



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0039657
(43) 공개일자 2017년04월11일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23D 9/00 (2006.01) A01H 5/00 (2006.01)
A61K 31/201 (2006.01) C11B 1/10 (2006.01)
C11B 3/00 (2006.01) C11B 3/04 (2006.01)
C11B 3/12 (2006.01) C12N 15/82 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A23D 9/00 (2013.01)
A01H 5/00 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2017-7002195
- (22) 출원일자(국제) 2015년06월18일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2017년01월24일
- (86) 국제출원번호 PCT/AU2015/050340
- (87) 국제공개번호 WO 2015/196250
국제공개일자 2015년12월30일
- (30) 우선권주장
2014902471 2014년06월27일 오스트레일리아(AU)
(뒷면에 계속)

- (71) 출원인
커먼웰쓰 사이언티픽 앤 인더스트리얼 리서치 오
거니제이션
오스트레일리아, 2601, 오스트레일리안 캐피탈 테
리토리, 액톤, 클루니즈 로스 스트리트
누시드 피티와이 리미티드
오스트레일리아, 빅토리아 3028, 래버튼, 103-105
파이프 로드
그레인스 리서치 앤드 디벨롭먼트 코퍼레이션
오스트레일리아 에이씨티 2600, 바튼, 4 내셔널
서킷, 레벨 4
- (72) 발명자
페트리, 제임스 로버트슨
오스트레일리아, 뉴 사우스 웨일즈 2580, 골번,
16 헨리 스트리트
싱, 수린더 팔
오스트레일리아, 오스트레일리안 캐피탈 테리토리
2602, 다운너, 10 루카스 플레이스
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
손민

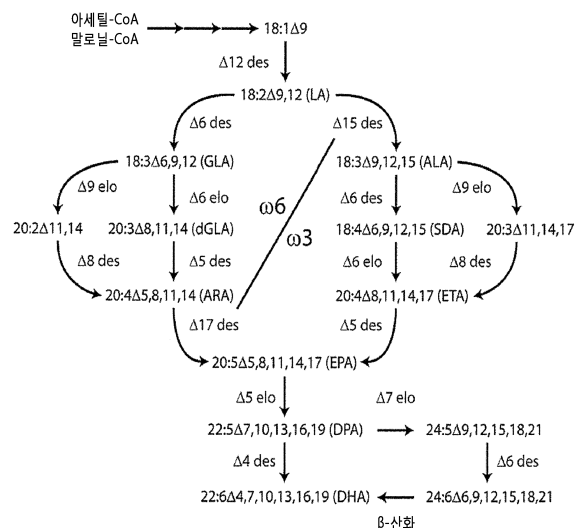
전체 청구항 수 : 총 26 항

(54) 발명의 명칭 도코사헨타에노산을 포함하는 지질

(57) 요약

본 발명은 도코사헨타에노산을 포함하는 추출된 식물 지질 또는 미생물 지질, 및 추출된 지질의 제조 방법에 관
한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 31/201 (2013.01)
A61K 31/202 (2013.01)
A61K 36/185 (2013.01)
A61K 36/31 (2013.01)
C11B 1/10 (2013.01)
C11B 3/003 (2013.01)
C11B 3/04 (2013.01)
C11B 3/12 (2013.01)
C12N 15/8247 (2013.01)

(72) 발명자

쉬레스타, 푸쉬카르

오스트레일리아, 오스트레일리언 캐피탈 테리토리
2617, 로손, 3 셀렉션 스트리트

맥칼리스터, 제이슨, 티모시

오스트레일리아, 빅토리아 3223, 포탈링턴, 114 질
롱 로드

디바인, 말콤, 데이비드

캐나다, 브리티시 컬럼비아 브이1에이치 1와이5,
버논, 219 도미 플레이스

드 페이터, 로버트, 찰스

오스트레일리아, 오스트레일리언 캐피탈 테리토리
2904, 모나쉬, 10 스토티 플레이스

(30) 우선권주장

20140104761 2014년12월18일 아르헨티나(AR)
PCT/AU2014/050433 2014년12월18일 오스트레일
리아(AU)
14/575,756 2014년12월18일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

에스테르화된 형태의 지방산을 포함하는 추출된 식물 지질 또는 미생물 지질로, 상기 지방산이 올레산, 팔미트산, 리놀레산(LA)을 포함하는 $\omega 6$ 지방산, α -리놀렌산(ALA) 및 도코사헵타에노산(DPA), 및 임의로 스테아리돈산(SDA), 에이코사헵타에노산(EPA) 및 에이코사테트라에노산(ETA) 중 하나 이상을 포함하는 $\omega 3$ 지방산을 포함하고, 상기 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 DPA의 수준이 7% 내지 35%인, 추출된 식물 지질 또는 미생물 지질.

청구항 2

제1항에 있어서,

하기의 특징들 중 하나 이상을 갖는 지질:

- i) 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 팔미트산의 수준은 약 2% 내지 15%, 또는 약 3% 내지 10%이고,
- ii) 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 미리스트산(C14:0)의 수준은 약 0.1%이고,
- iii) 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 올레산의 수준은 약 1% 내지 약 30%, 약 3% 내지 약 30%, 약 6% 내지 약 30%, 1% 내지 약 20%, 약 30% 내지 약 60%, 약 45% 내지 약 60%, 약 30%, 또는 약 15% 내지 약 30%이고,
- iv) 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 리놀레산(LA)의 수준은 약 4% 내지 약 35%, 약 4% 내지 약 20%, 약 4% 내지 17%, 또는 약 5% 내지 10%이고,
- v) 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 α -리놀렌산(ALA)의 수준은 약 4% 내지 약 40%, 약 7% 내지 약 40%, 약 10% 내지 약 35%, 약 20% 내지 약 35%, 약 4% 내지 16%, 또는 약 2% 내지 16% 이고,
- vi) 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 γ -리놀렌산(GLA)의 수준은 4% 미만, 약 3% 미만, 약 2% 미만, 약 1% 미만, 약 0.5% 미만, 0.05% 내지 7%, 0.05% 내지 4%, 0.05% 내지 약 3%, 또는 0.05% 내지 약 2%이고,
- vii) 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 스테아리돈산(SDA)의 수준은 약 10% 미만, 약 8% 미만, 약 7% 미만, 약 6% 미만, 약 4% 미만, 약 3% 미만, 약 0.05% 내지 약 7%, 약 0.05% 내지 약 6%, 약 0.05% 내지 약 4%, 약 0.05% 내지 약 3%, 약 0.05% 내지 약 10%, 또는 0.05% 내지 약 2%이고,
- viii) 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 에이코사테트라에노산(ETA)의 수준은 약 6% 미만, 약 5% 미만, 약 4% 미만, 약 1% 미만, 약 0.5% 미만, 약 0.05% 내지 약 6%, 약 0.05% 내지 약 5%, 약 0.05% 내지 약 4%, 약 0.05% 내지 약 3%, 또는 약 0.05% 내지 약 2%이고,
- ix) 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 에이코사트라이에노산(ETrA)의 수준은 4% 미만, 약 2% 미만, 약 1% 미만, 0.05% 내지 4%, 0.05% 내지 3%, 또는 0.05% 내지 약 2%, 또는 0.05% 내지 약 1%이고,
- x) 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 에이코사헵타에노산(EPA)의 수준은 4% 내지 15%, 4% 미만, 약 3% 미만, 약 2% 미만, 0.05% 내지 10%, 0.05% 내지 5%, 0.05% 내지 약 3%, 또는 0.05% 내지 약 2%이고,
- xi) 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 DHA의 수준이 2% 미만, 또는 0.05% 및 약 2%인 경우,
- xii) 지질은 그의 지방산 함량 중에 $\omega 6$ -도코사헵타에노산($22:5^{\Delta 4,7,10,13,16}$)을 포함하고,
- xiii) 지질은 그의 지방산 함량 중에 0.1% 미만의 $\omega 6$ -도코사헵타에노산($22:5^{\Delta 4,7,10,13,16}$)을 포함하고,
- xiv) 지질은 그의 지방산 함량 중에 0.1% 미만의, SDA, EPA 및 ETA 중 하나 이상 또는 모두를 포함하고,
- xv) 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 전체 포화 지방산의 수준은 약 4% 내지 약 25%, 약 4% 내지 약 20%, 약 6% 내지 약 20%, 또는 약 6% 내지 약 12%이고,
- xvi) 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 전체 단일불포화 지방산의 수준은 약 4% 내지 약 40%, 약 4% 내지 약

35%, 약 8% 내지 약 25%, 8% 내지 약 22%, 약 15% 내지 약 40%, 또는 약 15% 내지 약 35%이고,

xvii) 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 전체 다중불포화 지방산의 수준은 약 20% 내지 약 75%, 30% 내지 75%, 약 50% 내지 약 75%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 또는 약 60% 내지 약 75%이고,

xviii) 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 전체 ω 6 지방산의 수준은 약 35% 내지 약 50%, 약 20% 내지 약 35%, 약 6% 내지 20%, 20% 미만, 약 16% 미만, 약 10% 미만, 약 1% 내지 약 16%, 약 2% 내지 약 10%, 또는 약 4% 내지 약 10%이고,

xix) 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 신규 ω 6 지방산의 수준은 약 10% 미만, 약 8% 미만, 약 6% 미만, 4% 미만, 약 1% 내지 약 20%, 약 1% 내지 약 10%, 약 0.5% 내지 약 8%, 또는 약 0.5% 내지 4%이고,

xx) 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 전체 ω 3 지방산의 수준은 36% 내지 약 65%, 36% 내지 약 70%, 40% 내지 약 60%, 약 30% 내지 약 60%, 약 35% 내지 약 60%, 40% 내지 약 65%, 약 30% 내지 약 65%, 약 35% 내지 약 65%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 65% 또는 약 70%이고,

xxi) 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 신규 ω 3 지방산의 수준은 21% 내지 약 45%, 21% 내지 약 35%, 약 23% 내지 약 35%, 약 25% 내지 약 35%, 약 27% 내지 약 35%, 약 23%, 약 25%, 약 27%, 약 30%, 약 35%, 약 40% 또는 약 45%이고,

xxii) 추출된 지질의 지방산 함량 중 전체 ω 6 지방산:전체 ω 3 지방산의 비는 약 1.0 내지 약 3.0, 약 0.1 내지 약 1, 약 0.1 내지 약 0.5, 약 0.50 미만, 약 0.40 미만, 약 0.30 미만, 약 0.20 미만, 약 0.15 미만, 약 1.0, 약 0.1, 약 0.10 내지 약 0.4, 또는 약 0.2이고,

xxiii) 추출된 지질의 지방산 함량 중 신규 ω 6 지방산:신규 ω 3 지방산의 비는 약 1.0 내지 약 3.0, 약 0.02 내지 약 0.1, 약 0.1 내지 약 1, 약 0.1 내지 약 0.5, 약 0.50 미만, 약 0.40 미만, 약 0.30 미만, 약 0.20 미만, 약 0.15 미만, 약 0.02, 약 0.05, 약 0.1, 약 0.2 또는 약 1.0이고,

xxiv) 지질의 지방산 조성은 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 약 60% 내지 약 98%, 약 70% 내지 약 95%, 또는 약 75% 내지 약 90%의, Δ 12-불포화효소에 의한 올레산에서 LA로의 전환 효율을 기본으로 하고,

xxv) 지질의 지방산 조성은 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 약 30% 내지 약 70%, 약 35% 내지 약 60%, 또는 약 50% 내지 약 70%의, Δ 6-불포화효소에 의한 ALA에서 SDA로의 전환 효율을 기본으로 하고,

xxvi) 지질의 지방산 조성은 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 약 60% 내지 약 95%, 약 70% 내지 약 88%, 또는 약 75% 내지 약 85%의, Δ 6-신장효소에 의한 SDA에서 ETA로의 전환 효율을 기본으로 하고,

xxvii) 지질의 지방산 조성은 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 약 60% 내지 약 99%, 약 70% 내지 약 99%, 또는 약 75% 내지 약 98%의, Δ 5-불포화효소에 의한 ETA에서 EPA로의 전환 효율을 기본으로 하고,

xxviii) 지질의 지방산 조성은 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 약 50% 내지 약 99%, 약 85% 내지 약 99%, 약 50% 내지 약 95%, 또는 약 85% 내지 약 95%의, Δ 5-신장효소에 의한 EPA에서 DPA로의 전환 효율을 기본으로 하고,

xxix) 지질의 지방산 조성은 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 약 20%, 약 25%, 약 30%, 약 10% 내지 약 50%, 약 10% 내지 약 30%, 약 10% 내지 약 25% 또는 약 20% 내지 약 30%의 올레산에서 DPA로의 전환 효율을 기본으로 하고,

xxx) 지질의 지방산 조성은 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 22%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 약 25%, 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 15% 내지 약 50%, 약 20% 내지 약 40%, 또는 약 20% 내지 약 30%의 LA에서 DPA로의 전환 효율을 기본으로 하고,

xxxi) 지질의 지방산 조성은 적어도 약 17%, 적어도 약 22%, 적어도 약 24%, 적어도 약 30%, 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 22% 내지 약 70%, 약 17% 내지 약 55%, 약 22% 내지 약 40%, 또는 약 24% 내지 약 40%의 ALA에서 DPA로의 전환 효율을 기본으로 하고,

xxxii) 추출된 지질 중 전체 지방산은 1.5% 미만의 C20:1, 1% 미만의 C20:1, 또는 약1%의 C20:1을 갖고,

xxxiii) 지질의 트라이아실글리세롤(TAG) 함량은 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 95%,

약 70% 내지 약 99%, 또는 약 90% 내지 약 99%이고,

xxxiv) 지질은 다이아실글리세롤(DAG)을 포함하고, DAG는 바람직하게 DPA를 포함하고,

xxxv) 지질은 약 10% 미만, 약 5% 미만, 약 1% 미만, 또는 약 0.001% 내지 약 5%의 유리(비-에스테르화된) 지방산 및/또는 인지질을 포함하거나 이들을 실질적으로 포함하지 않고,

xxxvi) TAG의 형태로 에스테르화된 DPA의 적어도 70%, 적어도 72% 또는 적어도 80%는 상기 TAG의 *sn*-1 또는 *sn*-3 위치에 존재하고,

xxxviii) 지질 중 가장 풍부한 DPA-함유 TAG 종은 DPA/18:3/18:3(TAG 58:12)이고,

xxxviii) 지질은 트라이-DPA TAG(TAG 66:18)를 포함하고,

xxxix) 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 DPA의 수준은 약 7%, 약 8%, 약 9%, 약 10%, 약 12%, 약 15%, 약 18%, 약 20%, 약 22%, 약 24%, 약 26%, 약 28%, 약 31%, 약 7% 내지 약 31%, 약 7% 내지 약 28%, 약 10% 내지 35%, 약 10% 내지 약 30%, 약 10% 내지 약 25%, 약 10% 내지 약 22%, 약 14% 내지 35%, 약 16% 내지 35%, 약 16% 내지 약 30%, 약 16% 내지 약 25%, 또는 약 16% 내지 약 22%이고, 임의로 DHA의 수준은 추출된 지질의 전체 지방산 함량의 0.5% 미만이다.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 지질이 오일, 바람직하게는 유지종자로부터의 오일이고, 더욱 바람직하게는 상기 지질은 브라시카 종(*Brassica sp.*) 오일, 예컨대 브라시카 나푸스(*Brassica napus*) 오일 또는 브라시카 윤채아(*Brassica juncea*) 오일, 고시피움 히르수툼(*Gossypium hirsutum*) 오일, 리눔 유시타티시뮴(*Linum usitatissimum*) 오일, 헬리안투스 종(*Helianthus sp.*) 오일, 카르타무스 텅크토리우스(*Carthamus tinctorius*) 오일, 글리시네 맥스(*Glycine max*) 오일, 제아 메이스(*Zea mays*) 오일, 엘라에시스 구이니아니스(*Elaeisis guineensis*) 오일, 니코티아나 벤틀미아나(*Nicotiana benthamiana*) 오일, 루피누스 앙구스티폴리우스(*Lupinus angustifolius*) 오일, 카멜리나 사티바(*Camelina sativa*) 오일, 크람베 아비시니카(*Crambe abyssinica*) 오일, 미스칸투스 엑스 기간테우스(*Miscanthus x giganteus*) 오일, 또는 미스칸투스 시넨시스(*Miscanthus sinensis*) 오일이거나 이를 포함하는 것인 지질.

청구항 4

추출된 식물 지질 또는 미생물 지질의 생성 방법으로서,

i) 지질을 포함하는 식물 부분 또는 미생물 세포를 수득하는 단계로서, 상기 지질이 에스테르화된 형태의 지방산을 포함하며, 상기 지방산이 올레산, 팔미트산, 리놀레산(LA)을 포함하는 ω 6 지방산, α -리놀렌산(ALA), 스테아리돈산(SDA), 도코사헵타에노산(DPA), 및 임의로 에이코사헵타에노산(EPA) 및 에이코사테트라에노산(ETA) 중 하나 이상을 포함하는 ω 3 지방산을 포함하고, 상기 식물 부분 중 추출 가능한 지질의 전체 지방산 함량 중 DPA의 수준이 약 7% 내지 35%인 단계, 및

ii) 상기 식물 부분 또는 미생물 세포로부터 지질을 추출하는 단계

를 포함하고,

상기 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 DPA의 수준이 7% 내지 35%인, 방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

추출된 지질이 제2항 또는 제3항에서 정의된 특징들 중 하나 이상을 갖는 방법.

청구항 6

제4항 또는 제5항에 있어서,

상기 식물 부분이 종자, 바람직하게는 유지종자, 예를 들면, 브라시카 종(*Brassica sp.*), 예컨대 브라시카 나푸스(*Brassica napus*) 또는 브라시카 윤채아(*Brassica juncea*), 고시피움 히르수툼(*Gossypium hirsutum*), 리눔

유시타티시뮴(*Linum usitatissimum*), 헬리안투스 종(*Helianthus sp.*), 카르타무스 텅크토리우스(*Carthamus tinctorius*), 글리시네 맥스(*Glycine max*), 제아 메이스(*Zea mays*), 엘라에시스 구이니아니스(*Elaeagnus guineensis*), 니코티아나 벤틀미아나(*Nicotiana benthamiana*), 루피누스 앙구스티폴리우스(*Lupinus angustifolius*), 카멜리나 사티바(*Camelina sativa*), 또는 크람베 아비시니카(*Crambe abyssinica*), 바람직하게는 브라시카 나푸스, 브라시카 윤채아 또는 카멜리나 사티바 종자인 방법.

청구항 7

제4항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

식물 부분 또는 미생물 세포가 하기의 효소들의 세트 중 하나를 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하고:

- i) ω 3-불포화효소, Δ 6-불포화효소, Δ 5-불포화효소, Δ 6-신장효소 및 Δ 5-신장효소,
- ii) Δ 15-불포화효소, Δ 6-불포화효소, Δ 5-불포화효소, Δ 6-신장효소 및 Δ 5-신장효소,
- iii) Δ 12-불포화효소, Δ 6-불포화효소, Δ 5-불포화효소, Δ 6-신장효소 및 Δ 5-신장효소,
- iv) Δ 12-불포화효소, ω 3-불포화효소 및/또는 Δ 15-불포화효소, Δ 6-불포화효소, Δ 5-불포화효소, Δ 6-신장효소 및 Δ 5-신장효소,
- v) ω 3-불포화효소, Δ 8-불포화효소, Δ 5-불포화효소, Δ 9-신장효소 및 Δ 5-신장효소,
- vi) Δ 15-불포화효소, Δ 8-불포화효소, Δ 5-불포화효소, Δ 9-신장효소 및 Δ 5-신장효소,
- vii) Δ 12-불포화효소, Δ 8-불포화효소, Δ 5-불포화효소, Δ 9-신장효소 및 Δ 5-신장효소,
- viii) Δ 12-불포화효소, ω 3-불포화효소 및/또는 Δ 15-불포화효소, Δ 8-불포화효소, Δ 5-불포화효소, Δ 9-신장효소 및 Δ 5-신장효소;
- ix) ω 3-불포화효소 또는 Δ 15-불포화효소, Δ 6-불포화효소, Δ 5-불포화효소, Δ 6-신장효소 및 Δ 5-신장효소, 또는
- x) ω 3-불포화효소 또는 Δ 15-불포화효소, Δ 8-불포화효소, Δ 5-불포화효소, Δ 9-신장효소 및 Δ 5-신장효소,

각각의 폴리뉴클레오티드가 상기 식물 부분의 세포 또는 미생물 세포에서 상기 폴리뉴클레오티드의 발현을 유도할 수 있는 하나 이상의 프로모터에 작동적으로 연결되는 것인 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

식물 부분 또는 미생물 세포가 하기의 특징들 중 하나 이상 또는 전부를 갖는 방법:

- i) Δ 12-불포화효소는 상기 식물 부분 또는 미생물 세포의 하나 이상의 세포에서 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 약 60% 내지 약 95%, 약 70% 내지 약 90%, 또는 약 75% 내지 약 85%의 효율로 올레산을 리놀레산으로 전환시키고,
- ii) ω 3-불포화효소는 상기 식물 부분 또는 미생물 세포의 하나 이상의 세포에서 적어도 약 65%, 적어도 약 75%, 적어도 약 85%, 약 65% 내지 약 95%, 약 75% 내지 약 91%, 또는 약 80% 내지 약 91%의 효율로 ω 6 지방산을 ω 3 지방산으로 전환시키고,
- iii) Δ 6-불포화효소는 상기 식물 부분 또는 미생물 세포의 하나 이상의 세포에서 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 약 30% 내지 약 70%, 약 35% 내지 약 60%, 또는 약 50% 내지 약 70%의 효율로 ALA를 SDA로 전환시키고,
- iv) Δ 6-불포화효소는 상기 식물 부분 또는 미생물 세포의 하나 이상의 세포에서 약 5% 미만, 약 2.5% 미만, 약 1% 미만, 약 0.1% 내지 약 5%, 약 0.5% 내지 약 2.5%, 또는 약 0.5% 내지 약 1%의 효율로 리놀레산을 γ -리놀렌산으로 전환시키고,
- v) Δ 6-신장효소는 상기 식물 부분 또는 미생물 세포의 하나 이상의 세포에서 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 약 60% 내지 약 95%, 약 70% 내지 약 80%, 또는 약 75% 내지 약 80%의 효율로 SDA를 ETA로 전

환시키고,

- vi) $\Delta 5$ -불포화효소는 상기 식물 부분 또는 미생물 세포의 하나 이상의 세포에서 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 약 60% 내지 약 95%, 약 70% 내지 약 95%, 또는 약 75% 내지 약 95%의 효율로 ETA를 EPA로 전환시키고,
- vii) $\Delta 5$ -신장효소는 상기 식물 부분 또는 미생물 세포의 하나 이상의 세포에서 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 약 50% 내지 약 90%, 또는 약 85% 내지 약 95%의 효율로 EPA를 DPA로 전환시키고,
- viii) 식물 부분 또는 미생물 세포의 하나 이상의 세포에서 올레산의 DPA로의 전환 효율은 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 약 20%, 약 25%, 약 30%, 약 10% 내지 약 50%, 약 10% 내지 약 30%, 약 10% 내지 약 25%, 또는 약 20% 내지 약 30%이고,
- ix) 식물 부분 또는 미생물 세포의 하나 이상의 세포에서 LA의 DPA로의 전환 효율은 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 22%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 약 25%, 약 30%, 약 35%, 약 15% 내지 약 50%, 약 20% 내지 약 40%, 또는 약 20% 내지 약 30%이고,
- x) 식물 부분 또는 미생물 세포의 하나 이상의 세포에서 ALA의 DPA로의 전환 효율은 적어도 약 17%, 적어도 약 22%, 적어도 약 24%, 적어도 약 30%, 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 17% 내지 약 55%, 약 22% 내지 약 35%, 또는 약 24% 내지 약 35%이고,
- xi) 식물 부분 또는 미생물 세포의 하나 이상의 세포는 외인성 폴리뉴클레오티드가 없는 상응하는 세포보다 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 약 25% 내지 약 40%, 또는 약 27.5% 내지 약 37.5% 많은 $\omega 3$ 지방산을 포함하고,
- xii) $\Delta 6$ -불포화효소는 리놀레산(LA)에 비해 α -리놀렌산(AL)을 우선적으로 불포화시키고,
- xiii) $\Delta 6$ -신장효소는 또한 $\Delta 9$ -신장효소 활성을 갖고,
- xiv) $\Delta 12$ -불포화효소는 또한 $\Delta 15$ -불포화효소 활성을 갖고,
- xv) $\Delta 6$ -불포화효소는 또한 $\Delta 8$ -불포화효소 활성을 갖고,
- xvi) $\Delta 8$ -불포화효소는 또한 $\Delta 6$ -불포화효소 활성을 갖거나 또는 $\Delta 6$ -불포화효소 활성을 갖지 않고,
- xvii) $\Delta 15$ -불포화효소는 또한 GLA에 대한 $\omega 3$ -불포화효소 활성을 갖고,
- xviii) $\omega 3$ -불포화효소는 또한 LA에 대한 $\Delta 15$ -불포화효소 활성을 갖고,
- xix) $\omega 3$ -불포화효소는 LA 및/또는 GLA를 모두 불포화시키고,
- xx) $\omega 3$ -불포화효소는 LA에 비해 GLA를 우선적으로 불포화시키고,
- xxi) 불포화효소들 중 하나 이상 또는 전부는 상응하는 아실-PC 기질보다 아실-CoA 기질에 대해 더 큰 활성을 갖고,
- xxii) $\Delta 6$ -불포화효소는 지방산 기질로서 LA보다 ALA에 대해 더 큰 $\Delta 6$ -불포화효소 활성을 갖고,
- xxiii) $\Delta 6$ -불포화효소는 지방산 기질로서 PC의 sn-2 위치에 결합된 ALA보다 지방산 기질로서 ALA-CoA에 대해 더 큰 $\Delta 6$ -불포화효소 활성을 갖고,
- xxiv) $\Delta 6$ -불포화효소는 LA에 비해 기질로서 ALA에 대해 적어도 약 2배 더 큰 $\Delta 6$ -불포화효소 활성, 적어도 3배 더 큰 활성, 적어도 4배 더 큰 활성 또는 적어도 5배 더 큰 활성을 갖고,
- xxv) $\Delta 6$ -불포화효소는 지방산 기질로서 PC의 sn-2 위치에 결합된 ALA에 대해서보다 지방산 기질로서 ALA-CoA에 대해 더 큰 활성을 갖고,
- xxvi) $\Delta 6$ -불포화효소는 지방산 기질로서 PC의 sn-2 위치에 결합된 ALA에 대해서보다 지방산 기질로서 ALA-CoA에 대해 적어도 약 5 배 더 큰 $\Delta 6$ -불포화효소 활성 또는 적어도 10 배 더 큰 활성을 갖고,
- xxvii) 불포화효소는 전단부(front-end) 불포화효소이고,
- xxviii) $\Delta 6$ -불포화효소는 ETA에 대해 검출 가능한 $\Delta 5$ -불포화효소 활성을 갖지 않는다.

청구항 9

제7항 또는 제8항에 있어서,

식물 부분 또는 미생물 세포가 다이아실글리세롤 아실트랜스퍼라제(DGAT), 모노아실글리세롤 아실트랜스퍼라제(MGAT), 글리세롤-3-포스페이트 아실트랜스퍼라제(GPAT), 1-아실-글리세롤-3-포스페이트 아실트랜스퍼라제(LPAAT), 바람직하게는 DPA-CoA와 같은 C22 다중불포화 지방 아실-CoA 기질을 사용할 수 있는 LPAAT, 아실-CoA:리소포스파티딜콜린 아실트랜스퍼라제(LPCAT), 포스포리파제 A₂(PLA₂), 포스포리파제 C(PLC), 포스포리파제 D(PLD), CDP-콜린 다이아실글리세롤 콜린 포스포트랜스퍼라제(CPT), 포스파티딜콜린 다이아실글리세롤 아실트랜스퍼라제(PDAT), 포스파티딜콜린:다이아실글리세롤 콜린 포스포트랜스퍼라제(PDCT), 아실-CoA 신타제(ACS), 또는 이들 중 2개 이상의 조합을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 추가로 포함하는 방법.

청구항 10

제7항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서,

외인성 폴리뉴클레오티드가 DNA 분자, 바람직하게는 T-DNA 분자에 공유 결합되고, 식물 부분의 세포 또는 미생물 세포의 게놈에 통합되며, 바람직하게는 이때 상기 식물 부분 세포 또는 미생물 세포의 게놈에 통합된 상기과 같은 DNA 분자의 수가 1 이하, 2 이하 또는 3 이하이거나 또는 2 또는 3인 방법.

청구항 11

제4항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서,

외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 식물 부분 또는 미생물 세포의 전체 오일 함량이, 상기 외인성 폴리뉴클레오티드가 없는 상응하는 식물 부분 또는 미생물 세포의 전체 오일 함량의 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 약 50% 내지 약 80%, 또는 약 80% 내지 약 100%인 방법.

청구항 12

제4항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서,

지질을, 전체 지방산 함량의 백분율로서 DPA의 수준을 증가시키도록 처리함을 추가로 포함하고, 상기 처리는 DPA의 메틸- 또는 에틸-에스테르의 생성과 같은 분별, 중류 또는 트랜스에스테르화 중 하나 이상을 포함하는 방법.

청구항 13

a) 에스테르화된 형태의 지방산을 포함하는 지질, 및

b) i) Δ12-불포화효소, ω3-불포화효소 및/또는 Δ15-불포화효소, Δ6-불포화효소, Δ5-불포화효소, Δ6-신장효소 및 Δ5-신장효소,

ii) Δ12-불포화효소, ω3-불포화효소 및/또는 Δ15-불포화효소, Δ8-불포화효소, Δ5-불포화효소, Δ9-신장효소 및 Δ5-신장효소,

iii) ω3-불포화효소 및/또는 Δ15-불포화효소, Δ6-불포화효소, Δ5-불포화효소, Δ6-신장효소 및 Δ5-신장효소, 또는

iv) ω3-불포화효소 및/또는 Δ15-불포화효소, Δ8-불포화효소, Δ5-불포화효소, Δ9-신장효소 및 Δ5-신장효소,

의 효소 세트 중 하나를 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드

를 포함하는, 종자 중에 지질을 포함하는 유지종자 식물, 또는 그의 일부, 또는 미생물 세포로서,

각각의 폴리뉴클레오티드가 상기 식물의 발생 종자에서 상기 폴리뉴클레오티드의 발현을 유도할 수 있는 하나 이상의 종자-특이성 프로모터, 또는 미생물 세포에서 상기 폴리뉴클레오티드의 발현을 유도할 수 있는 하나 이상의 프로모터에 작동적으로 연결되고, 상기 지방산이 올레산, 팔미트산, 리놀레산(LA)을 포함하는 ω6 지방산, α-리놀렌산(ALA), 스테아리돈산(SDA) 및 도코사헵타에노산(DPA), 및 임의로 에이코사헵타에노산(EPA) 및/또는 에이코사테트라에노산(ETA)을 포함하는 ω3 지방산을 포함하고, 상기 종자 또는 미생물 세포의 지질의 전체 지방산 함량 중 DPA의 수준이 7% 내지 35%인, 종자 중에 지질을 포함하는 유지종자 식물, 또는 그의 일부, 또는

미생물 세포.

청구항 14

DPA를 포함하는 종자를 생산할 수 있는 브라시카 나푸스(*Brassica napus*), 브라시카 윤채아(*Brassica juncea*) 또는 카멜리나 사티바(*Camelina sativa*) 식물로서, 식물의 성숙한, 수확된 종자가 종자 그램당 적어도 약 28 mg, 바람직하게는 종자 그램당 적어도 약 32 mg, 종자 그램당 적어도 약 36 mg, 종자 그램당 적어도 약 40 mg, 보다 바람직하게는 종자 그램당 적어도 약 44 mg, 또는 종자 그램당 적어도 약 48 mg, 종자 그램당 적어도 약 80 mg, 또는 종자 그램당 약 30 mg 내지 약 80mg의 DPA 함량을 갖는 식물.

청구항 15

제13항에 있어서,

상기 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 식물 세포.

청구항 16

하기의 특징들 중 하나 이상 또는 전부를 갖는 식물 부분, 바람직하게는 종자, 또는 미생물 세포:

- i) 제13항 또는 제14항의 식물로부터 유래됨,
- ii) 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 정의된 지질을 포함함, 또는
- iii) 제4항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 방법에서 사용될 수 있음.

청구항 17

DPA를 포함하고, 약 4% 내지 약 15 중량%, 바람직하게는 약 6% 내지 약 8 중량% 또는 약 4% 내지 약 8 중량%의 수분함량을 갖는 성숙한, 수확된 브라시카 나푸스, 브라시카 윤채아 또는 카멜리나 사티바 종자로서, 상기 종자의 DPA 함량이 종자 그램당 적어도 약 28 mg, 바람직하게는 종자 그램당 적어도 약 32 mg, 종자 그램당 적어도 약 36 mg, 종자 그램당 적어도 약 40 mg, 보다 바람직하게는 종자 그램당 적어도 약 44 mg, 또는 종자 그램당 적어도 약 48 mg, 종자 그램당 적어도 약 80 mg, 또는 종자 그램당 약 30 mg 내지 약 80mg인, 종자.

청구항 18

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 추출된 식물 지질 또는 추출된 미생물 지질을 생성하기 위해 사용될 수 있는 식물 또는 미생물 세포의 생성 방법으로서,

- a) 복수의 식물 또는 미생물 세포로부터 하나 이상의 식물 부분 또는 미생물 세포에 의해 생성된 지질 중의 DPA의 수준을 평가하는 단계로서, 이때 각각의 식물 또는 미생물 세포는 하기 효소 세트 중 하나를 암호화하는 하나 이상의 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하고;
 - i) ω 3-불포화효소, Δ 6-불포화효소, Δ 5-불포화효소, Δ 6-신장효소 및 Δ 5-신장효소,
 - ii) Δ 15-불포화효소, Δ 6-불포화효소, Δ 5-불포화효소, Δ 6-신장효소 및 Δ 5-신장효소,
 - iii) Δ 12-불포화효소, Δ 6-불포화효소, Δ 5-불포화효소, Δ 6-신장효소 및 Δ 5-신장효소,
 - iv) Δ 12-불포화효소, ω 3-불포화효소 또는 Δ 15-불포화효소, Δ 6-불포화효소, Δ 5-불포화효소, Δ 6-신장효소 및 Δ 5-신장효소,
 - v) ω 3-불포화효소, Δ 8-불포화효소, Δ 5-불포화효소, Δ 9-신장효소 및 Δ 5-신장효소,
 - vi) Δ 15-불포화효소, Δ 8-불포화효소, Δ 5-불포화효소, Δ 9-신장효소 및 Δ 5-신장효소,
 - vii) Δ 12-불포화효소, Δ 8-불포화효소, Δ 5-불포화효소, Δ 9-신장효소 및 Δ 5-신장효소,
 - viii) Δ 12-불포화효소, ω 3-불포화효소 또는 Δ 15-불포화효소, Δ 8-불포화효소, Δ 5-불포화효소, Δ 9-신장효소 및 Δ 5-신장효소;
 - ix) ω 3-불포화효소 또는 Δ 15-불포화효소, Δ 6-불포화효소, Δ 5-불포화효소, Δ 6-신장효소 및 Δ 5-신장효소, 또는

x) ω 3-불포화효소 또는 Δ 15-불포화효소, Δ 8-불포화효소, Δ 5-불포화효소, Δ 9-신장효소 및 Δ 5-신장효소;

각각의 폴리뉴클레오티드가 식물 부분의 세포 또는 미생물 세포에서 상기 폴리뉴클레오티드의 발현을 유도할 수 있는 하나 이상의 프로모터에 작동적으로 연결되는 단계,

b) 하나 이상의 부분에서 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 추출된 식물 지질 또는 미생물 지질을 생성하기 위해 사용될 수 있는 식물 또는 미생물 세포를 복수개의 식물 또는 미생물 세포로부터 확인하는 단계, 및

c) 임의로, 상기 확인된 식물 또는 미생물 세포로부터 자손 식물 또는 미생물 세포, 또는 그로부터의 종자를 생성하는 단계

를 포함하는, 방법.

청구항 19

종자의 생성 방법으로서,

a) 제13항 또는 제14항의 식물, 또는 제16항의 식물 부분을 생산하거나 제17항의 종자를 생산하는 식물을, 바람직하게는 적어도 1000개 또는 2000개 또는 3000개의 상기와 같은 식물의 집단의 부분으로서 필드에서, 또는 표준 재식 밀도로 심어진 적어도 1 헥타아르 또는 2 헥타아르 또는 3 헥타아르의 면적에서 재배하는 단계,

b) 상기 식물 또는 식물들로부터 종자를 수확하는 단계, 및

c) 임의로, 상기 종자로부터 지질을 추출하여, 바람직하게는 적어도 60 kg 또는 70 kg 또는 80 kg DPA/헥타아르의 전체 DPA 수율로 오일을 생산하는 단계

를 포함하는 방법.

청구항 20

제13항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서,

하기의 특징들 중 하나 이상을 갖는 식물, 식물 세포, 식물 부분 또는 종자 또는 미생물 세포:

i) 제2항 또는 제3항에 정의된 바와 같은 오일을 포함, 및

ii) 상기 식물 부분 또는 종자 또는 미생물 세포가 제4항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 방법에 사용될 수 있음.

청구항 21

제4항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 방법을 사용하여, 제15항에 따른 세포, 제13항의 유지종자 식물, 제13항의 미생물 세포, 제14항의 브라시카 나푸스, 브라시카 윤채아 또는 카멜리나 사티바 식물, 제16항의 식물 부분, 또는 제17항의 종자에 의해 생산되거나 또는 이로부터 수득되는 지질 또는 오일.

청구항 22

제17항의 종자로부터 수득되거나 제13항 또는 제14항의 식물로부터 수득되는 종자박(seedmeal).

청구항 23

제21항의 지질 또는 오일, 제15항에 따른 세포, 제20항의 식물 세포 또는 미생물 세포, 제17항의 종자, 또는 제22항의 종자박 중 하나 이상을 포함하는 조성물.

청구항 24

제21항의 지질 또는 오일, 제15항에 따른 세포, 제13항의 유지종자 식물, 제20항의 식물 세포 또는 미생물 세포, 제14항의 브라시카 나푸스, 브라시카 윤채아 또는 카멜리나 사티바 식물, 제20항의 식물 부분, 또는 제17항의 종자, 제22항의 종자박 또는 제23항의 조성물 중 하나 이상을 포함하는 식료품, 화장품 또는 화학제.

청구항 25

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 지질 또는 오일, 제15항에 따른 세포, 제13항의 유지종자 식물, 제20항의 식

물 세포 또는 미생물 세포, 제14항의 브라시카 나푸스, 브라시카 윤채아 또는 카멜리나 사티바 식물, 제20항의 식물 부분, 제17항의 종자, 제22항의 종자박 또는 제23항의 조성물 중 하나 이상을 적어도 하나의 다른 식품 성분과 혼합함을 포함하는, 식료품의 제조 방법.

청구항 26

PUFA로부터 이익을 얻는 병의 치료 또는 예방을 위한 약제의 제조를 위한, 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 지질 또는 오일, 제15항에 따른 세포, 제20항의 식물 세포 또는 미생물 세포, 제20항의 식물 부분, 제17항의 종자, 제22항의 종자박 또는 제23항의 조성물 중 하나 이상의 용도.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 식물 세포 또는 미생물 세포로부터 얻어지는 도코사헥사에노산을 포함하는 지질, 및 상기 지질을 제조 및 사용하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 오메가-3 장쇄 다중불포화 지방산(LC-PUFA)은 현재 인간 및 동물 건강에 중요한 화합물로서 널리 인식되고 있다. 상기 지방산은 식이성 공급원으로부터 획득되거나 또는 리놀레산(LA, 18:2 ω 6) 또는 α -리놀렌산(ALA, 18:3 ω 3) 지방산(이들은 둘다 인간의 음식물에서 필수 지방산으로서 간주된다)의 전환에 의해 획득될 수 있다. 인간 및 다수의 다른 척추동물들은 식물 공급원으로부터 획득된 LA 또는 ALA를 C22로 전환시킬 수 있지만, 상기 전환을 매우 낮은 비율로 수행한다. 더욱이, 대부분의 현대 사회는 다중불포화 지방산(PUFA)의 90% 이상이, 이상적인 것으로 간주되는 4:1 비 이하의 ω 6: ω 3 지방산 대신에, ω 6 지방산인 불균형한 식사를 하고 있다 (Trautwein, 2001). 인간의 경우 에이코사헥사에노산(EPA, 20:5 ω 3), 도코사헥사에노산(DPA) 및 도코사헥사에노산(DHA, 22:6 ω 3)과 같은 LC-PUFA의 즉석 식이성 공급원은 대개 생선 또는 어유로부터 유래한다. 따라서 의료 종사자들은 상당한 수준의 LC-PUFA를 함유하는 어류를 인간의 음식물에 정기적으로 포함시킬 것을 권장하였다. 점점 더, 생선-유래된 LC-PUFA 오일들이, 예를 들어 식품 및 유아식에 혼입되고 있는 중이다. 그러나, 체계적이고 국가적인 수산업의 감퇴로 인해, 이들 이로온 건강-증대 오일의 대체 공급원이 필요하다.

[0003] 동물들과 대조적으로, 화훼류(flowering plants)는 탄소수 18 초과와 채 길이를 갖는 다중불포화 지방산을 합성하는 능력이 없다. 특히, 다른 속씨식물들과 함께 농작물 및 원예식물들은 ALA로부터 유도되는 보다 장쇄의 ω 3 지방산, 예를 들어 EPA, 도코사헥사에노산(DPA, 22:5 ω 3) 및 DHA를 합성하는데 필요한 효소를 갖고 있지 않다. 따라서 식물 생물공학에서 중요한 목적은 상당량의 LC-PUFA를 생산하는 농작물을 가공하여, 상기 화합물들의 대체 공급원을 제공하는 것이다.

[0004] LC-PUFA 생합성 경로

[0005] 미세조류, 이끼 및 진균과 같은 유기체에서 LC-PUFA의 생합성은 대개 일련의 산소-의존성 불포화 및 신장(elongation) 반응으로서 발생한다(도 1). 이들 유기체에서 EPA를 생산하는 가장 통상적인 경로는 Δ 6-불포화, Δ 6-신장 및 Δ 5-불포화(Δ 6-불포화 경로라 칭한다)를 포함하는 반면, 덜 통상적인 경로는 Δ 9-신장, Δ 8-불포화 및 Δ 5-불포화(Δ 9-불포화 경로라 칭한다)를 사용한다. 이들 연속적인 불포화 및 신장 반응들은 도 1의 상부 좌측 부분(ω 6)에 도식적으로 나타낸 ω 6 지방산 기질 LA, 또는 도 1의 하부 우측 부분(ω 3)에 나타낸 ω 3 기질 ALA 내지 EPA로 시작할 수 있다. 상기 초기 Δ 6-불포화가 상기 ω 6 기질 LA상에서 수행되는 경우, 상기 일련의 3 개 효소의 LC-PUFA 산물은 ω 6 지방산 ARA일 것이다. LC-PUFA 합성 유기체는 아라키돈산(ARA, 20:4 ω 6)에서 EPA로의 전환에 대해서 도 1에 Δ 17-불포화효소 단계로서 나타낸 바와 같이, ω 3-불포화효소를 사용하여 ω 6 지방산을 ω 3 지방산으로 전환시킬 수 있다. 상기 ω 3-불포화효소과의 일부 구성원들은 LA에서 ARA에 이르는 범위의 다양한 기질들상에서 작용할 수 있다. 식물 ω 3-불포화효소는 종종 LA의 ALA로의 Δ 15-불포화를 특이적으로 촉매화하는 반면, 진균 및 효모 ω 3-불포화효소는 ARA에서 EPA로의 Δ 17-불포화에 특이적일 수 있다 (Pereira et al., 2004a; Zank et al., 2005). 일부 보고서들은 광범위하게 다양한 ω 6 기질들을 그들의 상응하는 ω 3 산물로 전환시킬 수 있는 비-특이적인 ω 3-불포화효소들이 존재할 수도 있음을 시사한다(Zhang et al., 2008).

- [0006] 이들 유기체에서 EPA의 DHA로의 전환은 DPA를 생성시키는 EPA의 $\Delta 5$ -신장에 이어서 DHA를 생성시키는 $\Delta 4$ -불포화에 의해 일어난다(도 1). 대조적으로, 포유동물들은 $\Delta 4$ -불포화효소와 무관한 3 개의 별도의 반응들에 의해 DPA를 DHA로 전환시키는 소위 "스프레처" 경로를 이용한다(Sprecher et al., 1995).
- [0007] 식물, 이끼, 미세조류 및 하등 동물, 예를 들어 카에노라브디티스 엘레간스(*Caenorhabditis elegans*)에서 일반적으로 발견되는 전단부(front-end) 불포화효소는 포스포티딜콜린(PC) 기질의 sn-2 위치에 에스테르화된 지방산 기질을 우세하게 수용한다. 따라서 상기 불포화효소는 아실-PC, 지질-결합된, 전단부 불포화효소로서 공지된다(Domergue et al., 2003). 대조적으로, 보다 고등 동물의 전단부 불포화효소는 일반적으로 상기 지방산 기질이 PC보다는 CoA에 결합되는 아실-CoA 기질을 수용한다(Domergue et al., 2005). 일부 미세조류 불포화효소 및 하나의 식물 불포화효소가 CoA에 에스테르화된 지방산 기질을 사용하는 것으로 공지되어 있다(표 2).
- [0008] 각각의 PUFA 신장 반응은 다성분 단백질 복합체에 의해 촉매화되는 4 개의 단계로 이루어진다, 즉 첫 번째, 축합 반응은 말로닐-CoA로부터 2C 단위를 상기 지방산에 첨가하여 β -케토아실 중간체를 형성시킨다. 이어서 상기 중간체를 NADPH에 의해 환원시킨 다음 탈수시켜 α,β -불포화 중간체를 제공한다. 마지막으로 상기 중간체를 두 번째 환원시켜 신장된 지방산을 생성시킨다. 일반적으로 이들 4 개의 반응 중 축합 단계는 기질 특이적인 반면 다른 단계들은 그렇지 않은 것으로 생각된다. 실제로, 이는 고유의 식물 신장 기구가, 상기 비-고유 PUFA 기질을 신장시킴에 있어서 상기 고유의 식물 신장 기구의 효율이 낮을 수도 있지만, 상기 PUFA에 특이적인 축합 효소(전형적으로 "신장효소"라 칭한다)가 도입되는 한, FUPA를 신장시킬 수 있음을 의미한다. 2007년에, 효모 신장 주기 탈수효소의 식별 및 특성화가 공개되었다(Denic and Weissman, 2007).
- [0009] 식물, 이끼 및 미세조류에서 PUFA 불포화는 자연적으로 우세하게는 아실-PC 풀 중의 지방산 기질에 대해 발생하는 반면, 신장은 아실-CoA 풀 중의 기질에 대해 발생한다. 아실-PC 분자로부터 CoA 담체로의 지방산의 이동은 포스포리파제(PLA)에 의해 수행되는 반면 아실-CoA 지방산의 PC 담체로의 이동은 리소포스포티딜-콜린 아실트랜스퍼라제(LPCAT)에 의해 수행된다(Singh et al., 2005).
- [0010] LC-PUFA의 공학적 생산
- [0011] 대부분의 LC-PUFA 대사 공학은 호기성 $\Delta 6$ -불포화/신장 경로를 사용하여 수행되었다. 담배에서 γ -리놀렌산(GLA, 18:3 ω 6)의 생합성이 시아노박테리움 시네코시스티스(*Synechocystis*)로부터 $\Delta 6$ -불포화효소를 사용하여 1996년에 최초로 보고되었다(Reddy and Thomas, 1996). 더욱 최근에, GLA가 농작물, 예를 들어 잇꽃(종자유 중 73% GLA; WO 2006/127789) 및 대두(28% GLA; Sato et al., 2004)에서 생산되었다. EPA 및 DHA와 같은 LC-PUFA의 생산은 관련된 불포화 및 신장 단계의 증가된 수로 인해 보다 복잡한 가공을 수반한다. 육생 식물에서 EPA 생산은, 아이소크리시스 갈바나(*Isochrysis galbana*)로부터 $\Delta 9$ -신장효소, 유글레나 그라실리스(*Euglena gracilis*)로부터 $\Delta 8$ -불포화효소 및 모르티에렐라 알피나(*Mortierella alpina*)로부터 $\Delta 5$ -불포화효소를 암호화하는 유전자들을 아라비도프시스(*Arabidopsis*)에 도입시켜 3% 이하의 EPA를 제공한 퀴(Qi) 등(2004)에 의해 최초로 보고되었다. 상기 연구에 이어서, 아바디(Abadi) 등(2004)은 피스코미트렐라 파텐스(*Physcomitrella patens*)로부터 $\Delta 6$ -불포화효소 및 $\Delta 6$ -신장효소 및 파에오다틸룸 트리코르누툼(*Phaeodactylum tricornutum*)으로부터 $\Delta 5$ -불포화효소를 암호화하는 유전자를 사용하여 아마 종자에서 0.8% 이하의 EPA를 생산함을 보고하였다.
- [0012] DHA 생산의 최초 보고서는 WO 04/017467에서 있었으며, 여기에서는 종자가 아닌, 대두 배아에서 3% DHA가, 사프로레그니아 디클리나(*Saprolegnia diclina*) $\Delta 6$ -불포화효소, 모르티에렐라 알피나 $\Delta 6$ -불포화효소, 모르티에렐라 알피나 $\Delta 5$ -불포화효소, 사프로레그니아 디클리나 $\Delta 4$ -불포화효소, 사프로레그니아 다클리나 $\Delta 17$ -불포화효소, 모르티에렐라 알피나 $\Delta 6$ -신장효소 및 파블로바 루테리(*Pavlova lutheri*) $\Delta 5$ -신장효소를 암호화하는 유전자들의 도입에 의해 생산된다. DHA를 또한 생산하는 배아에서의 최대 EPA 수준은 19.6%이었으며, 이는 EPA에서 DHA로의 전환 효율이 불충분함을 가리킨다(WO 2004/071467). 상기 발견은 로버트(Robert) 등(2005)에 의해 공개된 것과 유사하였으며, 여기에서는 EPA에서 DHA로의 흐름이 낮으며, 다니오 레리오(*Danio rerio*) $\Delta 5/6$ -불포화효소, 카에노라브디티스 엘레간스 $\Delta 6$ -신장효소, 및 파블로바 살리나 $\Delta 5$ -신장효소 및 $\Delta 4$ -불포화효소를 사용하여 아라비도프시스에서 3% EPA 및 0.5% DHA가 생산되었다. 또한 2005년에, 우(Wu) 등은 피티움 이레귤라레(*Pythium irregulare*) $\Delta 6$ -불포화효소, 트라우스토키트리드(*Thraustochytrid*) $\Delta 5$ -불포화효소, 피스코미트렐라 파텐스(*Physcomitrella patens*) $\Delta 6$ -신장효소, 칼렌둘라 오피시아날리스(*Calendula officianalis*) $\Delta 12$ -불포화효소, 트라우스토키트리드(*Thraustochytrid*) $\Delta 5$ -신장효소, 피토프토라 인페스탄스(*Phytophthora infestans*) $\Delta 17$ -불포화효소, 온코링쿠스 미키스(*Oncorhynchus mykiss*) LC-PUFA 신장효소, 트라우스토키트리드(*Thraustochytrid*) $\Delta 4$ -불포화효소 및 트라우스토키트리드 LPCAT를 사용하여 브라시카 윤채아(*Brassica juncea*)에서 25% ARA, 15% EPA 및 1.5% DHA가 생산됨을 공개하였다(Wu et al., 2005). $\omega 3$ LC-PUFA를 합성하

는 유지종자 작물의 생산을 위한 노력에 대한 요약이 문헌[Venegas-Caleron et al. (2010)] 및 [Ruiz-Lopez et al. (2012)]에 제공되어 있다. 문헌[Ruiz-Lopez et al. (2012)]에서 지적인 바와 같이, 트랜스제닉 식물에서 DHA의 생산에 대해 지금까지 획득된 결과들은 어유 중에서 나타나는 수준에 가까운 경우가 없었다. 더욱 최근에, 페트리에 등은 아라비도프시스 탈리아나(*Arabidopsis thaliana*) 종자에서 약 15% DHA의 생산을 보고하였고 [Petrie et al (2012)], W02013/185184는 7% 내지 20% DHA를 갖는 특정 종자유의 생산을 보고하였다. 그러나, 20% 이상의 DHA를 갖는 식물유의 생산에 대한 보고는 없다.

[0013] DHA의 동반 생산 없이 유의적인 수준까지 재조합 세포에서 DPA를 생산하는 것에 대한 보고가 없다. 실제로, 본 발명자들은 DHA의 생산 없이 재조합 세포에서 DPA를 생산하는 어떠한 공개된 암시나 동기 부여도 인지하지 못한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 따라서 재조합 세포에서 LC-PUFA, 특히 유지종자 식물의 종자에서 DPA의 보다 효율적인 생산이 여전히 필요하다.

과제의 해결 수단

[0015] 소수의 유기체들만이 1 내지 2% 초과 DPA를 갖는 오일을 생산하고, 따라서 천연 공급원으로부터 DPA의 대규모 생산에 제한된 옵션이 존재한다. 본 발명자들은 천연 공급원보다 훨씬 더 높은 수준의 DPA를 갖는 지질의 생산을 위한 방법 및 식물을 동정하였다.

[0016] 첫 번째 태양에서, 본 발명은 에스테르화된 형태의 지방산을 포함하는 추출된 지질, 바람직하게는 추출된 식물 지질 또는 추출된 미생물 지질로, 상기 지방산이 올레산, 팔미트산, 리놀레산(LA)을 포함하는 $\omega 6$ 지방산, α -리놀렌산(ALA) 및 도코사헵타에노산(DPA), 및 임의로 스테아리돈산(SDA), 에이코사헵타에노산(EPA) 및 에이코사테트라에노산(ETA) 중 하나 이상을 포함하는 $\omega 3$ 지방산을 포함하고, 상기 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 DPA의 수준이 약 7% 내지 35%인 추출된 지질을 제공한다. 이러한 태양의 실시태양에서, 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 DPA의 수준은 약 7%, 약 8%, 약 9%, 약 10%, 약 12%, 약 15%, 약 18%, 약 20%, 약 22%, 약 24%, 약 26%, 약 28%, 약 30%, 약 7% 내지 약 28%, 약 7% 내지 약 25%, 약 10% 내지 35%, 약 10% 내지 약 30%, 약 10% 내지 약 25%, 약 10% 내지 약 22%, 약 14% 내지 35%, 약 16% 내지 35%, 약 16% 내지 약 30%, 약 16% 내지 약 25%, 또는 약 16% 내지 약 22%이다.

[0017] 상기 태양의 실시태양에서, DHA는 추출된 지질의 전체 지방산 함량의 2% 미만 또는 0.5% 미만의 수준으로 존재하고, 더욱 바람직하게는 지질의 전체 지방산 함량 중에 존재하지 않는다.

[0018] 또 다른 태양에서, 본 발명은 에스테르화된 형태의 지방산을 포함하는 추출된 지질, 바람직하게는 추출된 식물 지질 또는 추출된 미생물 지질로, 상기 지방산이 도코사헵타에노산(DPA)을 포함하고, 트리아실글리세롤(TAG)의 형태로 에스테르화된 DPA의 적어도 35%가 TAG의 *sn-2* 위치에서 에스테르화된 추출된 지질을 제공한다. 하나의 실시태양에서, 추출된 지질은 추가로 하기의 특징들 중 하나 이상 또는 전부를 특징으로 한다: (i) 이는 올레산, 팔미트산, 리놀레산(LA)을 포함하는 $\omega 6$ 지방산, α -리놀렌산(ALA) 및 임의로 스테아리돈산(SDA), 에이코사헵타에노산(EPA) 및 에이코사테트라에노산(ETA) 중 하나 이상을 포함하는 $\omega 3$ 지방산을 포함하는 지방산을 포함하고, (ii) 트리아실글리세롤(TAG)의 형태로 에스테르화된 DPA의 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 48%, 35% 내지 약 60%, 또는 35% 내지 약 50%가 TAG의 *sn-2* 위치에서 에스테르화되고, (iii) 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 DPA의 수준은 약 1% 내지 35%, 또는 약 7% 내지 35% 또는 약 20.1% 내지 35%이다. 이러한 태양의 실시태양에서, 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 DPA의 수준은 약 7%, 약 8%, 약 9%, 약 10%, 약 12%, 약 15%, 약 18%, 약 20%, 약 22%, 약 24%, 약 26%, 약 28%, 약 30%, 약 7% 내지 약 28%, 약 7% 내지 약 25%, 약 10% 내지 35%, 약 10% 내지 약 30%, 약 10% 내지 약 25%, 약 10% 내지 약 22%, 약 14% 내지 35%, 약 16% 내지 35%, 약 16% 내지 약 30%, 약 16% 내지 약 25%, 또는 약 16% 내지 약 22%이다. 바람직한 실시태양에서, 추출된 지질은 (i) 및 (ii), (i) 및 (iii) 또는 (ii) 및 (iii), 더욱 바람직하게는 (i), (ii) 및 (iii) 모두를 특징으로 한다. 바람직하게는, 추출된 지질은 약 2% 내지 16%인 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 팔미트산의 수준, 및 존재하는 경우, 1% 미만인 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 미리스트산(C14:0)의 수준을 추가로 특징으로 한다.

[0019] 상기 태양의 각각의 실시태양은 이하에서 더욱 상세하게 설명된다. 당업자는 상기 태양의 상응하는 특징보다

더욱 넓은 개시된 실시 태양의 임의의 특징들이 이러한 태양에 적용되지 않는는 것으로 이해할 것이다.

- [0020] 하나의 실시태양에서, 추출된 지질은 하기의 특징들 중 하나 이상을 갖는다:
- [0021] i) 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 팔미트산의 수준은 약 2% 내지 18%, 약 2% 내지 16%, 약 2% 내지 15%, 또는 약 3% 내지 10%이고,
- [0022] ii) 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 미리스트산(C14:0)의 수준은 6% 미만, 3% 미만, 2% 미만, 1% 미만, 또는 약 0.1%이고,
- [0023] iii) 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 올레산의 수준은 약 1% 내지 약 30%, 약 3% 내지 약 30%, 약 6% 내지 약 30%, 또는 1% 내지 약 20%, 약 30% 내지 약 60%, 약 45% 내지 약 60%, 약 30%, 또는 약 15% 내지 약 30%이고,
- [0024] iv) 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 리놀레산(LA)의 수준은 약 4% 내지 약 35%, 또는 약 4% 내지 약 20%, 또는 약 4% 내지 17%, 또는 약 5% 내지 10%이고,
- [0025] v) 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 α -리놀렌산(ALA)의 수준은 약 4% 내지 약 40%, 약 7% 내지 약 40%, 약 10% 내지 약 35%, 약 20% 내지 약 35%, 약 4% 내지 16%, 또는 약 2% 내지 16% 이고,
- [0026] vi) 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 γ -리놀렌산(GLA)의 수준은 4% 미만, 약 3% 미만, 약 2% 미만, 약 1% 미만, 약 0.5% 미만, 0.05% 내지 7%, 0.05% 내지 약 4%, 0.05% 내지 약 3%, 또는 0.05% 내지 약 2%이고,
- [0027] vii) 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 스테아리돈산(SDA)의 수준은 약 10% 미만, 약 8% 미만, 약 7% 미만, 약 6% 미만, 약 4% 미만, 약 3% 미만, 약 0.05% 내지 약 7%, 약 0.05% 내지 약 6%, 약 0.05% 내지 약 4%, 약 0.05% 내지 약 3%, 약 0.05% 내지 약 10%, 또는 0.05% 내지 약 2%이고,
- [0028] viii) 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 에이코사테트라에노산(ETA)의 수준은 약 6% 미만, 약 5% 미만, 약 4% 미만, 약 1% 미만, 약 0.5% 미만, 약 0.05% 내지 약 6%, 약 0.05% 내지 약 5%, 약 0.05% 내지 약 4%, 약 0.05% 내지 약 3%, 또는 약 0.05% 내지 약 2%이고,
- [0029] ix) 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 에이코사트라이에노산(ETrA)의 수준은 4% 미만, 약 2% 미만, 약 1% 미만, 0.05% 내지 4%, 0.05% 내지 3%, 또는 0.05% 내지 약 2%, 또는 0.05% 내지 약 1%이고,
- [0030] x) 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 에이코사펜타에노산(EPA)의 수준은 4% 내지 15%, 4% 미만, 약 3% 미만, 약 2% 미만, 0.05% 내지 10%, 0.05% 내지 5%, 0.05% 내지 약 3%, 또는 0.05% 내지 약 2%이고,
- [0031] xi) 지질은 그의 지방산 함량 중에 $\omega 6$ -도코사펜타에노산($22:5^{\Delta 4,7,10,13,16}$)을 포함하고,
- [0032] xii) 지질은 그의 지방산 함량 중에 약 0.1% 미만의 $\omega 6$ -도코사펜타에노산($22:5^{\Delta 4,7,10,13,16}$)을 포함하고,
- [0033] xiii) 지질은 그의 지방산 함량 중에 0.1% 미만의, SDA, EPA 및 ETA 중 하나 이상 또는 모두를 포함하고,
- [0034] xiv) 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 전체 포화 지방산의 수준은 약 4% 내지 약 25%, 약 4% 내지 약 20%, 약 6% 내지 약 20%, 또는 약 6% 내지 약 12%이고,
- [0035] xv) 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 전체 단일불포화 지방산의 수준은 약 4% 내지 약 40%, 약 4% 내지 약 35%, 약 8% 내지 약 25%, 8% 내지 약 22%, 약 15% 내지 약 40%, 또는 약 15% 내지 약 35%이고,
- [0036] xvi) 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 전체 다중불포화 지방산의 수준은 약 20% 내지 약 75%, 30% 내지 75%, 약 50% 내지 약 75%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 또는 약 60% 내지 약 75%이고,
- [0037] xvii) 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 전체 $\omega 6$ 지방산의 수준은 약 35% 내지 약 50%, 약 20% 내지 약 35%, 약 6% 내지 20%, 20% 미만, 약 16% 미만, 약 10% 미만, 약 1% 내지 약 16%, 약 2% 내지 약 10%, 또는 약 4% 내지 약 10%이고,
- [0038] xviii) 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 신규 $\omega 6$ 지방산의 수준은 약 10% 미만, 약 8% 미만, 약 6% 미만, 4% 미만, 약 1% 내지 약 20%, 약 1% 내지 약 10%, 약 0.5% 내지 약 8%, 또는 약 0.5% 내지 4%이고,
- [0039] xix) 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 전체 $\omega 3$ 지방산의 수준은 36% 내지 약 65%, 36% 내지 약 70%, 40% 내지 약 60%, 약 30% 내지 약 60%, 약 35% 내지 약 60%, 40% 내지 약 65%, 약 30% 내지 약 65%, 약 35% 내지 약

65%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 65% 또는 약 70%이고,

- [0040] xx) 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 신규 ω 3 지방산의 수준은 21% 내지 약 45%, 21% 내지 약 35%, 약 23% 내지 약 35%, 약 25% 내지 약 35%, 약 27% 내지 약 35%, 약 23%, 약 25%, 약 27%, 약 30%, 약 35%, 약 40% 또는 약 45%이고,
- [0041] xxi) 추출된 지질의 지방산 함량 중 전체 ω 6 지방산:전체 ω 3 지방산의 비는 약 1.0 내지 약 3.0, 약 0.1 내지 약 1, 약 0.1 내지 약 0.5, 약 0.50 미만, 약 0.40 미만, 약 0.30 미만, 약 0.20 미만, 약 0.15 미만, 약 1.0, 약 0.1, 약 0.10 내지 약 0.4, 또는 약 0.2이고,
- [0042] xxii) 추출된 지질의 지방산 함량 중 신규 ω 6 지방산:신규 ω 3 지방산의 비는 약 1.0 내지 약 3.0, 약 0.02 내지 약 0.1, 약 0.1 내지 약 1, 약 0.1 내지 약 0.5, 약 0.50 미만, 약 0.40 미만, 약 0.30 미만, 약 0.20 미만, 약 0.15 미만, 약 0.02, 약 0.05, 약 0.1, 약 0.2 또는 약 1.0이고,
- [0043] xxiii) 지질의 지방산 조성은 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 약 60% 내지 약 98%, 약 70% 내지 약 95%, 또는 약 75% 내지 약 90%의 Δ 12-불포화효소에 의한 올레산에서 LA로의 전환 효율을 기본으로 하고,
- [0044] xxiv) 지질의 지방산 조성은 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 약 30% 내지 약 70%, 약 35% 내지 약 60%, 또는 약 50% 내지 약 70%의 Δ 6-불포화효소에 의한 ALA에서 SDA로의 전환 효율을 기본으로 하고,
- [0045] xxv) 지질의 지방산 조성은 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 약 60% 내지 약 95%, 약 70% 내지 약 88%, 또는 약 75% 내지 약 85%의 Δ 6-신장효소에 의한 SDA에서 ETA로의 전환 효율을 기본으로 하고,
- [0046] xxvi) 지질의 지방산 조성은 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 약 60% 내지 약 99%, 약 70% 내지 약 99%, 또는 약 75% 내지 약 98%의 Δ 5-불포화효소에 의한 ETA에서 EPA로의 전환 효율을 기본으로 하고,
- [0047] xxvii) 지질의 지방산 조성은 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 약 50% 내지 약 99%, 약 85% 내지 약 99%, 약 50% 내지 약 95%, 또는 약 85% 내지 약 95%의 Δ 5-신장효소에 의한 EPA에서 DPA로의 전환 효율을 기본으로 하고,
- [0048] xxviii) 지질의 지방산 조성은 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 약 20%, 약 25%, 약 30%, 약 10% 내지 약 50%, 약 10% 내지 약 30%, 약 10% 내지 약 25% 또는 약 20% 내지 약 30%의 올레산에서 DPA로의 전환 효율을 기본으로 하고,
- [0049] xxix) 지질의 지방산 조성은 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 22%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 약 25%, 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 15% 내지 약 50%, 약 20% 내지 약 40%, 또는 약 20% 내지 약 30%의 LA에서 DPA로의 전환 효율을 기본으로 하고,
- [0050] xxx) 지질의 지방산 조성은 적어도 약 17%, 적어도 약 22%, 적어도 약 24%, 적어도 약 30%, 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 22% 내지 약 70%, 약 17% 내지 약 55%, 약 22% 내지 약 40%, 또는 약 24% 내지 약 40%의 ALA에서 DPA로의 전환 효율을 기본으로 하고,
- [0051] xxxi) 추출된 지질 중 전체 지방산은 1.5% 미만의 C20:1, 1% 미만의 C20:1, 또는 약 1%의 C20:1을 갖고,
- [0052] xxxii) 지질의 트라이아실글리세롤(TAG) 함량은 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 95%, 약 70% 내지 약 99%, 또는 약 90% 내지 약 99%이고,
- [0053] xxxiii) 지질은 다이아실글리세롤(DAG)을 포함하고, DAG는 바람직하게 DPA를 포함하고,
- [0054] xxxiv) 지질은 약 10% 미만, 약 5% 미만, 약 1% 미만, 또는 약 0.001% 내지 약 5%의 유리(비-에스테르화된) 지방산 및/또는 인지질을 포함하거나 이들을 실질적으로 포함하지 않고,
- [0055] xxxv) TAG의 형태로 에스테르화된 DPA의 적어도 70%, 적어도 72% 또는 적어도 80%는 상기 TAG의 sn-1 또는 sn-3 위치에 존재하고,
- [0056] xxxvi) 지질 중 가장 풍부한 DPA-함유 TAG 종은 DPA/18:3/18:3(TAG 58:12)이고, 상기 지질은 트리-DPA TAG (TAG 66:18)을 포함하고, 또한
- [0057] xxxvii) 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 DPA의 수준은 약 7%, 약 8%, 약 9%, 약 10%, 약 12%, 약 15%, 약 18%, 약 20%, 약 22%, 약 24%, 약 26%, 약 28%, 약 31%, 약 7% 내지 약 31%, 약 7% 내지 약 28%, 약 10% 내지

35%, 약 10% 내지 약 30%, 약 10% 내지 약 25%, 약 10% 내지 약 22%, 약 14% 내지 35%, 약 16% 내지 35%, 약 16% 내지 약 30%, 약 16% 내지 약 25%, 또는 약 16% 내지 약 22%이고, 임의로 DHA의 수준은 추출된 지질의 전체 지방산 함량의 0.5% 미만이다.

