



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102884189 A

(43) 申请公布日 2013. 01. 16

(21) 申请号 201180022751. 8 *C12N 1/19* (2006. 01)
(22) 申请日 2011. 04. 13 *C12N 1/21* (2006. 01)
(30) 优先权数据 *C12N 5/10* (2006. 01)
2010-106570 2010. 05. 06 JP *C12N 9/18* (2006. 01)
2011-020737 2011. 02. 02 JP *C12P 7/64* (2006. 01)
(85) PCT申请进入国家阶段日
2012. 11. 06
(86) PCT申请的申请数据
PCT/JP2011/059181 2011. 04. 13
(87) PCT申请的公布数据
W02011/138891 JA 2011. 11. 10
(71) 申请人 花王株式会社
地址 日本东京都
(72) 发明人 东条卓人 远藤圭二
(74) 专利代理机构 北京尚诚知识产权代理有限公司 11322
代理人 龙淳
(51) Int. Cl.
C12N 15/09 (2006. 01)
C12N 1/15 (2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 17 页
序列表 21 页 附图 3 页

(54) 发明名称
硫酯酶以及使用其的脂肪酸或脂质的制造方法

(57) 摘要
本发明涉及由序列号 1 所示的氨基酸序列构成的硫酯酶以及编码该蛋白质的硫酯酶基因、包含该基因的转化子、以及使用该转化子的脂肪酸或脂质的制造方法。

1. 一种蛋白质,其中,
所述蛋白质为下述(a)~(c)的任意一种蛋白质,
(a)由序列号1所示的氨基酸序列构成的,并且具有硫酯酶活性的蛋白质,
(b)由在序列号1所示的氨基酸序列中缺失、置换、插入和/或添加1个或多个氨基酸的氨基酸序列构成的,并且具有硫酯酶活性的蛋白质,
(c)由与序列号1所示的氨基酸序列具有90%以上同一性的氨基酸序列构成的,并且具有硫酯酶活性的蛋白质。
2. 一种基因,其中,
所述基因编码权利要求1所述的蛋白质。
3. 一种基因,其中,
所述基因由下述(d)~(f)的任意一种的DNA构成,
(d)由序列号2所示的碱基序列构成的,并且编码具有硫酯酶活性的蛋白质的DNA,
(e)在严格条件下与由序列号2所示的碱基序列互补的碱基序列构成的DNA进行杂交的,并且编码具有硫酯酶活性的蛋白质的DNA,
(f)由与序列号2所示的碱基序列具有90%以上的同一性的碱基序列构成的,并且编码具有硫酯酶活性的蛋白质的DNA。
4. 一种重组载体,其中,
所述重组载体含有权利要求2或3所述的基因。
5. 一种转化子,其中,
所述转化子包含权利要求2或3所述的基因或者权利要求4所述的重组载体。
6. 如权利要求5所述的转化子,其中,
宿主为微生物或植物。
7. 如权利要求5所述的转化子,其中,
宿主为大肠杆菌。
8. 如权利要求5所述的转化子,其中,
宿主为拟南芥。
9. 一种脂肪酸的制造方法,其特征在于,
在培养基中培养权利要求5~8中任一项所述的转化子,并从培养物中提取脂肪酸。
10. 一种含有脂肪酸的脂质的制造方法,其特征在于,
在培养基中培养权利要求5~8中任一项所述的转化子,并从培养物中提取含有脂肪酸的脂质。
11. 如权利要求9或10所述的制造方法,其特征在于,
所述脂肪酸为碳原子数为12以上的长链脂肪酸。
12. 如权利要求9~11中任一项所述的制造方法,其特征在于,
所述脂肪酸为选自月桂酸、肉豆蔻酸、棕榈酸以及棕榈油酸中的任意一种以上。
13. 一种提高脂肪酸或含有脂肪酸的脂质的生产能力的方法,其特征在于,
在宿主中导入编码下述(a)~(c)的任意一种蛋白质的基因,
(a)由序列号1所示的氨基酸序列构成的,并且具有硫酯酶活性的蛋白质,
(b)由在序列号1所示的氨基酸序列中缺失、置换、插入和/或添加1个或多个氨基酸

的氨基酸序列构成的,并且具有硫酯酶活性的蛋白质,

(c)由与序列号 1 所示的氨基酸序列具有 90% 以上同一性的氨基酸序列构成的,并且具有硫酯酶活性的蛋白质。

硫酯酶以及使用其的脂肪酸或脂质的制造方法

技术领域

[0001] 本发明涉及新型硫酯酶以及编码该硫酯酶的基因。另外,本发明涉及含有该硫酯酶基因的转化子以及使用该硫酯酶的脂肪酸或脂质的制造方法。

背景技术

[0002] 脂肪酸是脂质的 1 个主要构成成分,在生物体内与甘油进行酯结合构成三酰基甘油等脂质,在较多动植物中作为能量源被储藏利用的物质。在动植物内积蓄的脂肪酸或脂质作为食用或工业用受到广泛地利用,例如,单酰基甘油、二酰基甘油等被利用作食品的中原料,其它各种工业产品的添加剂、中间原料。另外,还原碳原子数为 12~18 左右的高级脂肪酸所得到的高级醇的衍生物可以用作表面活性剂。例如,烷基硫酸酯盐或烷基苯磺酸盐等作为阴离子表面活性剂,另外,聚氧化烯烷基醚或烷基聚糖苷等作为非离子表面活性剂都可以用作清洁剂或杀菌剂。同样地,作为高级醇的衍生物的烷基胺盐或者单或二烷基季铵盐等阳离子表面活性剂日常用作杀菌剂,苯扎型季铵盐日常用作杀菌剂或防腐剂。特别是,包含碳原子数为 12 左右的烷基部位的阴离子表面活性剂以及非离子表面活性剂作为表现出高清洁能力的清洁基材等,另外,包含碳原子数为 14 左右的烷基部位的阳离子表面活性剂作为优异的毛发护理剂等是有用的。进一步,碳原子数为 18 左右的高级醇作为植物的生长促进剂也是有用的。

[0003] 由于这样的脂肪酸类能够利用于各方面,因而其是有用的物质,所以进行使动植物等生物体内的脂肪酸或脂质的生产能力提高的尝试。例如,提出有通过导入乙酰基 CoA 羧化酶(ACCase)而使种子中的脂质量提高的方法(专利文献 1、非专利文献 1、专利文献 5),通过导入酶 sn-2 酰基转移酶(SLC1-1)使种子中的脂质量提高的方法(专利文献 2、专利文献 3 和非专利文献 2),通过导入二酰基甘油酰基转移酶基因(DGAT)使种子中的脂质量提高的方法(专利文献 4 以及非专利文献 3)等。另外,由于脂肪酸类的用途和有用性较大地依赖于其碳原子数,因此也进行控制脂肪酸的碳原子数、即链长的尝试。例如,提出有通过导入来自于加州月桂(*Umbellularia californica* (California bay))的酰基-ACP 硫酯酶使碳原子数为 12 的脂肪酸积蓄的方法(专利文献 6、非专利文献 4),通过导入来自于萼距花(*Cuphea hookeriana*)的酰基-ACP 硫酯酶使碳原子数为 8 或 10 的脂肪酸积蓄的方法(专利文献 7)、通过导入来自于樟树(*Cinnamomum camphorum*)的酰基-ACP 硫酯酶使碳原子数为 14 的脂肪酸积蓄的方法(非专利文献 5)等。

[0004] 现有技术文献

[0005] 专利文献

[0006] 专利文献 1:日本特开 2002-335786 号公报

[0007] 专利文献 2:日本特表平 11-506323 号公报

[0008] 专利文献 3:国际公开第 2008/076377 号小册子

[0009] 专利文献 4:国际公开第 2000/036114 号小册子

[0010] 专利文献 5:美国专利第 5,925,805 号说明书

- [0011] 专利文献 6 :日本特表平 7-501924 号公报
- [0012] 专利文献 7 :日本特表平 8-502892 号公报
- [0013] 非专利文献
- [0014] 非专利文献 1 :Madoka Y, Tomizawa K, Mizoi J, Nishida I, Nagano Y, Sasaki Y., "Chloroplast transformation with modified accD operon increases acetyl-CoA carboxylase and causes extension of leaf longevity and increase in seed yield in tobacco", *Plant Cell Physiol.*, 2002 Dec, 43 (12), p. 1518-1525
- [0015] 非专利文献 2 :Zou J, Katavic V, Giblin EM, Barton DL, MacKenzie SL, Keller WA, Hu X, Taylor DC., "Modification of seed oil content and acyl composition in the brassicaceae by expression of a yeast sn-2 acyltransferase gene", *Plant Cell*, 1997 Jun, 9 (6), p. 909-923
- [0016] 非专利文献 3 :Jako C, Kumar A, Wei Y, Zou J, Barton DL, Giblin EM, Covello PS, Taylor DC., "Seed-specific over-expression of an Arabidopsis cDNA encoding a diacylglycerol acyltransferase enhances seed oil content and seed weight", *Plant Physiol.*, 2001, 126 (2), p. 861-874
- [0017] 非专利文献 4 :Voelker TA, Worrell AC, Anderson L, Bleibaum J, Fan C, Hawkins DJ, Radke SE, Davies HM., "Fatty acid biosynthesis redirected to medium chains in transgenic oilseed plants", *Science*. 1992 Jul 3; 257 (5066), p. 72-74.
- [0018] 非专利文献 5 :Yuan L, Voelker TA, Hawkins DJ. "Modification of the substrate specificity of an acyl-acyl carrier protein thioesterase by protein engineering" *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Nov 7; 92 (23), p. 10639-10643.

发明内容

[0019] 发明所要解决的课题

[0020] 本发明的课题在于提供一种新型硫酯酶以及编码该酶的硫酯酶基因。另外,本发明的课题在于提供含有该硫酯酶基因、并且提高了脂肪酸或包含这些脂肪酸的脂质的生产能力的转化子。进一步,本发明的课题在于提供使用该转化子的脂肪酸或包含这些脂肪酸的脂质的制造方法。

[0021] 解决课题的手段

[0022] 本发明者们为了提高动植物等中的脂肪酸或脂质的生产能力进行了专心研究。因此,着眼于对生物体内的脂肪酸和脂质的生物合成起重要作用的酶硫酯酶,尝试对较之现有硫酯酶的生产能力更高的新型硫酯酶进行了探索。其结果发现:从椰子(*Cocos nucifera* L.)中分离新型编码硫酯酶的基因,并导入有该硫酯酶基因的转化子,与导入有其它硫酯酶基因的转化子相比较,其脂肪酸和脂质的生产能力都明显提高,以及脂质中所含的脂肪酸的组成与椰子胚乳的组成不同。基于这些发现至此完成本发明。

[0023] 本发明涉及下述(a)~(c)的任意一种蛋白质(以下,也称为本发明的蛋白质)。

[0024] (a) 由序列号 1 所示的氨基酸序列构成的,并且具有硫酯酶活性的蛋白质,

[0025] (b) 由在序列号 1 所示的氨基酸序列中缺失、置换、插入和 / 或添加 1 个或多个氨基酸的氨基酸序列构成的,并且具有硫酯酶活性的蛋白质,

[0026] (c) 由与序列号 1 所示的氨基酸序列具有 90% 以上同一性(同源性)的氨基酸序列构成的,并且具有硫酯酶活性的蛋白质。

[0027] 另外,本发明涉及编码所述本发明的蛋白质的基因(以下,也称为本发明的基因),优选为由下述(d)~(f)的任意一种的 DNA 构成的基因。

[0028] (d) 由序列号 2 所示的碱基序列构成的,并且编码具有硫酯酶活性的蛋白质的 DNA,

[0029] (e) 在严格条件下与由序列号 2 所示的碱基序列互补的碱基序列构成的 DNA 进行杂交的,并且编码具有硫酯酶活性的蛋白质的 DNA,

[0030] (f) 由与序列号 2 所示的碱基序列具有 90% 以上的同一性的碱基序列构成的,并且编码具有硫酯酶活性的蛋白质的 DNA。

[0031] 另外,本发明涉及含有所述基因的重组载体,以及包含所述基因或所述重组载体的转化子。

[0032] 另外,本发明涉及一种脂肪酸或含有脂肪酸的脂质的制造方法,其特征在于,在培养基中培养所述转化子,从培养物中提取脂肪酸或者包含这些脂肪酸的脂质,其中,脂肪酸优选为月桂酸、肉豆蔻酸、棕榈酸以及棕榈油酸。

