304よりゲノムDNAを鋳型に、PrimeSTAR HS DNA polymerase with GC Buffer（タカラバイオ社製）によりubiquitin promoter 配列（618 bp、配列番号149）を増幅した。用いたPCR primer は下記の通りで、RH053はubiquitin promoter 配列上に設定、BglIIリンカー配列を含む（実施例 2 – 2、配列番号5）。RH048はubiquitin promoter 配列とブラストサイジン耐性遺伝子配列を含む。[RH048: 58mer: 5' – CTT CTT GAG ACA AAG GCT TGG CCA TGT TGG CTA GTG TTG CTT AGG TCG CTT GCT GCT G –3'（配列番号150）]。[PCR cycles: 98°C 2min/ 98°C 10 sec, 68°C 1 min, 30 cycles/ 68°C 1min]。

pTracer-CMV/Bsd/lacZ (invitrogen社製)を鋳型に、PrimeSTAR HS DNA polymerase with GC Bufferによりブラストサイジン耐性遺伝子(432 bp、配列番号151) を増幅した。用いたPCR primer は下記の通りで、RH047はubiquitin promoter 配列とブラストサイジン耐性遺伝子配列を含む。RH049はブラスト

サイジン耐性遺伝子配列を含み、BglIIIリンカー配列を有する。[RH047: 54mer: 5' - AGC GAC CTA AGC AAC ACT AGC CAA CAT GGC CAA GCC TTT GTC TCA AGA AGA ATC -3' (配列番号152)、RH049: 38mer: 5' - CCC AGA TCT TAG CCC TCC CAC ACA TAA CCA GAG GGC AG -3' (配列番号153)]。[PCR cycles: 98°C 2min/ 98°C 10 sec, 68°C 1 min, 30 cycles/ 68°C 1min]。

配列番号149および151を鋳型に、非特許文献9記載の方法に従ってRH053 (実施例2-2、配列番号5) およびRH049 (配列番号153) を用いてFusion PCRを行った。酵素はLA Taq Hot start version (タカラバイオ社製) を使用し、下記の条件で増幅後、BglIIIにて消化した。[PCR cycles: 94°C 2min/ 94°C 20 sec, 55°C 30 sec, 68°C 1 min, 30 cycles/ 68°C 1min。ただし55°C から68°Cへは1°C/ 10sec とした] (図53)。

上記のようにしてFusionしたThraustochytrium aureum ATCC 34304 由来ubiquitin promoter-pTracer-CMV/Bsd/lacZ由来ブラストサイジン耐性遺伝子 (1000 bp、配列番号154) を、BglIIIにて消化し、これを実施例2-1記載pRH27 (図2) のBamHIサイトに繋いだ。出来たプラスミドを大腸菌にて増幅後、Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (BECKMAN COULTER社製) を用いて配列を確認した。これをpRH38と名付けた。

作製したブラストサイジン耐性遺伝子カセット (pRH38) を図54に示す。

[0086] [比較例3-4] GFP融合ゼオシン耐性遺伝子カセットの作製

Thraustochytrium aureum ATCC 34304よりゲノムDNAを鋳型に、PrimeSTAR HS DNA polymerase with GC Buffer (タカラバイオ社製) によりubiquitin promoter 配列 (812 bp、配列番号155) を増幅した。用いたPCR primer は下記の通りで、TM038はubiquitin promoter配列上に設定した。TM039はubiquitin promoter配列とEnhanced GFP 遺伝子配列を含む。[TM038: 29mer: 5' - TCG GTA CCC GTT AGA ACG CGT AAT ACG AC -3' (配列番号156)、TM039: 41mer: 5' - TCC TCG CCC TTG CTC ACC ATG TTG GCT AGT GTT GCT TAG GT -3' (配列番号157)]。[PCR cycles: 98°C 10 sec/ 98°C 10 sec, 58°C 30 sec, 72°C 1 min, 30 cycles/ 72°C 1min]。

Enhanced GFP 遺伝子配列 (clontech社製) を鋳型に、PrimeSTAR HS DNA polymerase (タカラバイオ社製) によりEnhanced GFP 遺伝子配列 (748 bp、配列番号158) を増幅した。用いたPCR primer は下記の通りで、TM040はubiquitin promoter配列とEnhanced GFP 遺伝子配列を含む。RH091はEnhanced GFP 配列およびゼオシン耐性遺伝子配列を含む。[TM040: 41mer: 5' - ACC TAA GCA ACA CTA GCC AAC ATG GTG AGC AAG GGC GAG GA -3' (配列番号159)、RH091: 58mer: 5' - GAA CGG CAC TGG TCA ACT TGG CGT CCA TGC CGA GAG TGA TCC CGG CGG CGG TCA CGA A-3' (配列番号160)]。[PCR cycles: 98°C 10 sec / 98°C 10 sec, 58°C 30 sec, 72°C 2 min, 30 cycles/ 72°C 2min]。

配列番号156および158を鋳型に、非特許文献9記載の方法に従ってLA Taq Hot start version (タカラバイオ社製) により、Fusion PCRを行った。PrimerにはTM038 (配列番号156) およびRH091 (配列番号160) を用い、条件はPCR cycles: 94°C 2min/ 94°C 20 sec, 55°C 30 sec, 68°C 2 min, 30 cycles/ 68°C 2min (ただし、55°Cから68°Cへは1°C/ 10sec) とした (図55、1519 bp、配列番号161)。

配列番号161を鋳型に、PrimeSTAR HS DNA polymerase (タカラバイオ社製) によりubiquitin promoter配列—Enhanced GFP遺伝子配列 (1319 bp、配列番号162) を増幅した。用いたprimerは下記の通り。RH053 (実施例2-2、配列番号5) はubiquitin promoter配列を含み、BglIIサイトを有する。RH091 (配列番号160) はEnhanced GFP配列およびゼオシン耐性遺伝子配列を含む。[PCR cycles: 98°C 2 min/ 98°C 10 sec, 68°C 2 min, 30 cycles/ 68°C 2min]。

pcDNA3.1 Zeo(+)を鋳型に、PrimeSTAR HS DNA polymerase (タカラバイオ社製) によりゼオシン耐性遺伝子配列 (408 bp、配列番号163) を増幅した。RH092はEnhanced GFP配列およびゼオシン耐性遺伝子配列を含む。RH064はゼオシン耐性遺伝子配列を含み、BglIIサイトを有する。[RH092: 54mer: 5' - C GC CGC CGG GAT CAC TCT CGG CAT GGA CGC CAA GTT GAC CAG TGC CGT TCC GG T -3' (配列番号164)、RH064: 38mer: 5' - CCC AGA TCT CAG TCC TGC TCC

TCG GCC ACG AAG TGC AC -3' (配列番号165)]。[PCR cycles: 98°C 2 min / 98°C 10 sec, 68°C 1 min, 30 cycles/ 68°C 1min]。

配列番号162および163を鋳型に、非特許文献9記載の方法に従ってLA taq Hot start version (タカラバイオ社製) によりFusion PCRを行った。PrimerにはRH053 (実施例2-2、配列番号5) およびRH064 (配列番号165) を用い、条件はPCR cycles: 94°C 2min/ 94°C 20 sec, 68°C 2 min, 30 cycles/ 68°C 2min (ただし55°Cから68°Cへは1°C/ 10sec) とした (図56)。

上記のようにしてFusionしたThraustochytrium aureum ATCC 34304 由来ubiquitin promoter-Enhanced GFP遺伝子-pcDNA3.1 Zeo(+) 由来ゼオシン耐性遺伝子 (図56、1677 bp、配列番号166) をBglIIにて消化し、これを実施例2-1記載pRH27 (図2) のBamHIサイトに繋いだ。出来たプラスミドを大腸菌にて増幅後、Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (BECKMAN COULTER 社製) を用いて配列を確認した。これをpRH51と名付けた。

作製したGFP融合ゼオシン耐性遺伝子カセット (pRH51) を図57に示す。

[0087] [比較例3-5] C20エロンガーゼ遺伝子ターゲティングベクターの作製のための土台となるプラスミド作製

Thraustochytrium aureum ATCC 34304ゲノムDNAを鋳型に、PrimeSTAR HS DNA polymerase (タカラバイオ社製) により、C20 エロンガーゼ遺伝子およびその周辺配列をPCR法にて増幅した (2884 bp、配列番号167)。用いたPCR primer は下記の通りで、いずれもEcoRIリンカー配列を含み、KS09はC20 エロンガーゼ遺伝子上流 (配列番号76) 中に、KS010はC20 エロンガーゼ遺伝子下流 (配列番号77) に設定した。[KS09: 50mer: 5' - CCC GAA TTC ACT AGT GAT TCT CCC GGG TGG ACC TAG CGC GTG TGT CAC CT -3' (配列番号168)、KS010: 40mer: 5' - CCC GAA TTC GAT TAT CCC GGG GCC GAG AAC GGG GTC GCC C -3' (配列番号169)]。[PCR cycles: 98°C 2 min/ 98°C 10 sec, 68°C 3.5 min, 30 cycles/ 68°C 10 min]。酵素はPrimeSTAR HS DNA Polymerase (タカラバイオ社製) を使用し、増幅後、EcoRIにて消化したのち、pBluescript(SK) (Stratagene社製) vector EcoRIサイトにクローニングした。大腸菌にて増幅

後、Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (BECKMAN COULTER社製) を用いて配列を確認した (図58)。

図58記載のプラスミドを鋳型に、C20 エロンガーゼ遺伝子配列部分を欠失し、BglIIサイトを挿入 (1939 bp、配列番号170) する目的で、逆向きに設定したprimer setを用意し、PrimeSTAR Max DNA Polymerase (タカラバイオ社製) にて増幅した。用いたPCR primer は下記の通りで、ともにBglIIリンカー配列を有する。[RH069: 38mer: 5' - CCC AGA TCT ACC TGT TTC CGG CTG GCT CCC GAG CCA TG -3' (配列番号171)、RH070: 38mer: 5' - CCC AGA TCT GGT CGC GTT TAC AAA GCA GCG CAG CAA CA -3' (配列番号172)]。[PCR cycles: 98°C 2 min/ 98°C 10 sec, 68°C 1.5 min, 30 cycles/ 68°C 1.5 min]上記条件で増幅後、BglIIにて消化したのち、セルフライゲーションした。ライゲーションしたサンプルは大腸菌にて増幅後、Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (BECKMAN COULTER社製) を用いて配列を確認した。これをpRH40と名付けた。

作製したC20エロンガーゼ遺伝子ターゲティングベクターの作製のための土台となるプラスミド (pRH40) を図59に示す。

[0088] [比較例3-6] ターゲティングベクターの作製 (ブラストサイジン耐性遺伝子およびGFP融合ゼオシン耐性遺伝子)

比較例3-3記載のpRH38 (図52) をBglIIにて消化し、ブラストサイジン耐性遺伝子カセットを含むDNA断片を比較例3-5記載のpRH40 (図59) のBglIIサイトに繋いだ。これをpRH43と名付けた。

比較例3-4記載のpRH51 (図55) をBglIIにて消化し、GFP融合ゼオシン耐性遺伝子カセットを含むDNA断片を比較例3-5記載のpRH40 (図57) のBglIIサイトに繋いだ。これをpRH54と名付けた。

作製した2種のターゲティングベクター (pRH43および54) を図60に示す。

[0089] [比較例3-7] *Thraustochytrium aureum* OrfA破壊株へのC20エロンガーゼ遺伝子ターゲティングベクター導入

比較例3-6で作製した2種類のターゲティングベクターを鋳型に、KS011

およびKS012をprimerとして用いて、PrimeSTAR Max DNA polymerase（タカラバイオ社製）により遺伝子を増幅した。KS011はThraustochytrium aureum C20エロンガーゼ遺伝子上流に、KS012はThraustochytrium aureum C20エロンガーゼ遺伝子下流に設定した。[KS011: 31mer: 5' - CTC CCG GGT GGA CCT AGC GCG TGT GTC ACC T -3'（配列番号173）、KS012: 27mer: 5' - ATC CCG GG G CCG AGA ACG CCC TCG CCC -3'（配列番号174）]。[PCR cycles: 98°C 2min/ 98°C 30 sec, 68°C 2 min, 30 cycles/ 68°C 2min]。フェノールクロロホルム抽出、クロロホルム抽出後、DNAをエタノール沈殿させ、沈殿を0.1×TEに溶解した。A260/280を測定しDNA濃度を算出した。比較例3－6記載pRH43（図60）を鋳型とした際に得られる導入断片は 3215 bpで、Thraustochytrium aureum C20エロンガーゼ遺伝子上流－ubiquitin promoter－ブラストサイジン耐性遺伝子配列－SV40 terminator 配列－Thraustochytrium aureum C20エロンガーゼ遺伝子下流という並びになる（配列番号175）。比較例3－6記載pRH54（図60）を鋳型とした際に得られる導入断片は 3887 bpで、Thraustochytrium aureum C20エロンガーゼ遺伝子上流－ubiquitin promoter－Enhanced GFP遺伝子配列－ゼオシン耐性遺伝子配列－SV40 terminator 配列－Thraustochytrium aureum C20エロンガーゼ遺伝子下流という並びになる（配列番号176）。

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

[0090] [比較例3－8] C20エロンガーゼ遺伝子ジーンターゲットティング相同組換え体の同定

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

ゲノムDNAを制限酵素で切断後、1 ウェルあたり約2～3 μg ずつ0.7% SeaKem GTG アガロースゲル（タカラバイオ社製）に電気泳動した。これをナイロンメンブレンにトランスファーし、DIGシステム(Roche Applied Science社製)を使用して作製したprobeと51 $^{\circ}\text{C}$ 、16 hr でハイブリダイズさせた。probe作製に用いたprimerは下記の通り。5' 側[RH094: 21mer: 5' - ACG TCC GCT TCA AAC ACC TCG -3' (配列番号177)、RH095: 24mer: 5' - TCG GAA CAA C TG GAA CAA CTA AAG -3' (配列番号178)]、3' 側[RH096: 22mer: 5' - ATG TCG CTC TCC TTC TTC TCA G-3' (配列番号179)、RH097: 21mer: 5' - TCG GCT CCT GGA AAG TGC TCT -3' (配列番号180)]。[PCR cycles: 98 $^{\circ}\text{C}$ 2min/ 98 $^{\circ}\text{C}$ 30 sec, 58 $^{\circ}\text{C}$ 30 sec、72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 30 cycles/ 72 $^{\circ}\text{C}$ 3min]。使用した制限酵素およびprobeの位置は図 6 1 に示した。ハイブリダイズしたプローブの検出は発色法（NBT/BCIP溶液）を用いて行った。

5' 側および3' 側の解析いずれにおいても、薬剤耐性遺伝子が相同組換えをおこした際あらかじめ予想されるサイズにバンドが観察された(図 6 2)。この実験により、Thraustochytrium aureum ATCC 34304株は、PKS経路関連遺伝子: OrfA および C20 エロンガーゼ遺伝子を欠損しても栄養要求性にならないことが分かった。

[0091] [比較例 3－9] Thraustochytrium aureum OrfA破壊株におけるC20エロンガーゼ遺伝子の破壊による脂肪酸組成の変化

実施例 2－9 記載の方法でThraustochytrium aureum ATCC 34304および遺伝子破壊株を培養、凍結乾燥後、脂肪酸をメチルエステル化し、GCを用いて解析した。GC解析にはガスクロマトグラフGC-2014（島津製作所社製）を使用し、カラム: HR-SS-10 (30 m x 0.25 mm; 信和化工社製)、カラム温度: 150 $^{\circ}\text{C}$ $\rightarrow$ (5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$) $\rightarrow$ 220 $^{\circ}\text{C}$ (10 min)、キャリアガス: He (1.3 mL/min) の条件で行った。

脂肪酸組成の変化を図63に示す。また、図64に野生型株を100%とした時の割合を示す。全脂肪酸組成のうちARA19.50%, DGLA1.81%, ETA0.31%, EPA24.92%, n-6DPA5.90%, DHA6.78%を示している。GC面積でLA/DHAの値0.25, GLA/DHAの値0.07, DGLA/DHAの値0.27, ARA/DHAの値2.88, EPA/DHAの値3.68, LA/EPAの値0.07, GLA/EPAの値0.02, DTA/EPAの値0.02, DTA/ARAの値0.02, DTA/DGLAの値0.26, LA/n-6DPAの値0.29, GLA/n-6DPAの値0.08, DGLA/n-6DPAの値0.31, ARA/n-6DPAの値3.31, EPA/n-6DPAの値4.22, DGLA/LAの値1.06, ARA/LAの値11.40, EPA/LAの値14.57, DTA/LAの値0.27, DGLA/GLAの値4.02, ARA/GLAの値43.33, n-6DPA/DTAの値12.55, DHA/n-3DPAの値11.69, C20PUFA/C22PUFAの値3.39, n-6PUFA/n-3PUFAの値0.85を示している。

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

このように内因性エロンガーゼ/デサチュラーゼ経路と内因性PUFA-PKS経路の両方を有する*Thraustochytrium aureum* ATCC34304から、野生株と比較してDHAとDPA n-6の生産量が顕著に減少した株を作出するためには、エロンガーゼ/デサチュラーゼ経路を構成する酵素の遺伝子（例えばC20エロンガーゼ遺伝子）およびPUFA-PKS経路関連遺伝子の双方の遺伝子を破壊しなければならないことが明らかになった。

[0092] [比較例4]

[*Thraustochytrium aureum* ATCC34304のPUFA-PKS遺伝子と Δ 4デサチュラーゼ遺伝子の破壊および形質転換株が生産する脂質の脂肪酸組成の測定]

[比較例4-1] *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304株の Δ 4デサチュラーゼ遺伝子上流1071 bp～ Δ 4デサチュラーゼ遺伝子内1500 bpの配列のクローニング

実施例2-2に記載の方法で抽出した*Thraustochytrium aureum* ATCC 34304株のゲノムDNAを解読し、既知の Δ 4デサチュラーゼと相同性の高い遺伝子配列を検索した。この検索結果をもとに2種のPCR primer を設計した。TM03は

、Thraustochytrium aureum ATCC 34304株の $\Delta 4$ デサチュラーゼ遺伝子上流1071～1049 bpに位置する配列で、TM04は、開始コドンから数えて1477～1500 bpに位置するたんぱく質コーディング領域内の配列である。[TM03: 23 mer: 5' - GGC GGA GCG AAG TGT GAA AGT TA -3' (配列番号181)、TM04: 24 mer: 5' - GCG ACA GCA TCT TGA AAT AGG CAG -3' (配列番号182)]。この2種の primer を使用し、Thraustochytrium aureum ATCC 34304株のゲノムDNAを鋳型に、LA Taq Hot start version (タカラバイオ社製) によりThraustochytrium aureum ATCC 34304株の $\Delta 4$ デサチュラーゼ遺伝子上流1071 bp～ $\Delta 4$ デサチュラーゼ遺伝子内1500 bpの配列 (2571 bp、配列番号183) を増幅した。増幅条件は下記の通り。[PCR cycles: 98°C 2min/ 98°C 20 sec, 60°C 30 sec, 72°C 3 min, 30 cycles/ 72°C 8 min]。得られたDNA断片はpGEM-T easy vector にクローニングし、大腸菌にて増幅後、Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (BECKMAN COULTER社製) を用いて配列を確認した。これをpTM1と名付けた(図65)。

[0093] [比較例4-2] $\Delta 4$ デサチュラーゼ遺伝子ターゲティングベクター作製のための、土台となるプラスミド作製

比較例4-1で作製したpTM1 (図65) を鋳型に、 $\Delta 4$ デサチュラーゼ遺伝子上流60 bpおよび $\Delta 4$ デサチュラーゼ遺伝子内の開始コドンを含む556 bpの配列 (616 bp、配列番号184) を欠失させ、かつ、欠失部分にBglII サイトが生じる様、逆向きに設定したprimer setを用意した。TM07、TM08ともにBglII 配列を包含する。増幅にはPrimeSTAR Max DNA Polymerase (タカラバイオ社製) を使用した。[TM07: 25 mer: 5' -CAG GAG ATC TCC AAG TCG CGA TTC A -3' (配列番号185)、TM08: 26 mer: 5' - CTT GGA GAT CTC CTG CCC GTC CCG AA -3' (配列番号186)]。[PCR cycles: 98°C 3 min/ 98°C 10 sec, 55°C 15 sec, 72°C 30 sec, 30 cycles/ 72°C 30 sec]。上記条件で増幅後、アガロースゲルに泳動して精製した。得られたDNA断片を大腸菌に導入して増幅し、Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (BECKMAN COULTER社製) を用いて配列を確認した。これをpTM2と名付けた。