- [0058] 또 다른 실시태양에서, 추출된 지질은 하기의 특징들 중 하나 이상을 갖는다:
- [0059] i) 추출된 식물 지질의 전체 지방산 함량 중 팔미트산의 수준은 약 2% 내지 15%이고,
- [0060] ii) 추출된 식물 지질의 전체 지방산 함량 중 미리스트산(C14:0)의 수준은 약 0.1%이고,
- [0061] iii) 추출된 식물 지질의 전체 지방산 함량 중 올레산의 수준은 1% 내지 30%이고,
- [0062] iv) 추출된 식물 지질의 전체 지방산 함량 중 리놀레산(LA)의 수준은 4% 내지 20%이고,
- [0063] v) 추출된 식물 지질의 전체 지방산 함량 중 α -리놀렌산(ALA)의 수준은 4% 내지 40%이고,
- [0064] vi) 추출된 식물 지질의 전체 지방산 함량 중 γ -리놀렌산(GLA)의 수준은 0.05% 내지 7%이고,
- [0065] vii) 추출된 식물 지질의 전체 지방산 함량 중 스테아리돈산(SDA)의 수준은 0.05% 내지 10%이고,
- [0066] viii) 추출된 식물 지질의 전체 지방산 함량 중 에이코사테트라에노산(ETA)의 수준은 6% 미만이고,
- [0067] ix) 추출된 식물 지질의 전체 지방산 함량 중 에이코사트라이에노산(ETrA)의 수준은 4% 미만이고,
- [0068] x) 추출된 식물 지질은 그의 지방산 함량 중에 0.1% 미만의 ω 6-도코사펜타에노산($22:5^{\Delta 4,7,10,13,16}$)을 포함하고,
- [0069] xi) 추출된 식물 지질의 전체 지방산 함량 중 신규 ω 6 지방산의 수준은 10% 미만이고,
- [0070] xii) 추출된 식물 지질의 지방산 함량 중 전체 ω 6 지방산:전체 ω 3 지방산의 비는 1.0 내지 3.0, 또는 0.1 내지 1이고,
- [0071] xiii) 추출된 식물 지질의 지방산 함량 중 신규 ω 6 지방산:신규 ω 3 지방산의 비는 1.0 내지 3.0, 0.02 내지 0.1, 또는 0.1 내지 1이고,
- [0072] xiv) 추출된 식물 지질의 지방산 조성은 적어도 10%의 올레산에서 DPA로의 전환 효율을 기본으로 하고,
- [0073] xv) 추출된 식물 지질의 지방산 조성은 적어도 15%의 LA에서 DPA로의 전환 효율을 기본으로 하고,
- [0074] xvi) 추출된 식물 지질의 지방산 조성은 적어도 17%의 ALA에서 DPA로의 전환 효율을 기본으로 하고,
- [0075] xvii) 추출된 식물 지질 중 전체 지방산은 1.5% 미만의 C20:1을 갖고, 또한
- [0076] xviii) 추출된 식물 지질의 트리아실글리세롤(TAG) 함량은 적어도 70%이고, 하기 특징들 중 하나 이상을 특징으로 할 수 있다:
- [0077] xix) 추출된 식물 지질은 DPA를 포함하는 다이아실글리세롤(DAG)을 포함하고,
- [0078] xx) 추출된 식물 지질은 10% 미만의 유리(비-에스테르화된) 지방산 및/또는 인지질을 포함하거나 이들을 실질적으로 포함하지 않고,
- [0079] xxi) TAG의 형태로 에스테르화된 DPA의 적어도 70%는 상기 TAG의 *sn*-1 또는 *sn*-3 위치에 존재하고,
- [0080] xxii) 추출된 식물 지질 중 가장 풍부한 DPA-함유 TAG 종은 DPA/18:3/18:3(TAG 58:12)이고,
- [0081] xxiii) 추출된 식물 지질은 트리-DPA TAG (TAG 66:18)를 포함한다.
- [0082] 하나의 실시태양에서, 추출된 식물 지질의 전체 지방산 함량 중 에이코사펜타에노산(EPA)의 수준은 0.05% 내지 10%이다.
- [0083] 또 다른 실시태양에서, 추출된 식물 지질의 전체 지방산 함량 중 DHA의 수준은 2% 미만, 바람직하게는 1% 미만, 또는 0.1% 내지 2%이고, 더욱 바람직하게는 검출되지 않는다. 바람직하게는, 식물, 또는 이의 일부, 예컨대 종자, 또는 미생물 세포는 Δ 4-불포화효소를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 갖지 않거나, Δ 4-불포화효소 폴리펩티드를 갖지 않는다. 또 다른 실시태양에서, 추출된 지질은 오일의 형태이고, 여기서 오일의 적어도 약 90 중량%, 적어도 약 95 중량%, 적어도 약 98 중량%, 또는 약 95 중량% 내지 약 98 중량%는 지질이다.
- [0084] 바람직하게는, 추출된 지질은 브라시카 종(*Brassica sp.*) 종자유 지질 또는 카멜리나 사티바(*Camelina sativa*)

종자유 지질이다.

[0085] 상기 첫 번째 태양의 바람직한 실시태양에서, 지질 또는 오일, 바람직하게는 종자유, 더욱 바람직하게는 브라시카 종 종자유 또는 카멜리나 사티바 종자유는 하기 특징들을 갖는다: 지질 또는 오일의 전체 지방산 함량 중에서, DPA의 수준은 약 7% 내지 30% 또는 약 7% 내지 35%이고, 팔미트산의 수준은 약 2% 내지 약 16%이고, 미리스트산의 수준은 1% 미만이고, 올레산의 수준은 약 1% 내지 약 30%이고, LA의 수준은 약 4% 내지 약 35%이고, ALA는 존재하고, 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 전체 포화 지방산의 수준은 약 4% 내지 약 25%이고, 추출된 지질의 지방산 함량 중 전체 $\omega 6$ 지방산:전체 $\omega 3$ 지방산의 비는 0.05 내지 약 3.0이고, 지질의 트리아실글리세롤 (TAG) 함량은 적어도 약 70%이고, 임의로 상기 지질은 본질적으로 콜레스테롤을 포함하지 않고 및/또는 상기 지질은 트리-DPA TAG (TAG 66:15)를 포함한다. 더욱 바람직하게는, 지질 또는 오일, 바람직하게 종자유는, 추가적으로 하기 특징들 중 하나 이상을 갖는다: DPA의 적어도 70%는 트리아실글리세롤 (TAG)의 *sn*-1 또는 *sn*-3 위치에서 에스테르화되고, ALA는 전체 지방산 함량의 4% 내지 40%의 수준으로 존재하고, GLA는 존재하고 및/또는 GLA의 수준은 전체 지방산 함량의 4% 미만이고, SDA의 수준은 0.05% 내지 약 10%이고, ETA의 수준은 약 4% 미만이고, EPA의 수준은 0.05% 내지 약 10%이고, 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 전체 단일불포화 지방산의 수준은 약 4% 내지 약 35%이고, 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 전체 다중불포화 지방산의 수준은 약 20% 내지 약 75%이고, 추출된 지질의 지방산 함량 중 신규 $\omega 6$ 지방산:신규 $\omega 3$ 지방산의 비는 약 0.03 내지 약 3.0, 바람직하게는 약 0.50 미만이고, 지질의 지방산 조성은 다음을 기초로 한다: 적어도 약 60%의 $\Delta 12$ -불포화 효소에 의한 올레산에서 LA로의 전환 효율, 적어도 약 60%의 $\Delta 6$ -신장효소에 의한 SDA에서 ETA로의 전환 효율, 약 50% 내지 약 95%의 $\Delta 5$ -신장효소에 의한 EPA에서 DPA로의 전환 효율, 적어도 약 10%의 올레산에서 DPA로의 전환 효율. 가장 바람직하게는, 적어도 81%의 DPA가 트리아실글리세롤 (TAG)의 *sn*-1 또는 *sn*-3 위치에서 에스테르화된다.

[0086] 상기 두 번째 태양의 또 다른 바람직한 실시태양에서, DPA를 포함하는 지질 또는 오일, 바람직하게는 종자유, 더욱 바람직하게는 브라시카 종 종자유 또는 카멜리나 사티바 종자유는 하기 특징들을 갖는다: 지질 또는 오일의 전체 지방산 함량 중에서, 팔미트산의 수준은 약 2% 내지 약 16%이고, 미리스트산의 수준은 1% 미만이고, 올레산의 수준은 약 1% 내지 약 30%이고, LA의 수준은 약 4% 내지 약 35%이고, ALA는 존재하고, 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 전체 포화 지방산의 수준은 약 4% 내지 약 25%이고, 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 전체 $\omega 6$ 지방산: 전체 $\omega 3$ 지방산의 비는 0.05 내지 약 3.0이고, 지질의 트리아실글리세롤 (TAG) 함량은 적어도 약 70%이고, 임의로 상기 지질은 트리-DPA TAG (TAG 66:15)를 포함하고, 여기서 트리아실글리세롤 (TAG)의 형태로 에스테르화된 DPA의 적어도 35%는 TAG의 *sn*-2 위치에서 에스테르화된다. 더욱 바람직하게는, 지질 또는 오일, 바람직하게는 종자유는, 추가적으로 하기 특징들 중 하나 이상을 갖는다: ALA는 전체 지방산 함량의 4% 내지 40%의 수준으로 존재하고, GLA는 존재하고 및/또는 GLA의 수준은 전체 지방산 함량의 4% 미만이고, SDA의 수준은 0.05% 내지 약 10%이고, ETA의 수준은 약 4% 미만이고, EPA의 수준은 0.05% 내지 약 10%이고, 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 전체 단일불포화 지방산의 수준은 약 4% 내지 약 35%이고, 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 전체 다중불포화 지방산의 수준은 약 20% 내지 약 75%이고, 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 신규 $\omega 6$ 지방산:신규 $\omega 3$ 지방산의 비는 약 0.03 내지 약 3.0, 바람직하게는 약 0.50 미만이고, 지질의 지방산 조성은 다음을 기초로 한다: 적어도 약 60%의 $\Delta 12$ -불포화효소에 의한 올레산에서 LA로의 전환 효율, 적어도 약 60%의 $\Delta 6$ -신장효소에 의한 SDA에서 ETA로의 전환 효율, 약 50% 내지 약 95%의 $\Delta 5$ -신장효소에 의한 EPA에서 DPA로의 전환 효율, 적어도 약 10%의 올레산에서 DPA로의 전환 효율.

[0087] 본 발명의 추출된 지질 또는 오일의 맥락에서, 하나의 실시태양에서 추출된 지질 또는 오일 중의 DPA의 수준은 증가하지 않았거나 추출 이전의 식물 부분 또는 미생물의 지질 또는 오일 중의 DPA의 수준과 실질적으로 동일하다. 즉, 추출 이후 다른 지방산 대비 지질 또는 오일 중의 DPA의 수준을 증가시키기 위한 과정을 수행하지 않았다. 명백한 바와 같이, 지질 또는 오일은 이후에 분획 또는 다른 과정으로 처리하여 지방산 조성을 변경시킬 수 있다.

[0088] 또 다른 바람직한 실시태양에서, 지질 또는 오일, 바람직하게는 종자유 및 더욱 바람직하게는 브라시카 종자유, 예컨대 머스타드 오일 또는 캐놀라 오일 또는 씨. 사티바(*C. sativa*) 종자유는 하기 특징을 갖는다: 지질 또는 오일의 전체 지방산 함량 중에서, DPA의 수준은 약 7% 내지 35%이고, 팔미트산의 수준은 약 2% 내지 약 16%이고, 미리스트산의 수준은 약 6% 미만, 바람직하게는 1% 미만이고, 올레산의 수준은 약 1% 내지 약 30%이고, LA의 수준은 약 4% 내지 약 35%이고, ALA는 존재하고, SDA의 수준은 약 0.05% 내지 약 10%이고, ETA의 수준은 약 6% 미만이고, EPA의 수준은 약 0.05% 내지 약 10%이다. DHA는 지질 또는 오일 중에서 검출가능하거나, 바람직하게는 검출가능하지 않다. 바람직하게는, DHA는 존재하는 경우, 지질 또는 오일의 전체 지방산 함

량 중 2% 이하 또는 5% 이하의 수준으로 존재하고, 더욱 바람직하게는 지질 또는 오일의 전체 지방산 함량 중에 존재하지 않는다. 임의로, 상기 지질은 본질적으로 콜레스테롤을 포함하지 않고 및/또는 상기 지질은 트리-DPA TAG (TAG 66:15)를 포함한다. 더욱 바람직하게는, 지질 또는 오일, 바람직하게는 종자유는, 추가적으로 하기 특징들 중 하나 이상을 갖는다: DPA의 적어도 70%가 트리아실글리세롤 (TAG)의 *sn*-1 또는 *sn*-3 위치에서 에스테르화되고, ALA는 전체 지방산 함량의 4% 내지 40%의 수준으로 존재하고, GLA는 존재하고 및/또는 GLA의 수준은 전체 지방산 함량의 4% 미만이고, SDA의 수준은 0.05% 내지 약 10%이고, ETA의 수준은 약 4% 미만이고, EPA의 수준은 0.05% 내지 약 10%이고, 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 전체 단일불포화 지방산의 수준은 약 4% 내지 약 35%이고, 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 전체 다중불포화 지방산의 수준은 약 20% 내지 약 75%이고, 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 신규 ω 6 지방산:신규 ω 3 지방산의 비는 약 0.03 내지 약 3.0, 바람직하게는 약 0.50 미만이고, 지질의 지방산 조성은 다음을 기초로 한다: 적어도 약 60%의 Δ 12-불포화효소에 의한 올레산에서 LA로의 전환 효율, 적어도 약 60%의 Δ 6-신장효소에 의한 SDA에서 ETA로의 전환 효율, 약 50% 내지 약 95%의 Δ 5-신장효소에 의한 EPA에서 DPA로의 전환 효율, 적어도 약 10%의 올레산에서 DPA로의 전환 효율. 하나의 실시태양에서, 적어도 81%의 DPA가 트리아실글리세롤 (TAG)의 *sn*-1 또는 *sn*-3 위치에서 에스테르화된다. 대안적으로, TAG의 형태로 에스테르화되는 적어도 35%의 DPA는 TAG의 *sn*-2 위치에서 에스테르화된다.

- [0089] 추가 실시태양에서, 본 발명의 추출된 지질은 하나 이상의 스테롤, 바람직하게는 식물 스테롤을 추가로 포함한다.
- [0090] 또 다른 실시태양에서, 추출된 지질은 오일의 형태이고, 약 10 mg 미만의 스테롤/오일의 g, 약 7 mg 미만의 스테롤/오일의 g, 약 1.5 mg 내지 약 10 mg의 스테롤/오일의 g, 또는 약 1.5 mg 내지 약 7 mg의 스테롤/오일의 g 을 포함한다.
- [0091] 추출된 지질 중에 존재할 수 있는 스테롤의 예로는 반드시 이에 제한되는 것은 아니나, 캄페스테롤/24-메틸콜레스테롤, Δ 5-스티그마스테롤, 에부리콜, β -시토스테롤/24-에틸콜레스테롤, Δ 5-아베나스테롤/이소푸코스테롤, Δ 7-스티그마스테롤/스티그마스트-7-엔-3 β -올, 및 Δ 7-아베나스테롤을 포함한다.
- [0092] 하나의 실시태양에서, 식물 종은 표 11에 나열된 것, 예컨대 케놀라이고, 스테롤의 수준은 이러한 특정 식물 종에 대한 표 11에 나열된 것과 거의 동일하다. 식물 종은 비. 나푸스(*B. napus*), 머스타드 (비. 윤채아) 또는 씨. 사티바일 수 있고 각각 야생형 머스타드 비. 나푸스(*B. napus*), 머스타드 또는 씨. 사티바 추출된 오일에서 발견된 것과 거의 같은 스테롤 수준을 포함한다.
- [0093] 하나의 실시태양에서, 추출된 식물 지질은 캄페스테롤/24-메틸콜레스테롤, Δ 5-스티그마스테롤, 에부리콜, β -시토스테롤/24-에틸콜레스테롤, Δ 5-아베나스테롤/이소푸코스테롤, Δ 7-스티그마스테롤/스티그마스트-7-엔-3 β -올, 및 Δ 7-아베나스테롤 중 하나 이상 또는 전부를 포함하거나 이는 야생형 케놀라 오일과 본질적으로 동일한 스테롤 함량을 갖는다.
- [0094] 하나의 실시태양에서, 추출된 지질은 야생형 케놀라 오일, 머스타드 오일 또는 씨. 사티바 오일과 본질적으로 동일한 스테롤 함량을 갖는다.
- [0095] 하나의 실시태양에서, 추출된 지질은 약 0.5 mg 미만의 콜레스테롤/오일의 g, 약 0.25 mg 미만의 콜레스테롤/오일의 g, 약 0 mg 내지 약 0.5 mg의 콜레스테롤/오일의 g, 또는 약 0 mg 내지 약 0.25 mg의 콜레스테롤/오일의 g 을 포함하거나 이는 본질적으로 콜레스테롤을 포함하지 않는다.
- [0096] 다른 실시태양에서, 상기 지질은 오일, 바람직하게는 유지종자로부터의 오일이다. 이러한 오일의 예로는 이에 제한되는 것은 아니나, 브라시카 종(*Brassica* sp.) 오일, 예컨대 케놀라 오일 또는 머스타드 오일, 고시피움 히르수툼(*Gossypium hirsutum*) 오일, 리눔 유시타티시뮴(*Linum usitatissimum*) 오일, 헬리안투스 종(*Helianthus* sp.) 오일, 카르타무스 텅크토리우스(*Carthamus tinctorius*) 오일, 글리시네 맥스(*Glycine max*) 오일, 제아 메이스(*Zea mays*) 오일, 아라비도프시스 탈리아나(*Arabidopsis thaliana*) 오일, 소르검 비콜라(*Sorghum bicolor*) 오일, 소르검 불가레(*Sorghum vulgare*) 오일, 아베나 사티바(*Avena sativa*) 오일, 트리폴리움 종(*Trifolium* sp.) 오일, 엘라에시스 구이니이니스(*Elaeisis guineensis*) 오일, 니코티아나 벤타미아나(*Nicotiana benthamiana*) 오일, 호르데움 불가레(*Hordeum vulgare*) 오일, 루피누스 앙구스티폴리우스(*Lupinus angustifolius*) 오일, 오리자 사티바(*Oryza sativa*) 오일, 오리자 글라베리마(*Oryza glaberrima*) 오일, 카멜리나 사티바(*Camelina sativa*) 오일, 크람베 아비시니카(*Crambe abyssinica*) 오일, 미스칸투스 엑스 기간테우스(*Miscanthus x giganteus*) 오일, 또는 미스칸투스 시넨시스(*Miscanthus sinensis*) 오일을 포함한다. 더욱 바람직하게는, 상기 오일은 브라시카 종(*Brassica* sp.) 오일, 카멜리나 사티바(*Camelina sativa*) 오일 또는 글리

시네 맥스(*Glycine max*) (대두) 오일이다. 하나의 실시태양에서, 상기 지질은 브라시카 종(*Brassica sp.*) 오일, 예컨대 브라시카 나푸스(*Brassica napus*) 오일 또는 브라시카 윤채아 종(*Brassica juncea sp.*) 오일, 고시피움 히르수툼(*Gossypium hirsutum*) 오일, 리눔 유시타티시뮴(*Linum usitatissimum*) 오일, 헬리안투스 종(*Helianthus sp.*) 오일, 카르타무스 텅크토리우스(*Carthamus tinctorius*) 오일, 글리시네 맥스(*Glycine max*) 오일, 제아 메이스(*Zea mays*) 오일, 엘라에시스 구이니에니스(*Elaeisis guineensis*) 오일, 니코티아나 벤탐미아나(*Nicotiana benthamiana*) 오일, 루피누스 앙구스티폴리우스(*Lupinus angustifolius*) 오일, 카멜리나 사티바(*Camelina sativa*) 오일, 크람베 아비시니카(*Crambe abyssinica*) 오일, 미스칸투스 엑스 기간테우스(*Miscanthus x giganteus*) 오일, 또는 미스칸투스 시넨시스(*Miscanthus sinensis*) 오일이거나 이를 포함한다. 다른 실시태양에서, 상기 오일은 캐놀라 오일, 머스타드 (비. 윤채아) 오일, 대두 (글리시네 맥스) 오일, 카멜리나 사티바 오일 또는 아라비도프시스 탈리아나 오일이다. 대안적인 실시태양에서, 상기 오일은 에이. 탈리아나 오일이외 및/또는 씨. 사티바 오일 이외의 식물 오일이다. 하나의 실시태양에서, 식물 오일은 지. 맥스 (대두) 오일 이외의 오일이다. 하나의 실시태양에서, 오일은 예를 들어 실시예 1에 기재된 바와 같이 표준 조건 하에서 재배된 식물로부터, 또는 표준 조건 하의 필드 또는 온실에서 재배된 식물로부터 얻어졌다.

[0097] 다른 태양에서, 본 발명은 추출된 식물 지질 또는 미생물 지질의 생성 방법으로, i) 지질을 포함하는 식물 부분, 바람직하게는 브라시카 종자 또는 카멜리나 사티바 종자, 또는 미생물 세포를 수득하고, 상기 지질이 에스테르화된 형태의 지방산을 포함하고, 상기 지방산이 올레산, 팔미트산, 리놀레산(LA)을 포함하는 $\omega 6$ 지방산, α -리놀렌산(ALA), 및 도코사헨타에노산(DPA), 및 임의로 스테아리돈산(SDA), 에이코사헨타에노산(EPA) 및 에이코사테트라에노산(ETA) 중 하나 이상을 포함하는 $\omega 3$ 지방산을 포함하고, 상기 식물 부분 또는 미생물 세포의 지질의 전체 지방산 함량 중 DPA의 수준은 약 7% 내지 35%이고,

[0098] ii) 상기 식물 부분 또는 미생물 세포로부터 지질을 추출하는

[0099] 단계들을 포함하고,

[0100] 상기 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 DPA의 수준이 약 7% 내지 35%인 방법을 제공한다. 하나의 실시태양에서, 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 DPA의 수준은 약 7% 내지 20%, 또는 20.1% 내지 35%이다. 하나의 실시태양에서, DPA의 수준은 7% 내지 20%, 또는 20.1% 내지 30%, 바람직하게는 20.1% 내지 35%, 더욱 바람직하게는 30% 내지 35%이다. 하나의 실시태양에서, 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 DPA의 수준은 8% 내지 20% 또는 10% 내지 20%, 바람직하게는 11% 내지 20% 또는 12% 내지 20%이다.

[0101] 상기 태양의 하나의 실시태양에서, 본 발명은 추출된 식물지질 또는 미생물 지질의 생성 방법으로, i) 지질을 포함하는 식물 부분, 바람직하게는 브라시카 종자 또는 씨. 사티바 종자, 또는 미생물 세포를 수득하고, 상기 지질이 에스테르화된 형태의 지방산을 포함하며, 상기 지질이 올레산, 팔미트산, 리놀레산(LA)을 포함하는 $\omega 6$ 지방산, α -리놀렌산(ALA) 및 도코사헨타에노산(DPA), 및 스테아리돈산(SDA), 에이코사헨타에노산(EPA) 및 에이코사테트라에노산(ETA) 중 하나 이상을 포함하는 $\omega 3$ 지방산을 포함하고, 여기서 (i) 상기 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 DPA의 수준이 7% 내지 30% 또는 7% 내지 35%, 바람직하게는 30% 내지 35%이고, (ii) 상기 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 팔미트산의 수준은 2% 내지 16%이고, (iii) 상기 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 미리스트산(C14:0)의 수준은 6% 미만, 바람직하게는 1% 미만이고, (iv) 상기 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 올레산의 수준은 1% 내지 30%이고, (v) 상기 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 리놀레산 (LA)의 수준은 4% 내지 35%이고, (vi) 상기 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 α -리놀렌산(ALA)의 수준은 4% 내지 40%이고, (vii) 상기 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 에이코사트리에노산(ETra)의 수준은 4% 미만이고, (viii) 상기 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 전체 포화 지방산의 수준은 4% 내지 25%이고, (ix) 상기 추출된 지질의 지방산 함량 중 전체 $\omega 6$ 지방산:전체 $\omega 3$ 지방산의 비는 0.05 내지 1이고, (x) 상기 지질의 트라이아실글리세롤 (TAG) 함량은 적어도 70%이고, (xi) TAG의 형태로 에스테르화된 적어도 70%의 DPA는 TAG의 sn-1 또는 sn-3 위치이고,

[0102] ii) 상기 식물 부분으로부터 지질을 추출하는

[0103] 단계들을 포함하고,

[0104] 상기 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 DPA의 수준이 약 7% 내지 30% 또는 7% 내지 35%, 바람직하게는 30% 내지 35%이다. 바람직하게는, TAG의 형태로 에스테르화된 적어도 81% 또는 적어도 90%의 DPA는 TAG의 sn-1 또는 sn-3 위치이다.

[0105] 또 다른 태양에서, 본 발명은 추출된 지질의 생성 방법으로, i) 지질을 포함하는 세포, 바람직하게는 상기 세포

를 포함하는 식물 부분 또는 미생물 세포, 더욱 바람직하게는 브라시카 종자 또는 씨. 사티바 종자를 수득하고, 상기 지질이 에스테르화된 형태의 지방산을 포함하며, 상기 지방산이 도코사헵타에노산(DPA)을 포함하고, 트라이아실글리세롤 (TAG)의 형태로 에스테르화된 적어도 35%의 DPA는 TAG의 *sn*-2 위치에서 에스테르화되고,

[0106] ii) 상기 세포로부터 지질을 추출하는

[0107] 단계들을 포함하고,

[0108] 상기 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 트라이아실글리세롤(TAG)의 형태로 에스테르화된 적어도 35%의 DPA는 TAG의 *sn*-2 위치에서 에스테르화된다. 하나의 실시태양에서, 상기 방법으로 생성된 추출된 지질은 (i) 이티올레산, 팔미트산, 리놀레산(LA)를 포함하는 ω 6 지방산, α -리놀렌산(ALA) 및 임의로 스테아리돈산(SDA), 에이코사헵타에노산(EPA), 및 에이코사테트라에노산(ETA) 중 하나 이상을 포함하는 ω 3 지방산을 포함하는 지방산을 포함하는 것, (ii) 트라이아실글리세롤 (TAG)의 형태로 에스테르화된 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 48%, 35% 내지 약 60%, 또는 35% 내지 약 50%의 DPA는 DHA는 TAG의 *sn*-2 위치에서 에스테르화되는 것, 및 (iii) 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 DPA의 수준은 약 1% 내지 35%, 또는 약 7% 내지 35% 또는 약 20.1% 내지 35%인 것 중 하나 이상 또는 전부를 추가로 특징으로 한다. 이러한 태양의 실시태양에서, 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 DPA의 수준은 약 7%, 약 8%, 약 9%, 약 10%, 약 12%, 약 15%, 약 18%, 약 20%, 약 22%, 약 24%, 약 26%, 약 28%, 약 30%, 약 7% 내지 약 28%, 약 7% 내지 약 25%, 약 10% 내지 35%, 약 10% 내지 약 30%, 약 10% 내지 약 25%, 약 10% 내지 약 22%, 약 14% 내지 35%, 약 16% 내지 35%, 약 16% 내지 약 30%, 약 16% 내지 약 25%, 또는 약 16% 내지 약 22%이다. 바람직한 실시태양에서, 추출된 지질은 (i) 및 (ii), (i) 및 (iii) 또는 (ii) 및 (iii), 더욱 바람직하게는 (i), (ii) 및 (iii) 전부를 특징으로 한다. 바람직하게는, 추출된 지질은 약 2% 내지 16%인 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 팔미트산의 수준을 특징으로 하고, 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 미리스트산(C14:0)의 수준은, 존재한다면, 1% 미만이다.

[0109] 상기 태양의 하나의 실시태양에서, 본 발명은 추출된 지질의 생성 방법으로, i) 지질을 포함하는 세포, 바람직하게는 상기 세포를 포함하는 식물 부분 또는 미생물 세포, 더욱 바람직하게는 브라시카 종자 또는 씨. 사티바 종자를 수득하고, 상기 지질이 에스테르화된 형태의 지방산을 포함하며, 상기 지방산이 도코사헵타에노산(DPA)을 포함하고, 올레산, 팔미트산, 리놀레산(LA)을 포함하는 ω 6 지방산, α -리놀렌산(ALA), 및 스테아리돈산(SDA), 에이코사헵타에노산(EPA), 및 에이코사테트라에노산(ETA) 중 하나 이상을 포함하는 ω 3 지방산을 추가로 포함하고, 여기서 (i) 상기 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 팔미트산의 수준은 2% 내지 16%이고, (ii) 상기 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 미리스트산(C14:0)의 수준은 1% 미만이고, (iii) 상기 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 올레산의 수준은 1% 내지 30%이고, (iv) 상기 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 리놀레산(LA)의 수준은 4% 내지 35%이고, (v) 상기 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 α -리놀렌산(ALA)의 수준은 4% 내지 40%이고, (vi) 상기 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 에이코사트리에노산(ETrA)의 수준은 4% 미만이고, (vii) 상기 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 전체 포화 지방산의 수준은 4% 내지 25%이고, (viii) 상기 추출된 지질의 지방산 함량 중 전체 ω 6 지방산:전체 ω 3 지방산의 비는 0.05 내지 1이고, (ix) 상기 지질의 트라이아실글리세롤 (TAG) 함량은 적어도 70%이고, (x) 트라이아실글리세롤 (TAG)의 형태로 에스테르화된 적어도 35%의 DPA는 TAG의 *sn*-2 위치에서 에스테르화되고,

[0110] ii) 상기 식물 부분으로부터 지질을 추출하는

[0111] 단계들을 포함하고,

[0112] 상기 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 트라이아실글리세롤 (TAG)의 형태로 에스테르화된 적어도 35%의 DPA는 TAG의 *sn*-2 위치에서 에스테르화된다.

[0113] 식물 부분 또는 미생물 세포를 수득하는 단계는 식물 부분을 생성하는 식물로부터 식물 부분, 바람직하게는 종자를 수확하는 것, 미생물 세포의 배양물로부터 이러한 세포의 회수, 또는 생산자 또는 공급자로부터 구입, 또는 수입하여 식물 부분 또는 미생물 세포를 수득하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 식물 부분 또는 미생물 세포의 샘플의 지질, 또는 추출된 지질의 지방산 조성을 측정하는 단계를 포함할 수 있다.

[0114] 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 방법으로 얻은 추출된 지질은, 관련이 있는 경우, 예를 들어 처음 두 개의 태양과 관련된 상기에서 정의된 바와 같은 본 명세서에서 정의된 하나 이상의 특징을 갖는다.

[0115] 본 발명의 상기 태양의 실시태양은 이하에서 더욱 상세히 설명된다. 당업자는 상기 태양의 해당하는 특징보다 더욱 넓게 기재된 실시태양의 임의의 특징들이 이러한 태양에 적용되지 않는다는 점을 이해할 것이다.

- [0116] 하나의 실시태양에서, 식물 부분은 종자, 바람직하게는 유지종자이다. 이러한 종자의 예로는 이에 제한되는 것은 아니나, 브라시카 종(*Brassica* sp.), 고시피움 히르수툼(*Gossypium hirsutum*), 리눔 유시타티시뮴(*Linum usitatissimum*), 헬리안투스 종(*Helianthus* sp.), 카르타무스 텅크토리우스(*Carthamus tinctorius*), 글리시네 맥스(*Glycine max*), 제아 메이스(*Zea mays*), 아라비도프시스 탈리아나(*Arabidopsis thaliana*), 소르검 비콜라(*Sorghum bicolor*), 소르검 불가레(*Sorghum vulgare*), 아베나 사티바(*Avena sativa*), 트리폴리움 종(*Trifolium* sp.), 엘라에시스 구이니아니스(*Elaeisis guineensis*), 니코티아나 벤타미아나(*Nicotiana benthamiana*), 호르데움 불가레(*Hordeum vulgare*), 루피누스 앙구스티폴리우스(*Lupinus angustifolius*), 오리자 사티바(*Oryza sativa*), 오리자 글라베리마(*Oryza glaberrima*), 카멜리나 사티바(*Camelina sativa*), 또는 크람베 아비시니카(*Crambe abyssinica*), 바람직하게는 브라시카 종(*Brassica* sp.) 종자, 씨. 사티바 종자 또는 지. 맥스 (대두) 종자, 더욱 바람직하게는 브라시카 나푸스(*Brassica napus*), 비. 윤채아(*B juncea*) 또는 씨. 사티바(*C. sativa*) 종자를 포함한다. 하나의 실시태양에서, 식물 부분은 종자, 바람직하게는 유지종자, 예를 들어 브라시카 종(*Brassica* sp.), 예컨대 브라시카 나푸스(*Brassica napus*) 또는 브라시카 윤채아(*Brassica juncea*), 고시피움 히르수툼(*Gossypium hirsutum*), 리눔 유시타티시뮴(*Linum usitatissimum*), 헬리안투스 종(*Helianthus* sp.), 카르타무스 텅크토리우스(*Carthamus tinctorius*), 글리시네 맥스(*Glycine max*), 제아 메이스(*Zea mays*), 엘라에시스 구이니아니스(*Elaeisis guineensis*), 니코티아나 벤타미아나(*Nicotiana benthamiana*), 루피누스 앙구스티폴리우스(*Lupinus angustifolius*), 카멜리나 사티바(*Camelina sativa*), 또는 크람베 아비시니카(*Crambe abyssinica*), 바람직하게는 브라시카 나푸스(*Brassica napus*) 비. 윤채아(*B juncea*) 또는 씨. 사티바(*C. sativa*) 종자이다. 하나의 실시태양에서, 상기 종자는 캐놀라 종자, 머스타드 종자, 대두 종자, 카멜리나 사티바 종자 또는 아라비도프시스 탈리아나 종자이다. 대안적인 실시태양에서, 상기 종자는 에이. 탈리아나 종자이외 및/또는 씨. 사티바 종자 이외의 종자이다. 하나의 실시태양에서, 상기 종자는 대두 종자 이외의 종자이다. 하나의 실시태양에서, 상기 식물 부분은 브라시카 종 종자이다. 상기 식물 부분은 바람직하게는 브라시카 종 종자 또는 카멜리나 사티바 종자이다. 하나의 실시태양에서, 상기 종자는 예를 들어 실시예 1에 기재된 바와 같은 표준 조건에서 재배된 식물로부터 얻어지거나 표준 조건의 필드 또는 온실에서 재배된 식물로부터 얻어졌다.
- [0117] 또 다른 실시태양에서, 상기 종자는 종자의 그램당 적어도 약 18 mg, 적어도 약 22 mg, 적어도 약 26 mg, 약 18 mg 내지 약 100 mg, 약 22 mg 내지 약 70 mg, 약 80 mg, 약 30 mg 내지 약 80 mg, 또는 약 24 mg 내지 약 50 mg의 DPA를 포함한다.
- [0118] 추가의 실시태양에서, 상기 식물 부분, 예컨대 종자는 하기의 효소들의 세트 중 하나를 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하고:
- [0119] i) ω3-불포화효소, Δ6-불포화효소, Δ5-불포화효소, Δ6-신장효소 및 Δ5-신장효소,
- [0120] ii) Δ15-불포화효소, Δ6-불포화효소, Δ5-불포화효소, Δ6-신장효소 및 Δ5-신장효소,
- [0121] iii) Δ12-불포화효소, Δ6-불포화효소, Δ5-불포화효소, Δ6-신장효소 및 Δ5-신장효소,
- [0122] iv) Δ12-불포화효소, ω3-불포화효소 및/또는 Δ15-불포화효소, Δ6-불포화효소, Δ5-불포화효소, Δ6-신장효소 및 Δ5-신장효소,
- [0123] v) ω3-불포화효소, Δ8-불포화효소, Δ5-불포화효소, Δ9-신장효소 및 Δ5-신장효소,
- [0124] vi) Δ15-불포화효소, Δ8-불포화효소, Δ5-불포화효소, Δ9-신장효소 및 Δ5-신장효소,
- [0125] vii) Δ12-불포화효소, Δ8-불포화효소, Δ5-불포화효소, Δ9-신장효소 및 Δ5-신장효소,
- [0126] viii) Δ12-불포화효소, ω3-불포화효소 및/또는 Δ15-불포화효소, Δ8-불포화효소, Δ5-불포화효소, Δ9-신장효소 및 Δ5-신장효소;
- [0127] 각각의 폴리뉴클레오티드가 상기 식물 부분의 세포에서 상기 폴리뉴클레오티드의 발현을 유도할 수 있는 하나 이상의 프로모터에 작동적으로 연결된다.
- [0128] 추가의 실시태양에서, 상기 식물 부분, 예컨대 종자, 또는 재조합 세포, 예컨대 미생물 세포는 하기의 효소들의 세트 중 하나를 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하고:
- [0129] i) ω3-불포화효소 및/또는 Δ15-불포화효소, Δ6-불포화효소, Δ5-불포화효소, Δ6-신장효소 및 Δ5-신장효소,

- [0130] ii) $\Delta 12$ -불포화효소, $\Delta 6$ -불포화효소, $\Delta 5$ -불포화효소, $\Delta 6$ -신장효소 및 $\Delta 5$ -신장효소,
- [0131] iii) $\Delta 12$ -불포화효소, $\omega 3$ -불포화효소 및/또는 $\Delta 15$ -불포화효소, $\Delta 6$ -불포화효소, $\Delta 5$ -불포화효소, $\Delta 6$ -신장효소 및 $\Delta 5$ -신장효소,
- [0132] iv) $\omega 3$ -불포화효소 및/또는 $\Delta 15$ -불포화효소, $\Delta 8$ -불포화효소, $\Delta 5$ -불포화효소, $\Delta 9$ -신장효소 및 $\Delta 5$ -신장효소,
- [0133] v) $\Delta 12$ -불포화효소, $\Delta 8$ -불포화효소, $\Delta 5$ -불포화효소, $\Delta 9$ -신장효소 및 $\Delta 5$ -신장효소,
- [0134] vi) $\Delta 12$ -불포화효소, $\omega 3$ -불포화효소 및/또는 $\Delta 15$ -불포화효소, $\Delta 8$ -불포화효소, $\Delta 5$ -불포화효소, $\Delta 9$ -신장효소 및 $\Delta 5$ -신장효소,
- [0135] 각각의 폴리뉴클레오티드가 상기 식물 부분의 세포 또는 상기 세포에서 상기 폴리뉴클레오티드의 발현을 유도할 수 있는 하나 이상의 프로모터에 작동적으로 연결된다.
- [0136] 하나의 실시태양에서, 식물 부분 또는 세포가 에스테르화된 형태의 지방산을 포함하는 지질을 포함하고, 상기 지방산은 도코사헵타에노산(DPA)을 포함하고, 트라이아실글리세롤(TAG)의 형태로 에스테르화된 DPA 및/또는 DHA(존재하는 경우)의 적어도 35%는 상기 TAG의 *sn-2* 위치에서 에스테르화되는 경우, 상기 식물 부분, 예컨대 종자, 또는 재조합 세포, 예컨대 미생물 세포는 1-아실-글리세롤-3-포스페이트 아실트랜스퍼라제 (LPAAT)를 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하고, 상기 폴리뉴클레오티드는 상기 식물 부분의 세포 또는 상기 세포에서 폴리뉴클레오티드의 발현을 유도할 수 있는 하나 이상의 프로모터에 작동적으로 연결된다. 또 다른 실시태양에서, 상기 세포는 하기의 효소들의 세트 중 하나를 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하고:
- [0137] i) 1-아실-글리세롤-3-포스페이트 아실트랜스퍼라제 (LPAAT), $\omega 3$ -불포화효소, $\Delta 6$ -불포화효소, $\Delta 5$ -불포화효소, $\Delta 6$ -신장효소, 및 $\Delta 5$ -신장효소,
- [0138] ii) 1-아실-글리세롤-3-포스페이트 아실트랜스퍼라제 (LPAAT), $\Delta 15$ -불포화효소, $\Delta 6$ -불포화효소, $\Delta 5$ -불포화효소, $\Delta 6$ -신장효소, 및 $\Delta 5$ -신장효소,
- [0139] iii) 1-아실-글리세롤-3-포스페이트 아실트랜스퍼라제 (LPAAT), $\Delta 12$ -불포화효소, $\Delta 6$ -불포화효소, $\Delta 5$ -불포화효소, $\Delta 6$ -신장효소, 및 $\Delta 5$ -신장효소,
- [0140] iv) 1-아실-글리세롤-3-포스페이트 아실트랜스퍼라제 (LPAAT), $\Delta 12$ -불포화효소, $\omega 3$ -불포화효소 및/또는 $\Delta 15$ -불포화효소, $\Delta 6$ -불포화효소, $\Delta 5$ -불포화효소, $\Delta 6$ -신장효소, 및 $\Delta 5$ -신장효소,
- [0141] v) 1-아실-글리세롤-3-포스페이트 아실트랜스퍼라제 (LPAAT), $\omega 3$ -불포화효소, $\Delta 8$ -불포화효소, $\Delta 5$ -불포화효소, $\Delta 9$ -신장효소, 및 $\Delta 5$ -신장효소,
- [0142] vi) 1-아실-글리세롤-3-포스페이트 아실트랜스퍼라제 (LPAAT), $\Delta 15$ -불포화효소, $\Delta 8$ -불포화효소, $\Delta 5$ -불포화효소, $\Delta 9$ -신장효소, 및 $\Delta 5$ -신장효소,
- [0143] vii) 1-아실-글리세롤-3-포스페이트 아실트랜스퍼라제 (LPAAT), $\Delta 12$ -불포화효소, $\Delta 8$ -불포화효소, $\Delta 5$ -불포화효소, $\Delta 9$ -신장효소, 및 $\Delta 5$ -신장효소,
- [0144] viii) 1-아실-글리세롤-3-포스페이트 아실트랜스퍼라제 (LPAAT), $\Delta 12$ -불포화효소, $\omega 3$ -불포화효소 및/또는 $\Delta 15$ -불포화효소, $\Delta 8$ -불포화효소, $\Delta 5$ -불포화효소, $\Delta 9$ -신장효소, 및 $\Delta 5$ -신장효소,
- [0145] 각각의 폴리뉴클레오티드가 상기 세포에서 상기 폴리뉴클레오티드의 발현을 유도할 수 있는 하나 이상의 프로모터에 작동적으로 연결된다. 바람직하게는, LPAAT는 C22 다중불포화 지방 아실-CoA 기질, 예컨대 DPA-CoA를 사용할 수 있다.
- [0146] 바람직하게는, 상기 식물, 또는 이의 부분 예컨대 종자, 또는 미생물 세포는 $\Delta 4$ -불포화효소를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 갖지 않거나, $\Delta 4$ -불포화효소 폴리펩티드를 갖지 않는다.
- [0147] 하나의 실시태양에서, $\Delta 12$ -불포화효소는 또한 $\omega 3$ -불포화효소 및/또는 $\Delta 15$ -불포화효소 활성을 갖는다. 즉, 상기 활성들은 단일 폴리펩티드에 의해 부여된다. 대안적으로, $\Delta 12$ -불포화효소는 $\omega 3$ -불포화효소 활성을 가지지 않고 $\Delta 15$ -불포화효소 활성을 가지지 않는다. 즉, $\Delta 12$ -불포화효소는 $\omega 3$ -불포화효소 활성 및/또는 $\Delta 15$ -불포화효소 활성을 갖는 폴리펩티드와 별개의 폴리펩티드이다.
- [0148] 또 다른 실시태양에서, 상기 식물 부분, 예컨대 종자, 또는 재조합 세포, 예컨대 미생물 세포는 하기의 특징들

중 하나 이상 또는 전부를 갖는다:

- [0149] i) $\Delta 12$ -불포화효소는 상기 식물 부분 또는 재조합 세포의 하나 이상의 세포에서 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 약 60% 내지 약 95%, 약 70% 내지 약 90%, 또는 약 75% 내지 약 85%의 효율로 올레산을 리놀레산으로 전환시키고,
- [0150] ii) $\omega 3$ -불포화효소는 상기 식물 부분 또는 재조합 세포의 하나 이상의 세포에서 적어도 약 65%, 적어도 약 75%, 적어도 약 85%, 약 65% 내지 약 95%, 약 75% 내지 약 91%, 또는 약 80% 내지 약 91%의 효율로 $\omega 6$ 지방산을 $\omega 3$ 지방산으로 전환시키고,
- [0151] iii) $\Delta 6$ -불포화효소는 상기 식물 부분 또는 재조합 세포의 하나 이상의 세포에서 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 약 30% 내지 약 70%, 약 35% 내지 약 60%, 또는 약 50% 내지 약 70%의 효율로 ALA를 SDA로 전환시키고,
- [0152] iv) $\Delta 6$ -불포화효소는 상기 식물 부분 또는 재조합 세포의 하나 이상의 세포에서 약 5% 미만, 약 2.5% 미만, 약 1% 미만, 약 0.1% 내지 약 5%, 약 0.5% 내지 약 2.5%, 또는 약 0.5% 내지 약 1%의 효율로 리놀레산을 γ -리놀렌산으로 전환시키고,
- [0153] v) $\Delta 6$ -신장효소는 상기 식물 부분 또는 재조합 세포의 하나 이상의 세포에서 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 약 60% 내지 약 95%, 약 70% 내지 약 80%, 또는 약 75% 내지 약 80%의 효율로 SDA를 ETA로 전환시키고,
- [0154] vi) $\Delta 5$ -불포화효소는 상기 식물 부분 또는 재조합 세포의 하나 이상의 세포에서 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 약 60% 내지 약 95%, 약 70% 내지 약 95%, 또는 약 75% 내지 약 95%의 효율로 ETA를 EPA로 전환시키고,
- [0155] vii) $\Delta 5$ -신장효소는 상기 식물 부분 또는 재조합 세포의 하나 이상의 세포에서 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 약 50% 내지 약 90%, 또는 약 85% 내지 약 95%의 효율로 EPA를 DPA로 전환시키고,
- [0156] ix) 식물 부분 또는 재조합 세포의 하나 이상의 세포에서 올레산의 DPA로의 전환 효율은 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 약 20%, 약 25%, 약 30%, 약 10% 내지 약 50%, 약 10% 내지 약 30%, 약 10% 내지 약 25%, 또는 약 20% 내지 약 30%이고,
- [0157] x) 식물 부분 또는 재조합 세포의 하나 이상의 세포에서 LA의 DPA로의 전환 효율은 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 22%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 약 25%, 약 30%, 약 35%, 약 15% 내지 약 50%, 약 20% 내지 약 40%, 또는 약 20% 내지 약 30%이고,
- [0158] xi) 식물 부분 또는 재조합 세포의 하나 이상의 세포에서 ALA의 DPA로의 전환 효율은 적어도 약 17%, 적어도 약 22%, 적어도 약 24%, 적어도 약 30%, 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 17% 내지 약 55%, 약 22% 내지 약 35%, 또는 약 24% 내지 약 35%이고,
- [0159] xi) 식물 부분 또는 재조합 세포의 하나 이상의 세포는 외인성 폴리뉴클레오티드가 없는 상응하는 세포보다 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 약 25% 내지 약 40%, 또는 약 27.5% 내지 약 37.5% 많은 $\omega 3$ 지방산을 포함하고,
- [0160] xii) $\Delta 6$ -불포화효소는 리놀레산(LA)에 비해 α -리놀렌산(ALA)을 우선적으로 불포화시키고,
- [0161] xiii) $\Delta 6$ -신장효소는 또한 $\Delta 9$ -신장효소 활성을 갖고,
- [0162] xiv) $\Delta 12$ -불포화효소는 또한 $\Delta 15$ -불포화효소 활성을 갖고,
- [0163] xv) $\Delta 6$ -불포화효소는 또한 $\Delta 8$ -불포화효소 활성을 갖고,
- [0164] xvi) $\Delta 8$ -불포화효소는 또한 $\Delta 6$ -불포화효소 활성을 갖거나 또는 $\Delta 6$ -불포화효소 활성을 갖지 않고,
- [0165] xvii) $\Delta 15$ -불포화효소는 또한 GLA에 대한 $\omega 3$ -불포화효소 활성을 갖고,
- [0166] xviii) $\omega 3$ -불포화효소는 또한 LA에 대한 $\Delta 15$ -불포화효소 활성을 갖고,
- [0167] xix) $\omega 3$ -불포화효소는 LA 및/또는 GLA를 모두 불포화시키고,
- [0168] xx) $\omega 3$ -불포화효소는 LA에 비해 GLA를 우선적으로 불포화시키고,
- [0169] xxi) 불포화효소들 중 하나 이상 또는 전부, 바람직하게는 $\Delta 6$ -불포화효소 및/또는 $\Delta 5$ -불포화효소는 상응하는

아실-PC 기질보다 아실-CoA 기질에 대해 더 큰 활성을 갖고,

- [0170] xxii) $\Delta 6$ -불포화효소는 지방산 기질로서 LA보다 ALA에 대해 더 큰 $\Delta 6$ -불포화효소 활성을 갖고,
- [0171] xxiii) $\Delta 6$ -불포화효소는 지방산 기질로서 PC의 *sn*-2 위치에 결합된 ALA보다 지방산 기질로서 ALA-CoA에 대해 더 큰 $\Delta 6$ -불포화효소 활성을 갖고,
- [0172] xxiv) $\Delta 6$ -불포화효소는 LA에 비해 기질로서 ALA에 대해 적어도 약 2배 더 큰 $\Delta 6$ -불포화효소 활성, 적어도 3배 더 큰 활성, 적어도 4배 더 큰 활성 또는 적어도 5배 더 큰 활성을 갖고,
- [0173] xxv) $\Delta 6$ -불포화효소는 지방산 기질로서 PC의 *sn*-2 위치에 결합된 ALA에 대해서보다 지방산 기질로서 ALA-CoA에 대해 더 큰 활성을 갖고,
- [0174] xxvi) $\Delta 6$ -불포화효소는 지방산 기질로서 PC의 *sn*-2 위치에 결합된 ALA에 대해서보다 지방산 기질로서 ALA-CoA에 대해 적어도 약 5배 더 큰 $\Delta 6$ -불포화효소 활성 또는 적어도 10배 더 큰 활성을 갖고,
- [0175] xxvii) 불포화효소는 전단부(front-end) 불포화효소이고,
- [0176] xxviii) $\Delta 6$ -불포화효소는 ETA에 대해 검출 가능한 $\Delta 5$ -불포화효소 활성을 갖지 않는다.
- [0177] 또 다른 실시태양에서, 상기 식물 부분, 예컨대 종자, 바람직하게는 브라시카 종자 또는 씨. 사티바 종자, 또는 재조합 세포, 예컨대 미생물 세포는 하기의 특징들 중 하나 이상 또는 전부를 갖는다:
- [0178] i) 상기 $\Delta 12$ -불포화효소는 서열번호 4에 제공된 바와 같은 서열, 그의 생물 활성 단편, 또는 서열번호 4에 적어도 50% 일치하는 아미노산 서열을 갖는 아미노산을 포함하고,
- [0179] ii) 상기 $\omega 3$ -불포화효소는 서열번호 6에 제공된 바와 같은 서열, 그의 생물 활성 단편, 또는 서열번호 6에 적어도 50% 일치하는 아미노산 서열을 갖는 아미노산을 포함하고,
- [0180] iii) 상기 $\Delta 6$ -불포화효소는 서열번호 9에 제공된 바와 같은 서열, 그의 생물 활성 단편, 또는 서열번호 9에 적어도 50% 일치하는 아미노산 서열을 갖는 아미노산을 포함하고,
- [0181] iv) 상기 $\Delta 6$ -신장효소는 서열번호 16에 제공된 바와 같은 서열, 그의 생물 활성 단편, 예를 들어 서열번호 16 및/또는 서열번호 17에 적어도 50% 일치하는 아미노산 서열을 갖는 아미노산을 포함하고,
- [0182] v) 상기 $\Delta 5$ -불포화효소는 서열번호 20에 제공된 바와 같은 서열, 그의 생물 활성 단편, 또는 서열번호 20에 적어도 50% 일치하는 아미노산 서열을 갖는 아미노산을 포함하고, 및
- [0183] vi) 상기 $\Delta 5$ -신장효소는 서열번호 25에 제공된 바와 같은 서열, 그의 생물 활성 단편, 또는 서열번호 25에 적어도 50% 일치하는 아미노산 서열을 갖는 아미노산을 포함한다.
- [0184] 하나의 실시태양에서, 상기 식물 부분, 예컨대 종자, 또는 재조합 세포, 예컨대 미생물 세포는 다이아실글리세롤 아실트랜스퍼라제(DGAT), 모노아실글리세롤 아실트랜스퍼라제(MGAT), 글리세롤-3-포스페이트 아실트랜스퍼라제(GPAT), 1-아실-글리세롤-3-포스페이트 아실트랜스퍼라제(LPAAT), 바람직하게는 C22 다중불포화 지방 아실-CoA 기질, 예컨대 DPA-CoA를 사용할 수 있는 LPAAT, 아실-CoA:리소포스파티딜콜린 아실트랜스퍼라제(LPCAT), 포스포리파제 A₂(PLA₂), 포스포리파제 C(PLC), 포스포리파제 D(PLD), CDP-콜린 다이아실글리세롤 콜린 포스포트랜스퍼라제(CPT), 포스파티딜콜린 다이아실글리세롤 아실트랜스퍼라제(PDAT), 포스파티딜콜린:다이아실글리세롤 콜린 포스포트랜스퍼라제(PDCT), 아실-CoA 신타제(ACS), 또는 이들 중 2 개 이상의 조합을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 추가로 포함한다.
- [0185] 또 다른 실시태양에서, 상기 식물 부분, 예컨대 종자, 또는 재조합 세포, 예컨대 미생물 세포는 FAE1, DGAT, MGAT, GPAT, LPAAT, LPCAT, PLA₂, PLC, PLD, CPT, PDAT, 티오에스테라제, 예를 들어 FATB, 및 $\Delta 12$ -불포화효소, 및 이들 중 2 개 이상의 조합 중에서 선택된 상기 식물 부분의 세포 중 외인성 효소의 생산 및/또는 활성을 하향 조절하는 도입된 돌연변이 또는 외인성 폴리뉴클레오티드를 추가로 포함한다.
- [0186] 추가의 실시태양에서, 상기 프로모터 중 적어도 하나 또는 바람직하게는 전부는 종자 특이성 프로모터이다. 하나의 실시태양에서, 상기 프로모터 중 적어도 하나 또는 전부는 오일 생합성 또는 축적 유전자, 예를 들어 올레오신을 암호화하는 유전자로부터, 또는 종자 저장 단백질 유전자, 예를 들어 콘리닌을 암호화하는 유전자로부터 취득되었다.
- [0187] 또 다른 실시태양에서, 상기 $\Delta 5$ -신장효소를 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드의 발현을 유도하는 프로모터

(들)는, 상기 프로모터(들)가 상기 $\Delta 12$ -불포화효소 및 $\omega 3$ -불포화효소를 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드의 발현을 유도하기 전에 상기 식물의 발생 종자 또는 재조합 세포, 예컨대 미생물 세포에서 상기 폴리뉴클레오티드의 발현을 개시하거나 그 전에 피크 발현에 도달한다.

- [0188] 또 다른 실시태양에서, 상기 외인성 폴리뉴클레오티드는 DNA 분자, 바람직하게는 T-DNA 분자에 공유 결합되고, 상기 식물 부분의 세포, 또는 재조합 세포, 예컨대 미생물 세포의 게놈에 통합되며, 바람직하게는 이때 상기 식물 부분의 세포 또는 재조합 세포의 게놈에 통합된 상기과 같은 DNA 분자의 수는 1, 2 또는 3 개 이하이거나 또는 2 또는 3이다.
- [0189] 또 다른 실시태양에서, 상기 식물 부분은 적어도 2 개의 상이한 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하며, 상기 폴리뉴클레오티드는 각각 동일하거나 상이한 아미노산 서열을 갖는 $\Delta 6$ -불포화효소를 암호화한다.
- [0190] 또 다른 실시태양에서, 상기 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 식물 부분의 전체 오일 함량은, 상기 외인성 폴리뉴클레오티드가 없는 상응하는 식물 부분의 전체 오일 함량의 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 약 50% 내지 약 80%, 또는 약 80% 내지 약 100%이다. 또 다른 실시태양에서, 상기 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 종자는 상기 외인성 폴리뉴클레오티드가 없는 상응하는 종자의 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 약 50% 내지 약 80%, 또는 약 80% 내지 약 100%의 종자 중량을 갖는다.
- [0191] 또 다른 실시태양에서, 상기 지질은 오일, 바람직하게는 유지종자로부터의 종자유의 형태로 존재하며, 여기에서 상기 지질의 중량의 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95%, 적어도 약 98%, 또는 약 95% 내지 약 98%는 트라이아실글리세롤이다.
- [0192] 또 다른 실시태양에서, 상기 방법은 전체 지방산 함량의 백분율로서 DPA의 수준을 증가시키기 위하여 상기 지질을 처리하는 단계를 추가로 포함한다. 예를 들어, 상기 처리는 에스테르화된 지방산의 유리 지방산으로의 가수분해, 또는 트랜스에스테르화를 포함한다. 예를 들어, 상기 지질, 예컨대 캐놀라 오일은 상기 오일 중의 지방산을 알킬 에스테르, 예컨대 메틸 또는 에틸 에스테르로 전환시키기 위하여 처리될 수 있고, 그 다음 이는 DPA에 대해 지질 또는 오일을 풍부하게 하기 위하여 분별될 수 있다. 실시태양에서, 이러한 처리 후 지질의 지방산 조성은 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80% 또는 적어도 90%의 DPA를 포함한다. 하나의 실시태양에서, 처리 후 지질의 전체 지방산 함량 중 DHA의 수준은 2.0% 미만 또는 0.5% 미만이고, 바람직하게는 지질에서 검출되지 않는다.
- [0193] 또한, 본 발명의 방법을 사용하여 생성된 지질, 예를 들어 유리 지방산 또는 알킬 에스테르, 또는 상기 지질을 포함하는 오일이 제공된다.
- [0194] 또 다른 태양에서, 본 발명은 다중불포화 지방산의 메틸 또는 에틸 에스테르의 제조 방법으로, 상기 방법은 추출된 식물 지질 중에서, 또는 추출 과정 도중에 트라이아실글리세롤을 각각 메탄올 또는 에탄올과 반응시킴을 포함하고, 상기 추출된 식물 지질이 TAG의 형태로 에스테르화된 지방산을 포함하고, 상기 지방산이 올레산, 팔미트산, 리놀레산(LA)을 포함하는 $\omega 6$ 지방산, α -리놀렌산(ALA) 및 도코사헵타에노산(DPA), 및 임의로 스테아리돈산(SDA), 에이코사헵타에노산(EPA), 및 에이코사테트라에노산(ETA) 중 하나 이상을 포함하는 $\omega 3$ 지방산을 포함하고, 상기 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 DPA의 수준이 7% 내지 35%, 바람직하게는 20.1% 내지 30% 또는 20.1% 내지 35%이며, 이에 의하여 다중불포화 지방산의 메틸 또는 에틸 에스테르를 제조하는 방법을 제공한다.
- [0195] 또 다른 태양에서, 본 발명은 도코사헵타에노산(DPA)의 메틸 또는 에틸 에스테르의 제조 방법으로, 상기 방법은 추출된 식물 지질 중에서, 또는 추출 과정 도중에 트라이아실글리세롤(TAG)을 각각 메탄올 또는 에탄올과 반응시킴을 포함하고, 상기 추출된 식물 지질이 에스테르화된 형태의 지방산을 포함하고, 상기 지방산이 도코사헵타에노산(DPA)을 포함하고, 상기 TAG의 형태로 에스테르화된 DPA의 적어도 35%는 TAG의 *sn*-2 위치에서 에스테르화되며, 이에 의하여 다중불포화 지방산의 메틸 또는 에틸 에스테르를 제조하는 방법을 제공한다.
- [0196] 바람직한 실시태양에서, 상기 두 개의 태양의 방법에 사용된 지질은 본 발명의 추출된 지질 또는 오일의 맥락에서 본 명세서에 정의된 하나 이상의 특징을 갖는다.
- [0197] 또 다른 태양에서, 본 발명은
- [0198] a) 에스테르화된 형태의 지방산을 포함하는 지질, 및
- [0199] b) i) $\Delta 12$ -불포화효소, $\omega 3$ -불포화효소 및/또는 $\Delta 15$ -불포화효소, $\Delta 6$ -불포화효소, $\Delta 5$ -불포화효소, $\Delta 6$ -신장

효소 및 $\Delta 5$ -신장효소,

- [0200] ii) $\Delta 12$ -불포화효소, $\omega 3$ -불포화효소 및/또는 $\Delta 15$ -불포화효소, $\Delta 8$ -불포화효소, $\Delta 5$ -불포화효소, $\Delta 9$ -신장효소 및 $\Delta 5$ -신장효소
- [0201] iii) $\omega 3$ -불포화효소 및/또는 $\Delta 15$ -불포화효소, $\Delta 6$ -불포화효소, $\Delta 5$ -불포화효소, $\Delta 6$ -신장효소 및 $\Delta 5$ -신장효소, 또는
- [0202] iv) $\omega 3$ -불포화효소 및/또는 $\Delta 15$ -불포화효소, $\Delta 8$ -불포화효소, $\Delta 5$ -불포화효소, $\Delta 9$ -신장효소 및 $\Delta 5$ -신장효소,
- [0203] 의 효소 세트 중 하나를 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드
- [0204] 를 포함하는, 상기 종자 중의 지질을 포함하는 유지종자 식물 또는 그의 일부, 예컨대 종자, 바람직하게는 브라시카 식물 또는 씨, 사티바 식물, 또는 미생물 세포로,
- [0205] 각각의 폴리뉴클레오티드가 상기 식물의 발생 종자에서 상기 폴리뉴클레오티드의 발현을 유도할 수 있는 하나 이상의 종자-특이성 프로모터, 또는 상기 미생물 세포에서 상기 폴리뉴클레오티드의 발현을 유도할 수 있는 하나 이상의 프로모터에 작동적으로 연결되고, 상기 지방산이 올레산, 팔미트산, 리놀렌산(LA) 및 선택적으로 γ -리놀렌산(GLA)을 포함하는 $\omega 6$ 지방산, α -리놀렌산(ALA), 스테아리돈산(SDA), 및 도코사헨타에노산(DPA), 및 선택적으로 에이코사헨타에노산(EPA) 및/또는 에이코사테트라에노산(ETA)을 포함하는 $\omega 3$ 지방산을 포함하고, 상기 종자 또는 미생물 세포의 지질의 전체 지방산 함량 중 DPA의 수준이 7% 내지 35%인, 종자중의 지질을 포함하는 유지종자 식물, 또는 그의 일부, 예컨대 종자, 또는 미생물 세포를 제공한다. 이러한 태양의 바람직한 실시태양에서, DHA는 상기 종자의 지질 및 추출된 지질의 전체 지방산 함량의 2% 미만 또는 0.5% 미만의 수준으로 존재하고, 더욱 바람직하게는 상기 지질의 전체 지방산 함량 중에서 검출되지 않는다.
- [0206] 또 다른 태양에서, 본 발명은
- [0207] a) 에스테르화된 형태의 지방산 (상기 지방산은 도코사헨타에노산(DPA)을 포함하고, 트라이아실글리세롤 (TAG)의 형태로 에스테르화된 DPA의 적어도 35%가 TAG의 *sn*-2 위치에서 에스테르화된), 및
- [0208] b) i) 1-아실-글리세롤-3-포스페이트 아실트랜스퍼라제 (LPAAT), $\omega 3$ -불포화효소, $\Delta 6$ -불포화효소, $\Delta 5$ -불포화효소, $\Delta 6$ -신장효소, 및 $\Delta 5$ -신장효소,
- [0209] ii) 1-아실-글리세롤-3-포스페이트 아실트랜스퍼라제 (LPAAT), $\Delta 15$ -불포화효소, $\Delta 6$ -불포화효소, $\Delta 5$ -불포화효소, $\Delta 6$ -신장효소, 및 $\Delta 5$ -신장효소,
- [0210] iii) 1-아실-글리세롤-3-포스페이트 아실트랜스퍼라제 (LPAAT), $\Delta 12$ -불포화효소, $\Delta 6$ -불포화효소, $\Delta 5$ -불포화효소, $\Delta 6$ -신장효소, 및 $\Delta 5$ -신장효소,
- [0211] iv) 1-아실-글리세롤-3-포스페이트 아실트랜스퍼라제 (LPAAT), $\Delta 12$ -불포화효소, $\omega 3$ -불포화효소 및/또는 $\Delta 15$ -불포화효소, $\Delta 6$ -불포화효소, $\Delta 5$ -불포화효소, $\Delta 6$ -신장효소, 및 $\Delta 5$ -신장효소,
- [0212] v) 1-아실-글리세롤-3-포스페이트 아실트랜스퍼라제 (LPAAT), $\omega 3$ -불포화효소, $\Delta 8$ -불포화효소, $\Delta 5$ -불포화효소, $\Delta 9$ -신장효소, 및 $\Delta 5$ -신장효소,
- [0213] vi) 1-아실-글리세롤-3-포스페이트 아실트랜스퍼라제 (LPAAT), $\Delta 15$ -불포화효소, $\Delta 8$ -불포화효소, $\Delta 5$ -불포화효소, $\Delta 9$ -신장효소, 및 $\Delta 5$ -신장효소,
- [0214] vii) 1-아실-글리세롤-3-포스페이트 아실트랜스퍼라제 (LPAAT), $\Delta 12$ -불포화효소, $\Delta 8$ -불포화효소, $\Delta 5$ -불포화효소, $\Delta 9$ -신장효소, 및 $\Delta 5$ -신장효소,
- [0215] viii) 1-아실-글리세롤-3-포스페이트 아실트랜스퍼라제 (LPAAT), $\Delta 12$ -불포화효소, $\omega 3$ -불포화효소 및/또는 $\Delta 15$ -불포화효소, $\Delta 8$ -불포화효소, $\Delta 5$ -불포화효소, $\Delta 9$ -신장효소, 및 $\Delta 5$ -신장효소
- [0216] 의 효소 세트 중 하나를 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드
- [0217] 를 포함하는, 세포, 바람직하게는 식물, 예컨대 유지종자 식물, 또는 그의 일부, 예컨대 종자 내 또는 이로부터의 세포, 또는 유지종자 식물, 또는 그의 일부, 바람직하게는 브라시카 식물 또는 씨, 사티바 식물, 또는 미생물 세포로,
- [0218] 각각의 폴리뉴클레오티드가 상기 세포에서 상기 폴리뉴클레오티드의 발현을 유도할 수 있는 하나 이상의 프로모

터에 작동적으로 연결된 세포를 제공한다. 바람직하게는, LPAAT는 C22 다중불포화 지방 아실-CoA 기질, 예컨대 DPA-CoA를 사용할 수 있고, 상기 추출된 지질의 전체 지방산 함량 중 DPA의 수준은 약 1% 내지 35%, 또는 약 7% 내지 35% 또는 약 20.1% 내지 35%이다. 하나의 실시태양에서, 트리아아실글리세롤 (TAG)의 형태로 에스테르화된 DPA의 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 48%, 35% 내지 약 60%, 또는 35% 내지 약 50%는 TAG의 sn-2 위치에서 에스테르화된다.