[0033] 进一步,本发明涉及使脂肪酸或含有脂肪酸的脂质的生产能力提高的方法,其特征在于,在宿主中导入编码下述(a)~(c)的任意一种的蛋白质的基因。

[0034] 发明的效果

[0035] 根据本发明,可以提供一种新型硫酯酶以及编码该酶的硫酯酶基因。另外,根据本发明,可以提供含有该硫酯酶基因,并且提高了脂肪酸或脂质的生产能力的转化子。进一步,根据本发明,可以提供使用该转化子的脂肪酸(优选为月桂酸、肉豆蔻酸、棕榈酸以及棕榈油酸)或脂质的制造方法。本发明的转化子以及脂肪酸或脂质的制造方法具有优异的生产能力,还可以得到特有的脂肪酸组成,可以优选用于脂肪酸或脂质的工业化生产。

[0036] 本发明的上述以及其它特征和优点可以适当参照附图,从下述的记载中进一步明确。

附图说明

[0037] 图 1 是表示导入有来自于加州月桂的硫酯酶(BTE)基因、或者来自于椰子的硫酯酶(CTE)基因并经过转化的大肠杆菌的各脂肪酸的生产量的图。

[0038] 图 2 是表示导入有来自于加州月桂的硫酯酶(BTE)基因、或者来自于椰子的硫酯酶(CTE)基因并经过转化的大肠杆菌的总脂肪酸生产量的图。

[0039] 图 3 是分别表示(a)椰子胚乳中的脂肪酸构成比率、(b)导入有来自于椰子的硫酯酶(CTE)基因的转化子的脂肪酸构成比率的图。

[0040] 图 4 是表示拟南芥野生株、以及导入有来自于椰子的硫酯酶基因的拟南芥转化子 Pnapin-CTE 的种子中所含的总脂肪酸量的图。

[0041] 图 5 是表示拟南芥野生株、以及导入有来自于椰子的硫酯酶基因的拟南芥转化子 Pnapin-CTE 的种子中的脂肪酸构成比率的图。

具体实施方式

[0042] 1. 硫酯酶

[0043] 本发明的蛋白质为以下的(a)~(c)的任意一种蛋白质(以下,也称为“本发明的硫酯酶”)。

[0044] (a)由序列号1所示的氨基酸序列构成的,并且具有硫酯酶活性的蛋白质,

[0045] (b)由在序列号1所示的氨基酸序列中缺失、置换、插入和/或添加1个或多个氨基酸的氨基酸序列构成的,并且具有硫酯酶活性的蛋白质,

[0046] (c)由与序列号1所示的氨基酸序列具有90%以上同一性(同源性)的氨基酸序列构成的,并且具有硫酯酶活性的蛋白质。

[0047] 另外,本发明的基因为编码上述蛋白质的基因。

[0048] 由序列号1所示的氨基酸序列构成的蛋白质为来自于椰子(*Cocos nucifera* L.)的新型硫酯酶(以下,简称为CTE)。

[0049] 硫酯酶是作为与甘油三酯的生物合成体系相关的酶的酰基-酰基载体蛋白质(Acy1-ACP)硫酯酶,并且水解作为叶绿体内或质体内的脂肪酸生物合成过程的中间体的酰基-酰基载体蛋白质(由作为脂肪酸残基的酰基和酰基载体蛋白质构成的复合体)的硫酯键,生成游离的脂肪酸的酶。通过硫酯酶的作用,使酰基载体蛋白质上的脂肪酸合成终止,游离的脂肪酸从质体输送并供给于甘油三酯合成。可知硫酯酶根据作为基质的构成酰基-酰基载体蛋白质的脂肪酸残基的种类不同而表现出不同的反应特异性,是确定生物体内的脂肪酸组成的重要因素。

[0050] 在本发明的蛋白质中,除了(a)由序列号1所示的氨基酸序列构成的具有硫酯酶活性的蛋白质,还包含与该蛋白质功能上均等的蛋白质。通常,编码酶蛋白质的氨基酸序列并不是全部区域的序列没被保留就一定不显示酶活性,已知即使氨基酸序列发生变化也存在不影响酶活性的区域。在这样的区域中即使导入氨基酸的缺失、置换、插入或添加等突变也可以维持酶本来的活性。在本发明中,也可以使用这样保持硫酯酶活性地由序列号1所示的氨基酸序列进行部分变化的变异体。

[0051] 作为与由序列号1所示的氨基酸序列构成的硫酯酶功能上均等的蛋白质,可以列举(b)由在序列号1所示的氨基酸序列中缺失、置换、插入和/或添加1个或多个氨基酸的氨基酸序列构成的,并且具有硫酯酶活性的蛋白质、以及(c)由与序列号1所示的氨基酸序列具有90%以上同一性(同源性)的氨基酸序列构成的,并且具有硫酯酶活性的蛋白质,这些都包含于本发明的蛋白质。

[0052] 上述(b)的蛋白质中的“缺失、置换、插入和/或添加1个或多个氨基酸的氨基酸序列”优选为缺失、置换、插入和/或添加1~20个氨基酸的氨基酸序列,更优选缺失、置换、插入和/或添加1~10个氨基酸的氨基酸序列,进一步优选缺失、置换、插入和/或添加1~5个氨基酸的氨基酸序列,特别优选缺失、置换、插入和/或添加1~2个左右氨基酸的氨基酸序列。另外,上述添加中包括在两末端添加1~多个氨基酸。

[0053] 另外,作为上述(c)的蛋白质中的“具有90%以上同一性的氨基酸序列”,氨基酸序列的同一性优选为95%以上,更优选为96%以上,进一步优选为97%以上,特别优选为98%以上。在后述的实施例中本发明者们进行了研究,在将由序列号1的氨基酸序列构成的硫酯酶与其它公知的硫酯酶的氨基酸序列比较的情况下,其同一性为50~60%左右。例如,与来自于加州月桂(*Umbellularia californica*,也称为加利福尼亚月桂)的硫酯酶的氨基酸

序列的同源性为 50% 左右,与来自于拟南芥的硫酯酶的氨基酸序列的同源性为 60% 左右。

[0054] 本发明中的氨基酸序列和碱基序列的同一性(同源性)通过 Lipman-Pearson 法(Science, 227, 1435, (1985))进行计算。具体来说,使用基因信息处理软件 Genetyx-Win(软件开发)的同源性分析(Search homology)程序,将 Unit size to compare (ktup) 作为 2 进行分析,由此算出。

[0055] 在上述(b)和(c)的蛋白质中,作为更优选的具有硫酯酶活性的变异体,优选具有硫酯酶活性的、并且具有序列号 1 所示的氨基酸序列中以下位置的氨基酸被保留,而在这些位置以外的区域中氨基酸序列一部分发生变化的蛋白质:相当于第 34 个的氨基酸保留为精氨酸,相当于第 35 个的氨基酸保留为丝氨酸,相当于第 37 个的氨基酸保留为谷氨酸,相当于第 39 个的氨基酸保留为甘氨酸,相当于第 41 个的氨基酸保留为天冬氨酸,相当于第 51 个的氨基酸保留为天冬酰胺,相当于第 54 个的氨基酸保留为谷酰胺,相当于第 59 个的氨基酸保留为天冬酰胺,相当于第 65 个的氨基酸保留为甘氨酸,相当于第 70 个的氨基酸保留为甘氨酸,相当于第 72 个的氨基酸保留为甘氨酸,相当于第 74 个的氨基酸保留为苏氨酸,相当于第 77 个的氨基酸保留为蛋氨酸,相当于第 82 个的氨基酸保留为亮氨酸,相当于第 84 个的氨基酸保留为色氨酸,相当于第 85 个的氨基酸保留为缬氨酸,相当于第 96 个的氨基酸保留为酪氨酸,相当于第 98 个的氨基酸保留为色氨酸,相当于第 99 个的氨基酸保留为色氨酸,相当于第 108 个的氨基酸保留为色氨酸,相当于第 113 个氨基酸保留为甘氨酸,相当于第 137 个的氨基酸保留为丝氨酸,相当于第 142 个的氨基酸保留为蛋氨酸,相当于第 147 个的氨基酸保留为精氨酸,相当于第 177 个的氨基酸保留为赖氨酸,相当于第 192 个的氨基酸保留为甘氨酸,相当于第 193 个的氨基酸保留为亮氨酸,相当于第 195 个的氨基酸保留为脯氨酸,相当于第 197 个的氨基酸保留为色氨酸,相当于第 199 个的氨基酸保留为天冬氨酸,相当于第 201 个的氨基酸保留为天冬氨酸,相当于第 203 个的氨基酸保留为天冬酰胺,相当于第 205 个的氨基酸保留为组氨酸,相当于第 206 个的氨基酸保留为缬氨酸,相当于第 210 个的氨基酸保留为赖氨酸,相当于第 211 个的氨基酸保留为酪氨酸,相当于第 214 个的氨基酸保留为色氨酸,相当于第 220 个的氨基酸保留为脯氨酸,相当于第 236 个的氨基酸保留为酪氨酸,相当于第 239 个的氨基酸保留为谷氨酸,相当于第 248 个的氨基酸保留为丝氨酸,相当于第 266 个的氨基酸保留为组氨酸,以及相当于第 283 个的氨基酸保留为色氨酸。

[0056] 本发明的硫酯酶具有下述特征。

[0057] (1) 本发明的导入了硫酯酶的转化子与导入了其它植物硫酯酶(例如,来自于加州月桂的硫酯酶)的转化子相比,脂肪酸或脂质的生产能力更高。

[0058] (2) 在本发明的导入了硫酯酶的转化子中,可以生产与椰子胚乳不同组成的脂肪酸。具体来说,增加肉豆蔻酸(C14:0)的生产量。另外,可以生产椰子胚乳中几乎看不到的不饱和脂肪酸(特别是, C16:1 的棕榈油酸)。

[0059] (3) 本发明的导入了硫酯酶的转化子中,主要生产月桂酸(C12:0)、肉豆蔻酸(C14:0)、棕榈酸(C16:0)以及棕榈油酸(C16:1)。

[0060] 在本发明中,“具有硫酯酶活性”是指,具有水解酰基-酰基载体蛋白质的硫酯键的活性。蛋白质是否具有硫酯酶活性,例如,可以通过将在大肠杆菌等宿主细胞内发挥作用的启动子的下游处连接有硫酯酶基因的融合基因导入缺损脂肪酸分解体系的宿主细胞,在导入的硫酯酶基因表达的条件下进行培养,使用气相色谱分析等方法分析宿

主细胞的脂肪酸组成的变化,从而可以测定硫酯酶活性。或者,通过将在大肠杆菌等宿主细胞内发挥作用的启动子的下游处连接有硫酯酶基因的融合基因导入宿主细胞,对于在导入的硫酯酶基因表达的条件下进行了培养的细胞的破碎液,进行将根据 Yuan et al., PNAS, 1995, (92), p. 10639-10643 等方法(所述非专利文献 5) 制得的各种酰基-ACP 作为基质的反应,由此可以测定硫酯酶活性。

[0061] 对于本发明的蛋白质的取得方法没有特别地限制,可以通过通常进行的化学或基因工程的方法等来得到。例如,可以通过从椰子的胚乳中分离、精制等,从而取得来自于天然物的蛋白质。另外,既可以基于序列号 1 所示的氨基酸序列信息进行人工合成等,也可以通过化学合成进行蛋白质合成,也可以通过基因重组技术制作重组蛋白质。在制作重组蛋白质的情况下,可以使用后述的本发明的硫酯酶基因。