作製した $\Delta 4$ デサチュラーゼ遺伝子ターゲティングベクター作製のための土台となるプラスミド (pTM2) を図 6 6 に示す。

[0094] [比較例 4 - 3] ターゲティングベクターの作製 (ブラストサイジン耐性遺伝子およびGFP融合ゼオシン耐性遺伝子)

比較例 3 - 3 記載のpRH38 (図 5 4) をBglIIにて消化し、ブラストサイジン耐性遺伝子カセットを含むDNA断片を比較例 4 - 2 記載のpTM2 (図 6 6) のBglIIサイトに繋いだ。これをpTM6と名付けた。

比較例 3 - 4 記載のpRH51 (図 5 7) をBglIIにて消化し、GFP融合ゼオシン耐性遺伝子カセットを含むDNA断片を比較例 4 - 2 記載のpTM2 (図 6 6) のBglIIサイトに繋いだ。これをpTM8と名付けた。

作製した2種のターゲティングベクター(pTM6および8)を図 6 7 に示す。

[0095] [比較例 4 - 4] *Thraustochytrium aureum* OrfA破壊株への $\Delta 4$ デサチュラーゼ遺伝子ターゲティングベクター導入

比較例 4 - 3 で作製した2種類のターゲティングベクターを鋳型に、TM03(比較例 4 - 1 記載。配列番号181)およびTM04(比較例 4 - 1 記載。配列番号182)をprimerとして用いて、PrimeSTAR HS DNA polymerase (タカラバイオ社製)により遺伝子を増幅した。[PCR cycles: 98°C 3min/ 98°C 10 sec, 55°C 5 sec, 72°C 4 min, 30 cycles/ 72°C 3 min]。フェノールクロロホルム抽出、クロロホルム抽出後、DNAをエタノール沈殿させ、沈殿を0.1×TEに溶解した。A260/280を測定しDNA濃度を算出した。比較例 4 - 3 記載pTM6 (図 6 7) を鋳型とした際に得られる導入断片は 3264 bpで、*Thraustochytrium aureum* $\Delta 4$ デサチュラーゼ遺伝子上流-SV40 terminator 配列-ブラストサイジン耐性遺伝子配列-ubiquitin promoter-*Thraustochytrium aureum* $\Delta 4$ デサチュラーゼ遺伝子内の配列という並びになる (配列番号187)。比較例 4 - 3 記載pTM8 (図 6 7) を鋳型とした際に得られる導入断片は 3935 bpで、*Thraustochytrium aureum* $\Delta 4$ デサチュラーゼ遺伝子上流-SV40 terminator 配列-ゼオシン耐性遺伝子配列-Enhanced GFP遺伝子配列-ubiquitin promoter-*Thraustochytrium aureum* $\Delta 4$ デサチュラーゼ遺伝子内の配列という並びになる (

配列番号188)。

比較例 2 記載のPUFA PKS経路関連遺伝子: OrfA遺伝子破壊株をGY培地中で4日間培養し、対数増殖期にある細胞を遺伝子導入に使用した。OD₆₀₀ = 1~1.5相当分の細胞に対し、0.625 μ gのDNA断片を遺伝子銃法 (マイクロキャリア: 0.6 micronの金粒子、target distance: 6 cm、chamber vacuum: 26 mmHg、Rupture disk: 1,100 PSI) により導入した。遺伝子導入した細胞は4~6時間のリカバリータイムの後、PDA寒天平板培地(20 mg/ml ゼオシン 含有もしくは0.2 mg/ml ブラストサイジン含有)に塗布した。この結果、1撃ちこみあたり100から200個の薬剤耐性株を得た。

[0096] [比較例 4 - 5] Δ 4デサチュラーゼ遺伝子ジーンターゲティング相同組換体の同定

実施例 2 - 2 記載の方法で、*Thraustochytrium aureum*および*Thraustochytrium aureum* OrfA破壊株における Δ 4デサチュラーゼ遺伝子の破壊株からゲノムDNAを抽出後、A₂₆₀/A₂₈₀を測定しDNA濃度を算出した。これを鋳型にし、Mighty Amp DNA polymerase (タカラバイオ社製)を用いてゲノム構造確認のPCRを行った。用いたprimerの位置、増幅に用いる組み合わせ、増幅産物の予想サイズを図68に示す。TM01は Δ 4デサチュラーゼ遺伝子上流、TM02は Δ 4デサチュラーゼ遺伝子下流、RH0198(配列番号191)およびRH049(比較例 3 - 3 記載。配列番号153) はブラストサイジン耐性遺伝子上、RH0128はEnhanced GFP遺伝子上、RH064(比較例 3 - 4 記載。配列番号165)はゼオシン耐性遺伝子上に、それぞれ設定した。[TM01: 23 mer: 5' - AAA AGA ACA AGC CCT CTC CTG GA -3' (配列番号189)、TM02: 23 mer: 5' - GAG GTT TGT ATG TTC GGC GG T TT -3' (配列番号190)、RH0198: 26 mer: 5' - TGG GGG ACC TTG TGC AGA ACT CGT GG -3' (配列番号191)、RH0128: 22 mer: 5' - GAC CTA CGG CGT GCA GTG CTT C -3' (配列番号192)]。[PCR cycles: 98°C 2 min/ 98°C 10 sec, 68°C 4 min 30 sec, 30 cycles/ 68°C 4min]。野生型アリル (Wt allele) に増幅がなく、ブラストサイジン耐性遺伝子アリル (BlaR allele) およびゼオシン耐性遺伝子アリル (ZeoR allele) に増幅のある Δ 4デサチュラー

ゼ遺伝子遺伝子破壊株が得られた（図69）。この実験により、Thraustochytrium aureum ATCC 34304株は、PKS経路関連遺伝子：OrfA および $\Delta 4$ デサチュラーゼ遺伝子を欠損しても栄養要求性にならないことが分かった。

[0097] [比較例4-6] Thraustochytrium aureum OrfA破壊株における $\Delta 4$ デサチュラーゼ遺伝子の破壊による脂肪酸組成の変化

実施例2-9記載の方法でThraustochytrium aureum ATCC 34304および遺伝子破壊株を培養、凍結乾燥後、脂肪酸をメチルエステル化し、GCを用いて解析した。GC解析にはガスクロマトグラフGC-2014（島津製作所社製）を使用し、カラム：HR-SS-10（30 m x 0.25 mm；信和化工社製）、カラム温度：150℃ → (5℃/min) → 220℃（10 min）、キャリアガス：He（1.3 mL/min）の条件で行った。

脂肪酸組成の変化を図70に示す。また、図71に野生型株を100%とした時の割合を示す。全脂肪酸組成のうちARA6.35%, DGLA0.90%, ETA0.28%, EPA6.22%, n-6DPA0.21%, DHA0.51%を示している。GC面積でLA/DHAの値8.76, GLA/DHAの値1.59, DGLA/DHAの値1.76, ARA/DHAの値12.45, EPA/DHAの値12.20, LA/EPAの値0.72, GLA/EPAの値0.13, DTA/EPAの値1.77, DTA/ARAの値1.73, DTA/DGLAの値12.23, LA/n-6DPAの値21.29, GLA/n-6DPAの値3.86, DGLA/n-6DPAの値4.29, ARA/n-6DPAの値30.24, EPA/n-6DPAの値29.62, DGLA/LAの値0.20, ARA/LAの値1.42, EPA/LAの値1.39, DTA/LAの値2.46, DGLA/GLAの値1.11, ARA/GLAの値7.84, n-6DPA/DTAの値0.02, DHA/n-3DPAの値0.03, C20PUFA/C22PUFAの値0.50, n-6PUFA/n-3PUFAの値0.81を示している。

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

このように内因性エロンガーゼ/デサチュラーゼ経路と内因性PUFA-PKS経路の両方を有するThraustochytrium aureum ATCC34304から、DHAとDPA n-6をほとんど生合成できない株を作出するためには、エロンガーゼ/デサチュラーゼ

経路を構成する酵素の遺伝子（例えば $\Delta 4$ デサチュラーゼ遺伝子）とPUFA-PKS遺伝子の両方の遺伝子を破壊しなければならないことが明らかになった。

[0098] このようにして得られた微生物油を用いることにより、DHA, n-6 DPA以外のPUFAの組成比率を上げた脂肪酸組成の微生物油を得ることができる。DHAを多く産生する微生物をもとにして、遺伝子を改変することにより任意のPUFAを生産することが可能となる。またDHA, n-6 DPAが特に少ない微生物油を作ることにより、精製する工程で負担の少ない微生物油を作ることができる。また、このように微生物にエロンガーゼ、デサチュラーゼを導入することにより、微生物油を産生する微生物を得ることができる。

産業上の利用可能性

[0099] ラビリンチュラ類という微生物において、高度不飽和脂肪酸（PUFA）の生合成経路として新規の「パターン」を発見した。エロンガーゼ／デサチュラーゼ経路のみでPUFAを生産するラビリンチュラを提供することができるため、エロンガーゼ／デサチュラーゼ経路のみを利用してPUFAを大量生産することが期待される。

請求の範囲

- [請求項1] 下記（a）～（g）からなる群から選ばれる1以上を満たす、微生物油であって、微生物がラビリンチュラ類である微生物油。
- （a）ARAが全脂肪酸組成のうち、5%以上である。
 - （b）DGLAが全脂肪酸組成のうち、2.5%以上である。
 - （c）ETAが全脂肪酸組成のうち、0.35%以上である。
 - （d）EPAが全脂肪酸組成のうち、4%以上である。
 - （e）n-6DPAが全脂肪酸組成のうち、0.20%以下である。
 - （f）DHAが全脂肪酸組成のうち、0.50%以下である。
 - （g）DHAとn-6DPAの合計が全脂肪酸組成のうち、0.7%以下である。
- [請求項2] 前記微生物油が、GC面積でn-6DPA/DTAの値が1.5以下を満たす、請求項1に記載の微生物油。
- [請求項3] 前記微生物油が、GC面積でDHA/n-3DPAの値が4以下を満たす、請求項1または2のいずれかに記載の微生物油。
- [請求項4] 前記微生物油が、GC面積でC20PUFA/C22PUFAの値が0.5以上50以下を満たす、請求項1ないし3のいずれかに記載の微生物油。
- [請求項5] 前記微生物油が、GC面積でn-6PUFA/n-3PUFAの値が1.8以上を満たす、請求項1ないし4のいずれかに記載の微生物油。
- [請求項6] ラビリンチュラ類が下記（A）および（B）からなる群から選ばれるラビリンチュラ類より得られる請求項1ないし5に記載の微生物油。
- （A）遺伝子を破壊または／および発現抑制することにより、脂肪酸組成が改変されたラビリンチュラ類。
 - （B）遺伝子を破壊または／および発現抑制することに加えて、さらに遺伝子を導入することにより、脂肪酸組成が改変されたラビリンチュラ類。
- [請求項7] 脂肪酸組成が改変するように遺伝子改変されたラビリンチュラ類から

得られる微生物油。

- [請求項8] 破壊または／および発現抑制する遺伝子が、P K S 遺伝子、脂肪酸鎖長伸長酵素遺伝子、および／または脂肪酸不飽和化酵素遺伝子である、請求項 6 または 7 に記載の微生物油。
- [請求項9] 導入する遺伝子が、脂肪酸鎖長伸長酵素遺伝子および／または脂肪酸不飽和化酵素遺伝子である、請求項 6 ないし 8 に記載の微生物油。
- [請求項10] 脂肪酸鎖長伸長酵素遺伝子がC 2 0 エロンゲース遺伝子である、請求項 8 または 9 に記載の微生物油。
- [請求項11] 脂肪酸不飽和化酵素遺伝子が $\Delta 4$ デサチュラーゼ遺伝子および／または $\omega 3$ デサチュラーゼ遺伝子である、請求項 8 または 9 のいずれかに記載の微生物油。
- [請求項12] ラビリンチュラ類の遺伝子を破壊または導入する方法が、エレクトロポレーション、遺伝子銃法またはゲノム編集によって行うことを特徴とする、請求項 6 ないし 1 1 のいずれかに記載の微生物油。
- [請求項13] ラビリンチュラ類の遺伝子を発現抑制する方法が、アンチセンス法あるいはR N A 干渉であることを特徴とする、請求項 6 ないし 1 2 のいずれかに記載の微生物油。
- [請求項14] 下記 (C) および (D) からなる群から選ばれるラビリンチュラ類から得られる微生物油。
- (C) P U F A - P K S 経路による P U F A の生産能が無いあるいは極めて微弱であるラビリンチュラ類。
- (D) 元来有する P U F A - P K S を破壊あるいは極めて微弱に発現を抑制したラビリンチュラ類。
- [請求項15] P U F A - P K S 経路による P U F A の生産能が無いあるいは極めて微弱であるラビリンチュラ類が、P a r i e t i c h y t r i u m 属または S c h i z o c h y t r i u m 属に属するラビリンチュラ類である、請求項 1 4 に記載の微生物油。

- [請求項16] P a r i e t i c h y t r i u m属に属するラビリンチュラ類が、
P a r i e t i c h y t r i u m s a r k a r i a n u mに属する
ラビリンチュラ類である、請求項15に記載の微生物油。
- [請求項17] S c h i z o c h y t r i u m属に属するラビリンチュラ類が、
S c h i z o c h y t r i u m a g g r e g a t u mに属するラビ
リンチュラ類である、請求15に記載の微生物油。
- [請求項18] P a r i e t i c h y t r i u m s a r k a r i a n u mに属する
微生物が、
P a r i e t i c h y t r i u m sp. SEK358、FERM
BP-11405、P a r i e t i c h y t r i u m s a r k a r
i a n u m SEK364、FERM BP-11298またはP a
r i e t i c h y t r i u m sp. SEK571、FERM BP
-11406である、請求項16に記載の微生物油。
- [請求項19] S c h i z o c h y t r i u m a g g r e g a t u mに属する微生物が、
S c h i z o c h y t r i u m a g g r e g a t u m ATCC2
8209である、請求項17に記載の微生物油。
- [請求項20] 元来有するPUFA-PKSを破壊あるいは極めて微弱に発現を抑制
したラビリンチュラ類が、T h r a u s t o c h y t r i u m属であ
る、請求項14に記載の微生物油。
- [請求項21] T h r a u s t o c h y t r i u m属が、T h r a u s t o c h y t
r i u m a u r e u mである、請求項20に記載の微生物油。
- [請求項22] 前記微生物油が、下記(E)～(H)からなる群から選ばれる1以上
を満たす、請求項1ないし21に記載の微生物油。
- (E) ARAが改変前に比較して改変後のGC面積比率が3倍以上
である微生物油。
- (F) DGLAが改変前に比較して改変後のGC面積比率が4倍以上
である微生物油。

(G) E T A が改変前に比較して改変後の G C 面積比率が 7 倍以上である微生物油。

(H) E P A が改変前に比較して改変後の G C 面積比率が 7 倍以上である微生物油。

[請求項23] 微生物油が、G C 面積で $n-6 \text{ D P A} / \text{D T A}$ の値が 1. 5 以下の微生物油である、請求項 2 2 に記載の微生物油の作成方法。

[請求項24] 微生物油が、G C 面積で $\text{D H A} / n-3 \text{ D P A}$ の値が 4 以下の微生物油である、請求項 2 2 または 2 3 のいずれかに記載の微生物油の作成方法。

[請求項25] 微生物油が、G C 面積で $\text{C 2 0 P U F A} / \text{C 2 2 P U F A}$ の値が 0. 5 以上 5 0 以下の微生物油である、請求項 2 2 ないし 2 4 のいずれかに記載の微生物油の作成方法。

[請求項26] 微生物油が、G C 面積で $n-6 \text{ P U F A} / n-3 \text{ P U F A}$ の値が 1. 8 以上の微生物油である、請求項 2 2 ないし 2 5 に記載の微生物油の作成方法。

[請求項27] 脂肪酸組成が改変するように遺伝子改変されたラビリンチュラ類から得られる微生物油の作成方法。

[請求項28] 下記 (A) および (B) からなる群から選ばれる、脂肪酸組成が改変するように遺伝子改変されたラビリンチュラ類に微生物油を産生させることを特徴とする、請求項 2 6 ないし 2 7 に記載の微生物油を作成する方法。

(A) 遺伝子を破壊または／および発現抑制することにより、脂肪酸組成が改変されたラビリンチュラ類。

(B) 遺伝子を破壊または／および発現抑制することに加えて、さらに遺伝子を導入することにより、脂肪酸組成が改変されたラビリンチュラ類。

[請求項29] 破壊または／および発現抑制する遺伝子が、P K S 遺伝子、脂肪酸鎖長伸長酵素遺伝子、および／または、脂肪酸不飽和化酵素遺伝子であ

る、請求項 28 に記載の微生物油の作成方法。

[請求項30] 導入する遺伝子が、脂肪酸鎖長伸長酵素遺伝子、および/または、脂肪酸不飽和化酵素遺伝子である、請求項 28 または 29 に記載の微生物油の作成方法。

[請求項31] 脂肪酸鎖長伸長酵素遺伝子が、C20 エロンゲース遺伝子である、請求項 29 または 30 に記載の微生物油の作成方法。

[請求項32] 脂肪酸不飽和化酵素が、 $\Delta 4$ デサチュラーゼ遺伝子、および/または、 $\omega 3$ デサチュラーゼ遺伝子である、請求項 29 または 30 のいずれかに記載の微生物油の作成方法。

[請求項33] ラビリンチュラ類の遺伝子を破壊または導入する方法が、エレクトロポレーション、遺伝子銃法またはゲノム編集によって行うことを特徴とする、請求項 28 ないし 32 に記載の微生物油の作成方法。

[請求項34] ラビリンチュラ類の遺伝子を発現抑制する方法が、アンチセンス法あるいはRNA干渉であることを特徴とする、請求項 28 ないし 33 のいずれかに記載の微生物油の作成方法。

[請求項35] 下記 (C) および (D) からなる群から選ばれる、ラビリンチュラ類に微生物油を産生させることを特徴とする、請求項 28 ないし 34 に記載の微生物油を作成する方法。

(C) PUFA-PKS 経路による PUFA の生産能が無いあるいは極めて微弱であるラビリンチュラ類。

(D) 元来有する PUFA-PKS を破壊あるいは極めて微弱に発現を抑制したラビリンチュラ類。

[請求項36] 下記 (E) ~ (H) からなる群から選ばれる 1 以上を満たす微生物油を作成する方法。

(E) ARA が改変前に比較して改変後の GC 面積比率が 3 倍以上である微生物油。

(F) DGLA が改変前に比較して改変後の GC 面積比率が 4 倍以上である微生物油。

(G) E T A が改変前に比較して改変後の G C 面積比率が 7 倍以上である微生物油。

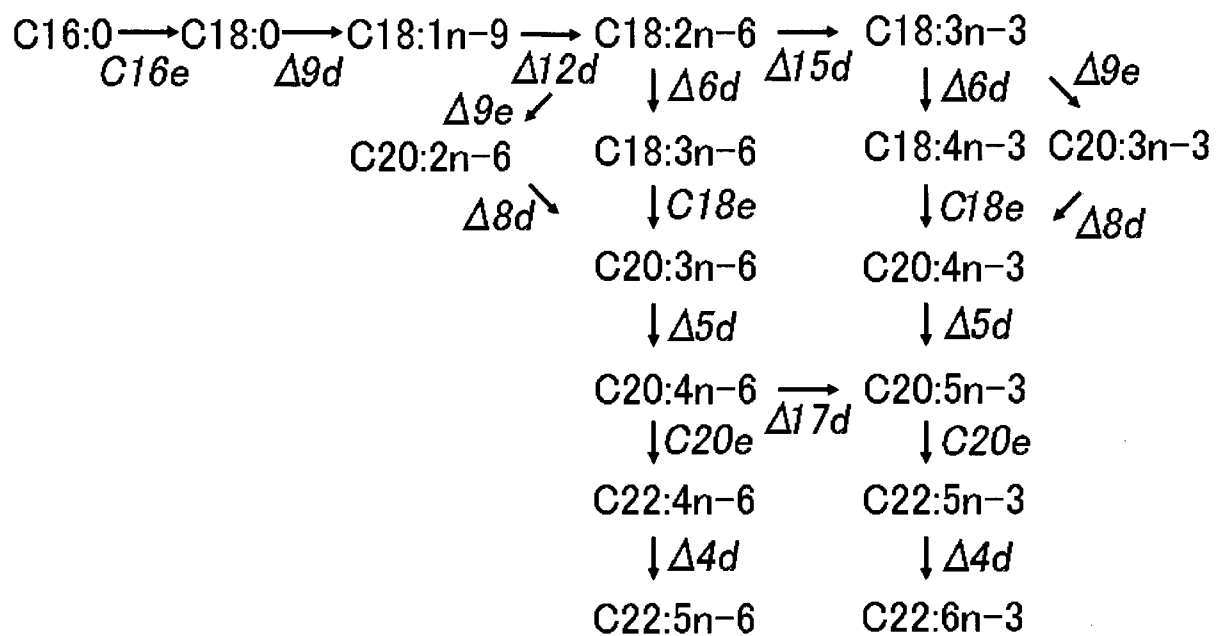
(H) E P A が改変前に比較して改変後の G C 面積比率が 7 倍以上である微生物油。