[0219] 각각의 상기 두 개의 태양의 바람직한 실시태양에서, $\Delta 15$ -불포화효소는 진균 $\Delta 15$ -불포화효소이고 $\omega 3$ -불포화효소는 진균 $\omega 3$ -불포화효소이다.

[0220] 바람직한 실시태양에서, 유지종자 식물, 미생물 세포 또는 본 발명의 세포는 관련이 있는 경우, 예를 들어 추출된 식물 지질, 추출된 미생물 지질 또는 이의 생성 방법과 관련하여 상기에서 정의된 바와 같은, 본 명세서에서 정의된 하나 이상의 특징을 갖는다.

[0221] 유지종자 식물의 예는 이에 제한되는 것은 아니나, 브라시카 종(*Brassica* sp.), 고시피움 히르수툼(*Gossypium hirsutum*), 리눔 유시타티시뮴(*Linum usitatissimum*), 헬리안투스 종(*Helianthus* sp.), 카르타무스 텅크토리우스(*Carthamus tinctorius*), 글리시네 맥스(*Glycine max*), 제아 메이스(*Zea mays*), 아라비도프시스 탈리아나(*Arabidopsis thaliana*), 소르검 비콜라(*Sorghum bicolor*), 소르검 불가레(*Sorghum vulgare*), 아베나 사티바(*Avena sativa*), 트리폴리움 종(*Trifolium* sp.), 엘라에시스 구이니이니스(*Elaeisis guineensis*), 니코티아나 벤타미아나(*Nicotiana benthamiana*), 호르데움 불가레(*Hordeum vulgare*), 루피누스 앙구스티폴리우스(*Lupinus angustifolius*), 오리자 사티바(*Oryza sativa*), 오리자 글라베리마(*Oryza glaberrima*), 카멜리나 사티바(*Camelina sativa*), 또는 크람베 아비시니카(*Crambe abyssinica*)를 포함한다. 하나의 실시태양에서, 상기 식물은 브라시카 종 식물, 씨. 사티바 식물 또는 지. 맥스 (대두) 식물이다. 상기 식물은 브라시카 종 또는 카멜리나 사티바이다. 하나의 실시태양에서, 상기 유지종자 식물은 캐놀라, 비. 윤채아, 글리시네 맥스, 카멜리나 사티바 또는 아라비도프시스 탈리아나 식물이다. 대안적인 실시태양에서, 상기 유지종자 식물은 에이. 탈리아나 이외 및/또는 씨. 사티바 이외이다. 하나의 실시태양에서, 상기 유지종자 식물은 지. 맥스 (대두) 이외의 식물이다. 상기 식물은 바람직하게는 브라시카 종 또는 카멜리나 사티바이다. 하나의 실시태양에서, 상기 유지종자 식물은 필드에 있거나 예를 들어 실시예 1에 기재된 바와 같은 표준 조건에서 필드에서 재배하거나 온실에서 재배하였다.

[0222] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 방법에 사용되거나, 본 발명의 세포, 또는 식물 또는 그의 부분에 존재하는 하나 이상의 불포화효소들은 아실-CoA 기질을 사용할 수 있다. 바람직한 실시태양에서, $\Delta 6$ -불포화효소, $\Delta 5$ -불포화효소 및 $\Delta 8$ -불포화효소(존재하는 경우) 중 하나 이상은 아실-CoA 기질을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 i) $\Delta 6$ -불포화효소 및 $\Delta 5$ -불포화효소 또는 ii) $\Delta 5$ -불포화효소 및 $\Delta 8$ -불포화효소는 각각 아실-CoA 기질을 사용할 수 있다. 하나의 실시태양에서, $\Delta 12$ -불포화효소 및/또는 $\omega 3$ -불포화효소는 아실-CoA 기질을 사용할 수 있다. 상기 아실-CoA 기질은 바람직하게는 $\Delta 6$ -불포화효소의 경우 ALA-CoA, $\Delta 5$ -불포화효소의 경우 ETA-CoA, $\Delta 8$ -불포화효소의 경우 ETrA-CoA, $\Delta 12$ -불포화효소의 경우 올레오일-CoA, 또는 $\omega 3$ -불포화효소의 경우 LA-CoA, GLA-CoA, 및 ARA-CoA 중의 하나 이상이다.

[0223] 하나의 실시태양에서, 상기 식물의 성숙한, 수확된 종자는 종자 그램당 적어도 약 28 mg, 바람직하게는 종자 그램당 적어도 약 32 mg, 종자 그램당 적어도 약 36 mg, 종자 그램당 적어도 약 40 mg, 보다 바람직하게는 종자 그램당 적어도 약 44 mg, 또는 종자 그램당 적어도 약 48 mg, 종자 그램당 적어도 약 80 mg, 또는 종자 그램당 약 30mg 내지 약 80mg의 DPA 함량을 갖는다.

[0224] 추가의 태양에서, 본 발명은 DPA를 포함하는 종자를 생산할 수 있는 브라시카 나푸스(*Brassica napus*), 브라시카 윤채아(*Brassica juncea*) 또는 카멜리나 사티바(*Camelina sativa*) 식물로, 식물의 성숙한, 수확된 종자가 종자 그램당 적어도 약 28 mg, 바람직하게는 종자 그램당 적어도 약 32 mg, 종자 그램당 적어도 약 36 mg, 종자 그램당 적어도 약 40 mg, 보다 바람직하게는 종자 그램당 적어도 약 44 mg, 또는 종자 그램당 적어도 약 48 mg, 종자 그램당 적어도 약 80 mg, 또는 종자 그램당 약 30 mg 내지 약 80mg의 DPA 함량을 갖는 식물을 제공한다.

[0225] 또 다른 태양에서, 본 발명은 본 발명에 정의된 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 본 발명의 식물의 식물 세포를 제공한다.

[0226] 또한, 하기의 특징들 중 하나 이상을 갖는 식물 부분, 바람직하게는 종자, 또는 재조합 세포, 예컨대 미생물 세포를 제공한다:

[0227] i) 본 발명의 식물로부터 유래됨,

- [0228] ii) 본 발명에서 정의된 바와 같은 지질을 포함함, 또는
- [0229] iii) 본 발명의 방법에서 사용될 수 있음.
- [0230] 또 다른 태양에서, 본 발명은 DPA를 포함하고, 약 4 내지 약 15 중량%, 바람직하게는 약 6 내지 약 8 중량% 또는 약 4 내지 약 8 중량%, 더욱 바람직하게는 약 4 내지 약 6 중량%의 수분 함량을 갖는 성숙한, 수확된 브라시카 나푸스, 브라시카 윤채아 또는 카멜리나 사티바 종자로, 상기 종자의 DPA 함량이 종자 그램당 적어도 약 28 mg, 바람직하게는 종자 그램당 적어도 약 32 mg, 종자 그램당 적어도 약 36 mg, 종자 그램당 적어도 약 40 mg, 보다 바람직하게는 종자 그램당 적어도 약 44 mg, 또는 종자 그램당 적어도 약 48 mg, 종자 그램당 적어도 약 80 mg, 또는 종자 그램당 약 30 mg 내지 약 80mg인 종자를 제공한다.
- [0231] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 세포, 본 발명의 유지종자 식물, 본 발명의 브라시카 나푸스, 비. 윤채아 또는 카멜리나 사티바 식물, 본 발명의 식물 부분, 또는 본 발명의 종자를, 본 발명에서 정의된 특징들 중 하나 이상 또는 전부를 포함하는 추출된 지질의 생성에 사용할 수 있다.
- [0232] 또 다른 태양에서, 본 발명은 본 발명의 추출된 지질을 생성하기 위해 사용될 수 있는 식물 또는 세포의 생성 방법으로,
- [0233] a) 복수의 식물 또는 재조합 세포, 예컨대 미생물 세포로부터 하나 이상의 식물 부분, 예컨대 종자, 또는 재조합 세포, 예컨대 미생물 세포에 의해 생성된 DPA의 수준을 평가하고, 이때 각각의 식물 또는 재조합 세포, 예컨대 미생물 세포는 하기 효소 세트 중 하나를 암호화하는 하나 이상의 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함하고;
- [0234] i) ω 3-불포화효소, Δ 6-불포화효소, Δ 5-불포화효소, Δ 6-신장효소 및 Δ 5-신장효소,
- [0235] ii) Δ 15-불포화효소, Δ 6-불포화효소, Δ 5-불포화효소, Δ 6-신장효소 및 Δ 5-신장효소,
- [0236] iii) Δ 12-불포화효소, Δ 6-불포화효소, Δ 5-불포화효소, Δ 6-신장효소 및 Δ 5-신장효소,
- [0237] iv) Δ 12-불포화효소, ω 3-불포화효소 또는 Δ 15-불포화효소, Δ 6-불포화효소, Δ 5-불포화효소, Δ 6-신장효소 및 Δ 5-신장효소,
- [0238] v) ω 3-불포화효소, Δ 8-불포화효소, Δ 5-불포화효소, Δ 9-신장효소 및 Δ 5-신장효소,
- [0239] vi) Δ 15-불포화효소, Δ 8-불포화효소, Δ 5-불포화효소, Δ 9-신장효소 및 Δ 5-신장효소,
- [0240] vii) Δ 12-불포화효소, Δ 8-불포화효소, Δ 5-불포화효소, Δ 9-신장효소 및 Δ 5-신장효소,
- [0241] viii) Δ 12-불포화효소, ω 3-불포화효소 또는 Δ 15-불포화효소, Δ 8-불포화효소, Δ 5-불포화효소, Δ 9-신장효소 및 Δ 5-신장효소,
- [0242] ix) ω 3-불포화효소, Δ 6-불포화효소, Δ 5-불포화효소, Δ 6-신장효소 및 Δ 5-신장효소,
- [0243] x) Δ 15-불포화효소, Δ 6-불포화효소, Δ 5-불포화효소, Δ 6-신장효소 및 Δ 5-신장효소, 또는
- [0244] xi) Δ 12-불포화효소, Δ 6-불포화효소, Δ 5-불포화효소, Δ 6-신장효소 및 Δ 5-신장효소,
- [0245] 각각의 폴리뉴클레오티드가 상기 식물 부분의 세포 또는 재조합 세포에서 상기 폴리뉴클레오티드의 발현을 유도할 수 있는 하나 이상의 프로모터에 작동적으로 연결되고,
- [0246] b) 상기 부분 중 하나 이상에서 본 발명의 추출된 식물 지질 또는 세포 지질을 생성하기 위해 사용될 수 있는 복수개의 식물 또는 재조합 세포로부터 식물 또는 재조합 세포를 확인하고,
- [0247] c) 임의로, 상기 확인된 식물 또는 재조합 세포로부터 자손 식물 또는 재조합 세포, 또는 그로부터의 종자를 생성하는 것을
- [0248] 포함하는 방법을 제공한다.
- [0249] 하나의 실시태양에서, 상기 식물 또는 재조합 세포는 본 발명에 정의된 LPAAT를 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 추가로 포함한다.
- [0250] 바람직하게는, 상기 자손 식물은 상기 확인된 식물로부터 제거된 적어도 2세대 또는 3세대이며, 바람직하게는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드에 대해 동종접합성이다. 더욱 바람직하게는, 하나 이상의 폴리뉴클레오티드는 단일 삽입 좌위에서만 자손 식물에 존재한다. 즉, 본 발명은 복수의 형질전환된 후보 식물 또는 종자로부터 식

물 또는 이로부터의 종자를 확인하기 위한 스크리닝 방법으로서 사용될 수 있는 이러한 방법으로서, 상기 확인된 식물 또는 이의 자손 식물이, 바람직하게는 이의 종자 내에서, 본 발명의 지질을 생성하는 방법을 제공한다. 이러한 식물 또는 자손 식물 또는 이의 종자는 이것이, 특히 지정된 DPA 수준을 갖는, 본 발명의 지질을 생성하는 경우 선택되거나 본 발명의 지질을 생성하지 않는 경우 선택되지 않는다.

- [0251] 하나의 실시태양에서, 본 발명에서 정의된 세포, 예컨대 미생물 세포, 또는 식물 또는 그의 부분에 존재하는 외인성 폴리뉴클레오티드(들)는 상기 세포, 식물 또는 식물 부분, 예컨대 종자의 계놈내로 안정적으로 통합된다. 바람직하게는, 외인성 폴리뉴클레오티드(들)는 계놈의 단일 좌위에서 세포, 식물 또는 식물 부분, 예컨대 종자의 계놈내로 안정적으로 통합되며, 바람직하게는 상기 삽입에 대해 동종접합성이다. 더욱 바람직하게는, 식물, 식물 부분 또는 종자는 하나 이상의 T-DNA 분자를 제외하고 외인성 폴리뉴클레오티드가 없는 것을 추가적으로 특징으로 한다. 즉, 외인성 벡터 서열이 T-DNA 서열을 제외하고 계놈 내로 통합되지 않는다.
- [0252] 하나의 실시태양에서, a) 단계 전에 상기 방법은 하나 이상의 외인성 폴리뉴클레오티드를 식물의 하나 이상의 세포 내로 도입시키는 것을 포함한다.
- [0253] 또한, 본 발명의 방법을 사용하여 생성된 식물, 및 이러한 식물의 종자가 제공된다.
- [0254] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 식물은 수술 및 암술 수정능력이 둘 모두 있으며, 바람직하게는 상응하는 야생형 식물 대비 적어도 70%이거나, 바람직하게는 거의 동등한 수술 및 암술 수정능력 둘 모두의 수준을 갖는다. 하나의 실시태양에서, 본 발명의 식물, 또는 본 발명의 종자로부터 생성된 식물에 의해 생성된 꽃가루는 생존력 염색으로 염색하여 측정되었을 때 90-100% 생존성이다. 예를 들어, 꽃가루 생존력은 실시예 1에 기재된 바와 같이 평가될 수 있다.
- [0255] 또 다른 태양에서, 본 발명은 종자의 생성 방법으로,
- [0256] a) 본 발명의 식물, 또는 본 발명의 부분을 생산하는 식물을, 바람직하게는 적어도 1000 개 또는 2000개 또는 3000개의 상기와 같은 식물의 집단의 부분으로서 필드에서, 또는 표준 재식 밀도로 심어진 적어도 1 헥타아르 또는 2 헥타아르 또는 3 헥타아르의 면적에서, 대안적으로 표준 조건 하의 온실에서 재배하고,
- [0257] b) 상기 식물 또는 식물들로부터 종자를 수확하고,
- [0258] c) 임의로, 상기 종자로부터 지질을 추출하여, 바람직하게는 적어도 60 kg 또는 70 kg 또는 80 kg DPA/헥타아르의 전체 DPA 수율로 오일을 생산함
- [0259] 을 포함하는 방법을 제공한다.
- [0260] 하나의 실시태양에서, 하기의 특징들 중 하나 이상을 갖는 본 발명의, 식물, 식물 세포, 식물 부분 또는 종자 또는 재조합 세포를 제공한다:
- [0261] i) 본 발명에 정의된 바와 같은 오일을 포함, 또는
- [0262] ii) 상기 식물 부분 또는 종자 또는 재조합 세포가 본 발명의 방법에 사용될 수 있음.
- [0263] 예를 들어, 상기 종자는 본 발명의 식물을 생성하는데 사용될 수 있다. 상기 식물은 예를 들어 실시예 1에 기재된 바와 같이, 필드에서 또는 표준 조건 하의 온실에서 재배할 수 있다.
- [0264] 또 다른 태양에서, 본 발명은 본 발명의 방법을 사용하여, 본 발명의 세포, 본 발명의 유지종자 식물, 본 발명의 브라시카 종, 브라시카 나푸스, 비. 윤채아, 지. 맥스 또는 카멜리나 사티바 식물, 본 발명의 식물 부분, 본 발명의 종자, 또는 본 발명의 식물, 식물 세포, 식물 부분 또는 종자에 의해 생산되거나 또는 이로부터 수득되는 지질 또는 오일을 제공한다. 바람직하게는, 상기 지질 또는 오일은 오염물질, 예컨대 핵산 (DNA 및/또는 RNA), 단백질 및/또는 탄수화물, 또는 색소, 예컨대 클로로필을 제거하기 위하여 정제된다. 상기 지질 또는 오일은 또한 예를 들어 유리 지방산 (FFA) 또는 인지질을 제거하여 TAG의 비율을 풍부하게 하기 위하여 정제될 수 있다.
- [0265] 하나의 실시태양에서, 상기 지질 또는 오일은 유지종자로부터 오일의 추출에 의해 수득된다. 유지종자로부터의 오일의 예는, 이에 제한되는 것은 아니나, 캐놀라 오일(브라시카 나푸스, 브라시카 라파 아종(*Brassica rapa* ssp.)), 머스타드 오일(브라시카 윤채아), 다른 브라시카 오일, 해바라기 오일(헬리안투스 안누우스), 아마인유(리눅스 유시타티시프), 대두 오일(글리시네 맥스), 잇꽃 오일(카르타무스 텅크토리우스), 옥수수 오일(제아 메이스), 담배 오일(니코티아나 타바쿰), 땅콩 오일(아라키스 하이포가에아(*Arachis hypogaea*)), 팜 오일, 면실유

(고시피움 히르수툼), 코코넛 오일(코코스 누시페라(*Cocos nucifera*)), 아보카도 오일(페르세아 아메리카나(*Persea americana*)), 올리브 오일(올레아 유로파에아(*Olea europaea*)), 캐슈 오일(아나카르디움 옥시덴탈레(*Anacardium occidentale*)), 마카다미아 오일(마카다미아 인테르그리폴리아(*Macadamia integrifolia*)), 아몬드 오일(프루누스 아미그달루스(*Prunus amygdalus*)) 또는 아라비도프시스 종자유(아라비도프시스 탈리아나)를 포함한다.

[0266] 하나의 실시태양에서, 본 발명의, 또는 이에 사용되는 세포(재조합 세포)는 미생물 세포, 예컨대 발효에 적합한 세포, 바람직하게는 중량 기준으로 적어도 25%의 수준으로 트라이아실글리세롤을 축적할 수 있는 유지성 미생물 세포이다. 바람직한 발효 방법은 당업계에 잘 알려져 있는 혐기성 발효 방법이다. 적합한 발효하는 세포, 전형적으로 미생물은 당, 예컨대 글루코스 또는 말토스를 원하는 지방산으로 직접적으로 또는 간접적으로 발효, 즉 전환시킬 수 있다. 발효하는 미생물의 예로는 진균 생물, 예컨대 효모를 포함한다. 본 발명에서 사용되는 바와 같은, "효모"는 사카로마이세스 종(*Saccharomyces* spp.), 사카로마이세스 세레비지아에(*Saccharomyces cerevisiae*), 사카로마이세스 칼베르젠시스(*Saccharomyces carlbergensis*), 칸디다 종(*Candida* spp.), 클루베로마이세스 종(*Kluveromyces* spp.), 피키아 종(*Pichia* spp.), 한세놀라 종(*Hansenula* spp.), 트리코데마 종(*Trichoderma* spp.), 리포마이세프 스타키(*Lipomyces starkey*), 및 바람직하게는 야로위아 리포리티카(*Yarrowia lipolytica*)를 포함한다.

[0267] 또 다른 태양에서, 본 발명은 본 발명의 방법을 사용하여, 본 발명의 세포, 본 발명의 유지종자 식물, 본 발명의 브라시카 종, 브라시카 나푸스, 비. 윤채아, 지. 맥스 또는 카멜리나 사티바 식물, 본 발명의 식물 부분, 본 발명의 종자, 또는 본 발명의 식물, 식물 세포, 식물 부분 또는 종자에 의해 생산되거나 또는 이로부터 수득되는 지방산을 제공한다. 바람직하게는, 상기 지방산은 DPA이다. 상기 지방산은 본 발명에 기재된 바와 같은 지방산 조성을 갖는 지방산의 혼합물일 수 있거나 상기 지방산, 바람직하게는 DPA가 상기 혼합물의 적어도 40% 또는 적어도 90%의 지방산 함량을 포함하도록 풍부해질 수 있다. 하나의 실시태양에서, 상기 지방산은 비-에스테르화된 것일 수 있다. 대안적으로, 상기 지방산은 예컨대 메틸, 에틸, 프로필 또는 부틸기로 에스테르화된 것이다.

[0268] 또한, 본 발명의 종자로부터 수득되거나 본 발명의 식물로부터 수득되는 종자박(seedmeal)이 제공된다. 바람직한 종자박은 이에 제한되는 것은 아니나, 브라시카 종, 브라시카 나푸스, 비. 윤채아, 카멜리나 사티바 또는 글리시네 맥스 종자박을 포함한다. 하나의 실시태양에서, 상기 종자박은 본 발명에서 정의된 외인성 폴리뉴클레오티드(들) 및/또는 유전적 구조물을 포함한다. 바람직한 실시태양에서, 상기 종자박은 종자박이 수득된 종자에서 생산된 일부 지질 또는 오일이 잔류하나, 대부분의 지질 또는 오일이 추출된 후 낮은 수준(예를 들어, 2 중량% 미만)으로 잔류한다. 상기 종자박은 동물 사료 또는 식품 생산의 성분으로서 사용될 수 있다.

[0269] 또 다른 태양에서, 본 발명은 본 발명의 지질 또는 오일, 본 발명의 지방산, 본 발명에 따른 세포, 본 발명의 유지종자 식물, 본 발명의 브라시카 종, 브라시카 나푸스, 비. 윤채아, 글리시네 맥스 또는 카멜리나 사티바 식물, 본 발명의 식물 부분, 본 발명의 종자, 또는 본 발명의 종자박 중 하나 이상을 포함하는 조성물을 제공한다. 하나의 실시태양에서, 상기 조성물은 약학, 식품 또는 농업적 사용에 적합한 캐리어, 종자 처리 혼합물, 비료, 또 다른 식품 또는 사료 성분, 또는 첨가 단백질 또는 비타민을 포함한다.

[0270] 또한, 본 발명의 지질 또는 오일, 본 발명의 지방산, 본 발명에 따른 세포, 본 발명의 유지종자 식물, 본 발명의 브라시카 종, 브라시카 나푸스, 비. 윤채아, 글리시네 맥스 또는 카멜리나 사티바 식물, 본 발명의 식물 부분, 본 발명의 종자, 본 발명의 종자박, 또는 본 발명의 조성물 중 하나 이상을 포함하는 식료품(feedstuff), 화장품 또는 화학제가 제공된다. 바람직한 식료품은 본 발명의 지질 또는 오일을 포함하는 영아용 조제유(infant formula)이다.

[0271] 또 다른 태양에서, 본 발명의 지질 또는 오일, 본 발명의 지방산, 본 발명에 따른 세포, 본 발명의 유지종자 식물, 본 발명의 브라시카 종, 브라시카 나푸스, 비. 윤채아, 글리시네 맥스 또는 카멜리나 사티바 식물, 본 발명의 식물 부분, 본 발명의 종자, 본 발명의 종자박, 또는 본 발명의 조성물 중 하나 이상을 적어도 하나의 다른 식품 성분과 혼합함을 포함하는, 식료품, 바람직하게는 영아용 조제유의 제조 방법이 제공된다. 상기 방법은 블렌딩, 쿡킹, 베이킹, 압출, 유화 또는 달리 식료품을 배합함, 또는 식료품을 포장함, 또는 식료품 중 지질 또는 오일의 양을 분석함의 단계를 포함할 수 있다.

[0272] 또 다른 태양에서, 본 발명은 PUFA, 바람직하게는 DPA로부터 이익을 얻는 병의 치료 또는 예방 방법으로서, 상기 방법이 본 발명의 지질 또는 오일, 본 발명의 지방산, 본 발명에 따른 세포, 본 발명의 유지종자 식물, 본 발명의 브라시카 종, 브라시카 나푸스, 비. 윤채아, 글리시네 맥스 또는 카멜리나 사티바 식물, 본 발명의 식물

부분, 본 발명의 종자, 본 발명의 종자박, 본 발명의 조성물, 또는 본 발명의 식료품 중 하나 이상을 대상에게 투여함을 포함하는 방법을 제공한다. 바람직한 실시태양에서, PUFA는 PUFA의 에틸 에스테르를 포함하는 약학적 조성물의 형태로 투여된다. 상기 대상은 인간 또는 인간을 제외한 동물일 수 있다.

[0273] PUFA로부터 이익을 얻는 병의 예로는, 이에 제한되는 것은 아니나 상승된 혈청 트라이글리세라이드 수준, 상승된 혈청 콜레스테롤 수준, 예컨대 상승된 LDL 콜레스테롤 수준, 심부정맥, 혈관형성, 염증, 천식, 건선, 골다공증, 신장결석, AIDS, 다발성 경화증, 류마티스성 관절염, 크론병, 정신분열증, 암, 태아알콜 증후군, 주의력 결핍 과잉행동 장애, 낭성 섬유증, 페닐케톤뇨증, 단극성 우울증, 공격성 적대감, 부신백질이영양증, 관상동맥 심장병, 고혈압, 당뇨병, 비만증, 알츠하이머병, 만성 폐쇄성 폐 질환, 궤양성 대장염, 혈관성형술후 재협착증, 습진, 높은 혈압, 혈소판 응집, 위장출혈, 자궁내막증, 월경전 증후군, 근육통성 뇌척수염, 바이러스 감염후 만성 피로, 또는 눈병을 포함한다.

[0274] 또한, PUFA, 바람직하게는 DPA로부터 이익을 얻는 병의 치료 또는 예방을 위한 약제의 제조를 위한 본 발명의 지질 또는 오일, 본 발명의 지방산, 본 발명에 따른 세포, 본 발명의 유지종자 식물, 본 발명의 브라시카 종, 브라시카 나푸스, 비. 윤채아, 글리시네 맥스 또는 카멜리나 사티바 식물, 본 발명의 식물 부분, 본 발명의 종자, 본 발명의 종자박, 본 발명의 조성물, 또는 본 발명의 식료품 중 하나 이상의 용도가 제공된다.

[0275] 상기 약제의 제조는 본 발명에 개시된 바와 같은 병의 치료를 위해, 본 발명의 오일을 약학적으로 허용 가능한 담체와 혼합함을 포함할 수 있다. 상기 방법은 먼저 상기 오일의 정제 및/또는 트랜스에스테르화, 및/또는 DPA의 수준을 증가시키기 위한 상기 오일의 분별화를 포함할 수 있다. 특정한 실시태양에서, 상기 방법은 케놀라유와 같은 지질 또는 오일을, 상기 오일 중의 지방산을 알킬 에스테르, 예를 들어 메틸 또는 에틸 에스테르로 전환시키기 위해 처리함을 포함한다. 추가의 처리, 예를 들어 분별화 또는 증류를 적용시켜 상기 지질 또는 오일에 DPA를 농축시킬 수도 있다. 바람직한 실시태양에서, 상기 약제는 DPA의 에틸 에스테르를 포함한다. 훨씬 더 바람직한 실시태양에서, 상기 약제 중의 DPA의 에틸 에스테르의 수준은 30% 내지 50%, 또는 적어도 80% 또는 적어도 약 85% 또는 적어도 90% 또는 적어도 약 95%이다. 상기 약제는, 예를 들어 상기 약제 중에 전체 지방산 함량의 30% 내지 50%, 또는 적어도 90%의 EPA의 에틸 에스테르를 추가로 포함할 수 있다. 상기과 같은 약제는 본 발명에 개시된 바와 같은 의학적 상태의 치료를 위해 인간 또는 동물 환자에게 투여하기에 적합하다.

[0276] 또 다른 태양에서, 본 발명은 본 발명의 종자를 수득하고, 상기 수득된 종자를 재정적 이득을 위해 거래함을 포함하는, 종자의 거래 방법을 제공한다.

[0277] 하나의 실시태양에서, 상기 종자를 수득함은 본 발명의 식물을 재배하고/하거나 상기 식물로부터 종자를 수확함을 포함한다.

[0278] 또 다른 실시태양에서, 상기 종자를 수득함은 또한 상기 종자를 용기에 넣고/넣거나 상기 종자를 보관함을 포함한다.

[0279] 추가의 실시태양에서, 상기 종자를 수득함은 상기 종자를 다른 장소로 운반함을 또한 포함한다.

[0280] 더욱 또 다른 실시태양에서, 상기 방법은 상기 종자를 거래후 다른 장소로 운반함을 또한 포함한다.

[0281] 추가의 실시태양에서, 상기 거래를 컴퓨터와 같은 전자 수단을 사용하여 수행한다.

[0282] 더욱 추가의 태양에서, 본 발명은

[0283] a) 본 발명의 종자를 포함하는 식물의 지상부를 베어내고, 줄지어 넣어 놓고/놓거나 거둬 들이고,

[0284] b) 상기 식물의 상기 부분을 타작하고/하거나 키질하여 상기 식물 부분의 나머지로부터 종자를 분리시키고,

[0285] c) 상기 단계 b)에서 분리된 종자를 체질하고/하거나 분류하고, 상기 체질되고/되거나 분류된 종자를 통에 담아, 종자의 저장통을 생성시킴

[0286] 을 포함하는, 종자의 저장통의 생산 방법을 제공한다.

[0287] 하나의 실시태양에서, 적합한 경우, 본 발명의, 또는 본 발명에 유용한, 지질 또는 오일, 바람직하게는 종자유는 실시예 섹션의 표에 제공된 것들의 지방 수준을 갖는다.

[0288] 본 발명의 임의의 실시태양을, 달리 구체적으로 서술되지 않는 한 임의의 다른 실시태양들에 준용할 것이다.

[0289] 본 발명은, 단지 예시를 목적으로 의도된 본 발명에 개시된 특정한 실시태양들로 범위가 제한되지 않는다. 작

용상 동등한 생성물, 조성물 및 방법은 본 발명에 개시된 바와 같이, 명백하게 본 발명의 범위내에 있다.

[0290] 본 명세서 전체를 통해, 달리 구체적으로 서술되거나 문맥상 달리 필요하지 않는 한, 단일의 단계, 물질의 조성물, 단계들의 그룹 또는 물질 조성물의 그룹에 대한 언급은 하나 및 복수(즉 하나 이상)의 상기 단계들, 물질의 조성물들, 단계들의 그룹들 또는 물질의 조성물들의 그룹을 포함하는 것으로 간주될 것이다.

[0291] 이하, 본 발명을 첨부된 도면을 참조하여 다음과 같은 비제한적인 실시예에 의거하여 설명한다.

도면의 간단한 설명

[0292] 도 1은 호기성 DPA 생합성 경로이다.

도 2는 pJP3416-GA7의 좌측 및 우측 경계 사이의 T-DNA 삽입 영역의 지도이다. RB는 우측 경계를 나타내고; LB, 좌측 경계; TER, 전사 종결자/폴리아데닐화 영역; PRO, 프로모터를 나타내고; 암호화 영역은 화살표 위에 나타내고, 프로모터 및 종결자는 화살표 아래에 나타낸다. Micpu-Δ6D, 마이크로모나스 푸실라(*Micromonas pusilla*) Δ6-불포화효소; Pyrco-Δ6E, 피라미모나스 코르다타(*Pyramimonas cordata*) Δ6-신장효소; Pavsa-Δ5D, 파블로바 살리나(*Pavlova salina*) Δ5-불포화효소; Picpa-ω3D, 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*) ω3-불포화효소; Pavsa-Δ4D, 피 살리나 Δ4-불포화효소; Lack1-Δ12D, 라칸세아 클루이베리(*Lachancea kluyveri*) Δ12-불포화효소; Pyrco-Δ5E, 피라미모나스 코르다타 Δ5-신장효소. NOS는 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*) 노팔린 신타제 전사 종결자/폴리아데닐화 영역을 나타내고; FP1, 브라시카 나푸스 절두된 나핀 프로모터; FAE1, 아라비도프시스 탈리아나 FAE1 프로모터; Lectin, 글리신 맥스 렉틴 전사 종결자/폴리아데닐화 영역을 나타내고; Cn11 및 Cn12는 리눅 유시타티시움 콘리닌1 또는 콘리닌2 프로모터 또는 종결자를 나타낸다. MAR은 니코티아나 타바쿰으로부터의 Rb7 기질 부착 영역을 나타낸다.

도 3 (A) 고리 및 측쇄 넘버링을 갖는 기본적인 피토스테롤 구조, (B) 상기 피토스테롤 중 일부의 화학 구조이다.

도 4 pJP3662의 좌측 및 우측 경계 사이의 T-DNA 삽입 영역의 지도이다. RB는 우측 경계를 나타내고; LB, 좌측 경계; TER, 전사 종결자/폴리아데닐화 영역; PRO, 프로모터를 나타내고; 암호화 영역은 화살표 위에 나타내고, 프로모터 및 종결자는 화살표 아래에 나타낸다. Micpu-Δ6D, 마이크로모나스 푸실라(*Micromonas pusilla*) Δ6-불포화효소; Pyrco-Δ6E, 피라미모나스 코르다타(*Pyramimonas cordata*) Δ6-신장효소; Pavsa-Δ5D, 파블로바 살리나(*Pavlova salina*) Δ5-불포화효소; Picpa-ω3D, 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*) ω3-불포화효소; Lack1-Δ12D, 라칸세아 클루이베리(*Lachancea kluyveri*) Δ12-불포화효소; Pyrco-Δ5E, 피라미모나스 코르다타 Δ5-신장효소. NOS는 아그로박테리움 튜메파시엔스 노팔린 신타제 전사 종결자/폴리아데닐화 영역을 나타내고; FP1, 브라시카 나푸스 절두된 나핀 프로모터; FAE1, 아라비도프시스 탈리아나 FAE1 프로모터; Lectin, 글리신 맥스 렉틴 전사 종결자/폴리아데닐화 영역을 나타내고; Cn11은 리눅 유시타티시움 콘리닌1 프로모터 또는 종결자를 나타낸다. MAR은 니코티아나 타바쿰(*Nicotiana tabacum*)으로부터의 Rb7 기질 부착 영역을 나타낸다.

서열목록에 대한 설명

서열번호 1 - pJP3416-GA7 뉴클레오티드 서열.

서열번호 2 - pGA7- mod_B 뉴클레오티드 서열.

서열번호 3 - 식물에서 라칸세아 클루이베리 Δ12 불포화효소의 발현을 위한 코돈-최적화된 개방 판독 프레임.

서열번호 4 - 라칸세아 클루이베리 Δ12-불포화효소.

서열번호 5 - 식물에서 피키아 파스토리스 ω3 불포화효소의 발현을 위한 코돈-최적화된 개방 판독 프레임.

서열번호 6 - 피키아 파스토리스 ω3 불포화효소.

서열번호 7 - 마이크로모나스 푸실라 Δ6-불포화효소를 암호화하는 개방 판독 프레임.

서열번호 8 - 식물에서 마이크로모나스 푸실라 Δ6-불포화효소의 발현을 위한 코돈-최적화된 개방 판독 프레임.

서열번호 9 - 마이크로모나스 푸실라 Δ6-불포화효소.

서열번호 10 - 오스트레오코쿠스 루시마리누스(*Ostreococcus lucimarinus*) Δ6-불포화효소를 암호화하는 개방 판독 프레임.

- 서열번호 11 - 식물에서 오스트레오코커스 루시마리누스 $\Delta 6$ -불포화효소의 발현을 위한 코돈-최적화된 개방 판독 프레임.
- 서열번호 12 - 오스트레오코커스 루시마리누스 $\Delta 6$ -불포화효소.
- 서열번호 13 - 오스트레오코커스 타우리 $\Delta 6$ -불포화효소.
- 서열번호 14 - 피라미모나스 코르다타 $\Delta 6$ -신장효소를 암호화하는 개방 판독 프레임.
- 서열번호 15 - 식물에서 피라미모나스 코르다타 $\Delta 6$ -신장효소의 발현을 위한 코돈-최적화된 개방 판독 프레임 (3' 단부에서 절두되었으며 작용성 신장효소를 암호화한다).
- 서열번호 16 - 피라미모나스 코르다타 $\Delta 6$ -신장효소.
- 서열번호 17 - 절두된 피라미모나스 코르다타 $\Delta 6$ -신장효소.
- 서열번호 18 - 파블로바 살리나 $\Delta 5$ -불포화효소를 암호화하는 개방 판독 프레임.
- 서열번호 19 - 식물에서 파블로바 살리나 $\Delta 5$ -불포화효소의 발현을 위한 코돈-최적화된 개방 판독 프레임.
- 서열번호 20 - 파블로바 살리나 $\Delta 5$ -불포화효소.
- 서열번호 21 - 피라미모나스 코르다타 $\Delta 5$ -불포화효소를 암호화하는 개방 판독 프레임.
- 서열번호 22 - 피라미모나스 코르다타 $\Delta 5$ -불포화효소.
- 서열번호 23 - 피라미모나스 코르다타 $\Delta 5$ -신장효소를 암호화하는 개방 판독 프레임.
- 서열번호 24 - 식물에서 피라미모나스 코르다타 $\Delta 5$ -신장효소의 발현을 위한 코돈-최적화된 개방 판독 프레임.
- 서열번호 25 - 피라미모나스 코르다타 $\Delta 5$ -신장효소.
- 서열번호 26 - 파블로바 살리나 $\Delta 4$ -불포화효소를 암호화하는 개방 판독 프레임.
- 서열번호 27 - 식물에서 파블로바 살리나 $\Delta 4$ -불포화효소의 발현을 위한 코돈-최적화된 개방 판독 프레임.
- 서열번호 28 - 파블로바 살리나 $\Delta 4$ -불포화효소.
- 서열번호 29 - 아이소크리시스 갈바나 $\Delta 9$ -신장효소.
- 서열번호 30 - 식물에서 에밀리아니아 혁슬레이(*Emiliania huxleyi*) $\Delta 9$ -신장효소의 발현을 위한 코돈-최적화된 개방 판독 프레임.
- 서열번호 31 - 에밀리아니아 혁슬레이 CCMP1516 $\Delta 9$ -신장효소.
- 서열번호 32 - 파블로바 핑구이스 $\Delta 9$ -신장효소를 암호화하는 개방 판독 프레임.
- 서열번호 33 - 파블로바 핑구이스 $\Delta 9$ -신장효소.
- 서열번호 34 - 파블로바 살리나 $\Delta 9$ -신장효소를 암호화하는 개방 판독 프레임.
- 서열번호 35 - 파블로바 살리나 $\Delta 9$ -신장효소.
- 서열번호 36 - 파블로바 살리나 $\Delta 8$ -불포화효소를 암호화하는 개방 판독 프레임.
- 서열번호 37 - 파블로바 살리나 $\Delta 8$ -불포화효소.
- 서열번호 38 - V2 바이러스 억제인자.
- 서열번호 39 - V2 바이러스 억제인자를 암호화하는 개방 판독 프레임.
- 서열번호 40 - 아라비도프시스 탈리아나 LPAAT2.
- 서열번호 41 - 림난테스 알바(*Limnanthes alba*) LPAAT.
- 서열번호 42 - 사카로마이세스 세레비지아에(*Saccharomyces cerevisiae*) LPAAT.
- 서열번호 43 - 마이크로모나스 푸실라 LPAAT.

서열번호 44 - 모르티에렐라 알피나(*Mortierella alpina*) LPAAT.

서열번호 45 - 브라시사 나푸스 LPAAT.

서열번호 46 - 브라시카 나푸스 LPAAT.

서열번호 47 - 피토프토라 인페스탄스(*Phytophthora infestans*) ω3 불포화효소.

서열번호 48 - 탈라시오시라 슈도나나(*Thalassiosira pseudonana*) ω3 불포화효소.

서열번호 49 - 피티움 이레굴라레 ω3 불포화효소.

서열번호 50 내지 58 - 올리고뉴클레오티드 프라이머/프로브.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0293] 일반적인 기법 및 정의

[0294] 본 발명에 사용되는 모든 과학기술 용어들은 당해 분야(예를 들어 세포 배양, 분자 유전학, 지방산 합성, 트랜스제닉 식물, 재조합 세포, 단백질 화학, 및 생화학)의 통상적인 숙련가에 의해 통상적으로 이해되는 바와 동일한 한 의미를 갖는 것으로 간주될 것이다.

[0295] 달리 나타내지 않는 한, 본 발명에 사용되는 단백질, 세포 배양, 및 면역학적 기법은 당해 분야의 숙련가들에게 널리 공지된 표준 과정이다. 상기와 같은 기법은 하기와 같은 출처들에서 문헌 전체를 통해 개시되고 설명된다: J. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley and Sons (1984), J. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989), T.A. Brown (editor), Essential Molecular Biology: A Practical Approach, Volumes 1 and 2, IRL Press (1991), D.M. Glover and B.D. Hames (editors), DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes 1-4, IRL Press (1995 and 1996), F.M. Ausubel et al. (editors), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988, including all updates until present), Ed Harlow and David Lane (editors), Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory, (1988), and J.E. Coligan et al. (editors), Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons (현재까지의 모든 업데이트들 포함).

[0296] "및/또는", 예를 들어 "X 및/또는 Y"란 용어는 "X 및 Y" 또는 "X 또는 Y"를 의미하는 것으로 이해될 것이며 이들 둘 다의 의미 또는 어느 한 의미에 대한 명백한 지지를 제공하는 것으로 간주될 것이다.

[0297] 본 발명에 사용된 바와 같이, "약"이란 용어는, 달리 서술되지 않는 한, 지시된 값의 +/-10%, 보다 바람직하게 +/-5%, 보다 바람직하게 +/-1%를 지칭한다.

[0298] 본 명세서 전체를 통해서 "포함하다"란 단어, 또는 "포함하는" 또는 "포함하고 있는"과 같은 변형들은 서술된 요소, 정수 또는 단계, 또는 요소들, 정수들 또는 단계들의 그룹을 포함함을 의미하지만, 임의의 다른 요소, 정수 또는 단계, 또는 요소들, 정수들 또는 단계들의 그룹을 제외하는 것은 아니다.

[0299] 선택된 정의

[0300] 본 발명에 사용된 바와 같이, "추출된 식물 지질" 및 "단리된 식물 지질"이란 용어들은 예를 들어 파쇄에 의해, 식물 또는 종자와 같은 그의 부분으로부터 추출된 지질 조성물을 지칭한다. 상기 추출된 지질은, 예를 들어 식물 종자를 파쇄시켜 수득한 비교적 조질의 조성물이거나, 상기 식물 물질로부터 유래된 물, 핵산, 단백질 및 탄수화물의 대부분(전부는 아니더라도), 하나 이상 또는 각각이 제거된 보다 정제된 조성물일 수 있다. 정제 방법의 예는 하기에 개시된다. 하나의 실시태양에서, 상기 추출되거나 단리된 식물 지질은 상기 조성물의 중량을 기준으로 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95%(w/w)의 지질을 차지한다. 상기 지질은 실온에서 고체 또는 액체(이때 액체는 오일인 것으로 간주된다)일 수 있다. 하나의 실시태양에서, 본 발명의 추출된 지질은 또 다른 공급원에 의해 생성되는 DPA(예를 들어 어유로부터의 DPA)와 같은 또 다른 지질과 블렌딩되지 않았다. 하나의 실시태양에서, 추출에 따른 올레산 대 DPA, 팔미트산 대 DPA, 리놀레산 대 DPA, 및 전체 ω6 지방산:전체 ω3 지방산 중 하나 이상 또는 전부의 비는, 완전한 종자 또는 세포에서의 비에 비해, 현저하게 변경되지 않았다(예를 들어 10% 또는 5% 이하로 변경되었다). 또 다른 실시태양에서, 상기 추출된 식물 지질은 완전한 종자 또는 세포에서의 비에 비해, 올레산 대 DPA, 팔미트산 대 DPA, 리놀레산 대 DPA, 및 전체 ω6 지방산:전체 ω3 지방산 중 하나 이상 또는 전부의 비를 변경시킬 수도 있는 수소화 또는

분별화 과정에 노출되지 않았다. 본 발명의 추출된 식물 지질이 오일 중에 포함될 때, 상기 오일은 스테롤과 같은 비-지방산 분자를 추가로 포함할 수도 있다.

[0301] 본 발명에 사용된 바와 같이, "추출된 식물 오일" 및 "단리된 식물 오일"이란 용어들은 추출된 식물 지질 또는 단리된 식물 지질을 포함하고 실온에서 액체인 물질 또는 조성물을 지칭한다. 상기 오일을 식물 또는 종자와 같은 그의 부분으로부터 수득한다. 상기 추출되거나 단리된 오일은 예를 들어 식물 종자를 파쇄시켜 수득되는 비교적 조질의 조성물, 또는 상기 식물 물질로부터 유래된 물, 핵산, 단백질 및 탄수화물의 대부분(전부는 아니더라도), 하나 이상 또는 각각이 제거된 보다 정제된 조성물일 수 있다. 상기 조성물은 지질 또는 비-지질일 수 있는 다른 성분들을 포함할 수도 있다. 하나의 실시태양에서, 상기 오일 조성물은 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95%(w/w)의 추출된 식물 지질을 포함한다. 하나의 실시태양에서, 본 발명의 추출된 오일은 또 다른 공급원에 의해 생성된 DPA(예를 들어 어유로부터의 DPA)와 같은 또 다른 오일과 블렌딩되지 않았다. 하나의 실시태양에서, 추출에 따른 올레산 대 DPA, 팔미트산 대 DPA, 리놀레산 대 DPA, 및 전체 ω 6 지방산:전체 ω 3 지방산 중 하나 이상 또는 전부의 비는, 완전한 종자 또는 세포에서의 비에 비해, 현저하게 변경되지 않았다(예를 들어 10% 또는 5% 이하로 변경되었다). 또 다른 실시태양에서, 상기 추출된 식물 오일은 완전한 종자 또는 세포에서의 비에 비해, 올레산 대 DPA, 팔미트산 대 DPA, 리놀레산 대 DPA, 및 전체 ω 6 지방산:전체 ω 3 지방산 중 하나 이상 또는 전부의 비를 변경시킬 수도 있는 수소화 또는 분별화 과정에 노출되지 않았다. 본 발명의 추출된 식물 오일은 스테롤과 같은 비-지방산 분자를 추가로 포함할 수도 있다.

[0302] 본 발명에 사용된 바와 같이, "추출된 미생물 지질" 또는 "추출된 미생물 오일"은 주요 차이점이 지질 또는 오일원인, 각각 상응하는 용어의 "추출된 식물 지질" 및 "추출된 식물 오일"과 유사한 의미를 갖는다.

[0303] 본 발명에 사용된 바와 같이, "오일"은 우세하게 지질을 포함하며 실온에서 액체인 조성물이다. 예를 들어, 본 발명의 오일은 바람직하게는 중량 기준으로 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 또는 적어도 90%의 지질을 포함한다. 전형적으로, 정제된 오일은 상기 오일 중에 적어도 90 중량%의 트라이아실글리세롤(TAG)을 포함한다. 오일의 소량 성분, 예를 들어 다이아실글리세롤(DAG), 유리 지방산(FFA), 인지질 및 스테롤이 본 발명에 개시된 바와 같이 존재할 수도 있다.

[0304] 본 발명에 사용된 바와 같이, "지방산"이란 용어는 포화되거나 불포화된, 종종 긴 지방족 꼬리를 갖는 카복실산(또는 유기산)을 지칭한다. 전형적으로 지방산은 적어도 탄소수 8의 길이, 보다 바람직하게는 적어도 탄소수 12의 길이의 탄소-탄소 결합된쇄를 갖는다. 본 발명의 바람직한 지방산은 18 내지 22개의 탄소 원자(C18, C20, C22 지방산), 더욱 바람직하기로 20 내지 22개의 탄소 원자(C20, C22), 가장 바람직하기로 22개의 탄소 원자(C22)의 탄소 사슬을 갖는다. 대부분의 천연 지방산은 그의 생합성이 2 개의 탄소 원자를 갖는 아세테이트를 수반하므로 짝수의 탄소 원자를 갖는다. 상기 지방산은 유리 상태(비-에스테르화된) 또는 에스테르화된 형태로, 예를 들어 트라이글리세라이드, 다이아실글리세라이드, 모노아실글리세라이드, 아실-CoA(티오-에스테르) 결합된 또는 다른 결합된 형태의 부분으로 존재할 수 있다. 상기 지방산은 인지질, 예를 들어 포스파티딜콜린, 포스파티딜에탄올아민, 포스파티딜세린, 포스파티딜글리세롤, 포스파티딜-이노시톨, 또는 다이포스파티딜글리세롤 형태로서 에스테르화될 수 있다. 하나의 실시태양에서, 지방산은 예를 들어 C20 또는 C22 PUFA의 메틸 또는 에틸 에스테르와 같이 메틸 또는 에틸 그룹으로 에스테르화된다. 바람직한 지방산은 EPA 또는 DPA, 또는 EPA, DPA 및 DHA, 또는 EPA 및 DPA의 메틸 또는 에틸 에스테르이다.

[0305] "포화 지방산"은 상기쇄를 따라 어떠한 이중 결합이나 다른 작용기들도 함유하지 않는다. "포화"란 용어는 모든 탄소(카복실산[-COOH] 기와 별개로)가 가능한 한 많은 수소를 함유한다는 점에서 수소를 지칭한다. 즉, 오메가(ω) 단부는 3 개의 수소(-CH₃-)를 함유하고,쇄 내의 각각의 탄소는 2 개의 수소(-CH₂-)를 함유한다.

[0306] "불포화 지방산"은 포화 지방산과 유사한 형태를 가지나, 단 하나 이상의 알켄 작용기가 상기쇄를 따라 존재하며, 이때 각각의 알켄은 상기쇄의 단일-결합된 "-CH₂-CH₂-" 부분이 이중으로-결합된 "-CH=CH-" 부분(즉, 또 다른 탄소에 이중 결합된 탄소)으로 치환된다. 상기 이중 결합의 어느 한쪽에 결합되는 상기쇄 중의 2 개의 다음 탄소 원자들은 시스 또는 트랜스 형태, 바람직하기로 시스 형태로 존재할 수 있다. 하나의 실시태양에서, 본 발명의 지질 또는 오일은 1% 미만의 트랜스 형태의 탄소-탄소 이중 결합을 갖는 지방산(트랜스 지방산)을 포함하는 지방산 조성물을 갖는다.

[0307] 본 발명에 사용된 바와 같이, "단일불포화 지방산"이란 용어는 탄소쇄 중에 적어도 12 개의 탄소 원자를 포함하고 상기쇄 중에 단지 하나의 알켄기(탄소-탄소 이중 결합)만을 포함하는 지방산을 지칭한다. 본 발명에 사용된 바와 같이, "다중불포화 지방산" 또는 "PUFA"란 용어는 탄소쇄 중에 적어도 12 개의 탄소 원자 및 2 개 이상

의 알켄기(탄소-탄소 이중 결합)를 포함하는 지방산을 지칭한다.

[0308]

본 발명에 사용된 바와 같이, "장쇄 다중불포화 지방산" 및 "LC-PUFA"란 용어는 탄소 쇠 중에 적어도 20 개의 탄소 원자 및 적어도 2 개의 탄소-탄소 이중 결합을 포함하고, 따라서 VLC-PUFA를 포함하는 지방산을 지칭한다. 본 발명에 사용된 바와 같이, "매우 긴 장쇄 불포화 지방산" 및 "VLC-PUFA"란 용어는 탄소 쇠 중에 적어도 22 개의 탄소 원자 및 적어도 3 개의 탄소-탄소 이중 결합을 포함하는 지방산을 지칭한다. 통상적으로, 상기 지방산의 탄소 쇠 중의 탄소 원자의 수는 분지되지 않은 탄소 쇠를 지칭한다. 상기 탄소 쇠가 분지되는 경우, 상기 탄소 원자의 수는 측기 중의 것은 제외한다. 하나의 실시태양에서, 상기 장쇄 다중불포화 지방산은 $\omega 3$ 지방산, 즉 상기 지방산의 메틸 단부로부터 세 번째 탄소-탄소 결합이 불포화된(탄소-탄소 이중 결합) 것이다. 또 다른 실시태양에서, 상기 장쇄 다중불포화 지방산은 $\omega 6$ 지방산, 즉 상기 지방산의 메틸 단부로부터 여섯 번째 탄소-탄소 결합이 불포화된(탄소-탄소 이중 결합) 것이다. 추가의 실시태양에서, 상기 장쇄 다중불포화 지방산은 아라키돈산(ARA, 20:4 Δ 5,8,11,14; $\omega 6$), 에이코사테트라에노산(ETA, 20:4 Δ 8,11,14,17, $\omega 3$), 에이코사펜타에노산(EPA, 20:5 Δ 5,8,11,14,17; $\omega 3$), 도코사펜타에노산(DPA, 22:5 Δ 7,10,13,16,19, $\omega 3$), 및 도코사헥사에노산(DHA, 22:6 Δ 4,7,10,13,16,19, $\omega 3$)으로 이루어진 그룹 중에서 선택된다. 상기 LC-PUFA는 또한 다이호모- γ -리놀레산(DGLA) 또는 에이코사트라이에노산(ETra, 20:3 Δ 11,14,17, $\omega 3$)일 수 있다. 본 발명에 따라 생성된 LC-PUFA는 상기 화합물들 중 어느 하나 또는 전부의 혼합물일 수 있으며 다른 LC-PUFA 또는 이들 LC-PUFA 중 어느 하나의 유도체를 포함할 수도 있다. 바람직한 실시태양에서, $\omega 3$ 지방산은 적어도 DPA, 또는 DPA 및 DHA, 또는 EPA, DPA 및 DHA, 또는 EPA 및 DPA이다. 하나의 실시태양에서, DPA는 약 7% 내지 30% 또는 35%의 수준으로 존재하고, DHA는 존재하지 않거나 존재하는 경우, 2.0% 미만, 바람직하게는 1.0% 미만, 더욱 바람직하게는 0.5% 미만의 전체 지방산 조성의 수준으로 존재하고, 가장 바람직하게는 존재하지 않거나 검출불가능하다. 이는 세포 내 $\Delta 4$ -불포화효소 활성이 없어 달성될 수 있다. 하나의 실시태양에서, DPA의 수준은 EPA의 수준보다 크고, 더욱 바람직하게는 EPA 및 DHA의 각각의 수준보다 크고, 가장 바람직하게는 EPA 및 DHA의 조합 수준보다 크다. 이러한 실시태양에서, DHA는 존재하지 않을 수 있거나 존재하는 경우, 0.5% 미만의 전체 지방산 조성의 수준으로 존재한다.

[0309]

더욱 또한, 본 발명에 사용된 바와 같이 "장쇄 다중불포화 지방산(LC-PUFA)" 및 "매우 긴 장쇄 다중불포화 지방산(VLC-PUFA)"이란 용어는 유리 상태(비-에스테르화된) 또는 에스테르화된 형태로, 예를 들어 트라이글리세라이드(트리아실글리세롤), 다이아실글리세라이드, 모노아실글리세라이드, 아실-CoA 결합된 또는 다른 결합된 형태의 부분으로 존재하는 지방산을 지칭한다. 트리글리세라이드에서, LC-PUFA 또는 VLC-PUFA, 예컨대 DPA는 *sn*-1/3 또는 *sn*-2 위치에서 에스테르화될 수 있거나 트리글리세라이드는 LC-PUFA 및 VLC-PUFA 아실기로부터 선택된 두개 또는 세개의 아실기를 포함할 수 있다. 예를 들어, 트리글리세라이드는 *sn*-1 및 *sn*-3 위치 둘 모두에 DPA를 포함할 수 있다. 상기 지방산은 인지질, 예를 들어 포스파티딜콜린(PC), 포스파티딜에탄올아민, 포스파티딜세린, 포스파티딜글리세롤, 포스파티딜-이노시톨 또는 다이포스파티딜글리세롤 형태로서 에스테르화될 수 있다. 따라서, 상기 LC-PUFA는 세포의 지질 또는 세포, 조직 또는 유기체로부터 추출된 정제된 오일 또는 지질 중 형태들의 혼합물로서 존재할 수 있다. 바람직한 실시태양에서, 본 발명은 적어도 75% 또는 적어도 85%의 트리아실글리세롤을 포함하는 오일을 제공하며, 이때 나머지는 다른 형태의 지질, 예를 들어 상기 언급한 것들로서 존재하며, 적어도 상기 트리아실글리세롤은 LC-PUFA를 포함한다. 상기 오일을 후속으로, 예를 들어 유리 지방산의 방출을 위해 강염기에 의해 가수분해시키거나 또는 트랜스에스테르화, 증류 등에 의해 정제하거나 처리할 수 있다.

[0310]

본 발명에 사용된 바와 같이, "전체 $\omega 6$ 지방산" 또는 "전체 $\omega 6$ 지방산 함량" 등은 전체 지방산 함량의 백분율로서 나타낸, 상기 추출된 지질, 오일, 재조합 세포, 식물 부분 또는 종자 중의 에스테르화된 및 비-에스테르화된 모든 $\omega 6$ 지방산의 합을 지칭한다. 이들 $\omega 6$ 지방산은 (존재하는 경우) LA, GLA, DGLA, ARA, EDA 및 $\omega 6$ -DPA를 포함하며, 임의의 $\omega 3$ 지방산 및 단일불포화 지방산을 제외한다. 식물, 종자에 존재하는 $\omega 6$ 지방산, 본 발명의 지질 또는 오일은 모두 다중불포화 지방산(PUFA)의 부류에 포함된다.

[0311]

본 발명에 사용된 바와 같이, "신규 $\omega 6$ 지방산" 또는 "신규 $\omega 6$ 지방산 함량" 등은 전체 지방산 함량의 백분율로서 나타낸, 상기 추출된 지질, 오일, 재조합 세포, 식물 부분 또는 종자 중의 에스테르화된 및 비-에스테르화된, LA를 제외한 모든 $\omega 6$ 지방산의 합을 지칭한다. 이들 신규의 $\omega 6$ 지방산은 세포내에 도입되는 유전자 구조물(외인성 폴리뉴클레오티드)의 발현에 의해 본 발명의 세포, 식물, 식물 부분 및 종자에서 생성되는 지방산이며 (존재하는 경우) GLA, DGLA, ARA, EDA 및 $\omega 6$ -DPA를 포함하고, LA 및 임의의 $\omega 3$ 지방산 및 단일불포화 지방산은 제외한다. 예시적인 전체 $\omega 6$ 지방산 함량 및 신규 $\omega 6$ 지방산 함량을, 실시예 1에 개시된 바와 같이, 샘플 중 지방산의 FAME로의 전환 및 GC에 의한 분석에 의해 측정한다.

- [0312] 본 발명에 사용된 바와 같이, "전체 ω 3 지방산" 또는 "전체 ω 3 지방산 함량" 등은 전체 지방산 함량의 백분율로서 나타낸, 상기 추출된 지질, 오일, 제조합 세포, 식물 부분 또는 종자 중의 에스테르화된 및 비-에스테르화된 모든 ω 3 지방산의 합을 지칭한다. 이들 ω 3 지방산은 (존재하는 경우) ALA, SDA, EtrA, EPA, DPA 및 DHA를 포함하며, 임의의 ω 6 지방산 및 단일불포화 지방산은 제외한다. 식물, 종자에 존재하는 ω 6 지방산, 본 발명의 지질 또는 오일은 모두 다중불포화 지방산(PUFA)의 부류에 포함된다.
- [0313] 본 발명에 사용된 바와 같이, "신규 ω 3 지방산" 또는 "신규 ω 3 지방산 함량" 등은 전체 지방산 함량의 백분율로서 나타낸, 상기 추출된 지질, 오일, 제조합 세포, 식물 부분 또는 종자 중의 에스테르화된 및 비-에스테르화된, ALA를 제외한 모든 ω 3 지방산의 합을 지칭한다. 이들 신규의 ω 3 지방산은 세포내에 도입되는 유전자 구조물(외인성 폴리뉴클레오티드)의 발현에 의해 본 발명의 세포, 식물, 식물 부분 및 종자에서 생성되는 ω 3 지방산이며 (존재하는 경우) SDA, ETrA, ETA, EPA, DPA 및 DHA를 포함하고, ALA 및 임의의 ω 6 지방산 및 단일불포화 지방산은 제외한다. 예시적인 전체 ω 3 지방산 함량 및 신규 ω 3 지방산 함량을, 실시예 1에 개시된 바와 같이, 샘플 중 지방산의 FAME로의 전환 및 GC에 의한 분석에 의해 측정한다.
- [0314] 당업자가 이해하는 바와 같이, 본 발명의 방법의 단계로서 "식물 부분을 수득함"이란 용어는 상기 방법에 사용하기 위한 하나 이상의 식물 부분을 수득하는 것을 포함할 수 있다. 식물 부분을 수득함은 식물으로부터 식물 부분을, 예컨대 기계적 수확기로 수확하는 것, 또는 식물 부분을 구입하는 것, 또는 공급자로부터 식물 부분을 입수하는 것을 포함한다. 또 다른 예로서, 식물 부분을 수득함은 식물 부분을 수확하는 다른 사람으로부터 식물을 얻는 것일 수 있다.
- [0315] 본 발명에 사용될 수 있는 불포화효소, 신장효소 및 아실 트랜스퍼라제 단백질 및 이들을 암호화하는 유전자는 당해 분야에 공지된 것들 또는 이들의 동족체 또는 유도체 중 어느 하나이다. 상기와 같은 유전자 및 암호화된 단백질 크기의 예를 표 1에 나열한다. LC-PUFA 생합성에 관여하는 것으로 입증된 불포화효소들은 모두 소위 "전단부" 불포화효소의 그룹에 속한다. 바람직한 단백질, 또는 단백질의 조합은 서열번호 1 및 2와 같이 본 명세서에 제공된 유전적 구조물에 의해 암호화된 것이다.
- [0316] 본 발명에 사용된 바와 같이, "전단부 불포화효소"란 용어는 지질의 아실 쇄의 카복실기와 기존 불포화 부분 사이에 이중 결합을 도입시키는 효소 부류의 구성원을 지칭하며, 구조적으로 3 개의 고도로 보존된 히스티딘 박스를 포함하는 전형적인 지방산 불포화효소 도메인과 함께, N-말단 시토크롬 b5 도메인의 존재를 특징으로 한다 (Napier et al., 1997).
- [0317] 본 발명에 사용하기 위한 신장효소 또는 불포화효소 중 어느 하나의 활성을 세포, 예를 들어 식물 세포 또는 바람직하게는 체세포 배 또는 트랜스제닉 식물에서 상기 효소를 암호화하는 유전자를 발현시키고, 상기 세포, 배 또는 식물이, 상기 효소를 발현하지 않는 필적하는 세포, 배 또는 식물에 비해 LC-PUFA를 생성시키는 증가된 능력을 갖는지의 여부를 측정함으로써 시험할 수 있다.
- [0318] 하나의 실시태양에서 본 발명에 사용하기 위한 상기 불포화효소 및/또는 신장효소 중 하나 이상을 미세조류로부터 정제할 수 있다, 즉 상기는 미세조류로부터 정제될 수 있는 폴리펩티드와 아미노산 서열이 일치한다.
- [0319] 몇몇 효소를 구체적으로 본 발명에서 "이작용성"으로서 개시하지만, 상기와 같은 용어의 부재가 반드시, 특정 효소가 구체적으로 정의된 활성 외의 활성을 갖지 않음을 암시하는 것은 아니다.