[0062] 2. 硫酯酶基因

[0063] 本发明的基因是编码上述本发明的蛋白质的基因(以下,也称为“本发明的硫酯酶基因”)。优选,可以列举(d)由序列号 2 所示的碱基序列构成并且编码具有硫酯酶活性的蛋白质的 DNA 所构成的基因,或者与该基因功能上均等的基因。作为功能上均等的基因,可以列举以下(e)~(g)的基因,(e)在严格条件下与由序列号 2 所示的碱基序列互补的碱基序列构成的 DNA 进行杂交并且编码具有硫酯酶活性的蛋白质的 DNA 所构成的基因,(f)由与序列号 2 所示的碱基序列具有 90% 以上的同一性(同源性)的碱基序列构成并且编码具有硫酯酶活性的蛋白质的 DNA 所构成的基因,以及(g)由序列号 2 所示的碱基序列中 1 个或多个碱基缺失、置换、插入和 / 或添加的碱基序列构成并且编码具有硫酯酶活性的蛋白质的 DNA 所构成的基因,这些都包含于本发明的基因。

[0064] 在本发明中,作为“严格的条件”,例如可以列举 Molecular Cloning - A LABORATORY MANUAL THIRD EDITION [Joseph Sambrook, David W Russell., Cold Spring Harbor Laboratory Press] 记载的方法,例如可以列举使含有 6×SSC (1×SSC 的组成: 0.15M 氯化钠、0.015M 柠檬酸钠, pH7.0)、0.5%SDS、5xDenhardt 以及 100mg/ml 鲑鱼精 DNA 的溶液与探针在 65°C 下恒温 8~16 小时进行杂交的条件。

[0065] 作为上述(f)的基因中的“具有 90% 以上同一性的碱基序列”,碱基序列的同一性优选为 95% 以上,更优选为 96% 以上,进一步优选为 97% 以上,特别优选为 98% 以上。本发明中的碱基序列的同一性通过所述的 Lipman-Pearson 法 (Science, 227, 1435, (1985)) 来进行计算。具体来说,通过使用基因信息处理软件 Genetyx-Win (软件开发)的同源性分析 (Search homology) 程序,将 Unit size to compare (ktup) 作为 2 进行分析,从而算出。

[0066] 上述(g)的基因中的“缺失、置换、插入和 / 或添加 1 个或多个碱基的碱基序列”优选缺失、置换、插入和 / 或添加 1~60 个碱基的碱基序列,更优选缺失、置换、插入和 / 或添加 1~30 个碱基的碱基序列,进一步优选缺失、置换、插入和 / 或添加 1~15 个碱基的碱基序列,特别优选缺失、置换、插入和 / 或添加 1~6 个碱基的碱基序列。另外,上述添加包括在两末端添加 1~多个碱基。

[0067] 作为上述(e)~(g)的基因,优选为由编码具有硫酯酶活性的蛋白质的碱基序列构成的基因,并且,具有对应于该基因编码的氨基酸序列成为在所述序列号 1 所示的氨基酸序列中以下位置的氨基酸被保留的碱基序列,而这些氨基酸保留位置以外的区域中碱基序列一部分发生变化:相当于第 34 个的氨基酸保留为精氨酸、相当于第 35 个的氨基酸保留为

丝氨酸、相当于第 37 个的氨基酸保留为谷氨酸、相当于第 39 个的氨基酸保留为甘氨酸、相当于第 41 个的氨基酸保留为天冬氨酸、相当于第 51 个的氨基酸保留为天冬酰胺、相当于第 54 个的氨基酸保留为谷酰胺、相当于第 59 个的氨基酸保留为天冬酰胺、相当于第 65 个的氨基酸保留为甘氨酸、相当于第 70 个的氨基酸保留为甘氨酸、相当于第 72 个的氨基酸保留为甘氨酸、相当于第 74 个的氨基酸保留为苏氨酸、相当于第 77 个的氨基酸保留为蛋氨酸、相当于第 82 个的氨基酸保留为亮氨酸、相当于第 84 个的氨基酸保留为色氨酸、相当于第 85 个的氨基酸保留为缬氨酸、相当于第 96 个的氨基酸保留为酪氨酸、相当于第 98 个的氨基酸保留为色氨酸、相当于第 99 个的氨基酸保留为色氨酸、相当于第 108 个的氨基酸保留为色氨酸、相当于第 113 个氨基酸保留为甘氨酸、相当于第 137 个的氨基酸保留为丝氨酸、相当于第 142 个的氨基酸保留为蛋氨酸、相当于第 147 个的氨基酸保留为精氨酸、相当于第 177 个的氨基酸保留为赖氨酸、相当于第 192 个的氨基酸保留为甘氨酸、相当于第 193 个的氨基酸保留为亮氨酸、相当于第 195 个的氨基酸保留为脯氨酸、相当于第 197 个的氨基酸保留为色氨酸、相当于第 199 个的氨基酸保留为天冬氨酸、相当于第 201 个的氨基酸保留为天冬氨酸、相当于第 203 个的氨基酸保留为天冬酰胺、相当于第 205 个的氨基酸保留为组氨酸、相当于第 206 个的氨基酸保留为缬氨酸、相当于第 210 个的氨基酸保留为赖氨酸、相当于第 211 个的氨基酸保留为酪氨酸、相当于第 214 个的氨基酸保留为色氨酸、相当于第 220 个的氨基酸保留为脯氨酸、相当于第 236 个的氨基酸保留为酪氨酸、相当于第 239 个的氨基酸保留为谷氨酸、相当于第 248 个的氨基酸保留为丝氨酸、相当于第 266 个的氨基酸保留为组氨酸、以及相当于第 283 个的氨基酸保留为色氨酸。

[0068] 作为本发明的硫酯酶基因的取得方法,没有特别地限制,可以通过通常的基因工程技术来得到。例如,基于序列号 1 所示的氨基酸序列或序列号 2 所示的碱基序列,可以通过人工合成取得本发明的硫酯酶基因。基因的人工合成可以利用例如 Invitrogen Inc. 等业务。另外,可以通过克隆从椰子中取得,例如,可以根据 Molecular Cloning-ALABORATORY MANUAL THIRD EDITION[Joseph Sambrook, David W. Russell, Cold Spring Harbor Laboratory Press(2001)] 记载的方法等来进行。

[0069] 在将突变导入序列号 1 所示的氨基酸序列或序列号 2 所示的碱基序列的情况下,例如可以列举位点特异突变导入法。作为具体的位点特异突变的导入方法,可以列举利用剪接重叠延伸(Splicing overlap extension, SOE)PCR 反应(Horton et al., Gene 77, 61-68, 1989) 的方法、ODA 法(Hashimoto-Gotoh et al., Gene, 152, 271-276, 1995)、Kunkel 法(Kunkel, T. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1985, 82, 488) 等。另外,也可以利用 Site-Directed Mutagenesis System Mutan-SuperExpress Km 试剂盒(Takara Bio, Inc.)、Transformer™ Site-Directed Mutagenesis 试剂盒(Clontech 公司)、KOD-Plus-Mutagenesis Kit (东洋纺公司)等市售的试剂盒。另外,在赋予任意的基因突变之后,可以通过用适当的方法进行酶活性评价和基因分析来取得目标基因。具体来说,通过使用任意克隆的 DNA 片段使同源重组发生的方法,或者通过照射 γ 射线等,从而可以导入任意的基因突变。

[0070] 3. 转化子

[0071] 本发明的转化子是包含所述本发明的硫酯酶基因或含有该基因的重组载体而成的。如后述的实施例所示,本发明的转化子大幅提高脂肪酸或者含有这些脂肪酸的脂质的

生产能力,所述脂肪酸优选为碳原子数为 12 以上的长链脂肪酸,更优选月桂酸、肉豆蔻酸、棕榈酸以及棕榈油酸。另外,对于转化子的脂肪酸生产能力,可以通过后述的实施例记载的方法进行测定。

[0072] 本发明的转化子通过用通常基因工程的方法将所述硫酯酶基因导入宿主而得到。优选为,可以通过将该基因导入能够使所述硫酯酶基因在宿主细胞中表达的载体中来调制重组载体,并将该重组载体导入宿主细胞使宿主细胞转化来制作。得到的转化子提高脂肪酸或含有脂肪酸的脂质的生产能力。

[0073] 首先,对本发明的含有硫酯酶基因的重组载体进行说明。

[0074] 作为使用的载体,只要是能够将本发明的硫酯酶基因导入宿主、并且能够使该基因在宿主细胞内表达的载体即可。例如,可以使用根据所要导入的宿主的种类而具有启动子或终止子等表达调节区域的表达载体,该载体并且具有复制起始点或选择标记等。另外,也可以是在质粒等染色体外进行自增殖·复制的载体,也可以是合并于染色体内的载体。

[0075] 作为具体的载体,在将微生物作为宿主的情况下,例如可以列举 pBlue script II SK(-) (Stratagene 公司制造)、pUC119 (宝酒造公司制造)、pET 系载体(Takara Bio, Inc. 制造)、pGEX 系载体(GE Healthcare, Inc. 制造)、pCold 系载体(Takara Bio, Inc. 制造)、pHY300PLK (Takara Bio, Inc. 制造)、pUB110 (Mckenzie, T. et al., (1986), Plasmid 15(2); p. 93-103)、pBR322 (Takara Bio, Inc. 制造)、pRS403 (Stratagene Corp. 制造)、pMW218/219 (Nippon Gene Co., Ltd. 制造)等。在将植物细胞作为宿主的情况下,例如可以列举 pRI 系载体(Takara Bio, Inc. 制造)、pBI 系载体(Clontech Laboratories, Inc. 制造)、IN3 系载体(Inplanta Innovations, Inc. 制造)等。特别是,在将大肠杆菌作为载体的情况下,优选使用 pBlue script II SK(-) (Stratagene 公司制造)、pMW218/219 (Nippon Gene Co., Ltd. 制造);在将拟南芥作为宿主的情况下,优选使用 pRI 系载体(Takara Bio, Inc. 制造)、pBI 系载体(Clontech Laboratories, Inc. 制造)。

[0076] 启动器或终止子等表达调节区域或选择标记的种类也没有特别地限定,可以根据所要导入的宿主的种类,适当选择通常使用的启动子或标记等来使用。具体来说,作为启动子,可以列举 lac 启动子、trp 启动子、tac 启动子、trc 启动子、T7 启动子、SpoVG 启动子、花椰菜花叶病毒 35SRNA 启动子、肌动蛋白和泛素等看家基因 (house-keeping gene) 的启动子、来自于菜籽的 Napin 基因启动子、来自于植物的 Rubisco 启动子等。另外,作为选择标记,可以列举抗生素抗药性基因(氨苄西林抗性基因、氯霉素抗性基因、红霉素抗性基因、新霉素抗性基因、卡那霉素抗性基因、大观霉素抗性基因、四环素抗性基因、灭瘟素 S 抗性基因、双丙氨膦抗性基因、以及潮霉素抗性基因)等抗药性基因。进一步,也可以将与营养缺陷型相关的基因的缺失等用作选择标记基因。

[0077] 可以采用限制酶处理或结扎等通常的方法,通过将本发明的硫酯酶基因导入这样的载体来构建转化子用的载体。另外,本发明的硫酯酶基因可以通过上述的方法取得。

[0078] 通过由此制得的重组载体,将所述硫酯酶基因导入宿主从而制作转化子。

[0079] 作为转化子的宿主没有特别地限定,可以使用微生物、植物体、动物体。本发明的硫酯酶如后所述优选用于特别是碳原子数为 12 以上的长链脂肪酸的制造,例如,本来不具有将碳原子数为 12 的脂肪酸残基识别为基质的硫酯酶的生物体也可以用作宿主。在本发明中,从脂肪酸或脂质的制造效率以及得到的脂肪酸的利用性的观点出发,作为宿主优