[請求項37] 脂質組成物として、請求項 1 ないし 2 2 のいずれかに記載の微生物油を含む、食品、飼料、医薬または工業製品。

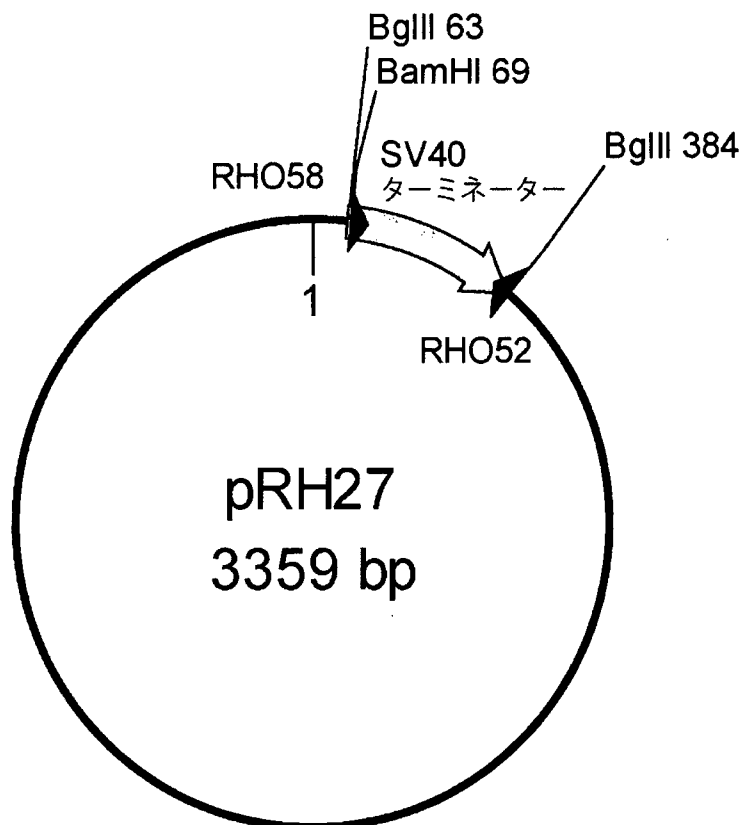
[請求項38] 請求項 1 ないし 2 2 のいずれかに記載の微生物油を産生する、産生する脂肪酸組成が改変するように遺伝子改変されたラビリンチュラ類。

[請求項39] 請求項 3 8 に記載の産生する脂肪酸組成が改変するように遺伝子改変されたラビリンチュラ類を作成する方法。

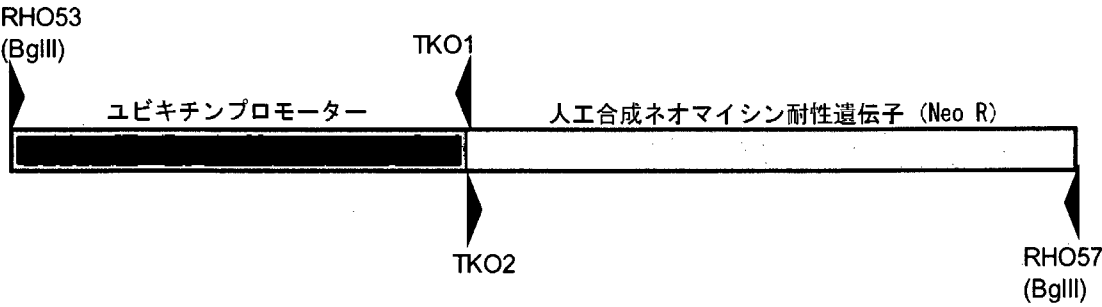
[図 1]



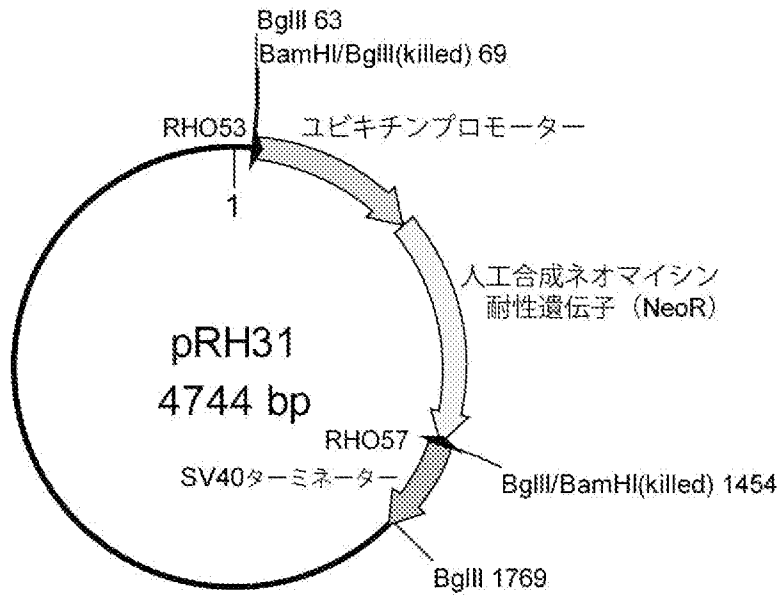
[図 2]



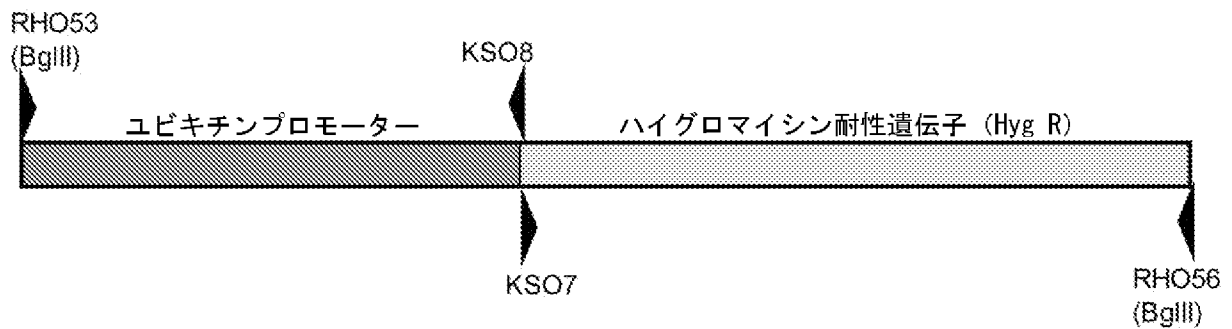
[図 3]



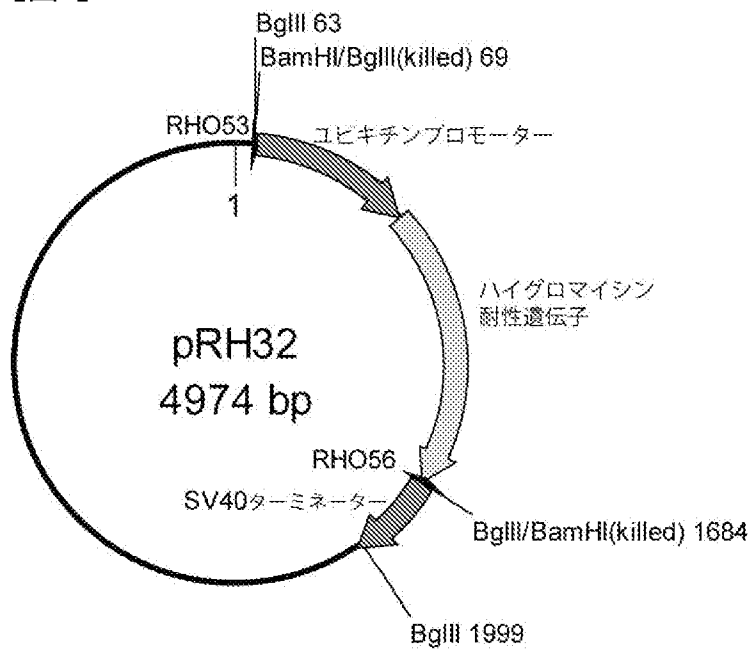
[図4]



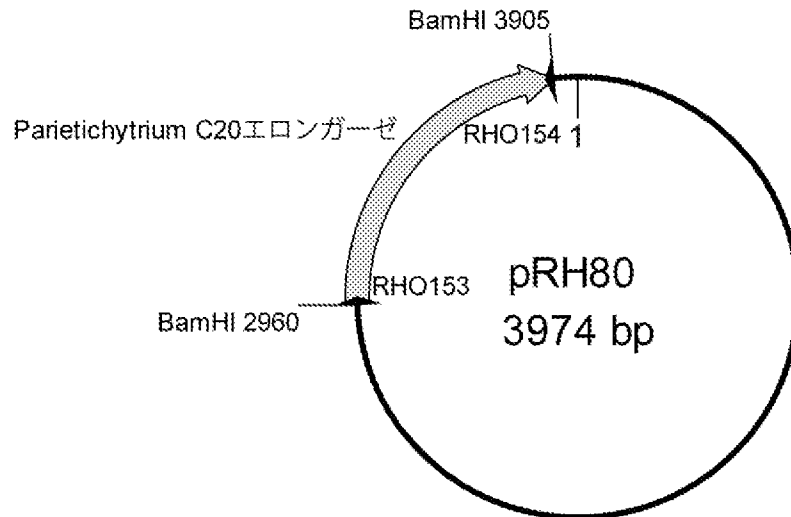
[図5]



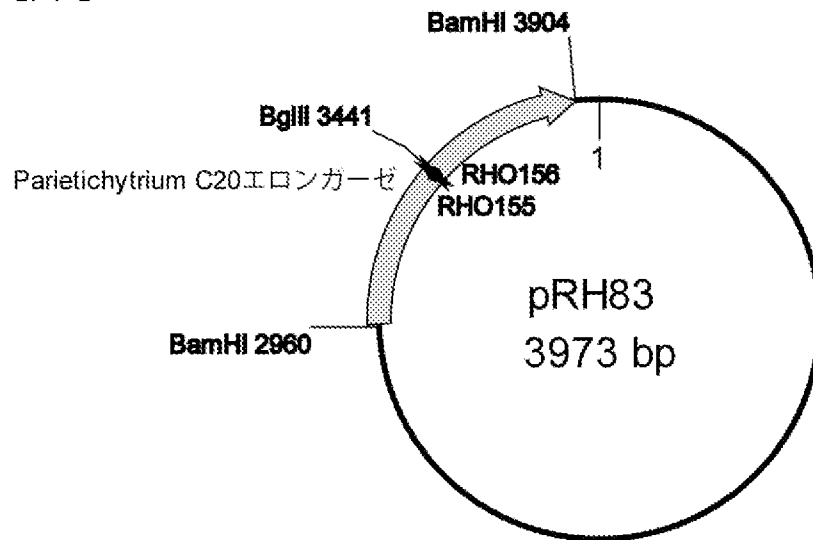
[図6]



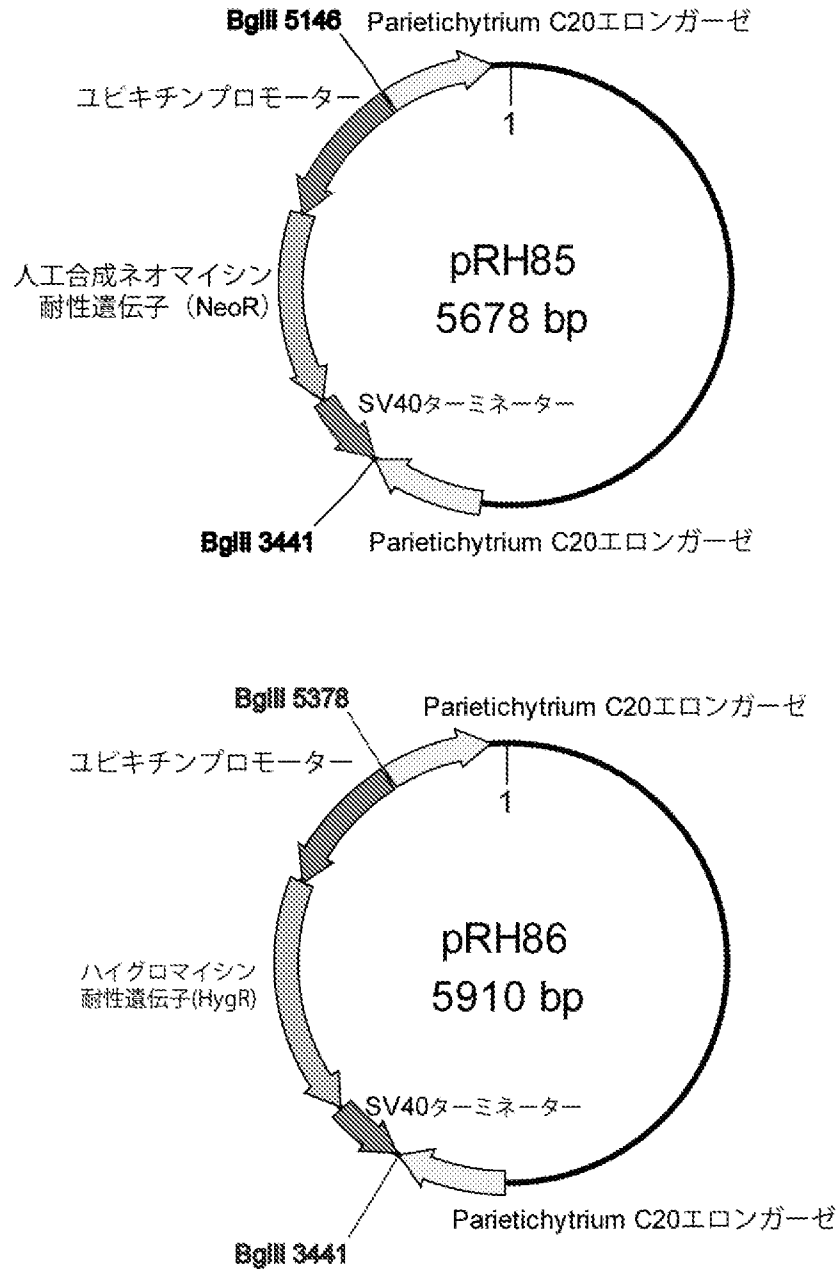
[図7]



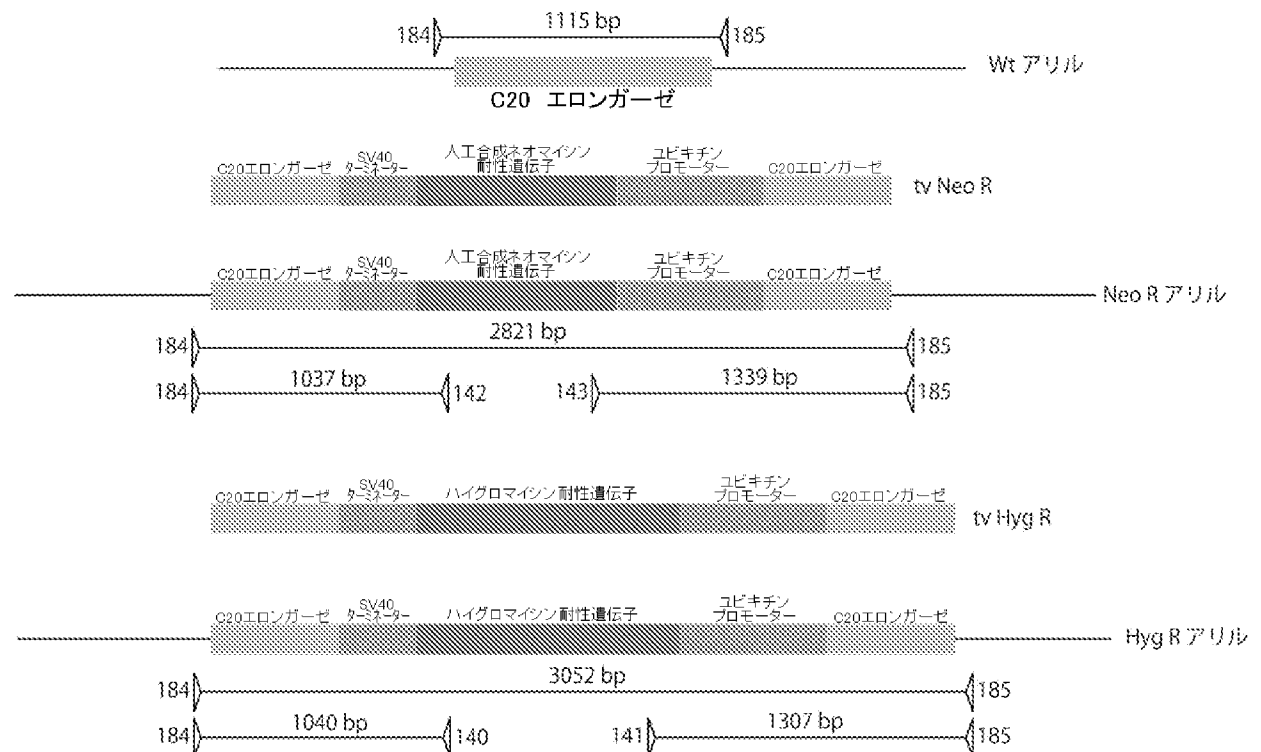
[図8]



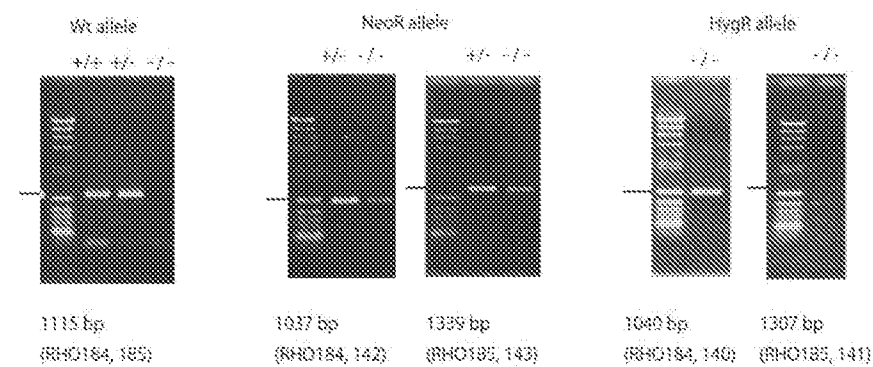
[図9]



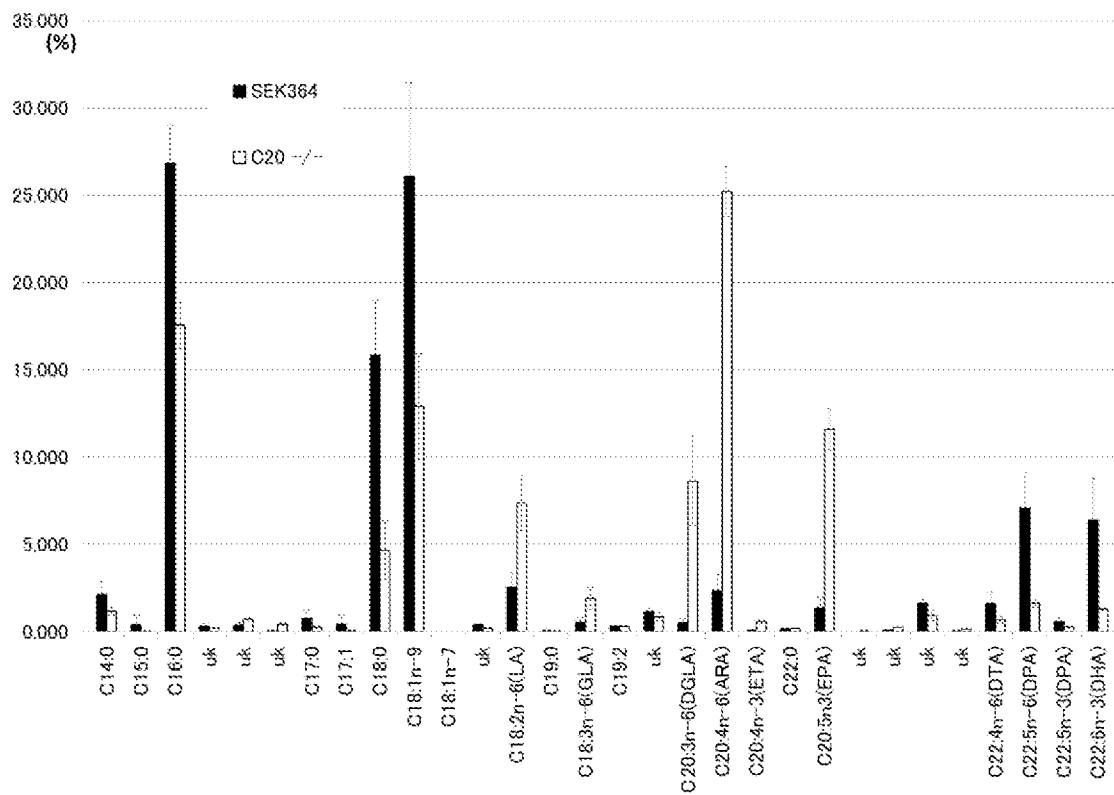
[図10]