표 1

LC-PUFA 생합성에 관련된 클로닝된 유전자들

효소	유기체의 유형	종	수납 번호	단백질 크기 (aa's)	참고문헌
Δ4-불포화효소	원생생물	유글레나 그라실리스	AY278558	541	Meyer et al., 2003
	조류	파블로바 루테라이	AY332747	445	Tanon et al., 2003
		아이소크리시스 갈마나	AAV33631	433	Pereira et al., 2004b
		파블로바 살리나	AAV15136	447	Zhou et al., 2007
	브라우스토 키트리드	브라우스토 키트리움 아 우레움	AAV75707 AAV75708 AAV75709 AAV75710	515	N/A
Δ5-불포화효소		브라우스토 키트리움 스페시즈 ATCC21685	AAV09688	519	Qiu et al. 2001
	포유동물	호모 사피엔스	AF199596	444	Cho et al., 1999b Leonard et al., 2000b
	선충류	카에노라브디티스 엘레간스	AF11440, NM_069350	447	Michaelson et al., 1998b; Watts and Browse, 1999b
	진균류	모르티에렐라 알피나	AF067654	446	Michaelson et al., 1998a; Knutzon et al., 1998
		피티움 이레굴라레	AF419297	456	Hong et al., 2002a
		덕티오스텔리움 디스코이데움	AB022097	467	Saito et al., 2000
		사프로레그나아 디클리나		470	W002081668
	균조류	파에오 막틸롬 트리코르누툼	AY082392	469	Domergue et al., 2002
	조류	브라우스토 키트리움 스페시즈	AF489588	439	Qiu et al., 2001
		브라우스토 키트리움 아 우레움		439	W002081668
		아이소크리시스 갈마나		442	W002081668
	이끼류	바르칸티아 플라모르파	AY583465	484	Kajikawa et al., 2004

[0320]

효소	유기체의 유형	종	수납 번호	단백질 크기 (aa's)	참고문헌
Δ6-불포화 효소	포유동물	호모 사피엔스	NM_013402	444	Cho et al., 1999a; Leonard et al., 2000
		무스 무스쿨루스	NM_019699	444	Cho et al., 1999a
	선충류	카에노라브다티스 엘레강스	Z70271	443	Napier et al., 1998
	식물	브라코 오파시날레스	U79010	448	Sayanova et al., 1997
		예키움	AY055117 AY055118		Garcia-Maroto et al., 2002
		프리볼라 비알리이	AY234127	453	Sayanova et al., 2003
		아네토네 레베일레이	AF536525	446	Whitney et al., 2003
	이끼류	세라토돈 푸르푸레우스	AJ250735	520	Sperling et al., 2000
		마르칸타아 폴리모르파	AY583463	481	Kajikawa et al., 2004
	진균류	파스코미트렐라 파웬스	CAA11033	525	Girke et al., 1998
		모르티에렐라 알피나	AF110510 AB020032	457	Huang et al., 1999; Sakuradani et al., 1999
		피터움 이레굴라레	AF419296	459	Hong et al., 2002a
		류코르 씨르시넬로이데스	AB052086	467	NCBI*
		리조푸스 스페시즈	AY320288	458	Zhang et al., 2004
		사프로레그니아 더글리나		453	W002081668
	규조류	파에오닥틸롬 트리코르누툼	AY082393	477	Domergue et al., 2002
	세균류	시넨코시스티스	L11421	359	Reddy et al., 1993
	조류	트라우스토키트리움 아우레움		456	W002081668
	어류	다니오 레리오	AF309556	444	Hastings et al., 2001

C20 Δ8-불포화 효소	조류	유클레나 그라실리스	AF139720	419	Wallis and Browse, 1999
	식물	브라코 오파시날레스	AAG43277	446	Sperling et al., 2001

효소	유기체의 유형	종	수납 번호	단백질 크기 (aa's)	참고문헌
Δ6-신장 효소	선충류	카에노라브디티스 엘레간스	NM_069288	288	Beaudoin et al., 2000
	이끼류	피스코마트렐라 파텐스	AF428243	290	Zank et al., 2002
		마르칸티아 폴리모르파	AY583464	290	Kajikawa et al., 2004
	진균류	도르티에렐라 알파나	AF206662	318	Parker-Barnes et al., 2000
	조류	파블로바 루테리**		501	WO 03078639
		트라우스토키프리움	AX951565	271	WO 03093482
		트라우스토키프리움 스페시즈**	AX214454	271	WO 0159128
PUF A-신장 효소	포유동물	호모 사피엔스	AF231981	299	Leonard et al., 2000b; Leonard et al., 2002
		라투스 노르베키쿠스	AB071985	299	Inagaki et al., 2002
		라투스 노르베키쿠스**	AB071986	267	Inagaki et al., 2002
		무스 무스쿨루스	AF170907	279	Tvrdek et al., 2000
		무스 무스쿨루스	AF170908	292	Tvrdek et al., 2000
	어류	다니오 레리오	AF532782	291 (282)	Agaba et al., 2004
		다니오 레리오**	NM_199532	266	Lo et al., 2003
	유충	카에노라브디티스 엘레간스	Z68749	309	Abbott et al., 1998; Beaudoin et al., 2000
	조류	트라우스토키프리움 아우레움**	AX464802	272	WO 0208401-A2
		파블로바 루테리**		320	WO 03078639
Δ9-신장 효소	조류	아이소크리스탈리스 갈바나	AF390174	263	Qi et al., 2002
		유글레나 그라실리스		258	WO 08/128241
Δ5-신장 효소	조류	오스트레오코커스 타우리	AAV67798	300	Meyer et al., 2004

		피라미모나스 코르다타		268	WO 2010/057246
		파블로바 스페시즈 CCM459	AAV33630	277	Pereira et al., 2004b
		파블로바 살리나	AAV15135	302	Robert et al., 2009
	규조류	탈라시오시라 슈도나나	AAV67800	358	Meyer et al., 2004
	어류	온코렐루스 미키스	CAM55862	295	WO 06/008099
	이끼류	마르칸티아 폴리모르파	BAE71129	348	Kajikawa et al., 2006

* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> ** 입증되지 않고/설명되지 않은 작용

불포화효소

본 발명에 사용된 바와 같이, "불포화효소"란 용어는 전형적으로 에스테르화된 형태, 예를 들어 아실-CoA 에스테르로 존재하는 지방산 기질의 아실기에 탄소-탄소 이중 결합을 도입시킬 수 있는 효소를 지칭한다. 상기 아실기는 인지질, 예를 들어 포스파티딜콜린(PC), 또는 아실 담체 단백질(ACP), 또는 바람직한 실시태양에서 CoA

로 에스테르화될 수 있다. 불포화효소는 일반적으로 3 개의 그룹으로 상응하게 분류될 수 있다. 하나의 실시태양에서, 상기 불포화효소는 전단부 불포화효소이다.

[0328] 본 발명에 사용된 바와 같이, " $\Delta 4$ -불포화효소"는 지방산 기질의 카복실 단부로부터 4 번째 탄소-탄소 결합에 탄소-탄소 이중 결합을 도입시키는 불포화 반응을 수행하는 단백질을 지칭한다. " $\Delta 4$ -불포화효소"는 적어도 DPA를 DHA로 전환시킬 수 있다. 바람직하게는, " $\Delta 4$ -불포화효소"는 DPA-CoA를 DHA-CoA로 전환시킬 수 있다. 즉, 이는 acyl-CoA 불포화효소이다. 하나의 실시태양에서, " $\Delta 4$ -불포화효소"는 PC의 sn-2 위치에서 에스테르화된 DPA를 DHA-PC로 전환시킬 수 있다. 바람직하게는, $\Delta 4$ -불포화효소는 DPA-PC보다 DPA-CoA에 대한 더욱 큰 활성을 갖는다. DPA로부터 DHA를 생성시키는 불포화 단계는 포유동물 이외의 유기체에서 $\Delta 4$ -불포화효소에 의해 촉매화되며, 상기 효소를 암호화하는 유전자는 담수 원생생물 중 유글레나 그라실리스(*Euglena gracilis*) 및 해수 중 트라우스토키트리움 종(*Thraustochytrium* sp.)로부터 단리되었다(Qiu et al., 2001; Meyer et al., 2003). 하나의 실시태양에서, 상기 $\Delta 4$ -불포화효소는 서열번호 28에 제공된 바와 같은 서열, 또는 트라우스토키트리움 종 $\Delta 4$ -불포화효소, 그의 생물 활성 단편, 또는 서열번호 28과 적어도 80% 일치하는 아미노산 서열을 갖는 아미노산을 포함한다. 하나의 실시태양에서, 높은 수준의 DPA, 예를 들어 5% 내지 35%의 전체 추출가능한 지방산 함량을 생성하는 본 발명의, 또는 이에 사용되는 식물, 식물 부분(예컨대, 종자) 또는 세포는 DPA이고, 작용성 $\Delta 4$ -불포화효소를 암호화하는 유전자를 포함하지 않는다.

[0329] 본 발명에 사용된 바와 같이, " $\Delta 5$ -불포화효소"는 지방산 기질의 카복실 단부로부터 5 번째 탄소-탄소 결합에 탄소-탄소 이중 결합을 도입시키는 불포화효소 반응을 수행하는 단백질을 지칭한다. 하나의 실시태양에서, 지방산 기질은 ETA이고 효소는 EPA를 생성한다. 바람직하게는, " $\Delta 5$ -불포화효소"는 ETA-CoA를 EPA-CoA로 전환시킬 수 있다. 즉, 이는 acyl-CoA 불포화효소이다. 하나의 실시태양에서, " $\Delta 5$ -불포화효소"는 PC의 sn-2 위치에서 에스테르화된 ETA를 전환시킬 수 있다. 바람직하게는, $\Delta 5$ -불포화효소는 ETA-PC보다 ETA-CoA에 대한 더욱 큰 활성을 갖는다. $\Delta 5$ -불포화효소의 예는 문헌[Ruiz-Lopez et al. (2012)] 및 문헌[Petrie et al. (2010a)] 및 본 발명의 표 1에 나열된다. 하나의 실시태양에서, 상기 $\Delta 5$ -불포화효소는 서열번호 20에 제공된 바와 같은 서열, 그의 생물 활성 단편, 또는 서열번호 20과 적어도 80% 일치하는 아미노산 서열을 갖는 아미노산을 포함한다. 또 다른 실시태양에서, 상기 $\Delta 5$ -불포화효소는 서열번호 22에 제공된 바와 같은 서열, 그의 생물 활성 단편, 또는 서열번호 22와 적어도 53% 일치하는 아미노산 서열을 갖는 아미노산을 포함한다. 또 다른 실시태양에서, 상기 $\Delta 5$ -불포화효소는 트라우스토키트리움 종 또는 에밀리아니아 헉슬레이로부터 유래한다.

[0330] 본 발명에 사용된 바와 같이, " $\Delta 6$ -불포화효소"는 지방산 기질의 카복실 단부로부터 6 번째 탄소-탄소 결합에 탄소-탄소 이중 결합을 도입시키는 불포화효소 반응을 수행하는 단백질을 지칭한다. 하나의 실시태양에서, 지방산 기질은 ALA이고 효소는 SDA를 생성한다. 바람직하게는, " $\Delta 6$ -불포화효소"는 ALA-CoA를 SDA-CoA로 전환시킬 수 있다. 즉, 이는 acyl-CoA 불포화효소이다. 하나의 실시태양에서, " $\Delta 6$ -불포화효소"는 PC의 sn-2 위치에서 에스테르화된 ALA를 전환시킬 수 있다. 바람직하게는, $\Delta 6$ -불포화효소는 ALA-PC보다 ALA-CoA에 대한 더욱 큰 활성을 갖는다. $\Delta 6$ -불포화효소는 또한 $\Delta 5$ -불포화효소와 같은 활성을 가질 수 있으며, 이것이 ETA에 대한 $\Delta 5$ -불포화효소 활성보다 ALA에 대한 더욱 큰 $\Delta 6$ -불포화효소 활성을 가지는 한, $\Delta 5/\Delta 6$ 이작용성 불포화효소라 불릴 수 있다. $\Delta 6$ -불포화효소의 예는 문헌[Ruiz-Lopez et al. (2012)] 및 문헌[Petrie et al. (2010a)] 및 본 발명의 표 1에 나열된다. 바람직한 $\Delta 6$ -불포화효소는 마이크로모나스 푸실라, 피티움 이레굴라레 또는 오스트레오코커스 타우리이(*Ostreococcus taurii*)로부터 유래한다.

[0331] 하나의 실시태양에서, 상기 $\Delta 6$ -불포화효소는 바람직하게는 식물 세포에서 하기 중 적어도 2 개, 바람직하게는 3 개 모두를 가짐을 추가의 특징으로 한다: i) 지방산 기질로서 리놀레산(LA, 18:2 $\Delta 9,12,\omega 6$)보다 α -리놀렌산(ALA, 18:3 $\Delta 9,12,15,\omega 3$)에 대해 더 큰 $\Delta 6$ -불포화효소 활성; ii) 지방산 기질로서 PC의 sn-2 위치에 결합된 ALA에 대해서보다 지방산 기질로서 ALA-CoA에 대해 더 큰 $\Delta 6$ -불포화효소 활성; 및 iii) ETrA에 대한 $\Delta 8$ -불포화효소 활성. 상기와 같은 $\Delta 6$ -불포화효소의 예를 표 2에 제공한다.

[0332] 하나의 실시태양에서 $\Delta 6$ -불포화효소는 상응하는 $\omega 6$ 기질보다 $\omega 3$ 기질에 대해 더 큰 활성을 가지며 재조합 세포, 예를 들어 식물 세포에서 외인성 폴리뉴클레오티드로부터 발현시 적어도 30%, 보다 바람직하게는 적어도 40%, 또는 가장 바람직하게는 적어도 50%의 효율로, 또는 효모 세포에서 발현시 적어도 35%의 효율로 옥타데카테트라에노산(스테아리돈산, SDA, 18:4 $\Delta 6,9,12,15,\omega 3$)을 생산하는 ALA에 대한 활성을 갖는다. 하나의 실시태양에서, 상기 $\Delta 6$ -불포화효소는 지방산 기질로서 LA보다 ALA에 대해 더 큰 활성, 예를 들어 적어도 약 2배 더 큰 $\Delta 6$ -불포화효소 활성을 갖는다. 다른 실시태양에서, 상기 $\Delta 6$ -불포화효소는 지방산 기질로서 PC의 sn-2 번 위치에 결합된 ALA에 대해서보다 지방산 기질로서 ALA-CoA에 대해 더 큰 활성, 예를 들어 적어도 약 5배 더 큰 $\Delta 6$ -불포화효소 활성 또는 적어도 10배 더 큰 활성을 갖는다. 추가의 실시태양에서, 상기 $\Delta 6$ -불포화효소는 지

방산 기질 ALA-CoA 및 PC의 sn-2 번 위치에 결합된 ALA 모두에 대해서 활성을 갖는다.

표 2

아실-CoA 기질에 대해 활성을 갖는 것으로 입증된 불포화효소들

효소	유기체의 유형	종	수납 번호	단백질 크기 (aa's)	참고문헌
Δ6-불포화효소	조류	만토니엘라 스쿠아마타	CAQ30479	449	Hoffmann et al., 2008
		오스트레오코커스 타우리	AAW70159	456	Domergue et al., 2005
		마이크로모나스 푸실라	EEH58637		Petrie et al., 2010a (SEQ ID NO: 13)
Δ5-불포화효소	조류	만토니엘라 스쿠아마타	CAQ30478	482	Hoffmann et al., 2008
	식물	아네모네 레베일레이	N/A		Sayanova et al., 2007
ω3-불포화효소	진균류	피티움 아파니테르마툼	FW362186.1	359	Xue et al., 2012; W02008/054565
	진균류 (난균)	피토프토라 소자예	FW362214.1	363	Xue et al., 2012; W02008/054565
	진균류 (난균)	피토프토라 라모룸	FW362213.1	361	Xue et al., 2012; W02008/054565

[0333]

[0334]

하나의 실시태양에서, 상기 Δ6-불포화효소는 ETA에 대해 검출 가능한 Δ5-불포화효소 활성을 갖지 않는다. 또 다른 실시태양에서, 상기 Δ6-불포화효소는 서열번호 9, 서열번호 12 또는 서열번호 13에 제공된 바와 같은 서열, 그의 생물 활성 단편, 또는 서열번호 9, 서열번호 12 또는 서열번호 13과 적어도 77% 일치하는 아미노산 서열을 갖는 아미노산을 포함한다. 다른 실시태양에서, 상기 Δ6-불포화효소는 서열번호 12 또는 서열번호 13에 제공된 바와 같은 서열, 그의 생물 활성 단편, 또는 서열번호 12 또는 서열번호 13과 적어도 67% 일치하는 아미노산 서열을 갖는 아미노산을 포함한다. 상기 Δ6-불포화효소는 또한 Δ8-불포화효소 활성을 가질 수도 있다.

[0335]

본 발명에 사용된 바와 같이, "Δ8-불포화효소"는 지방산 기질의 카복실 단부로부터 8 번째 탄소-탄소 결합에 탄소-탄소 이중 결합을 도입시키는 불포화효소 반응을 수행하는 단백질을 지칭한다. Δ8-불포화효소는 적어도 ETrA를 ETA로 전환시킬 수 있다. 바람직하게는, Δ8-불포화효소는 ETrA-CoA를 ETA-CoA로 전환시킬 수 있다. 즉, 이는 acyl-CoA 불포화효소이다. 하나의 실시태양에서, Δ8-불포화효소는 PC의 sn-2 위치에서 에스테르화된 ETrA를 전환시킬 수 있다. 바람직하게는, Δ8-불포화효소는 ETrA-PC보다 ETrA-CoA에 대한 더욱 큰 활성을 갖는다. Δ8-불포화효소는 또한 Δ6-불포화효소와 같은 활성을 가질 수 있고, 이것이 ALA에 대한 Δ6-불포화효소 활성보다 ETrA에 대한 더욱 큰 Δ8-불포화효소 활성을 가지는 한, Δ6/Δ8 이작용성 불포화효소라 불릴 수 있다. Δ8-불포화효소의 예는 표 1에 나열된다. 하나의 실시태양에서, 상기 Δ8-불포화효소는 서열번호 37에 제공된 바와 같은 서열, 그의 생물 활성 단편, 또는 서열번호 37와 적어도 80% 일치하는 아미노산 서열을 갖는 아미노산을 포함한다.

[0336]

본 발명에 사용된 바와 같이, "ω3-불포화효소"는 지방산 기질의 메틸 단부로부터 3 번째 탄소-탄소 결합에 탄소-탄소 이중 결합을 도입시키는 불포화효소 반응을 수행하는 단백질을 지칭한다. 따라서 ω3-불포화효소는 LA를 ALA로 및 GLA를 SDA로(모두 C18 지방산), 또는 DGLA를 ETA로 및/또는 ARA를 EPA로(C20 지방산) 전환시킬 수 있다. 일부 ω3-불포화효소(그룹 I)는 C18 기질, 예를 들어 식물 및 시아노세균성 ω3-불포화효소에 대해서만 활성을 갖는다. 상기와 같은 ω3-불포화효소는 또한 Δ15-불포화효소이다. 다른 ω3-불포화효소는, C18 기질에 대한 활성 없이(그룹 II) 또는 약간의 활성(그룹 III)과 함께 C20 기질에 대해 활성을 갖는다. 상기와 같은 ω3-불포화효소는 또한 Δ17-불포화효소이다. 바람직한 ω3-불포화효소는 LA를 ALA로, GAL를 SDA로, DGLA를 ETA로, ARA를 EPA로 전환시키는 그룹 III 유형, 예를 들어 피키아 파스토리스 ω3-불포화효소(서열번호 6)이다. ω3-불포화효소의 예는 하기 문헌들에 개시된 것들을 포함한다[Pereira et al. (2004a)(사프로레그니아 디클리나 ω3-불포화효소, 그룹 II), Horiguchi et al. (1998), Berberich et al. (1998) 및 Spychalla et al. (1997)(씨 엘레간스 ω3-불포화효소, 그룹 III)]. 바람직한 실시태양에서, 상기 ω3-불포화효소는 진균 ω3-불포화효소이다. 본 발명에 사용된 바와 같이, "진균 ω3-불포화효소"는 난균 공급원을 포함한 진균 공급원으로부터의 ω3-불포화효소, 또는 아미노산 서열이 상기와 적어도 95% 일치하는 그의 변체를 지칭한다. 다수의 ω

3-불포화효소를 암호화하는 유전자들이 진균 공급원, 예를 들어 피토프토라 인페스탄스(수납 번호 CAJ30870, W02005083053; 서열번호 47), 사프로레그니아 디클리나(수납 번호 AAR20444, 문헌[Pereira et al., 2004a] & US 7211656), 피티움 이레굴라레(W02008022963, 그룹 II; 서열번호 49), 모르티에렐라 알피나(문헌[Sakuradani et al., 2005]; 수납 번호 BAD91495; W02006019192), 탈라시오시라 슈도나나(문헌[Armbrust et al., 2004]; 수납 번호 XP_002291057; W02005012316, 서열번호 48), 라칸세아 클루이베리(또한 사카로마이세스 클루이베리로서 공지됨; 문헌[Oura et al., 2004]; 수납 번호 AB118663)로부터 단리되었다. 문헌[Xue et al. (2012)]은 ω 6 지방산 기질을 상응하는 ω 3 지방산(이때 C20 기질이 바람직하다)으로 효율적으로 전환시킬 수 있는 난균 피티움 아파니테르마툼, 피토프토라 소자애, 및 피토프토라 라모룸으로부터의 ω 3-불포화효소를 개시한다, 즉 상기 효소는 Δ 15-불포화효소 활성보다 더 강한 Δ 17-불포화효소 활성을 가졌다. 상기 효소는 Δ 12-불포화효소 활성이 없지만, 기질로서 아실-CoA 및 인지질 분획 모두에서 지방산을 사용할 수 있었다.

[0337] 보다 바람직한 실시태양에서, 상기 진균 ω 3-불포화효소는 피키아 파스토리스(또한 코마가타엘라 파스토리스로서 공지됨) ω 3-불포화효소/ Δ 15-불포화효소(문헌[Zhang et al., 2008]; 수납 번호 EF116884; 서열번호 6) 또는 상기와 적어도 95% 일치하는 폴리펩티드이다.

[0338] 하나의 실시태양에서, 상기 ω 3-불포화효소는 적어도 ARA에서 EPA로, DGLA에서 ETA로, GLA에서 SDA로 중 하나, ARA에서 EPA로 및 DGLA에서 ETA로 모두, ARA에서 EPA로 및 GLA에서 SDA로 모두, 또는 이들 중 3 개 전부로 전환시킬 수 있다.

[0339] 하나의 실시태양에서, 상기 ω 3-불포화효소는 적어도 3 개의 탄소-탄소 이중 결합을 갖는 C20 지방산, 바람직하게는 ARA에 대해 Δ 17-불포화효소 활성을 갖는다. 또 다른 실시태양에서, 상기 ω 3-불포화효소는 3 개의 탄소-탄소 이중 결합을 갖는 C18 지방산, 바람직하게는 GLA에 대해 Δ 15-불포화효소 활성을 갖는다. 바람직하게는 상기 두 활성이 모두 존재한다.

[0340] 본 발명에 사용된 바와 같이, " Δ 12-불포화효소"는 지방산 기질의 카복실 단부로부터 12 번째 탄소-탄소 결합에 탄소-탄소 이중 결합을 도입시키는 불포화효소 반응을 수행하는 단백질을 지칭한다. Δ 12-불포화효소는 전형적으로 올레오일-포스파티딜콜린 또는 올레오일-CoA를 각각 리놀레오일-포스파티딜콜린(18:1-PC) 또는 리놀레오일-CoA(18:1-CoA)로 전환시킨다. 상기 PC 결합된 기질을 사용하는 하위부류를 인지질-의존성 Δ 12-불포화효소라 칭하고, 후자의 하위부류를 아실-CoA 의존성 Δ 12-불포화효소라 칭한다. 식물 및 진균 Δ 12-불포화효소는 일반적으로 전자의 하위부류의 것인 반면, 동물 Δ 12-불포화효소는 후자의 하위부류의 것, 예를 들어 문헌[Zhou et al. (2008)]에 의해 곤충으로부터 클로닝된 유전자에 의해 암호화된 Δ 12-불포화효소이다. 다수의 다른 Δ 12-불포화효소 서열들을 서열 데이터베이스의 탐색에 의해 쉽게 확인할 수 있다.

[0341] 본 발명에 사용된 바와 같이, " Δ 15-불포화효소"는 지방산 기질의 카복실 단부로부터 15 번째 탄소-탄소 결합에 탄소-탄소 이중 결합을 도입시키는 불포화효소 반응을 수행하는 단백질을 지칭한다. Δ 15-불포화효소를 암호화하는 다수의 유전자들이 식물 및 진균 종으로부터 클로닝되었다. 예를 들어, US5952544는 식물 Δ 15-불포화효소(FAD3)를 암호화하는 핵산을 개시한다. 이들 효소는 식물 Δ 15-불포화효소의 특징인 아미노산 동기를 포함한다. W0200114538은 대두 FAD3를 암호화하는 유전자를 개시한다. 다수의 다른 Δ 15-불포화효소 서열을 서열 데이터베이스의 탐색에 의해 쉽게 확인할 수 있다.

[0342] 본 발명에 사용된 바와 같이, " Δ 17-불포화효소"는 지방산 기질의 카복실 단부로부터 17 번째 탄소-탄소 결합에 탄소-탄소 이중 결합을 도입시키는 불포화효소 반응을 수행하는 단백질을 지칭한다. Δ 17-불포화효소를 또한 상기 효소가 C20 기질상에서 작용하여 ω 3 결합에 불포화를 도입시키는 경우 ω 3-불포화효소로서 간주한다.

[0343] 바람직한 실시태양에서, 상기 Δ 12-불포화효소 및/또는 Δ 15-불포화효소는 진균 Δ 12-불포화효소 또는 진균 Δ 15-불포화효소이다. 본 발명에 사용된 바와 같이, "진균 Δ 12-불포화효소" 또는 "진균 Δ 15-불포화효소"는 난균 공급원을 포함한 진균 공급원으로부터의 Δ 12-불포화효소 또는 Δ 15-불포화효소, 또는 아미노산 서열이 적어도 95% 일치하는 그의 변체를 지칭한다. 다수의 불포화효소를 암호화하는 유전자들이 진균 공급원으로부터 단리되었다. US 7211656은 사프로레그니아 디클리나로부터의 Δ 12-불포화효소를 개시한다. W02009016202는 헬로브텔라 로부스타(*Helobdella robusta*), 라카리아 비콜라(*Laccaria bicolor*), 로티아 기간테아(*Lottia gigantea*), 마이크로콜레우스 크토노플라스테스(*Microcoleus chthonoplastes*), 모노시가 브레비콜리스(*Monosiga brevicollis*), 마이코스파에렐라 피지엔시스(*Mycosphaerella fijiensis*), 마이코스파에렐라 그라미니콜라(*Mycosphaerella graminicola*), 나에글레리아 그루벤(*Naegleria gruberi*), 넥트리아 하에마토코카(*Nectria haematococca*), 네마토스텔라 벡텐시스(*Nematostella vectensis*), 피코마이세스 블라케슬리아누스(*Phycomyces blakesleeana*), 트리코더마 레시이(*Trichoderma reesei*), 피스코미트렐라 파텐스(*Physcomitrella patens*), 포

스티아 플라센타(*Postia placenta*), 셀라기넬라 모엘렌도르피이(*Selaginella moellendorffii*) 및 마이크로도키움 니발레(*Microdochium nivale*)로부터의 진균 불포화효소를 개시한다. W02005/012316은 탈라시오시라 슈도나나 및 다른 진균으로부터의 $\Delta 12$ -불포화효소를 개시한다. W02003/099216은 뉴로스포라 크라사(*Neurospora crassa*), 아스퍼질러스 니둘란스(*Aspergillus nidulans*), 보트리티스 시네레아(*Botrytis cinerea*) 및 모르티에렐라 알피나(*Mortierella alpina*)로부터 단리된 진균 $\Delta 12$ -불포화효소 및 $\Delta 15$ -불포화효소를 암호화하는 유전자를 개시한다. W02007133425는 하기로부터 단리된 진균 $\Delta 15$ 불포화효소를 개시한다: 사카로마이세스 클루이베리, 모르티에렐라 알피나, 아스퍼질러스 니둘란스, 뉴로스포라 크라사, 푸사리움 그라미네아룸(*Fusarium graminearum*), 푸사리움 모닐리포르메(*Fusarium moniliforme*) 및 마그나포르테 그리세아(*Magnaporthe grisea*). 바람직한 $\Delta 12$ 불포화효소는 피토프토라 소자으로부터의 것이다(Ruiz-Lopez et al., 2012).

[0344] 진균 $\Delta 12$ -불포화효소, 및 진균 $\Delta 15$ -불포화효소의 독특한 하위부류는 이작용성 진균 $\Delta 12/\Delta 15$ -불포화효소이다. 이들을 암호화하는 유전자는 푸사리움 모노리포르메(수납 번호 DQ272516, Damude et al., 2006), 아칸타모에바 카스텔라니이(*Acanthamoeba castellanii*)(수납 번호 EF017656, Sayanova et al., 2006), 페르킨수스 마리누스(*Perkinsus marinus*)(W02007042510), 클라비셉스 푸르푸레아(*Claviceps purpurea*)(수납 번호 EF536898, Meesapyodsuk et al., 2007) 및 코프리누스 시네레우스(*Coprinus cinereus*)(수납 번호 AF269266, Zhang et al., 2007)로부터 클로닝되었다.

[0345] 또 다른 실시태양에서, 상기 $\omega 3$ -불포화효소는 상응하는 아실-PC 기질보다 아실-CoA 기질에 적어도 약간의 활성, 바람직하게는 더 큰 활성을 갖는다. 본 발명에 사용된 바와 같이, "상응하는 아실-PC 기질"은 지방산이 아실-CoA 기질에서와 동일한 지방산인 포스파티딜콜린(PC)의 sn-2 위치에서 에스테르화된 지방산을 지칭한다. 예를 들어, 상기 아실-CoA 기질은 ARA-CoA일 수 있으며 상응하는 아실-PC 기질은 sn-2 ARA-PC이다. 하나의 실시태양에서, 상기 활성은 적어도 2 배 더 크다. 바람직하게, 상기 $\omega 3$ -불포화효소는 아실-CoA 기질 및 그의 상응하는 아실-PC 기질 모두에 대해 적어도 약간의 활성을 가지며, C18 및 C20 기질 모두에 대해 활성을 갖는다. 상기와 같은 $\omega 3$ -불포화효소의 예는 상기 나열된 클로닝된 진균 불포화효소들 가운데 공지되어 있다.

[0346] 추가의 실시태양에서, 상기 $\omega 3$ -불포화효소는 서열번호 6에 제공된 서열, 그의 생물 활성 단편, 또는 서열번호 6에 적어도 60% 일치하는, 바람직하게는 서열번호 6에 적어도 90% 또는 적어도 95% 일치하는 아미노산 서열을 갖는 아미노산을 포함한다.

[0347] 더욱 추가의 실시태양에서, 본 발명에 사용하기 위한 불포화효소는 상응하는 아실-PC 기질보다 아실-CoA 기질에 더 큰 활성을 갖는다. 또 다른 실시태양에서, 본 발명에 사용하기 위한 불포화효소는 상응하는 아실-CoA 기질보다 아실-PC 기질에 더 큰 활성을 갖지만, 상기 두 기질 모두에 대해 약간의 활성을 갖는다. 상기에 개략한 바와 같이, "상응하는 아실-PC 기질"은 지방산이 상기 아실-CoA 기질에서와 동일한 지방산인 포스파티딜콜린(PC)의 sn-2 위치에서 에스테르화된 지방산을 지칭한다. 하나의 실시태양에서, 더 큰 활성은 적어도 2 배 더 크다. 하나의 실시태양에서, 상기 불포화효소는 $\Delta 5$ 또는 $\Delta 6$ -불포화효소, 또는 $\omega 3$ -불포화효소이며, 이들의 예는 비제한적으로 표 2에 나열된 것들을 제공한다. 불포화효소가 어느 기질, 즉 아실-CoA 또는 아실-PC 기질에서 작용하는지를 시험하기 위해서, 문헌[Domergue et al.(2003 and 2005)]에 개시된 바와 같이 효모 세포에서 분석을 수행할 수 있다. 불포화효소에 대한 아실-CoA 기질 능력은, 신장효소가 상기 불포화효소와 함께 발현될 때 식물 세포에서 적어도 약 90%의 효소 전환효율(이때 상기 신장효소는 상기 불포화효소의 산물의 신장을 촉매화한다)을 갖는 경우로 추론될 수 있다. 이를 근거로, GA7 구조물로부터 발현된 $\Delta 5$ -불포화효소 및 $\Delta 4$ -불포화효소(실시예 2, 도 2 및 서열번호 1 참조) 및 그의 변체(실시예 3)는 그들의 각각의 아실-CoA 기질, ETA-CoA 및 DPA-CoA를 불포화시킬 수 있다.

[0348] 신장효소

[0349] 생화학적 증거는 지방산 신장이 4 개의 단계, 즉 축합, 환원, 탈수 및 2차 환원으로 이루어짐을 암시한다. 본 발명과 관련하여, "신장효소"는 적합한 생리학적 조건 하에서, 신장 복합체의 다른 구성원들의 존재 하에서 축합 단계를 촉매화하는 폴리펩티드를 지칭한다. 세포에서 상기 신장 단백질 복합체의 오직 축합 성분("신장효소")만의 이종 또는 동종 발현이 각 아실 쇄의 신장에 필요한 것으로 나타났다. 따라서, 상기 도입된 신장효소는 트랜스제닉 호스트로부터 환원 및 탈수 활성들을 성공적으로 모집하여 성공적인 아실 신장을 수행할 수 있다. 지방산 기질의 쇄 길이 및 불포화 정도에 관하여 상기 신장 반응의 특이성은 상기 축합 성분 에 있는 것으로 생각된다. 상기 성분은 또한 상기 신장 반응의 율속 인자인 것으로 생각된다.

[0350] 본 발명에 사용된 바와 같이, " $\Delta 5$ -신장효소"는 적어도 EPA를 DPA로 전환시킬 수 있다. $\Delta 5$ -신장효소의 예는 W02005/013253에 개시된 것들을 포함한다. 하나의 실시태양에서, 상기 $\Delta 5$ -신장효소는 적어도 60%, 보다 바람

직하게는 적어도 65%, 보다 바람직하게는 적어도 70% 또는 가장 바람직하게는 적어도 80% 또는 90%의 효율로 DPA를 생산하는 EPA에 대한 활성을 갖는다. 추가의 실시태양에서, 상기 $\Delta 5$ -신장효소는 서열번호 25에 제공된 바와 같은 아미노산 서열, 그의 생물 활성 단편, 또는 서열번호 25에 적어도 47% 일치하는 아미노산 서열을 포함한다. 추가의 실시태양에서, 상기 $\Delta 6$ -신장효소는 오스트레오코쿠스 타우리이 또는 오스트레오코쿠스 루시마리누스로부터 유래된다(US2010/088776).

[0351] 본 발명에 사용된 바와 같이, " $\Delta 6$ -신장효소"는 적어도 SDA를 ETA로 전환시킬 수 있다. $\Delta 6$ -신장효소의 예는 표 1에 나열된 것들을 포함한다. 하나의 실시태양에서, 상기 신장효소는 서열번호 16에 제공된 바와 같은 서열, 그의 생물 활성 단편(예를 들어 서열번호 17으로서 제공된 단편), 또는 서열번호 16 및 서열번호 17 중 하나 또는 둘 다에 적어도 55% 일치하는 아미노산 서열을 갖는 아미노산을 포함한다. 하나의 실시태양에서, 상기 $\Delta 6$ -신장효소는 퍼스코미트렐라 파텐스(Zank et al., 2002; 수납 번호 AF428243) 또는 탈라시오시라 슈도나나(Ruiz-Lopez et al., 2012)로부터 유래된다.

[0352] 본 발명에 사용된 바와 같이, " $\Delta 9$ -신장효소"는 적어도 ALA를 ETrA로 전환시킬 수 있다. $\Delta 9$ -신장효소의 예는 표 1에 나열된 것들을 포함한다. 하나의 실시태양에서, 상기 $\Delta 9$ -신장효소는 서열번호 29에 제공된 바와 같은 서열, 그의 생물 활성 단편, 또는 서열번호 29에 적어도 80% 일치하는 아미노산 서열을 갖는 아미노산을 포함한다. 또 다른 실시태양에서, $\Delta 9$ -신장효소는 서열번호 31에 제공된 바와 같은 서열, 그의 생물 활성 단편, 또는 서열번호 31에 적어도 81% 일치하는 아미노산 서열을 갖는 아미노산을 포함한다. 또 다른 실시태양에서, $\Delta 9$ -신장효소는 서열번호 33에 제공된 바와 같은 서열, 그의 생물 활성 단편, 또는 서열번호 33에 적어도 50% 일치하는 아미노산 서열을 갖는 아미노산을 포함한다. 또 다른 실시태양에서, 상기 $\Delta 9$ -신장효소는 서열번호 35에 제공된 바와 같은 서열, 그의 생물 활성 단편, 또는 서열번호 35에 적어도 50% 일치하는 아미노산 서열을 갖는 아미노산을 포함한다. 추가의 실시태양에서, 상기 $\Delta 9$ -신장효소는 상응하는 $\omega 3$ 기질보다 $\omega 6$ 기질에 더 큰 활성을 갖거나 그 반대로 역시 같다.

[0353] 본 발명에 사용된 바와 같이, "상응하는 $\omega 3$ 기질보다 $\omega 6$ 기질에 더 큰 활성을 갖는다"란 용어는 $\omega 3$ 불포화효소의 작용에 따라 상이한 기질들에 대한 상기 효소의 상대 활성을 지칭한다. 바람직하게는, 상기 $\omega 6$ 기질은 LA이고 상기 $\omega 3$ 기질은 ALA이다.

[0354] $\Delta 6$ -신장효소 및 $\Delta 9$ -신장효소 활성을 갖는 신장효소는 적어도 (i) SDA를 ETA로 전환시킬 수 있고 (ii) ALA를 ETrA로 전환시킬 수 있으며 $\Delta 9$ -신장효소 활성보다 더 큰 $\Delta 6$ -신장효소 활성을 갖는다. 하나의 실시태양에서, 상기 신장효소는 적어도 50%, 보다 바람직하게는 적어도 60%인 ETA를 생산하는 SDA에 대한 전환효율, 및/또는 적어도 6% 또는 보다 바람직하게는 적어도 9%인 ETrA를 생산하는 ALA에 대한 전환효율을 갖는다. 또 다른 실시태양에서, 상기 신장효소는 $\Delta 9$ -신장효소 활성보다 적어도 약 6.5배 더 큰 $\Delta 6$ -신장효소 활성을 갖는다. 추가의 실시태양에서, 상기 신장효소는 검출 가능한 $\Delta 5$ -신장효소 활성을 갖지 않는다.

[0355] 다른 효소

[0356] 재조합 세포, 예컨대 미생물 세포, 또는 트랜스제닉 식물 또는 이의 부분에 도입된 트랜스유전자는 또한 LPAAT를 암호화할 수 있다. 본 발명에 사용된 바와 같이, "1-아실-글리세롤-3-포스페이트 아실트랜스퍼라제"(LPAAT)(또한 리소포스파티드산-아실트랜스퍼라제 또는 아실CoA-리소포스파티데이트-아실트랜스퍼라제라 칭한다)란 용어는 sn-2 위치에서 sn-1-아실-글리세롤-3-포스페이트(sn-1 G-3-P)를 아실화하여 포스파티드산(PA)을 형성시키는 단백질을 지칭한다. 따라서, "1-아실-글리세롤-3-포스페이트 아실트랜스퍼라제 활성"이란 용어는 PA(EC 2.3.1.51)를 생성시키는 sn-2 위치에서 sn-1 G-3-P의 아실화를 지칭한다. 바람직한 LPAAT는 기질로서 다중불포화 C22 아실-CoA를 사용하여 상기 다중불포화 C22 아실기를 LPA의 sn-2 위치로 운반하여 PA를 형성시킬 수 있는 것들이다. 하나의 실시태양에서, 다중불포화 C22 acyl-CoA는 DPA-CoA이다. 상기와 같은 LPAAT는 실시예 6에 예시되며 상기 중에 개시된 바와 같이 시험될 수 있다. 하나의 실시태양에서, 본 발명에 유용한 LPAAT는 서열번호 40 내지 46 중 어느 하나에 제공된 바와 같은 서열, 그의 생물 활성 단편, 또는 서열번호 40 내지 46 중 임의의 하나 이상에 적어도 40% 일치하는 아미노산 서열을 갖는 아미노산을 포함한다. 또 다른 실시태양에서, LPAAT는 서열번호 44에 제공된 바와 같은 서열을 갖는 아미노산을 갖지 않는다. 바람직한 실시태양에서, C22 다중불포화 지방산 acyl-CoA 기질을 사용할 수 있는 본 발명의 유용한 LPAAT, 바람직하게는 DPA-CoA는 서열번호 41, 42 및 44 중 어느 하나에 제공된 바와 같은 서열, 그의 생물 활성 단편, 또는 서열번호 41, 42 및 44 중 임의의 하나 이상에 적어도 40% 일치하는 아미노산 서열을 갖는 아미노산을 포함한다. 바람직한 실시태양에서, C22 다중불포화 지방산 acyl-CoA 기질을 사용할 수 있는 본 발명의 유용한 LPAAT, 바람직하게는 DPA-CoA는 서열번호 41 또는 42 중 어느 하나에 제공된 바와 같은 서열, 그의 생물 활성 단편, 또는 서열번호 41 및 42 중

임의의 하나 이상에 적어도 40% 일치하는 아미노산 서열을 갖는 아미노산을 포함한다. 하나의 실시태양에서, LPAAT는 바람직하게는 이의 아미노산 서열이 서열번호 44에 기재된 *모르티에렐라 알피나*(*Mortierella alpina*) LPAAT, 또는 DPA를 LPA로 전환하는 기질로서 DPA-CoA를 사용하여 *sn*-2 위치에 DPA를 갖는 PA를 형성할 수 있는 또 다른 LPAAT이다.

[0357] 재조합 세포, 트랜스제닉 식물 또는 이의 부분 내에 도입되는 트랜스유전자는 또한 DGAT를 암호화할 수 있다. 본 발명에 사용된 바와 같이, "다이하실글리세롤 아실트랜스퍼라제"(EC 2.3.1.20; DGAT)는 아실-CoA로부터 지방 아실기를 다이하실글리세롤 기질로 운반하여 트라이아실글리세롤을 생성시키는 단백질을 지칭한다. 따라서, "다이하실글리세롤 아실트랜스퍼라제 활성"이란 용어는 트라이아실글리세롤을 생성시키는 아실-CoA의 다이하실글리세롤로의 운반을 지칭한다. 각각 DGAT1, DGAT2 및 DGAT3 라 칭하는 3 개의 공지된 유형의 DGAT가 존재한다. DGAT1 폴리펩티드는 전형적으로 10 개의 막관통 도메인을 가지며, DGAT2는 전형적으로 2 개의 막관통 도메인을 갖는 반면, DGAT3은 전형적으로 용해성이다. DGAT1 폴리펩티드의 예는 아스페질러스 푸미가투스(*Aspergillus fumigatus*)(수납 번호 XP_755172), 아라비도프시스 탈리아나(*Arabidopsis thaliana*)(CAB44774), 리시누스 코뮤니스(*Ricinus communis*)(AAR11479), 베르니시아 포르디이(*Vernicia fordii*)(ABC94472), 베르노니아 갈라멘시스(*Vernonia galamensis*)(ABV21945, ABV21946), 유오니무스 알라투스(*Euonymus alatus*)(AAV31083), 카에노라브디티스 엘레간스(AAF82410), 라투스 노르베기쿠스(*Rattus norvegicus*)(NP_445889), 호모 사피엔스(NP_036211)로부터의 DGAT1 유전자뿐만 아니라 이들의 변종 및/또는 돌연변이체들에 의해 암호화된 폴리펩티드를 포함한다. DGAT2 폴리펩티드의 예는 아라비도프시스 탈리아나(수납 번호 NP_566952), 리시누스 코뮤니스(AAY16324), 베르니시아 포르디이(ABC94474), 모르티에렐라 라마니아나(*Mortierella ramanniana*)(AAK84179), 호모 사피엔스(Q96PD7, Q58HT5), 보스 타우루스(Q70VD8), 무스 무스쿨루스(AAK84175), 마이크로모나스 CCMP1545로부터의 DGAT2 유전자뿐만 아니라 이들의 변종 및/또는 돌연변이체들에 의해 암호화된 폴리펩티드를 포함한다. DGAT3 폴리펩티드의 예는 땅콩(아라키스 히포가에아, Saha, et al., 2006)로부터의 DGAT3 유전자뿐만 아니라 이들의 변종 및/또는 돌연변이체들에 의해 암호화된 폴리펩티드를 포함한다.

[0358] 폴리펩티드/펩티드

[0359] "폴리펩티드" 및 "단백질"이란 용어는 일반적으로 호환적으로 사용된다.

[0360] 폴리펩티드 또는 폴리펩티드의 부류는 기준 아미노산 서열과의 그의 아미노산 서열의 일치성(일치성%) 정도에 의해서, 또는 또 다른 것에 대해서보다 하나의 기준 아미노산 서열에 더 큰 일치성%를 가짐으로써 한정될 수 있다. 기준 아미노산 서열에 대한 폴리펩티드의 일치성%는 전형적으로 중단 생성 벌점 = 5 및 중단 연장 벌점 = 0.3의 매개변수로 GAP 분석(Needleman and Wunsch, 1970; GCG 프로그램)에 의해 측정한다. 조회 서열은 길이가 적어도 15 아미노산이며 상기 GAP 분석은 상기 두 서열을 적어도 15 아미노산의 영역에 걸쳐 정렬시킨다. 보다 바람직하게는, 상기 조회 서열은 길이가 적어도 50 아미노산이며 상기 GAP 분석은 상기 두 서열을 적어도 50 아미노산의 영역에 걸쳐 정렬시킨다. 보다 바람직하게는, 상기 조회 서열은 길이가 적어도 100 아미노산이며 상기 GAP 분석은 상기 두 서열을 적어도 100 아미노산의 영역에 걸쳐 정렬시킨다. 훨씬 더 바람직하게는, 상기 조회 서열은 길이가 적어도 250 아미노산이며 상기 GAP 분석은 상기 두 서열을 적어도 250 아미노산의 영역에 걸쳐 정렬시킨다. 훨씬 더 바람직하게는, 상기 GAP 분석은 상기 두 서열을 전체 길이에 걸쳐 정렬시킨다. 상기 폴리펩티드 또는 폴리펩티드의 부류는 상기 기준 폴리펩티드와 동일한 효소 활성, 또는 상기와 상이한 활성을 갖거나 상기 활성이 없을 수도 있다. 바람직하게, 상기 폴리펩티드는 상기 기준 폴리펩티드의 활성의 적어도 10%, 적어도 50%, 적어도 75%, 또는 적어도 90%의 효소 활성을 갖는다.

[0361] 본 발명에 사용된 바와 같이 "생물 활성" 단편은 완전길이 기준 폴리펩티드의 한정된 활성을 유지하는, 예를 들어 불포화효소 및/또는 신장효소 활성 또는 다른 효소 활성을 갖는 본 발명에 정의된 폴리펩티드의 일부이다. 본 발명에 사용된 바와 같은 생물 활성 단편은 완전길이 폴리펩티드를 제외한다. 생물 활성 단편은 상기 단편이 상기 한정된 활성을 유지하는 한 임의의 크기의 부분일 수 있다. 바람직하게, 상기 생물 활성 단편은 상기 완전길이 단백질의 활성의 적어도 10%, 적어도 50%, 적어도 75%, 또는 적어도 90%의 활성을 유지한다.

[0362] 한정된 폴리펩티드 또는 효소에 관하여, 본 발명에 제공된 것들보다 더 높은 일치성% 숫자는 바람직한 실시태양을 포함함을 알 것이다. 따라서, 적용 가능한 경우, 최소 일치성% 숫자에 비추어, 상기 폴리펩티드/효소가 관련된 지명된 서열번호와 적어도 60%, 보다 바람직하게는 적어도 65%, 보다 바람직하게는 적어도 70%, 보다 바람직하게는 적어도 75%, 보다 바람직하게는 적어도 76%, 보다 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 85%, 보다 바람직하게는 적어도 90%, 보다 바람직하게는 적어도 91%, 보다 바람직하게는 적어도 92%, 보다 바람직하게는 적어도 93%, 보다 바람직하게는 적어도 94%, 보다 바람직하게는 적어도 95%, 보다 바람직하게는

적어도 96%, 보다 바람직하게는 적어도 97%, 보다 바람직하게는 적어도 98%, 보다 바람직하게는 적어도 99%, 보다 바람직하게는 적어도 99.1%, 보다 바람직하게는 적어도 99.2%, 보다 바람직하게는 적어도 99.3%, 보다 바람직하게는 적어도 99.4%, 보다 바람직하게는 적어도 99.5%, 보다 바람직하게는 적어도 99.6%, 보다 바람직하게는 적어도 99.7%, 보다 바람직하게는 적어도 99.8%, 및 훨씬 더 바람직하게는 적어도 99.9% 일치하는 아미노산 서열을 포함하는 것이 바람직하다.

[0363] 본 발명에 정의된 폴리펩티드의 아미노산 서열 변체/돌연변이체를, 적합한 뉴클레오타이드 변화를 본 발명에 정의된 핵산에 도입시키거나 목적하는 폴리펩티드의 시험관내 합성에 의해 제조할 수 있다. 상기와 같은 변체/돌연변이체는 예를 들어 상기 아미노산 서열내 잔기의 결실, 삽입 또는 치환을 포함한다. 결실, 삽입 및 치환의 조합을 최종 구조물에 도달하도록 수행할 수 있으나, 단 상기 최종 펩티드 생성물은 목적하는 효소 활성을 가져야 한다.

[0364] 돌연변이(변경된) 펩티드를 당해 분야에 공지된 임의의 기법을 사용하여 제조할 수 있다. 예를 들어, 하라야마(Harayama)(1998)에 의해 광범위하게 개시된 바와 같이 본 발명에 정의된 폴리뉴클레오타이드에 대해 시험관내 돌연변이 또는 DNA 서플링 기법을 수행할 수 있다. 돌연변이된/변경된 DNA로부터 유도된 생성물을 본 발명에 개시된 기법을 사용하여 선별하여, 상기 생성물이 예를 들어 불포화효소 또는 신장효소 활성을 갖는지를 쉽게 측정할 수 있다.

[0365] 아미노산 서열 돌연변이체의 설계에 있어서, 돌연변이 부위의 위치 및 돌연변이의 성질은 변형되는 특징(들)에 따라 변할 것이다. 상기 돌연변이 부위들을 예를 들어 (1) 먼저 선택된 보존적 아미노산으로 치환하고 이어서 성취되는 결과에 따라 보다 근본적인 선택으로 치환하거나 (2) 표적 잔기를 결실시키거나 (3) 배치된 위치에 인접한 다른 잔기들을 삽입함으로써 개별적으로 또는 연속해서 변형시킬 수 있다.

[0366] 아미노산 서열 결실은 일반적으로 약 1 내지 15 개의 잔기, 보다 바람직하게는 약 1 내지 10 개의 잔기, 및 전형적으로 약 1 내지 약 5 개의 연속적인 잔기들의 범위이다.

[0367] 치환 돌연변이체는 폴리펩티드 중에 하나 이상의 아미노산 잔기가 제거되고 대신에 상이한 잔기가 삽입된다. 치환 돌연변이유발에 가장 크게 중요한 부위는 천연 불활성효소 또는 신장효소들 가운데 보존되지 않은 부위를 포함한다. 이들 부위는 바람직하게는 효소 활성을 유지시키기 위해서 비교적 보존적인 방식으로 치환된다. 상기와 같은 보존적 치환을 표 3에 "예시적인 치환"의 제목하에 나타낸다.

[0368] 바람직한 실시태양에서 돌연변이체/변체 폴리펩티드는 천연 폴리펩티드와 비교시 단지 1 또는 2 또는 3 또는 4 개, 또는 그 이하의 보존적 아미노산 변화를 갖는다. 보존적 아미노산 변화에 대한 세부사항들을 표 3에 제공한다. 숙련가가 알고 있는 바와 같이, 상기와 같은 작은 변화들은 재조합 세포에서 발현시 상기 폴리펩티드의 활성을 변경시키지 않음이 합당하게 예견될 수 있다.

표 3

예시적인 아미노산 치환

원래의 잔기	예시적인 치환
Ala (A)	val; leu; ile; gly
Arg (R)	lys
Asn (N)	gln; his
Asp (D)	glu
Cys (C)	ser
Gln (Q)	asn; his
Glu (E)	asp
Gly (G)	pro, ala
His (H)	asn; gln
Ile (I)	leu; val; ala
Leu (L)	ile; val; met; ala; phe
Lys (K)	arg
Met (M)	leu; phe
Phe (F)	leu; val; ala
Pro (P)	gly
Ser (S)	thr
Thr (T)	ser
Trp (W)	tyr
Tyr (Y)	trp; phe
Val (V)	ile; leu; met; phe, ala

[0369]

[0370]

폴리뉴클레오티드

[0371]

본 발명은 또한 예를 들어 유전자, 단리된 폴리뉴클레오티드, 키메라 유전자 구조물, 예를 들어 T-DNA 분자, 또는 키메라 DNA일 수 있는 폴리뉴클레오티드의 사용을 제공한다. 상기는 게놈 또는 합성 기원의 이중 가닥 또는 단일 가닥의 DNA 또는 RNA이고 탄수화물, 지질, 단백질 또는 다른 물질과 결합하여 본 발명에 정의된 특정한 활성을 수행할 수 있다. "폴리뉴클레오티드"란 용어는 본 발명에서 "핵산 분자"란 용어와 호환적으로 사용된다.

[0372]

하나의 실시태양에서, 폴리뉴클레오티드는 비-천연적으로 발생한 것이다. 비-천연적으로 발생한 폴리뉴클레오티드의 예로는, 이에 제한되는 것은 아니나, 돌연변이된 것(예컨대 본 명세서에 기재된 방법을 사용함), 및 단백질을 암호화하는 오픈 리딩 프레임(open reading frame)이 천연적으로 관련되지 않은 프로모터(예컨대 본 명세서에 기재된 구조물에서)에 작동가능하게 연결된 폴리뉴클레오티드를 포함한다.

[0373]

본 발명에 사용된 바와 같이, "유전자"란 용어는 그의 가장 넓은 의미로 해석되어야 하며 전사된 영역, 및 번역된 경우, 구조 유전자의 단백질 암호화 영역을 포함하고 어느 한 단부에, 약 2 kb 이상의 거리로 5' 및 3' 단부 모두상의 암호화 영역에 인접하여 위치한 서열을 포함하며 상기 유전자의 발현에 관련되는 데옥시리보뉴클레오티드 서열을 포함한다. 이에 관하여, 상기 유전자는 주어진 유전자와 자연적으로 관련된 조절 신호, 예를 들어 프로모터, 인핸서, 종결 및/또는 폴리아데닐화 신호, 또는 이중 조절 신호(이 경우에, 상기 유전자를 "키메라 유전자"라 칭한다)를 포함한다. 상기 단백질 암호화 영역의 5'에 위치하고 mRNA상에 존재하는 서열을 5' 비-번역 서열이라 칭한다. 상기 단백질 암호화 영역의 3' 또는 하류에 위치하고 mRNA상에 존재하는 서열을 3' 비-번역 서열이라 칭한다. "유전자"란 용어는 유전자의 cDNA 및 게놈 형태 모두를 포함한다. 유전자의 게놈 형태 또는 클론은 "인트론", 또는 "중재 영역" 또는 "중재 서열"이라 칭하는 비-암호화 서열로 중단될 수도 있는 암호화 영역을 함유한다. 인트론은 핵 RNA(hnRNA)로 전사되는 유전자의 분절이다. 인트론은 조절 요소, 예를 들어 인핸서를 함유할 수도 있다. 인트론은 핵 또는 1차 전사물로부터 제거되거나 "연접 파괴"된다; 따라서 인트론은 상기 전령 RNA(mRNA) 전사물에 존재하지 않는다. 상기 mRNA는 번역하는 동안 발생 폴리펩티드 중의 아미노산의 서열 또는 순서를 명시하는 작용을 한다. "유전자"란 용어는 본 발명에 개시된 단백질 전부 또는 그의 일부를 암호화하는 합성 또는 융합 분자 및 상기 중 어느 하나에 대한 상보성 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0374]

본 발명에 사용된 바와 같이, "키메라 DNA" 또는 "키메라 유전자 구조물" 또는 유사물은 그의 고유의 위치에서 고유의 DNA 분자가 아닌 DNA를 지칭하며; 또한 본 발명에서 "DNA 구조물"이라 칭한다. 전형적으로, 키메라 DNA 또는 키메라 유전자는 자연에서 함께 작동적으로 연결되어 발견되지 않는, 즉 서로에 대해 이중인 조절 및 전사

된 또는 단백질 암호화 서열을 포함한다. 따라서, 키메릭 DNA 또는 키메릭 유전자는 상이한 출처로부터 유래되는 조절 서열 및 암호화 서열, 또는 동일한 출처로부터 유래되지만 자연에서 발견되는 것과 상이한 방식으로 배열되는 조절 서열 및 암호화 서열을 포함할 수 있다.

[0375] "내인성 유전자"는 유기체의 게놈 중 그의 본래 위치의 고유 유전자를 지칭한다. 본 발명에 사용된 바와 같이, "재조합 핵산 분자", "재조합 폴리뉴클레오타이드" 또는 그의 변형들은 재조합 DNA 기술에 의해 제작되거나 변형된 핵산 분자를 지칭한다. "외래 폴리뉴클레오타이드" 또는 "외인성 폴리뉴클레오타이드" 또는 "이종 폴리뉴클레오타이드"와 같은 용어들은 실험 조작에 의해 세포의 게놈내로 도입되는 임의의 핵산을 지칭한다. 외래 또는 외인성 유전자는 비-고유 유기체에 삽입되는 유전자, 고유 숙주내 새로운 위치에 도입된 고유 유전자, 또는 키메릭 유전자일 수 있다. "트랜스유전자"는 형질전환 과정에 의해 게놈내로 도입된 유전자이다. "유전자 변형된", "트랜스제닉"이란 용어 및 그의 변형들은 유전자를 형질전환 또는 형질도입에 의해 세포에 도입시키거나, 유전자를 세포에서 돌연변이시키고 유전자가 작용하는 세포 또는 유기체 또는 이들의 자손에서 상기 유전자의 조절을 변경 또는 조절함으로써 세포에 유전자를 도입시킴을 포함한다. 본 발명에 사용된 바와 같은 "게놈 영역"은 트랜스유전자, 또는 트랜스유전자들의 그룹(또한 본 발명에서 클러스터라 칭한다)이 세포 또는 그의 선조에 삽입된, 게놈내 위치를 지칭한다. 상기와 같은 영역은 오직 인간의 중재에 의해 통합된, 예를 들어 본 발명에 개시된 방법들에 의해 통합된 뉴클레오타이드를 포함한다.

[0376] 폴리뉴클레오타이드와 관련하여 "외인성"이란 용어는 그의 고유의 상태에 비해, 세포 중에 변경된 양으로 존재하는 폴리뉴클레오타이드를 지칭한다. 하나의 실시태양에서, 상기 세포는 상기 폴리뉴클레오타이드를 자연적으로 포함하지 않는 세포이다. 그러나, 상기 세포는 암호화된 폴리펩티드를 변경된 양으로 생성시키는 비-내인성 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 세포일 수 있다. 외인성 폴리뉴클레오타이드는 존재하는 트랜스제닉(재조합) 세포, 또는 무세포 발현 시스템의 다른 성분들로부터 분리되지 않은 폴리뉴클레오타이드, 및 상기와 같은 세포 또는 무세포 시스템에서 생산되고 후속으로 적어도 일부 다른 성분들로부터 정제되는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 상기 외인성 폴리뉴클레오타이드(핵산)는 자연에 존재하는 뉴클레오타이드의 연속적인 신장부, 또는 단일 폴리뉴클레오타이드를 형성하기 위해 결합된 상이한 출처(천연 및/또는 합성)로부터의 뉴클레오타이드의 2 개 이상의 연속적인 신장부일 수 있다. 전형적으로, 상기와 같은 키메릭 폴리뉴클레오타이드는, 관심 세포 중에서 개방 판독 프레임의 전사를 구동하기에 적합한 프로모터에 작동적으로 연결된 폴리펩티드를 암호화하는 개방 판독 프레임을 적어도 포함한다.

[0377] 상기 정의된 폴리뉴클레오타이드에 관하여, 상기에 제공된 것을 초과하는 일치율% 숫자는 바람직한 실시태양을 포함함을 알 것이다. 따라서, 적용가능한 경우, 최소 일치율% 숫자에 비추어, 상기 폴리뉴클레오타이드는 관련된 지명된 서열번호에 60% 이상, 보다 바람직하게는 65% 이상, 보다 바람직하게는 70% 이상, 보다 바람직하게는 75% 이상, 보다 바람직하게는 80% 이상, 보다 바람직하게는 85% 이상, 보다 바람직하게는 90% 이상, 보다 바람직하게는 91% 이상, 보다 바람직하게는 92% 이상, 보다 바람직하게는 93% 이상, 보다 바람직하게는 94% 이상, 보다 바람직하게는 95% 이상, 보다 바람직하게는 96% 이상, 보다 바람직하게는 97% 이상, 보다 바람직하게는 98% 이상, 보다 바람직하게는 99% 이상, 보다 바람직하게는 99.1% 이상, 보다 바람직하게는 99.2% 이상, 보다 바람직하게는 99.3% 이상, 보다 바람직하게는 99.4% 이상, 보다 바람직하게는 99.5% 이상, 보다 바람직하게는 99.6% 이상, 보다 바람직하게는 99.7% 이상, 보다 바람직하게는 99.8% 이상, 보다 바람직하게는 99.9% 이상 일치하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것이 바람직하다.

[0378] 폴리뉴클레오타이드는 천연 분자에 비해 뉴클레오타이드 잔기의 결실, 삽입, 또는 치환인 하나 이상의 돌연변이를 가질 수 있다. 기준 서열에 비해 돌연변이를 갖는 폴리뉴클레오타이드는 천연(즉, 천연 출처로부터 단리된)이거나 합성(예를 들어 상술한 바와 같이 핵산상에서 부위-지향된 돌연변이 또는 DNA 서폴링을 수행함으로써)일 수 있다. 따라서, 폴리뉴클레오타이드는 천연 공급원 또는 재조합체로부터 유래할 수 있음이 자명하다. 바람직한 폴리뉴클레오타이드는 당해 분야에 공지된 바와 같이, 식물 세포에서 번역을 위해 코돈-최적화된 암호화 영역을 갖는 것들이다.

[0379] 재조합 벡터

[0380] 재조합 발현은 본 발명의 재조합 세포, 또는 식물 또는 식물 부분을 생성하는데 사용될 수 있다. 재조합 벡터는 이종 폴리뉴클레오타이드 서열, 즉 바람직하게는 폴리뉴클레오타이드 분자(들)가 유래된 종 이외의 종으로부터 유래되는, 본 발명에 정의된 폴리뉴클레오타이드 분자에 인접하여 자연에서 발견되지 않는 폴리뉴클레오타이드 서열을 함유한다. 상기 벡터는 RNA 또는 DNA일 수 있으며 전형적으로는 플라스미드이다. 플라스미드 벡터는 전형적으로, 용이한 선택, 증폭, 및 원핵생물 세포에서 발현 카세트의 형질전환을 제공하는 추가적인 핵산 서열을

포함하며, 예를 들어 pUC-유도된 벡터, pSK-유도된 벡터, pGEM-유도된 벡터, pSP-유도된 벡터, pBS-유도된 벡터, 또는 바람직하게는 하나 이상의 T-DNA 영역을 함유하는 2원 벡터를 포함한다. 추가적인 핵산 서열은 상기 벡터의 자율적인 복제를 제공하는 복제의 기원, 선택성 마커 유전자, 바람직하게는 항생제 또는 제초제 내성을 암호화하는 유전자, 핵산 서열 또는 핵산 구조물에서 암호화된 유전자를 삽입하기 위한 다수의 부위를 제공하는 독특한 다중 클로닝 부위, 및 원핵생물 및 진핵생물(특히 식물) 세포의 형질전환을 증대시키는 서열을 포함한다. 상기 재조합 벡터는 하나보다 많은 본 발명에 정의된 폴리뉴클레오티드, 예를 들어 3, 4, 5 또는 6 개의 본 발명에 정의된 폴리뉴클레오티드를, 바람직하게는 본 발명에 기재된 키메릭 유전자 구조물과 함께 포함할 수 있으며, 각각의 폴리뉴클레오티드는 관심 세포에서 작동 가능한 발현 조절 서열에 작동적으로 연결된다. 바람직하게는, 발현 조절 서열은 이중 프로모터를 포함하거나 전부 이중 프로모터이다. 즉, 이들은 이들이 조절하는 코딩 영역에 대해 이중이다. 하나보다 많은 본 발명에 정의된 폴리뉴클레오티드, 예를 들어 상이한 폴리펩티드를 암호화하는 각각의 3, 4, 5 또는 6 개의 폴리뉴클레오티드, 바람직하게는 7개 또는 8개의 폴리뉴클레오티드는, 바람직하게는 단일 재조합 벡터에서, 바람직하게는 단일 T-DNA 분자 내에서 함께 공유 결합되며, 이어서 단일 분자로서 세포내에 도입되어 본 발명에 따른 재조합 세포를 형성하고, 바람직하게는 상기 재조합 세포, 예를 들어 트랜스제닉 식물의 게놈에 통합될 수 있다. 게놈은 핵의 게놈 또는 트랜스제닉 식물의 원형자 게놈으로 통합될 수 있다. 이에 의해, 상기와 같이 결합된 폴리뉴클레오티드는 재조합 세포 또는 식물의 자손에서 단일 유전자 자리로서 함께 유전될 것이다. 상기 재조합 벡터 또는 식물은 2 개 이상의 상기와 같은 재조합 벡터를 포함할 수 있으며, 이들은 각각 다수의 폴리뉴클레오티드를 함유하고, 예를 들어 각각의 재조합 벡터는 3, 4, 5 또는 6 개의 폴리뉴클레오티드를 포함한다.

[0381] 본 발명에 사용된 바와 같은 "작동적으로 연결되는"은 2 개 이상의 핵산(예를 들어 DNA) 분절간의 작용 관계를 지칭한다. 전형적으로, 전사된 서열에 대한 전사 조절 요소(프로모터)의 작용 관계를 지칭한다. 예를 들어, 프로모터는, 상기가 적합한 세포 중의 암호화 서열의 전사를 자극하거나 조절하는 경우, 본 발명에서 정의된 폴리뉴클레오티드와 같은 암호화 서열에 작동적으로 연결된다. 일반적으로, 전사된 서열에 작동적으로 연결된 프로모터 전사 조절 요소는 상기 전사된 서열에 물리적으로 인접한다, 즉 상기는 시스-작용이다. 그러나, 일부 전사 조절 요소, 예를 들어 인헨서는 상기가 증대시키는 전사를 갖는 암호화 서열에 물리적으로 인접하거나 가깝게 위치할 필요가 없다.

[0382] 다수의 프로모터가 존재하는 경우, 각각의 프로모터는 독립적으로 동일하거나 상이할 수 있다. 바람직하게는, 적어도 3개 최대 6개까지 상이한 프로모터 서열이 외인성 폴리뉴클레오티드의 발현을 조절하기 위하여 재조합 벡터에 사용된다.

[0383] 재조합 분자, 예를 들어 키메릭 DNA 또는 유전자 구조물은 또한 (a) 본 발명에 정의된 발현된 폴리펩티드를, 상기 폴리펩티드를 생산하는 세포로부터 분비되게 할 수 있는 신호 펩티드 서열을 암호화하거나 또는 상기 발현된 폴리펩티드의 국소화, 예를 들어 세포내 소포체(ER) 중의 상기 폴리펩티드의 체류 또는 색소체내로의 이동을 제공하는 하나 이상의 분비 신호, 및/또는 (b) 융합 단백질로서 핵산 분자의 발현을 도출하는 융합 서열을 함유할 수 있다. 적합한 신호 분절의 예는 본 발명에 정의된 폴리펩티드의 분비 또는 국소화를 지시할 수 있는 임의의 신호 분절을 포함한다. 재조합 분자는 또한 본 발명에 정의된 핵산 분자의 핵산 서열 주변 및/또는 내부의 중재 및/또는 번역되지 않은 서열을 포함할 수 있다.