选使用微生物和植物体。作为微生物,可以使用属于埃希氏菌(*Escherichia*)属的微生物或属于芽孢杆菌(*Bacillus*)属的微生物等原核生物,或者酵母或丝状菌等真核微生物,其中,优选大肠杆菌(*Escherichia coli*)、枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)、圆红冬孢酵母菌(*Rhodospiridium toruloides*)、被孢霉菌(*Mortierella* sp.),特别优选大肠杆菌。作为植物体,优选拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、菜籽、椰子、棕榈、萼距花、麻风树(*Jatropha*),特别优选拟南芥。

[0080] 作为转化方法,只要是能够将目标基因导入宿主的方法就没有特别地限定。例如,可以采用使用钙离子的方法、通常的感受态细胞转化方法(*J. Bacteriol.* 93, 1925(1967))、原生质体转化法(*Mol. Gen. Genet.* 168, 111(1979))、电穿孔法(*FEMS Microbiol. Lett.* 55, 135(1990))或者LP转化方法(T. Akamatsu 和 J. Sekiguchi, *Archives of Microbiology*, 1987, 146, p. 353-357; T. Akamatsu 和 H. Taguchi, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2001, 65, 4, p. 823-829)等。

[0081] 另外,导入有目标基因片段的转化子的选择可以通过利用选择标记等来进行。例如,将转化子获得抗药性为指标可以来进行选择,其结果来自于载体的抗药性基因在转化时导入目标DNA片段并且导入宿主细胞中。另外,将染色体组作为模板,通过PCR法等也可以确认目标DNA片段的导入。

[0082] 4. 脂肪酸或脂质的制造方法

[0083] 本发明的脂肪酸或含有脂肪酸的脂质的制造方法使用上述本发明的硫酯酶。作为具体的制造方法,可以列举使用含有编码本发明的硫酯酶的基因的转化子(重组体)的方法、使用精制的Acyl-ACP和本发明的硫酯酶体外进行从Acyl-ACP中切出脂肪酸的方法(Yuan et al., *PNAS*, 1995, (92), p. 10639-10643)等。特别是优选为,在通过上述的方法等得到导入了编码本发明的硫酯酶的基因的转化子之后,使用适当的培养基在适当的条件下培养该转化子,使脂肪酸或含有脂肪酸的脂质产生,从培养物中提取脂肪酸或脂质。另外,在培养基中培养本发明的转化子当然包含微生物或动植物或者其细胞·组织的培养,也包含在土壤等中栽培植物体。另外,在培养物中也包含经培养·栽培等后的转化子。

[0084] 转化子的培养条件可以根据导入了硫酯酶基因的宿主的种类来选择,可以采用适宜优选的培养条件。作为一个例子,在将大肠杆菌用作宿主的转化子的情况下,可以列举在LB培养基中30~37℃下进行培养0.5~1天。另外,在将拟南芥用作宿主的转化子的情况下,在土壤中以温度条件为20~25℃下连续照射白色光或光期为16小时·暗期为8小时等的光照条件下进行栽培1~2个月。

[0085] 另外,从脂肪酸和脂质的生产效率的观点出发,在培养基中可以添加例如作为与硫酯酶的基质或脂肪酸生物合成体系相关的前驱物质的甘油、醋酸、丙二酸等。

[0086] 培养转化子使脂肪酸或脂质产生之后,从培养物(培养体或培养液等)中分离、精制等脂肪酸或含有其的脂质提取。

[0087] 作为分离、回收转化子内产生的脂肪酸或含有其的脂质的方法没有特别地限定,可以通过分离通常生物体内的脂质成分等时使用的方法来进行。例如,可以通过过滤、离心分离、细胞破碎、凝胶过滤色谱法、离子交换色谱法、氯仿/甲醇提取法、己烷提取法、乙醇提取法等从转化子或培养物中分离、回收脂肪酸或含有脂肪酸的脂质成分。另外,在更大规模的情况下,在通过压榨或提取从转化子或培养物中回收油分之后,可以进行脱气、脱酸、

脱色、脱蜡、脱臭等通常的精制,得到脂质。在分离该含有脂肪酸的脂质成分之后,可以通过水解分离的脂质得到脂肪酸。作为从脂质成分中分离脂肪酸的方法,具体来说,可以列举在碱溶液中在 70°C 左右的高温下进行处理的方法、进行脂肪酶处理的方法、使用高压热水进行分解的方法等。

[0088] 由此,可以使用本发明的硫酯酶基因制造脂肪酸或脂质。

[0089] 本发明的脂肪酸或脂质的制造方法可以优选用于特别是碳原子数为 12 以上的长链脂肪酸的制造。其中,本发明的制造方法优选用于制造碳原子数为 12~18 的脂肪酸,更优选用于制造碳原子数为 12~16 的脂肪酸,特别优选用于制造月桂酸(C12:0)、肉豆蔻酸(C14:0)、棕榈酸(C16:0)、棕榈油酸(C16:1)。

[0090] 本发明的制造方法或通过转化子制得的脂肪酸或其衍生物,除了用作食用以外,可以作为乳化剂配合于化妆品等中,或者可以作为皂或洗涤剂等的清洁剂、纤维处理剂、毛发护理剂、或杀菌剂或防腐剂利用。特别是,棕榈油酸可以利用为皮肤功能改善剂(皮肤乳化作用、保护效果、抗炎症作用、减轻发痒刺激、轻度烫伤的镇静等)。

[0091] 实施例

[0092] 以下,基于实施例进一步详细地说明本发明,但是本发明并没有限定于此。

[0093] 实施例 1 来自于椰子(*Cocos nucifera* L.)的 Acyl-ACP 硫酯酶基因的取得

[0094] 1. 由椰子胚乳调制 cDNA

[0095] 从椰子胚乳中提取 RNA。在 RNA 的提取操作中使用 RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Valencia, California)。用液氮冻结椰子胚乳之后,使用研钵和碾槌进行粉碎。将已粉碎的物质移至适量 1.5mL 管中,在其中加入 450 μ L 添加有 1M/100 容量的二硫苏糖醇的 RLT Buffer,将搅拌后的总量适用于 QIA shredder spin column。之后按照试剂盒附上的手册进行操作,得到来自于椰子的 total RNA。使用得到的 total RNA (3.2 μ g) 和 SuperScript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen Carlsbad, California),按照试剂盒附上的手册,通过进行逆转录反应,得到来自于椰子胚乳的 cDNA。

[0096] 2. 来自于椰子的硫酯酶基因(CTE 基因)的克隆

[0097] 与椰子相关的染色体组信息以及与来自于椰子的 Acyl-ACP 硫酯酶相关的基因信息并不是公知的,挑选已知的植物硫酯酶的氨基酸序列,并且挑选各硫酯酶间氨基酸保留性高的区域,相对于该区域设计表 1 所示的简并引物(引物 No. 1~No. 5(序列号 5~9))。具体来说,相当于拟南芥硫酯酶(Genbank ID (GI):804947)中的 105~110 位(AAEKQW)、250~255 位(WVMMN)、310~318 位(DLDVNQHV)、325~324 位(NQHVNNVKY)的氨基酸相对于植物硫酯酶序列设计简并引物。将来自于椰子胚乳的 cDNA 作为模板,进行使简并引物组合的 PCR 反应,通过序列分析确定取得的各 CTE 基因片段的序列。特别是,通过比对由引物 No. 2 和 No. 4 的组合而得到的序列,取得 CTE 基因的部分序列信息。使用参考取得的部分的序列信息设计的 DNA 引物(表 1,引物 No. 6 (序列号 10))以及低聚 dT 引物(表 1,引物 No. 7 (序列号 11))通过 PCR 反应扩增 DNA 片段,进行该 DNA 片段的序列分析,取得、确认编码来自于椰子的硫酯酶的功能性部分的基因的碱基序列(序列号 2)。

[0098] 表 1:

[0099] 表 1 引物序列

[0100]

引物 No.	序列 *	序列号 .
1	ttyathaaycarytnccngaytgg	5
2	gcngcngaraarcartgg	6
3	rtayttnacrttrttnacrtgytgrtt	7
4	rttcatcatnaccca	8
5	acrtgytgrttnacrtcnarrtc	9
6	cagtggaccctgctcgattc	10
7	tttttttttttttttttttttttt	11
8	caggctgactctagagctcgattccaagaagaggggggc	12
9	ggtacccggggatcctcatttactctcagttgg	13
10	ggatccccgggtaccgagctcgaa	14
11	tctagagtcgacctgcagcgcagca	15
12	gcaggtcgactctagagtgaagccgaagccgaagctac	16
13	tcggtacccggggatcctgcagcttctaaaagt	17

[0101] *No. 1~5 的序列中的“h”表示“a、c 或 t”，“r”表示“g 或 a”，“y”表示“c 或 t”，“n”表示肌苷。

[0102] 3. 来自于椰子的硫酯酶的氨基酸序列的分析

[0103] 基于得到的 CTE 基因的碱基序列，分析来自于椰子的硫酯酶的氨基酸序列(序列号 1)。氨基酸序列的同一性(同源性)基于基因信息处理软件 Genetyx-Win (软件开发)的 Lipman-Pearson 法(Science, 227, 1435, (1985)), 使用同源性分析(Search homology)程序, 将 Unit size to compare(ktup)作为 2 进行分析, 由此算出。另外, 氨基酸序列间的对比通过在默认设置下使用 Clustal W 多序列比对程序(Nucleic acids Res. 22, 4673, (1994))来制作。

[0104] 使用 Genetyx-Win 比较分析来自于其它植物的硫酯酶序列与得到的来自于椰子的硫酯酶序列, 其结果, 来自于椰子的硫酯酶与来自于加州月桂的硫酯酶(序列号 3)表现出 50% 的氨基酸同源性, 来自于椰子的硫酯酶与来自于拟南芥的硫酯酶(GI :804947)表现出 59% 的氨基酸同源性, 来自于椰子的硫酯酶与来自于萼距花的硫酯酶(GI :1292906)表现出 55% 的氨基酸同源性, 来自于椰子的硫酯酶与来自于玉米的硫酯酶(GI :226529781)表现出 49% 的氨基酸同源性, 来自于椰子的硫酯酶与来自于棕榈的硫酯酶(GI :90018255)表现出 62% 的氨基酸同源性, 来自于椰子的硫酯酶与来自于稻子的硫酯酶(GI :125554012)表现出

59%的氨基酸同源性,来自于椰子的硫酯酶与来自于大豆的硫酯酶(GI:90192131)表现出57%的氨基酸同源性,确认CTE与任意一种植物硫酯酶没有表现出极高的同源性(作为一个例子,来自于拟南芥的硫酯酶与来自于大豆的硫酯酶表现出82%的氨基酸同源性)。

[0105] 另外,使用Clustal W多序列比对程序进行来自于椰子的硫酯酶与其它植物硫酯酶的氨基酸序列的对序列比对。其结果,Yuan等的报告(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 92, pp. 10639-10643, 1995)中显示的对来自于加州月桂的硫酯酶的C12:0识别重要的相当于197位的蛋氨酸(对应于序列号3的114位的蛋氨酸)、199位的精氨酸(对应于序列号3的116位的精氨酸)以及231位的苏氨酸(对应于序列号3的148位的苏氨酸)的部分中,来自于椰子的硫酯酶中保留197位的蛋氨酸(对应于序列号1的117位的蛋氨酸)、199位的精氨酸(对应于序列号1的119位的精氨酸),231位的氨基酸为来自于加州月桂的硫酯酶以外的植物硫酯酶中常看到的赖氨酸(对应于序列号1的151位的赖氨酸)。197位的蛋氨酸、199位的精氨酸以及231位的赖氨酸的组合也保留于拟南芥或玉米等主要识别C16:0的硫酯酶中。因此,也认为能够以与来自于加州月桂的硫酯酶不同的方式进行来自于椰子的硫酯酶中的C12:0的识别。