[図11]



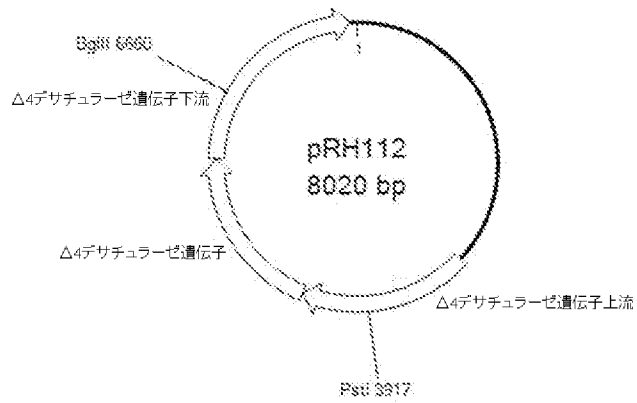
[図12]



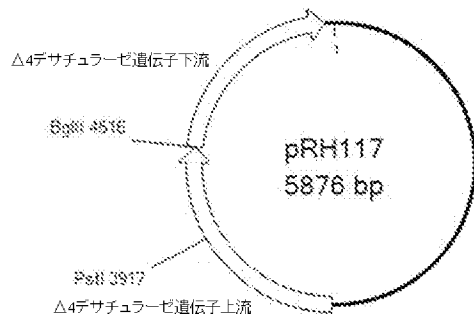
[図13]

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

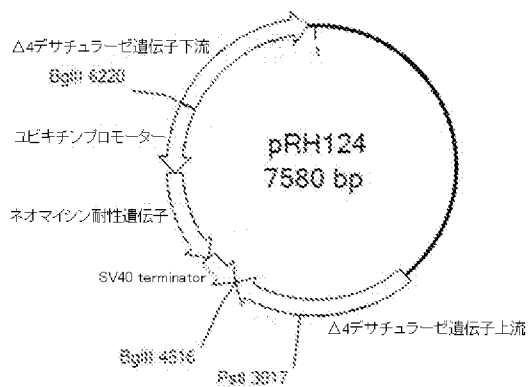
[図14]



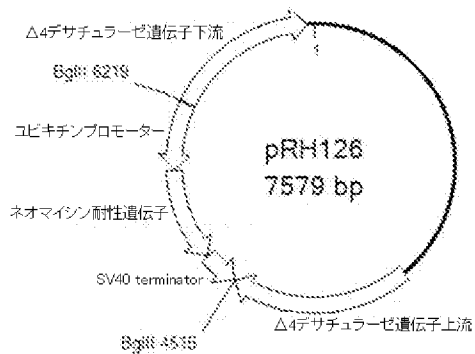
[図15]



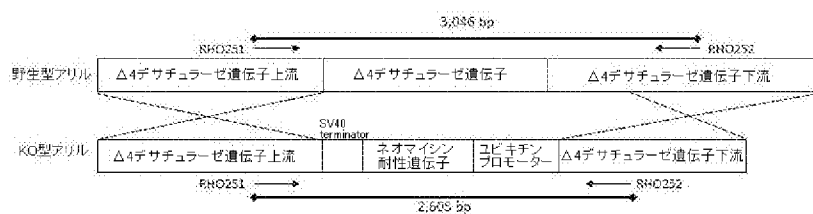
[図16]



[図17]



[図18]



[図 19]

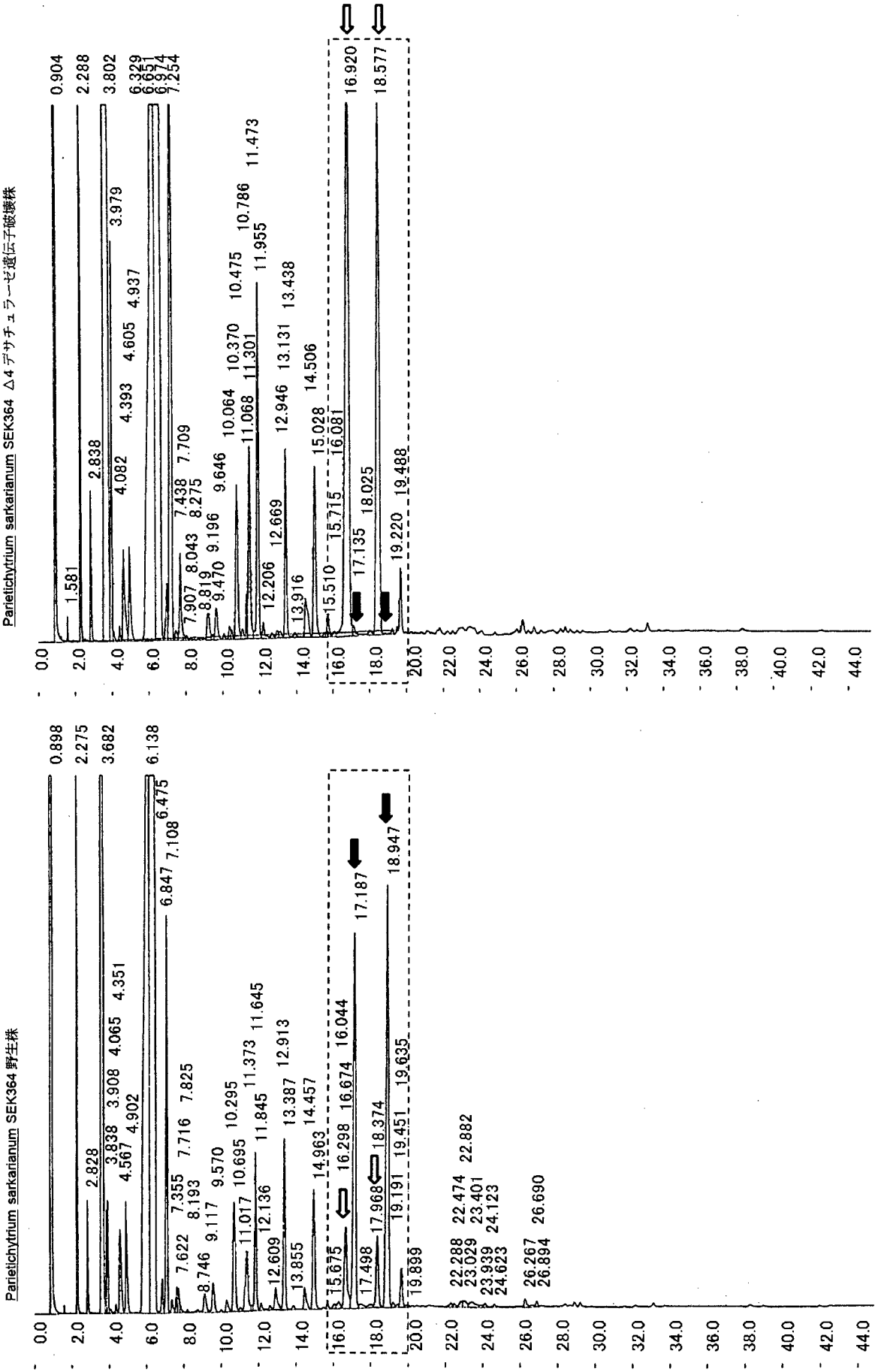


レーン1-8: 薬剤耐性株

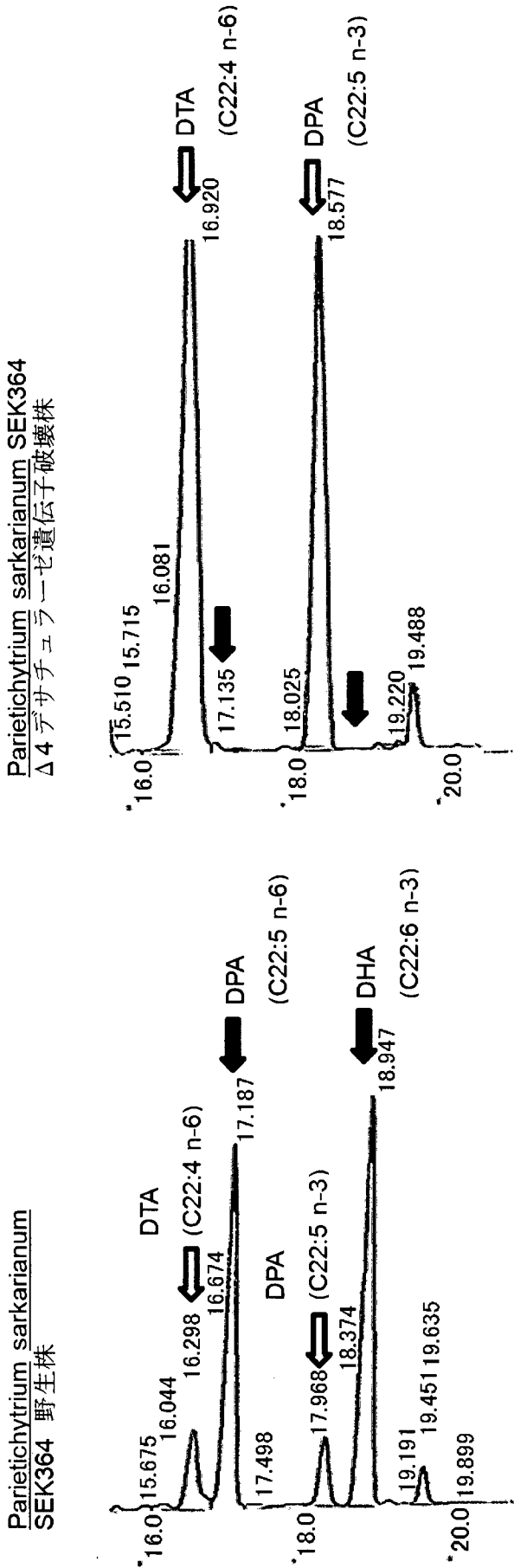
レーン9: 野生株

レーン7: $\Delta 4$ デサチュラーゼ遺伝子破壊株
($\Delta 4$ デサチュラーゼKO変異株)

[図 20]



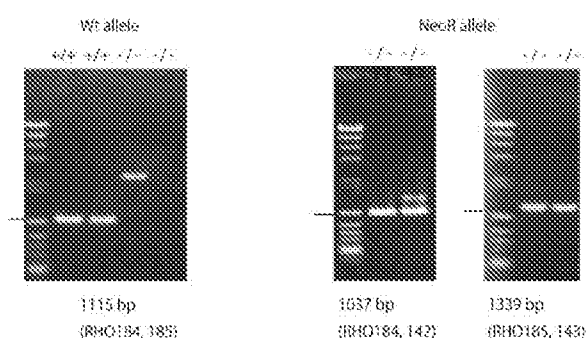
[図 21]



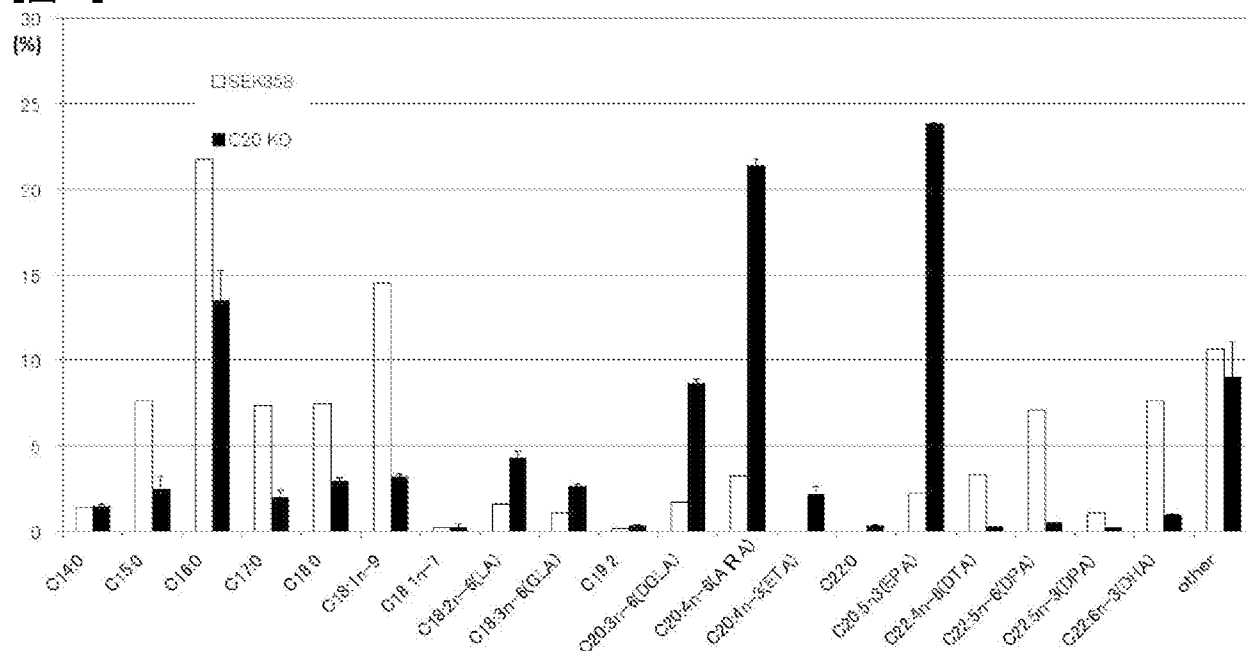
[図22]

Fatty acid(%)	SEK364	$\Delta 4$ desaturase KO	KO/SKE358
C14:0	2.24	2.65	118%
C16:0	20.28	29.67	146%
C18:0	16.69	15.80	95%
C18:1n-9	33.63	27.71	82%
C18:2n-6(LA)	2.71	4.05	150%
C18:3n-6(GLA)	0.19	0.38	198%
C20:3n-6(DGLA)	0.78	0.98	125%
C20:4n-6(ARA)	1.30	1.59	122%
C20:4n-3(ETA)	0.30	0.05	16%
C20:5n-3(EPA)	1.44	0.79	55%
C22:4n-6(DTA)	1.17	5.91	505%
C22:5n-6(n-6 DPA)	4.29	<0.005	<0.12%
C22:5n-3(n-3 DPA)	0.85	4.02	475%
C22:6n-3(DHA)	4.94	<0.005	<0.11%

[図23]



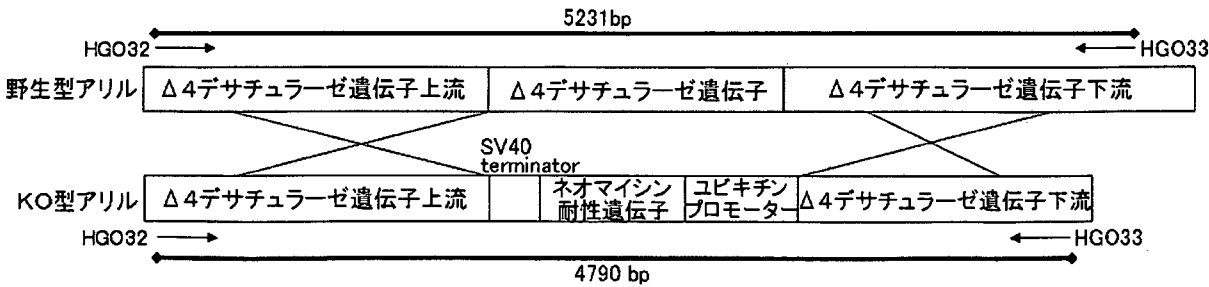
[図24]



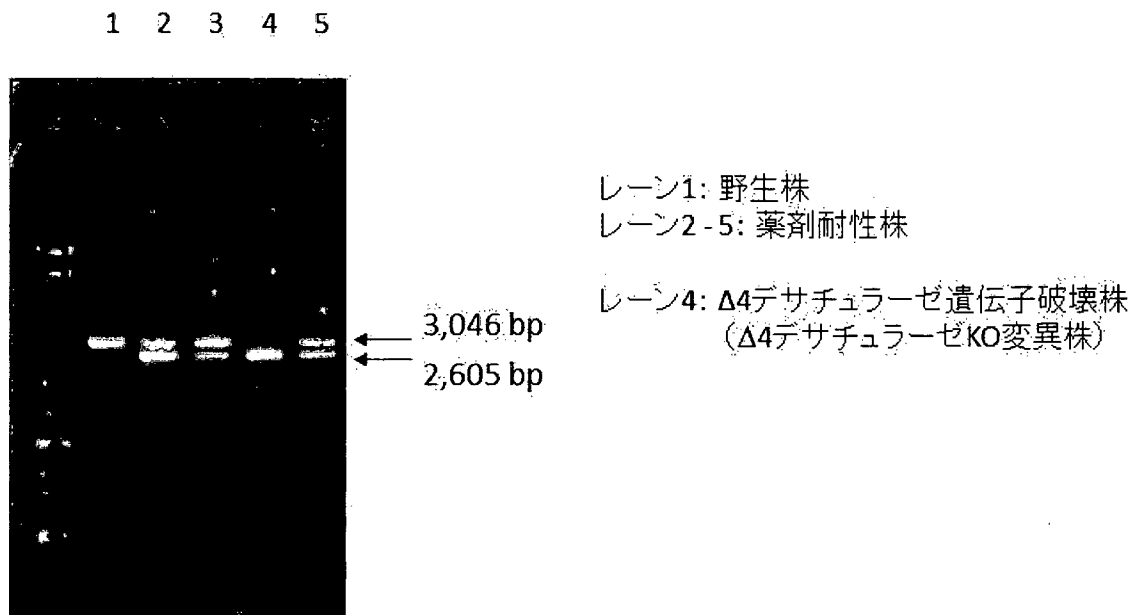
[図 25]

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

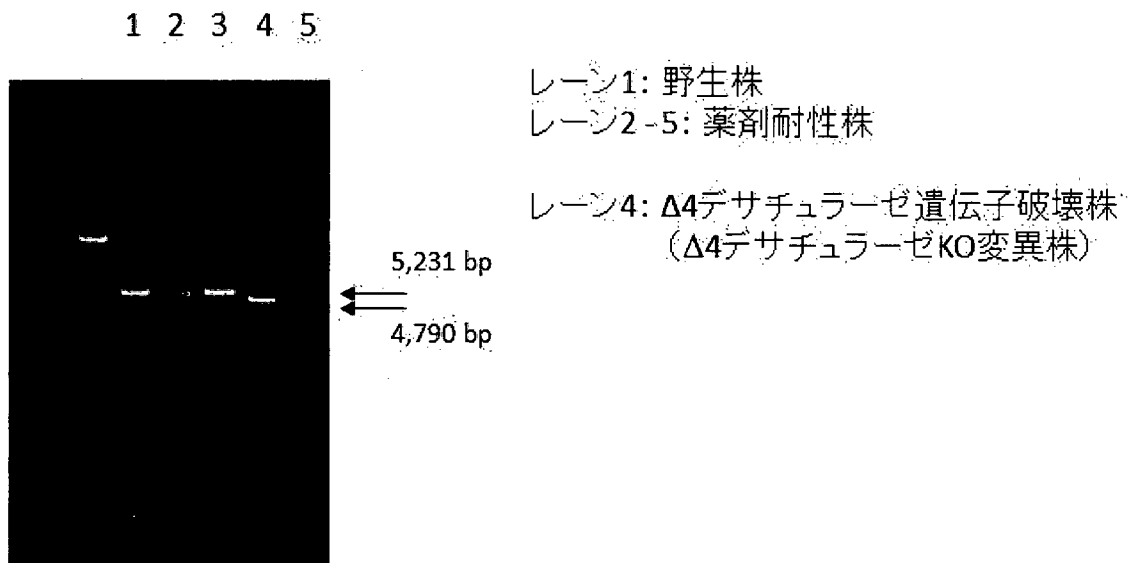
[図 26]