[0384] 형질전환체의 식별을 용이하게 하기 위해서, 상기 핵산 구조물은 바람직하게는 외래 또는 외인성 폴리뉴클레오티드로서 또는 이외에 선택성 또는 선별성 마커 유전자를 포함한다. "마커 유전자"는 상기 마커 유전자를 발현하는 세포에 독특한 표현형을 부여하고 따라서 상기와 같은 형질전환된 세포를 상기 마커를 갖지 않는 세포와 구분되게 하는 유전자를 의미한다. 선택성 마커 유전자는 선택제(예를 들어 제초제, 항생제, 방사선, 열, 또는 형질전환되지 않은 세포에 손상을 주는 다른 처리)에 대한 내성을 근거로 "선택"할 수 있는 특징을 부여한다. 선별성 마커 유전자(또는 리포터 유전자)는 관찰 또는 시험을 통해서, 즉 "선별"(예를 들어 형질전환되지 않은 세포 중에 존재하지 않는 β -글루쿠로니다제, 루시페라제, GFP 또는 다른 효소 활성화)에 의해 식별될 수 있는 특징을 부여한다. 상기 마커 유전자 및 관심 뉴클레오티드 서열은 연결시킬 필요가 없다. 마커의 실제 선택은, 상기 마커가 식물 세포와 같이 선택 세포와 함께 작용성인(즉 선택성인) 한 중요하지 않다.

[0385] 선택성 마커의 예는 항생제 내성, 예를 들어 암피실린, 에리스로마이신, 클로람페니콜 또는 테트라사이클린 내성, 바람직하게는 가나마이신 내성을 부여하는 마커이다. 식물 형질전환체의 선택을 위해 예시적인 선택성 마커는 비제한적으로 하이그로마이신 B 내성을 암호화하는 hyg 유전자; 가나마이신, 파로모마이신, G418에 대한 내성을 부여하는 네오마이신 포스포트랜스퍼라제(nptII) 유전자; 예를 들어 EP 256233에 개시된 바와 같이 글루타치온 유도된 제초제에 대한 내성을 부여하는 래트 간으로부터의 글루타치온-S-트랜스퍼라제 유전자; 예를 들

어 WO 87/05327에 개시된 바와 같이 과발현시 포스포노트리신과 같은 글루타민 신타제 억제제에 대한 내성을 부여하는 글루타민 신타제 유전자; 예를 들어 EP 275957에 개시된 바와 같이 선택성 작용제 포스포노트리신에 대한 내성을 부여하는 스트렙토마이세스 비리도크로모제네스로부터의 아세틸트랜스퍼라제 유전자; 예를 들어 문헌 [Hinchee et al. (1988)]에 개시된 바와 같이 N-포스포노메틸글리신에 대한 내성을 부여하는 5-에놀쉬키메이트-3-포스페이트 신타제(EPSPS)를 암호화하는 유전자; 또는 바람직하게는 예를 들어 W091/02071에 개시된 바와 같은 바이알라포스에 대한 내성을 부여하는 *bar* 유전자를 포함한다.

[0386] 바람직하게, 상기 핵산 구조물은 식물 세포와 같은 세포의 게놈에 안정하게 통합된다. 따라서, 상기 핵산은 상기 분자가 상기 게놈, 바람직하게는 T-DNA 분자의 우측 및 좌측 경계 서열에 통합되게 하거나 상기 구조물이 상기 세포의 염색체내로 통합될 수 있게 하는 적합한 벡터 중에 놓이는 적합한 요소들을 포함할 수 있다.

[0387] 발현

[0388] 본 발명에 사용된 바와 같이, 발현 벡터는 숙주 세포를 형질전환시킬 수 있고 하나 이상의 명시된 폴리뉴클레오티드 분자(들)의 발현을 수행할 수 있는 DNA 벡터이다. 본 발명의 발현 벡터는 식물 세포 또는 재조합 세포, 예컨대 미생물 세포에서 유전자 발현을 지시할 수 있다. 본 발명에 유용한 발현 벡터는 조절 서열, 예를 들어 전사 조절 서열, 번역 조절 서열, 복제 기원, 및 재조합 세포와 양립성이고 본 발명의 폴리뉴클레오티드 분자의 발현을 조절하는 다른 조절 서열들을 함유한다. 특히, 본 발명에 유용한 폴리펩티드 또는 벡터는 전사 조절 서열을 포함한다. 전사 조절 서열은 전사의 개시, 연장 및 종결을 조절하는 서열이다. 특히 중요한 전사 조절 서열은 전사 개시를 조절하는 것, 예를 들어 프로모터 및 인핸서 서열이다. 적합한 전사 조절 서열은 본 발명의 재조합 세포들 중 하나 이상에서 작용할 수 있는 임의의 전사 조절 서열을 포함한다. 사용되는 조절 서열의 선택은 표적 유기체, 예를 들어 관심 식물 및/또는 표적 기관 또는 조직에 따라 변한다. 상기과 같은 조절 서열을 식물 또는 식물 바이러스와 같은 임의의 진핵생물 유기체로부터 수득하거나 화학적으로 합성할 수 있다. 다양한 상기과 같은 전사 조절 서열은 당해 분야의 숙련가들에게 공지되어 있다. 특히 바람직한 전사 조절 서열은 식물 또는 그의 부분의 용도에 따라, 구성적으로 또는 단계 및/또는 조직 특이적으로, 상기 식물에서의 전사를 지시하는데 활성인 프로모터이다.

[0389] 식물 세포의 안전한 형질감염 또는 트랜스제닉 식물의 확립에 적합한 다수의 벡터들이 예를 들어 하기의 문헌들에 개시되었다: Pouwels et al., Cloning Vectors: A Laboratory Manual, 1985, supp. 1987, Weissbach and Weissbach, Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, 1989, 및 Gelvin et al., Plant Molecular Biology Manual, Kluwer Academic Publishers, 1990. 전형적으로, 식물 발현 벡터는 예를 들어 5' 및 3' 조절 서열의 전사 조절 하에 하나 이상의 클로닝된 식물 유전자 및 우세한 선택성 마커를 포함한다. 상기과 같은 식물 발현 벡터는 또한 프로모터 조절 영역(예를 들어 유도성 또는 구성적인, 환경적으로 또는 발생적으로-조절된, 또는 세포- 또는 조직-특이적인 발현을 조절하는 조절 영역), 전사 개시 출발 부위, 리보솜 결합 부위, RNA 가공 신호, 전사 종결 부위, 및/또는 폴리아데닐화 신호를 함유할 수 있다.

[0390] 식물 세포에서 활성인 다수의 구성 프로모터가 개시되었다. 식물에서 구성적 발현에 적합한 프로모터는 비제한적으로 콜리플라워 모자이크 바이러스(CaMV) 35S 프로모터, 피그위트 모자이크 바이러스(FMV) 35S, 및 리볼로스-1,5-비스-포스페이트 카복실라제의 작은 서브유닛으로부터의 빛-유도성 프로모터를 포함한다.

[0391] 잎, 종자, 뿌리 또는 줄기와 같은 식물의 출처 조직들에서의 발현을 위해서, 본 발명에서 사용되는 프로모터들은 이들 특정 조직에서 비교적 높은 발현을 갖는 것이 바람직하다. 다수의 예들이 당업계에 잘 알려져 있다. 환경, 호르몬, 화학적 및/또는 발생 신호에 응답하여 조절되는 다양한 식물 유전자 프로모터들을 또한 식물 세포에서의 유전자의 발현에 사용하거나 기관-특이성 프로모터를 사용하는 것이 또한 유리할 수도 있다.

[0392] 본 발명에 사용된 바와 같이, "종자 특이성 프로모터"란 용어 또는 다른 변형은 다른 식물 조직에 비해 식물의 발생 종자, 바람직하게는 브라시카 종(*Brassica sp.*), 카멜리나 사티바(*Camelina sativa*) 또는 지. 맥스(*G. max*) 식물에서의 유전자 전사를 우선적으로 지시하는 프로모터를 지칭한다. 하나의 실시태양에서, 상기 종자 특이성 프로모터는 상기 식물의 잎 및/또는 줄기에 비해 상기 식물의 발생 종자에서 적어도 5 배 더 강하게 발현되며, 바람직하게는 다른 식물 조직에 비해 상기 발생 종자의 배에서 더 강하게 발현된다. 바람직하게, 상기 프로모터는 오직 상기 발생 종자에서 관심 유전자의 발현만을 지시하고/하거나, 상기 식물의 다른 부분, 예를 들어 잎에서의 관심 유전자의 발현은 노던 블롯 분석 및/또는 RT-PCR에 의해 검출될 수 없다. 전형적으로, 상기 프로모터는 상기 종자의 성장 및 발달 동안, 특히 상기 종자에서의 저장 화합물의 합성 및 축적 단계 동안 유전자의 발현을 구동한다. 상기과 같은 프로모터는 전체 식물 저장 기관 또는 단지 그의 부분, 예를 들어 바람직하게는 배, 쌍떡잎 식물의 종자 또는 외떡잎 식물의 종자의 내배유 또는 호분층 중 종피 또는 떡잎(들)에서

유전자 발현을 구동할 수 있다.

[0393] 종자-특이성 발현에 바람직한 프로모터는 i) 지질 생합성 및 종자 중 축적에 관련된 효소, 예를 들어 지방산 불포화효소 및 신장효소를 암호화하는 유전자로부터의 프로모터, ii) 종자 저장 단백질을 암호화하는 유전자로부터의 프로모터, 및 iii) 종자중 탄수화물 생합성 및 축적에 관련된 효소를 암호화하는 유전자로부터의 프로모터를 포함한다. 적합한 종자 특이성 프로모터는 유지종자 유채 나뭇잎 유전자 프로모터(US 5,608,152), 누에콩 USP 프로모터(Baumlein et al., 1991), 아라비도프시스 올레오신 프로모터(WO 98/45461), 파세올루스 불가리스 파세올린 프로모터(US 5,504,200), 브라시카 Bce4 프로모터(WO 91/13980), 또는 비시아 파바(*Vicia faba*)로부터의 레구민 LeB4 프로모터(Baumlein et al., 1992), 및 옥수수, 보리, 밀, 호밀, 벼 등과 같은 외떡잎식물에서의 종자-특이성 발현을 도출하는 프로모터들이다. 적합한 주목할만한 프로모터들은 보리 lpt2 또는 lpt1 유전자 프로모터(WO 95/15389 및 WO 95/23230), 또는 WO 99/16890에 개시된 프로모터들(보리 호르데인 유전자, 벼 글루텔린 유전자, 벼 오리진 유전자, 벼 프롤아민 유전자, 밀 글리아딘 유전자, 밀 글루텔린 유전자, 옥수수 제인 유전자, 귀리 글루텔린 유전자, 수수 카시린 유전자, 호밀 세칼린 유전자로부터의 프로모터들)이다. 다른 프로모터는 하기에 개시된 것들을 포함한다: Broun et al. (1998), Potenza et al. (2004), US 20070192902 및 US 20030159173. 하나의 실시태양에서, 상기 종자 특이성 프로모터는 배, 떡잎(들) 또는 내배유와 같은 종자의 한정된 부분들에서 우선적으로 발현된다. 상기와 같은 특이성 프로모터의 예는 비제한적으로 FP1 프로모터(Ellestrom et al., 1996), 완두콩 레구민 프로모터(Perrin et al., 2000), 콩 피토헤마글루티닌 프로모터(Perrin et al., 2000), 아마 2S 저장 단백질을 암호화하는 유전자에 대한 콘리닌 1 및 콘리닌 2 프로모터(Cheng et al., 2010), 아라비도프시스 탈리아나로부터의 FAE1 유전자의 프로모터, 브라시카 나푸스의 글로불린-유사 단백질 유전자의 BnGLP 프로모터, 리눔 유스타티시몹으로부터의 퍼옥시레독신 유전자의 LPXR 프로모터를 포함한다.

[0394] 5' 비-번역 리더 서열은 본 발명의 폴리뉴클레오티드의 이중 유전자 서열을 발현하도록 선택된 프로모터로부터 유래하거나 생성되는 효소의 암호화 영역에 대해서 이중이며, 경우에 따라 mRNA의 번역을 증가시키기 위해서 특이적으로 변형될 수도 있다. 트랜스유전자의 최적화 발현에 대한 리뷰에 대해서, 문헌[Koziel et al.(1996)]을 참조하시오. 상기 5' 비-번역 영역을 또한 식물 바이러스 RNA(특히 담배 모자이크 바이러스, 담배 부식 바이러스, 옥수수 오갈병 모자이크 바이러스, 알팔파 모자이크 바이러스)로부터, 적합한 진핵생물 유전자, 식물 유전자(밀 및 옥수수 염색소 a/b 결합 단백질을 유전자 리더)로부터, 또는 합성 유전자 서열로부터 획득할 수 있다. 본 발명은, 상기 비-번역 영역이 상기 프로모터 서열을 수반하는 5' 비-번역 서열로부터 유도된 구조물로 제한되지 않는다. 상기 리더 서열은 또한 관련없는 프로모터 또는 암호화 서열로부터 유도될 수도 있다. 본 발명과 관련하여 유용한 리더 서열은 옥수수 Hsp70 리더(US5,362,865 및 US5,859,347), 및 TMV 오메가 요소를 포함한다.

[0395] 전사의 종결은 키메릭 벡터에서 관심 폴리뉴클레오티드에 작동적으로 연결된 3' 비-번역 DNA 서열에 의해 수행된다. 재조합 DNA 분자의 3' 비-번역 영역은, 식물에서 상기 RNA의 3' 단부에 대한 아데닐레이트 뉴클레오티드의 첨가를 야기하는 작용을 하는 폴리아데닐화 신호를 함유한다. 상기 3' 비-번역 영역을 식물 세포에서 발현된 다양한 유전자로부터 획득할 수 있다. 노팔린 신타제 3' 비번역 영역, 완두콩 작은 서브유닛 루비스코 유전자로부터의 3' 비번역 영역, 대두 7S 종자 저장 단백질 유전자 또는 아마 콘리닌 유전자로부터의 3' 비번역 영역이 상기 능력에 통상적으로 사용된다. 아그로박테리움 종양-유도(Ti) 플라스미드 유전자의 폴리아데닐화 신호를 함유하는 3' 전사된, 비-번역 영역이 또한 적합하다.

[0396] 재조합 DNA 기술을 사용하여, 예를 들어 숙주 세포내 폴리뉴클레오티드 분자의 사본수, 상기 폴리뉴클레오티드 분자가 전사되는 효율, 생성되는 전사물이 번역되는 효율, 및 번역-후 변형의 효율을 조작함으로써 형질전환된 폴리뉴클레오티드 분자의 발현을 개선시킬 수 있다. 본 발명에 정의된 폴리뉴클레오티드 분자의 발현을 증가시키기 위해 유용한 재조합 기법은 비제한적으로 하나 이상의 숙주세포 염색체내 상기 폴리뉴클레오티드 분자의 통합, mRNA에 안정성 서열의 첨가, 전사 조절 신호(예를 들어 프로모터, 오퍼레이터, 인핸서)의 치환 또는 변형, 번역 조절 신호(예를 들어 리보솜 결합 부위, 샤프인-달가노 서열)의 치환 또는 변형, 숙주 세포의 코돈 사용에 상응하도록 폴리뉴클레오티드 분자의 변형, 및 전사물을 탈안정화하는 서열의 결실을 포함한다.

[0397] 트랜스제닉 식물

[0398] 본 발명에서 명사로 사용되는 용어 "식물"은 전체 식물을 지칭하지만, 형용사로서 사용되는 경우 예를 들어 식물 기관(예를 들어 잎, 줄기, 뿌리, 꽃), 단세포(예를 들어 꽃가루), 종자, 식물 세포 등과 같이 식물 중에 존재하거나, 상기로부터 수득되거나, 상기로부터 유래되거나 상기와 관련되는 임의의 물질을 의미한다. "식물 부

분"이란 용어는 상기 식물 부분이 본 발명에 따른 지질을 합성하는 한, 식물 DNA를 포함하는 모든 식물 부분, 예를 들어 식물 구조, 예를 들어 잎 또는 줄기, 뿌리, 꽃 기관 또는 구조, 꽃가루, 종자, 종자 부분, 예를 들어 배, 내배유, 배반, 또는 종피, 식물 조직, 예를 들어 관 조직, 세포 및 그의 자손을 의미한다.

[0399] "트랜스제닉 식물", "유전자 변형된 식물" 또는 이들의 변형은 동일한 중, 품종 또는 품종의 야생형 식물에서 발견되지 않는 유전자 구조물("트랜스유전자")를 함유하는 식물을 지칭한다. 본 발명과 관련하여 정의된 바와 같은 트랜스제닉 식물은 재조합 기법을 사용하여 유전자 변형시켜 목적하는 식물 또는 식물 기관에 지질 또는 본 발명에 정의된 하나 이상의 폴리펩티드를 생성시킨 식물 및 그의 자손을 포함한다. 트랜스제닉 식물 세포 및 트랜스제닉 식물 부분은 상응하는 의미를 갖는다. 본 발명에서 지칭되는 바와 같은 "트랜스유전자"는 생물 공학 분야에서의 통상적인 의미를 가지며, 재조합 DNA 또는 RNA 기술에 의해 생성되거나 변경되고 식물 세포에 도입된 유전자 서열을 포함한다. 상기 트랜스유전자는 상기 트랜스유전자가 도입되는 식물 세포와 동일한 중, 변종 또는 품종, 또는 상이한 중, 변종 또는 품종으로부터의 것일 수 있는 식물 세포, 또는 식물 세포 이외의 세포로부터 유도된 유전자 서열을 포함할 수 있다. 전형적으로, 상기 트랜스유전자를 인간 조작에 의해, 예를 들어 형질전환에 의해 상기 세포, 예를 들어 식물에 도입시켰지만, 당해 분야의 숙련가가 인정하는 바와 같은 임의의 방법을 사용할 수 있다.

[0400] "종자" 및 "그레인"이란 용어는 본 발명에서 호환적으로 사용된다. "그레인"은 성숙한 그레인, 예를 들어 수확된 그레인, 또는 여전히 식물상에 있지만 수확할 준비가 된 그레인을 지칭하지만, 문맥에 따라 침윤 또는 발아 후의 그레인을 지칭할 수도 있다. 성숙한 그레인은 통상적으로 약 18 내지 20% 미만, 바람직하게는 10% 미만의 수분 함량을 갖는다. 브라시카 종자, 예컨대 카놀라 종자는 전형적으로 성숙시 약 4-8% 또는 6-8%, 바람직하게는 약 4% 또는 약 6%의 수분 함량을 갖는다. 본 발명에 사용된 바와 같은 "발생 종자"는 수정 또는 개화 후 식물의 생식 구조에서 전형적으로 발견되는, 성숙전의 종자를 지칭하지만, 식물로부터 단리된 성숙전의 상기와 같은 종자를 또한 지칭할 수 있다.

[0401] 본 발명에 사용된 바와 같이, "식물 부분을 수득함" 또는 "종자를 수득함"이란 용어는 각각 식물 부분 또는 종자를 수득하는 임의의 수단, 예를 들어 필드에서 또는 온실 또는 생육 챔버와 같은 봉쇄구역에서 식물 부분 또는 식물로부터의 종자의 수확, 또는 상기 식물 부분 또는 종자의 공급자로부터 구입 또는 수령에 의한 수단을 지칭한다. 온실에서의 표준 재배 조건은 자연 일광을 사용한 22-24℃의 주간 온도 및 16-18℃의 야간 온도를 포함한다. 상기 종자는 식재에 적합하거나, 즉 발아 및 자손 식물 생산이 가능하거나 한편으로 더 이상 발아할 수 없도록 하는 방식으로 처리되었다, 예를 들어 식품 또는 사료 용도에 유용하거나 또는 본 발명의 지질의 추출에 유용한 열분해되거나, 손질되거나 또는 분쇄된 종자일 수 있다.

[0402] 본 발명에 사용된 바와 같이, "식물 저장 기관"이란 용어는 예를 들어 단백질, 탄수화물, 지질의 형태로 에너지를 저장하도록 분화된 식물의 부분을 지칭한다. 식물 저장 기관의 예는 종자, 열매, 괴근 및 괴경이다. 바람직한 식물 저장 기관은 종자이다.

[0403] 본 발명의 식물 또는 식물 부분, 또는 본 발명에 사용되는 식물 또는 식물 부분은 바람직하게는 표현형적으로 정상적이다. 본 발명에 사용된 바와 같이, "표현형적으로 정상적인"이란 용어는 변형되지 않은 식물 또는 식물 기관에 비해 성장 및 번식 능력이 현저하게 감소되지 않은 종자, 덩이줄기 또는 열매와 같은 유전자 변형된 식물 또는 식물 기관, 특히 저장 기관을 지칭한다. 하나의 실시태양에서, 표현형적으로 정상적인 유전자 변형된 식물 또는 식물 기관은 외인성 폴리뉴클레오티드(들)를 포함하지 않는 상응하는 식물 또는 기관과 본질적으로 동일한 성장 또는 번식 능력을 갖는다. 바람직하게, 바이오매스, 증식률, 발아율, 저장 기관 크기, 꽃가루 생존력, 수술 및 암술 수정능력, 종자 크기 및/또는 생산된 생육성 종자의 수는 동일한 조건 하에서 생육시 상기 외인성 폴리뉴클레오티드가 없는 식물의 경우의 90% 이상이다. 바람직하게는, 본 발명의 식물, 또는 본 발명의 종자로부터 생산된 식물의 꽃가루 생존력은 상응하는 야생형 식물의 꽃가루 생존력 대비 약 100%이다. 상기 용어는, 야생형 식물과 상이할 수 있지만 상업적인 목적을 위해 상기 식물의 유용성에 영향을 주지 못하는 상기 식물의 특징들, 예를 들어 묘목잎의 발레리나 표현형은 포함하지 않는다.

[0404] 본 발명의 실시예에 사용하기 위해 제공되거나 고려되는 식물은 외떡잎 및 쌍떡잎 식물 모두를 포함한다. 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 식물은 농작물(예를 들어 곡류 및 콩류, 옥수수, 밀, 감자, 타피오카, 벼, 수수, 기장, 카사바, 보리 또는 완두콩), 또는 다른 콩과 식물이다. 상기 식물을 식용 뿌리, 괴경, 잎, 줄기, 꽃 또는 열매의 생산을 위해 재배할 수 있다. 상기 식물은 야채 또는 관상용 식물일 수 있다. 본 발명의 식물, 또는 본 발명에 유용한 식물은 옥수수(제아 메이스), 캐놀라(브라시카 나푸스, 브라시카 라파 종), 겨자(브라시카 유체아), 아마(리눔 유시타티시움), 알팔파(메디카고 사티바), 벼(오리자 사티바), 호밀(세칼레 세탈레), 수수

(소르검 비콜로르, 소르검 불가레), 해바라기(헬리안투스 안누스), 밀(트리티움 아에스티븀), 대두(글리시네 맥스), 담배(니코티아나 타바쿰), 감자(솔라눔 튜베로썬), 땅콩(아라키스 히포가에아), 면(고시피움 히르수툼), 고구마(로프모에아 바타투스), 카사바(마니호트 에스쿨렌타), 커피(코페아 종), 코코넛(코코스 누시페라), 파인애플(아나나 코모수스), 시트리스 나무(시트리스 종), 코코아(테오브로마 카카오), 차(카멜리아 세넨시스), 바나나(뮤사 종), 아보카도(페르세아 아메리카나), 무화과(피쿠스 카시카), 구아바(프시디움 구아자바), 망고(만지페르 인디카), 올리브(올레아 유로파에아), 파파야(카리카 파파야), 캐슈(아나카르디움 옥시덴탈레), 마카다미아(마카다미아 인테르그리폴리아), 아몬드(프루누스 아미그달루스), 사탕무(베타 불가리스), 귀리 또는 보리 일 수 있다.

[0405] 바람직한 실시태양에서, 상기 식물은 속씨식물이다.

[0406] 하나의 실시태양에서, 상기 식물은 유지종자 식물, 바람직하게는 유지종자 작물이다. 본 발명에 사용된 바와 같이, "유지종자 식물"은 상기 식물의 종자로부터 상업적인 오일 생산에 사용되는 식물 종이다. 상기 유지종자 식물은 유지종자 유채(예를 들어 캐놀라), 옥수수, 해바라기, 대두, 수수, 아마(아마인) 또는 사탕무일 수 있다. 더욱 또한, 상기 유지종자 식물은 다른 배추속, 면, 땅콩, 양귀비, 겨자, 아주까리, 참깨, 해바라기, 잇꽃, *카멜리나(Camelina)*, *크람베(Crambe)* 또는 너트 생산 식물일 수 있다. 상기 식물은 그의 열매, 예를 들어 올리브, 오일팜 또는 코코넛 중에 높은 수준의 오일을 생산한다. 본 발명이 적용될 수 있는 원예식물은 상추, 앤다이브, 또는 양배추, 브로콜리 또는 콜리플라워를 포함한 채소 배추속이다. 본 발명을 담배, 박, 당근, 딸기, 토마토 또는 후추에 적용할 수도 있다.

[0407] 추가의 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 트랜스제닉 식물의 생산에 사용되는 비-트랜스제닉 식물은 i) 20% 미만, 10% 미만 또는 5% 미만의 18:2 지방산 및/또는 ii) 10% 미만 또는 5% 미만의 18:3 지방산을 갖는, 특히 종자 중의 오일을 생산한다.

[0408] 바람직한 실시태양에서, 상기 트랜스제닉 식물 또는 그의 부분은 그의 자손이 목적하는 표현형에 대해 분리되지 않도록 도입된(트랜스유전자) 각각 및 모든 유전자(외인성 폴리뉴클레오티드)에 대해 동형접합성이다. 상기 트랜스제닉 식물은 또한 도입된 트랜스유전자(들)에 대해서 이형접합성, 바람직하게는 예를 들어 하이브리드 종자로부터 번식된 F1 자손에서 트랜스유전자에 대해 균일하게 이형접합성일 수 있다. 상기와 같은 식물들은 당해 분야에 널리 공지된, 잡종 강세와 같은 이점을 제공할 수 있거나 식물 번식 또는 역교배에 사용될 수 있다.

[0409] 적합한 경우, 상기 트랜스제닉 식물 또는 그의 부분은 LC-PUFA의 생산에 관련된 추가적인 트랜스유전자 암호화효소, 예를 들어 비제한적으로 $\Delta 6$ -불포화효소, $\Delta 9$ -신장효소, $\Delta 8$ -불포화효소, $\Delta 6$ -신장효소, $\Delta 5$ -불포화효소, $\omega 3$ -불포화효소, $\Delta 5$ -신장효소, 다이아실글리세롤 아실트랜스퍼라제, LPAAT, $\Delta 17$ -불포화효소, $\Delta 15$ -불포화효소 및/또는 $\Delta 12$ 불포화효소를 또한 포함할 수 있다. 이들 활성 중 하나 이상을 갖는 상기와 같은 효소의 예는 당해 분야에 공지되어 있으며 본 발명에 개시된 것들을 포함한다. 특정한 실시예에서, 상기 트랜스제닉 식물은 적어도 하기를 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드의 세트를 포함한다:

[0410] a) $\Delta 5$ -불포화효소, $\Delta 6$ -불포화효소, $\Delta 5$ -신장효소 및 $\Delta 6$ -신장효소,

[0411] b) $\Delta 5$ -불포화효소, $\Delta 8$ -불포화효소, $\Delta 5$ -신장효소 및 $\Delta 9$ -신장효소,

[0412] c) $\Delta 5$ -불포화효소, $\Delta 6$ -불포화효소, $\Delta 5$ -신장효소, $\Delta 6$ -신장효소, 및 $\Delta 15$ -불포화효소,

[0413] d) $\Delta 5$ -불포화효소, $\Delta 8$ -불포화효소, $\Delta 5$ -신장효소, $\Delta 9$ -신장효소, 및 $\Delta 15$ -불포화효소,

[0414] e) $\Delta 5$ -불포화효소, $\Delta 6$ -불포화효소, $\Delta 5$ -신장효소, $\Delta 6$ -신장효소, 및 $\Delta 17$ -불포화효소,

[0415] f) $\Delta 5$ -불포화효소, $\Delta 8$ -불포화효소, $\Delta 5$ -신장효소, $\Delta 9$ -신장효소, 및 $\Delta 17$ -불포화효소,

[0416] g) $\omega 3$ -불포화효소 또는 $\Delta 15$ -불포화효소, $\Delta 6$ -불포화효소, $\Delta 5$ -불포화효소, $\Delta 6$ -신장효소 및 $\Delta 5$ -신장효소,

[0417] h) $\omega 3$ -불포화효소 또는 $\Delta 15$ -불포화효소, $\Delta 8$ -불포화효소, $\Delta 5$ -불포화효소, $\Delta 9$ -신장효소 및 $\Delta 5$ -신장효소,

[0418] i) $\Delta 12$ -불포화효소, $\omega 3$ -불포화효소 또는 $\Delta 15$ -불포화효소, $\Delta 6$ -불포화효소, $\Delta 5$ -불포화효소, $\Delta 6$ -신장효소 및 $\Delta 5$ -신장효소,

[0419] j) $\Delta 12$ -불포화효소, $\omega 3$ -불포화효소 또는 $\Delta 15$ -불포화효소, $\Delta 8$ -불포화효소, $\Delta 5$ -불포화효소, $\Delta 9$ -신장효소 및 $\Delta 5$ -신장효소,

[0420] k) 1-아실-글리세롤-3-포스페이트 아실트랜스퍼라제(LPAAT), $\omega 3$ -불포화효소, $\Delta 6$ -불포화효소, $\Delta 5$ -불포화효소,

Δ6-신장효소, 및 Δ5-신장효소,

- [0421] l) 1-아실-글리세롤-3-포스페이트 아실트랜스퍼라제(LPAAT), Δ15-불포화효소, Δ6-불포화효소, Δ5-불포화효소, Δ6-신장효소, 및 Δ5-신장효소,
- [0422] m) 1-아실-글리세롤-3-포스페이트 아실트랜스퍼라제(LPAAT), Δ12-불포화효소, Δ6-불포화효소, Δ5-불포화효소, Δ6-신장효소, 및 Δ5-신장효소,
- [0423] n) 1-아실-글리세롤-3-포스페이트 아실트랜스퍼라제(LPAAT), Δ12-불포화효소, ω3-불포화효소 및/또는 Δ15-불포화효소, Δ6-불포화효소, Δ5-불포화효소, Δ6-신장효소 및 Δ5-신장효소,
- [0424] o) 1-아실-글리세롤-3-포스페이트 아실트랜스퍼라제(LPAAT), ω3-불포화효소, Δ8-불포화효소, Δ5-불포화효소, Δ9-신장효소, 및 Δ5-신장효소,
- [0425] p) 1-아실-글리세롤-3-포스페이트 아실트랜스퍼라제(LPAAT), Δ15-불포화효소, Δ8-불포화효소, Δ5-불포화효소, Δ9-신장효소 및 Δ5-신장효소,
- [0426] q) 1-아실-글리세롤-3-포스페이트 아실트랜스퍼라제(LPAAT), Δ12-불포화효소, Δ8-불포화효소, Δ5-불포화효소, Δ9-신장효소 및 Δ5-신장효소, 또는
- [0427] r) 1-아실-글리세롤-3-포스페이트 아실트랜스퍼라제(LPAAT), Δ12-불포화효소, ω3-불포화효소 및/또는 Δ15-불포화효소, Δ8-불포화효소, Δ5-불포화효소, Δ9-신장효소 및 Δ5-신장효소.
- [0428] 하나의 실시태양에서, 상기 외인성 폴리뉴클레오티드는 피티움 이레굴라레 Δ6-불포화효소, 트라우스토키티리드 Δ5-불포화효소 또는 에밀리아나 혁슬레이 Δ5-불포화효소, 피스코미트렐라 파텐스 Δ6-신장효소, 트라우스토키티리드 Δ5-신장효소 또는 오스트레오커스 타우리이 Δ5-신장효소, 및 피토프토라 인페스탄스 ω3-불포화효소 또는 피티움 이레굴라레 ω3-불포화효소인 폴리펩티드들의 세트를 암호화한다.
- [0429] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 식물들, 또는 본 발명을 위해 사용되는 식물들을 필드에서, 본질적으로 동일한 적어도 1,000, 1,000,000 또는 2,000,000 개 식물들의 집단으로서, 또는 적어도 1 헥타아르 또는 2 헥타아르의 면적에서 재배한다. 재식 밀도는 식물 종, 식물 품종, 기후, 토양 조건, 비료 비율 및 당해 분야에 공지된 다른 인자들에 따라 상이하다. 예를 들어 캐놀라는 전형적으로 헥타아르당 120만 내지 150만 식물의 재식 밀도로 재배된다. 식물을 당해 분야에 공지된 바와 같이 수확하며, 이는 상기 식물의 지상부를 베어내고, 줄지어 늘어 놓고/놓거나 거둬 들인 다음, 상기 식물 물질을 타작하고/하거나 키질하여 종종 왕겨 형태의 상기 식물 부분의 나머지에서부터 종자를 분리시킴을 포함할 수 있다. 한편으로, 종자를 단일 공정으로, 즉 콤바인 수확으로 필드에서 식물로부터 수확할 수도 있다.
- [0430] *식물의 형질전환*
- [0431] 트랜스제닉 식물을 당해 분야에 공지된 기법, 예를 들어 문헌[A. Slater et al., Plant Biotechnology - The Genetic Manipulation of Plants, Oxford University Press (2003)] 및 문헌[P. Christou and H. Klee, Handbook of Plant Biotechnology, John Wiley and Sons (2004)]에 일반적으로 개시된 바와 같은 기법을 사용하여 생산할 수 있다.
- [0432] 본 발명에 사용된 바와 같이, "안정하게 형질전환되는", "안정하게 형질전환된"이란 용어들 및 그의 변형들은 세포 분열 동안 그의 존재에 대한 양의 선택의 필요 없이 자손 세포로 전달되도록 세포의 게놈에 외인성 핵산 분자를 통합시킴을 지칭한다. 안정한 형질전환체, 또는 그의 자손을 당해 분야에 공지된 임의의 수단, 예를 들어 염색체 DNA 상에서의 서던 블롯 또는 게놈 DNA의 원위치 하이브리드화에 의해 선택할 수 있다. 바람직하게는, 식물 형질전환은 본 발명의 실시예에 기재된 바와 같이 수행된다.
- [0433] 아그로박테리움-매개된 전달은, DNA를 상기 DNA의 식물 세포 게놈내로의 일시적인 발현 또는 안정한 통합을 위해 전체 식물 조직, 식물 기관 또는 조직 배양물 중의 외식체 중의 세포에 도입시킬 수 있으므로, 유전자를 식물 세포에 도입시키기 위해 널리 적용할 수 있는 시스템이다. DNA를 식물 세포에 전달할 수 있는 아그로박테리움 또는 다른 세균을 사용하는 플라스미드 침투법을 포함하여 DNA를 식물 세포에 도입시키기 위한 아그로박테리움-매개된 식물 통합 벡터의 용도는 당해 분야에 널리 공지되어 있다(예를 들어 US 5177010, US 5104310, US 5004863, 또는 US 5159135를 참조하시오). 전달되는 DNA의 영역은 경계 서열에 의해 한정되며, 중재 DNA(T-DNA)가 대개 식물 게놈내로 삽입된다. 더욱이, 상기 T-DNA의 통합은 거의 재배열을 생성시키지 않는 비교적 정밀한 과정이다. 아그로박테리움-매개된 형질전환이 효율적인 식물 품종들에서, 상기는 상기 유전자 전달의 용

이하고 한정된 성질로 인해 선택되는 방법이다. 바람직한 아그로박테리움 형질전환 벡터는 개시된 바와 같이 이 콜라이뿐만 아니라 아그로박테리움에서 복제가 가능하여 편리한 조작을 허용한다(Klee et al., In: Plant DNA Infectious Agents, Hohn and Schell, eds., Springer-Verlag, New York, pp. 179-203 (1985)).

[0434] 사용될 수 있는 가속화 방법은 예를 들어 미세입자 투사법 등을 포함한다. 식물 세포에 형질전환 핵산 분자의 전달 방법의 일례가 미세입자 투사법이다. 상기 방법은 문헌[Yang et al., Particle Bombardment Technology for Gene Transfer, Oxford Press, Oxford, England (1994)]에 리뷰되어 있다. 비-생물 입자(미세투사물)를 핵산으로 코팅하고 추진력에 의해 세포내로 전달할 수 있다. 예시적인 입자는 텅스텐, 금, 백금 등을 포함하는 것들을 포함한다. 미세입자 투사법의 특징한 이점은 상기가 외떡잎식물을 번식가능하게 형질전환시키는 유효한 수단이라는 것 외에, 원형질체의 단리도, 아그로박테리움 감염의 민감성도 필요하지 않다는 것이다.

[0435] 또 다른 대안적인 실시태양에서, 색소체를 안정하게 형질전환시킬 수 있다. 고등 식물에서 색소체 형질전환에 대해 개시된 방법은, 선택성 마커를 함유하고 동종 재조합을 통해 상기 색소체 계통에 대해 DNA를 표적화하는, DNA의 입자 건 전달을 포함한다(US 5,451,513, US 5,545,818, US 5,877,402, US 5,932,479, 및 WO 99/05265).

[0436] 세포 형질전환의 다른 방법들을 또한 사용할 수 있으며 여기에는 비제한적으로 꽃가루내로의 직접적인 DNA 전달에 의해서, 식물의 번식 기관내로의 DNA의 직접 주입에 의해서, 또는 미성숙 배의 세포내로 DNA를 직접 주입한 다음 탈수된 배의 재수화에 의해서 식물내로 DNA를 도입시킴이 포함된다.

[0437] 단일 식물 원형질체 형질전환체로부터 또는 다양한 형질전환된 외식체로부터 식물의 재생, 발생, 및 배양은 당해 분야에 널리 공지되어 있다(Weissbach et al., In: Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, San Diego, Calif., (1988)). 상기 재생 및 생육 과정은 전형적으로 형질전환된 세포의 선택, 뿌리내린 묘목 단계를 통한 배 발생의 통상적인 단계를 통해 개별화된 세포들의 배양을 포함한다. 트랜스제닉 배 및 종자는 유사하게 재생된다. 그 후에 생성된 트랜스제닉의 뿌리내린 어린싹을 토양과 같은 적합한 식물 생육 배지에 심는다.

[0438] 상기 외래, 외인성 유전자를 함유하는 식물의 발생 또는 재생은 당해 분야에 널리 공지되어 있다. 바람직하게, 상기 재생된 식물은 자가-수분되어 동형접합성 트랜스제닉 식물을 제공한다. 달리, 상기 재생된 식물로부터 수득된 꽃가루를 작물학적으로 중요한 계통의 종자-생육된 식물과 교배한다. 환원하면, 상기 중요한 계통의 식물로부터의 꽃가루를 사용하여 재생된 식물을 수분한다. 목적하는 외인성 핵산을 함유하는 본 발명의 트랜스제닉 식물을 당해 분야의 숙련가들에게 널리 공지된 방법을 사용하여 재배한다.

[0439] 트랜스제닉 세포 및 식물 중의 상기 트랜스유전자의 존재를 확인하기 위해서, 폴리머라제 쉘 반응(PCR) 증폭 또는 서던 블롯 분석을 당해 분야의 숙련가들에게 공지된 방법을 사용하여 수행할 수 있다. 상기 트랜스유전자의 발현 산물을 상기 산물의 성질에 따라 다양한 방식들 중 어느 하나로 검출할 수 있으며, 상기 방식은 웨스턴 블롯 및 효소 분석을 포함한다. 일단 트랜스제닉 식물이 수득되었으면, 상기 식물을 목적하는 표현형을 갖는 식물 조직 또는 부분을 생산하도록 생육시킬 수 있다. 상기 식물 조직 또는 식물 부분을 수확하고/하거나 종자를 수거할 수 있다. 상기 종자는 상기 목적하는 특성들을 갖는 조직 또는 부분을 갖는 추가의 식물들을 생육시키기 위한 공급원으로서 작용할 수 있다.

[0440] 아그로박테리움 또는 다른 형질전환 방법을 사용하여 형성된 트랜스제닉 식물은 전형적으로 하나의 염색체상에 단일의 트랜스제닉 자리를 함유한다. 상기과 같은 트랜스제닉 식물을 첨가된 유전자(들)에 대해 반접합성인 것으로 칭할 수 있다. 첨가된 유전자(들)에 대해 동형접합성인 트랜스제닉 식물, 즉 하나의 염색체 쌍의 각각의 염색체상의 동일한 자리에 하나씩, 2 개의 첨가된 유전자를 함유하는 트랜스제닉 식물이 보다 바람직하다. 동형접합성 트랜스제닉 식물을, 반접합성 트랜스제닉 식물을 자가-수분하고, 생성된 종자 중 일부를 발아시키고, 관심 유전자에 대해 생성된 식물을 분석함으로써 수득할 수 있다.

[0441] 2 개의 독립적으로 분리되는 외인성 유전자 또는 자리를 함유하는 2 개의 상이한 트랜스제닉 식물을 또한 교배(교잡)시켜 상기 두 유전자 또는 자리 세트들 모두 함유하는 자손을 생산할 수 있는 것으로 생각된다. 적합한 F1 자손의 자가수정은 상기 두 외인성 유전자 또는 자리에 대해 동형접합성인 식물들을 생산할 수 있다. 모 식물에 대한 역-교배 및 비-트랜스제닉 식물과의 이종교배가 또한, 생장 번식과 같이, 고려된다. 상이한 특성 및 작물에 대해 통상적으로 사용되는 다른 육종 방법들에 대한 설명을 문헌[Fehr, In: Breeding Methods for Cultivar Development, Wilcox J. ed., American Society of Agronomy, Madison Wis. (1987)]에서 찾을 수 있다.

[0442] 외인성 RNA 수준의 증대 및 안정화된 발현

- [0443] 침묵화 억제인자
- [0444] 하나의 실시태양에서, 식물 세포, 식물 또는 식물 부분은 침묵화 억제인자 단백질을 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 포함한다.
- [0445] 전사후 유전자 침묵화(PTGS)는 외래(이종) 또는 내인성 DNA로 안정하게 또는 일시적으로 형질전환된 식물 또는 진균에서 분해 PTGS 발생에 대해 세포 및 바이러스 mRNA 모두를 표적화할 수 있고 도입된 핵산과 서열 유사성을 갖는 RNA 분자의 감소된 축적을 생성시키는 뉴클레오티드 서열-특이성 방어 기전이다.
- [0446] 침묵화 억제인자와 관심 트랜스유전자와의 공-발현이 상기 트랜스유전자로부터 전사된 세포 중에 존재하는 RNA의 수준을 증가시킬 것임은 널리 생각되어 왔다. 이는 시험관내 세포의 경우 참인 것으로 입증되었지만, 다수의 전체적인 식물 공-발현 연구들에서 상당한 부작용들이 관찰되었다. 보다 구체적으로, 문헌[Mallory et al. (2002)], [Chapman et al. (2004)], [Chen et al. (2004)], [Dunoyer et al. (2004)], [Zhang et al. (2006)], [Lewsey et al. (2007)] 및 [Meng et al. (2008)]에 개시된 바와 같이, 침묵화 억제인자를 발현하는 식물들은 일반적으로 구성 프로모터 하에서 종종 상업적인 생산에 유용하지 않은 정도로 표현형적으로 비정상적이다.
- [0447] 최근에, 상기 침묵화 억제인자의 발현을 식물의 종자 또는 상기 식물의 부분으로 제한함으로써 RNA 분자 수준을 증가시키고/시키거나 RNA 분자 수준을 다수의 세대에 걸쳐 안정화시킬 수 있음이 밝혀졌다(WO2010/057246). 본 발명에 사용된 바와 같이, "침묵화 억제인자 단백질" 또는 SSP는 식물 세포에서, 특히 초기에 형질전환된 식물로부터 반복된 세대에 걸쳐 상이한 트랜스유전자로부터 발현 산물의 수준을 증대시키는, 식물 세포에서 발현될 수 있는 임의의 폴리펩티드이다. 하나의 실시태양에서, 상기 SSP는 바이러스 침묵화 억제인자 또는 그의 돌연변이체이다. 다수의 바이러스 침묵화 억제인자들이 당해 분야에 공지되어 있으며, 비제한적으로 P19, V2, P38, Pe-Po 및 RPV-P0를 포함한다. 하나의 실시태양에서, 상기 바이러스 침묵화 억제인자는 서열번호 38에 제공된 바와 같은 서열, 그의 생물 활성 단편, 또는 서열번호 38에 적어도 50% 일치하는 아미노산 서열을 갖고 침묵화 억제인자로서 활성을 갖는 아미노산을 포함한다.
- [0448] 본 발명에 사용된 바와 같이, "안정화 발현", "안정하게 발현된", "안정화된 발현"이란 용어들 및 이들의 변형은 상기 침묵화 억제인자를 암호화하는 외인성 폴리뉴클레오티드가 없는 동질유전자 식물에 비해, 반복된 세대에 걸쳐, 예를 들어 적어도 3, 적어도 5 또는 적어도 10 세대 이상에 걸쳐 자손 식물에서 본질적으로 동일하거나 더 높은 RNA 분자의 수준을 지칭한다. 그러나, 상기 용어(들)는 선행 세대에 비해, 반복된 세대에 걸쳐, 예를 들어 세대당 10% 이상의 상기 RNA 분자 수준의 일부 상실이 존재할 가능성을 배제하지 않는다.
- [0449] 상기 억제인자를 임의의 공급원, 예를 들어 식물, 바이러스, 포유동물 등으로부터 선택할 수 있다. 상기 억제인자가 수득될 수 있는 바이러스의 목록 및 각각의 특정 바이러스로부터의 상기 억제인자의 단백질(예를 들어 B2, P14 등) 또는 암호화 영역 명칭에 대해서 WO2010/057246을 참조하십시오. 억제인자의 다수의 사본을 사용할 수도 있다. 상이한 억제인자들을 함께(예를 들어 나란히) 사용할 수 있다.
- [0450] RNA 분자
- [0451] 본질적으로 식물 종자에서 발현되는 것이 바람직한 임의의 RNA 분자를 상기 침묵화 억제인자와 공-발현시킬 수 있다. 상기 암호화된 폴리펩티드는 오일, 전분, 탄수화물, 영양소 등의 대사에 관련되거나 단백질, 펩티드, 지방산, 지질, 왁스, 오일, 전분, 당, 탄수화물, 향, 냄새, 독소, 카로티노이드, 호르몬, 중합체, 플라보노이드, 저장 단백질, 페놀산, 알칼로이드, 리그닌, 탄닌, 셀룰로스, 당단백질, 당지질 등의 합성, 바람직하게는 TAG의 생합성 또는 조립을 책임질 수 있다.
- [0452] 특정한 실시예에서, 상기 생성된 식물은 배추속, 예를 들어 케놀라 또는 해바라기, 잇꽃, 아마, 면, 대두, 카멜리나 또는 옥수수과 같은 식물에서 오일 생산을 위해 효소의 수준을 증가시켰다.
- [0453] 생성된 LC-PUFA의 수준
- [0454] 종자와 같은 식물 부분 또는 재조합 세포에서 생성되는 LC-PUFA 또는 LC-PUFA들의 조합의 수준이 중요하다. 상기 수준을 특정한 LC-PUFA 또는 관련된 LC-PUFA의 그룹, 예를 들어 ω 3 LC-PUFA 또는 ω 6 LC-PUFA, 또는 VLC-PUFA인 전체 지방산의 조성(퍼센트)으로서, 또는 당해 분야에 공지된 방법에 의해 측정될 수 있는 다른 것으로서 나타낼 수 있다. 상기 수준을 또한 LC-PUFA 함량으로서, 예를 들어 상기 재조합 세포를 차지하는 물질의 건조 중량 중 LC-PUFA의 백분율, 예를 들어 LC-PUFA인 종자의 중량의 백분율로서 나타낼 수도 있다. 유지종자에서 생성되는 LC-PUFA는 오일 생산을 위해 재배되지 않았지만 유사한 LC-PUFA 조성을 가질 수 있는 식물 또는 그

레인 중에서보다 LC-PUFA 함량이 상당히 더 높을 수 있으며, 이들을 모두 인간 또는 동물 소비를 위한 LC-PUFA의 공급원으로서 사용할 수 있다.

- [0455] 상기 LC-PUFA의 수준을 당해 분야에 공지된 방법들 중 임의의 방법에 의해 측정할 수 있다. 바람직한 방법에서, 전체 지질을 세포, 조직 또는 유기체로부터 추출하고 상기 지방산을 메틸 에스테르로 전환시킨 후에 기체 크로마토그래피(GC)에 의해 분석한다. 상기와 같은 기법은 실시예 1에 개시된다. 상기 크로마토그램에서 피크 위치를 사용하여 각각의 특정한 지방산을 확인하고, 각 피크 아래 면적을 적분하여 그 양을 측정할 수 있다. 본 발명에 사용된 바와 같이, 달리 서술되지 않는 한, 샘플 중 특정 지방산의 백분율을 상기 크로마토그램 중 지방산에 대한 전체 면적의 백분율로서 상기 지방산에 대한 피크 아래 면적으로서 측정한다. 이는 중량 백분율(w/w)에 본질적으로 상응한다. 지방산의 정체를 GC-MS에 의해 확인할 수 있다. 전체 지질을 당해 분야에 공지된 기법에 의해 분리시켜 분획들, 예를 들어 TAG 분획을 정제할 수 있다. 예를 들어 구체적으로 TAG의 지방산 조성을 측정하기 위해서 박층 크로마토그래피(TLC)를 분석 규모로 수행하여 다른 지질 분획들, 예를 들어 DAG, 아실-CoA 또는 인지질로부터 TAG를 분리시킬 수 있다.
- [0456] 하나의 실시태양에서, 상기 추출된 지질 중의 지방산 중 ARA, EPA, DPA 및 DHA의 전체 합은 상기 세포 중 전체 지방산의 약 21% 내지 약 40%이다. 추가의 실시태양에서, 상기 세포 중 전체 지방산은 1% 미만의 C20:1을 갖는다. 바람직한 실시태양에서, 상기 세포 중 추출성 TAG는 본 발명에 언급된 수준의 지방산을 포함한다. 본 발명에 개시된 바와 같은 지질을 한정하는 특징들의 각각의 가능한 조합이 또한 포함된다.
- [0457] 제조합 세포, 식물 또는 종자와 같은 식물 부분 중 LC-PUFA의 생성 수준을 또한 특정 기질 지방산의 하나 이상의 생성물 지방산으로의 전환 백분율(또한 본 발명에서 "전환 효율" 또는 "효소적 효율"로서 지칭된다)로서 나타낼 수 있다. 상기 매개변수는 상기 세포, 식물, 식물 부분 또는 종자로부터 추출된 지질 중 지방산 조성, 즉 하나 이상의 기질 지방산(상기로부터 유도된 모든 다른 지방산 포함)의 백분율로서 상기 형성된 LC-PUFA(상기로부터 유도된 다른 LC-PUFA 포함)의 양을 기준으로 한다. 전환 백분율에 대한 일반식은 $100 \times (\text{생성물 LC-PUFA 및 상기로부터 유도된 모든 생성물의 백분율의 합}) / (\text{기질 지방산 및 상기로부터 유도된 모든 생성물의 백분율의 합})$ 이다. 예를 들어 DPA에 관하여, 이를 기질 지방산(예를 들어 OA, LA, ALA, SDA, ETA 또는 EPA) 및 상기 기질로부터 유도된 DPA를 포함하여 모든 생성물의 수준에 대한 DPA의 수준(지질 중 전체 지방산 함량 중 백분율로서)의 비로서 나타낼 수도 있다. 상기 전환 백분율 또는 전환효율을 하나의 경로에서 단일 효소 단계에 대해, 또는 하나의 경로의 부분 또는 전체에 대해 나타낼 수 있다.
- [0458] 특정한 전환 효율들을 본 발명에서 하기 식에 따라 계산한다:
- [0459] 1. OA 에서 $DPA = 100 \times (\%DHA + \%DPA) / (OA, LA, GLA, DGLA, ARA, EDA, ALA, SDA, ETrA, ETA, EPA, DPA \text{ 및 DHA에 대한 \%합})$.
- [0460] 2. LA 에서 $DPA = 100 \times (\%DHA + \%DPA) / (LA, GLA, DGLA, ARA, EDA, ALA, SDA, ETrA, ETA, EPA, DPA \text{ 및 DHA에 대한 \%합})$.
- [0461] 3. ALA 에서 $DPA = 100 \times (\%DHA + \%DPA) / (ALA, SDA, ETrA, ETA, EPA, DPA \text{ 및 DHA에 대한 \%합})$.
- [0462] 4. EPA 에서 $DPA = 100 \times (\%DHA + \%DPA) / (EPA, DPA \text{ 및 DHA에 대한 \%합})$.
- [0463] 5. DPA 에서 $DHA (\Delta 4\text{-불포화효소 효율}) = 100 \times (\%DHA) / (DPA \text{ 및 DHA에 대한 \%합})$.
- [0464] 6. $\Delta 12\text{-불포화효소 효율} = 100 \times (LA, GLA, DGLA, ARA, EDA, ALA, SDA, ETrA, ETA, EPA, DPA \text{ 및 DHA에 대한 \%합}) / (OA, LA, GLA, DGLA, ARA, EDA, ALA, SDA, ETrA, ETA, EPA, DPA \text{ 및 DHA에 대한 \%합})$.
- [0465] 7. $\omega 3\text{-불포화효소 효율} = 100 \times (ALA, SDA, ETrA, ETA, EPA, DPA \text{ 및 DHA에 대한 \%합}) / (LA, GLA, DGLA, ARA, EDA, ALA, SDA, ETrA, ETA, EPA, DPA \text{ 및 DHA에 대한 \%합})$.
- [0466] 8. OA 에서 $ALA = 100 \times (ALA, SDA, ETrA, ETA, EPA, DPA \text{ 및 DHA에 대한 \%합}) / (OA, LA, GLA, DGLA, ARA, EDA, ALA, SDA, ETrA, ETA, EPA, DPA \text{ 및 DHA에 대한 \%합})$.
- [0467] 9. $\Delta 6\text{-불포화효소 효율} (\omega 3 \text{ 기질 ALA에 대한}) = 100 \times (SDA, ETA, EPA, DPA \text{ 및 DHA에 대한 \%합}) / (\%ALA, SDA, ETrA, ETA, EPA, DPA \text{ 및 DHA})$.
- [0468] 10. $\Delta 6\text{-신장효소 효율} (\omega 3 \text{ 기질 SDA에 대한}) = 100 \times (ETA, EPA, DPA \text{ 및 DHA에 대한 \%합}) / (SDA, ETA, EPA, DPA \text{ 및 DHA에 대한 \%합})$.

- [0469] 11. $\Delta 5$ -불포화효소 효율($\omega 3$ 기질 ETA에 대한) = $100 \times (\text{EPA, DPA 및 DHA에 대한 \%합}) / (\text{ETA, EPA, DPA 및 DHA에 대한 \%합})$.
- [0470] 12. $\Delta 5$ -신장효소 효율($\omega 3$ 기질 EPA에 대한) = $100 \times (\text{DPA 및 DHA에 대한 \%합}) / (\text{EPA, DPA 및 DHA에 대한 \%합})$.
- [0471] 본 발명의 지질, 바람직하게는 종자의 지방산 조성은 또한 전체 $\omega 6$ 지방산:전체 $\omega 3$ 지방산 또는 신규 $\omega 6$ 지방산:신규 $\omega 3$ 지방산에 대한, 전체 지방산 함량 중 $\omega 6$ 지방산: $\omega 3$ 지방산의 비를 특징으로 한다. 전체 $\omega 6$ 지방산, 전체 $\omega 3$ 지방산, 신규 $\omega 6$ 지방산 및 신규 $\omega 3$ 지방산이란 용어들은 본 발명에서 정의된 바와 같은 의미를 갖는다. 상기 비를 본 발명에 예시된 바와 같은 방식으로, 상기 세포, 식물, 식물 부분 또는 종자로부터 추출된 지질 중 지방산 조성으로부터 계산한다. 상기 지질 중 $\omega 6$ 지방산보다 $\omega 3$ 의 수준이 더 높은 것이 바람직하며, 따라서 1.0 미만의 $\omega 6$: $\omega 3$ 비가 바람직하다. 0.0의 비는 상기 한정된 $\omega 6$ 지방산의 완벽한 부재를 가리키며; 0.03의 비가 성취되었다. 상기와 같은 낮은 비는 $\omega 3$ -불포화효소, 특히 진균 $\omega 3$ -불포화효소, 예를 들어 본 발명에 예시된 바와 같은 피키아 파스토리스 $\omega 3$ -불포화효소와 함께 $\omega 3$ 기질 선호를 갖는 $\Delta 6$ -불포화효소의 병용을 통해 성취될 수 있다.
- [0472] 종자의 중량당 LC-PUFA의 수율을 또한 상기 종자 중 전체 오일 함량 및 상기 오일 중 DPA%를 근거로 계산할 수 있다. 예를 들어, 캐놀라 종자의 오일 함량이 약 40%(w/w)이고 상기 오일 중 전체 지방산 함량의 약 12%가 DPA인 경우, 상기 종자의 DPA 함량은 약 4.8% 또는 종자의 그램당 약 48 mg이다. 약 21%의 DPA 함량에서, 캐놀라 종자 또는 카멜리나 사티바 종자는 종자의 그램당 약 84 mg의 DPA 함량을 갖는다. 따라서 본 발명은 종자 그램당 적어도 약 80 mg 또는 적어도 약 84 mg의 DPA를 포함하는 브라시카 나푸스, 비. 윤채아 및 카멜리나 사티바 식물, 및 이로부터 수득된 종자를 제공한다. 상기 종자는 건조후 수확된 성숙한 종자에 대한 기준(4 내지 15% 수분)의 함수율을 갖는다. 본 발명은 또한 종자를 수득하고 상기 종자로부터 오일을 추출함을 포함하는 오일의 수득 방법, 및 상기 오일의 용도 및 본 발명에 따른 식물로부터 종자를 수확함을 포함하는 상기 종자의 수득 방법을 제공한다.
- [0473] 헥타아르당 생성되는 DPA의 양을 또한, 헥타아르당 상기 종자 수율을 알고 있거나 추정할 수 있는 경우 계산할 수 있다. 예를 들어, 호주에서 캐놀라는 전형적으로 헥타아르당 약 2.5 톤의 종자를 제공하며, 40% 오일 함량에서 약 1000 kg의 오일을 제공한다. 전체 오일 중 20.1% DPA에서, 상기 헥타아르당 약 200 kg의 DPA를 제공한다. 상기 오일 함량이 50%까지 감소되는 경우, 상기 여전히 약 100 kg DPA/ha를 제공한다.
- [0474] 지금까지의 증거는 효모 또는 식물에서 이중으로 발현된 일부 불포화효소들이 일부 신장효소들과 조합하여 비교적 낮은 활성을 가진다는 것을 암시한다. 이것은 LC-PUFA 합성에서 기질로서 지방산의 아실-CoA 형태를 사용하는 능력을 갖는 불포화효소를 제공함으로써 경감될 수 있으며, 이것은 재조합 세포, 특히 식물 세포에서 유리한 것으로 생각된다. 효율적인 DPA 합성에 특히 유리한 조합은 진균 $\omega 3$ -불포화효소, 예를 들어 피키아 파스토리스 $\omega 3$ -불포화효소(서열번호 6)와 $\omega 3$ 아실 기질에 바람직한 $\Delta 6$ -불포화효소, 예를 들어 마이크로모나스 푸실라 $\Delta 6$ -불포화효소(서열번호 9) 또는 적어도 95%의 아미노산 서열 일치성을 갖는 그의 변체와의 조합이다.
- [0475] 본 발명에 사용된 바와 같이, "실질적으로 없는"이란 용어는 상기 조성물(예를 들어 지질 또는 오일)이 상기 한정된 성분을 거의(예를 들어 약 0.5% 미만, 약 0.25% 미만, 약 0.1% 미만, 또는 약 0.01% 미만) 또는 전혀 포함하지 않음을 의미한다. 하나의 실시태양에서, "실질적으로 없는"은 상기 성분을 통상적인 분석 기법을 사용하여 검출할 수 없음, 예를 들어 특정 지방산(예를 들어 $\omega 6$ -도코사헥타에노산)을 실시예 1에 개략된 바와 같이 기체 크로마토그래피를 사용하여 검출할 수 없음을 의미한다.
- [0476] 하나의 실시태양에서, 추출된 지질, 추출된 오일, 식물 또는 이의 부분, 예컨대 종자 (본 발명의 것 또는 본 발명의 과정/방법에 사용된 것), 본 발명의 식료품, 또는 조성물은 올-시스-6,9,12,15,18-헵타에이코사헥타에노산(n-3 HPA)을 포함하지 않는다.
- [0477] 오일의 생산
- [0478] 당해 분야에서 통상적으로 실시되는 기법들을 사용하여 본 발명의 세포, 식물, 종자 등에 의해 생산된 오일을 추출, 처리 및 분석할 수 있다. 전형적으로, 식물 종자를 구멍하고, 압착하고, 추출하여 조 오일을 생성시키고, 이어서 이를 정련하고, 정제하고, 표백하고 탈취시킨다. 일반적으로, 종자 파쇄 기법은 당해 분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 유지종자를 물로 분무하여 수분 함량을 예를 들어 8.5%까지 상승시킴으로써 불리고, 0.23 내지 0.27 mm의 간격 설정을 갖는 매끄러운 롤러를 사용하여 박편화하였다. 종자의 유형에 따라, 물을 파쇄 전에 가하지 않을 수도 있다. 열을 적용하여 효소를 불활성화시키고, 추가적인 세포 파괴를 촉진하

고, 오일 소적을 유합시키고, 단백질 입자를 응집시키며, 이들은 모두 추출 공정을 용이하게 한다.

[0479] 하나의 실시태양에서, 종자유의 대부분이 스크류 프레스를 통과하여 방출된다. 이어서 상기 스크류 프레스로부터 배출된 덩어리를, 예를 들어 핵산으로, 열 추적 컬럼을 사용하여 용매 추출한다. 대안적으로, 상기 압착 작업에 의해 생성된 조 오일을, 상기 압착 작업 동안 상기 종자유와 함께 압착된 고체를 제거하기 위해서 슬롯망 배수 탭이 있는 침전조에 통과시킬 수 있다. 청정화된 오일을 평판형 필터에 통과시켜 임의의 잔류 미세 고체 입자를 제거할 수 있다. 경우에 따라, 상기 추출 공정으로부터 회수된 오일을 상기 청정화된 오일과 조합하여 혼합 조 오일을 생성할 수 있다.

[0480] 일단 용매가 상기 조 오일로부터 스트리핑되면, 상기 압착되고 추출된 부분들을 조합하고 통상적인 오일 처리 과정을 가한다. 본 발명에 사용된 바와 같이, "정제된"이란 용어는 본 발명의 지질 또는 오일과 관련하여 사용될 때 전형적으로 상기 추출된 지질 또는 오일에 상기 지질/오일 성분의 순도를 증가시키는 하나 이상의 처리 단계를 가했음을 의미한다. 예를 들어, 정제 단계는 상기 추출된 오일의 정련, 탈취, 탈색, 건조 및/또는 분별화로 이루어지는 그룹 중 하나 이상 또는 전부를 포함할 수 있다. 그러나, 본 발명에 사용된 바와 같이, "정제된"이란 용어는 전체 지방산 함량의 백분율로서 상기 DPA 함량을 증가시키기 위해서 본 발명의 지질 또는 오일의 지방산 조성을 변경시키는 트랜스에스테르화 과정 또는 다른 과정을 포함하지 않는다. 즉 달리 표현하자면, 상기 정제된 지질 또는 오일의 지방산 조성은 정제되지 않은 지질 또는 오일의 경우와 본질적으로 동일하다.

[0481] 정련

[0482] 정련은 오일의 정제에서 초기 단계이며 그의 주목적은 상기 오일로부터 대부분의 인지질(전체 추출된 지질의 대략 1 내지 2%로서 존재할 수 있다)을 제거하는 것이다. 70 내지 80 °C에서, 전형적으로 인산을 함유하는, 약 2%의 물을 상기 조 오일에 첨가하여 미량 금속 및 안료에 의해 동반되는 인지질의 대부분을 분리시킨다. 상기 제거되는 불용성 물질은 주로 인지질과 트리아실글리세롤의 혼합물이며 또한 레시틴으로서 공지되어 있다. 정련은 농축된 인산을 조 종자유에 첨가하여 비-수화성 포스파티드를 수화성 형태로 전환시키고, 존재하는 소량 금속을 킬레이트화함으로써 수행될 수 있다. 원심분리에 의해 상기 종자유로부터 검이 분리된다.

[0483] 알칼리 정제

[0484] 알칼리 정제는 조 오일의 처리를 위한 정제 공정들 중 하나이며, 이는 때때로 또한 중화라고도 칭한다. 통상 정련을 수반하고 표백에 선행한다. 정련 후에, 상기 종자유를, 지방산 및 인산 모두를 적정하기에 충분한 양의 알칼리 용액을 첨가하고 따라서 형성된 비누를 제거함으로써 처리할 수 있다. 적합한 알칼리성 물질은 수산화 나트륨, 수산화 칼륨, 탄산 나트륨, 수산화 리튬, 수산화 칼슘, 탄산 칼슘 및 수산화 암모늄을 포함한다. 상기 공정은 전형적으로는 실온에서 수행되며 유리 지방산 분획을 제거한다. 비누는 원심분리에 의해서 또는 상기 비누에 대한 용매내로의 추출에 의해서 제거되며, 중화된 오일을 물로 세척한다. 경우에 따라, 상기 오일 중 임의의 과잉 알칼리를 적합한 산, 예를 들어 염산 또는 황산으로 중화시킬 수도 있다.

[0485] 표백

[0486] 표백은 오일을 90 내지 120 °C에서 10 내지 30 분 동안 표백토(0.2 내지 2.0%)의 존재 하에서 및 질소 또는 증기와 함께 또는 진공 하에서 작동시킴으로써 산소의 부재 하에서 가열하는 정제 공정이다. 오일 가공에서 상기 단계는 불필요한 색소(카로티노이드, 클로로필, 고시폴 등)를 제거하도록 설계되며 상기 공정은 또한 산화 생성물, 미량 금속, 황 화합물 및 잔량의 비누를 제거한다.

[0487] 탈취

[0488] 탈취는 고온(200 내지 260 °C) 및 저압(0.1 내지 1 mmHg)에서의 오일 및 지방의 처리이다. 이는 전형적으로 상기 종자유 내에 증기를 약 0.1 ml/분/100 ml 종자유의 속도로 도입시킴으로써 성취된다. 약 30 분의 살포 후에, 상기 종자유를 진공 하에서 냉각시킨다. 상기 종자유를 전형적으로는 유리 용기로 옮기고 아르곤으로 플러싱시킨 후에 냉장 하에서 보관한다. 이러한 처리는 상기 종자유의 색상을 개선시키고 임의의 잔류 유리 지방산, 모노아실글리세롤 및 산화 생성물을 포함하는 휘발성 물질 또는 냄새나는 화합물의 대부분을 제거한다.

[0489] 동결방지 처리

[0490] 동결방지 처리는 때때로 주변 온도 이하의 온도에서 결정화에 의해 오일 및 지방의 고체(스테아린) 및 액체(올레인) 분획으로의 분리를 위해 오일의 상업적인 생산에 사용되는 공정이다. 이는 원래 고체-부재 생성물을 생성시키기 위해 면실유에 적용되었다. 이를 전형적으로는 오일의 포화 지방산 함량을 감소시키기 위해

사용한다.