[0106] 由此,本发明的来自于椰子的硫酯酶与已知的植物硫酯酶的氨基酸序列的同源性比较低,并且在基质识别中也可以看到差异。

[0107] 实施例2在大肠杆菌中导入有硫酯酶基因的转化子的制作

[0108] 通过下述的方法将实施例1中取得的来自于椰子的硫酯酶(CTE)基因导入大肠杆菌(*Escherichia coli*),得到转化子。为了比较,通过同样的方法,得到在大肠杆菌中导入有来自于加州月桂的Acyl-ACP硫酯酶(BTE)基因的转化子。

[0109] 1. CTE基因表达质粒的构建

[0110] 将实施例1中取得的编码来自于椰子的硫酯酶的功能性部分的基因(序列号2)作为模板,使用表1所示的低聚DNA引物(引物No. 8和No. 9(序列号12和13))通过PCR反应在CTE基因片段的末端赋予质粒载体pMW219(Nippon Gene Co., Ltd. 制造)的部分序列,取得DNA片段。另外,将pMW219作为模板,使用表1所示的低聚DNA引物(引物No. 10和No. 11(序列号14和15))通过PCR反应,直链状地扩增pMW219片段。通过使用In-Fusion Advantage PCR Cloning Kit(Clontech, Mountain View, California)连接CTE基因片段和pMW219片段,构成质粒以与来自于载体的LacZ蛋白质的N末端侧的27氨基酸融合的形式表达CTE基因。

[0111] 2. BTE基因表达质粒的构建

[0112] 将包含编码序列号4所示的碱基序列构成的来自于加州月桂的硫酯酶(BTE)的人工合成基因的质粒作为模板,使用低聚DNA引物(表1,引物No. 12和No. 13(序列号16和17))通过PCR反应在BTE基因片段的末端赋予pMW219的部分序列,从而取得DNA片段。另外,具有序列号4的碱基序列的基因利用Invitrogen, Inc. 提高的受托合成服务取得。通过使用In-Fusion Advantage PCR Cloning Kit连接BTE基因片段和pMW219片段,构建以与来自于载体的LacZ蛋白质的N末端侧的27氨基酸融合的形式表达BTE基因的质粒。

[0113] 3. 转化子中的CTE基因、BTE基因的表达

[0114] 使用上述构建的CTE基因表达质粒或BTE基因表达质粒,转化作为大肠杆菌突变株的K27株(fadD88)(Overath et al, Eur J Biochem. 7(4):559-741969, CSCG#:5478,)

。另外, K27 株为缺失脂肪酸分解体系的变异株。将进行了转化处理的 K27 株在 30℃ 下静置一晚, 将得到的菌落接种于 1mL 的 LBKm 液体培养基 (Bacto Trypton 1%, Yeast Extract 0.5%, NaCl 1%, 卡那霉素 50 μg/mL) 中, 在 30℃ 下振荡培养 12 小时 (预培养液)。将 20 μL 预培养液接种于 2mL 含有 50 μg/mL 卡那霉素的 Overnight Express™ Instant TB Medium 培养基, 在 30℃ 下振荡培养 24 小时 (180rpm)。测量计算培养结束时的培养液的浊度 (OD_{600})。使用得到的培养液, 分析实施例 3 中培养液中所含的脂质成分。

[0115] 实施例 3 用大肠杆菌转化子生产脂肪酸

[0116] 1. 从转化大肠杆菌中提取脂质以及分析脂肪酸组成

[0117] 在 900 μL 实施例 2 中培养开始后经过 24 小时的培养液中添加 40 μL 乙酸以及 40 μL 作为内部标准的溶解于甲醇的 7-十五烷酮 (0.5mg/mL)。进一步, 添加 0.5mL 氯仿和 1mL 甲醇, 充分搅拌之后静置 15 分钟。进一步, 添加 0.5mL 1.5% 氯化钾水溶液和 0.5mL 氯仿, 充分搅拌之后静置 15 分钟。室温下以 1500rpm 进行离心分离 15 分钟之后, 提取下层部分, 氮气下进行干燥。在干燥后的样品中添加 1mL 3-氟化硼甲醇络合物溶液, 在 80℃ 下恒温 10 分钟, 由此进行脂肪酸的甲酯化处理。之后, 添加 1mL 饱和食盐水和 1mL 己烷, 充分搅拌之后静置 30 分钟。提取上层部分, 提供给气相色谱分析 (Hewlett packard 6890)。使用的气相色谱在 [毛细管色谱柱: DB-1MS 30m×200 μm×0.25 μm (J&W Scientific), 移动层: 高纯度氮, 柱内流量: 1.0mL/min, 升温程序: 100℃ (1 分钟) → 10℃/min → 300℃ (5 分钟), 平衡化时间: 1 分钟, 注入口: 分流进样 (分流比: 100:1) • 压力 14.49psi • 104mL/min • 注入量 1 μL, 清洁瓶: 甲醇 • 氯仿, 检测器温度: 300℃] 的条件下进行。

[0118] 2. 脂肪酸量的分析

[0119] 根据由气相色谱分析得到的波形数据的峰面积, 定量各脂肪酸的甲酯量。通过将各峰面积与作为内部标准的 7-十五烷酮的峰面积进行比较, 进行样品间的校正, 算出每 1 升培养液的各脂肪酸量。用事前计算的培养结束时的培养液的吸光度 (OD_{600}) 的值对算出的脂肪酸量进行标准化。将结果表示于图 1 中。

[0120] 另外, 将合计上述算出的各脂肪酸生产量而得到的总脂肪酸生产量表示于图 2 中。

[0121] 由图 1 可以明确, 在导入有来自于椰子的硫酯酶的转化子中, 作为脂肪酸主要积蓄月桂酸 (C12:0)、肉豆蔻酸 (C14:0) 以及棕榈油酸 (C16:1)。月桂酸 (C12:0) 的积蓄量与导入了来自于加州月桂的硫酯酶 (BTE) 的转化子的积蓄量大致相同或高于导入了来自于加州月桂的硫酯酶 (BTE) 的转化子的积蓄量。

[0122] 另外, 由图 2 可以明确, 导入了来自于椰子的硫酯酶的转化子表现出比导入了来自于加州月桂的硫酯酶 (BTE) 的转化子高约 3 倍的总脂肪酸生产量, 确认大幅提高脂肪酸以及脂质的生产能力。

[0123] 3. 椰子胚乳中的脂质的提取以及脂肪酸组成的分析

[0124] 相对于约 100mg 椰子胚乳添加 0.5mL 氯仿、0.5mL 甲醇以及 0.25mL 1.5% 氯化钾水溶液, 进行搅拌, 在由此得到的混合物中进一步添加 40 μL 乙酸以及 40 μL 溶解于甲醇的 7-十五烷酮 (0.5mg/mL)。在其中添加 0.5mL 氯仿和 1mL 甲醇, 之后与上述 1. 同样地进行操作, 进行脂质的提取和脂肪酸的分析。

[0125] 根据由气相色谱分析而得到的波形数据的峰面积, 定量各脂肪酸的甲酯量。基于

该峰面积算出脂肪酸构成比。将结果表示于图 3 中。

[0126] 由图 3 可以明显地确认,在椰子胚乳中积蓄最多月桂酸(C12:0),接着以肉豆蔻酸(C14:0)、棕榈酸(C16:0)、硬脂酸(C18:0)的顺序积蓄脂肪酸。

[0127] 相对于此,在导入了来自于椰子的硫酯酶的转化子中,肉豆蔻酸(C14:0)最多,接着,积蓄较多月桂酸(C12:0)。进一步,在胚乳中几乎没有看到积蓄的棕榈油酸(C16:1)与月桂酸(C12:0)相同程度地积蓄。因此,可知通过使用本发明的来自于椰子的硫酯酶,可以在转化子内生产与椰子胚乳不同组成的脂肪酸。

[0128] 实施例 4 将硫酯酶基因导入拟南芥的转化子的制作

[0129] 通过下述的方法将实施例 1 中取得的来自于椰子的硫酯酶(CTE)基因导入拟南芥(*Arabidopsis thaliana*),制作转化子。

[0130] 1. 拟南芥中的 CTE 基因表达用质粒的构建

[0131] (1) Napin 基因的启动子区域以及终止子区域的克隆

[0132] 通过下述的方法分别从在茨城县潮来市中提取的野生的油菜类植物芜菁(*Brassica rapa*)中取得 Napin 基因的终止子区域,另外,从在栃木县益子町提取的野生如油菜的植物中取得 Napin 基因的终止子区域。

[0133] 使用 PowerPlant DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, USA) 从上述植物中提取染色体组 DNA,将得到的染色体组作为模板,使用 DNA 聚合酶 PrimeSTAR 通过 PCR 反应尝试扩增各启动子和终止子区域。具体来说,使用表 2 所示的引物 No. 1 和 No. 2(序列号 21 和序列号 22)的引物对扩增来自于芜菁(*Brassica rapa*)的 Napin 基因启动子区域,使用引物 No. 3 和 No. 4(序列号 23 和序列号 24)的引物对扩增来自于芜菁(*Brassica rapa*)的 Napin 基因终止子区域。对于发现有扩增的来自于芜菁(*Brassica rapa*)的 Napin 基因的启动子和终止子,将 PCR 产物作为模板,再次进行 PCR 反应。此时, Napin 基因启动子使用表 2 所示的引物 No. 5 和 No. 6(序列号 25 和序列号 26)的引物对, Napin 基因终止子使用引物 No. 3 和 No. 7(序列号 23 和序列号 27)的引物对。通过 PCR 扩增的 DNA 片段使用 Mighty TA-cloning Kit (Takara Bio, Inc. 制造)在两末端添加脱氧腺嘌呤(dA)之后,通过结扎反应插入 pMD20-T vector (Takara Bio, Inc. 制造),分别构建包含 Napin 基因启动子的质粒 pNnapin1、以及包含 Napin 基因终止子的质粒 pTnapin1。将这些质粒供给序列分析,确定启动子区域的碱基序列(序列号 18)以及终止子区域的碱基序列(序列号 19)。

[0134] (2) 植物导入用载体的构建

[0135] 作为植物导入用载体使用 pRI909 (Takara Bio, Inc. 制造)。

[0136] 在 pRI909 中导入来自于芜菁(*Brassica rapa*)的 Napin 基因的启动子和 Napin 基因的终止子。首先,将所述(1)中制作的质粒 pNnapin1 作为模板,使用 PrimeSTAR、表 2 所示的引物 No. 8 和 No. 9(序列号 28 和序列号 29)的引物对,通过 PCR 反应扩增在两末端添加有限制酶识别序列的启动子区域的 DNA 片段。另外,将质粒 pTnapin1 作为模板,使用 PrimeSTAR、表 2 所示的引物 No. 10 和 No. 11(序列号 30 和序列号 31)的引物对,通过 PCR 反应扩增终止子区域的 DNA 片段。对于扩增片段,使用 Mighty TA-cloning Kit (Takara Bio, Inc. 制造)在两末端添加脱氧腺嘌呤(dA)之后,通过结扎反应插入 pMD20-T vector (Takara Bio, Inc. 制造),分别构建质粒 pNnapin2 以及 pTnapin2。用 Sal I 和 Not I 处理质粒 pNnapin2,用 Sma I 和 Not I 处理质粒 pTnapin2,通过结扎反应插入用 Sal I 和 Sma I

处理过的质粒 pRI909, 构建质粒 p909PTnapin。

[0137] 利用 Invitrogen 公司 (Carlsbad, California) 提供的受托合成服务取得编码来自于加州月桂的 Acyl-ACP 硫酯酶 (BTE) 基因的叶绿体转移信号肽的基因 (序列号 20)。

[0138] 将包含上述序列的质粒作为模板, 使用 PrimeSTAR、表 2 所示的引物 No. 12 和 No. 13 (序列号 32 和序列号 33) 的引物对, 通过 PCR 反应扩增编码叶绿体转移信号肽的基因片段。经过扩增的基因片段使用 Mighty TA-cloning Kit (Takara Bio, Inc. 制造) 在两末端添加脱氧腺嘌呤 (dA) 之后, 通过结扎反应插入 pMD20-T vector (Takara Bio, Inc. 制造), 构建质粒 pSignal。通过用 Not I 处理 pSignal, 并且用结扎反应将 pSignal 连接于 p909PTnapin 的 Not I 位点, 从而得到质粒 p909PTnapin-S。