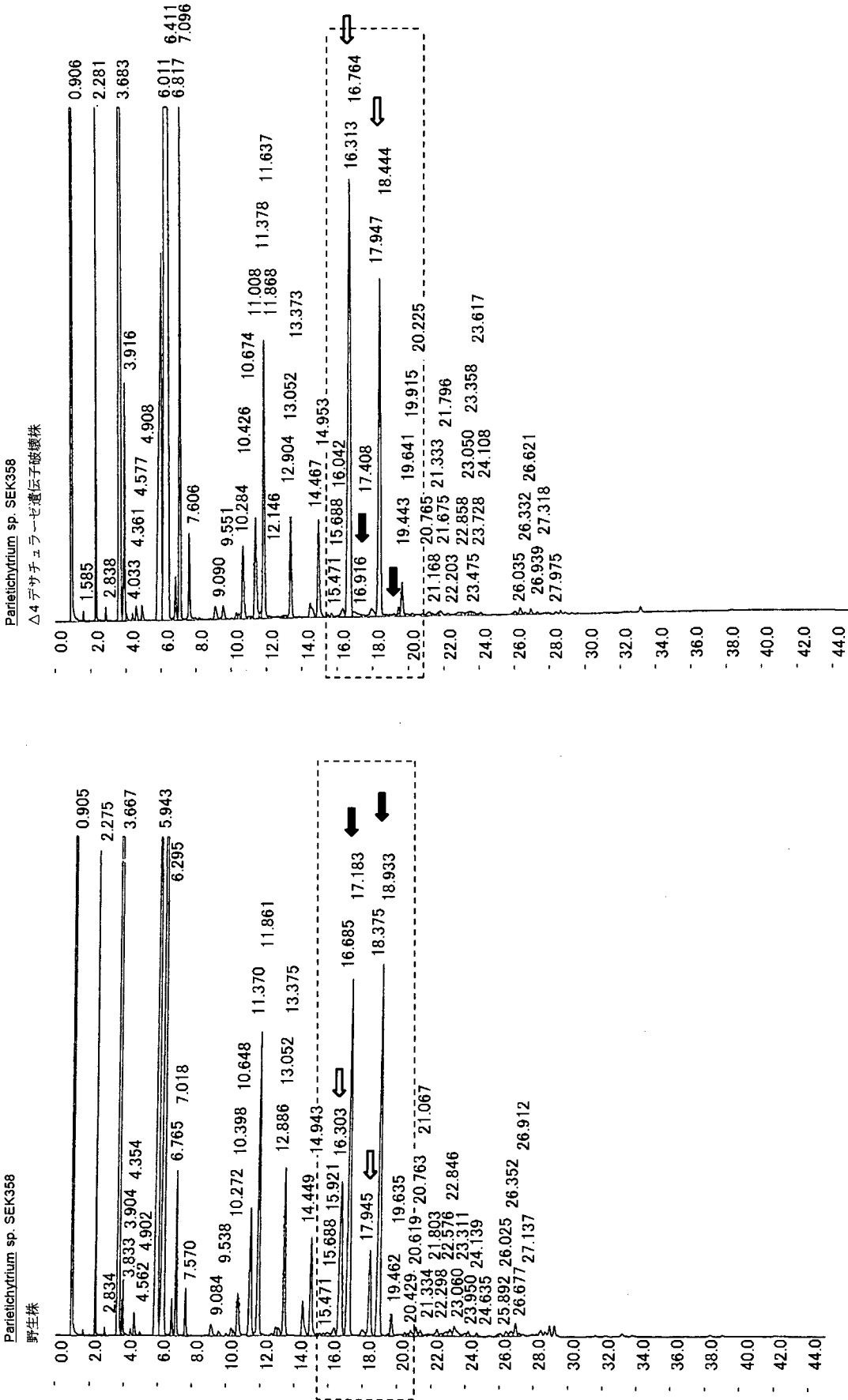
[図 27]



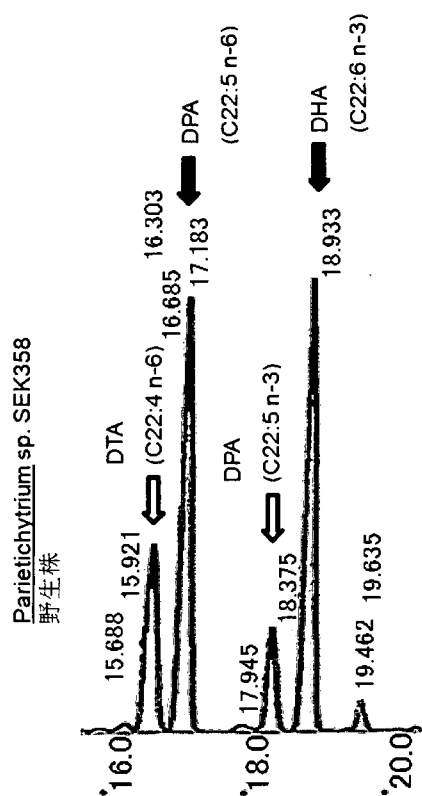
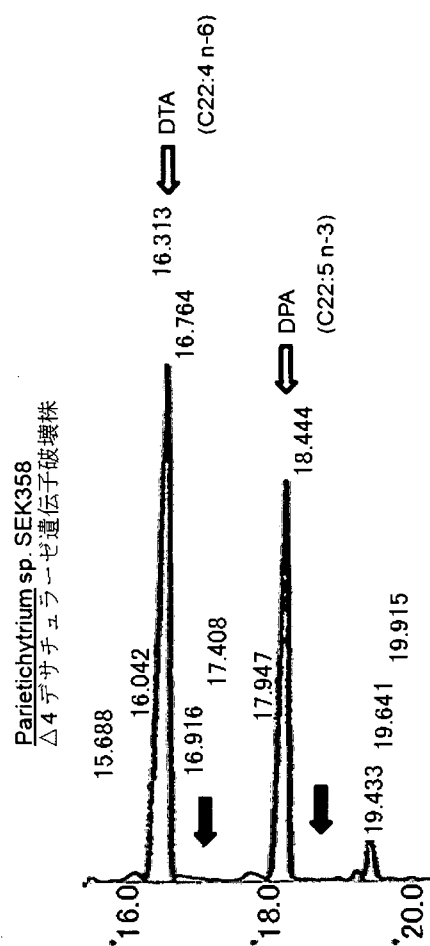
[図 28]



[図 29]



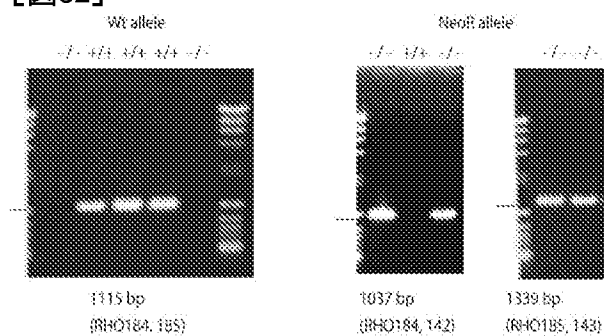
[図 30]



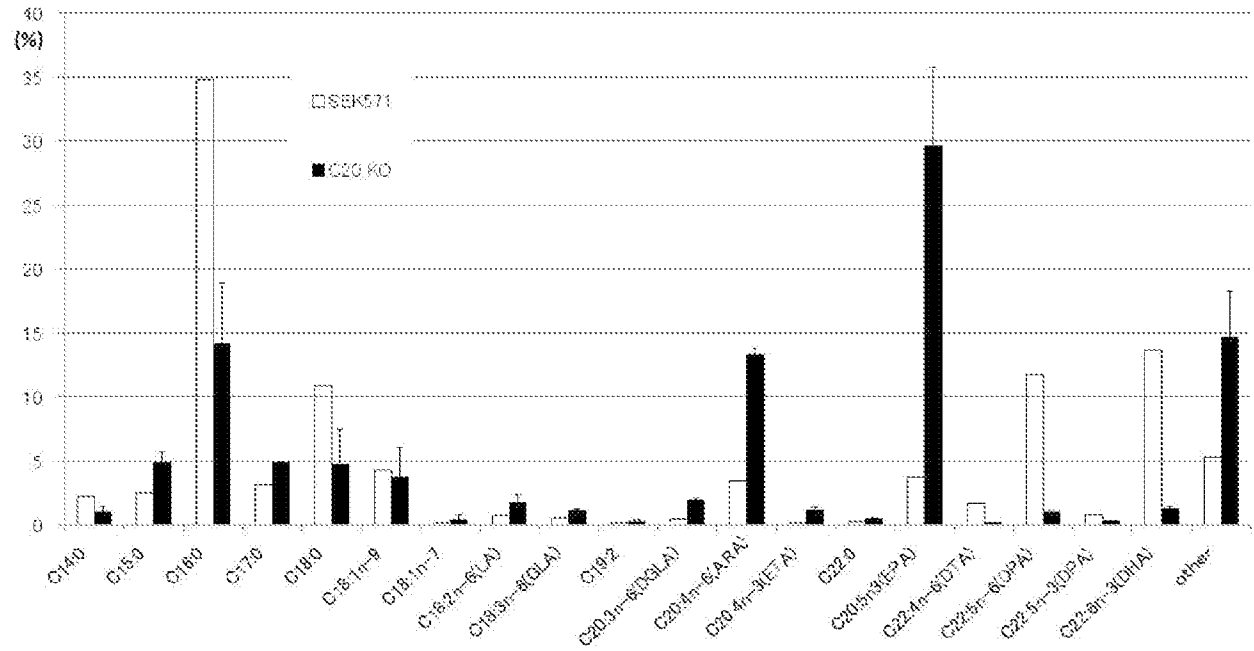
[図31]

Fatty acid(%)	SKE 358	$\Delta 4$ desaturase KO	KO/SKE358
C14:0	2.37	2.94	124%
C16:0	26.42	23.57	89%
C18:0	13.58	6.70	49%
C18:1n-9	17.26	34.57	200%
C18:2n-6(LA)	1.66	4.60	276%
C18:3n-6(GLA)	0.51	0.78	152%
C20:3n-6(DGLA)	2.21	1.35	61%
C20:4n-6(ARA)	4.59	3.03	66%
C20:4n-3(ETA)	0.16	0.03	20%
C20:5n-3(EPA)	2.40	1.10	46%
C22:4n-6(DTA)	3.72	7.88	212%
C22:5n-6(n-6 DPA)	7.32	<0.005	<0.07%
C22:5n-3(n-3 DPA)	1.67	5.10	305%
C22:6n-3(DHA)	7.13	<0.005	<0.07%

[図32]



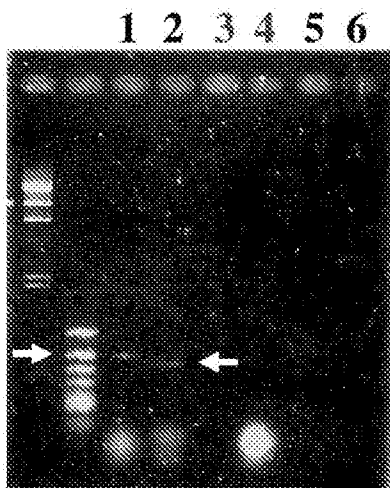
[図33]



[図34]

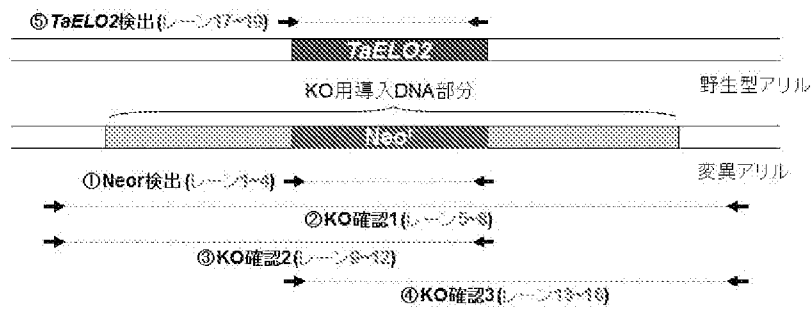
C20 elongase KO		SEK571	FA
43.8%	0.98	2.23	C14:0
197.0%	4.86	2.47	C15:0
40.6%	14.13	34.78	C16:0
152.7%	4.80	3.14	C17:0
43.4%	4.71	10.86	C18:0
85.5%	3.66	4.28	C18:1n-9
234.8%	0.37	0.16	C18:1n-7
251.6%	1.70	0.67	C18:2n-6(LA)
228.8%	1.07	0.47	C18:3n-6(GLA)
156.9%	0.24	0.16	C19:2
450.2%	1.93	0.43	C20:3n-6(DGLA)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

[図35]

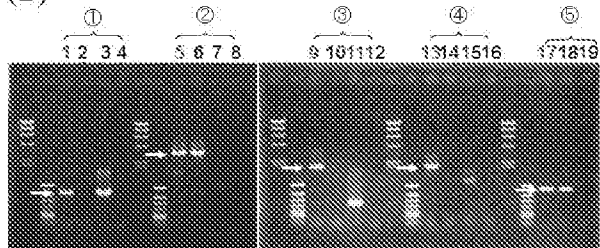


[図36]

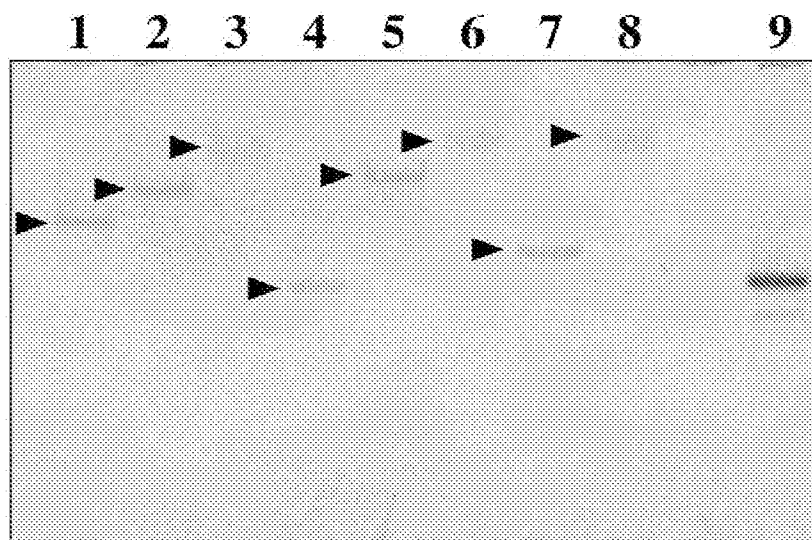
(A)



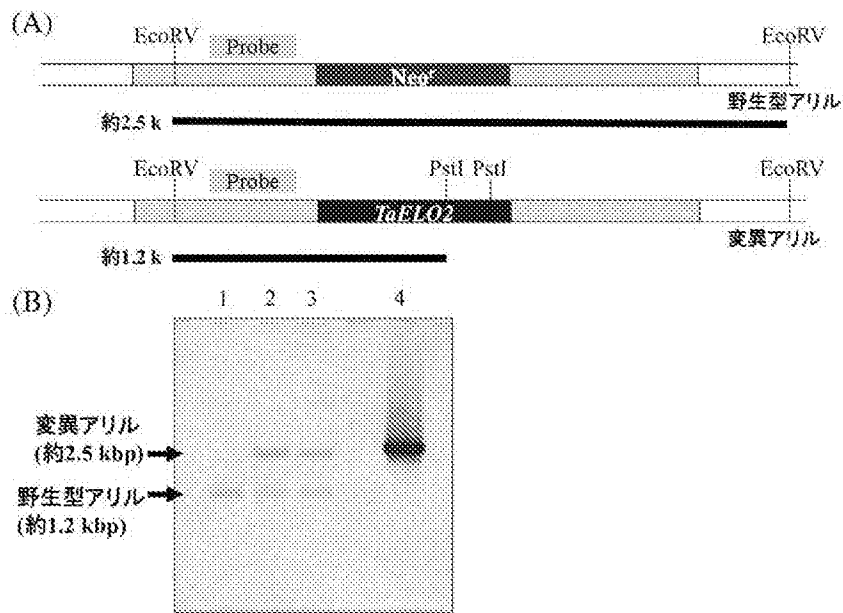
(B)



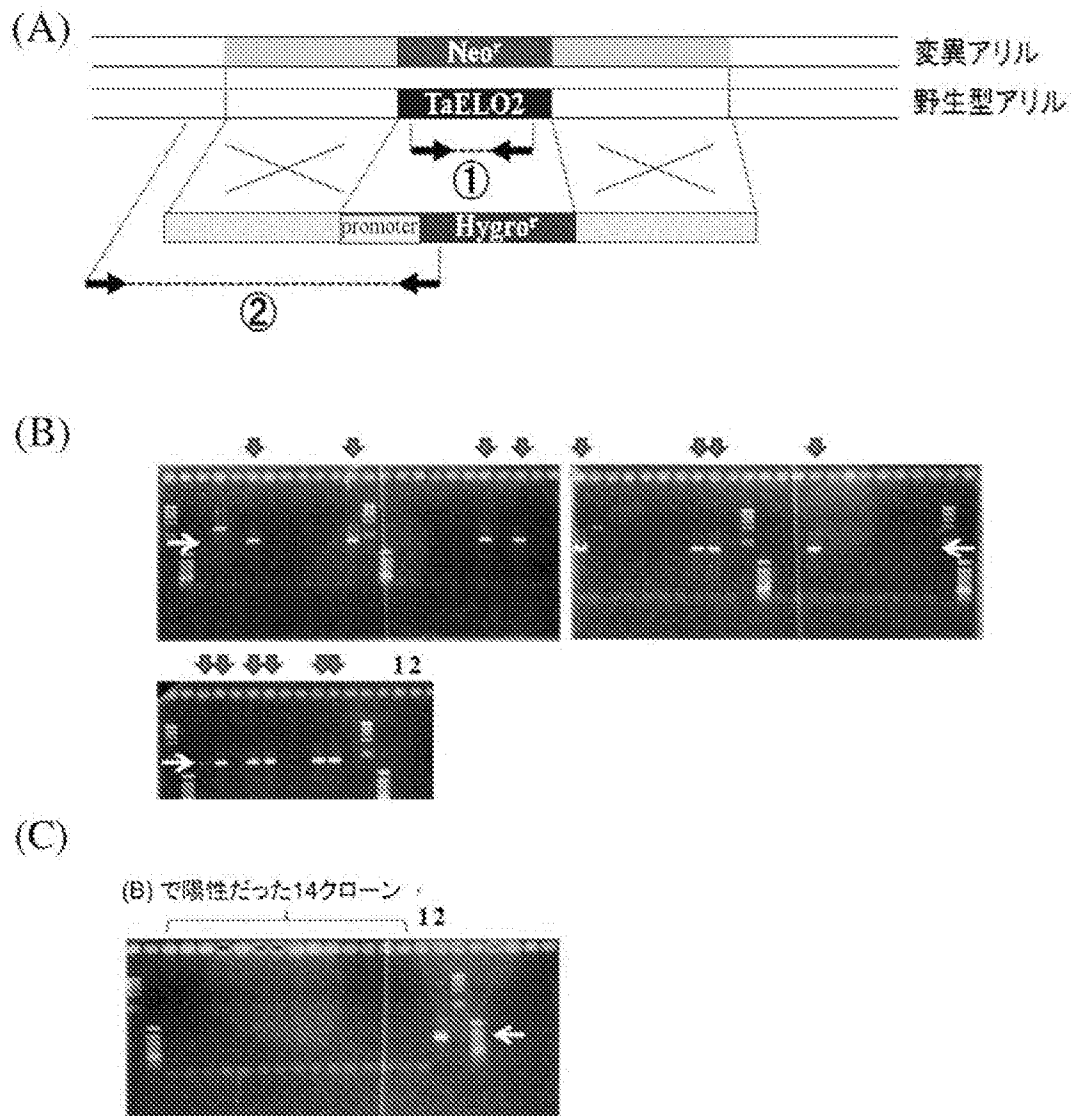
[図37]



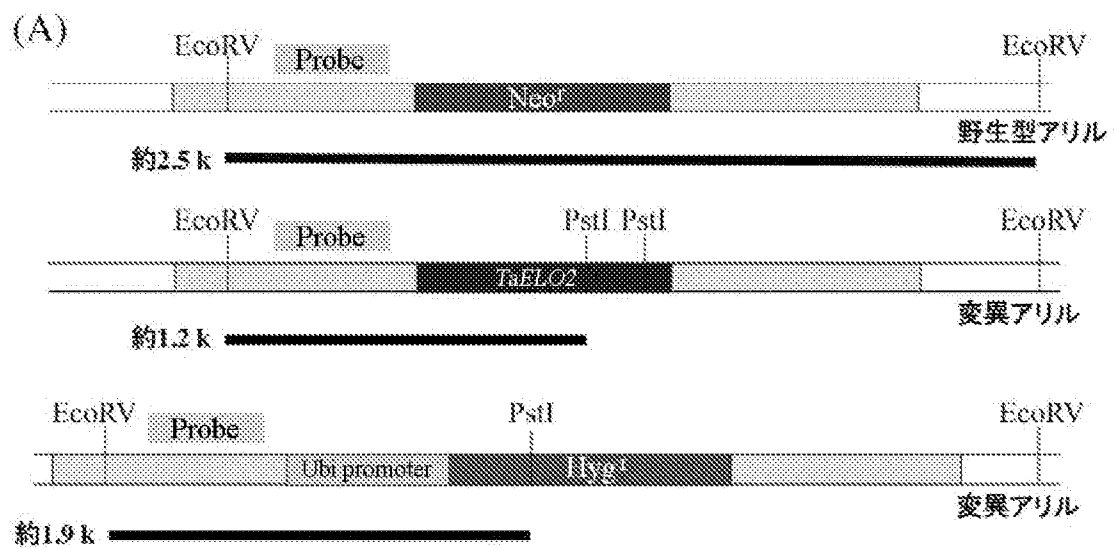
[図38]