[0491] 트랜스에스테르화

[0492] 본 발명에 사용된 바와 같이, "트랜스에스테르화"란 용어는 TAG 내 및 TAG 간 지방산을 교환하거나 상기 지방산을 또 다른 알콜로 전달하여 에스테르를 형성시키는 공정을 의미한다. 이는 초기에 TAG로부터 지방산을 유리 지방산으로서 방출시키는 것을 수반할 수 있거나 또는 이는 직접 지방산 에스테르, 바람직하게는 지방산 메틸 에스테르 또는 에틸 에스테르를 생성할 수 있다. 알코올, 예컨대 메탄올 또는 에탄올을 사용한 TAG의 트랜스에스테르화 반응시, 알코올의 알킬기는 TAG의 아실기(DPA 포함)와 에스테르 결합을 형성한다. 분별 공정과 병행시, 트랜스에스테르화를 사용하여 지질의 지방산 조성을 변형시킬 수 있다(Marangoni et al., 1995). 트랜스에스테르화는 화학적(예를 들어 강산 또는 강염기 촉매화되는) 또는 효소적 수단을 사용할 수 있으며, 후자는 TAG 상의 지방산에 대해 위치-특이적(sn-1/3 또는 sn-2 특이적)일 수 있는 리파제를 사용하거나 다른 것들에 대해 일부 지방산에 바람직하다(Speranza et al., 2012). 오일 중 LC-PUFA의 농도를 증가시키기 위한 상기 지방산 분별화는 당해 분야에 공지된 방법들 중 어느 하나, 예를 들어 동결 결정화, 유레아를 사용하는 복합체 형성, 분자 증류, 초임계 유체 추출, 역류 크로마토그래피 및 은 이온 복합화에 의해 성취될 수 있다. 유레아와의 복합체 형성이 그의 간편성 및 오일 중 포화 및 단일불포화 지방산 수준의 감소에서의 효율성으로 인해 바람직한 방법이다(Gamez et al., 2003). 처음에, 상기 오일의 TAG를 그의 구성 지방산, 종종 지방산 에스테르의 형태로, 산 또는 염기 촉매화된 반응 조건 하에서 가수분해에 의해서[이때 1 몰의 TAG를 적어도 3 몰의 알콜(예를 들어 에틸 에스테르의 경우 에탄올 또는 메틸 에스테르의 경우 메탄올)과, 과잉의 알콜을 사용하여 반응시켜, 형성된 알킬 에스테르 및 또한 형성된 글리세롤의 분리를 가능하게 한다] 또는 리파제에 의해서 분리시킨다. 이어서 상기 유리 지방산 또는 지방산 에스테르(이들은 대개 상기 처리에 의해 지방산 조성이 변경되지 않는다)를 복합체 형성을 위해 유레아의 에탄올 용액과 혼합한다. 상기 포화 및 단일불포화 지방산은 유레아와 쉽게 복합화하며 냉각시 결정화되고 후속으로 여과에 의해 제거될 수 있다. 이에 의해 상기 비-유레아 복합화된 분획은 LC-PUFA가 농축된다.

[0493] 식료품

[0494] 본 발명은 식료품으로서 사용될 수 있는 조성물을 포함한다. 본 발명의 목적을 위해서, "식료품"은 체내로 섭취시 (a) 자양분을 주거나 또는 조직을 형성시키거나 에너지를 공급하는 작용을 하고/하거나, (b) 적합한 영양 상태 또는 대사 기능을 유지하거나, 회복하거나 지지하는 인간 또는 동물 소비용의 임의의 식료품 또는 체제를 포함한다. 본 발명의 식료품은 아기 및/또는 아동을 위한 영양 조성물, 예를 들어 유아식 및 본 발명의 종자박을 포함한다.

[0495] 본 발명의 식료품은 예를 들어 본 발명의 세포, 본 발명의 식물, 본 발명의 식물 부분, 본 발명의 종자, 본 발명의 추출물, 본 발명 방법의 생성물, 본 발명의 발효 과정의 생성물, 또는 적합한 담체(들)를 갖는 조성물을 포함한다. "담체"란 용어는 그의 가장 넓은 의미에서 영양가를 갖거나 갖지 않을 수도 있는 임의의 성분을 포함하는 것으로 사용된다. 숙련가가 이해하는 바와 같이, 상기 담체는 식료품을 소비하는 유기체에 대해 유해한 영향을 미치지 않도록, 상기 식료품에 사용하기에(또는 충분히 낮은 농도로 사용하기에) 적합해야 한다.

[0496] 본 발명의 식료품은 본 발명에 개시된 방법, 세포 또는 유기체의 사용에 의해 직접 또는 간접적으로 생산된 오일, 지방산 에스테르, 또는 지방산을 포함한다. 상기 조성물은 고체 또는 액체 형태로 존재할 수 있다. 또한, 상기 조성물은 식용 다량영양소, 단백질, 탄수화물, 비타민 및/또는 미네랄을 특정 용도에 원하는 양으로 포함할 수 있다. 이들 성분들의 양은 상기 조성물을 정상적인 개인에 사용하고자 하는지 또는 대사 질환 등을 앓고 있는 개인과 같이 특수한 필요를 갖는 개인에 사용하고자 하는지에 따라 다양할 것이다.

[0497] 영양가가 있는 적합한 담체의 예는 비제한적으로 다량영양소, 예를 들어 식용 전분, 탄수화물 및 단백질을 포함한다. 상기와 같은 식용 지방의 예는 비제한적으로 코코넛 오일, 보리지 오일, 진균 오일, 블랙커런트 오일, 대두 오일, 및 모노- 및 다이-글리세라이드를 포함한다. 상기와 같은 탄수화물의 예는 비제한적으로 글루코스, 식용 락토오스 및 가수분해된 전분을 포함한다. 또한, 본 발명의 영양 조성물에 사용될 수 있는 단백질의 예는 비제한적으로 대두 단백질, 전기투석된 유장, 전기투석된 탈지유, 유장, 또는 이들 단백질의 가수분해산물을 포함한다.

[0498] 비타민 및 미네랄에 관하여, 하기를 본 발명의 식료품 조성물에 첨가할 수 있다: 칼슘, 인, 칼륨, 나트륨, 클로라이드, 마그네슘, 망간, 철, 구리, 아연, 셀레늄, 요오드 및 비타민 A, E, D, C 및 B 복합체. 다른 상기와 같은 비타민 및 미네랄을 또한 첨가할 수도 있다.

- [0499] 본 발명의 식료품 조성물에 사용되는 성분들은 반-정제되거나 정제된 기원의 것일 수 있다. 반-정제된 또는 정제된이란 천연 물질의 정제에 의해 제조되거나 드노보 합성에 의해 제조된 물질을 의미한다.
- [0500] 본 발명의 식료품 조성물을 또한 상기 음식물의 보충이 필요하지 않은 경우에조차 식품에 첨가할 수도 있다. 예를 들어, 상기 조성물을 임의의 유형의 식품, 예를 들어 비제한적으로 마가린, 변성 버터, 치즈, 우유, 요거트, 초콜릿, 캔디, 스낵, 샐러드 오일, 쿠키 오일, 쿠키 지방, 고기, 생선 및 음료에 첨가할 수 있다.
- [0501] 또한, 본 발명에 따라 생성된 지방산 또는 주제 유전자를 함유하고 발현하도록 형질전환된 숙주 세포를 또한 동물 식품 보충제로서 사용하여 동물의 조직, 계란 또는 우유 지방산 조성을 인간 또는 동물 소비에 바람직한 하나 이상으로 변경시킬 수 있다. 상기와 같은 동물의 예는 양, 소, 말, 닭과 같은 가금류 등을 포함한다.
- [0502] 더욱 또한, 본 발명의 식료품을 수산양식에 사용하여 인간 또는 동물 소비용 생선 또는 갑각류 동물, 예를 들어 참새우 중 지방산 수준을 증가시킬 수 있다. 바람직한 생선은 연어이다.
- [0503] 본 발명의 바람직한 식료품은 인간 또는 다른 동물용 식품 또는 사료로서 직접 사용될 수 있는 식물, 시드 및 다른 식물 부분, 예를 들어 잎, 열매 및 줄기이다. 예를 들어, 동물은 들판에서 자란 상기와 같은 식물을 직접 뜯어 먹거나 조절된 급식에서 보다 표준에 맞는 양을 먹을 수 있다. 본 발명은 인간 및 다른 동물에서 LC-PUFA 수준을 증가시키기 위한 사료로서 상기와 같은 식물 및 식물 부분의 용도를 포함한다.
- [0504] 하나의 실시태양에서, 식료품은 본 발명의 지질 또는 오일을 포함하는 영아용 조제유이다. 본 발명에 사용된 바와 같이, "영아용 조제유"는 영아의 적어도 일부의 영양적 요구를 충족시키는 비-자연 발생적 조성물을 의미한다. "영아"는 출생으로부터 1년 이하의 연령 범위의 인간 대상체를 의미하며, 0 내지 12 개월 사이의 정정된 연령(corrected age)의 영아를 포함한다. 문구 "정정된 연령"이란 영아의 생활 연령에서 조기에 출산된 시간을 감한 것을 의미한다. 따라서, 정정된 연령은 전체 기간을 다 채우고 태어났을 경우의 영아의 나이이다. 본 발명에 사용된 바와 같이, "비-자연 발생적"이란 자연에서 발견되지 않고 인간의 개입에 의해 생산된 제품을 의미한다. 본 발명에서 사용된 바와 같이, 본 발명의 영아용 조제유는 순수 인간 모유(Koletzko et al., 1988) 및 비-인간 동물에 의해 생산된 순수 우유를 배제하나, 우유로부터 유래된 성분, 예컨대 우유 단백질 또는 탄수화물, 예를 들어 유청 단백질(whey protein) 또는 락토스를 포함할 수 있다. 본 발명의 영아용 조제유는 자연 발생 육류, 예컨대 소고기, 바다표범 고기, 고래 고기 또는 어류를 배제하나, 이러한 공급원으로부터의 성분, 예컨대 단백질을 포함할 수 있다. 본 발명의 영아용 조제유는 반드시 본 발명의 DPA를 포함하는 지질을, 바람직하게는 전체 지방산 함량의 0.05 중량% 내지 0.5 중량%의 수준으로 포함한다. 상기 DPA는 TAG, 인지질 또는 비-에스테르화된 지방산으로서, 또는 이의 혼합물로서 존재할 수 있다. 본 발명의 지질 또는 오일은 당해 분야에 공지된 절차를 사용하여 영아용 조제유에 혼입될 수 있다. 예를 들어, 당업자는 일반적으로 WO 2008/027991, US20150157048, US2015094382 및 US20150148316에 기재된 절차를 사용하여 본 발명의 영아용 조제유를 용이하게 제조할 수 있으며, 여기서 상기 DPA는 이에 개시된 하나 이상의 다중불포화 지방산에 추가되거나 대신하여 첨가될 수 있다.
- [0505] 하나의 예에서, 영아용 조제유는, 임의로 프리바이오틱스, 특히 폴리텍스트로스 (PDX) 및 갈락토-올리고사카라이드 (GOS), 비-인간 공급원 유래의 락토페린, 및 다른 장쇄 다중불포화 지방산 (LC-PUFA)을 갖는 DPA(즉, 본 발명에 기재된 바와 같은 오메가-3 DPA)를 포함한다. 일부 실시태양에서, 상기 영양 조성물은 SDA 및/또는 감마-리놀렌산 (GLA)을 추가로 포함한다. 특정 실시태양에서, 상기 영아용 조제유는 최대 약 7 g/100 kcal의 지방 또는 지질 공급원, 더욱 바람직하게는 약 3 g/100 kcal 내지 약 7 g/100 kcal의 지방 또는 지질 공급원을 포함하며, 여기서 상기 지방 또는 지질 공급원은 적어도 약 0.5 g/100 kcal, 더욱 바람직하게는 약 1.5 g/100 kcal 내지 약 7 g/100 kcal; 최대 약 7 g/100 kcal의 단백질 또는 단백질 등가물 공급원, 더욱 바람직하게는 약 1 g/100 kcal 내지 약 7 g/100 kcal의 단백질 또는 단백질 등가물 공급원; 및 적어도 약 5 g/100 kcal의 탄수화물, 더욱 바람직하게는 약 5 g 내지 약 25 g/100 kcal의 탄수화물을 포함한다. 상기 영아용 조제유는 1) 적어도 약 10 mg/100 kcal의 락토페린, 더욱 바람직하게는 약 10 mg/100 kcal 내지 약 200 mg/100 kcal의 락토페린; 2) PDX 및 GOS을 포함하는 약 0.1 g/100 kcal 내지 약 1 g/100 kcal의 프리바이오틱 조성물; 및 3) DHA를 포함하는 적어도 약 5 mg/100 kcal의 추가의 LC-PUFA (즉, DPA 이외의 LC-PUFA), 더욱 바람직하게는 DHA를 포함하는 약 5 mg/100 kcal 내지 약 75 mg/100 kcal의 추가의 LC-PUFA 중 하나 이상 또는 모두를 추가로 포함할 수 있다.
- [0506] 하나의 실시태양에서, 상기 영아용 조제유의 전체 지방산 함량 중 DPA:DHA의 비는 1:3 내지 2:1이다. 또한 EPA가 존재할 수 있으나, 없는 것이 바람직하다. 존재하는 경우, 전체 지방산 함량 중 EPA:DPA의 비는 바람직하게는 1:2 미만, 더욱 바람직하게는 1:5 미만이다. 또한 ARA가 없을 수 있으나, 존재하는 것이 바람직하고, 바람

직하게는 전체 지방산 함량 중 ARA:DPA의 비는 1:3 내지 2:1이다. 가장 바람직하게는, 상기 영아용 조제유 중 각각의 LC-PUFA의 수준은 임의의 인간 모유에서 발견된 바와 거의 같고, 이는 어머니의 연령, 유전적 요인, 식이 섭취 및 영양 상태에 따라 자연적으로 다르다. 예를 들어, 문헌[Koletzko et al. (1988)] 참조. 바람직한 실시태양에서, 상기 영아용 조제유는 검출가능한 수준의 헤파이코사펜타에노산 (HPA, 21:5 ω 3)를 함유하지 않는다.

[0507] 상기 영아용 조제유는 예를 들어, 액체, 분말, 젤, 반죽, 고체, 농축물, 현탁액, 또는 즉시 사용가능한(ready-to-use) 형태의 장내 처방제(formula), 경구 처방제, 영아용 처방제를 지칭할 수 있다.

[0508] 본 발명에 유용한 프로바이오틱스는 폴리텍스트로스, 폴리텍스트로스 분말, 락툴로스, 락토수크로스, 라피노스, 글루코-올리고사카라이드, 이눌린, 프럭토-올리고사카라이드, 이소말토-올리고사카라이드, 대두 올리고사카라이드, 락토수크로스, 자일로-올리고사카라이드, 키토-올리고사카라이드, 만노-올리고사카라이드, 아라비노-올리고사카라이드, 시알릴-올리고사카라이드, 푸코-올리고사카라이드, 갈락토-올리고사카라이드 및 젠티오-올리고사카라이드를 포함할 수 있다.

[0509] 또한, 락토페린은 본 발명의 영양 조성물에 포함될 수 있다. 락토페린은 종에 따라 1 내지 4개 글리칸을 함유하는 약 80 kD의 단일 체 폴리펩티드이다. 상이한 종의 락토페린의 3-D 구조는 매우 유사하나, 동일하지는 않다. 각각의 락토페린은, 각 분자의 N-말단 및 C-말단부를 지칭하는 N- 및 C-엽(C-lobe)이라 불리는, 2개의 상동성 엽을 포함한다.

[0510] 상기 단백질 또는 단백질 등가물 공급원은 당해 분야에서 사용되는 임의의 것, 예를 들어 탈지유, 유청 단백질, 카제인, 대두 단백질, 가수분해된 단백질 및 아미노산등 일 수 있다. 본 발명을 시행하기에 유용한 소 우유 단백질 공급원으로는, 제한 없이, 우유 단백질 분말, 우유 단백질 농축물, 우유 단백질 단리물, 탈지유 고형분, 탈지유, 탈지 분유, 유청 단백질, 유청 단백질 단리물, 유청 단백질 농축물, 감미 유청(sweet whey), 산 유청, 카제인, 산 카제인, 카제인염(예를 들어, 카제인 나트륨, 카제인 나트륨 칼슘, 카제인 칼슘 및 이의 임의의 조합)을 포함한다.

[0511] 적절한 탄수화물 공급원은 당해 분야에서 사용되는 임의의 것, 예를 들어, 락토스, 글루코스, 프럭토스, 옥수수 시럽 고형분, 말토덱스트린, 수크로스, 전분 및 쌀 시럽 고형분 등 일 수 있다. 상기 영양 조성물 중 탄수화물 성분의 양은 적어도 약 5 g/100 kcal이며, 전형적으로는 약 5 g 내지 약 25 g/100 kcal으로 다양할 수 있다. 일부 실시태양에서, 상기 탄수화물의 양은 약 6 g 내지 약 22 g/100 kcal이다. 다른 실시태양에서, 상기 탄수화물의 양은 약 12 g 내지 약 14 g/100 kcal이다. 일부 실시태양에서, 옥수수 시럽 고형분이 바람직하다. 더욱이, 가수분해된, 부분적으로 가수분해된, 및/또는 광범위하게 가수분해된 탄수화물이, 이들의 소화능으로 인해 영양 조성물에 포함하는 것이 바람직할 수 있다. 구체적으로는, 가수분해된 탄수화물은 알레르기 유발 에피토프(allergenic epitopes)를 포함할 가능성이 적다. 본 발명에 사용하기에 적합한 탄수화물 물질의 비-제한적인 예로는 옥수수, 타피오카, 쌀 또는 감자로부터 추출된, 가수분해되거나 온전한(intact), 천연이거나 화학적으로 변형된, 밀납성(waxy) 이거나 비-밀납성 형태의 전분을 포함한다. 적절한 탄수화물의 비-제한적인 예로는 가수분해된 콘스타치(cornstarch), 말토덱스트린, 말토스, 옥수수 시럽, 텍스트로스, 옥수수 시럽 고형분, 글루코스로 특징되는 다양한 가수분해된 전분, 및 다양한 다른 글루코스 중합체 및 이의 조합을 포함한다. 다른 적절한 탄수화물의 비-제한적인 예로는 수크로스, 락토스, 프럭토스, 고 과당(high fructose) 옥수수 시럽, 소화하기 힘든 올리고사카라이드, 예컨대 프럭토올리고사카라이드로 종종 언급되는 것들 및 이의 조합을 포함한다.

[0512] 또한, 바람직하게는, 대상체의 일일 영양적 요구를 공급하도록 하나 이상의 비타민 및/또는 미네랄이 충분한 양으로 상기 영아용 조제유에 첨가될 수 있다. 당해 분야의 숙련가들은, 예를 들어, 아동의 연령에 기반하여 비타민 및 미네랄의 요구량이 다양할 것이라는 것을 이해할 것이다. 상기 영양 조성물은 임의로, 제한 없이, 하나 이상의 하기 비타민 또는 이의 유도체를 포함할 수 있다: 비타민 B1 (티아민, 티아민 피로포스페이트, TPP, 티아민 트리포스페이트, TTP, 티아민 하이드로클로라이드, 티아민 모노니트레이트), 비타민 B2 (리보플라빈, 플라빈 모노뉴클레오티드, FMN, 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드, FAD, 락토플라빈, 오보플라빈), 비타민 B3 (니아신, 니코틴산, 니코틴아미드, 니아신아미드, 니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오티드, NAD, 니코틴산 모노뉴클레오티드, NicMN, 피리딘-3-카복실산), 비타민 B3-전구체 트립토판, 비타민 B6 (피리독신, 피리독살, 피리독사민, 피리독신 하이드로클로라이드), 판토텐산 (판토텐산, 판테놀), 폴레이트 (폴산, 폴라신, 프테로일글루타민산), 비타민 B12 (코발라민, 메틸코발라민, 데옥시아데노실코발라민, 시아노코발라민, 하이드록시코발라민, 아데노실코발라민), 비오틴, 비타민 C (아스코르브산), 비타민 A (레티놀, 레티닐 아세테이트, 레티닐

팔미테이트, 다른 장쇄 지방산을 갖는 레티닐 에스테르, 레티날, 레티노산, 레티놀 에스테르), 비타민 D (칼시페롤, 콜레칼시페롤, 비타민3, 1,25,-디하이드록시비타민 D), 비타민 E (α -토코페롤, α -토코페롤 아세테이트, α -토코페롤 석시네이트, α -토코페롤 니코티네이트, α -토코페롤), 비타민 K (비타민 K1, 필로퀴논, 나프토크논, 비타민 K2, 메나퀴논-7, 비타민 K3, 메나퀴논-4, 메나디온, 메나퀴논-8, 메나퀴논-8H, 메나퀴논-9, 메나퀴논-9H, 메나퀴논-10, 메나퀴논-11, 메나퀴논-12, 메나퀴논-13), 콜린, 이노시톨, β -카로틴 및 이의 임의의 조합. 추가로, 상기 영양 조성물은 임의로, 제한 없이, 하나 이상의 하기 미네랄 또는 유도체를 포함할 수 있다: 붕소, 칼슘, 칼슘 아세테이트, 칼슘 글루코네이트, 칼슘 클로라이드, 칼슘 락테이트, 칼슘 포스페이트, 칼슘 셀페이트, 클로라이드, 크롬, 크롬 클로라이드, 크롬 피콜로네이트, 구리, 구리 셀페이트, 구리 글루코네이트, 구리 셀페이트, 플루오라이드, 철, 카보닐 철, 제2 철, 푸마르산 제2 철(ferrous fumarate), 제2 철 오르토포스페이트, 철 가루(iron trituration), 폴리사카라이드 철, 아이오다이드, 아이오딘, 마그네슘, 마그네슘 카보네이트, 마그네슘 히드록사이드, 마그네슘 옥사이드, 마그네슘 스테아레이트, 마그네슘 셀페이트, 망간, 몰리브덴, 인, 칼륨, 칼륨 포스페이트, 칼륨 아이오다이드, 칼륨 클로라이드, 칼륨 아세테이트, 셀레늄, 황, 나트륨, 도큐세이트 나트륨 (docusate sodium), 나트륨 클로라이드, 나트륨 셀레네이트, 나트륨 몰리브데이트, 아연, 아연 옥사이드, 아연 셀페이트 및 이의 혼합물. 미네랄 화합물 유도체의 비제한적 예로 임의의 미네랄 화합물의 염, 알칼린 염, 에스테르 및 킬레이트를 포함한다. 상기 미네랄은 칼슘 포스페이트, 칼슘 글리세롤 포스페이트, 나트륨 시트레이트, 칼륨 클로라이드, 칼륨 포스페이트, 마그네슘 포스페이트, 철 셀페이트(ferrous sulfate), 아연 셀페이트, 황산 제2 구리, 황산 망간 및 나트륨 셀레나이트와 같은 염의 형태로 영양 조성물에 첨가될 수 있다. 당해 분야에 공지된 바와 같이 추가의 비타민 및 미네랄을 첨가할 수 있다.

[0513] 하나의 실시태양에서, 본 발명의, 또는 본 발명을 사용하여 생산된 상기 영양 조성물은 인간 또는 동물 모두 또는 DPA를 포함하는 이의 추출물을 포함하지 않는다.

[0514] 또 다른 실시태양에서, 상기 영양 조성물의 전체 지방산 함량 중 오메가-6 DPA의 수준은 2% 미만, 바람직하게는 1% 미만, 또는 0.1% 내지 2%이며, 더욱 바람직하게는 존재하지 않는다.

[0515] 조성물

[0516] 본 발명은 또한 바람직하게는 지방산의 에틸 에스테르의 형태의, 본 발명의 방법을 사용하여 제조된 지방산 및/또는 생성 오일 중 하나 이상을 포함하는 조성물, 특히 약학 조성물을 포함한다.

[0517] 약학 조성물은 상기 지방산 및/또는 오일 중 하나 이상을, 표준의, 널리 공지된, 무독성의 약학적으로 허용 가능한 담체, 보조제 또는 비히클, 예를 들어 인산염 완충된 염수, 물, 에탄올, 폴리올, 식물성 오일, 습윤제, 또는 유화제, 예를 들어 수/오일 유화제와 함께 포함할 수 있다. 상기 조성물은 액체 또는 고체 형태로 존재할 수 있다. 예를 들어, 상기 조성물은 정제, 캡슐, 삼킬 수 있는 액체 또는 분말, 주사성 또는 국소용 연고 또는 크림의 형태로 존재할 수 있다. 적합한 유동성이, 예를 들어 분산액의 경우에 필요한 입자 크기의 유지에 의해서 및 계면활성제의 사용에 의해서 유지될 수 있다. 등장제, 예를 들어 당, 염화 나트륨 등을 포함하는 것도 또한 바람직할 수 있다. 상기와 같은 불활성 희석제 외에, 상기 조성물은 또한 보조제, 예를 들어 습윤제, 유화제 및 현탁제, 감미제, 풍미제 및 방향제를 포함할 수 있다.

[0518] 현탁액은 상기 활성 화합물 외에, 현탁제, 예를 들어 에톡실화된 아이소스테아릴 알콜, 폴리옥시에틸렌 솔비톨 및 솔비탄 에스터, 미정질 셀룰로스, 알루미늄 메타하이드록사이드, 벤토나이트, 아가-아가 및 트라가칸트, 또는 이들 물질의 혼합물을 포함할 수 있다.

[0519] 고체 투여형, 예를 들어 정제 및 캡슐을 당해 분야에 널리 공지된 기법을 사용하여 제조할 수 있다. 예를 들어, 본 발명에 따라 제조된 지방산을 통상적인 정제 베이스, 예를 들어 락토스, 슈크로스 및 옥수수 전분으로, 결합제, 예를 들어 아카시아, 옥수수전분 또는 젤라틴, 붕해제, 예를 들어 감자 전분 또는 알긴산, 및 윤활제, 예를 들어 스테아르산 또는 마그네슘 스테아레이트와 함께 타정할 수 있다. 캡슐은 상기 부형제들을 젤라틴 캡슐에, 산화방지제 및 적합한 지방산(들)과 함께 혼입시킴으로써 제조할 수 있다.

[0520] 정맥내 투여를 위해서, 본 발명에 따라 제조된 지방산 또는 그의 유도체를 상업적인 제형에 혼입시킬 수 있다.

[0521] 특정 지방산의 전형적인 투여량은 0.1 mg 내지 20 g으로, 하루에 1 내지 5 회 복용되며(매일 100 g 이하), 바람직하게는 매일 약 10 mg 내지 약 1, 2, 5 또는 10 g(1 회 또는 수회 용량으로 복용)의 범위이다. 당해 분야에 공지된 바와 같이, 최소 약 300 mg/일의 지방산, 특히 LC-PUFA가 바람직하다. 그러나, 어떤 양의 지방산이 환자에게 이로울 것인지를 알 것이다.

[0522] 본 발명의 약학 조성물의 가능한 투여 경로는 예를 들어 경장(예를 들어 경구 및 직장) 및 비경구를 포함한다.

예를 들어, 액체 제제는 경구 또는 직장 투여될 수 있다. 또한, 균일한 혼합물을 물에 완전히 분산시키고, 멸균 조건 하에서 생리학적으로 허용 가능한 희석제, 보존제, 완충제 또는 추진제와 혼합하여 스프레이 또는 흡입제를 형성시킬 수 있다.

[0523] 환자에게 투여되는 조성물의 투여량은 당해 분야의 통상적인 숙련가에 의해 결정될 수 있으며, 다양한 인자들, 예를 들어 상기 환자의 체중, 상기 환자의 연령, 상기 환자의 전반적인 건강, 상기 환자의 과거 병력, 상기 환자의 면역 상태 등에 따라 변할 수 있다.

[0524] 또한, 본 발명의 조성물을 화장용으로 사용할 수도 있다. 상기 조성물을 기존의 화장품 조성물에, 혼합물이 형성되도록 첨가하거나 본 발명에 따라 제조된 지방산을 화장품 조성물 중의 유일한 "활성" 성분으로서 사용할 수도 있다.

[0525] **실시예**

[0526] **실시예 1. 일반적인 물질 및 방법**

[0527] 일시적인 발현 시스템에서 식물 세포 중 유전자의 발현

[0528] 외인성 유전자 구조물을 실질적으로 문헌[Voinnet et al. (2003)] 및 [Wood et al. (2009)]에 개시된 바와 같이 일시적인 발현 시스템에서 식물 세포에서 발현시켰다.

[0529] 지방산의 기체 크로마토그래피(GC) 분석

[0530] FAME를 30 m SGE-BPX70 컬럼(70% 시아노프로필 폴리실페닐렌-실록산, 0.25 mm 내부 직경, 0.25 mm 필름 두께), FID, 분할/비분할 주입기 및 Agilent Technologies 7693 Series 자동 샘플러 및 주입기가 구비된 Agilent Technologies 7890A GC(미국 캘리포니아주 팔로알토 소재)를 사용하여 기체 크로마토그래피에 의해 분석하였다. 헬륨을 캐리어 가스로서 사용하였다. 샘플을 150 °C의 오븐 온도에서 분할 방식(50:1 비)으로 주입하였다. 주입 후, 상기 오븐 온도를 1 분간 150 °C에서 유지시킨 후, 3 °C 분⁻¹으로 210 °C까지 상승시키고, 다시 50 °C 분⁻¹으로 240 °C까지 상승시키고, 최종적으로 240 °C에서 1.4 분 동안 유지시켰다. 피크들을 기지량의 외부 표준 GLC-411(Nuchek) 및 C17:1-ME 내부 표준의 반응을 근거로 Agilent Technologies ChemStation 소프트웨어(Rev B.04.03(16), 미국 캘리포니아주 팔로알토 소재)에 의해 정량분석하였다.

[0531] 지질의 액체 크로마토그래피-질량 분광분석(LC-MS)

[0532] 전체 지질을, 내부 정량분석 표준으로서 기지량의 트라이-C17:0-TAG를 첨가한 후에 동결-건조된 발생 종자, 개화 후 12일째(daf) 및 성숙한 종자로부터 추출하였다. 상기 추출된 지질을 건조 물질 5 mg당 1 mL의 부탄올:메탄올(1:1 v/v) 중 10 mM 부틸화된 하이드록시톨루엔에 용해시키고, Agilent 1200 시리즈 LC 및 6410b 전기분무 이온화 삼중 4극자 LC-MS를 사용하여 분석하였다. 지질을 0.2 mL/분 유량의 2원 구매로 작동하는 에이센티스 익스프레스(Ascentis Express) RP-아미드 컬럼(50 mm x 2.1 mm, 2.7 µm, 슈펠코)을 사용하여 크로마토그래피에 의해 분리시켰다. 이동상은 A, H₂O:메탄올:테트라하이드로퓨란(50:20:30, v/v/v) 중의 10 mM 암모늄 포르메이트; B, H₂O:메탄올:테트라하이드로퓨란(5:20:75, v/v/v) 중의 10 mM 암모늄 포르메이트이었다. 다중 반응 모니터링(MRM) 목록은 30 V의 충돌 에너지 및 60 V의 단편화 전압을 사용하여 주요 지방산 16:0, 18:0, 18:1, 18:2, 18:3, 18:4, 20:1, 20:2, 20:3, 20:4, 20:5, 22:4, 22:5, 22:6을 기본으로 하였다. 개별적인 MRM TAG를 암모니아와 화합된 전구체 이온 및 22:6의 중성 손실로부터의 생성물 이온을 근거로 확인하였다. TAG를 10 µM 트라이스테아린 외부 표준을 사용하여 정량분석하였다.

[0533] LC-MS를 사용한 지질 프로파일링

[0534] 추출된 전체 지질을 Agilent 6410B 전기분무 이온화 QQQ-MS (Agilent, Palo Alto, California, USA)에 연결된 Agilent 1200 시리즈 LC를 사용하여 분석하였다. 각각의 전체 지질 추출물의 5 µL 주입물을 0.2 mL/min의 유속으로 2원 농도구배를 사용하여 Ascentis Express RP-Amide 50 mm x 2.1 mm, 2.7 µm HPLC 컬럼 (Sigma-Aldrich, Castle Hill, Australia)으로 크로마토그래피적으로 분리하였다. 이동상은 다음과 같았다: A, H₂O:메탄올:테트라하이드로퓨란 (50:20:30, v/v/v.) 중의 10 mM 암모늄 포르메이트; B, H₂O:메탄올:테트라하이드로퓨란 (5:20:75, v/v/v.) 중의 10 mM 암모늄 포르메이트. 선택된 중성 지질 (TAG 및 DAG) 및 인지질 (PL; PC, PE, PI, PS, PA, PG 포함)을 30 V의 충돌 에너지 및 60 V의 단편화 에너지를 사용하여 다중 반응 모니터링 (MRM)으로 분석하였다. 중성 지질은 다음의 주요 지방산: 16:0 (팔미트산), 18:0 (스테아르산), 18:1ω9 (올레산,

OA), 18:2 ω 6 (리놀레산, LA), 18:3 ω 3 (α -리놀렌산, ALA), 18:4 ω 3 (스테아리돈산, SDA), 20:1, 20:2, 20:3, 20:4 ω 3, 20:5 ω 3, 22:4 ω 3, 22:5 ω 3, 22:6 ω 3에 대해 표적화하였으며, 반면 인지질은 각각 0-3, 0-4, 0-5, 4-6 개의 이중 결합을 갖는 C₁₆, C₁₈, C₂₀ 및 C₂₂ 종을 함유하는 것을 스캐닝하였다.

[0535] 개별적인 MRM TAG를 암모니아화된 전구체 이온 및 SDA, EPA 및 DHA, 20:1의 중성 손실 유래 생성물 이온에 기반하여 동정하였다. TAG 및 DAG를 외부 표준물질로서 50 μ M 트리스테아린 및 디스테아린을 사용하여 정량화하였다. PL을 외부 표준물질로서 10 μ M의 디-18:0-PC, 디-17:0-PA, 디-17:0-PE, 17:0-17:1-PG, 디-18:1-PI 및 디-17:0-PS를 사용하여 정량화하였다 (Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama, USA). 선택된 TAG, DAG 및 PL 시리즈를 Agilent 6520 Q-TOF MS/MS로 추가로 확인하였다.

[0536] 종자 지방산 프로파일 및 오일 함량의 측정

[0537] 종자유 함량을 측정하고자 하는 경우, 종자를 건조기에서 24 시간 동안 건조시키고 대략 4 mg의 종자를, 테플론을 덴 스크류 캡을 함유하는 2 ml 유리 바이알로 옮겼다. 0.1 ml 톨루엔에 용해된 0.05 mg 트라이헵타데카노인을 내부 표준으로서 상기 바이알에 첨가하였다.

[0538] 종자 FAME를, 종자 물질을 함유하는 바이알에 0.7 ml의 1N 메탄올성 HCl(슈펠코)을 가함으로써 제조하고, 간단히 와동시키고 80 °C에서 2 시간 동안 배양하였다. 실온으로 냉각시킨 후에, 0.3 ml의 0.9% NaCl(w/v) 및 0.1 ml 헥산을 상기 바이알에 첨가하고 헤이돌프 비브라맥스(Heidolph Vibramax) 110에서 10 분간 잘 혼합하였다. FAME를 0.3 ml 유리 삽입물에 수거하고 앞서 언급한 바와 같이 화염 이온화 검출기(FID)로 GC에 의해 분석하였다.

[0539] 개개 FAME의 피크 면적을 먼저 상업적인 표준 GLC-411(NU-CHEK PREP, INC., 미국 소재) 중에 존재하는 기지량의 동일한 FAME의 피크 면적 반응을 근거로 보정하였다. GLC-411은 C8:0 내지 C22:6 범위의, 동량의 31 지방산(중량%)을 함유한다. 상기 표준 중에 존재하지 않는 지방산의 경우에, 본 발명자들은 가장 유사한 FAME의 피크 면적 반응을 취하였다. 예를 들어, 16:1d9의 FAME의 피크 면적 반응을 16:1d7에 사용하고 C22:6의 FAME 반응을 C22:5에 사용하였다. 상기 보정된 면적을 사용하여 내부 표준 질량 대비 상기 샘플 중 각 FAME의 질량을 계산하였다. 오일은 주로 TAG의 형태로 저장되며 그의 중량을 FAME 중량을 기준으로 계산하였다. 글리세롤의 전체 물을, 각 FAME의 물을 계산하고 FAME의 전체 물을 3으로 나누어 측정하였다. TAG를 하기 관계를 사용하여 글리세롤 및 지방산 부분의 합으로서 계산하였다: 오일의 중량% = $100 \times ((41 \times \text{FAME 전체 물}/3) + (\text{FAME 전체 g} - (15 \times \text{FAME 전체 물}))) / \text{종자 g}$ (여기에서 41 및 15는 각각 글리세롤 부분과 메틸기의 분자량이다).

[0540] 오일 샘플의 스테롤 함량의 분석

[0541] 내부 표준으로서 C24:0 모놀의 분액이 첨가된 대략 10 mg의 오일 샘플을 4 ml의 80% MeOH 중의 5% KOH를 사용하여 비누화시키고 테플론을 덴 스크류-캡핑된 유리 튜브 중에서 80 °C에서 2 시간 동안 가열하였다. 상기 반응 혼합물을 냉각시킨 후에, 2 ml의 밀리-Q 수를 가하고 상기 스테롤을 2 ml의 헥산:다이클로로메탄(4:1 v/v) 내로 진탕 및 와동에 의해 추출하였다. 상기 혼합물을 원심분리시키고 스테롤 추출물을 제거하고 2 ml의 밀리-Q 수로 세척하였다. 이어서 상기 스테롤 추출물을 진탕 및 원심분리 후 제거하였다. 상기 추출물을 질소 기체의 스트림을 사용하여 증발시키고 상기 스테롤을 200 ml의 BSTFA를 사용하여 실릴화하고 80 °C에서 2 시간 동안 가열하였다.

[0542] 상기 스테롤의 GC/GC-MS 분석을 위해서, 스테롤-OTMSi 유도체를 40 °C 열 블록상에서 질소 기체의 스트림 하에 건조시킨 다음, GC/GC-MS 분석 직전에 클로로폼 또는 헥산에 재용해시켰다. 상기 스테롤-OTMS 유도체를 Supelco EquityTM-1 융합된 실리카 모세관 컬럼(15 m x 0.1 mm 직경, 0.1 μ m 필름 두께), FID, 분할/비분할 주입기 및 Agilent Technologies 7683B 시리즈 자동 샘플러 및 주입기가 구비된 Agilent Technologies 6890A GC(미국 캘리포니아주 팔로알토 소재)를 사용하여 기체 크로마토그래피(GC)에 의해 분석하였다. 헬륨은 캐리어 가스였다. 샘플을 120 °C의 오븐 온도에서 비분할 방식으로 주입하였다. 주입 후, 상기 오븐 온도를 10 °C 분⁻¹으로 270 °C까지 상승시키고 최종적으로 5 °C 분⁻¹으로 300 °C까지 상승시켰다. 피크들을 Agilent Technologies ChemStation 소프트웨어(미국 캘리포니아주 팔로알토 소재)에 의해 정량분석하였다. GC 결과는 개별 성분 면적의 $\pm 5\%$ 의 오차로 적용한다.

[0543] GC-질량 분광측정(GC-MS) 분석을 피니간 써모퀘스트(Finnigan Thermoquest) GCQ GC-MS 및 피니간 써모 일렉트론 코포레이션 GC-MS 상에서 수행하였으며; 이 두 시스템은 모두 온-컬럼 주입기 및 써모퀘스트 엑스칼리버(Xcalibur) 소프트웨어(미국 텍사스주 오스틴 소재)가 구비되어 있다. 각각의 GC는 상술한 바와 유사한 극성을

갖는 모세관 컬럼이 구비되어 있다. 개별적인 성분들을, 질량 스펙트럼 데이터를 사용하고 체류시간 데이터를 진정한 표준 및 실험용 표준에 대해 수득된 경우와 비교하여 확인하였다. 전체 과정 블랭크 분석을 상기 샘플 배치와 동시에 수행하였다.

[0544] RT-PCR 조건

[0545] 역전사-PCR(RT-PCR) 증폭을 전형적으로 제조사의 설명에 따라 완충제 및 뉴클레오타이드 성분들과 함께, 10 pmol의 순방향 프라이머 및 30 pmol의 역방향 프라이머를 사용하는 25 μ L 부피의 슈퍼스크립트(Superscript) III 1-단계 RT-PCR 시스템(Invitrogen), 2.5 mM의 최종 농도의 $MgSO_4$, 400 ng의 전체 RNA를 사용하여 수행하였다. 전형적인 온도 영역은 하기와 같았다: 역전사 발생을 위해서 1 주기의 45 $^{\circ}C$ 30 분; 이어서 1 주기의 94 $^{\circ}C$ 2 분 이어서 40 주기의 94 $^{\circ}C$ 30 초, 52 $^{\circ}C$ 30 초, 70 $^{\circ}C$ 1 분; 이어서 5 $^{\circ}C$ 로 반응 혼합물을 냉각시키기 전에 1 주기의 72 $^{\circ}C$ 2 분.

[0546] 디지털 PCR에 의한 트랜스유전자의 카피-수의 측정

[0547] 트랜스제닉 식물 내 트랜스유전자의 카피-수(copy-number)를 측정하기 위하여, 디지털 PCR 방법을 다음과 같이 사용하였다. 이러한 방법은 또한 식물이 본 발명에 개시된 유전적 구조물에 대해 형질전환되었는지 여부를 측정하기 위해 사용될 수 있었다. 약 1 센티미터 평방의 잎 조직을 각각의 개개 식물로부터 수확하고 수집 마이크로튜브(Qiagen)에 넣었다. 이어서 샘플을 24 내지 48시간 동안 동결건조시켰다. DNA 추출을 위하여 샘플을 깨기 위하여, 스테인리스 스틸 볼 베어링을 각각의 건조된 샘플에 투입하고 튜브를 Qiagen 조직 파쇄기 상에서 흔들었다. 375 μ L의 추출 버퍼 (0.1M Tris-HCl pH8, 0.05M EDTA pH8 및 1.25% SDS)를 각각의 튜브에 투입하고, 혼합물을 1시간 동안 65 $^{\circ}C$ 에서 인큐베이션시킨 다음, 냉각시키고 187 μ L의 6M 암모늄 아세테이트(4 $^{\circ}C$)를 철저히 혼합하면서 각각의 튜브에 첨가하였다. 그 다음 샘플을 3000 rpm에서 30분 동안 원심분리하였다. 각각의 튜브의 상등액을, 각각 상온에서 5분 동안 DNA를 침전시키기 위한 220 μ L의 이소프로판올을 함유하는 새로운 마이크로튜브로 제거하였다. DNA를 30분 동안 3000rpm으로 튜브를 원심분리하여 수집하고, DNA 펠렛을 320 μ L의 70% 에탄올로 세척한 후, 건조시키고 225 μ L의 물 중에 DNA를 재현탁시켰다. 비-용해 물질을 20분 동안 3000 rpm으로 원심분리하여 펠렛화하고, 150 μ L의 각각의 상등액을 장기저장을 위한 96-웰 플레이트로 옮겼다.

[0548] 효율적이고 정량적인 디지털 PCR (ddPCR)의 경우, 트랜스유전자의 다중 카피 또는 다중 삽입물이 물리적으로 분리되는 것을 보장하도록, DNA를 증폭 반응에 앞서 제한 효소로 소화시켰다. 따라서 DNA 제제의 분할량을 10x *EcoRI* 버퍼, 5 μ L의 DNA 및 샘플 당 약 4 유닛의 각각의 효소를 사용하여 20 μ L의 부피로 *EcoRI* 및 *BamHI*를 함께 사용하여 소화시키고, 37 $^{\circ}C$ 에서 하룻밤 동안 인큐베이션시켰다.

[0549] 이들 PCR 반응에 사용된 프라이머를 Primer3 소프트웨어를 사용하여 설계하여 기준용 프라이머와 타깃 유전자가 상호작용하는 것으로 예측되지 않거나 이러한 상호작용이 사용된 조건 하에서 문제가 없음을 확인하였다. 분석에 사용된 기준 유전자는, 캐놀라 게놈 당 하나의 유전자로 존재하는, 캐놀라 *Hmg* (고 이동도 그룹) 유전자이었다 (Weng et al., 2004). 캐놀라가 알로테트라프로이드이기 때문에, *브라시카 나푸스* 내에, *Hmg* 유전자의 4개 카피, 즉 각각의 2개 유전자의 2개의 대립 형질이 있는 것을 취하였다. 기준 유전자 반응에 사용된 프라이머 쌍과 듀얼-라벨링된 프로브는 다음과 같다: 센스 프라이머, Can11 gcgaagcacatcgagtca (서열번호 50); 안티센스 프라이머, Can12 ggttgaggtggttagctgagg (서열번호 51); 프로브, Hmg-P3 5'-Hex/tctctac/zen/ccgtctcacatgacgc/3IABkFQ/-3' (서열번호 52). 증폭 생성물 크기는 73bp이었다.

[0550] 모든 트랜스제닉 식물을 스크린하기 위한 PPT 선택성 마커 유전자의 영역을 검출하는 하나의 타깃 유전자 증폭 반응에서, 센스 프라이머는 Can17, atacaagcacggttgatgg (서열번호 53)이었고; 안티센스 프라이머는 Can18 tgggtctaacaggtctaggagga (서열번호 54)이었으며; 프로브는 PPT-P3 5'-/FAM/tggcaaga/zen/gatttcgagcttctctgc/3IABkFQ/-3' (서열번호 55)이었다. 이러한 타깃 유전자 증폭 생성물의 크기는 82 bp이었다. 일부 경우에, 두 번째 타깃 유전자 분석을 병행하여 수행하여 T-DNA의 부분 삽입을 검출하였다. 이러한 두 번째 분석은 센스 프라이머, Can23 caagcaccgtagtaagagagca (서열번호 56), 안티센스 프라이머, Can24 cagacagcctgaggttagca (서열번호 57); 프로브, D6des-P3 5'-/FAM/tccccactt/zen/cttagcgaaaggaacga/3IABkFQ/-3' (서열번호 58)를 사용하여 $\Delta 6$ -불포화효소 유전자의 영역을 검출하였다. 이러한 타깃 유전자 증폭 생성물의 크기는 89bp이었다. 반응은 일반적으로 2 μ L의 소화된 DNA 조제물을 사용하였다. 샘플 당 반응 조성물: 25 μ L의 전체 부피 중 기준 센스 프라이머 (10pM), 1 μ L; 기준 안티센스 프라이머 (10pM), 1 μ L; 기준 유전자 프로브 (10pM), 0.5 μ L; 타깃 유전자 센스 프라이머 (10pM), 1 μ L; 타깃 유전자 안티센스 프라이머 (10pM), 1 μ L; 타깃 유전자 프로브 (10pM), 0.5 μ L; ddPCR 시약 믹스,

12.5 μ L; 물 5.5 μ L.

[0551] 그 다음 상기 혼합물을 QX100 액적 발생기에 넣었으며, 여기서 각각의 샘플을 20000 나노리터 크기의 액적으로 분할시켰다. 이는 모든 샘플이 가공되고 96-웰 PCR 플레이트로 옮길 때까지 8-웰 카트리지 내에서 수행하였다. 그 다음 상기 플레이트를 플레이트 밀봉 기기를 사용하여 관통 가능한 호일로 열 밀봉하였다. 그 다음 샘플을 하기 반응 조건 하에서 처리하였다: 95℃, 10 분, 2.5℃/s의 승온; 그 다음 94℃의 39 사이클, 2.5℃/s의 30초 승온; 61℃, 1분, 2.5℃/s의 승온; 98℃, 10분, 이어서 12℃로 냉각. 액적 내 DNA의 증폭 반응 후에, 플레이트를 QX100 액적 검출기에 넣었으며, 여기서 각각의 액적을 개별적으로 2색 검출 시스템(FAM 또는 Hex를 검출하기 위해 세팅됨)을 사용하여 분석하였다. 액적 디지털 PCR 데이터를 형광 세기 그래프 상에 플롯팅된 샘플 유래 각각의 액적을 갖는 1-D 플롯, 또는 형광 (FAM)이 각각의 액적에 대한 형광 (Hex)에 대해 플롯팅된 2-D 플롯 중 어느 하나로 조사하였다. 소프트웨어는 각각의 샘플 내 각각의 형광체 (FAM 또는 Hex)에 대한 양성 및 음성 액적의 수를 측정하였다. 이어서 소프트웨어가 포아송 알고리즘(Poisson algorithm)에 양성 액적의 분획을 피팅하여 카피의 유닛/투입 μ L로 타겟 DNA 분자의 농도를 측정하였다. 카피 수 변화를 하기 식을 사용하여 계산하였다: $CNV = (A/B) * Nb$, 여기서 A= 타겟 유전자의 농도, B= 기준 유전자의 농도, 및 $Nb = 4$, 게놈 내 기준 유전자의 카피의 수.

[0552] 꽃가루 생존력 평가

[0553] 플루오레세인 디아세테이트 (FDA)를 2 mg/ml으로 아세톤 중에 용해시켜 스톱 용액을 제공하였다. FDA 회색액을, 지속적인 흐린 외관으로 표시되는 바와 같은 포화에 도달할 때까지 2 ml의 수크로즈 용액 (0.5 M)에 FDA 스톱 용액을 적가함으로써 사용 직전에 제조하였다.

[0554] 프로피듐 아이오다이드(PI)를 멸균 증류수에 1 mg/ml로 용해시켜 스톱 용액을 제공하였다. 사용 직전에, 100 μ l의 스톱 용액을 10ml의 멸균 증류수에 첨가하여 작업 용액을 만들었다. 생존 및 비-생존 꽃가루의 비율을 체크하기 위하여, PI 및 FDA 스톱 용액을 2:3 비율로 혼합하였다.

[0555] 트랜스제닉 및 야생형 캐놀라 및 머스타드 식물을 일 당 16시간의 광주기로 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 의 온실에서 표준 조건 하에 재배하였다. 다음 날에 개화할 준비가 된 성숙한 꽃 봉오리를 라벨링하고 오전 9-10에 다음 날 아침에 수확하였다. 개화된 꽃의 꽃가루를 FDA/PI 혼합물로 염색하고 Leica MZFLIII 형광 현미경을 사용하여 시각화하였다. 480/40 nm 여기 필터를 구비한 510 nm 길이 통과 방출 필터 (적색 및 녹색 광을 투과시킴)인 GFP-2를 사용하여 생존 및 비-생존 꽃가루를 검출하였다. PI 염색을 한 비-생존 꽃가루가 형광 현미경 하에 적색으로 나타난 반면 생존 꽃가루는 PI 및 FDA로 염색시 밝은 녹색으로 나타났다.

[0556] 실시예 2. 카멜리나 사티바 종자에서 트랜스제닉 DHA 경로의 안정한 발현

[0557] 2원 벡터 pJP3416-GA7 (도 2 및 서열번호 1 참조)을 상기 사용된 에이. 튜메사피엔스 균주 AGL1 및 형질전환된 아그로박테리움의 배양물로부터의 세포내로 도입시켜 형질전환을 위한 플로랄 침지 방법을 사용하여 씨. 사티바 화훼 식물을 처리하였다(Lu and Kang, 2008). 식물의 증식 및 숙성 후, 상기 처리된 식물로부터 T_1 종자를 수확하고, 토양에 파종하고, 생성된 식물을 제초제 BASTA로 분무 처리하여, pJP3416-GA7의 T-DNA 상에 존재하는 bar 선택성 마커 유전자에 대해 트랜스제닉이고 이를 발현하는 식물을 선택하였다. 제초제에 허용성인 생존하는 T_1 파종을 숙성기로 증식시키고 자가-수분을 허용한 후에, 생성된 T_2 종자를 수확하였다. 5 개의 트랜스제닉 식물을 수득하였으며, 이중 단지 3 개만이 전체 T-DNA를 함유하였다.

[0558] 지질은 전체 T-DNA를 함유하는 3 개의 식물들 각각으로부터 대략 20 개의 종자 풀로부터 추출하였다. 수집된 샘플 중 2개는 매우 낮은, 거의 검출할 수 없는 수준의 DHA를 함유하였으나, 세 번째 풀은 약 4.7%의 DHA를 함유하였다. 따라서, 지질을 상기 식물로부터 10 개의 개개 T_2 종자로부터 추출하고 지방산 조성을 GC에 의해 분석하였다. 형질전환된 라인에 대한 개개 종자의 지방산 조성 데이터를 또한 표 4에 나타낸다. 전체 종자 지질 프로파일(표 4)로부터 집계한 데이터를 표 5에 나타낸다.

[0559] DHA는 10 개의 개별적인 종자 중 6 개에 존재하였다. 4개의 다른 종자는 DHA를 갖지 않았으며, 부모 식물에서 T-DNA 삽입의 반접합성 상태를 근거로 상기 T-DNA를 갖지 않는 빈(null) 분리개체인 것으로 추정되었다. 최고 수준의 DHA를 갖는 단일 종자로부터 추출된 지질은 9.0% DHA를 갖는 반면 EPA, DPA 및 DHA에 대한 백분율의 합은 11.4%이었다.

표 4

pJP3416-GA7 로부터의 T-DNA로 형질전환된 트랜스제닉 T2 카멜리나 사티바 종자로부터의 전체 종자 지질의 지방산 조성. 상기 지방산 조성을 수집된 종자 배치(FD5.46) 및 최고에서부터 최저까지의 DHA로 순위를 매긴(좌에서 우로) 10 개의 단일 종자에 대해서 나타낸다.

지방산	수집된 FD5.46	# 2	# 4	# 8	# 7	# 9	# 1	# 3	# 5	# 6	# 10
14:0	0	0.2	0.2	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1	0.2	0.2
16:0	11.6	12.1	12.3	12.1	13.2	12.3	12.8	11.9	11.4	11.5	11.7
16:1	0.2	0.0	0.1	0.1	0.0	0.2	0.0	0.2	0.2	0.2	0.2
16:3	0.3	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
18:0	3.7	3.3	3.2	3.2	3.0	3.1	3.2	3.3	3.1	3.2	3.2
18:1	10.8	8.0	8.0	8.6	8.5	9.4	11.0	10.2	8.3	9.4	8.6
18:1Δ11	1.7	1.3	1.4	1.4	1.7	1.4	1.5	1.3	1.3	1.3	1.3
18:2	24.7	18.2	19.5	19.2	18.5	20.1	23.8	32.2	30.3	29.8	31.6
18:3ω3	27.4	26.7	26.6	27.3	28.9	28.2	27.4	28.3	29.2	29.5	28.2
18:3ω6	0.2	1.4	0.3	0.3	0.4	0.2	0.5	0.0	0.5	0.4	0.6
20:0	1.6	1.4	1.3	1.4	1.2	1.4	1.4	1.8	2.1	1.9	2.0
18:4ω3	2.2	6.8	6.4	5.7	7.2	5.7	4.1	0.0	0.0	0.0	0.0
20:1Δ11	5.3	4.4	4.6	4.8	3.3	4.1	3.5	4.4	6.1	5.8	5.5
20:1iso	0.4	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.0	0.5	0.6	0.5	0.5
20:2ω6	0.8	0.8	0.9	0.8	0.6	0.8	0.7	1.3	1.5	1.4	1.4
20:3ω3	0.6	0.8	0.8	0.8	0.7	0.8	0.7	0.6	0.7	0.7	0.6
22:0	0.4	0.5	0.5	0.5	0.4	0.5	0.5	0.6	0.6	0.6	0.6
20:4ω3	0.2	0.3	0.3	0.3	0.4	0.4	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0
22:1	1.1	1.1	1.2	1.1	0.5	0.9	0.8	1.6	2.2	1.9	2.0
20:5ω3	0.7	1.3	1.6	1.5	1.6	1.1	1.7	0.0	0.0	0.0	0.1
22:2ω6	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.3	0.2	0.2
22:4ω6+22:3ω3	0.3	0.2	0.3	0.3	0.0	0.3	0.0	0.4	0.6	0.5	0.5
24:0	0.3	0.3	0.3	0.3	0.0	0.3	0.0	0.4	0.4	0.4	0.4
24:1	0.3	0.4	0.4	0.3	0.0	0.3	0.0	0.5	0.6	0.5	0.5
22:5ω3	0.3	1.1	1.2	1.1	1.1	0.9	0.8	0.0	0.0	0.0	0.0
22:6ω3	4.7	9.0	8.5	8.3	8.3	7.1	4.9	0.0	0.0	0.0	0.0

[0560]

표 5

표 4에 나타난 트랜스제닉 종자로부터의 전체 종자 지질 프로파일로부터 집계된 데이터.
계산은 표 4의 '소수 지방산'을 포함하지 않는다.

매개 변수	수집된 FD5.46	# 2	# 4	# 8	# 7	# 9	# 1	# 3	# 5	# 6	# 10
전체 $\omega 3$ (전 체 FA 의 %)	36.1	46	45.4	45	48.2	44.2	40.1	28.9	29.9	30.2	28.9
전체 $\omega 6$ (전 체 FA 의 %)	25.8	20.4	20.7	20.3	19.5	21.1	25	33.7	32.6	31.8	33.8
$\omega 3/\omega 6$ 비	1.40	2.25	2.19	2.22	2.47	2.09	1.60	0.86	0.92	0.95	0.86
$\omega 6/\omega 3$ 비	0.71	0.44	0.46	0.45	0.40	0.48	0.62	1.17	1.09	1.05	1.17
전체 신규 $\omega 3$ (전 체 FA 의 %)	8.1	18.5	18	16.9	18.6	15.2	12	0	0	0	0.1
전체 신규 $\omega 6$ (전 체 FA 의 %)	1.1	2.2	1.2	1.1	1	1	1.2	1.5	2.3	2	2.2
신규 $\omega 3/\omega 6$ 비	7.36	8.41	15.00	15.36	18.60	15.20	10.00				0.05
신규 $\omega 6/\omega 3$ 비	0.14	0.12	0.07	0.07	0.05	0.07	0.10				22.00
OA 예 서 EPA 효율	8.2%	15.6%	15.5%	15.1%	15.1%	12.8%	10.5%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%
OA 예 서 DHA 효율	6.7%	12.3%	11.6%	11.5%	11.4%	10.0%	7.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
LA 예 서 EPA 효율	9.2%	17.2%	17.1%	16.7%	16.2%	13.9%	11.4%	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%
LA 예 서 DHA 효율	7.6%	13.6%	12.9%	12.7%	12.3%	10.9%	7.5%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%

[0561]

ALA 에서 EPA 효율	15.8%	24.8%	24.9%	24.2%	22.8%	20.6%	18.5%	0.0%	0.0%	0.0%	0.3%
ALA 에서 DHA 효율	13.0%	19.6%	18.7%	18.4%	17.2%	16.1%	12.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
전체 포화물	17.6	17.8	17.8	17.6	18	17.8	18.1	18.2	17.7	17.8	18.1
전체 단일 불포 화물	19.8	15.3	16	16.6	14.3	16.6	16.8	18.7	19.3	19.6	18.6
전체 다중 불포 화물	62.5	66.6	66.4	65.6	67.7	65.6	65.1	63	63.1	62.5	63.2
전체 C20	9.6	9.3	9.8	9.9	8.1	8.9	8.5	8.6	11	10.3	10.1
전체 C22	5.4	10.3	10	9.7	9.4	8.3	5.7	0.6	0.9	0.7	0.7
C20/C2 2 비	1.78	0.90	0.98	1.02	0.86	1.07	1.49	14.33	12.22	14.71	14.43

[0562]

[0563]

상기 라인으로부터 동종접합성 종자를 T4 세대에서 수득하였다. 10.3% 이하의 DHA가 사건 FD5-46-18-110에서 생성되었으며 이때 전체 T4 세대에 걸쳐 평균 7.3%의 DHA가 관찰되었다. 이후의 세대(T5)를 확립하여 다중 세대에 걸친 PUFA 생성물, 특히 DHA의 안정성을 추가로 시험하였다. 비록 통합(pooled)종자 DHA 함량이 다중의 트랜스제닉 좌위의 존재로 인하여 T₄ 세대까지 안정성을 갖지 않았을지라도, 관찰된 최대 DHA 수준은 5번째 세대에서 안정한 것으로 확인되었다. 또한, T₅ 종자 배치를, 관찰된 발아 효율 또는 속도에 명백한 차이가 없는 모체 씨. *사티바* 종자와 함께 시험관 내 MS 배지 상에서 발아시켰다. 트랜스제닉 라인의 추가 세대(T6, T7 세대 등)는 종자 DHA 수준으로 어떠한 감소도 나타내지 않았다. 트랜스제닉 식물을 완전히 수술 및 암술 수정능력이 있었으며, 꽃가루는 야생형 식물과 같은 약 100% 생존력을 보였다. 상이한 수준의 DHA를 갖는 종자의 오일 함량의 분석은, 아라비도프시스 *탈리아나*에서 나타난 상관관계에 반하여, DHA 수준과 오일 함량 간의 상관관계를 밝히지 못하였다.

[0564]

몇몇의 추가적인 트랜스제닉 라인에서, 독립적인 사건의 단일 종자의 DHA 함량은 12%를 초과하였다. 이들 라인의 트랜스제닉:영(null) 비율은 대략 3:1 내지 15:1인 것으로 확인되었다. 각각의 구조물 유래 상위 DHA 샘플의 대표적인 지방산 프로파일의 분석에서 검출된 다른 새로운 ω 6 PUFA 없이 단지 1.2-1.4% GLA만이 확인되었다. 반면에, 새로운 ω 3 PUFA (SDA) ω 3 LC-PUFA (ETA, EPA, DPA, DHA)는 전체 지방산 함량의 9.6%의 DHA 수준을 가지고 18.5%까지 축적하는 것으로 확인되었다. Δ 6-불포화는 32%이었고 EPA는 전체 지방산 함량의 0.8%이었다. Δ 5-신장 효율은 93%이었고 Δ 6-신장 효율은 60%이었다. DHA는 GA7 라인의 극성 종자 지질 분석에서 검출되었다.

[0565]

관찰된 분리 비율(~3:1 내지 ~15:1)은 하나 또는 최대 2개의 트랜스제닉 좌위가 씨. *사티바* 내에서 DHA의 어유 유사 수준을 생성하는데 필요하였음을 나타낸다는 점을 주목하였다. 이것은 트랜스제닉 특징이 성장될 수 있는 용이성 뿐만 아니라 트랜스유전자 안정성에 대한 중요한 의미가 포함되어 있다.

[0566]

동형접합성 종자를 다수의 온실에 걸쳐 심어 총 600개 이상의 개개 식물을 생산하였다. 오일을 다양한 방법들, 예를 들어 속슬렛, 아세톤 및 헥산 추출을 사용하여 종자로부터 추출하였다.

[0567]

¹³C NMR 위치특이성 분석을 트랜스제닉 씨. *사티바* 종자 오일에 대해 수행하여 TAG에 대한 ω 3 LC-PUFA의 위치 분포를 측정하였다. 대략 동등한 EPA 및 DHA를 갖는 사건을 이들 지방산에 대한 반응을 최대화하도록 선택하였으며 *sn*-1,3 대 *sn*-2의 비율은 EPA의 경우 0.75:0.25이고 DHA의 경우 0.86:0.14인 것으로 확인되었으며, 여기서 불편 분포(unbiased distribution)는 0.66:0.33이었다. 즉, 75%의 EPA 및 86%의 DHA가 TAG의 *sn*-1,3 위치에 위치하였다. 이는 비록 EPA에 대한 선호가 DHA의 경우보다 약할지라도 둘 모두의 지방산이 씨. *사티바* TAG 내에서 *sn*-1,3 위치상에 우선적으로 위치하였음을 나타내었다. DHA가 *sn*-1,3 상에서 주로 확인된 상기 결과는 *에이. 탈리아나* 종자에서 이전에 보고된 결과와 유사하였다 (Petrie et al., 2012).

[0568]

단지 소수의 독립적으로 형질전환된 라인만이 상기 기재된 형질전환 실험에서 얻어졌기 때문에, 추가적인 씨.

사티바 형질전환을 GA7-modB 구조물 (실시예 3)을 사용하여 수행하였다. 추가의 형질전환체를 얻었으며 20.1% 초과인 DHA를 생산하는 동중접합성 라인이 확인된다.

[0569] **실시예 3. 식물 종자에서 DHA 경로를 암호화하는 T-DNA에 대한 변형**

[0570] 비 나푸스에서 DHA 생산 수준을 W02013/185184에 개시된 수준 이상으로 개선시키기 위해서, 2원 벡터를 pJP3416-GA7-modA, pJP3416-GA7-modB, pJP3416-GA7-modC, pJP3416-GA7-modD, pJP3416-GA7-modE 및 pJP3416-GA7-modF를 W02013/185184에 기재된 바와 같이 제작하고 트랜스제닉 식물에서 시험하였다. 이들 2원 벡터는 pJP3416-GA7 구조물의 변형체이며, 특히 $\Delta 6$ -불포화효소 및 $\Delta 6$ -신장효소 작용을 개선시킴으로써 식물 종자 중 DHA의 합성을 더욱 증가시키도록 설계되었다. SDA가 $\Delta 5$ -신장효소에 비해, 비교적 낮은 $\Delta 6$ 신장 효율로 인해 GA7 구조물로 형질전환된 일부 종자에서 축적되며, 따라서 다른 변형들 중에서도 2 개의 신장효소 유전자 위치가 T-DNA에서 변환되는 것으로 관찰되었다.

[0571] pJP3416-GA7 중 2 개의 신장효소 암호화 서열을, 먼저 신규 피 코르다타 $\Delta 6$ -신장효소 카세트를 pJP3416-GA7의 SbfI 부위 사이에 클로닝하여 피 코르다타 $\Delta 5$ -신장효소 카세트를 대체시킴으로써 T-DNA 상에서 그의 위치를 변환시켜 pJP3416-GA7-modA를 제공하였다. 엠 푸실라 $\Delta 6$ -불포화효소를 구동하는 FP1 프로모터를 콘리닌 Cn12 프로모터(pLuCn12)로 교환하여 pJP3416-GA7-modB를 제공함으로써 상기 구조물을 더욱 변형시켰다. 이러한 변형은 상기 $\Delta 6$ -불포화효소 발현을 증가시키고 이에 의해 효소 효율을 증가시키고자 수행되었다. 상기 Cn12 프로모터는 절두된 나핀 프로모터보다 비 나푸스에서 상기 트랜스유전자의 더 높은 발현을 제공할 수도 있는 것으로 생각되었다.