[0139] 将实施例 1 中取得的编码来自于椰子的硫酯酶 (CTE) 的功能性部分的基因 (序列号 2) 作为模板, 使用 PrimeSTAR MAX 以及表 2 所示的引物 No. 14 和 No. 15 (序列号 34 和序列号 35) 的引物对, 通过 PCR 反应扩增编码 CTE 基因的 DNA 片段。另外, 将 p909PTnapin-S 作为模板, 使用引物 No. 16 和 No. 17 (序列号 36 和序列号 37) 的引物对, 将 p909PTnapin-S 作为直链状片段扩增。使用 In-Fusion Advantage PCR Cloning Kit (Clontech Laboratories, Inc. 制造) 连接 CTE 基因片段和 p909PTnapin-S 片段。

[0140] 由此, 构建包含来自于椰子的硫酯酶 (CTE) 基因序列的植物导入用质粒 p909CTE, 在该质粒中, 通过来自于 Brassica rapa (油菜) 的 Napin 基因启动子控制其表达, 并且通过来自于加州月桂的硫酯酶基因 (BTE) 的叶绿体转移信号肽向叶绿体转移。

[0141] 表 2:

[0142] 表 2

[0143]

引物 No.	序列 (5' -3')	序列号
1	GATATCACTACAATGTCGGAGAGACAAGGC	21
2	TTGTGTATGTTCTGTAGTGATGAGTTTTGG	22
3	AGTGTGTATAACCACGGTGATATGAGTGT	23
4	AAGCTTTATCGGTAAAACAACGAGCAGAG	24
5	GGGGGTCGACGATATCACTACAATGTCGGAGAGACAAGGCTGCGCCA	25
6	GCTAAAGAGGTGGTGGCCATTTGTGTATGTTCTGTAGTGATGAGTTTTGGTTTGAGT	26
7	CCCCCGGGAAGCTTTATCGGTAAAACAACGAGCAGAGCAAGAAT	27
8	GGGGGTCGACGATATCACTACAATGTCGGAGAGACAAGGCTGCGCCA	28
9	CATATGCCGCGGCCGCCACTAGTTTGTGTATGTTCTGTAGTGATGAGTT	29
10	ACTAGTGGGCGGCCGCGCATATGGTGTGTATAACCACGGTGATATGAGT	30

11	CCCCCGGGAAGCTTTATCGGTAAAACAACGAGCAGCAAGAAT	31
12	GCGGCCGCATGGCCACCACCTCTTTAGCTT	32
13	GCGGCCGCTCTAGATTGGTCCACTGCTTCTCAGCAGCCG	33
14	TGGACCAATCTAGAGCTCGATTCCAAGAAGAGGGGGG	34
15	ATATGCCGCGCCGCTCATTACTCTCAGTTGGGTGC	35
16	CTCTAGATTGGTCCACTGCTTCTCA	36
17	GCGGCCGCGGCATATGGTGTGTA	37

[0144] 2. 拟南芥的转化和栽培方法

[0145] 将构建的植物导入用载体 p909CTE 供给 Inplanta Innovations, Inc. 的拟南芥转化受托服务, 得到导入有 CTE 基因的拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* (Colombia 株)) 的转化子 Pnapin-CTE。

[0146] 将拟南芥野生株以及转化子 Pnapin-CTE 一同在土壤中以 22°C 下, 使用荧光灯照明在光期 16 小时 (约 4000 勒克斯)、暗期 8 小时的条件下进行栽培。在约 2 个月的栽培后看, 收获种子。

[0147] 实施例 5 用拟南芥转化子生产脂肪酸以及脂质

[0148] 对于实施例 4 中构建的拟南芥转化子 (Pnapin-CTE) 以及拟南芥野生株, 通过下述的方法进行种子中的脂质量以及脂肪酸组成的分析。

[0149] 1. 从种子中提取脂质和脂肪酸的甲酯化

[0150] 用种子勺 (seed spoon) (200 粒用, Biomedical Science Co., Ltd. 制造) 舀取 2 杯左右, 放入 Lysing Matrix D (MP Biomedicals, USA)。将 Lysing Matrix D 安装于 FastPrep (MP Biomedicals), 以速度 6.0 使之振动 20 秒粉碎种子, 在其中添加 20 μ L 的 7-十五烷酮 (0.5mg/mL, 甲醇) (内部标准) 和 20 μ L 乙酸, 加入 0.25mL 氯仿、0.5mL 甲醇, 充分搅拌之后静置 15 分钟。进一步, 添加 0.25mL 1.5% 氯化钾水溶液和 0.25mL 氯仿, 充分搅拌之后静置 15 分钟。室温下以 1500rpm 进行离心分离 5 分钟之后, 提取下层部分, 用氮气干燥。在干燥后的样品中加入 100 μ L 溶解于甲醇中的 0.5N 氢氧化钾-甲醇溶液, 70°C 下恒温 30 分钟, 由此水解三酰基甘油。通过添加 0.3mL 3-氟化硼甲醇络合物溶液, 溶解干燥物, 80°C 下恒温 10 分钟, 进行脂肪酸的甲酯化处理。其后, 添加 0.2mL 饱和食盐水和 0.3mL 己烷, 充分搅拌之后静置 30 分钟。提取包含脂肪酸的甲酯的己烷层 (上层部分), 供给气相色谱 (GC) 分析。

[0151] 2. 气相色谱 (GC) 分析

[0152] 用 GC 分析上述已经甲酯化的样品。使用的 GC 使用柱: DB1-MS (J&W Scientific, Folsom, California)、分析装置: 6890 (Agilent technology, Santa Clara, California), 在 [柱温箱温度: 100°C 保持 1 分钟 \rightarrow 100~300°C (10°C / 分钟升温) \rightarrow 300°C 保持 5 分钟 (post-run 2 分钟), 注入检测器温度: 300°C, 注入法: 分流模式 (分流比 = 193:1), 样品注入量 1-2 μ L, 柱流速: 0.5mL/min 常数, 检测器: FID, 载气: 氢, 补气: 氮] 的条件下进行。根据由 GC 分析而得到的波形数据的峰面积, 定量各脂肪酸的甲酯量。另外, 通过将各峰面积

与作为内部标准的 7-十五烷酮的峰面积进行比较,进行样品间的校正,算出供分析的全部种子中所含的脂肪酸量。另外,通过用事前测量的种子数去除算出的脂肪酸量,算出每 100 粒种子的脂肪酸量。另外,对应于种子中的各脂质的 GC 的峰通过各脂肪酸的标准品的甲酯的保留时间(Retention Time, RT)以及用下述的 GC/MS 进行的分析来鉴定。

[0153] 3. GC/MS 分析

[0154] 对于供给 GC 分析的样品,根据需要使用毛细管色谱柱:DB1-MS、GC 分析装置:7890A (Agilent technology)、MS 分析装置:5975C (Agilent technology),在以下的条件下进行 GC/质谱(MS)分析。[柱温箱温度:100℃保持 2 分钟→100~300℃(10℃/分钟升温)→300℃保持 5 分钟(平衡时间 2 分钟,320℃下 post-run 5 分钟)或者 100℃保持 2 分钟→100~200℃(10℃/分钟升温)→200~320℃(50℃/分钟升温)→320℃保持 5 分钟(平衡时间 2 分钟,320℃下 post-run 5 分钟),注入检测器温度:250℃,注入法:分流模式,样品注入量 1 μL,柱流速:1mL/min 常数,检测器:FID,载气:氢,补气:氮,溶剂等待时间:7 分钟或 3.5 分钟,离子化法:EI 法,离子源温度:250℃,接口温度:300℃,测定模式:扫描模式(m/z:20~550 或 10~550)]

[0155] 根据由上述 GC 分析得到的峰面积,分别算出拟南芥转化子 Pnapin-CTE 以及野生株的种子中所含的各脂肪酸的量,将总脂肪酸量(脂质量)表示于图 4 中,将总脂肪酸量中各脂肪酸所占的比例表示于图 5 中。另外,在图 4 和 5 中,将由 2 个独立的种子的集团而得到的结果的平均值表示野生株种子的脂质含量,将独立的 5 株的平均值表示转化子 Pnapin-CTE 中的脂质含量。

[0156] 由图 4 可知,导入了 CTE 基因的转化子 Pnapin-CTE 的种子与野生型的种子相比,总脂肪酸量(脂质含量)更多。

[0157] 另外,由图 5 可以明确,在转化子 Pnapin-CTE 中包含野生型的拟南芥中不含的月桂酸(C12:0)以及肉豆蔻酸(C14:0),进一步,棕榈酸(C16:0)的量也增加。进一步,可知,在转化子 Pnapin-CTE 中,相比于月桂酸(C12:0),含有更多的肉豆蔻酸(C14:0)以及棕榈酸(C16:0),转化子的脂肪酸组成与椰子胚乳不同。

[0158] 因此,可知通过本发明的来自于椰子的硫酯酶,可以提高转化子的脂肪酸以及脂质生产能力,并且可以以与椰子胚乳的脂肪酸组成不同的比例生产脂肪酸。

[0159] 产业上利用的可能性

[0160] 本发明的硫酯酶具有优异的脂肪酸生产能力,通过将编码该硫酯酶的基因导入微生物或植物等,可以提高转化子的脂肪酸以及脂质的生产能力。由该转化子制得的脂肪酸以及脂质或其衍生物可以利用为配合于食用、化妆品等的乳化剂,皂或洗剂等清洁剂、纤维处理剂、毛发护理剂或者杀菌剂或防腐剂等。

[0161] 尽管将本发明与其实施方式一起进行说明,但是,除非特别指定,本发明并不限于说明的任意详细部分,可以在不违反附加的权利要求所示的发明精神和范围的情况下进行广泛的解释。

[0162] 本申请基于 2010 年 5 月 6 日在日本进行专利申请的日本特愿 2010-106570、以及 2011 年 2 月 2 日在日本进行专利申请的日本特愿 2011-20737 主张优先权,在此作为参照并将其内容作为本说明书记载的一部分引入。

Asn Leu Ile Trp Val Val Ala Lys Met Leu Val His Val Glu Arg Tyr
85 90 95

Pro Trp Trp Gly Asp Val Val Gln Ile Asn Thr Trp Ile Ser Ser Ser
100 105 110

Gly Lys Asn Gly Met Gly Arg Asp Trp His Val His Asp Cys Gln Thr
115 120 125

Gly Leu Pro Ile Met Arg Gly Thr Ser Val Trp Val Met Met Asp Lys
130 135 140

His Thr Arg Arg Leu Ser Lys Leu Pro Glu Glu Val Arg Ala Glu Ile
145 150 155 160

Thr Pro Phe Phe Ser Glu Arg Asp Ala Val Leu Asp Asp Asn Gly Arg
165 170 175

Lys Leu Pro Lys Phe Asp Asp Asp Ser Ala Ala His Val Arg Arg Gly
180 185 190

Leu Thr Pro Arg Trp His Asp Phe Asp Val Asn Gln His Val Asn Asn
195 200 205

Val Lys Tyr Val Gly Trp Ile Leu Glu Ser Val Pro Val Trp Met Leu
210 215 220

Asp Gly Tyr Glu Val Ala Thr Met Ser Leu Glu Tyr Arg Arg Glu Cys
225 230 235 240

Arg Met Asp Ser Val Val Gln Ser Leu Thr Ala Val Ser Ser Asp His
245 250 255

[0003]

Ala Asp Gly Ser Pro Ile Val Cys Gln His Leu Leu Arg Leu Glu Asp
 260 265 270

Gly Thr Glu Ile Val Arg Gly Gln Thr Glu Trp Arg Pro Lys Gln Gln
 275 280 285

Ala Cys Asp Leu Gly Asn Met Gly Leu His Pro Thr Glu Ser Lys
 290 295 300

<210> 2

<211> 912

<212> DNA

<213> 椰子(Cocos nucifera)