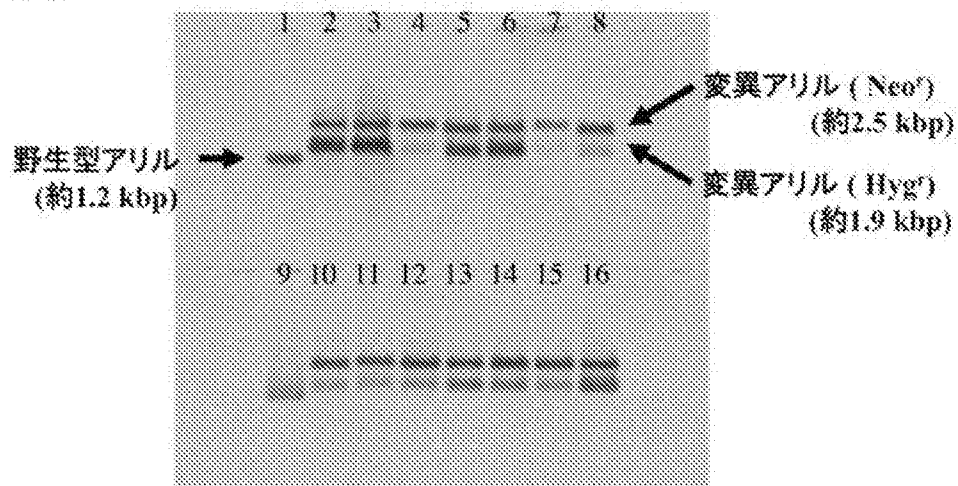
[図39]



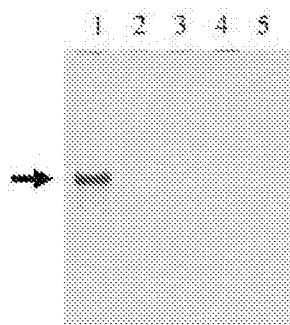
[図40]



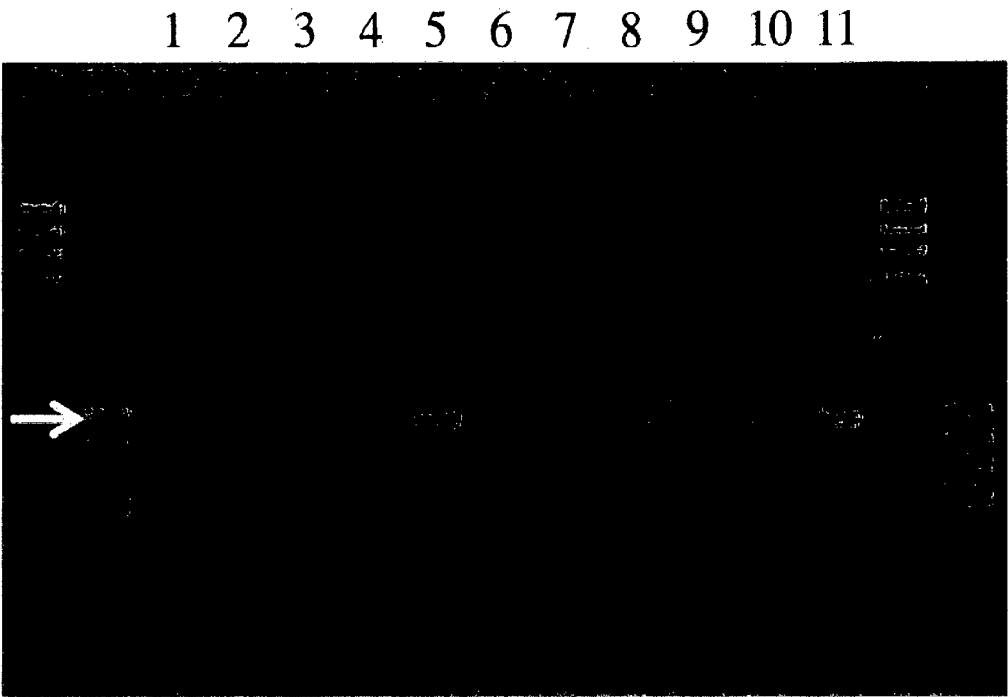
(B)



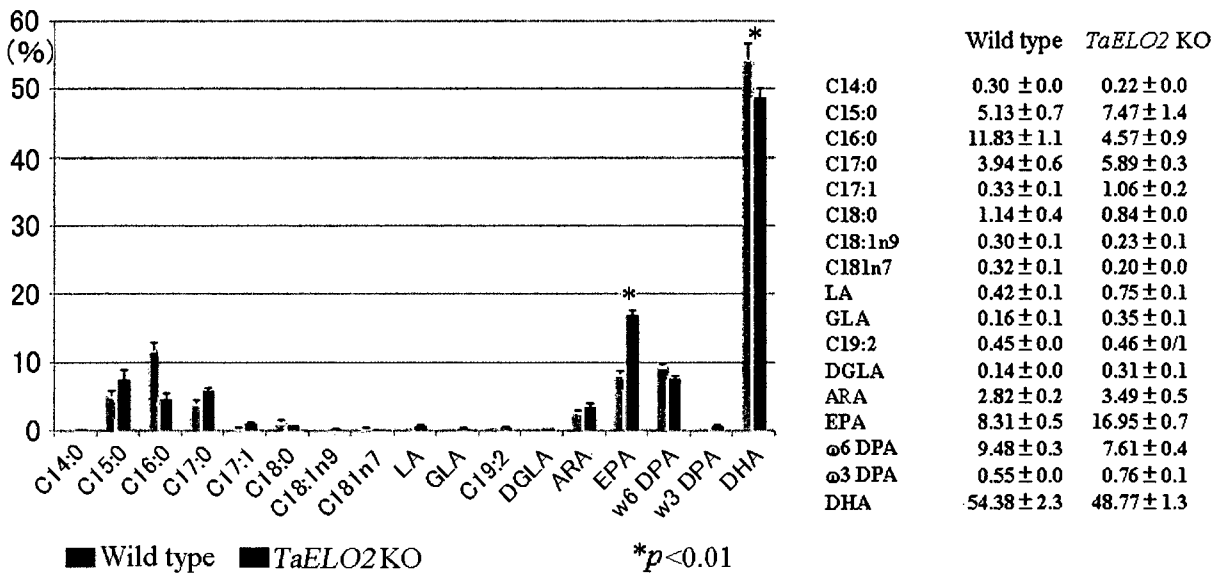
[図41]



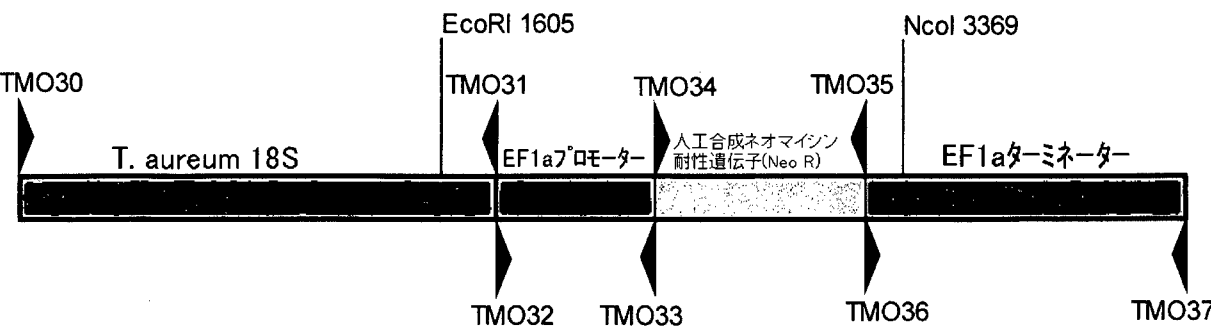
[図 42]



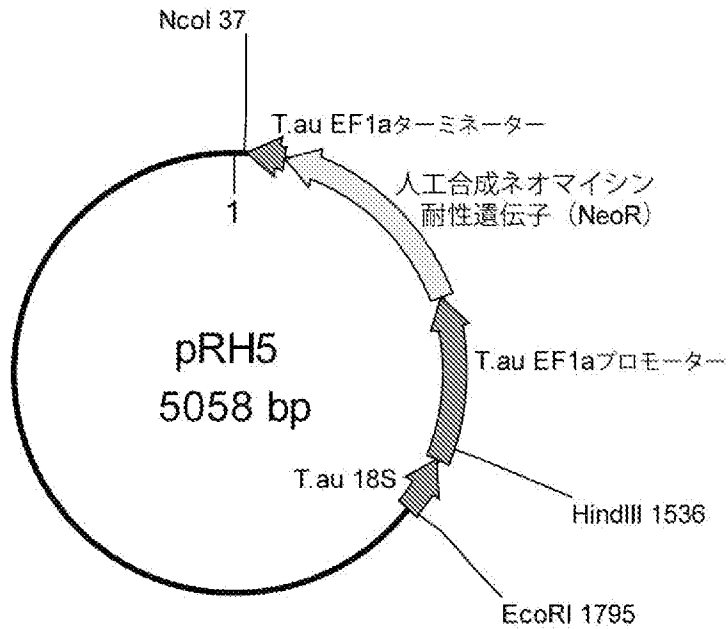
[図 43]



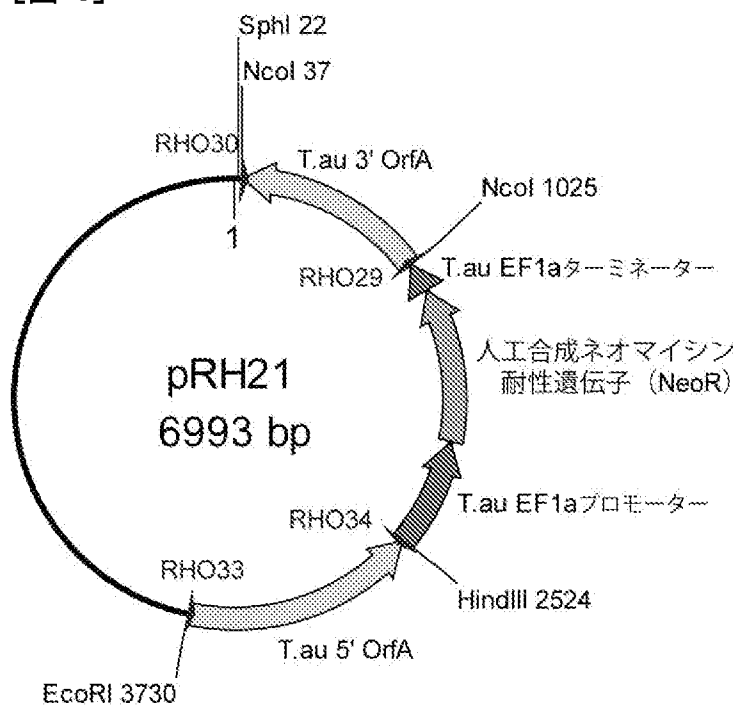
[図 44]



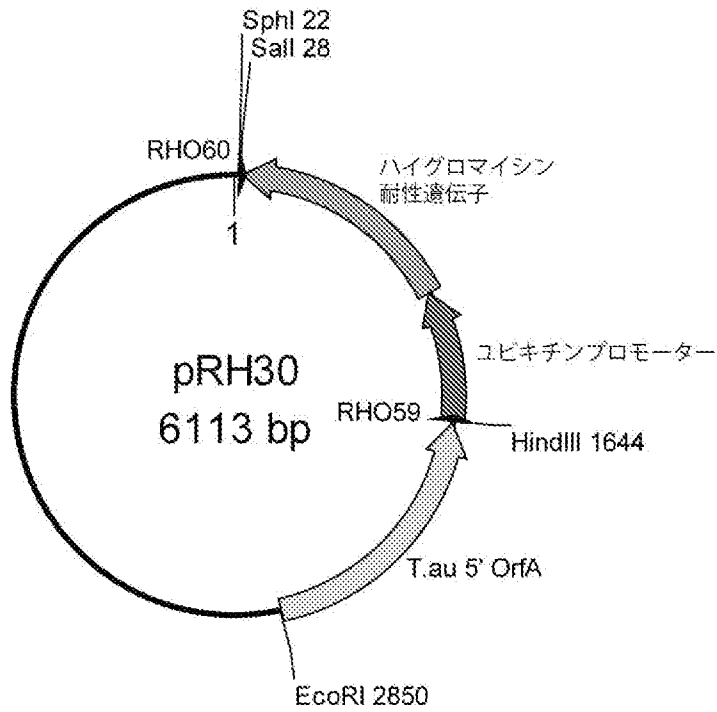
[図45]



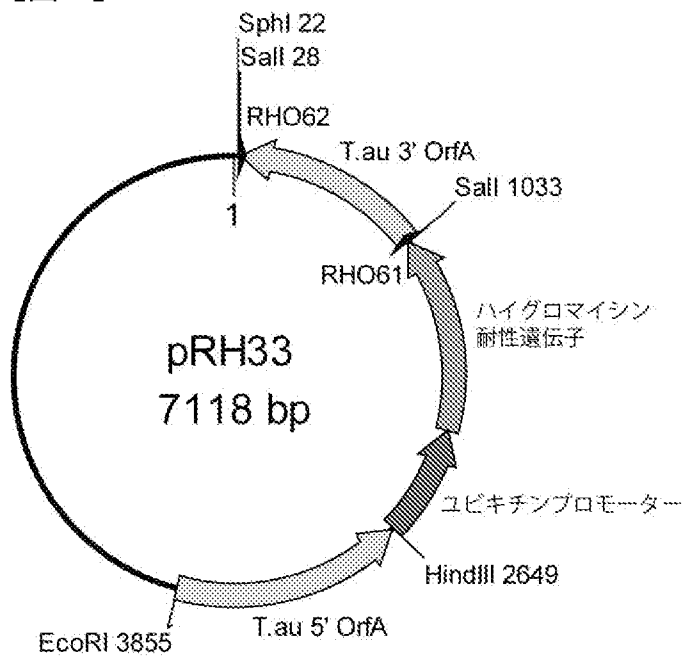
[図46]



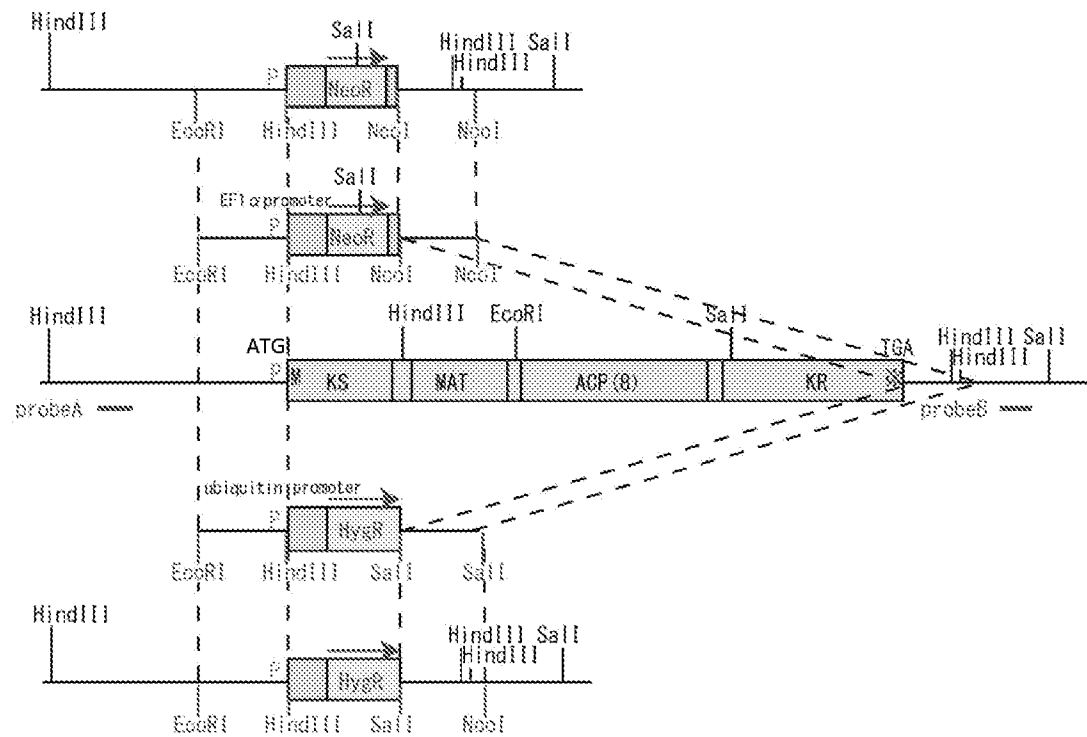
[図47]



[図48]



[図49]



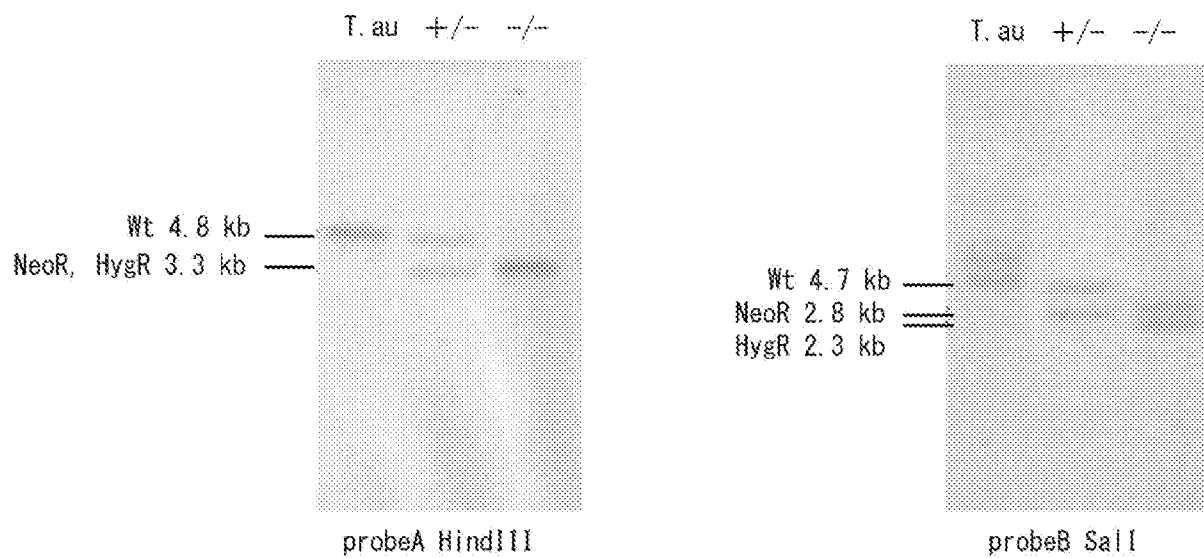
Wt	4.8 kb	—————
NeoR	3.3 kb	—————
HygR	3.3 kb	—————

probeA HindIII

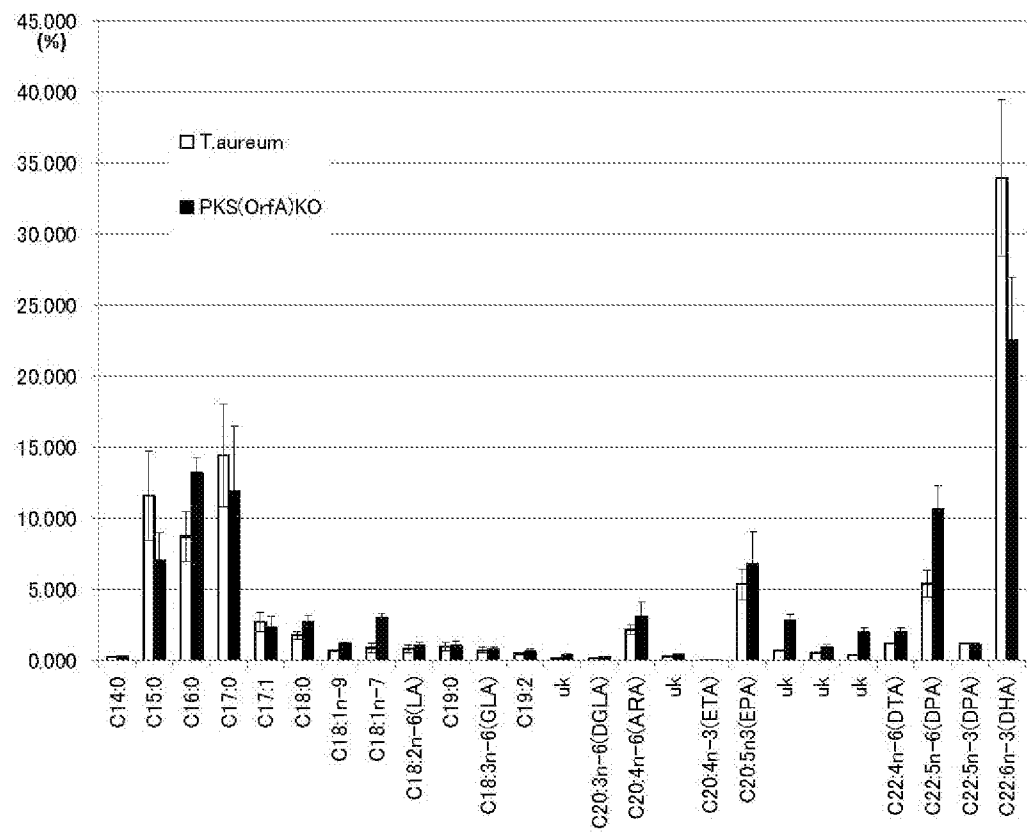
4.7 kb	Wt	—————
2.8 kb	NeoR	—————
2.3 kb	HygR	—————

probeB SalI

[図50]