[0572] 8 개의 트랜스제닉 pJP3416-GA7-modB 에이 탈리아나 사건 및 15 개의 트랜스제닉 pJP3416-GA7-modG 에이 탈리아나 사건들이 생성되었다. 수집된 pJP3416-GA7-modB 종자에서 3.4% 내지 7.2% DHA가 관찰되었으며 수집된 T2 pJP3416-GA7-modG 종자에서 0.6 내지 4.1% DHA가 관찰되었다. 최고의 pJP3416-GA7-modB 사건들 중 다수를 선택성 배지에 파종하고 생존 묘종을 다음 세대로 간주하였다. 종자는 DHA 함량에 대해 분석한다. 상기 수집된 T1 종자는 상기 트랜스유전자와 분리되고 임의의 빈 분리물을 포함하는 집단을 나타내기 때문에, 자손 식물로부터의 동형접합성 종자는 종자유 중 전체 지방산 함량의 30% 이하의 증가된 수준의 DHA를 가졌을 것으로 예상된다. 다른 변형된 구조물들을 사용하여 에이 탈리아나를 형질전환시켰다. 오직 소수의 형질전환된 세포주들만이 수득되었지만, 어느 것도 상기 modB 구조물보다 더 높은 수준의 DHA를 제공하지 못하였다.

[0573] pJP3416-GA7-modB 구조물을 또한 사용하여 오스카 품종 및 NX002, NX003, NX005, NX050, NX052 및 NX054로 표시한 일련의 육종 라인의 형질전환된 비 나푸스 식물을 생성시켰다. 오스카 형질전환에 대해서 77개의 독립적인 형질전환된 식물(T0), 및 FAD2 유전자의 돌연변이에 의한 이의 종자유의 높은 올레산 함량을 갖는 계통인, NX005에 대한 189개를 포함하는 육종 계통에 대한 1480개의 독립적인 식물을 포함하여 전체 1558개의 형질전환된 식물을 수득하였다. 다른 육종 계통은 LA 및 ALA의 더욱 높은 수준을 가졌다. 디지털 PCR 방법(실시예 1)에 의해 측정된 바에 따라 T-DNA의 4개 이상의 카피를 나타내는 트랜스제닉 식물을 버렸다; T0 식물의 약 25%가 이러한 기준에 의해 버렸다. T0 트랜스제닉 식물의 약 53%가 디지털 PCR 방법에 의해 측정된 바에 따라 T-DNA의 1개 또는 2개의 카피를 가졌으며, 12%가 약 3개의 카피를 가졌으며, 24%는 4개 또는 그 이상의 카피를 가졌다. 종자(T1 종자)를 자가-체외수정 이후 약 450개의 트랜스제닉 라인들로부터 수확하였으며, 아웃-크로싱을 피하기 위하여 개화 중 식물을 낮으로 베어먹어 성취하였다. T1 종자는 성숙시 나머지 트랜스제닉 식물로부터 수확한다. 약 1-2%의 식물 라인이 수술 또는 암술 중 어느 하나가 없었으며 생육 종자를 생산하지 못하였고, 이들 T0 식물은 버렸다.

[0574] 종자의 풀(각각의 풀에 20개의 T1 종자)을 풀의 종자유 중 DHA의 수준에 대해 시험하였으며, 최고 수준을 나타낸 계통을 선택하였다. 특히, 풀의 T1 종자 중 전체 지방 함량의 적어도 2%의 DHA 함량을 갖는 계통을 선택하였다. 약 15%의 트랜스제닉 라인이 이러한 방식으로 선택되었으며; 다른 85%는 버렸다. 이들 중 일부를 라인 CT132-5 (오스카 품종에서), CT133-15, -24, -63, -77, -103, -129 및 -130 (NX005에서)로 표시하였다. NX050에서 선택된 계통은 CT136-4, -8, -12, -17, -19, -25, -27, -49 및 -51을 포함하였다. CT132.5를 포함하는 선택된 라인으로부터 20 개의 종자 및 CT133.15로부터 11 개의 종자를 흡수팽윤시키고, 2일 후에, 개개 종자 각각으로부터 반쪽 떡잎으로부터 오일을 추출하였다. 배축을 갖는 다른 반쪽 떡잎을 보존하고 배지상에서 배양하여 특정한 자손 라인을 유지시켰다. 상기 오일 중 지방산 조성을 측정하였으며; CT132.5에 대한 데이터를 표 6에 나타낸다. 상기 분석된 20 개 종자 중 10 개의 DHA 수준은 GC 분석에 의해 측정된 바와 같이 전체 지방산 함량의 7 내지 20%의 범위였다. 다른 종자는 7% 미만의 DHA를 가졌으며 pJP3416-GA7-modB로부터 T-DNA의 부분(불완전) 사본을 함유할 수도 있다. 상기 트랜스제닉 라인은 유전학적으로 연결되지 않은 다수의 트랜스유전자

삽입을 함유하는 것으로 나타났다. 트랜스제닉 라인 CT133.15의 종자는 0 내지 5% 범위의 DHA 수준을 나타내었다. DHA가 없는 종자는 빈 분리물일 가능성이 있었다. 이들 데이터는 상기 modB 구조물이 캐놀라 종자에서 DHA 생산에 대해 잘 수행됨을 확인하였다.

[0575] 선택된 형질전환된 라인으로부터, 자가-체외수정 후에, 각각의 다수의 T1 식물로부터 얻어진 20개 또는 40개의 개개 종자(T2 종자)를 지방산 조성에 대해 개별적으로 테스트하였다. 20%보다 높은 수준으로 DHA를 포함하는 종자를 확인하였다(표 7). 2개의 대표적인 샘플, CT136-27-18-2 및 CT136-27-18-19는 각각 21.2% 및 22.7% DHA를 가졌다. 이들 종자 중 전체 $\omega 3$ 지방산 함량은 전체 지방산 함량의 퍼센트로서 약 60%이었으며, $\omega 6$ 함량은 10% 미만이었다. 각각의 T1 식물로부터의 20개 또는 40개의 T2 종자의 추가적인 세트를 지방산 조성에 대해 시험하였다. 최대 34.3%의 DHA를 포함하는 종자를 예를 들어 종자 CT136-27-47-25에서 확인하였다(표 9). CT136-27-47-25로부터 얻은 종자유에 대한 지방산 조성은 표 9에 나타낸다. 지방산 조성은 약 1.5% DPA, 0.6% EPA 및 0.5% ETA와 함께 34.3% DHA를 포함하였다. SDA 수준은 약 7.5%였고, ALA는 약 21.9%이었으며 LA는 약 6.9%이었다. 새로운 $\omega 6$ PUFA는 1.1% GLA를 나타내었으나 $\omega 6$ -C20 또는 -C22 LC-PUFA는 검출할 수 없었다. 전체 포화된 지방산은 다음과 같다: 9.6%; 단일불포화 지방산, 12.5%; 전체 PUFA, 75.2%; 전체 $\omega 6$ -PUFA (LA 포함), 7.2%; 전체 $\omega 3$ -PUFA, 66.9%; 전체 $\omega 6$: $\omega 3$ 지방산의 비율, 9.3:1; 새로운 $\omega 6$:새로운 $\omega 3$ 지방산, 37:1. 올레산으로부터 DHA로의 각각의 효소적 단계의 효율은 다음과 같았다: $\Delta 12$ -불포화효소, 90%; $\Delta 15/\omega 3$ -불포화효소, 89%; $\Delta 6$ -불포화효소, 67%; $\Delta 6$ -신장효소, 83%; $\Delta 5$ -불포화효소, 99%; $\Delta 5$ -신장효소, 98%; $\Delta 4$ -불포화효소, 96%. 올레산으로부터 DHA로의 전환의 전체적인 효율은 약 50%이었다. 따라서, 전체 지방산 함량의 20.1% 내지 30% DHA 또는 30% 내지 35% DHA를 갖는 종자를 포함하여, 종자유의 전체 지방산 함량의 20.1-35%의 범위로 DHA를 생산하는 종자가 확인되고 선택될 수 있었다는 점이 명백하였다.

[0576] 일부 종자의 오일 함량은 야생형 종자의 약 44%로부터 일부 DHA 생산 종자의 약 31-39%로 감소하였으나, 다른 DHA 생산 종자의 야생형 수준과 유사하였다.

[0577] T2 종자 중 적어도 10%의 수준으로 DHA를 생산하는 다양한 형질전환된 식물 라인이 교차교배되고 F1 자손은 다중 T-DNA 삽입에 대해 동종접합인 F2 자손을 생산하기 위하여 자가교배된다. 동종접합 종자의 종자유가 분석되고 종자유 중 전체 지방산 함량의 30% 또는 35%까지가 DHA이다.

[0578] *CT136-27-18-2 및 CT136-27-18-19로부터 수득된 오일 중 TAG를, TAG 분자의 글리세롤 골격 상의 DHA의 위치 분포에 대해 ^{13}C NMR 위치특이성 분석으로 분석하였다. DHA가 *sn*-1,3 위치에 우선적으로 연결되었다. 70% 이상, 실제로 90% 이상의 DHA가 *sn*-1,3 위치에 있었다.

[0579] 몇몇의 추가적인 트랜스제닉 라인에서, 독립적인 사건의 단일 종자의 DHA 함량은 12%를 초과하였다. 상기 라인의 트랜스제닉:영 비율은, 단일 트랜스제닉 좌위에 상응하는 대략 3:1, 또는 2개의 트랜스제닉 좌위에 상응하는 15:1인 것으로 확인되었다. DHA의 최고 수준을 갖는 각각의 구조물의 샘플의 대표적인 지방산 프로파일의 분석은 단지 1.2-1.4%의 GLA를 확인하고 다른 새로운 $\omega 6$ PUFA는 검출되지 않았다. 반면에, 새로운 $\omega 3$ PUFA (SDA) 및 $\omega 3$ LC-PUFA (ETA, EPA, DPA, DHA)는 GA7-형질전환된 종자에 대한 18.5% 대비 modF 구조물에 대해 25.8% 및 modG 구조물에 대해 21.9%의 함을 축적하였다. 이들 종자의 오일의 DHA 수준은 각각 9.6%, 12.4% 및 11.5%이었다. $\Delta 6$ -불포화는 modF- 및 modG-형질전환된 종자보다 GA7-형질전환된 종자에서 더욱 낮은 것으로 확인되었으며 (32% vs 47% and 43%) 이는 GA7 대비 modF 및 modG 종자에서 ALA의 감소를 초래하였다. 또 다른 주목할만한 차이는 modF 종자 중 EPA의 축적 (3.3% 대 다른 2개의 형질전환 종자에서 0.8%)이었으며 이는 GA7 및 modG 종자 (93% 및 94%) 대비 modF (80%) 종자에서 관찰된 감소된 $\Delta 5$ -신장에 반영되었다. 비록 SDA의 양이 약간 더욱 활성인 $\Delta 6$ -불포화로 인하여 실제적으로 증가하였을지라도 이들 종자에서의 $\Delta 6$ -신장의 약간의 증가(66% 대 60% 및 61%)가 있었다. DHA는 GA7 라인의 극성 종자 지질 분획에서 검출되었다.

[0580] modB 구조물의 T-DNA로 형질전환된 *B. napus* 육종 라인 NX54의 70개의 독립적인 트랜스제닉 식물의 T1 종자 중 지질에 대해 지방산 조성을 분석하였다. 이들 트랜스제닉 식물 중 하나가 종자유 중 DPA를 가지나 DHA를 가지지 않는 종자를 생산한 것으로 관찰되었다. 이러한 라인 (CT-137-2)의 T1 종자는 T1 풀의 종자 중 어떠한 검출가능한 DHA 없이 약 4% DPA를 생산하였다. 본 발명자들은 이것이 자발적인 돌연변이를 통해, 특별한 삽입된 T-DNA 중 $\Delta 4$ -불포화효소 유전자의 비활성화에 의해 야기되었는지의 여부를 시험하였다. PCR 분석 및 DNA 서열 분석은 결실의 존재를 나타냈으며, 이는 GA7-modB (서열번호 2)의 T-DNA 중 결실된 뉴클레오티드 12988-15317를 갖는 것으로 정의되었다. 결실된 뉴클레오티드는 $\Delta 4$ -불포화효소 암호화 영역 그 자체뿐만 아니라 $\Delta 4$ -불포화효소 암호화 영역의 발현을 유도하는 리노스(Linus) Cn12 프로모터 부분에 상응하며, 이로 인해 결실을 포함하는 T-DNA로 형질전환된 상기 종자가 DHA를 생산하지 않은 이유가 설명된다.

- [0581] 이러한 트랜스제닉 라인의 대략 50개의 T1 종자를 받아시켰고 하나가 나머지 오일 중 지방산 조성에 대해 분석된 각각으로부터의 떡잎을 나타냈다. 이어서, 5% 초과 DPA를 나타내는 선택된 묘목을 성숙기까지 성장시키고, T2 종자를 수확하였다. 폴의 종자 지방산 조성을 표 8에 나타내며; 7% 초과 DPA가 이들 라인에서 관찰되었다. 비. 나푸스 DPA 라인 CT-137-2로부터 T4 종자를 생산하고 지방산 프로파일에 대하여 분석하였다. 최대 13%의 DPA를 폴의 성숙한 종자 샘플 중에서 관찰하였다.
- [0582] 약 10%의 DPA를 갖는 종자로부터의 오일을 온화 알칼리(mild alkali)로 처리하여 지방산을 가수분해 하였다.
- [0583] B0003-514로 표시된 또 다른 트랜스제닉 라인은 T2 종자 중 약 10 내지 16%의 DPA를 나타냈다. 15.8%의 DPA, 0.2 내지 0.9%의 DHA 및 0.1 내지 2.5%의 EPA를 함유하는 종자를 선별하였다. T2 종자 집단은 DPA 높음:중간:없음에 대해 1:2:1 분리 비를 나타냈으며, 상기 트랜스제닉 라인에서 DPA 생산에 대한 단일 유전자 좌위가 존재함을 의미한다.
- [0584] LC-PUFA를 생산하는 종자 샘플로부터 스크류 프레스를 이용하여 오일을 추출하고, 이로써 종자박을 생산하였다.
- [0585] 구조물 설계
- [0586] 이러한 실험의 초점은 오일 종자 작물 종의 DHA 및 DPA의 생산을 입증하는 것이지만, 상기 주목된 결과는 또한 구조물 설계 관점에서 흥미로웠다. 먼저, modF 구조물의 Δ6- 및 Δ5-신장효소 코딩 영역 위치를 스위칭하는 것이 더욱 낮은 Δ5-신장으로 인하여 더욱 많이 축적된 EPA를 갖는 의도된 프로파일 변화를 초래하였다. Δ6-신장의 부수물 증가가 관찰되었으나 이는 더욱 낮은 SDA 수준을 초래하지 않았다. 이것은 추가의 *옴. 푸실라* Δ6-불포화효소 발현 카세트를 추가하는 것 뿐만 아니라 더욱 고도로 활성인 플렉스 콘리닌2(flax conlinin2) 프로모터로 절두된(truncated) 나프인 프로모터 (FP1)를 대체하는 것에 의해 야기되는, modF 형질전환된 종자의 Δ6-불포화의 증가로 인한 것이었다. modG 구조물에서 관찰된 Δ6-불포화의 다소 더욱 낮은 증가는 GA7의 고도로 발현된 Δ5-신장효소 카세트를 이용함으로써 야기되었다. Δ6-불포화효소 및 Δ5-신장효소 코딩 영역의 위치를 스위칭하는 것은 더욱 큰 Δ6-불포화를 초래하였다. Δ5-신장효소 활성은 FP1 프로모터를 Cn12 프로모터로 대체하는 것으로 인하여 이러한 경우에 감소하지 않았다.
- [0587] 이들 데이터는 modB, modF 및 modG 구조물이 아라비도프시스 및 캐놀라의 경우와 같이 *카멜리나* 종자에서 DHA 생산을 잘 수행하였음을 확인하였다.
- [0588] 본 발명자들은, 일반적으로 DHA 경로에서 속도-제한 효소 활성의 효율이 단일-사본 T-DNA 형질전환체에 비해 다중사본 T-DNA 형질전환체에서 더 크거나 상기 효율을 상기 T-DNA에 상기 경로에서 제한될 수도 있는 효소를 암호화하는 다수의 유전자들을 삽입함으로써 증가시킬 수 있다고 고려하였다. 다중-사본 형질전환체의 가능한 중요성에 대한 증거가 상기 GA7 구조물에 의해 형질전환된 아라비도프시스 종자에서 나타났으며, 이때 최고 수율의 DHA 사건은 숙주 계놈내에 삽입된 3 개의 T-DNA를 가졌다. 상기 다수의 유전자들은 동일하거나 바람직하게는 동일한 폴리펩티드를 암호화하는 상이한 변이체이거나, 중복되는 발현 패턴을 갖는 상이한 프로모터들의 조절 하에 있다. 예를 들어, 증가된 발현은, 동일한 단백질이 생성된다 하더라도, 다수의 Δ6-불포화효소 암호화 영역들의 발현에 의해 성취될 수 있었다. 예를 들어 pJP3416-GA7-modF 및 pJP3416-GA7-modC에서, 옴 푸실라 Δ6-불포화효소의 2 개의 버전이 존재하였으며 상이한 프로모터들에 의해서 발현되었다. 상기 암호화 서열은 상이한 코돈 사용, 및 따라서 상이한 뉴클레오티드 서열을 가져, 잠재적인 침묵화 또는 공-억제 효과를 감소시켰지만, 동일한 단백질을 생성시켰다.

표 6

GA7-modB 구조물 유래 T-DNA를 함유하는 T1 트랜스제닉 비.

나푸스 종자를 발아하는 지질의 지방산 조성. 또한, 상기 지질은 각각 C16:1, C16:3, C24:0 및 C24:1를 0.1 내지 0.3%로 함유하고, C20:1Δ11를 함유하지 않았다.

종자	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:1Δ11	C18:2	C18:3ω6	C18:3ω3	C20:0	C18:4ω3	C20:1Δ11	C20:2ω6	C20:3ω3	C22:0	C20:4ω3	C20:5ω3	C22:3ω3	22:5ω3	C22:6ω3
1	0.1	4.2	1.8	29.9	2.5	9.9	0.1	38.4	0.5	0.8	1.0	0.1	2.1	0.3	2.8	0.3	0.1	0.5	3.9
2	0.1	4.7	4.0	23.0	2.3	7.4	0.3	29.3	1.0	4.3	1.1	0.1	1.9	0.4	6.9	1.0	0.0	1.7	9.5
3	0.1	3.7	1.8	55.1	1.9	4.7	0.2	15.2	0.8	1.8	1.4	0.1	0.3	0.5	11.3	0.0	0.0	0.0	0.0
4	0.1	4.6	2.9	22.1	1.8	6.6	0.4	26.5	1.0	7.2	1.0	0.1	0.8	0.5	11.2	1.9	0.0	1.7	8.7
5	0.1	4.0	1.7	27.4	2.1	8.1	0.3	26.4	0.6	2.8	1.0	0.1	1.5	0.3	7.6	1.5	0.0	1.8	12.2
6	0.1	3.5	1.6	59.8	2.0	4.3	0.1	18.5	0.6	0.5	1.3	0.0	0.7	0.3	6.0	0.0	0.0	0.0	0.0
7	0.1	6.0	1.7	16.6	2.6	23.9	1.0	23.2	0.6	5.4	0.8	0.2	0.6	0.4	2.6	1.1	0.0	1.7	9.9
8	0.1	4.9	2.7	12.9	1.4	11.7	0.3	34.3	0.9	5.0	0.9	0.2	2.4	0.5	4.1	1.3	0.0	1.8	13.8
9	0.1	3.9	2.4	41.6	1.7	21.5	0.0	23.4	0.7	0.0	1.2	0.1	2.2	0.4	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0
10	0.1	3.7	2.1	30.9	1.7	19.2	0.4	23.6	0.7	2.1	1.1	0.1	1.5	0.4	3.6	0.6	0.0	0.7	6.9
11	0.1	5.7	3.8	41.2	2.4	26.7	2.1	7.2	1.3	0.3	1.2	0.2	0.3	0.8	4.8	0.0	0.0	0.0	0.0
12	0.1	4.6	2.4	25.5	1.7	16.1	0.3	28.9	0.8	3.9	1.1	0.1	1.9	0.4	3.9	0.6	0.0	1.1	6.2
13	0.1	4.3	4.2	19.4	1.6	9.2	0.1	45.5	1.0	0.2	1.1	0.1	5.2	0.4	2.6	0.3	0.2	0.4	3.4
14	0.1	6.3	4.0	10.5	2.3	8.4	0.3	31.1	1.3	3.9	0.8	0.1	2.3	0.6	4.6	1.8	0.1	2.5	18.1
15	0.1	5.1	3.3	16.8	2.4	11.2	0.3	28.8	1.0	4.5	0.9	0.1	2.1	0.6	3.2	1.5	0.1	1.8	15.1
16	0.1	4.4	4.0	16.2	1.5	11.6	0.2	33.5	0.9	2.8	1.1	0.2	3.7	0.4	4.6	0.7	0.1	1.3	12.1
17	0.2	7.2	4.9	15.0	2.1	8.9	0.3	25.9	1.4	5.1	0.9	0.0	1.6	0.8	4.9	2.1	0.0	2.2	15.0
18	0.1	4.0	2.3	64.8	1.2	7.2	0.1	12.5	1.0	3.5	1.5	0.1	0.0	0.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

[0589]

표 7

GA7-modB 구조물 유래 T-DNA를 함유하는 T2 트랜스제닉 비. 나푸스 종자 중 지질의 지방산 조성.

샘플 (T2 종자)	C16:0	C18:0	C18:1	C18:1Δ11	C18:2	C18:3ω6	C18:3ω3	C18:4ω3	C20:1Δ11	C20:2ω6	C20:3ω3	C20:4ω3	C20:5ω3	C22:5ω3	C22:6ω3	ω3 (%) 비율	ω6 (%) 비율	ω3 대 ω6 비율	PUFA 비율 (%)
CT136-27-18-1	5.0	2.6	25.4	3.6	6.7	0.2	37.5	1.4	1.0	0.1	2.1	0.8	0.4	0.9	10.2	53.4	7.1	0.13	60.5
CT136-27-18-2	7.1	2.8	16.9	4.3	5.5	0.4	29.1	5.4	0.8	0.1	1.2	0.5	0.5	1.9	21.2	59.8	6.1	0.10	66.0
CT136-27-18-3	5.4	2.5	26.5	3.8	6.4	0.4	26.4	4.7	1.0	0.1	0.7	1.1	0.6	1.2	17.3	52.0	6.9	0.13	58.9
CT136-27-18-4	5.3	2.4	34.7	4.0	5.9	0.3	30.3	1.3	1.1	0.1	1.1	1.5	0.3	0.4	9.3	44.4	6.3	0.14	50.7
CT136-27-18-5	4.8	2.7	34.5	3.8	5.6	0.3	23.5	3.9	1.2	0.1	0.7	1.1	0.5	1.1	14.2	45.1	6.0	0.13	51.1
CT136-27-18-6	5.0	2.1	54.3	3.8	5.7	0.2	18.2	0.6	1.5	0.1	1.1	0.7	0.1	0.2	4.4	25.5	6.1	0.24	31.5
CT136-27-18-7	5.3	2.1	43.8	4.2	5.6	0.4	18.3	2.2	1.3	0.2	0.6	1.5	0.4	0.5	11.6	35.2	6.2	0.18	41.4
CT136-27-18-8	5.4	2.7	25.8	4.1	6.7	0.4	26.6	5.7	1.0	0.1	0.6	1.3	0.6	1.2	15.8	51.9	7.1	0.14	59.0
CT136-27-18-9	4.6	1.6	53.8	3.7	17.5	0.5	9.2	0.5	1.6	0.3	0.6	0.4	0.1	0.1	3.7	14.5	18.3	1.26	32.8
CT136-27-18-10	4.8	2.4	44.1	3.7	5.4	0.4	19.1	2.3	1.1	0.1	0.6	1.5	0.5	0.8	11.4	36.1	5.9	0.16	42.0
CT136-27-18-11	5.1	2.2	48.3	4.1	10.9	0.7	12.5	1.2	1.3	0.2	0.5	1.5	0.3	0.3	9.1	25.3	11.8	0.47	37.1
CT136-27-18-12	5.3	2.7	23.3	3.7	6.0	0.4	27.9	4.9	0.9	0.1	0.7	1.3	0.8	1.5	18.5	55.7	6.6	0.12	62.2
CT136-27-18-13	5.5	3.4	30.7	5.6	5.1	0.4	23.1	3.5	1.1	0.1	1.2	1.1	0.6	1.2	14.9	45.8	5.5	0.12	51.3
CT136-27-18-14	5.4	2.3	23.9	3.5	6.0	0.4	30.1	3.7	1.0	0.1	1.0	0.7	0.6	1.2	18.2	55.5	6.6	0.12	62.1
CT136-27-18-15	5.0	2.3	45.4	4.0	5.3	0.4	16.2	2.3	1.2	0.1	0.5	1.9	0.6	0.7	12.3	34.4	5.8	0.17	40.3
CT136-27-18-18	5.1	2.3	29.0	3.6	5.7	0.4	26.5	3.8	1.1	0.2	0.8	0.8	0.6	1.0	17.4	50.8	6.3	0.12	57.1
CT136-27-18-19	5.8	2.3	19.7	4.2	6.7	0.7	23.7	7.7	0.9	0.1	0.4	0.7	0.6	1.7	22.7	57.6	7.5	0.13	65.1
CT136-27-18-20	5.7	2.9	23.2	4.0	5.6	0.3	35.8	2.4	1.0	0.1	1.3	1.1	0.5	1.0	13.0	55.1	6.1	0.11	61.2

ARA (C20:4ω6) 및 DPAω6은 어떠한 샘플에서도 검출되지 않았다. 또한 샘플은 0.1% C14:0, 약 0.2% 또는 0.3% C16:1, 약 0.1 내지 0.3% C16:3, 약 0.7% 내지 1.0% C20:0, 약 0.3% C22:0를 함유하였으며, 일부 샘플은 미량 수준(<0.1%)의 C20:1Δ13, C22:3ω3, C24:0 및 C24:1을 함유함

[0590]

표 8

Δ4-불포화효소 유전자 내 돌연변이를 가지는, GA7-modB 구조물의 T-DNA로 형질전환된 T2 트랜스제닉 비 나푸스 종자 내 지질의 지방산 조성. 지질은 또한 약 0.1% 14:0, 0.2% 16:3, 0.2-0.4% GLA, 0.1% 20:1Δ13, 0.3-0.4% 22:0, 및 ARA, DPAω6 (22:5ω6)을 함유하였으며, 16:2 및 22:1은 검출되지 않았다.

	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:1Δ11	C18:2	C18:3ω3	C20:0	C18:4ω3	C20:1Δ11	C20:2ω6	C20:3ω6	C20:3ω3	C20:4ω3	C20:5ω3	C22:2ω6	C22:3ω3	C24:0	C24:1	C22:5ω3	C22:6ω3
CT-137-2-34	5.3	0.2	3.7	26.8	3.1	12.4	29.1	0.8	2.5	0.8	0.1	0.0	1.1	1.7	0.8	0.0	0.1	0.1	0.1	10.0	0.0
CT-137-2-38	5.3	0.2	4.2	24.4	3.0	12.6	29.4	0.9	2.5	0.8	0.1	0.0	1.3	2.2	0.9	0.0	0.1	0.2	0.1	10.8	0.0
CT-137-2-48	5.0	0.2	4.2	24.1	3.1	11.9	31.0	0.9	2.4	0.9	0.1	0.0	1.5	2.0	1.0	0.0	0.1	0.1	0.1	10.5	0.0
CT-137-2-51	5.7	0.2	4.6	22.3	3.4	12.3	34.5	1.0	2.0	0.8	0.1	0.0	1.9	1.2	0.5	0.0	0.1	0.2	0.2	7.9	0.0
CT-137-2-59	5.4	0.2	3.9	25.7	3.4	12.9	27.8	0.9	2.6	0.8	0.1	0.0	1.0	1.9	0.9	0.0	0.1	0.2	0.1	11.0	0.0

[0591]

표 9

GA7-modB 유래 T-DNA로 형질전환된 비 나푸스의 T2 종자 유래 종자유 지방산 조성.

C16:0	C18:0	C18:1Δ9	C18:1Δ7	C18:2ω6	C18:3ω6	C18:3ω3	C20:0	C18:4ω3	C20:1ω9c	C20:2ω6 + C21:0	C20:3ω3	C20:4ω3	C20:5ω3	C22:5ω6	C22:5ω3	C22:6ω3
6.3	2.4	8.4	3.1	6.9	1.1	21.9	0.7	7.5	0.7	0.1	0.5	0.5	0.6	0.2	1.5	34.3

종자유 샘플은 또한 0.1% C14:0; 0.2% C16:1; 0.1% C20:3ω6을 함유하고; C22:1 및 C22:2ω6은 함유하지 않으며; 0.1% C24:0 및 0.2% C24:1, 2.6% 다른 지방산을 함유하였다.

[0592]

[0593]

실시예 4. DHA를 생성시키는 트랜스제닉 에이 탈리아나 종자로부터의 TAG의 분석

[0594]

형질전환된 에이 탈리아나 종자로부터의 TAG 상의 DHA의 위치 분포를 NMR에 의해 측정하였다. 전체 지질을, 먼저 헥산 하에서 과쇄시킨 후에 상기 과쇄된 종자를 10 ml 헥산을 함유하는 유리 튜브로 옮김으로써 대략 200 mg의 종자로부터 추출하였다. 튜브를 수욕에서 대략 55 °C에서 가온하고 이어서 와동하며 원심분리시켰다. 헥산 용액을 제거하고 상기 과정을 추가의 4 x 10 ml로 반복하였다. 상기 추출물들을 합하고, 회전 증발에 의해 농축시키고 상기 추출된 지질 중의 TAG를, 20 ml의 헥산 중 7% 다이에틸 에테르를 사용하여 짧은 실리카 컬럼에 통과시킴으로써 극성 지질로부터 정제시켰다. 정제된 TAG상의 아실기 위치 분포를 앞서 개시된 바와 같이 (Petrie et al., 2010a and b) 정량적으로 측정하였다.

[0595]

상기 분석은 전체 종자유 중 DHA의 대부분이 TAG의 sn-1/3 위치에 위치하였으며 이때 sn-2 위치에서는 거의 발견되지 않음을 나타냈다. 이는 ARA 생성 종자(ARA(20:4^{Δ5,8,11,14}))의 50%가 트랜스제닉 캐놀라 오일의 sn-2 위치에 위치한 반면 단지 33%만이 무작위 분포로 예상되는 것으로 나타났다(Petrie et al., 2012))로부터의 TAG와 대조적이었다.

[0596]

트랜스제닉 에이 탈리아나로부터의 전체 지질을 또한 3 중 4극자 LC-MS에 의해 분석하여 주요 DHA-함유 트라이아실글리세롤(TAG) 종을 측정하였다. 가장 풍부한 DHA-함유 TAG 종은 DHA-18:3-18:3(TAG 58:12; 명명법은 위치 분포를 묘사하지 않는다)인 것으로 밝혀졌으며, 두 번째-가장 풍부한 것은 DHA-18:3-18:2(TAG 58:11)이다.

트라이-DHA TAG(TAG 66:18)가, 낮은 수준이지만 검출 가능한 수준으로 전체 종자유에서 관찰되었다. 다른 주요 DHA-함유 TAG 중은 DHA-34:3 (TAG 56:9), DHA-36:3 (TAG 58:9), DHA-36:4 (TAG 58:10), DHA-36:7 (TAG 58:13) 및 DHA-38:4 (TAG 60:10)를 포함하였다. 상기 2 개의 주요 DHA-함유 TAG의 정체를 Q-TOF MS/MS에 의해 추가로 확인하였다.

[0597] 실시예 5. 오일 중 스테롤 함량 및 조성의 분석

[0598] 오스트레일리아의 상업적인 공급원으로부터 구입한 12 개 식물성 오일 샘플로부터의 피토스테롤을 실시예 1에 개시된 바와 같이 GC 및 GC-MS 분석에 의해 0-트라이메틸실릴 에테르(OTMSi-에테르) 유도체로서 특성화하였다. 스테롤은 체류 데이터, 질량 스펙트럼의 해석 및 문헌 및 실험 표준 질량 스펙트럼 데이터와의 비교에 의해 확인되었다. 상기 스테롤을 5 β (H)-콜란(Cholan)-24-올 표준의 사용에 의해 정량분석하였다. 상기 확인된 스테롤 중 일부의 기본적인 피토스테롤 구조 및 화학 구조를 도 3 및 표 10에 나타낸다.

[0599] 상기 분석된 식물성 오일은 하기로부터였다: 참깨(세사뮴 인디쿰(*Sesamum indicum*)), 올리브(올레아 에우로파에(*Olea europaea*)), 해바라기꽃(헬리안투스 안누스(*Helianthus annuus*)), 아주까리(리시누스 코뮤니스(*Ricinus communis*)), 카놀라(브라시카 나푸스(*Brassica napus*)), 잇꽃(카르타무스 텅크토리우스(*Carthamus tinctorius*)), 땅콩(아라키스 히포가에아(*Arachis hypogaea*)), 아마(리눔 유시타티시뮴(*Linum usitatissimum*)) 및 대두(글리시네 맥스(*Glycine max*)). 상대적인 풍부성이 감소함에 있어서, 상기 오일 샘플 전체에 걸쳐, 주요 피토스테롤은 β -시토스테롤(범위 전체 스테롤 함량의 28 내지 55%), Δ 5-아베나스테롤(아이소푸코스테롤)(3 내지 24%), 캄페스테롤(2 내지 33%), 5-스티그마스테롤(0.7 내지 18%), Δ 7-스티그마스테롤(1 내지 18%) 및 Δ 7-아베나스테롤(0.1 내지 5%)이었다. 다수의 다른 소량 스테롤들이 확인되었으며, 이들은 콜레스테롤, 브라시카스테롤, 칼리나스테롤, 캄페스타놀 및 에부리콜이었다. 4 개의 C29:2 및 2 개의 C30:2 스테롤이 또한 검출되었으나, 이들 소량 성분의 확인을 완료하기 위해서는 추가의 연구가 필요하다. 또한, 다수의 다른 확인되지 않은 스테롤들이 상기 오일 중 일부에 존재하였으나, 이들의 매우 낮은 풍부성으로 인해, 질량 스펙트럼은 이들 구조의 확인이 가능할 정도로 충분히 강력하지 않았다.

표 10

확인된 스테롤들의 IUPAC/체계명		
스테롤 번호	일반명(들)	IUPAC/체계명
1	콜레스테롤	콜레스트-5-엔-3 β -올
2	브라시카스테롤	24-메틸콜레스타-5,22E-다이엔-3 β -올
3	칼리나스테롤/24-메틸렌 콜레스테롤	24-메틸콜레스타-5,24(28)E-다이엔-3 β -올
4	캄페스테롤/24-메틸콜레스테롤	24-메틸콜레스트-5-엔-3 β -올
5	캄페스타놀/24-메틸콜레스타놀	24-메틸콜레스탄-3 β -올
7	Δ 5-스티그마스테롤	24-에틸콜레스타-5,22E-다이엔-3 β -올
9	에르고스트-7-엔-3 β -올	24-메틸콜레스트-7-엔-3 β -올
11	에부리콜	4,4,14-트라이메틸에르고스타-8,24(28)-다이엔-3 β -올
12	β -시토스테롤/24-에틸콜레스테롤	24-에틸콜레스트-5-엔-3 β -올
13	Δ 5-아베나스테롤/아이소푸코스테롤	24-에틸콜레스타-5,24(28)Z-다이엔-3 β -올
19	Δ 7-스티그마스테롤/스티그마스트-7-엔-3b-올	24-에틸콜레스트-7-엔-3 β -올
20	Δ 7-아베나스테롤	24-에틸콜레스타 7,24(28)-다이엔-3 β -올

[0600] 오일의 mg/g으로서 표현되는 감소하는 스테롤 함량은 카놀라 오일(6.8 mg/g), 참깨 오일(5.8 mg/g), 아마 오일(4.8 내지 5.2 mg/g), 해바라기 오일(3.7 내지 4.1 mg/g), 땅콩 오일(3.2 mg/g), 잇꽃 오일(3.0 mg/g), 대두 오일(3.0 mg/g), 올리브 오일(2.4 mg/g), 피마자 오일(1.9 mg/g)이었다. 상기 스테롤 조성% 및 총 스테롤 함량을 표 11에 나타낸다.

[0602] 상기 모든 시드 오일 샘플들 중에서, 주요 피토스테롤은 일반적으로 β -시토스테롤(범위 전체 스테롤 함량의 30 내지 57%)이었다. 상기 오일 중에서 광범위한 다른 주요 스테롤들이 존재하였다: 캄페스테롤(2 내지 17%), Δ 5-스티그마스테롤(0.7 내지 18%), Δ 5-아베나스테롤(4 내지 23%), Δ 7-스티그마스테롤(1 내지 18%). 상이한 종들로부터의 오일은 상이한 스테롤 프로파일을 가졌으며, 일부는 매우 독특한 프로파일을 가졌다. 캐놀라 오일

은 최고 비율의 캄페스테롤(33.6%)을 가진 반면, 다른 종 샘플들은 일반적으로 보다 낮은 수준, 예를 들어 땅콩 오일에서 17% 이하를 가졌다. 잇꽃 오일은 비교적 높은 비율의 Δ^7 -스티그마스테롤(18%)을 가진 반면, 상기 스테롤은 대개 다른 종 오일에서, 해바라기 오일에서 9% 이하로 낮았다. 따라서 스테롤 프로파일은 각각의 종들에 대해 독특하였기 때문에, 특정 식물성 또는 식물 오일의 확인을 돕고 다른 오일의 진정성 또는 섞임을 검사하는데 사용될 수 있다.

[0603] 해바라기 및 잇꽃의 2 개 샘플들을 각각 비교하였으며, 각각의 경우에 하나는 시드의 저온 압착에 의해 생성되고 정제되지 않은 반면, 다른 것은 저온-압착되지 않고 정제되었다. 약간의 차이가 관찰되었지만, 상기 두 오일 공급원들은 유사한 스테롤 조성 및 총 스테롤 함량을 가졌으며, 이는 처리 및 정제가 이들 두 매개변수에 거의 영향을 미치지 않음을 암시한다. 상기 샘플들 가운데 스테롤 함량은 1.9 mg/g 내지 6.8 mg/g의 범위로 3배까지 다양하였다. 캐놀라 오일은 최고의 스테롤 함량을, 아주까리 오일은 최저의 스테롤 함량을 가졌다.

[0604] **실시예 6. sn-2 TAG 위치에서 DHA 및 DPA의 축적의 증가**

[0605] 본 발명자들은 TAG의 sn-2 위치에서 DHA 및/또는 DPA 축적을, 1-아실-글리세롤-3-포스페이트 아실트랜스퍼라제(LPAAT)를 상기 GA7 구조물 또는 그의 변체에 의해 부여된 바와 같은 DHA 또는 DPA 생합성 경로와 함께 공-발현 시킴으로써 증가시킬 수 있음을 고려하였다. 바람직한 LPAAT는, 내인성 LPAAT에 비해, 기질로서 다중불포화 C22 지방 아실-CoA, 바람직하게는 DHA-CoA 및/또는 DPA-CoA, 특히 기질로서 DHA-CoA 및 DPA-CoA 둘다 사용할 수 있는 것들 상에서 작용하여 LPA의 sn-2 위치에서 상기 다중불포화 C22 쇄의 증가된 삽입을 생성시켜 PA를 형성시킬 수 있는 것들이다. 세포질 LPAAT 효소는 종종, 특히 상기 종이 TAG 중의 색다른 지방산을 합성하고 축적하는 경우 변화된 기질 선호를 나타낸다. 림난테스 더글라시이(*Limnanthes douglasii*)로부터의 LPAAT2는, C22 기질을 사용할 수 없는 같은 종으로부터의 LPAAT1과 대조적으로, PA 합성에 대한 기질로서 에루코일-CoA(C22:1-CoA)를 사용하는 것으로 나타났다(Brown et al., 2002).

표 11

분석된 식물 오일의 스테롤 함량 및 조성

스테롤 일반명	참깨	올리브	해바라기	아주까리	캐놀라	홍화	땅콩	아마	대두
콜레스테롤	0.2	0.8	0.2	0.1	0.3	0.2	0.2	0.4	0.2
브라시카스테롤	0.1	0.0	0.0	0.3	0.1	0.0	0.0	0.2	0.0
칼리나스테롤/24-메틸렌 콜레스테롤	1.5	0.1	0.3	1.1	2.4	0.2	0.9	1.5	0.8
캄페스테롤/24-메틸콜레스테롤	16.2	2.4	7.4	8.4	33.6	12.1	17.4	15.7	16.9
캄페스타놀/24-메틸콜레스타놀	0.7	0.3	0.3	0.9	0.2	0.8	0.3	0.2	0.7
C29:2*	0.0	0.0	0.1	0.0	0.1	0.5	0.0	1.2	0.1
Δ^5 -스티그마스테롤	6.4	1.2	7.4	18.6	0.7	7.0	6.9	5.1	17.6
미지의 것	0.5	1.3	0.7	0.8	0.7	0.7	0.4	0.7	1.3
에르고스트-7-엔-3 β -올	0.1	0.1	1.9	0.2	0.4	2.7	1.4	1.4	1.0
미지의 것	0.0	1.3	0.9	1.2	0.9	1.8	1.2	0.7	0.7
에부리콜	1.6	1.8	4.1	1.5	1.0	1.9	1.2	3.5	0.9
β -시토스테롤/24-에틸 콜레스테롤	55.3	45.6	43.9	37.7	50.8	40.2	57.2	29.9	40.2
Δ^5 -아베나스테롤/ 아이소퓨코스테롤	8.6	16.9	7.2	19.3	4.4	7.3	5.3	23.0	3.3
트라이터페노이드 알콜	0.0	2.4	0.9	0.0	0.0	1.6	0.0	0.0	0.9
트라이터페노이드 알콜	0.0	0.0	0.7	0.0	0.0	2.8	0.0	0.0	0.0
Δ^7 -스티그마스테롤/스티그마스트-7-엔-3 β -올	2.2	7.1	9.3	2.3	0.9	10.5	1.1	7.9	5.6
Δ^7 -아베나스테롤	1.3	0.1	4.0	0.6	0.2	2.0	0.7	0.4	0.6
총 스테롤 (mg/g 오일)	5.8	2.4	4.1	1.9	6.8	3.2	3.2	4.8	3.0

C29:2*는 각각 2 개의 이중 결합을 갖는 C29 스테롤을 나타낸다.

[0606]

[0607] 공지된 LPAAT들이 고려되었으며 다수를 시험을 위해 선택되었고, 대조군으로서, sn-2 위치에서 DHA 결합을 증가시키지 않는 것으로 예상되는 것들을 포함하였다. 공지된 LPAAT는 아라비도프시스 탈리어나 LPAAT2: (서열번호 40, 수납번호 ABG48392, Kim et al., 2005), 림난테스 알바 LPAAT(서열번호 41, 수납번호 AAC49185, Lassner

et al., 1995), 사카로마이세스 세레비지아에 Slc1p(서열번호 42, 수납번호 NP_010231, Zou et al., 1997), 모르티에렐라 알피나 LPAAT1(서열번호 44, 수납번호 AED33305; US 7879591) 및 브라시카 나푸스 LPAATs(서열번호 45 및 서열번호 46, 각각 수납번호 ADC97479 및 ADC97478)를 포함하였다.

[0608] 상기 아라비도프시스 LPAAT2(또한 LPAT2로 표시됨)는 C16 및 C18 기질에 대해 활성을 갖는 것으로 나타난(그러나, C20 또는 C22 기질에 대한 활성은 시험되지 않았다) 소포체-국소화된 효소이다(Kim et al., 2005). 리만테스 알바 LPAAT2는 PA의 sn-2 위치에 C22:1 아실 쇠를 삽입하는 것으로 나타났지만, 기질로서 DHA 또는 DPA를 사용하는 능력은 시험되지 않았다(Lassner et al., 1995). 상기 선택된 에스 세레비지아에 LPAAT Slc1p는 기질로서 18:1-CoA 외에 22:1-CoA를 사용하는 활성을 갖는 것으로 나타났으며, 이는 쇠 길이에 대한 넓은 기질 특이성을 가리킨다(Zou et al., 1997). 다시, DHA-CoA, DPA-CoA 및 다른 LC-PUFA는 기질로서 시험되지 않았다. 상기 모르티에렐라 LPAAT는 앞서 트랜스제닉 야로위아 리포르티카에서 EPA 및 DHA 지방산 기질에 대한 활성을 갖는 것으로 나타났으나(US 7879591) 식물 세포 내에서의 이의 활성은 알려져 있지 않았다.

[0609] 추가적인 LPAAT들이 발명자들에 의해 확인되었다. 마이크로모나스 푸실라는 그의 오일 중에 DHA를 생산하고 축적하는 미세조류이지만, 상기 중에서 TAG상의 DHA의 위치 분포는 확인되지 않았다. 마이크로모나스 푸실라 LPAAT(서열번호 43, 수납번호 XP_002501997)는 BLAST 조회 서열로서 아라비도프시스 LPAAT2를 사용하는 마이크로모나스 푸실라 게놈 서열을 탐색함으로써 확인되었다. 다수의 후보 서열들이 출현하였으며 서열 XP_002501997이 C22 LC-PUFA에 대해 시험하기 위해 합성되었다. 리시누스 코뮤니스 LPAAT는 아주까리 게놈 서열에서 추정적인 LPAAT로서 주석이 달렸다(Chan et al., 2010). 상기 아주까리 게놈으로부터 4 개의 후보 LPAAT가 합성되었으며 침윤된 엔 벤타미아나(*N. benthamiana*) 잎 조직의 조일 용해물에서 시험되었다. 여기에 개시된 후보 서열은 LPAAT 활성을 나타내었다.

[0610] 다수의 후보 LPAAT를 계통수상의 공지된 LPAAT와 정렬시켰다. 추정적인 마이크로모나스 LPAAT는 추정적인 C22 LPAAT와 무리를 이루는 것이 아니고 분기된 서열이었다.

[0611] 기질로서 DHA-CoA 및/또는 DPA-CoA를 사용하는 능력에 대한 다양한 LPAAT의 초기 시험으로서, 키메릭 유전자 구조물을 엔 벤타미아나 잎 중 외인성 LPAAT의 구성적 발현을 위해 제조하였으며, 이들 구조물은 각각 하기와 같은 35S 프로모터의 조절 하에 있다: 35S:Arath-LPAAT2(아라비도프시스 ER LPAAT); 35S:Limal-LPAAT(림난테스 알바 LPAAT); 35S:Sacce-Slc1p(에스 세레비지아에 LPAAT); 35S:Micpu-LPAAT(마이크로모나스 푸실라 LPAAT); 35S:Moral-LPAAT1(모르티에렐라 알피나 LPAAT); 35S:Brana-LPAAT1.13 (브라시카 나푸스 LPAAT1.13); 35S:Brana-LPAAT1.5 (브라시카 나푸스 LPAAT1.5). 외인성 LPAAT가 없는 35S:p19 구조물은 상기 실험에서 대조군으로서 사용되었고; 이는 각각 엔 벤타미아나 접종에 포함되었다. 이들 구조물을 각각 실시예 1에 개시된 바와 같이 아그로박테리움을 통해 엔 벤타미아나 잎에 도입시켰고, 침윤후 5일째에, 상기 처리된 잎 대역을 절제하였고 분쇄하여 잎 용해물을 제조하였다. 각각의 용해물은 외인성 LPAAT뿐만 아니라 LPA 합성을 위한 내인성 효소를 포함하였다. ¹⁴C-표지된-OA 및 -DHA를 상기 용해물에 별도로 가함으로써 시험관내 반응을 마련하였다. 반응물들을 25 °C에서 인큐베이션시켰고 PA 내로의 ¹⁴C 표지된 지방산의 통합 수준을 TLC에 의해 측정하였다. ARA 및 C18 지방산에 비해 DHA를 사용하는 각 LPAAT의 능력을 평가하였다. 메도우폼 (림난테스 알바), 모르티에렐라 및 사카로마이세스 LPAAT는 DHA 기질에 대해 활성을 갖는 것으로 밝혀졌으며, 이때 방사성표지된 PA가 이들에 대해 존재하였지만, 다른 LPAAT에 대해서는 존재하지 않았다. 모든 LPAAT는 올레산 대조군 공급물에 의해 활성인 것으로 입증되었다.

[0612] 종자 중 LPAAT 활성을 시험하기 위해서, 다수의 단백질 암호화 서열 또는 LPAAT를 콘리닌(pLuCn12) 프로모터의 조절 하에서 2원 벡터에 삽입하였다. 이어서 각각 키메릭 유전자, Cn12:Arath-LPAAT(음성 대조군), Cn12:Limal-LPAAT, Cn2:Sacce-Slc1p, 및 Cn12:Moral-LPAAT를 함유하는 생성된 유전자 구조물을 사용하여, TAG의 sn-2 위치에 DHA의 증가된 결합이 있는지 여부를 시험하기 위하여 종자-특이성 방식으로 LPAAT를 발현하는 안정한 형질전환체 및 트랜스제닉 DHA 경로를 생성하도록 이들의 종자 내에서 DHA를 생산하는 에이 탈리아나 식물을 형질전환하였다. 상기 구조물을 또한, 이미 상기 GA7 구조물 및 그의 변체(실시예 2 및 3)를 함유하는 비나푸스, 및 씨 사티바 식물의 형질전환에 사용하여 부모 및 LPAAT 유전자 구조물을 모두 갖는 자손을 생성시킨다. 상기 LPAAT 암호화 트랜스유전자가 없는 식물에서의 통합에 비해 TAG의 sn-2 위치에서 DHA 및/또는 DPA의 증가된 통합을 시험한다. 오일 함량도 또한 상기 종자에서, 특히 보다 높은 수준의 DHA를 생성시키는 종자에서 개선된다.

[0613] 종자-특이성 pCn12:Moral-LPAAT1 구조물을 사용하여 GA7 구조물 유래 T-DNA에 동종접합성이고 이의 종자가 종자 지질 중 대략 15% DHA를 함유하는 이미 트랜스제닉인 아라비도프시스 탈리아나 라인을 형질전환시켰다 (Petric

et al., 2012). 이를 위하여, 트랜스제닉 라인에 이미 존재하는 *bar* 선택성 마커 유전자와 상이한 pCn12::Moral-LPAAT1 구조물 내 카나마이신 선택성 마커 유전자를 사용하였다. 카나마이신에 저항성인 트랜스제닉 묘목을 선택하고 온실에서 성숙기로 성장시켰다. T2 종자를 수확하고 이들의 전체 종자 지질의 지방산 조성을 GC로 분석하였다 (표 12). 세개의 표현형을 33개의 독립적으로 형질전환된 라인 중에서 관찰하였다. 첫번째 그룹에서(6/33 라인), DPA가 전체 종자 지질의 약 10.6%까지, DHA의 수준보다 실질적으로 더욱 큰 수준으로 유의적으로 증가하였다. 이는 라인의 이러한 그룹에서 강하게 감소하는 DHA의 대가로 발생하였다. 이러한 첫번째 그룹의 라인 중 2개에서, DPA + DHA의 합이 감소하였으나, 다른 4개의 라인에서는 아니었다. 두번째 그룹에서(5/33), DPA 및 DHA의 수준은, 모체 종자에 대한 것과 거의 동일한 DPA + DHA의 합과 거의 동일하였다. 세번째 그룹에서, DPA 및 DHA의 수준은 모체 종자의 것과 유사하였다. 첫번째 및 두번째 그룹의 DPA의 증가된 수준에 대한 하나의 가능한 설명은 LPAAT가 DPA-CoA 기질에 대한 $\Delta 4$ -불포화효소를 앞서고 $\Delta 4$ -불포화 대비 우선적으로 DPA를 PA 내로, 그 때문에 TAG 내로 결합시키는 것이다. 두번째 가능한 설명은 $\Delta 4$ -불포화가 부분적으로 억제되는 것이다.

[0614] 아라비도프시스 식물 유래 종자를 GA7 구조물의 T-DNA로 형질전환시키고 이를 추가로 pCn12::Moral-LPAAT로 형질전환시키고 벡터를 수집하고 오일을 종자로부터 추출하였다. 그 다음 TAG 분획을 TLC 방법으로 추출된 오일로부터 분리시키고 TLC 플레이트로부터 회수하였다. 이들 TAG 샘플 및 분획화 이전의 종자유의 샘플을 리조푸스 리파제로 소화시켜 분석하여 DHA의 위치 분포를 측정하였다. 상기 리파제는 TAG의 sn-1 또는 sn-3 위치에서 에스테르화된 아실기에 대해 특이적이다. 이는 초음파처리기를 사용하여 5% 아라비아 검 중에 각각의 지질 샘플을 유화시키고, 5 mM CaCl_2 를 함유하는 0.1M Tris-HCl pH 7.7 중의 리조푸스 리파제 용액을 첨가한 후 지속적으로 셰이킹하면서 30°C에서 인큐베이션시킴으로써 수행하였다. 각각의 반응을 클로로포름: 메탄올 (2/1, v/v) 및 1 분량(one volume)의 0.1M KCl을 각각의 혼합물에 첨가함으로써 중지시켰다. 지질을 클로로포름 분획으로 추출하고 헥산/디에틸에테르/아세트산 (50/50/1, v/v)을 사용하여 2.3% 붕산 함침된 TLC 상에서 분리하여 결과적인 지질의 sn-2 MAG, sn-1/3 FFA, DAG 및 TAG 성분의 상대적인 양을 측정하였다. 지질 밴드를 TLC 플레이트 상으로 아세톤/물 (80/20, v/v) 중의 0.01% 프리물린을 분무하여 시각화하고 UV 광선 하에 시각화하였다. 개별적인 지질 밴드를 동일한 TLC 플레이트 상에 용해된 지질 표준 스팟에 기반하여 식별하였다. TLC 지질 밴드를 유리 바이알 내에 수집하고 이들의 지방산 메틸 에스테르를 1N 메탄올성-HCl (Supelco)을 사용하고 2시간 동안 80°C에서 인큐베이션시켜 제조하였다. 개개 지질의 지방산 조성을 GC로 분석하였다.

[0615] 이러한 분석은 GA7로 형질전환된 모체 종자 (22-2-1-1 및 22-2-38-7 라인) 내 DHA가 TAG의 sn-1 또는 sn-3 위치에서 우선적으로 에스테르화되었다는 점을 입증하였다. 반면에, GA7 구조물 및 LPAAT를 암호화하는 트랜스유전자 모두로 형질전환된 NY11 및 NY15 종자 내 DHA는, TAG의 sn-2 위치에서 에스테르화되는 라인 중 하나에서 35%의 DHA와 다른 라인에서 48%의 DHA를 가지면서, sn-2 위치에서 풍부하였다. 즉, 리파제 소화 후에, DHA는 sn-2-MAG으로서 존재하였다 (표 13). 유사한 결과가 GA7-modB 구조물 유래 T-DNA 및 LPAAT-암호화 유전자 모두로 형질전환되고 DHA를 생산하는 비 나푸스 및 비 윤채아 종자, 및 DPA를 생산하는 비 나푸스 및 비 윤채아 종자에서 얻어진다.

[0616] 모르티에렐라 LPAAT 또는 또 다른 LPAAT가 DPA-CoA 또는 DHA-CoA 중 어느 하나에 대해 우선성을 가지는 지 여부를 측정하기 위하여, 상기 기재된 바와 같은 구성요소 프로모터의 조절 하에 후보 LPAAT를 일시적으로 발현하는 엔 벤짜미아나 잎의 용해물에 ^{14}C -labelled-DPA-CoA 또는 -DHA-CoA를 개별적으로 첨가하여 시험관내 반응을 마련한다. 반응물을 25°C에서 인큐베이션시키고 PA내로의 ^{14}C 라벨링된 지방산의 결합 수준을 지질의 TLC 분석으로 측정하였다. DPA-CoA 대비 DHA-CoA를 사용하는 각각의 LPAAT의 능력을 평가한다. 우수한 DHA 결합 LPAAT 활성을 가지는 것으로 확인된 LPAAT를 암호화하는 유전자를 사용하여 형질전환된 DHA-생산 캐놀라 식물 및 종자를 생산하였다.

[0617] DPA-CoA를 사용하여 강한 활성을 갖는 LPAAT를 암호화하는 유전자를 사용하여 TAG의 sn-2 위치에서 에스테르화된 DPA의 양을 증가시키는 DPA-생산 식물 및 종자를 형질전환시킨다.

[0620] 실시예 7. 트랜스제닉 카멜리나 사티바 종자의 추가적인 분석

[0621] 전체 지질 함량

[0622] GA7 구조물 유래 T-DNA에 대해 동종접합성이고 이의 전체 지방산 함량으로 DHA를 함유하는 씨 사티바 종자를 이의 전체 지질 함량 및 조성에 대해 하기와 같이 분석하였다. 먼저 헥산을 사용하고 두번째로 클로로포름/메탄올을 사용하여, 2개의 연속적인 용매 추출 단계를 종자에 대해 수행하였다. 추출 또는 분석 도중에 산화제를 첨가하지 않았다. 장기 가열 및 지질/용매 혼합물의 환류로 종자 지질을 추출하기 위해 흔히 사용되는 속슬레 추출 방법을, ω 3 PUFA, 예컨대 DHA의 분해 또는 산화에 대한 가능성 때문에 여기에서는 사용하지 않았다.

[0623] 오일종자에 대한 산업 표준이기 때문에 헥산을 첫번째 추출에서 용매로서 사용하였다. 또한, 특히 상온에서의 극성 지질의 용매화 특성 및 상대적으로 나쁜 용매화로 인하여 우선적으로 TAG-함유 오일을 추출한다. 형질전환 및 대조군 카멜리나 종자(각각 130g 및 30g)를 헥산으로 적시고 전기 마노 막자사발과 막자를 사용하여 부수었다(Retsch Muhle, Germany). 상기 혼합물을 분별 깔대기로 옮기고, 세번째 추출에 대한 하룻밤 동안의 정적 추출을 포함하여, 전체 800 mL 헥산을 사용하여 4회 추출하였다. 각각의 추출의 경우, 추출물을 여과하여 진공 하에 GFC 유리섬유 필터를 통해 미세물을 제거한 다음, 진공 하에 40°C에서 회전 증발시켰다. 추출물을 모으고 TAG-풍부 헥산 추출물을 구성하였다.

[0624] 헥산을 사용한 추출 이후, 나머지 종자박(meal)을 헥산 추출의 경우와 같은 과정을 사용하여 클로로포름-메탄올(CM, 1:1 v/v)을 사용하여 추가로 추출하였다. 그 다음 상기 박을 여과하여 제거하고 화합된 추출물을 회전 증발시켰다. 그 다음 모아진 CM 전체 조지질 추출물을 단일상 메탄올-클로로포름-물 혼합물(2:1:0.8 v/v/v)을 사용하여 용해시켰다. 상기 상을 클로로포름-물(최종 용매 비율, 1:1:0.9 v/v/v 메탄올-클로로포름-물)을 첨가하여 분리시켰다. 각각의 추출물 내 정제된 지질을 하부 클로로포름 상에 분배시키고, 회전 증발을 사용하여 농축시킨 후 극성 지질-풍부 CM 추출물을 구성하였다. 각각의 이들 추출물의 지질 함량을 중량분석으로 측정하였다.

[0625] 지방산 조성 분석을 위하여, 헥산 및 CM 추출물의 엘리퀴트를 메탄올-클로로포름-진한 염산(3mL, 10:1:1, 80°C, 2시간)을 사용하여 지방산 메틸 에스테르(FAME)를 생성하기 위하여 문헌[Christie et al. (1982)]의 방법에 따라 트랜스-메틸화하였다. FAME를 헥산-클로로포름(4:1, 3 × 1.8mL) 내로 추출하였다. 또한, 헥산 및 CM 추출 이후 나머지 종자박(1-2g)의 샘플을 중량분석에 의한 FAME로서 임의의 잔여 지질을 측정하기 위하여 트랜스-메틸화하였다. 종자의 전체 지질 함량은 헥산 및 CM 추출물의 지질 함량과 용매 추출 이후 트랜스메틸화된 박의 FAME 함량을 더함으로써 계산하였다.

[0626] 트랜스제닉 종자는 종자 중량의 40.9%의 야생형 카멜리나 사티바 종자 대비 36.2%의 종자 중량으로 약간 더 적은 전체 지질을 함유하였다. 오일종자를 포함하는 종자의 경우, 전체 지질은, 본 발명에 예시된 바와 같이, 헥산, 그 다음 클로로포름-메탄올을 사용한 연속적인 추출로 얻은 용매 추출가능한 지질 더하기 용매 추출 후 추출된 박의 트랜스메틸화에 의해 방출된 잔여 지질의 함으로 결정하였다. 이러한 전체 지질은 주로 지방산 함유 지질, 예컨대 트리아실글리세롤 및 극성 지질 및 소량의 비지방산 지질, 예를 들어 피토스테롤, 및 유리 비에스테르화 형태 또는 지방산과의 에스테르화 형태로 존재할 수 있는 지방 알코올로 이루어졌다. 또한, 임의의 스테롤 에스테르 또는 왁스 에스테르 및 탄화수소, 예컨대 카로티노이드, 예를 들어 β -카로틴이 또한 존재하는 경우 용매 추출가능한 지질 중에 포함되었다. 이들은 전체적인 중량분석적 측정에 포함되었으며 TLC-FID 분석에 나타내었다(표 14).

[0627] 전체 지질 중에서, 종자 중량 당 31%-38%의 지질을 각각 트랜스제닉 및 대조군 종자에 대해 헥산으로 추출하였으며, 이는 종자 내 전체 지질의 86% 및 92%를 차지하였다. CM 추출은 각각 트랜스제닉 및 대조군 종자로부터 추가로 4.8% 및 2.4% (종자 중량의)의 대부분 극성의 지질이 풍부한 추출물을 회수하였다. 나머지 용매 추출된 오일종자 박의 트랜스메틸화에 의해 방출된 잔여 지질은 각각 종자 중량의 0.3% 및 0.4%이었다. 즉, 첫번째 및 두번째 용매 추출은 함께 종자의 전체 지질 함량의 99%를 추출하였다(즉, 종자 중량의 36.2% 또는 40.9%, 이는 대부분 지방산 함유 지질, 예컨대 트리글리세라이드, 및 당지질 및 인지질로 이루어진 극성 지질이었음(다음 섹션 - 지질 종류 분석 참조)).

[0628] 지질 종류 분석

[0629] 헥산 및 CM 추출물 중의 지질 종류를 석영 로드 상의 Chromarod S-III 실리카와 결합하여 전개 용매계로서 헥산

/디에틸 에테르/빙초산 (70:10:0.1, v/v/v)을 사용하여 불꽃-이온화 검출을 사용한 박층 크로마토그래피 (TLC-FID; Iatroscan Mark V, Iatron Laboratories, Tokyo, Japan)로 분석하였다. 적합한 교정 곡선을 Nu-Chek Prep, Inc. (Elysian, MN, USA)로부터 입수한 대표적인 표준물질을 사용하여 만들었다. 데이터를 SIC-480II 소프트웨어 (SISC Version: 7.0-E)를 사용하여 가공하였다. 실리카 컬럼 크로마토그래피로부터 얻은 정제된 인지질 분획을 적용하고 FID 검출 이전에 클로로포름/메탄올/빙초산/물(85:17:5:2, v/v/v) 중에서 상기 로드를 전개시킴으로써 인지질 종을 분리하였다.

[0630] CM 추출물로부터 TAG, 당지질 및 인지질 분획을 분리하기 위하여, 글래스 울로 막힌 쇼트 글래스 컬럼 또는 파스퇴르 피펫 내 실리카 겔 60 (100-200 메쉬) (0.3-1 g)을 사용하여 10 mg의 정제된 CM 지질 추출물을 정제하였다. CM 추출물 내 잔여 TAG 분획을 헥산 중 10% 디에틸 에테르 20 mL를 사용하여 용리시키고, 당지질을 20 mL의 아세톤으로 용리시키고 인지질을 먼저 10 mL의 메탄올 그 다음 10 mL의 메탄올-클로로포름-물 (5:3:2)의 두 단계로 용리시켰다. 이러한 두번째 용리는 인지질의 회수를 증가시켰다. 각각의 분획의 수율을 중량분석적으로 측정하고 순도를 TLC-FID로 체크하였다. 모든 추출물 및 분획을 GC 및 GC-MS에 의한 추가적인 분석까지 -20 °C에서 디클로로메탄 중에서 보관하였다.

[0631] 각각의 트랜스제닉 및 대조군 종자의 TAG-풍부한 헥산 추출물은 약 96% TAG를 함유하였다. CM 추출물은 트랜스제닉 및 야생형 종자에 대하여, 각각 44 중량% 및 13 중량%의 CM 추출물에 달하는 잔여 TAG를 함유하였다. 헥산 추출물에 반하여, CM 추출물은 극성 지질, 즉 인지질 및 당지질이 풍부하였으며, 트랜스제닉 및 대조군 종자에 대하여 각각 50 중량% 및 76 중량%의 CM 추출물에 달하였다 (표 14). 주요 인지질은 포스파티딜 콜린(PC)이었으며 전체 인지질의 70%-79%에 달하고 이어서 포스파티딜 에탄올아민 (PE, 7%-13%)과 상대적으로 낮은 수준의 포스파티드산 (PA, 2%-5%) 및 포스파티딜 세린 (PS, <2%)이었다. **2015년 7월 7일** 이전에 최종 의견제출통지서에 대한 답변을 제출하는데 절차상의 이점이 존재한다.

[0632] 지방산 조성

[0633] 일반적으로 DHA 및/또는 DPA를 생산하는 종자의 경우에, 본 발명자는 종자의 모든 지질의 직접적인 트랜스메틸화로 측정되는 바와 같은 종자 내 전체 지질의 지방산 조성이 TAG 분획과 유사하였음을 관찰하였다. 이는 90% 이상의 전체 지질이 TAG의 형태로 발생하는 종자 내에 존재하기 때문이었다.

[0634] 헥산 및 CM 추출물 내 상이한 지질 종류의 지방산 조성을, Supelco Equity™-1 퓨즈형 실리카 모세관 컬럼 (15 m × 0.1 mm 내부직경, 0.1 μm 필름 두께, Bellefont, PA, USA), FID, 분할/비분할 주입기 및 Agilent Technologies 7683B 시리즈 오토 샘플러 및 주입기로 피팅된 Agilent Technologies 6890A GC 기기 (Palo Alto, CA, USA)를 사용하여 가스 크로마토그래피 (GC) 및 GC-MS 분석으로 측정하였다. 헬륨이 캐리어 가스이었다. 샘플을 120°C의 오븐 온도에서 비분할 모드로 주입하였다. 주입 후, 오븐 온도를 10 °C min⁻¹으로 270°C까지 승온시키고 마지막으로 5 °C min⁻¹으로 300°C까지 승온시켰다. 용리된 화합물을 Agilent Technologies ChemStation 소프트웨어 (Palo Alto, CA, USA)로 정량화하였다. GC 결과가 ±5% 이하의 개별적인 성분 영역의 오차에 대한 대상이었다.

표 14

트랜스제닉 및 대조군 카멜리나 사티바 종자 유래 핵산 및 CM 추출물의 지질 종류 조성(각각의 추출 단계에 대해 얻어진 전체 지질의 %). SE, WE 및 HC를 서로 분리하지 않았다.