<400> 2

ctcgattcca agaagagggg ggccgacgcg gtcgcagatg cctctggggt cgggaagatg
 60

gtcaagaatg gacttgitta caggcagaat tttctatcc ggtectacga aatcggggtt
 120

gataaacgtg ctteggtaga ggcattgatg aatcatttcc aggaaacgtc gcttaacct
 180

tgcaagtgta ttggccttat geatggcggc tttggttgta caccagagat gactcgaaga
 240

aatctgatat gggttgttgc caaaatgctg gttcatgtcg aacgttatcc ttggtgggga
 300

gacgtggttc aaataaatac gtggattagt tcactctggaa agaatggtat gggacgtgat
 360

tggeatgttc atgactgcca aactggccta cctattatga ggggtaccag tgtctgggtc
 420

atgatggata aacacacgag gagactgtct aaacttctg aagaagttag agcagagata
 480

accctttct tttcagagcg tgatgctggt ttggacgata acggcagaaa actteccaag

[0004]

540

ttcgatgatg attctgcage teatgttcga aggggettga ctctctgttg geatgatttc
600

gatgtaaadc agcatgtgaa caatgtcaaa tacgtcggtt ggattcttga gagegttctt
660

gtgtggatgt tggatggcta cgaggttgca accatgagtc tggaataacc gagggagtgt
720

aggatggata gtgtggtgca gtctctcacc gccgtctctt ccgaccacgc cgacggctcc
780

cccctcgtgt gccagcatct tctgcggctc gaggatggga ctgagattgt gaggggtcaa
840

acagaatgga ggcctaagca gcaggcttgt gatcttggga acatgggtct gcaccaact
900

gagagtaaat
912 ga

<210> 3

<211> 299

<212> PRT

<213> 加州月桂(Umbellularia californica)

<400> 3

Leu Glu Trp Lys Pro Lys Pro Lys Leu Pro Gln Leu Leu Asp Asp His
1 5 10 15

Phe Gly Leu His Gly Leu Val Phe Arg Arg Thr Phe Ala Ile Arg Ser
20 25 30

Tyr Glu Val Gly Pro Asp Arg Ser Thr Ser Ile Leu Ala Val Met Asn
35 40 45

His Met Gln Glu Ala Thr Leu Asn His Ala Lys Ser Val Gly Ile Leu

[0005]

225	230	235	240
Ser Val Leu Arg Ser Leu Thr Thr Val Ser Gly Gly Ser Ser Glu Ala			
	245	250	255
Gly Leu Val Cys Asp His Leu Leu Gln Leu Glu Gly Gly Ser Glu Val			
	260	265	270
Leu Arg Ala Arg Thr Glu Trp Arg Pro Lys Leu Thr Asp Ser Phe Arg			
	275	280	285
Gly Ile Ser Val Ile Pro Ala Glu Pro Arg Val			
290	295		

<210> 4

<211> 901

<212> DNA

<213> 加州月桂(Umbellularia californica)

<400> 4

tctagagtgg aagccgaagc egaagctacc ccagttgctt gatgaccatt tiggactgca
60

tgggttagtt ttcaggegea cctttgccat cagatettat gaggtgggac ctgaccgctc
120

cacatctata ctggctgtta tgaatcacat gcaggaggct acacttaate atgcgaagag
180

tgtgggaatt ctaggagatg gattcgggac gacgctagag atgagtaaga gagatctgat
240

gtgggttgtg agacgcacgc atgttgctgt ggaacggtae cctacttggg gtgatactgt
300

agaagtagag tgctggattg gtgcatctgg aaataatgge atgcgacgtg atttccttgt
360

ccgggactgc aaaacaggeg aaattcttac aagatgtacc agcctttegg tgctgatgaa

[0007]

420

tacaaggaca aggaggttgt ccacaatccc tgacgaagtt agaggggaga tagggcctgc
480

attcattgat aatgtggctg tcaaggacga tgaattaag aaactacaga agctcaatga
540

cagcaactgea gattacatcc aaggaggttt gactcctcga tggaatgatt tggatgtcaa
600

tcagcatgtg aacaacctca aatacgttgc ctgggttttt gagaccgtcc cagactccat
660

ctttgagagt catcatatth ccagcttcac tcttgaatac aggagagagt gcacgaggga
720

tagcgtgctg cggtccttga ccaetgtctc tggtgctcgc tcggaggctg ggttagtgtg
780

cgateacttg ctccagcttg aaggtgggtc tgaggtattg agggcaagaa cagagtggag
840

gcctaagett accgatagtt tcagagggat tagtgtgata cccgcagaac cgagggtgta
900

a
901

<210> 5
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 寡核苷酸引物 No. 1

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(15)
<223> 符号“n”表示 i (肌昔)

[0008]

- <220>
 <221> misc_feature
 <222> (18).. (18)
 <223> 符号"n"表示 i (肌苷)
- <400> 5
 ttyathaayc arytnccnga ytgg
 24
- <210> 6
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 寡核苷酸引物 No. 2
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3).. (3)
 <223> 符号"n"表示 i (肌苷)
- <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6).. (6)
 <223> 符号"n"表示 i (肌苷)
- <400> 6
 gengcngara arcartgg
 18
- <210> 7
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 寡核苷酸引物 No. 3
- <220>

[0009]

<220>

<223> 寡核苷酸引物 No. 8

<400> 12

caggtcgact ctagagctcg attccaagaa gaggggggc
39

<210> 13

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸引物 No. 9

<400> 13

ggtaccceggg gatcctcatt tactctcagt tgg
33

<210> 14

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸引物 No. 10

<400> 14

ggatccccgg gtaccgagct cgaa
24

<210> 15

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸引物 No. 11

<400> 15

tctagagtcg acctgcaggc atgcaa

[0012]

26

<210> 16
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 寡核苷酸引物 No. 12

<400> 16
 gcaggtcgac tctagagtgg aagccgaagc cgaagctac
 39

<210> 17
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 寡核苷酸引物 No. 13

<400> 17
 fcggtacecg gggatccctg cagcttctaa aaagt
 35

<210> 18
 <211> 1747
 <212> DNA
 <213> 芜菁 (Brassica rapa)

<400> 18
 gatataccta caatgtcgga gagacaaggc tgcgccagca tatacaaaag ggaaatgaag
 60

atggcctttt gattagctgt gtagcatcag cagctaattc ctgggctctc atcatggatg
 120

ctggaactgg attcaattct caagtttatg agttgtcacc ggtcttecta cacaaggtaa
 180

[0013]

taatcagttg aagcaattaa gaatcaatth gattttagt aaactaagaa gaacttacct
 240
 tatgttttcc ccgcaggact ggattatgga acaatgggaa aagaactact atataagetc
 300
 catagctggt tcagataacg ggagctcttt agttgttatg tcaaaaggff agtgtttagt
 360
 gaataataaa cttataccac aaagtettca ttgacttatt tatatacttg ttgtgaattg
 420
 ctaggaacta cttattctca gcagtcatac aaagttagtg actcatttcc gttcaagtgg
 480
 ataaataaga aatggaaaga agattttcat gtaaccteca tgacaactgc tggtaatcgt
 540
 tggggtgtgg taatgtegag gaactctggc ttctctgate aggtaggttt ttgtctctta
 600
 tggctcgggg gtttttattt cccctgatag tctaataatga taaactctgc gttgtgaaag
 660
 gtggtggagc ttgacttttt gtaccaagc gatgggatac ataggaggtg ggagaatggg
 720
 tatagaataa catcaatggc agcaactgcg gatcaagcag ctttcatatt aagcatacca
 780
 aagegtaaga tgggtgatga aactcaagag actctccgca ccaccgectt tccaagtact
 840
 catgtcaagg ttggtttctt tagctttgaa cacagatttg gatctttttg ttttgtttcc
 900
 atatacttag gacctgagag cttttggttg attttttttt caggacaaat gggcgaagaa
 960
 tctgtacatt gcateaatat gctatggcag gacagtgtgc tgatacacac ttaagcatca
 1020
 tgtggaaagc caaagacaat tggagcgaga ctcagggtcg tcataatacc aatcaaagac
 1080

[0014]

gtaaaaccag acgcaacctc tttggttgaa tgtaatgaaa gggatgtgtc ttggtatgta
1140

tgtaacgaata acaaaaagaga agatggaatt agtagtagaa atatitggga gcttttlaag
1200

ccettcaagt gtgcttttta tcttatigat atcatccatt tgegittgttt aatgcgtctc
1260

tagatatgtt cctatatctt tctcagtgtc tgataagtga aatgtgagaa aaccatacca
1320

aacaaaaata ttcaaafett atttttaata atgttgaatc acteggagtt gccacettct
1380

gtgccaattg tgctgaatct atcacactag aaaaaaacat ttcttcaagg taatgacttg
1440

tggactatgt tetgaattct cattaagttt ttattttctg aagtittaagt ttttaccttc
1500

tgttttgaaa tatategttc ataagatgtc acgccaggac atgagctaca categcacat
1560

agcatgcaga tcaggacgat ttgtcactca cttcaaacac ctaagagctt ctctctcaca
1620

gcgcacacac atatgcatgc aatatttaca cgtgatcgcc atgcaaafct ceattctcac
1680

ctataaatta gagecteggc ttcactcttt actcaaacca aaactcatca ctacagaaca
1740

tacacaa
1747

<210> 19

<211> 1255

<212> DNA

<213> 芜菁 (Brassica rapa)

<400> 19

[0015]

```

gtgtgtatac cacggtgata tgagtgtggt tgttgatgta tgttaacact acatagtcac
60

ggtgtgtggt ccataaataa tgtactaatg taataagaac tactccgtag acggtataaa
120

aagagaagtt ttttttttta ctcttgctac ttectataa agtgatgatt aacaacagat
180

acaccaaaaa gaaaacaatt aatctatatt cacaatgaag cagtactagt ctattgaaca
240

tgtcagattt tctttttcta aatgtctaata taagccttca aggctagtga tgataaaaga
300

tcatccaatg ggateccaaca aagactcaaa tctggttttg atcagatact tcaaaactat
360

ttttgtatcc attaaattat gcaagtgttc ttttatttgg tgaagactct ttagaagcaa
420

agaacgacaa gcagtaataa aaaaaacaaa gttcagtttt aagatttggt attgacttat
480

tgtcatttga aaaatatagt atgatattaa tatagtttta tttatataat gcttgtctat
540

tcaagatttg agaacattaa tatgatactg tccacatata caatatatta agtttcattt
600

ctgttcaaac atatgataga tgggtcaaatg attatgagtt ttgttattta cctgaagaaa
660

gataagtgag cttecgagtt ctgaagggta cgtgatcttc atttcttgge taaaagcgaa
720

tatgacatca cctagagaaa gccgataata gtaaactctg ttcttggttt ttggtttaat
780

caaaccgaac cggtagctga gtgtcaagtc agcaaacatc gcaaaccata tgteaattcg
840

ttagattccc ggtttaagtt gtaaaccggt atttcatttg gtgaaaacce tagaagccag
900

```

[0016]

ccaccctttt taatctaatt tttgtaaacg agaagtcacc acacctctec actaaaaccc
960

tgaaccttac tgagagaagc agagegcagc tcaaagaaca aataaaaccc gaagatgaga
1020

ccaccacgtg gcggcgggag cttcagggga cggggaggaa gagatggcgg cggacgcttt
1080

ggtggcggcg gcggacgttt tgggtggcgc ggtggacgct ttggtggcgg cggtggacgc
1140

tttggtggtg gtggatatcg tgacgaaggg cctcccagcg aagtcattgg ttcgtttact
1200

ctttacttag tcgaatctta ttcttgctct gctcgttggt ttaccgataa agctt
1255

<210> 20

<211> 240

<212> DNA

<213> 加州月桂(Umbellularia californica)