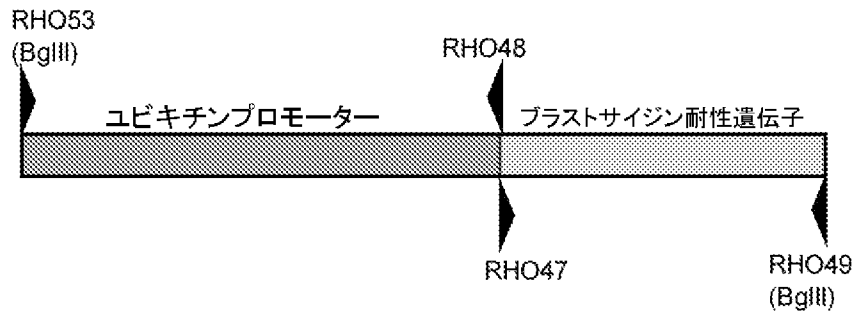
[図51]



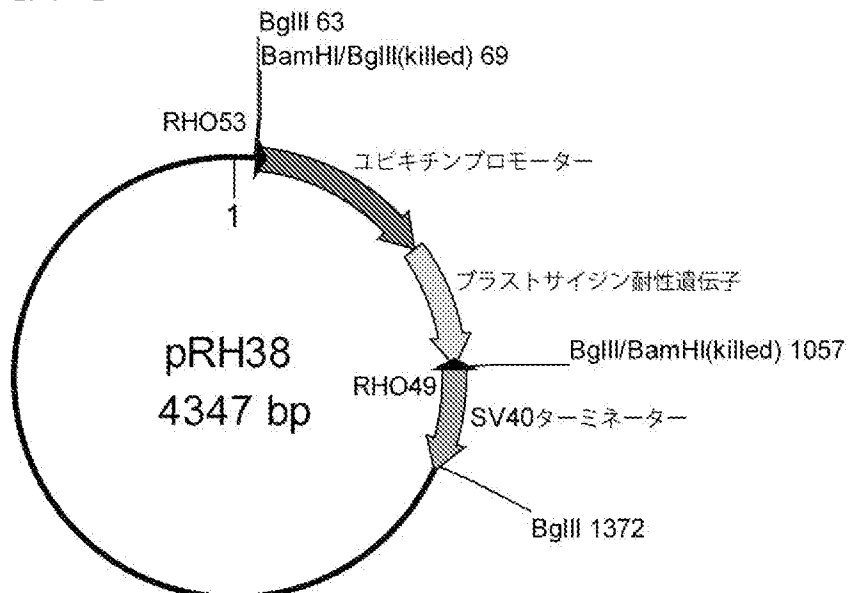
[図52]

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

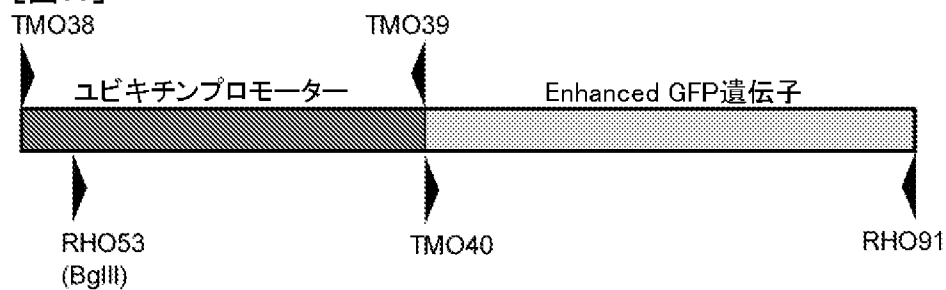
[図53]



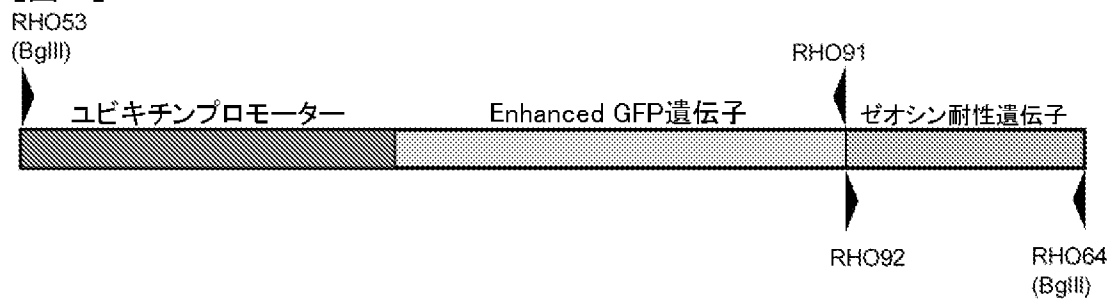
[図54]



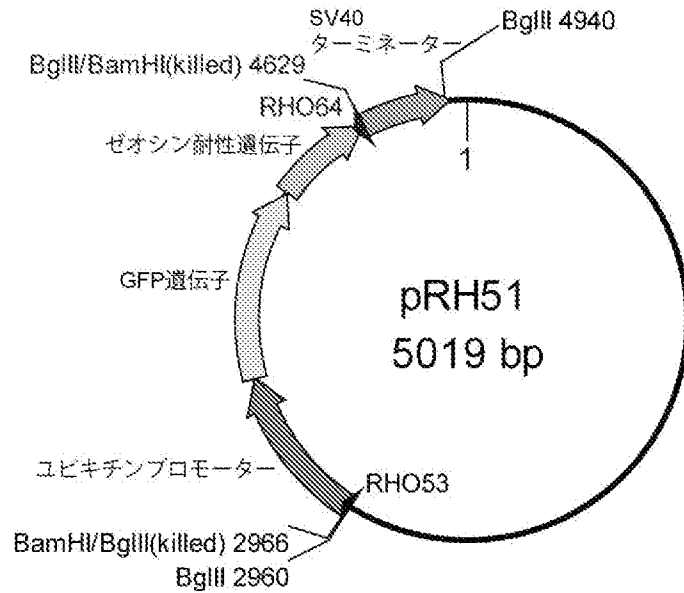
[図55]



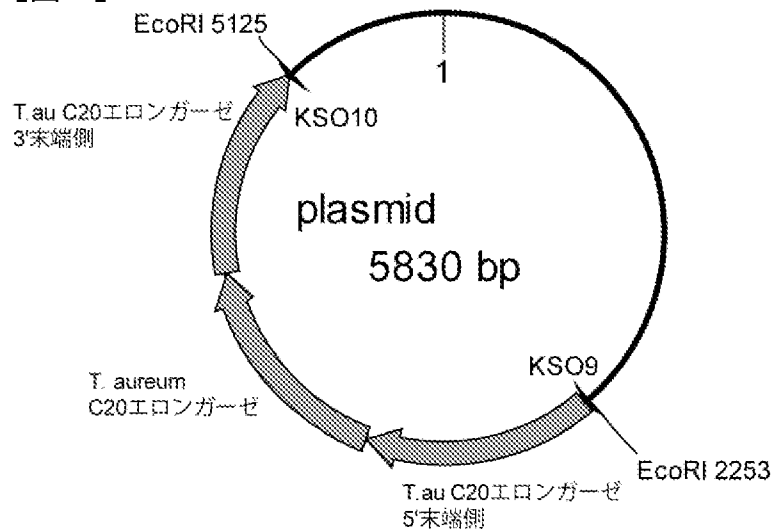
[図56]



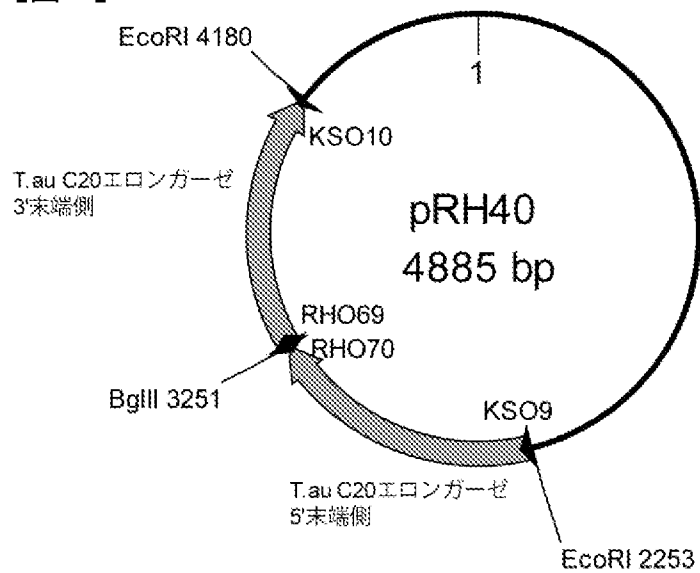
[図57]



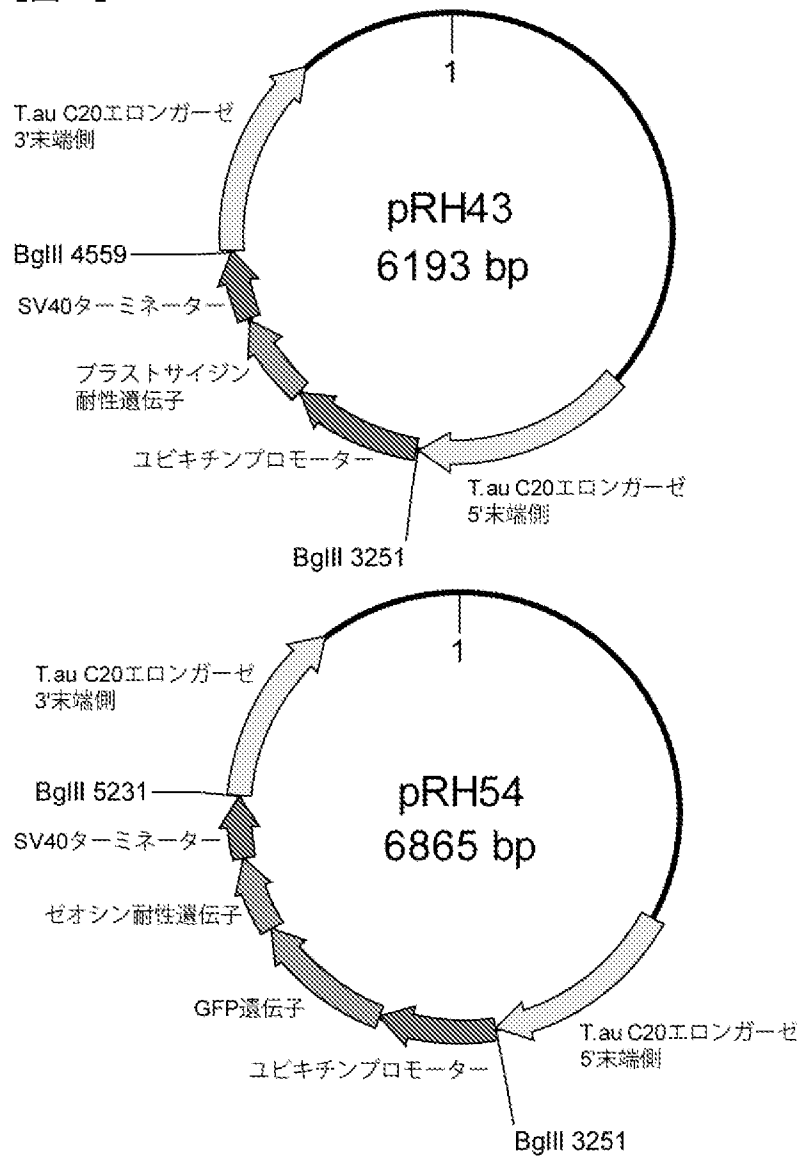
[図58]



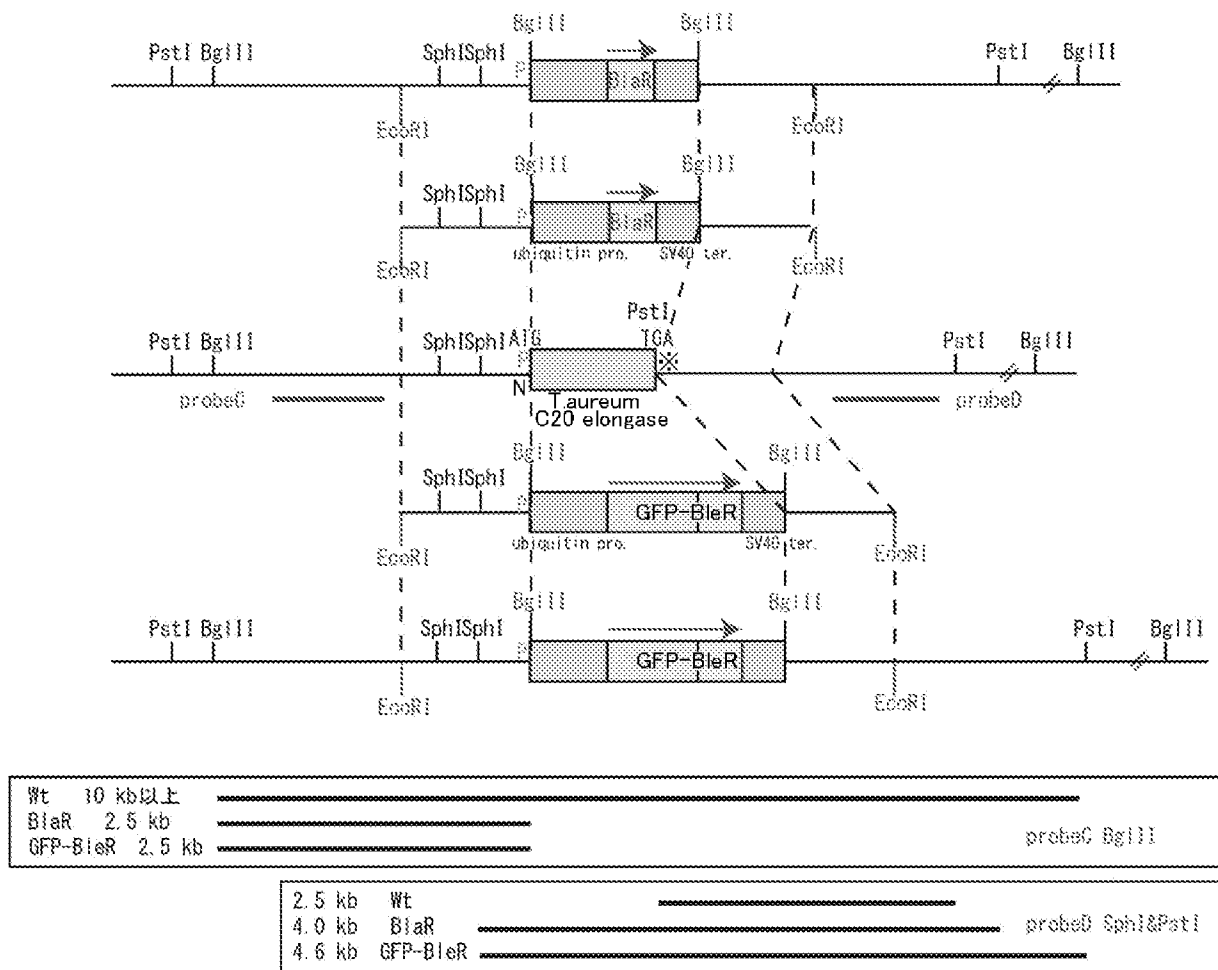
[図59]



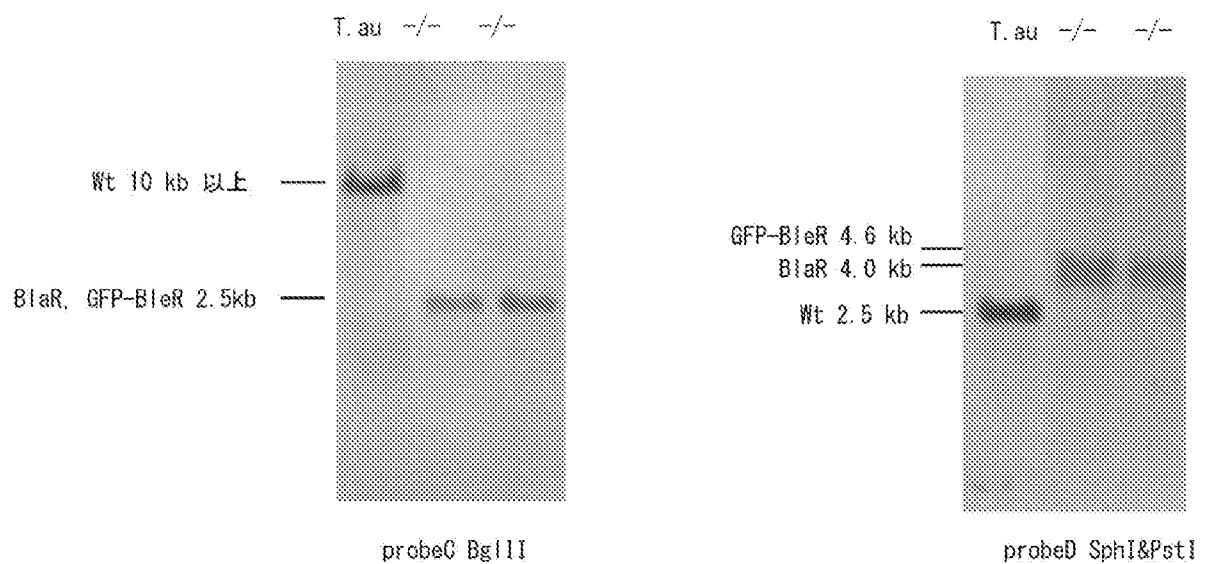
[図60]