<400> 20

atggccacca cctcttttagc ttccgctttc tgetcgatga aagctgtaat gttggctcgt
60

gatggccggg gcatgaaacc caggagcagt gatttgcage tgagggcggg aaatgcgcca
120

acctctttga agatgatcaa tgggaccaag ttcagttaca cggagagctt gaaaaggttg
180

cctgaactgga gcatgctctt tgeagtgate acaaccatct tttcggctgc tgagaagcag
240

<210> 21

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

[0017]

29

<210> 25
<211> 47
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 用于拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的寡核苷酸引物 No. 5

<400> 25

gggggtcgac gatatcacta caatgtcggc gagacaaggc tgcgcca
47

<210> 26
<211> 57
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> oligonucleotide primer No. 6 用于拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的寡核苷酸引物 No. 6

<400> 26

gctaaagagg tgggtggccat ttgtgtatgt tctgtagtga tgagttttgg tttgagt
57

<210> 27
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 用于拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的寡核苷酸引物 No. 7

<400> 27

ccccccggga agctttatcg gtaaaacaac gagcagagca agaat
45

<210> 28

[0019]

<211> 47
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 用于拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的寡核苷酸引物 No. 8

<400> 28

gggggtcgac gatataccta caatgtcgga gagacaaggc tgcgcca
47

<210> 29
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 用于拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的寡核苷酸引物 No. 9

<400> 29

catatgcccgc ggccgcccac tagtttgtgt atgttctgta gtgatgagtt
50

<210> 30
<211> 49
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 用于拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的寡核苷酸引物 No. 10

<400> 30

actagtgggc ggccgcgga tatggtgtgt ataccacggt gatatgagt
49

<210> 31
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

[0020]

<223> 用于拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的寡核苷酸引物 No. 11

<400> 31

ccccccggga agctttatcg gtaaaacaac gagcagagca agaat
45

<210> 32

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的寡核苷酸引物 No. 12

<400> 32

gcggccgcat ggccaccacc tctttagctt
30

<210> 33

<211> 39

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的寡核苷酸引物 No. 13

<400> 33

gcggccgctc tagattggtc cactgcttet cagcagccg
39

<210> 34

<211> 37

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的寡核苷酸引物 No. 14

<400> 34

tggaccaatc tagagctcga ttccaagaag agggggg
37

[0021]

<210> 35

<211> 37

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的寡核苷酸引物 No. 15

<400> 35

atatgccgcg

gccgetcatt

tactctcagt

tgggtgc

37

<210> 36

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的寡核苷酸引物 No. 16

<400> 36

ctctagattg

gtccactgct

tctca

25

<210> 37

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的寡核苷酸引物 No. 17

<400> 37

gcggccgcgg

catatggtgt

gta

23

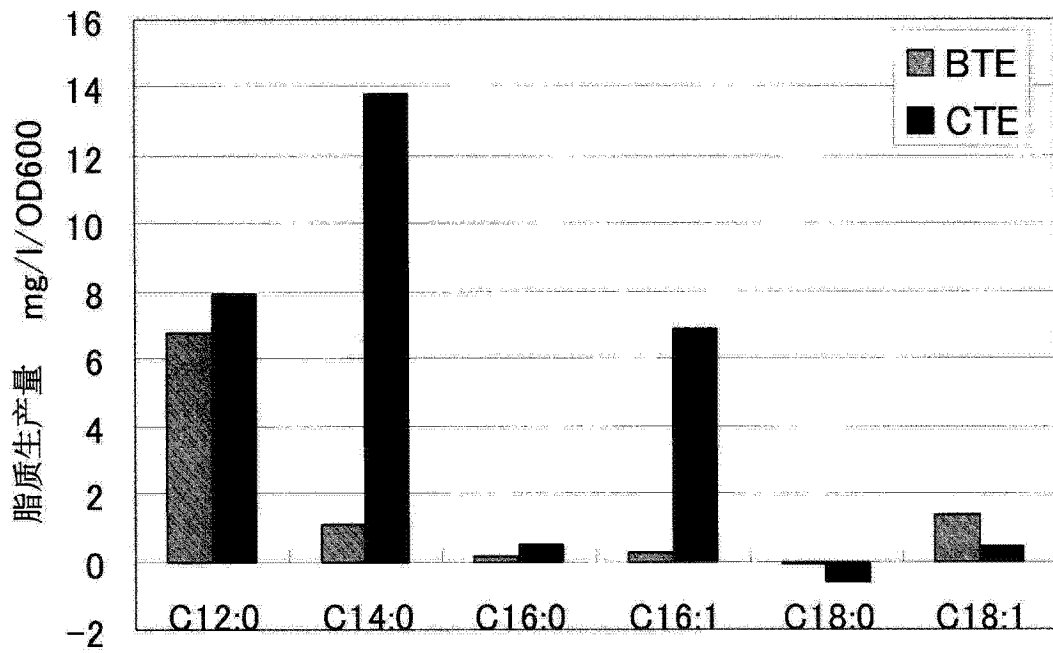


图 1

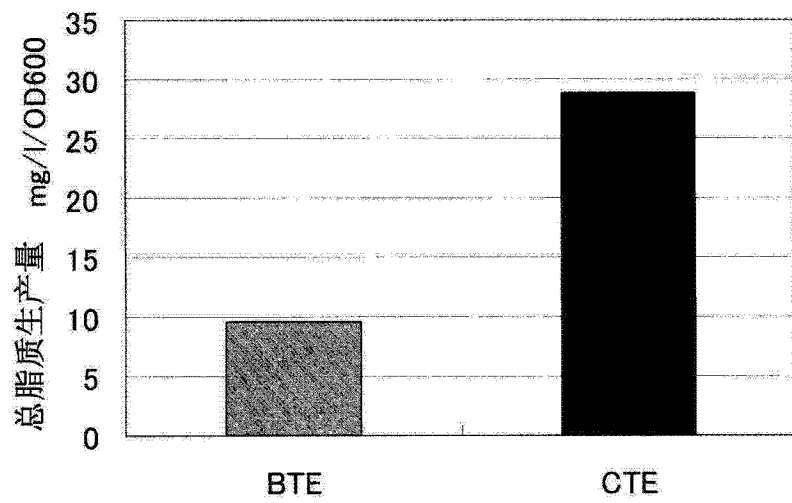


图 2

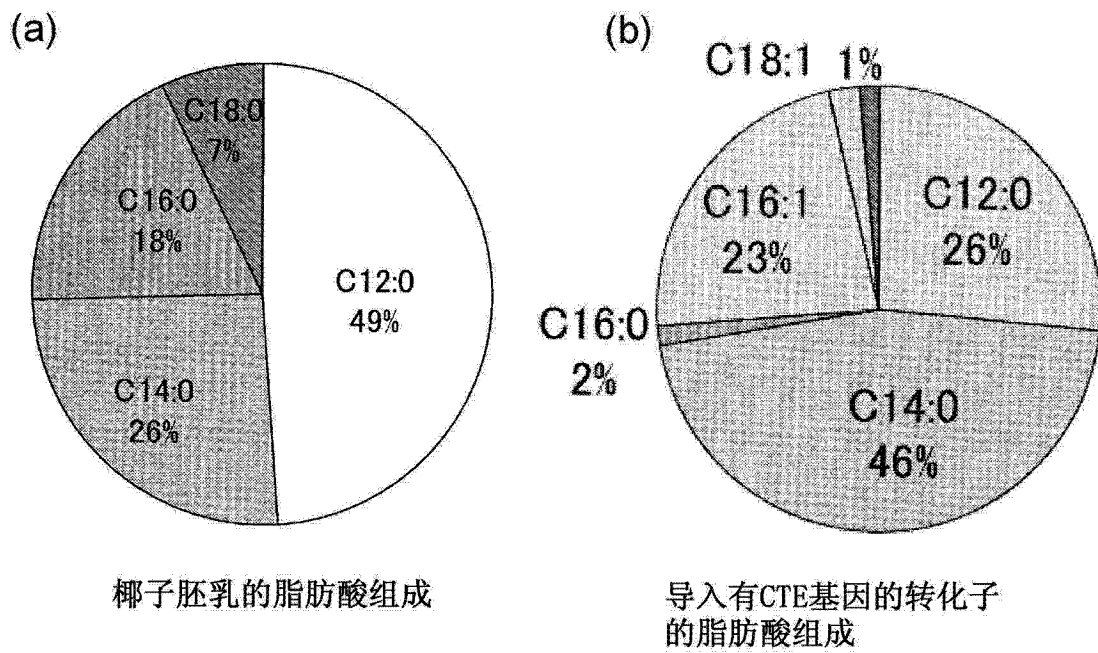


图 3

总脂肪酸量

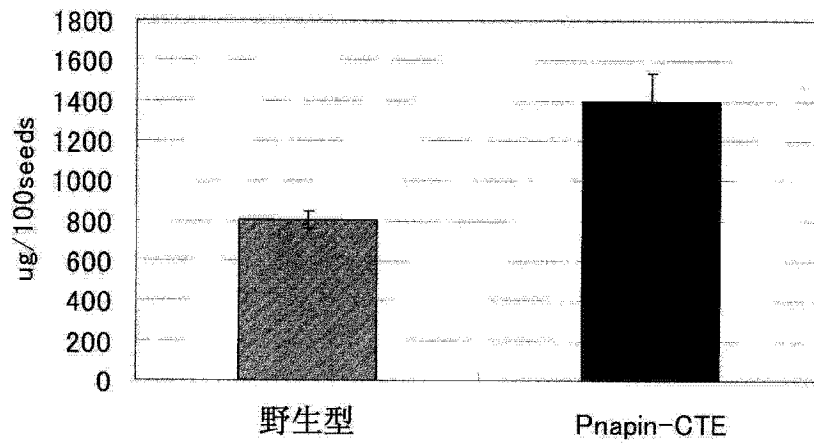


图 4

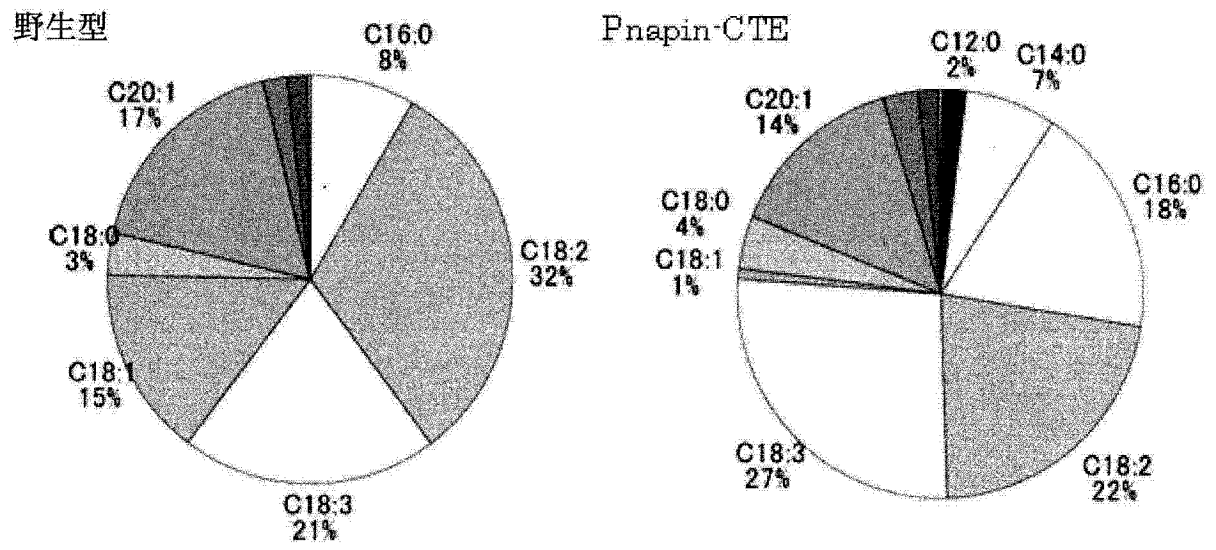


图 5