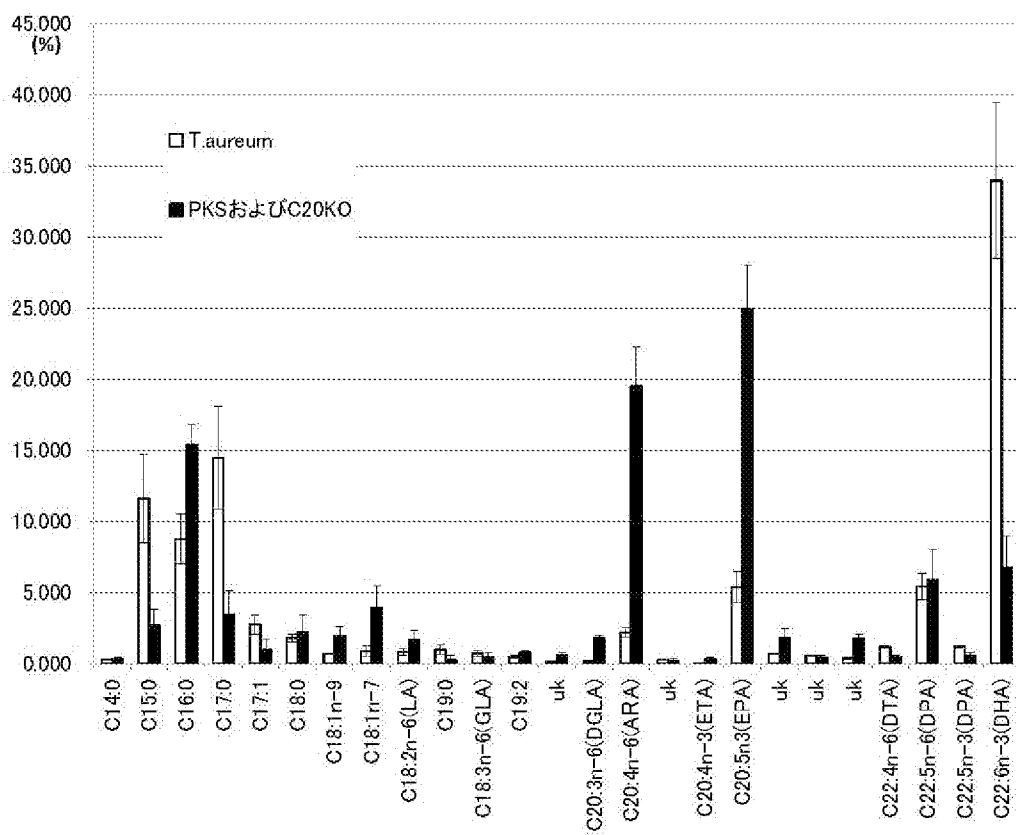
[図61]



[図62]



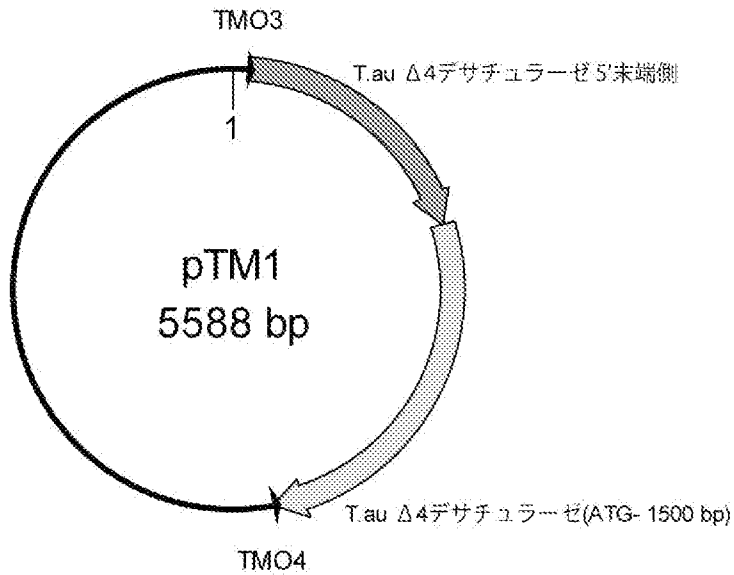
[図63]



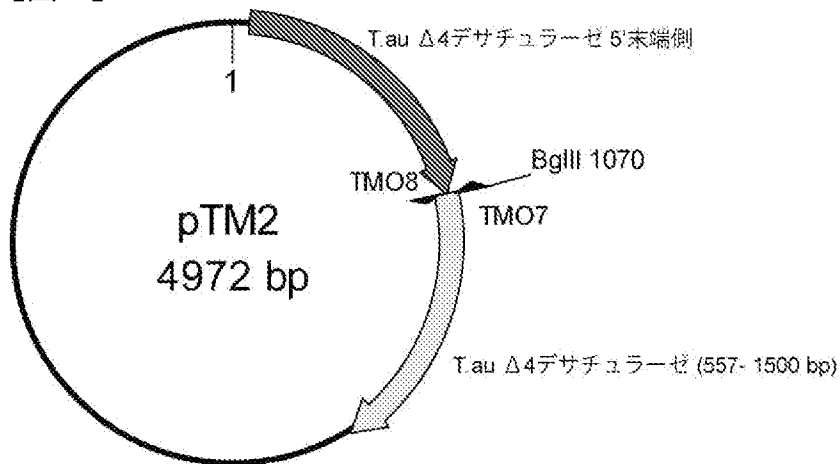
[図64]

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

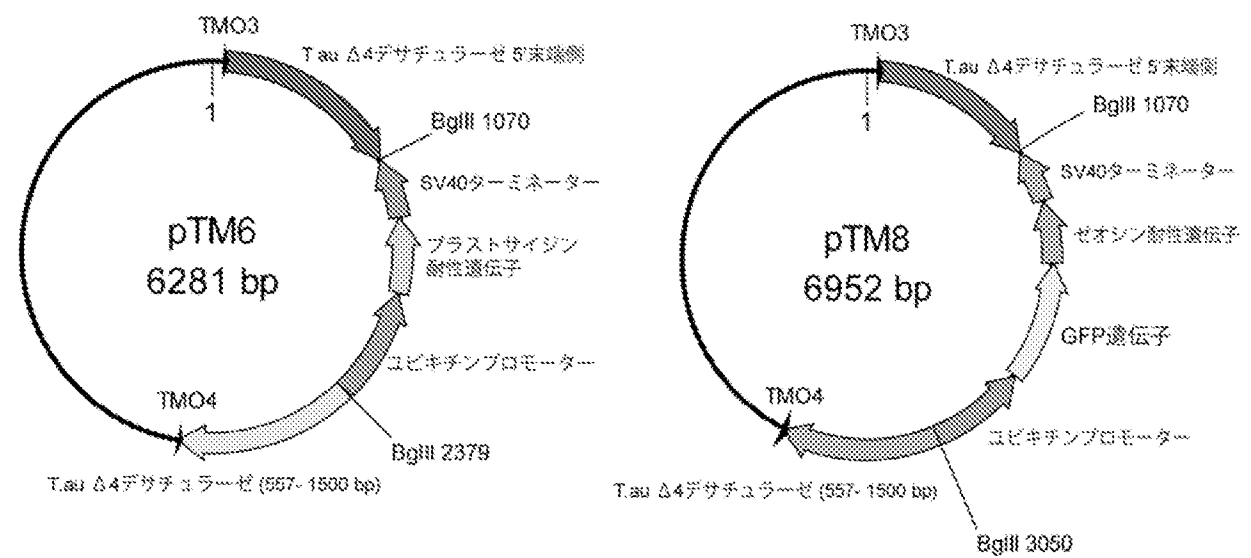
[図65]



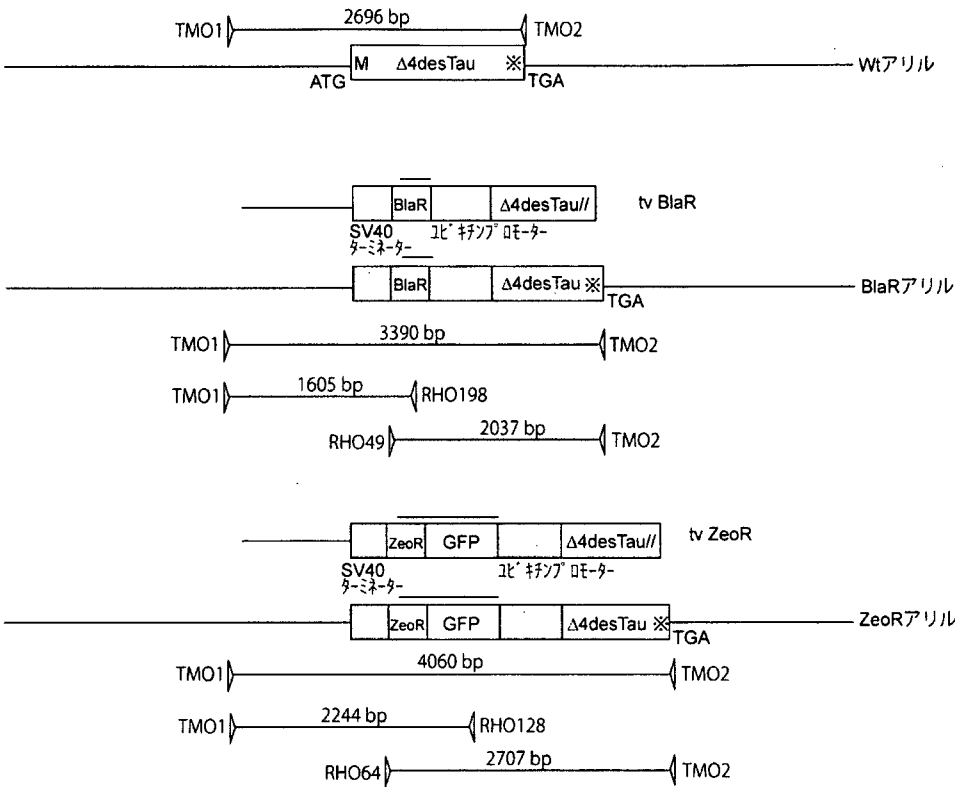
[図66]



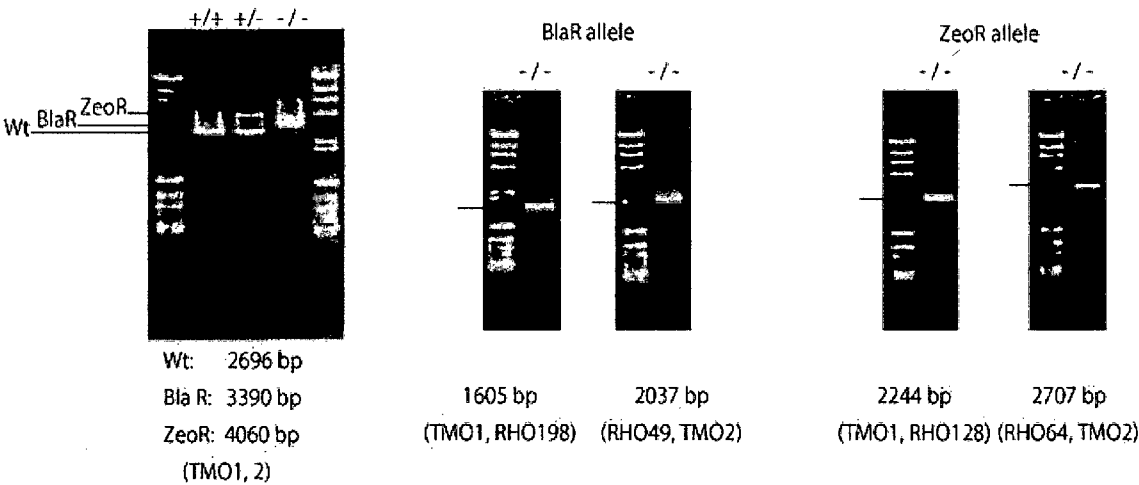
[図67]



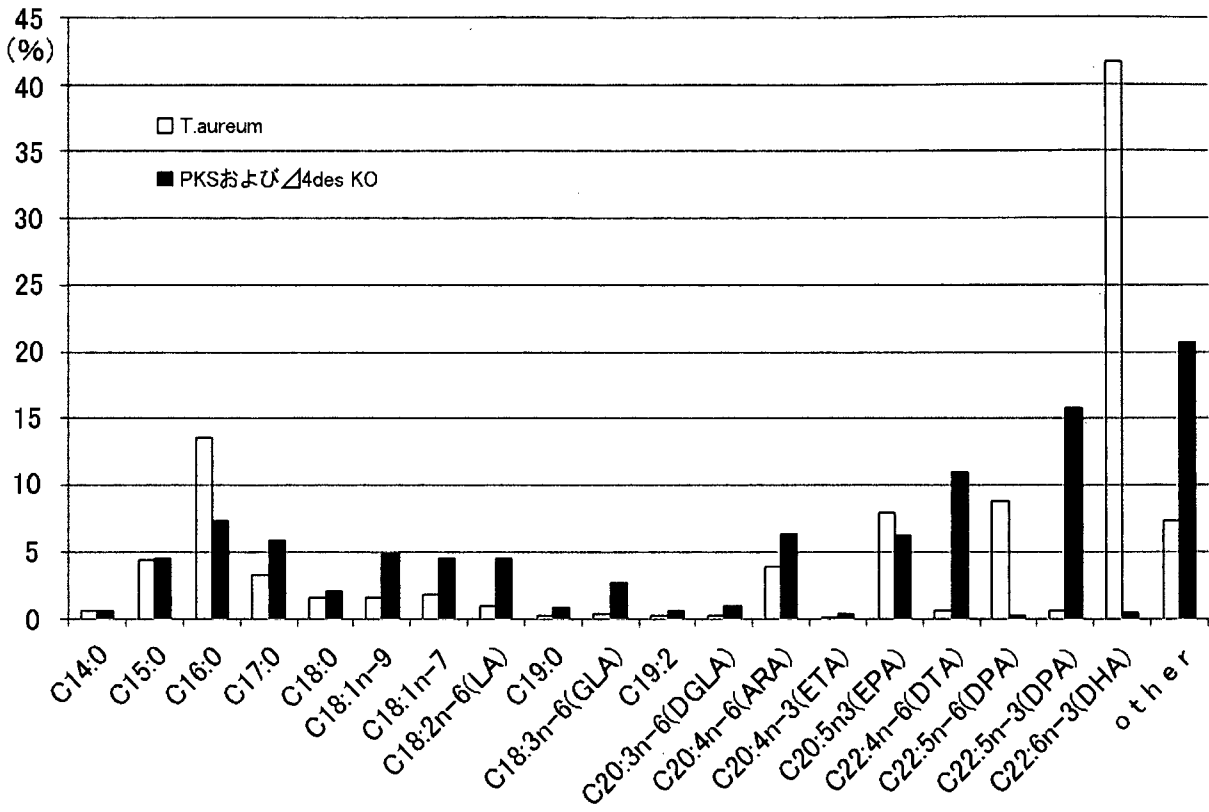
[図 68]



[図 69]



[図 70]



[図71]

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/069825

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P7/64(2006.01)i, C12N1/13(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12P1/00(2006.01)i, C12R1/89(2006.01)n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12P7/64, C12N1/13, C12N15/09, C12P1/00, C12R1/89

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2016	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2016

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII),
CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS/WPIX(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	WO 2012/043826 A1 (Kyushu University), 05 April 2012 (05.04.2012), examples 1 to 11; claims 1 to 43; fig. 21 to 79 & US 2013/0309772 A1 & EP 2623588 A1 & CN 103415611 A & KR 10-2014-0032939 A	1-16, 18, 20-39/1-39
X/Y	WO 2011/037207 A1 (Kyushu University), 31 March 2011 (31.03.2011), paragraph [0033]; claims 1 to 22 & US 2012/0322116 A1 & EP 2481799 A1 & CN 102725405 A & KR 10-2013-0026411 A	14-21/1-39
A	OHARA Junichiro, et al., "Two Fatty Acid Elongases Possessing C18-Δ6/C18-Δ9/C20-Δ5 or C16-Δ9 Elongase Activity in Thraustochytrium sp. ATCC 26185", Mar. Biotechnol., 2013, Vol.15, pp.476-486, Table 2	1-39

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
13 September 2016 (13.09.16)

Date of mailing of the international search report
27 September 2016 (27.09.16)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/069825

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SAKAGUCHI Keishi, et al., "Versatile Transformation System That Is Applicable to both Multiple Transgene Expression and Gene Targeting for Thraustochytrids", Appl. Environ. Microbiol., 2012, Vol.78, No.9, pp.3193-3202, p.3200, Fig. 6	1-39
A	KOBAYASHI Takumi, et al., "Increase of Eicosapentaenoic Acid in Thraustochytrids through Thraustochytrid Ubiquitin Promoter-Driven Expression of a Fatty Acid $\Delta 5$ Desaturase Gene", Appl. Environ. Microbiol., 2011, Vol.77, No.11, pp.3870-3876, Table 2, Fig. 2-4	1-39
A	MATSUDA Takanori, et al., "Analysis of $\Delta 12$ -fatty acid desaturase function revealed that two distinct pathways are active for the synthesis of PUFAs in T. aureum ATCC 34304", J. Lipid Res., 2012, Vol.53, pp.1210-1222,2806, Fig. 4-7, Table 1-3	1-39
A	MATSUDA Takanori, et al., "Molecular cloning of a Pinguiochrysis pyriformis oleate-specific microsomal $\Delta 12$ -fatty acid desaturase and functional analysis in yeasts and thraustochytridsy", J. Biochem., 2011, Vol.150, No.4, pp.375-383, Fig. 1-5	1-39
A	LIPPMEIER J. Casey, et al., "Characterization of Both Polyunsaturated Fatty Acid Biosynthetic Pathways in Schizochytrium sp.", Lipids, 2009, Vol.44, pp.621-630, Table 1-3, Fig. 1-4	1-39
A	MATSUDA Takanori, et al., "Species-dependent pathway for production of PUFA in thraustochytrids revealed by analysis of $\Delta 12$ fatty acid desaturase", Chemistry and Physics of Lipids, 2011, Vol.164, No.Suppl., p.S24, entire document	1-39
A	MARTINEZ Manuela, et al., "The $\Delta 4$ -desaturation pathway for DHA biosynthesis is operative in the human species: Differences between normal controls and children with the Zellweger syndrome", Lipids in Health and Disease, 2010, 9:98	1-39

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12P7/64(2006.01)i, C12N1/13(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12P1/00(2006.01)i, C12R1/89(2006.01)n

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12P7/64, C12N1/13, C12N15/09, C12P1/00, C12R1/89

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 6 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 6 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 6 年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS/WPIX (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X/Y	WO 2012/043826 A1 (国立大学法人九州大学) 2012.04.05, 実施例 1 ~ 1 1、 請求項 1 ~ 4 3、図 2 1 ~ 7 9 & US 2013/0309772 A1 & EP 2623588 A1 & CN 103415611 A & KR 10-2014-0032939 A	1-16, 18, 20-39/ 1-39
X/Y	WO 2011/037207 A1 (国立大学法人九州大学) 2011.03.31, [0 0 3 3]、請求 項 1 ~ 2 2 & US 2012/0322116 A1 & EP 2481799 A1 & CN 102725405 A & KR 10-2013-0026411 A	14-21/1-39

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

1 3 . 0 9 . 2 0 1 6

国際調査報告の発送日

2 7 . 0 9 . 2 0 1 6

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鳥居 敬司

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

4 B

4 0 4 5

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	OHARA Junichiro, et al., "Two Fatty Acid Elongases Possessing C18- Δ 6/C18- Δ 9/C20- Δ 5 or C16- Δ 9 Elongase Activity in <i>Thraustochytrium</i> sp. ATCC 26185", Mar. Biotechnol., 2013, Vol.15, pp.476-486, Table 2	1-39
A	SAKAGUCHI Keishi, et al., "Versatile Transformation System That Is Applicable to both Multiple Transgene Expression and Gene Targeting for <i>Thraustochytrids</i> ", Appl. Environ. Microbiol., 2012, Vol.78, No.9, pp.3193-3202, p.3200, Fig.6	1-39
A	KOBAYASHI Takumi, et al., "Increase of Eicosapentaenoic Acid in <i>Thraustochytrids</i> through <i>Thraustochytrid</i> Ubiquitin Promoter-Driven Expression of a Fatty Acid Δ 5 Desaturase Gene", Appl. Environ. Microbiol., 2011, Vol.77, No.11, pp.3870-3876, Table 2, Fig.2-4	1-39
A	MATSUDA Takanori, et al., "Analysis of Δ 12-fatty acid desaturase function revealed that two distinct pathways are active for the synthesis of PUFAs in <i>T. aureum</i> ATCC 34304", J. Lipid Res., 2012, Vol.53, pp.1210-1222,2806, Fig.4-7, Table 1-3	1-39
A	MATSUDA Takanori, et al., "Molecular cloning of a <i>Pinguiochrysis pyriformis</i> oleate-specific microsomal Δ 12-fatty acid desaturase and functional analysis in yeasts and <i>thraustochytrids</i> ", J. Biochem., 2011, Vol.150, No.4, pp.375-383, Fig.1-5	1-39
A	LIPPMEIER J. Casey, et al., "Characterization of Both Polyunsaturated Fatty Acid Biosynthetic Pathways in <i>Schizochytrium</i> sp.", Lipids, 2009, Vol.44, pp.621-630, Table 1-3, Fig.1-4	1-39
A	MATSUDA Takanori, et al., "Species-dependent pathway for production of PUFA in <i>thraustochytrids</i> revealed by analysis of Δ 12 fatty acid desaturase", Chemistry and Physics of Lipids, 2011, Vol.164, No.Suppl., p.S24, entire document	1-39
A	MARTINEZ Manuela, et al., "The Δ 4-desaturation pathway for DHA biosynthesis is operative in the human species: Differences between normal controls and children with the Zellweger syndrome", Lipids in Health and Disease, 2010, 9:98	1-39