지질 종류	트랜스제닉 종자		대조군 종자	
	핵산	CM	핵산	CM
SE/WE/HC*	1.0	1.4	1.0	1.4
TAG	95.6	44.2	96.0	13.1
FFA	0.9	1.3	0.8	1.4
UN**	0.9	1.1	0.8	1.2
ST	0.5	0.7	0.4	0.4
MAG	0.7	1.1	0.8	6.2
PL	0.3	50.3	0.3	76.3
전체	100.0	100.0	100.0	100.0

약어: 스테롤 에스테르 (SE), 왁스 에스테르 (WE), 탄화수소 (HC), 트리아실글리세롤 (TAG), 유리 지방산 (FFA), 미지 물질 (UN), 스테롤 (ST), 모노아실글리세롤 (MAG), 당지질 및 인지질로 이루어지는 극성 지질 (PL); * 이러한 시스템을 사용한 SE, WE 및 HC 공용리; ** 지방 알코올 및 디아실글리세롤 (DAG)을 함유할 수 있음.

[0635]

[0636]

GC-질량 분광(GC-MS) 분석을 핀니간 트레이스 울트라 쿼드러폴(Finnigan Trace ultra Quadrupole) GC-MS (모델: ThermoQuest Trace DSQ, Thermo Electron Corporation) 상에서 수행하였다. 데이터를 ThermoQuest Xcalibur 소프트웨어 (Austin, TX, USA)로 가공하였다. GC를 온-컬럼 주입기 및 상기 기재된 것과 유사한 극성의 모세관 HP-5 Ultra Agilent J & W 컬럼 (50m × 0.32mm 내부직경, 0.17 μm 필름 두께, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)으로 피팅하였다. 개개의 성분을 질량 분광 데이터를 사용하고 입증된 표준물질 및 실험실 표준물질에서 얻어진 것과 머무름 시간 데이터를 비교하여 확인하였다. 전체 과정의 블랭크 분석을 샘플 배치와 병행하여 수행하였다.

[0637]

추출물 내 상이한 지질 종류의 지방산 조성에 대한 데이터를 표 15에 나타낸다. DHA-생산 카멜리나 종자에서, DHA는 1.6% 내지 6.8%의 비율 범위로 주요 지질 분획 (TAG, 인지질 및 당지질)에 분포하였으며 DHA와 ALA의 비율이 반비례하였다. 트랜스제닉 종자 유래의 TAG-풍부 핵산 추출물은 6.8% DHA 및 41% ALA를 함유하였다 (표 15). 극성 지질-풍부 CM 추출물은 4.2% DHA 및 50% ALA, 즉 비교적 더욱 적은 DHA와 더욱 많은 ALA를 함유하였다. 극성 지질-풍부 CM 추출물 유래 잔여 TAG는 6% DHA 및 40% ALA를 함유하였다. CM 추출물로부터 분리된 당지질 분획은 3% DHA 및 39% ALA를 함유하였으며 인지질 분획이 최저 수준의 DHA (1.6%) 및 최고 수준의 ALA (54%)를 함유하였다. 트랜스제닉 카멜리나 종자는 주요 지질 종류(TAG, 당지질 및 인지질)에 있어 대조군 종자 대비 더욱 높은 수준의 ALA 및 더욱 낮은 수준의 LA (리놀레산, 18:2ω6)를 함유하였다. ALA 및 LA의 비율은 다음과 같았다: 트랜스제닉 종자의 경우 ALA 39%-54% 및 LA 4%-9% 및 대조군 종자의 경우 ALA 12%-32% 및 LA 20%-29%. 에루크산 (22:1ω9)의 상대적인 수준은, 예를 들어 핵산 추출물에서 1.3% 대 2.7%로, 대조군 종자보다 트랜스제닉 종자의 모든 분획에서 더욱 낮았다 (표 15).

[0638]

종자의 스테롤 조성

[0639]

추출된 지질의 스테롤 함량 및 조성을 측정하기 위하여, TAG-풍부 핵산 추출물 및 극성 지질-풍부 CM 추출물의 대략 10 mg 전체 지질의 샘플을 80% MeOH 중의 5% KOH 4 mL를 사용하여 비누화하고 테프론으로 라이닝하고 (lined) 스크류로 캐핑한(capped) 유리 시험관 내에서 80℃에서 2시간 동안 가열하였다. 반응 혼합물을 냉각시킨 후, 2mL의 Milli-Q 물을 첨가하고 스테롤 및 알코올을 2mL의 핵산:디클로로메탄 (4:1, v/v) 내로 웨이킹하고 볼텍싱하여 3회 추출하였다. 혼합물을 원심분리하고 유기 상의 각각의 추출물을 2mL의 Milli-Q 물로 웨이킹하고 원심분리하여 세척하였다. 상단의 스테롤-함유 유기 층을 취한 후, 용매를 질소 가스 스트림을 이용하여 증발시키고 스테롤 및 알코올을 밀봉된 GC 바이알 내에서 200 μL의 비스(트리메틸실릴)-트리플루오로아세트아미드 (BSTFA, Sigma-Aldrich)를 사용하여 80℃에서 2시간 동안 가열함으로써 실릴화하였다. 이러한 방법에 의하여, 유리 히드록실기가 이들의 트리메틸실릴 에테르로 전환되었다. 스테롤- 및 알코올-OTMSi 유도체를 히팅 블록

(40℃) 상에서 질소 가스 스트림 하에 건조시키고 상기 기재된 바와 같은 GC/GC-MS 분석 직전에 디클로로메탄 (DCM) 중에 재용해시켰다.

표 15

트랜스제닉 및 대조군 씨. 사티바 종자의 지질 추출물 및 분획의 지방산 조성 (전체 지방산의 %).

지방산	트랜스제닉 종자						대조군 종자					
	핵산	CM				밀	핵산	CM				밀
	TAG	전체	TAG	GL	PL	잔여	TAG	전체	TAG	GL	PL	잔여
16:1 ω 7	0.1	0.2	0.1	0.2	0.1	0.2	0.1	0.2	0.2	-	-	0.3
16:0	6.2	12.8	6.8	21.3	19.4	10.4	6.7	12.8	7.8	29.6	13.7	10.3
18:4 ω 3	3.7	3.3	3.4	2.1	2.9	3.6	-	-	-	-	-	-
18:2 ω 6	7.1	3.9	8.8	7.2	3.7	8.8	22.2	28.4	29.4	20.8	29.3	27.9
18:3 ω 3	41.9	50.3	39.9	38.6	54.1	38.9	32.0	20.6	19.7	13.0	12.3	20.0
18:1 ω 9	11.1	4.7	9.6	7.2	2.8	8.1	14.0	25.4	13.3	14.7	35.7	14.3
18:1 ω 7	1.4	2.3	2.1	3.7	3.4	2.8	1.0	1.5	2.2	4.0	2.8	2.2
18:0	3.2	4.0	3.0	4.5	5.7	3.1	3.0	2.7	2.9	5.7	3.6	2.7
20:5 ω 3	0.4	0.2	0.3	-	-	0.3	-	-	-	-	-	-
20:4 ω 3	0.4	0.4	0.4	-	0.2	0.3	-	-	-	-	-	-
20:2 ω 6	0.7	0.7	0.8	0.6	0.4	0.7	1.8	0.8	2.1	1.2	-	1.8
20:3 ω 3	0.8	1.2	0.9	0.6	1.3	0.5	0.9	0.3	-	-	-	0.4
20:1 ω 9/11	11.6	6.1	10.9	5.1	1.3	8.4	12.5	3.0	11.1	4.2	1.7	9.4
20:1 ω 7	0.6	0.8	1.4	0.6	0.2	1.1	0.6	0.6	2.0	1.3	-	1.8
20:0	1.3	0.8	1.4	0.6	0.1	1.4	1.5	0.7	2.0	1.4	-	1.8
22:6 ω 3	6.8	4.2	6.1	3.0	1.6	5.4	-	-	-	-	-	-
22:5 ω 3	0.3	1.1	0.4	0.6	1.4	0.3	-	-	-	-	-	-
22:1 ω 9	1.3	1.0	1.8	0.6	0.1	1.5	2.7	0.7	3.6	0.9	-	2.9
22:0	0.3	0.2	0.3	0.6	0.1	0.7	0.3	0.2	0.7	0.8	-	0.8
24:1 ω 9	0.3	0.4	0.4	0.6	0.3	0.6	0.3	0.6	0.7	0.9	0.5	1.0
24:0	0.1	0.4	0.2	0.9	0.4	1.1	0.1	0.4	0.5	1.4	0.4	1.3
기타 *	0.4	1.0	1.0	1.4	0.5	1.8	0.3	1.1	0.9	0.1	-	1.1
전체	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

약어: 트리아실글리세롤 (TAG), 당지질 (GL), 인지질 (PL); 전체: CM 추출물 유래 GL 및 PL을 함유하는 극성 지질-풍부 추출물; TAG, GL 및 PL은 CM 추출물의 실리카 컬럼 크로마토그래피로 분리하였다; * 소수의 지방산의 합

[0640]

[0641]

트랜스제닉 및 대조군 종자 둘 모두의 주요 스테롤은 24-에틸콜레스테롤 (시토스테롤, 전체 스테롤의 43%-54%), 더욱 낮은 수준의 콜레스테롤 (5%-8%)과 함께 24-메틸콜레스테롤 (캄페스테롤, 20%-26%), 브라시카스테롤 (2%-7%), 이소푸코스테롤 (5-아베나스테롤, 4%-6%), 스티그마스테롤 (0.5%-3%), 콜레스트-7-엔-3 β -올, (0.2%-0.5%), 24-메틸콜레스테롤 (캄페스타놀, 0.4%-1%) 및 24-디하이드로콜레스테롤 (0.5%-2%)이었다 (표 16). 이들 9개의 스테롤은 전체 스테롤의 86%-95%에 달하였으며, 나머지 성분은 탄소 및 이중 결합의 수에 대해 단지 부분적으로 식별된 스테롤이었다. 전체적인 스테롤 프로파일은 핵산 및 CM 추출물 둘 모두에 대해 트랜스제닉 및 대조군 종자 간에 유사하였다.

[0642]

지방 알코올 분석

[0643]

종자 내 지방 알코올은 스테롤의 경우처럼 유도체화하고 분석하였다. 이소-분지형 지방 알코올을 동반하는 C₁₆-C₂₂의 일련의 지방 알코올을 핵산 및 CM 추출물 둘 모두에서 식별하였다. 유사한 프로파일이 트랜스제닉 및 대

조군 종자에서 관찰되었으며, 개개의 성분의 비율에 있어서의 다소간의 변동이 관찰되었다. 클로로필로부터 유도된 피톨이 주요 지방족 알코올이었고 각각 트랜스제닉 및 대조군 종자에서 헥산 분획의 전체 지방 알코올의 47% 및 37%에 달하였다. 홀수-쇄 알코올이 헥산 추출물(16%-23%)에서 보다 CM 추출물(전체 지방 알코올 함량의 37%-38%)에서 더욱 높은 수준으로 존재하였다. 이소-17:0 (16%-38%)가 17:0 (0.3%-5.7%)보다 우세하였다. 존재하는 또 다른 홀수-쇄 알코올은 19:0 (4.5%-6.5%)이었다. 검출된 또 다른 알코올은 이소-16:0, 16:0, 이소-18:0, 18:1, 18:0를 포함하였고, 마이너 수준의 이소-20:0, 20:1, 20:0, 이소-22:0, 22:1 및 22:0이 또한 존재하였다.

[0644] 논의

[0645] 상기 결과는 상온에서 헥산을 사용하여 다중 추출로 전동식 막자 사발과 막자를 사용한 분쇄가 트랜스제닉 종자로부터 대부분의 TAG-함유 오일을 회수하는데 효과적이었음을 나타내었다. 중간 수준의 DHA를 함유하는 트랜스제닉 종자 유래 오일 이외에, 트랜스제닉 종자는 또한 대조군 종자 대비 주요 지질 종류 (트리아실글리세롤, 당지질 및 인지질)에서 뚜렷하게 더욱 높은 수준의 ALA를 가졌다. 이는 $\Delta 15$ -불포화효소 활성이 종자 발생 중 트랜스제닉 종자에서 상당히 강화되었음을 보여주었다. 흥미롭게도, 다양한 추출물 및 분획에서 지방산 조성 및 DHA의 비율에 있어서 다소 약간의 차이가 있었으며 DHA 수준이 TAG-풍부 헥산 추출물 및 CM 추출 유래 TAG에서 더욱 높고 (6%-6.8%) 극성 지질 분획에서 더욱 낮았다 (당지질에서 3% 및 인지질에서 1.6%). 16:0의 수준이 TAG-풍부 헥산 추출물 및 CM 추출 유래 TAG (6%-7%) 대비 CM 추출물 내 당지질 및 인지질의 극성 지질 분획 (19%-21%)에서 더욱 높았다.

표 16

트랜스제닉 및 대조군 카멜리나 종자의 스테롤 조성 (전체 스테롤의 %).

스테롤	트랜스제닉 종자		대조군 종자	
	헥산	CM	헥산	CM
24-디하이드로콜레스테롤	0.8	1.8	0.5	1.4
콜레스테롤	5.7	7.6	4.7	7.2
브라시카스테롤	4.4	6.5	1.9	4.2
콜레스트-7-엔-3 β -올	0.2	0.5	0.3	0.4
캄페스테롤	24.5	20.8	25.7	21.7
캄페스타놀	0.4	1.1	0.4	0.9
스티그마스테롤	1.0	2.6	0.5	1.6
시토스테롤	54.3	43.7	53.8	42.9
$\Delta 5$ -아베나스테롤 (이소푸코스테롤)	4.2	5.2	4.7	5.5
합계	95.5	89.6	92.6	85.9
기타				
UN1 C28 1db	0.6	1.2	0.7	1.2
UN2 C29 1db	1.2	2.0	1.2	2.4
UN3 C29 2db	0.9	1.8	1.3	2.4
UN4 C28 1db	0.3	0.9	0.6	1.1
UN5 C30 2db	1.2	1.8	1.4	1.8
UN6 C29 1db + C30 2db	0.3	2.7	2.2	5.2
기타 합계	4.5	10.4	7.4	14.1
전체	100	100	100	100

약어: UN은 미지 스테롤을 지칭하고, C 이후 숫자는 탄소 원자의 수를 나타내고 db는 이중 결합의 수를 지칭한다.

[0646]

- [0647] 트랜스제닉 종자 및 대조군 종자의 스테롤 조성은 동일한 주요 스테롤이 존재하는 정제된 카멜리나 오일에서 확인된 것(Shukla et al., 2002)과 유사하였으며, 이는 부가된 유전자가 종자의 스테롤 합성에 영향을 주지 않았음을 나타낸다. 카멜리나 오일 중 콜레스테롤의 수준은 대부분의 식물성 오일에서 발생된 것보다 더욱 높았다. 브라시카스테롤이 존재하였으며, 이는 카멜리나 사티바를 포함하는 브라시카세아에(Brassicaceae) 과에서 확인된 특징적인 스테롤이다.
- [0648] **실시예 8. 브라시카 윤채아 종자에서의 LC-PUFA의 생산**
- [0649] 트랜스제닉 브라시카 윤채아 식물을 다음과 같이 DHA의 생산을 위한 GA7-modB 구조물 (실시예 3)을 사용하여 생산하였다. 긴 광주기 민감성 변종의 비. 윤채아 종자를 문헌 [Kereszt et al. (2007)]에 기재된 바와 같이 염소 가스를 사용하여 멸균시켰다. 멸균된 종자를 0.8% 아가로 고형화되고 pH 5.8로 조정된 1/2 강도(strength) MS 배지 (Murashige and Skoog, 1962) 상에서 발아시키고 6-7일 동안 16/8 시간 (명/암) 광주기로 형광등 (50 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$) 하에 24°C에서 성장시켰다. 2-4 mm 줄기를 갖는 떡잎 잎자루를 이들 묘목에서 무균 상태로 분리하고 외식편으로 사용하였다. 아그로박테리움 튜메파시엔스 균주 AGL1을 이원 구조물 GA7로 형질전환시켰다. 아그로박테리움 배양을 문헌 [Belide et al. (2013)]에 기재된 바와 같이 감염을 위하여 개시하고 진행하였다. 모든 형질전환의 경우, 약 50개의 새롭게 분리된 떡잎 잎자루를 6분 동안 10ml의 에이. 튜메파시엔스 배양물로 감염시켰다. 감염된 잎자루를 멸균 여과지 상에 덮어 과량의 에이. 튜메파시엔스를 제거하고 공-재배 배지 (1.5mg/L BA, 0.01mg/L NAA 및 100 μM 아세토시링온을 함유하고, 또한 L-시스테인 (50mg/L), 아스코르브산 (15mg/L) 및 MES (250mg/L)으로 보충된 MS)에 옮겼다. 모든 플레이트를 마이크로포어 테이프로 밀봉하고 공-재배의 48시간 동안 24°C에서 암(dark) 조건으로 인큐베이션시켰다. 그 다음 외식편을 예비선택(pre-selection) 배지 (1.5mg/L BA, 0.01mg/L NAA, 3mg/L AgNO_3 , 250mg/L 세포탁심 및 50mg/L 티멘틴을 함유하는 MS-아가)에 옮기고 16/8 시간 광주기로 24°C에서 4-5일 동안 배양한 후 외식편을 선발 배지 (1.5mg/L BA, 0.01mg/L NAA, 3mg/L AgNO_3 , 250mg/L 세포탁심, 50mg/L 티멘틴 및 5mg/L PPT를 함유하는 MS-아가)에 옮기고 16/8 시간 광주기로 24°C에서 4주 동안 배양하였다. 녹색 캘러스를 갖는 외식편을 줄기 재생(shoot regeneration) 배지 (2.0 mg/L BA, 3mg/L AgNO_3 , 250mg/L 세포탁심, 50mg/L 티멘틴 및 5mg/L PPT를 함유하는 MS-아가)에 옮기고 추가 2주 동안 배양하였다. 작은 재생 줄기 싹을 호르몬 무첨가 MS 배지 (3mg/L AgNO_3 , 250mg/L 세포탁심, 50mg/L 티멘틴 및 5mg/L PPT를 함유하는 MS-아가)에 옮기고 추가 2-3주 동안 배양하였다.
- [0650] 최소한 1.5cm 크기의 잠재적인 트랜스제닉 줄기를 분리하고 뿌리 유도 배지 (0.5mg/L NAA, 3mg/L AgNO_3 , 250mg/L 세포탁심 및 50mg/L 티멘틴을 함유하는 MS-아가)에 옮긴 다음 2-3주 동안 배양하였다. PCR로 확인되고 풍부한 뿌리를 갖는 트랜스제닉 줄기를 온실의 토양에 옮기고 22°C에서 16/8시간 (명/암)의 광주기 하에 성장시켰다. 3개의 확인된 트랜스제닉 식물을 얻었다. 형질전환된 식물을 온실에서 성장시키고, 자가수정시켜 T1 종자를 수확하였다. 각각의 T0 형질전환된 식물 유래의 T1 종자의 폴로부터의 지질의 지방산 조성을 분석하였으며, 이는 JT1-4로 지정된 하나의 라인에서 2.8% DPA 및 7.2% DHA의 존재를 보여주는데 반해, JT1-6로 지정된 또 다른 라인은 2.6% DPA를 나타내었다.
- [0651] 개개의 T1 종자 유래 종자유를 지방산 조성에 대해 분석하였으며; 일부 데이터를 표 17에 나타낸다. 몇몇의 T1 종자는 JT1-4-A-13, JT1-4-A -5, 및 JT1-4-B-13을 포함하여 전체 지방산 함량의 10% 내지 약 21% 수준으로 DHA를 생산하였다. 놀랍고 예기치 않게도, 일부 T1 종자가 전체 지방산 함량의 10% 내지 약 18% 수준으로 DPA를 함유하였으며 DHA는 검출가능하지 않았다 (<0.1%). 본 발명자들은, 실시예 2에 기재된 것과 유사하게, 이들 식물에 삽입된 T-DNA의 $\Delta 4$ -불포화효소 유전자가 자발적인 돌연변이를 통해 비활성화되었다는 결론을 내렸다. T1 종자를 발아시키고 각각으로부터의 하나의 용기 떡잎을 잔여 오일 중 지방산 조성에 대해 분석하였다. 나머지 각각의 묘목을 유지하고 성숙기로 성장시켜 T2 종자를 제공하였다.
- [0652] 단일 T-DNA 삽입에 대해 동종접합성인 트랜스제닉 식물을 식별하고 선택하였다. JT1-4-17로 지정된 하나의 선택된 라인의 식물은 단일 T-DNA 삽입을 가졌고 낮은 수준에 불과한 DPA와 함께 DHA를 생산하는데 반해, JT1-4-34로 지정된 두번째 선택된 라인의 식물은 또한 단일 T-DNA 삽입을 가지나 DHA 생산 없이 DPA를 생산하였다. 본 발명자들은 본래의 형질전환체가 2개의 개별적인 T-DNA를 함유하고, 하나는 DHA의 생산능을 부여하고 다른 하나는 DHA 없이 DPA의 생산능을 부여한다는 것으로 결론내렸다. 종자에서 DHA를 생산하는 비. 윤채아 식물을 종자에서 DPA를 생산하는 식물과 교차교배하였다. F1 자손은 둘 모두의 T-DNA 삽입에 대해 이종접합성인 식물을 포함하였다. 이들 자손 식물 유래 종자는 26%의 전체 DHA + DPA 함량에 대하여, 약 20% DHA 및 약 6% DPA를 생산하는 것으로 관찰되었다. F1 식물을 자가수정시키고 둘 모두의 T-DNA 삽입에 대해 동종접합성인 자손은

35%까지 DHA 및 DPA를 생산할 것으로 예측된다.

- [0653] 약 18% DPA가 JT1-4-34-11로 지정된 T3 자손의 풀의(pooled) 종자의 지질에서 관찰되었다. 유사하게 약 17.5% DHA가 T3 JT1-4-17-20의 자손의 풀의 종자 유래 지질에서 관찰되었다. JT1-4 T1 풀의 종자, T1 단일 종자, T2 풀의 종자, T2 단일 종자, 및 T3 풀의 종자, T3 단일 종자의 지방산 조성을 표 18 내지 21에 나타낸다. 각각 전체 지방산 함량의 퍼센트로서, JT1-4 T3 분리체(segregant) JT-1-4-34-11은 18%의 풀의 T3 종자 DPA 함량을 가지고 이러한 특별한 분리체 유래 단일 종자는 약 26%의 DPA 함량을 가졌다.
- [0654] 하기 파라미터를 17.9% DPA를 갖는 종자 유래 오일에 대해 계산하였다: 전체 포화 지방산, 6.8%; 전체 단일불포화 지방산, 36.7%; 전체 다중불포화 지방산, 56.6%, 전체 ω 6 지방산, 7.1%; 새로운 ω 6 지방산, 모두 GLA인 0.4%; 전체 ω 3 지방산, 46.5%; 새로운 ω 3 지방산, 24.0%; 전체 ω 6: 전체 ω 3 지방산의 비율, 6.5; 새로운 ω 6: 새로운 ω 3 지방산의 비율, 60; Δ 12-불포화효소에 의한 올레산의 LA로의 전환 효율, 61%; Δ 6-불포화효소에 의한 ALA의 SDA로의 전환 효율, 51%; Δ 6-신장효소에 의한 SDA의 ETA 산으로의 전환 효율, 90%; Δ 5-불포화효소에 의한 ETA의 EPA로의 전환 효율, 87%; Δ 5-신장효소에 의한 EPA의 DPA로의 전환 효율, 98%.
- [0655] modB 구조물로 비. 윤체아에서 더욱 많은 트랜스제닉 식물을 생산하기 위하여, 형질전환을 5번 반복하고 16개의 추정 트랜스제닉 줄기/묘목을 재생시켰다. T1 종자 분석을 수행하여 DPA 및 DHA 함량을 측정하였다.
- [0656] DPA를 함유하고 DHA를 함유하지 않는 추가적인 종자를 생산하기 위하여, Δ 4-불포화효소 유전자가 결여된 modB 구조물의 변이체인 유전 구조물을 하기와 같이 제조하였다. EPA-DPA 단편 1 및 EPA-DPA 단편 2로 구성된 2개 DNA 단편을 적절한 제한 부위를 이용하여 합성하였다 (Geneart, Germany). EPA-DPA 단편 1의 *AatII-MluI* 단편을 11ABHZHC_GA7-frag_d6D_pMS 지시된 벡터(Δ 6 불포화효소 카세트를 함유하는 GA7-modB의 구성(construction) 초기에 사용된 벡터) 내 *AscI-AatII* 부위 내로 클로닝시켜 중간(intermediate) 클로닝 벡터인 pJP3660를 생성하였다. 이어서 pJP3660의 *PmeI-PspOMI* 단편을 modB의 *PmeI-PspOMI* 부위 내로 클로닝시켜 pJP3661을 생성하였다. 이어서, EPA-DPA 단편 2의 *BsiWI-PspOMI* 단편을 pJP3661의 *BsiWI-PspOMI* 부위 내로 클로닝시켜 DPA 벡터인 pJP3662 (도 4)를 조립하였다. 이러한 벡터는 올레산을 DPA ω 3 및 이에 상응하는 ω 6 지방산으로 전환시키는 효소를 암호화하는 지방산 생합성 유전자를 함유하였다. 생성된 구조물을 사용하여 비. 윤체아 및 비. 나푸스를 형질전환시켰다. 종자 지질의 전체 지방산 함량 중 35%이하의 DPA를 갖는 자손 종자가 생산된다.
- [0657] DHA를 생산하는 식물의 종자로부터 추출된 오일을 NMR로 조사시, 적어도 95%의 DHA가 TAG 분자의 *sn*-1,3 위치에 존재하는 것으로 관찰되었다.

표 17

GA7 유래 T-DNA로 형질전환된 비. 윤채아의 T1 종자 유래 종자유 지방산 조성.

T1 종자 번호	C16:0	C16:1Δ9	C18:0	C18:1	18:1Δ11	C18:2	C18:3ω6	C18:3ω3	C20:0	C18:4ω3	20:1Δ11	C20:2ω6	C20:3ω3	C20:4ω3	C20:5ω3	C22:5ω3	C22:6ω3
JT1-4-A-1	5.0	0.2	2.7	23.5	3.4	17.0	0.7	24.8	0.7	2.0	1.1	0.2	0.8	4.0	0.6	2.4	9.9
JT1-4-A-2	4.3	0.3	2.6	37.2	3.2	11.0	0.3	22.1	0.7	0.9	1.3	0.2	1.4	3.2	0.3	9.4	0.0
JT1-4-A-3	5.6	0.3	2.7	20.8	3.7	16.0	0.6	24.4	0.7	2.0	0.9	0.2	1.1	4.5	0.7	3.1	11.4
JT1-4-A-4	4.6	0.4	2.8	36.2	3.4	10.6	0.3	24.5	0.8	9.9	1.7	0.2	0.3	0.5	0.0	2.5	0.0
JT1-4-A-5	5.0	0.2	3.2	20.3	3.6	13.7	0.7	25.9	0.7	2.0	0.9	0.2	1.3	4.4	1.5	1.6	13.5
JT1-4-A-6	4.8	0.4	3.4	37.9	3.7	7.4	0.4	19.9	0.9	1.4	1.4	0.1	0.8	1.9	0.4	13.9	0.0
JT1-4-A-7	5.6	0.3	3.0	26.2	4.0	8.9	0.3	26.6	0.6	1.8	1.0	0.1	1.8	3.7	1.3	2.2	11.3
JT1-4-A-8	4.8	0.4	2.9	40.3	3.4	7.8	0.3	22.2	0.8	1.4	1.3	0.1	0.8	2.4	0.4	9.6	0.0
JT1-4-A-9	7.1	0.3	3.6	17.7	4.3	17.9	0.7	23.1	1.0	2.1	0.8	0.2	1.5	3.6	0.8	2.0	11.9
JT1-4-A-10	5.1	0.2	4.2	22.3	3.4	19.5	0.7	21.7	0.8	1.5	0.9	0.2	1.7	7.8	0.9	1.0	6.5
JT1-4-A-11	5.0	0.5	2.8	37.6	4.0	7.1	0.4	19.2	0.7	1.9	1.4	0.2	0.5	1.6	0.3	15.5	0.0
JT1-4-A-12	5.2	0.3	3.0	28.2	4.0	9.2	0.3	27.4	0.6	1.9	0.9	0.1	1.5	3.2	1.1	1.8	10.2
JT1-4-A-13	5.4	0.2	3.0	16.7	4.1	9.9	0.6	29.9	0.7	2.2	1.0	0.2	1.7	2.0	1.1	2.0	17.9
JT1-4-A-14	5.1	0.4	3.1	30.0	4.0	11.5	0.3	27.7	0.7	2.2	1.0	0.1	0.6	2.4	0.8	1.3	7.8
JT1-4-A-15	5.1	0.4	2.5	34.2	3.6	6.9	0.6	20.4	0.7	1.6	1.1	0.2	0.6	4.7	0.9	15.2	0.0
JT1-4-B-1	5.5	0.2	2.7	18.9	4.0	17.6	0.8	24.1	0.8	2.2	1.0	0.2	1.2	4.6	0.9	2.2	11.5
JT1-4-B-2	5.5	0.2	2.7	20.2	4.0	14.3	0.5	25.5	0.7	1.7	0.9	0.2	1.6	8.7	1.3	2.2	8.5
JT1-4-B-3	5.3	0.3	3.6	34.1	3.5	35.0	0.6	9.3	0.8	0.2	1.4	0.4	0.6	0.9	0.1	0.3	2.1
JT1-4-B-4	5.3	0.3	3.1	25.2	3.6	17.0	0.7	24.1	0.7	1.9	1.0	0.2	0.8	4.3	0.5	2.3	7.8
JT1-4-B-5	5.5	0.5	2.2	30.1	4.6	10.2	0.5	21.7	0.6	1.4	1.1	0.2	0.9	2.4	0.5	16.1	0.0
JT1-4-B-8	6.2	0.5	1.9	33.1	4.0	30.0	0.5	12.7	0.6	0.3	1.3	0.4	1.4	0.9	0.1	4.4	0.0
JT1-4-B-13	5.6	0.3	2.8	20.9	3.9	11.9	0.4	27.0	0.7	2.0	1.0	0.2	1.7	2.3	0.7	4.1	13.5

종자유 샘플은 또한 0.1% C14:0; 0.1-0.2% C16:3; 각각 0.0-0.1%의 C20:1Δ13, C20:3ω6 및 C20:4ω6; 0.3-0.4% C22:0를 함유하고; C22:1 및 C22:2ω6를 함유하지 않으며; 0.2% C24:0 및 0.2-0.4% C24:1를 함유하였다.

[0658]

표 18

GA7-modB 유래 T-DNA로 형질전환된 비. 윤채아의 T1 종자 (풀의) 유래 지질의 지방산 조성.

지질은 또한 각각 약 0.1%의 14:0, 16:3, 20:1Δ13을 함유하고; 16:2, 22:1은 검출되지 않았다.

종자	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:1Δ11	C18:2	C18:3ω6	C18:3ω3	C20:0	C18:4ω3	C20:1Δ11	C20:2ω6	C20:3ω6	C20:4ω6	C20:3ω3	C22:0	C20:4ω3	C20:5ω3	C22:2ω6	C22:3ω3	C24:0	C24:1	C22:5ω3	C22:6ω3
JT1-2	4.2	0.3	2.5	42.4	3.2	27.7	0.1	16.4	0.6	0.0	1.2	0.1	0.0	0.0	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.4	0.0	0.0
JT1-3	4.5	0.3	2.7	44.6	3.1	26.8	0.1	14.8	0.7	0.0	1.2	0.1	0.0	0.0	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.4	0.0	0.0
JT1-4	5.1	0.3	3.2	26.8	3.5	17.4	0.5	22.8	0.7	2.5	1.1	0.2	0.0	0.0	1.2	0.3	2.9	0.7	0.0	0.1	0.2	0.3	2.8	7.2
JT1-5	4.7	0.4	2.4	41.6	3.4	28.4	0.1	15.8	0.7	0.0	1.2	0.1	0.0	0.0	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.4	0.0	0.0
JT1-6	4.8	0.4	2.3	37.3	3.3	30.2	0.4	13.2	0.7	0.2	1.4	0.3	0.0	0.0	0.7	0.3	0.6	0.1	0.0	0.3	0.2	0.5	2.6	0.0

[0659]

표 19

GA7-modB 유래 T-DNA로 형질전환된 비. 윤체아의 T1 (단일) 종자 유래 종자의 지방산 조성.

T1 종자 번호	C16:0	C16:1Δ9	C18:0	C18:1	18:1Δ11	C18:2	C18:3ω6	C18:3ω3	C20:0	C18:4ω3	20:1Δ11	C20:2ω6	C20:3ω3	C20:4ω3	C20:5ω3	C22:5ω3	C22:6ω3
JT1-4-A-1	5.0	0.2	2.7	23.5	3.4	17.0	0.7	24.8	0.7	2.0	1.1	0.2	0.8	4.0	0.6	2.4	9.9
JT1-4-A-2	4.3	0.3	2.6	37.2	3.2	11.0	0.3	22.1	0.7	0.9	1.3	0.2	1.4	3.2	0.3	9.4	0.0
JT1-4-A-3	5.6	0.3	2.7	20.8	3.7	16.0	0.6	24.4	0.7	2.0	0.9	0.2	1.1	4.5	0.7	3.1	11.4
JT1-4-A-4	4.6	0.4	2.8	36.2	3.4	10.6	0.3	24.5	0.8	9.9	1.7	0.2	0.3	0.5	0.0	2.5	0.0
JT1-4-A-5	5.0	0.2	3.2	20.3	3.6	13.7	0.7	25.9	0.7	2.0	0.9	0.2	1.3	4.4	1.5	1.6	13.5
JT1-4-A-6	4.8	0.4	3.4	37.9	3.7	7.4	0.4	19.9	0.9	1.4	1.4	0.1	0.8	1.9	0.4	13.9	0.0
JT1-4-A-7	5.6	0.3	3.0	26.2	4.0	8.9	0.3	26.6	0.6	1.8	1.0	0.1	1.8	3.7	1.3	2.2	11.3
JT1-4-A-8	4.8	0.4	2.9	40.3	3.4	7.8	0.3	22.2	0.8	1.4	1.3	0.1	0.8	2.4	0.4	9.6	0.0
JT1-4-A-9	7.1	0.3	3.6	17.7	4.3	17.9	0.7	23.1	1.0	2.1	0.8	0.2	1.5	3.6	0.8	2.0	11.9
JT1-4-A-10	5.1	0.2	4.2	22.3	3.4	19.5	0.7	21.7	0.8	1.5	0.9	0.2	1.7	7.8	0.9	1.0	6.5
JT1-4-A-11	5.0	0.5	2.8	37.6	4.0	7.1	0.4	19.2	0.7	1.9	1.4	0.2	0.5	1.6	0.3	15.5	0.0
JT1-4-A-12	5.2	0.3	3.0	28.2	4.0	9.2	0.3	27.4	0.6	1.9	0.9	0.1	1.5	3.2	1.1	1.8	10.2
JT1-4-A-13	5.4	0.2	3.0	16.7	4.1	9.9	0.6	29.9	0.7	2.2	1.0	0.2	1.7	2.0	1.1	2.0	17.9
JT1-4-A-14	5.1	0.4	3.1	30.0	4.0	11.5	0.3	27.7	0.7	2.2	1.0	0.1	0.6	2.4	0.8	1.3	7.8
JT1-4-A-15	5.1	0.4	2.5	34.2	3.6	6.9	0.6	20.4	0.7	1.6	1.1	0.2	0.6	4.7	0.9	15.2	0.0
JT1-4-B-1	5.5	0.2	2.7	18.9	4.0	17.6	0.8	24.1	0.8	2.2	1.0	0.2	1.2	4.6	0.9	2.2	11.5
JT1-4-B-2	5.5	0.2	2.7	20.2	4.0	14.3	0.5	25.5	0.7	1.7	0.9	0.2	1.6	8.7	1.3	2.2	8.5
JT1-4-B-3	5.3	0.3	3.6	34.1	3.5	35.0	0.6	9.3	0.8	0.2	1.4	0.4	0.6	0.9	0.1	0.3	2.1
JT1-4-B-4	5.3	0.3	3.1	25.2	3.6	17.0	0.7	24.1	0.7	1.9	1.0	0.2	0.8	4.3	0.5	2.3	7.8
JT1-4-B-5	5.5	0.5	2.2	30.1	4.6	10.2	0.5	21.7	0.6	1.4	1.1	0.2	0.9	2.4	0.5	16.1	0.0
JT1-4-B-6	5.6	0.3	2.5	19.5	3.8	15.2	0.5	27.7	0.6	2.1	0.9	0.2	1.1	3.7	0.6	3.3	11.1
JT1-4-B-7	5.9	0.5	2.0	29.9	4.0	11.2	0.3	26.2	0.6	11.5	1.4	0.2	0.3	0.4	0.0	4.1	0.1
JT1-4-B-8	6.2	0.5	1.9	33.1	4.0	30.0	0.5	12.7	0.6	0.3	1.3	0.4	1.4	0.9	0.1	4.4	0.0
JT1-4-B-9	4.9	0.2	3.4	24.6	3.0	18.5	0.3	26.2	0.8	1.3	1.1	0.2	2.0	5.5	0.6	0.8	5.2
JT1-4-B-10	5.2	0.3	2.7	19.0	4.0	12.0	0.6	30.5	0.7	1.6	1.0	0.2	1.7	4.9	1.1	3.0	10.2
JT1-4-B-11	4.8	0.2	3.0	23.7	3.1	18.1	0.6	23.5	0.7	1.6	1.2	0.2	1.5	4.5	0.8	1.6	9.6
JT1-4-B-12	5.0	0.2	2.6	19.6	3.4	12.5	0.6	26.9	0.8	3.1	1.1	0.2	0.9	5.6	0.9	3.5	11.7
JT1-4-B-13	5.6	0.3	2.8	20.9	3.9	11.9	0.4	27.0	0.7	2.0	1.0	0.2	1.7	2.3	0.7	4.1	13.5
JT1-4-B-14	5.1	0.3	3.1	25.5	3.3	16.7	0.7	23.9	0.8	1.8	1.2	0.2	0.9	2.6	0.4	2.9	9.2
JT1-4-B-15	5.6	0.3	2.7	19.5	4.1	14.0	0.8	24.6	0.7	2.7	0.9	0.2	0.7	9.4	1.3	2.5	8.5

종자유 샘플은 또한 0.1% C14:0; 0.1-0.2% C16:3; 각각 0.0-0.1%의 C20:1Δ13, C20:3ω6 및 C20:4ω6를 함유하고; 0.3-0.4% C22:0를 함유하며; C22:1 및 C22:2ω6을 함유하지 않고; 0.2% C24:0 및 0.2-0.4% C24:1을 함유하였다.

[0660]

표 20

GA7-modB 유래 T-DNA로 형질전환된 비. 윤체아의 T2 단일 종자 유래 종자유의 지방산 조성.
지질은 또한 0.1-0.2% C16:1Δ9, C16:3 및 C20:2ω6, 0.5-0.6% C20:0을 함유하고,
C20:3ω6, C20:4ω6 및 C22:2ω6를 함유하지 않았다.

종자 번호	C16:0	C18:0	C18:1	C18:1Δ11	C18:2	C18:3ω6	C18:3ω3	C18:4	C20:1Δ11	C20:3ω3	C22:0	C20:4ω3	C20:5ω3	C22:3ω3	C24:0	C22:5ω6	C22:4ω3	C24:1	22:5ω3	C22:6ω3
1	4.4	1.7	36.3	2.9	8.3	0.5	22.0	1.4	1.2	0.4	0.3	4.2	0.6	0.1	0.1	0.0	1.8	0.3	12.1	0.0
2	5.6	1.9	39.1	3.1	8.4	0.4	18.9	1.2	1.3	0.5	0.3	2.5	0.4	0.1	0.2	0.0	1.5	0.4	12.6	0.0
3	5.5	1.8	42.3	3.2	9.9	0.3	24.0	5.9	1.5	0.2	0.4	0.5	0.0	0.0	0.2	0.0	0.4	0.4	1.5	0.0
4	5.6	1.5	36.8	3.7	9.4	0.3	19.6	0.6	1.4	1.4	0.3	1.9	0.3	0.2	0.2	0.0	1.6	0.4	13.1	0.0
5	4.6	1.7	36.3	2.7	7.2	0.3	22.6	1.0	1.5	0.7	0.3	2.1	0.3	0.1	0.2	0.0	2.2	0.3	14.4	0.0
6	4.9	1.8	38.3	3.1	7.4	0.3	20.2	0.8	1.3	0.8	0.3	2.7	0.5	0.2	0.2	0.0	1.7	0.3	13.7	0.0
7	4.7	1.7	36.2	3.0	8.2	0.4	20.9	0.7	1.3	0.9	0.3	2.9	0.5	0.2	0.2	0.0	2.0	0.3	14.2	0.0
8	4.8	2.2	41.0	3.0	9.8	0.2	27.0	4.2	1.8	0.3	0.3	0.5	0.0	0.1	0.2	0.0	0.7	0.3	2.2	0.0
9	5.8	1.7	36.6	3.7	9.1	0.3	21.3	0.9	1.4	0.8	0.3	1.5	0.3	0.1	0.2	0.0	1.2	0.4	12.7	0.0
10	4.8	2.1	47.1	2.9	7.4	0.2	23.9	4.8	1.7	0.2	0.3	0.5	0.0	0.0	0.2	0.0	0.5	0.3	1.5	0.0
11	5.1	1.7	37.4	3.3	7.7	0.3	20.7	0.9	1.4	0.8	0.3	2.5	0.4	0.1	0.2	0.0	1.6	0.4	13.6	0.0
12	4.7	1.8	37.3	2.7	7.9	0.4	20.6	1.1	1.3	0.5	0.3	4.3	0.6	0.1	0.1	0.0	2.2	0.3	12.3	0.0
13	4.9	2.0	37.9	3.0	7.1	0.4	20.1	1.1	1.3	0.6	0.3	4.1	0.5	0.1	0.1	0.0	2.1	0.3	12.6	0.0
14	4.7	1.6	35.7	3.2	6.9	0.3	22.4	0.7	1.4	1.3	0.3	3.0	0.5	0.2	0.1	0.0	1.9	0.3	14.0	0.0
15	4.7	1.8	37.6	3.4	7.8	0.3	23.7	0.6	1.5	1.2	0.2	1.7	0.3	0.2	0.1	0.0	1.8	0.3	11.4	0.0
16	5.3	1.6	35.3	3.5	8.1	0.5	21.1	0.8	1.2	0.7	0.3	3.1	0.5	0.2	0.1	0.0	1.9	0.3	13.9	0.0
17	4.9	1.7	39.4	3.3	7.7	0.3	21.1	0.7	1.4	0.8	0.3	2.0	0.3	0.2	0.1	0.0	1.7	0.3	12.3	0.0
18	5.0	1.8	38.5	3.1	7.8	0.4	20.5	0.8	1.3	0.8	0.2	2.3	0.3	0.2	0.1	0.0	2.0	0.3	13.1	0.0
19	5.1	1.8	39.5	2.9	9.0	0.2	22.2	0.6	1.5	1.0	0.3	1.7	0.2	0.1	0.2	0.0	1.6	0.3	10.2	0.0
20	4.8	1.8	38.2	3.2	7.8	0.4	21.1	0.7	1.4	0.7	0.3	2.1	0.4	0.2	0.1	0.0	1.7	0.3	13.3	0.0
21	5.0	2.0	39.7	2.9	7.9	0.4	20.2	0.7	1.3	0.7	0.3	2.3	0.3	0.2	0.1	0.0	1.9	0.3	12.2	0.0
22	4.7	1.6	36.0	3.3	8.3	0.3	23.7	0.6	1.5	1.2	0.3	1.7	0.3	0.2	0.1	0.0	1.8	0.3	12.7	0.0
23	6.2	2.1	32.0	4.4	7.2	0.6	19.4	1.2	1.2	0.6	0.4	2.2	0.5	0.3	0.2	0.0	1.6	0.4	17.6	0.0

[0661]

표 21

GA7-modB 유래 T-DNA로 형질전환된 비. 윤체아의 T3 단일 종자 유래 종자유의 지방산 조성.
종자는 또한 0.1-0.2%의 각각의 C16:3, C20:1Δ13, C20:2ω6를 함유하였다. C20:3ω6, C20:4ω6,
C22:2ω6, C22:5ω6 및 C22:6ω3는 검출되지 않았다.

종자 번호	C16:0	C16:1Δ9	C18:0	C18:1	C18:1Δ11	C18:2	C18:3ω6	C18:3ω3	C20:0	C18:4	C20:1Δ11	C20:3ω3	C22:0	C20:4ω3	C20:5ω3	C22:3ω3	C22:4ω3	C24:1	C22:5ω3
1	4.8	0.4	2.8	38.4	3.7	5.7	0.4	18.0	0.7	1.0	1.5	1.1	0.3	1.4	0.4	0.3	1.4	0.5	16.3
2	4.3	0.4	3.0	43.3	3.6	5.2	0.2	18.5	0.7	0.8	1.7	1.4	0.3	1.2	0.3	0.2	1.2	0.3	12.4
3	4.6	0.4	2.8	33.1	4.1	5.1	0.4	18.5	0.7	1.2	1.4	1.1	0.3	1.6	0.5	0.3	1.4	0.4	20.8
4	4.5	0.4	2.9	39.5	3.3	6.3	0.4	18.5	0.8	1.2	1.5	1.0	0.3	1.7	0.3	0.2	1.8	0.3	14.2
5	4.9	0.5	2.8	32.2	3.9	4.7	0.3	20.7	0.8	1.2	1.4	2.0	0.3	1.4	0.5	0.3	1.2	0.4	19.4
6	4.3	0.3	3.0	38.1	3.2	5.8	0.3	19.4	0.7	1.1	1.5	1.2	0.3	1.5	0.4	0.2	1.3	0.4	16.0
7	5.4	0.5	3.2	29.3	4.0	4.6	0.4	18.6	0.9	1.7	1.3	1.2	0.4	1.6	0.7	0.3	1.4	0.5	22.9
8	5.2	0.5	3.7	34.5	4.1	4.5	0.3	17.2	1.0	1.4	1.4	1.5	0.4	1.4	0.6	0.3	1.2	0.5	19.4
9	5.3	0.5	3.4	33.4	3.7	4.6	0.3	17.6	0.9	1.7	1.2	1.1	0.4	1.5	0.6	0.2	1.2	0.5	20.7
10	4.6	0.4	3.0	39.5	3.5	5.1	0.3	17.8	0.8	0.8	1.6	1.4	0.4	1.3	0.4	0.3	1.3	0.4	16.1
11	4.3	0.4	3.1	41.7	3.5	5.6	0.2	19.0	0.7	0.9	1.6	1.3	0.3	1.4	0.3	0.2	1.5	0.3	12.7
12	4.8	0.5	2.8	33.8	4.0	5.3	0.4	18.2	0.7	1.4	1.3	1.2	0.3	1.6	0.6	0.3	1.3	0.4	20.1
13	4.4	0.4	3.5	40.3	3.5	5.2	0.2	19.1	0.7	1.0	1.5	1.6	0.3	1.4	0.4	0.2	1.4	0.3	13.8
14	4.8	0.4	3.2	36.1	3.7	5.9	0.3	19.9	0.7	1.4	1.3	1.1	0.3	1.9	0.5	0.2	1.7	0.3	15.4
15	4.0	0.3	2.8	37.2	3.2	4.9	0.3	19.6	0.8	0.9	1.6	1.5	0.4	1.3	0.5	0.3	1.1	0.4	17.9
16	4.5	0.4	3.8	36.7	3.2	4.5	0.2	19.0	0.9	1.1	1.4	1.8	0.4	1.2	0.5	0.2	1.0	0.5	17.8
17	5.2	0.4	2.8	27.8	3.7	5.3	0.5	18.3	0.8	1.7	1.3	1.0	0.4	1.9	0.7	0.3	1.7	0.5	24.7
18	5.4	0.6	2.8	31.7	4.1	4.6	0.3	18.5	0.8	1.3	1.3	1.4	0.4	1.4	0.6	0.2	1.3	0.4	21.8
19	6.4	0.6	2.7	30.3	3.5	4.1	0.4	16.1	0.8	2.1	1.1	0.9	0.4	1.4	0.7	0.2	1.1	0.5	25.8
20	4.3	0.3	3.2	39.2	3.3	5.7	0.2	20.1	0.7	0.9	1.6	1.7	0.3	1.3	0.3	0.2	1.3	0.3	14.1

[0662]

[0663] **실시예 9. 형질전환된 식물의 추가적인 분석 및 필드 실험**

[0664] 씨던 블릿 하이브리디제이션 분석을 GA7-modB 구조물 유래 T-DNA로 형질전환된 선택된 T2 비. 나푸스 식물 상에서 수행하였다. 식물 조직의 샘플로부터 추출된 DNA를 씨던 블릿 하이브리드 형성 분석을 위한 몇몇의 제한 효소로 소화시켰다. T-DNA의 부분에 상응하는 방사성 프로브를 블릿에 하이브리드 형성시키고, 이를 가혹 조건 하에서 세척하고, 블릿을 필름에 노출시켜 하이브리드 형성 밴드를 검출하였다. 일부 샘플은 각각의 제한 소화에 대해, 식물 내 단일 T-DNA 삽입에 상응하는 단일 하이브리드 형성 밴드를 나타내며 반해, 다른 샘플들은 4 내지 6개의 삽입에 상응하는 다중 T-DNA 밴드를 다시 나타내었다. 씨던 블릿 분석에서 관찰된 하이브리드 형성 밴드의 수는 약 3개 또는 4개의 카피 수까지, 디지털 PCR 방법에 의해 측정된 바와 같은 트랜스제닉 식물의 T-DNA 카피 수와 잘 상관관계를 나타내었다. 약 5개 이상의 카피 수에서, 디지털 PCR 방법은 신뢰성이 떨어졌다.

[0665] 일부의 선택된 계통을 상이한 유전적 배경의 일련의 약 30개의 상이한 비. 나푸스 변종과의 교차교배에서 꽃가루 공여자로서 사용하였다. 추가적인 역-교차를 수행하여 다중 T-DNA 삽입이 유전적으로 연관되는지 또는 아닌지 여부를 입증하고, 유전적으로 연관되지 않은 트랜스제닉 좌위를 분리시켰다. 이에 의해, 단일 트랜스제닉 좌위를 함유하는 라인을 선택한다.

[0666] 단일-프라이머 PCR 반응을 T-DNA의 좌- 및 우-경계에 인접하는 프라이머를 사용하여, 트랜스제닉 라인 상에서 수행하였으며, T-DNA의 반전된 반복의 존재를 보이는 임의의 라인을 버린다.

[0667] 몇몇의 트랜스제닉 라인은 지연된 개화를 보이면서, 다른 것들은 감소된 종자-세트를 가졌고 이에 따라 온실에서 재배 후 식물 당 종자 수율이 감소하였고, 이는 감소된 수술 또는 암술 수정능력에 일치하였다. 꽃 모폴로지를 이들 식물에서 조사하였고 몇몇의 경우에, 꽃밥 유래 꽃가루의 열개 및 방출이 지연되어 암술대가 열개에 발생하기 전에 길어지고, 이에 의하여 암술머리로부터 꽃밥이 거리를 두게 되는 것을 관찰하였다. 온전한 수정능력이 인공 수분으로 회복될 수 있었다. 또한, 열개시 꽃가루 생존력을 생체염색 FDA 및 PI로 염색하여 측정하였고 (실시예 1) 이는 일부 라인에서 감소하는 것으로 나타났지만, 대부분의 트랜스제닉 라인에서, 꽃가루 생존력은 야생형 대조군에서와 같이 약 100%이었다. 일부 식물에서 감소된 종자 수율의 가능한 원인에 대한 추가적인 테스트로서, 일부 T3 및 T4 식물의 꽃밥 및 암술머리/암술대를 포함하는 꽃봉오리의 지방산 함량 및 조성을 테스트하였다. DHA는 추출된 지질에서 검출되지 않았고, 이는 유전적 구조물 내 유전자가 식물 발달 도중에 꽃봉오리 내에서 발현되지 않았음을 나타내며, 이것을 감소된 종자 수율의 원인으로 규정하였다.

[0668] 오일 함량을 NMR로 측정하고 전체 지방산 함량 중 DHA 수준을 T2 종자에 대해 측정하였다. 6% 미만의 DHA를 갖는 트랜스제닉 라인은 버렸다. T1, T2 및 T3 세대의 식물 유래 일 샘플의 T-DNA 카피 수를 디지털 PCR 방법(실시예 1)으로 측정하였다.

[0669] 선택된 T3 및 T4 종자 로트를 각각 10m 줄로 약 10개 종자/m의 파종 밀도로 호주 빅토리아에 2개 부지의 필드에 파종하였다. 선택된 종자 로트는 B003-5-14 유도 라인을 포함하며 이는 약 8-11%의 통합(pooled) 종자 DHA 수준 및 약 19%까지의 개별적인 T2 종자 DHA 수준을 나타내고, 3개의 T0 식물 T-DNA 카피 수를 가졌다. 또한, 선택된 종자 로트는 B0050-27 유도 라인을 포함하며 이는 20% 초과 T2 종자 DHA 수준, 및 1개 또는 2개의 T2 식물 T-DNA 카피 수를 나타냈다. 필드에 파종된 종자를 발아시켰으며 소식물체가 야생형 종자와 동일한 속도로 발생하였다. 대부분, 그러나 전부는 아닌 파종된 종자 로트로부터 성장한 식물은 표현형으로 정상이었으며, 예를 들어 동일한 조건 하에서 성장한 야생형 대조군 식물과 본질적으로 동일한, 모폴로지, 성장 속도, 식물 높이, 수술 및 암술 수정능력, 꽃가루 생존력 (100%), 종자 세트, 장각과 크기 및 모폴로지를 가졌다. 식물 당 종자 수율은 동일한 조건 하에서 성장한 야생형 대조군과 유사하였다. 다른 종자 샘플을 더욱 큰 면적에 파종하여 선택된 트랜스제닉 라인을 성장시켰다. 수확된 종자 내 전체 DHA 함량은 적어도 30mg/g 종자이었다.

[0670] 당해 분야의 숙련가들은 본 발명에 대한 다수의 변화 및/또는 변형들이 광범위하게 개시된 바와 같은 본 발명의 정신 또는 범위를 이탈하지 않고 구체적 실시태양에 나타난 바와 같이 수행할 수 있는 것으로 이해할 것이다. 따라서 본 발명의 실시태양들은 모든 면에서 예시적이고 비제한적인 것으로 간주되어야 한다.

[0671] 본 명세서에 포함된 문서, 행위, 물질, 장치, 물품 등에 대한 임의의 논의는 오직 본 발명에 대한 배경을 제공하기 위한 것이다. 이들 자료 모두가 본 출원의 각 청구항의 우선일 이전에 존재하는 것으로서 종래 기술 토대의 부분을 형성하거나 본 발명과 관련된 분야의 통상적인 일반 지식을 인정하는 것으로서 간주해서는 안 된다.

- [0672] 참조 문헌
- [0673] Abbadi et al. (2004) Plant Cell 16: 2734-2748.
- [0674] Abbott et al. (1998) Science 282:2012-2018.
- [0675] Agaba et al. (2004) Marine Biotechnol. (NY) 6:251-261.
- [0676] Alvarez et al. (2000) Theor Appl Genet 100:319-327.
- [0677] Armbrust et al. (2004) Science 306:79-86.
- [0678] Baumlein et al. (1991) Mol. Gen. Genet. 225:459-467.
- [0679] Baumlein et al. (1992) Plant J. 2:233-239.
- [0680] Beaudoin et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97:6421-6426.
- [0681] Belide et al. (2013) Plant Cell Tiss Organ Cult. 113:543-553.
- [0682] Berberich. et al. (1998) Plant Mol. Biol. 36:297-306.
- [0683] Broun et al. (1998) Plant J. 13:201-210.
- [0684] Brown et al. (2002) Biochem J. 364:795-805.
- [0685] Chan et al. (2006) Nature Biotechnology 28:951-956.
- [0686] Chapman et al. (2004) Gen. Dev. 18:1179-1186.
- [0687] Chen et al. (2004) The Plant Cell 16:1302-1313.
- [0688] Cheng et al. (1996) Plant Cell Rep. 15:653-657.
- [0689] Cheng et al. (2010) Transgenic Res 19: 221-229.
- [0690] Cho et al. (1999a) J. Biol. Chem. 274:471-477.
- [0691] Cho et al. (1999b) J. Biol. Chem. 274:37335-37339.
- [0692] Christie (1982) J. Lipid Res. 23:1072-1075.
- [0693] Damude et al. (2006). Proc Natl Acad Sci USA 103: 9446-9451.
- [0694] Denic and Weissman (2007) Cell 130:663-677.
- [0695] Domergue et al. (2002) Eur. J. Biochem. 269:4105-4113.
- [0696] Domergue et al. (2003) J. Biol. Chem. 278: 35115-35126.
- [0697] Domergue et al. (2005) Biochem. J. 1 389: 483-490.
- [0698] Dunoyer et al. (2004) The Plant Cell 16:1235-1250.
- [0699] Ellerstrom et al. (1996) Plant Mol. Biol. 32:1019-1027.
- [0700] Gamez et al. (2003) Food Res International 36: 721-727.
- [0701] Garcia-Maroto et al. (2002) Lipids 37:417-426.
- [0702] Girke et al. (1998) Plant J. 15:39-48.
- [0703] Harayama (1998). Trends Biotechnol. 16: 76-82.
- [0704] Hastings et al. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98:14304-14309.
- [0705] Hinchee et al. (1988) Biotechnology 6:915-922.
- [0706] Hoffmann et al. (2008) J Biol. Chem. 283:22352-22362.
- [0707] Hong et al. (2002a) Lipids 37:863-868.

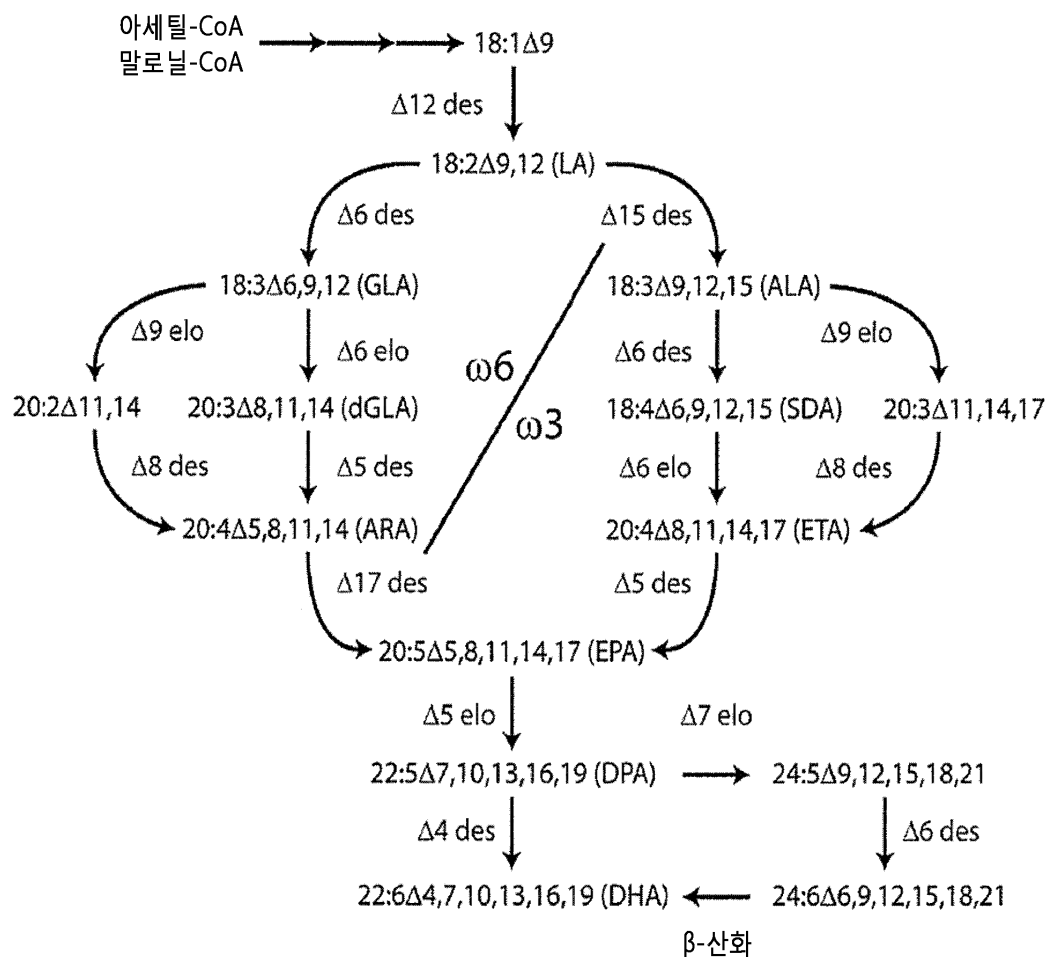
- [0708] Horiguchi et al. (1998) *Plant Cell Physiol.* 39:540-544.
- [0709] Huang et al. (1999) *Lipids* 34:649-659.
- [0710] Inagaki et al. (2002) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66:613-621.
- [0711] Kajikawa et al. (2004) *Plant Mol. Biol.* 54:335-52.
- [0712] Kajikawa et al. (2006) *FEBS Lett* 580:149-154.
- [0713] Kereszt et al. (2007) *Nature Protoc* 2:948-952.
- [0714] Kim et al. (2005) *Plant Cell.* 2005 1073-89.
- [0715] Knutzon et al. (1998) *J. Biol Chem.* 273:29360-6.
- [0716] Koletzko et al. (1988) *Am. J. Clin. Nutr.* 47:954-959.
- [0717] Koziel et al. (1996) *Plant Mol. Biol.* 32:393-405.
- [0718] Lassner (1995) *Plant Physiol.* 109:1389-94.
- [0719] Leonard et al. (2000) *Biochem. J.* 347:719-724.
- [0720] Leonard et al. (2000b) *Biochem. J.* 350:765-770.
- [0721] Leonard et al. (2002) *Lipids* 37:733-740.
- [0722] Lewsey et al. (2007) *Plant J.* 50:240-252.
- [0723] Lo et al. (2003) *Genome Res.* 13:455-466.
- [0724] Lu and Kang (2008) *Plant Cell Rep.* 27:273-8.
- [0725] Mallory et al. (2002) *Nat. Biotech.* 20:622-625.
- [0726] Marangoni et al. (1995) *Trends in Food Sci. Technol.* 6: 329-335.
- [0727] Meesapyodsuk et al. (2007) *J Biol Chem* 282: 20191-20199.
- [0728] Meng et al. (2008) *J. Gen. Virol.* 89:2349-2358.
- [0729] Meyer et al. (2003) *Biochem.* 42:9779-9788.
- [0730] Meyer et al. (2004) *Lipid Res* 45:1899-1909.
- [0731] Michaelson et al. (1998a) *J. Biol. Chem.* 273:19055-19059.
- [0732] Michaelson et al. (1998b) *FEBS Lett.* 439:215-218.
- [0733] Murashige and Skoog (1962) *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
- [0734] Napier et al. (1998) *Biochem. J.* 330:611-614.
- [0735] Needleman and Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443-453.
- [0736] Parker-Barnes et al. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:8284-8289.
- [0737] Pereira et al. (2004a) *Biochem. J.* 378:665-671.
- [0738] Pereira et al. (2004b) *Biochem. J.* 384:357-366.
- [0739] Perrin et al. (2000) *Mol Breed* 6:345-352.
- [0740] Petrie et al. (2010a) *Metab. Eng.* 12:233-240.
- [0741] Petrie et al. (2010b) *Plant Methods* 11:6:8.
- [0742] Petrie et al. (2012) *Transgenic Res.* 21:139-147.
- [0743] Potenza et al. (2004) *In Vitro Cell Dev Biol - Plant* 40:1-22.

- [0744] Qi et al. (2002) FEBS Lett. 510:159-165.
- [0745] Qi et al. (2004) Nat. Biotech. 22: 739-745.
- [0746] Qiu et al. (2001) J. Biol. Chem. 276:31561-31566.
- [0747] Reddy and Thomas (1996) Nat. Biotech. 14:639-642.
- [0748] Reddy et al. (1993) Plant Mol. Biol. 22:293-300.
- [0749] Robert et al. (2005) Func. Plant Biol. 32:473-479.
- [0750] Robert et al. (2009) Marine Biotech 11:410-418.
- [0751] Ruiz-Lopez et al. (2012) Transgenic Res. 21:139-147.
- [0752] Saha et al. (2006) Plant Physiol. 141:1533-1543.
- [0753] Saito et al. (2000) Eur. J. Biochem. 267:1813-1818.
- [0754] Sakuradani et al. (1999) Gene 238:445-453.
- [0755] Sato et al. (2004) Crop Sci. 44: 646-652.
- [0756] Sakuradani et al. (2005) Appl. Microbiol. Biotechnol. 66:648-654.
- [0757] Sayanova et al. (2006) J Biol Chem 281: 36533-36541.
- [0758] Sayanova et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94:4211-4216.
- [0759] Sayanova et al. (2003) FEBS Lett. 542:100-104.
- [0760] Sayanova et al. (2006) Planta 224:1269-1277.
- [0761] Sayanova et al. (2007) Plant Physiol 144:455-467.
- [0762] Shukla et al. (2002) J. Amer. Oil Chem. Soc. 79:965-969.
- [0763] Singh et al. (2005) Curr. Opin. in Plant Biol. 8:197-203.
- [0764] Speranza et al. (2012) Process Biochemistry (In Press).
- [0765] Sperling et al. (2000) Eur. J. Biochem. 267:3801-3811.
- [0766] Sperling et al. (2001) Arch. Biochem. Biophys. 388:293-8.
- [0767] Sprecher et al. (1995) J. Lipid Res. 36:2471-2477.
- [0768] Spsychalla et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94:1142-1147.
- [0769] Tonon et al. (2003) FEBS Lett. 553:440-444.
- [0770] Trautwein (2001) European J. Lipid Sci. and Tech. 103:45-55.
- [0771] Tvrdik (2000) J. Cell Biol. 149:707-718.
- [0772] Venegas-Caleron et al. (2010) Prog. Lipid Res. 49:108-119.
- [0773] Voinnet et al. (2003) Plant J. 33:949-956.
- [0774] Wallis and Browse (1999) Arch. Biochem. Biophys. 365:307-316.
- [0775] Watts and Browse (1999b) Arch. Biochem. Biophys. 362:175-182.
- [0776] Weiss et al. (2003) Int. J. Med. Microbiol. 293:95-106.
- [0777] Weng et al., (2004) Plant Molecular Biology Reporter 22:289-300.
- [0778] Whitney et al. (2003) Planta 217:983-992.
- [0779] Wood (2009) Plant Biotechnol J. 7:914-24.

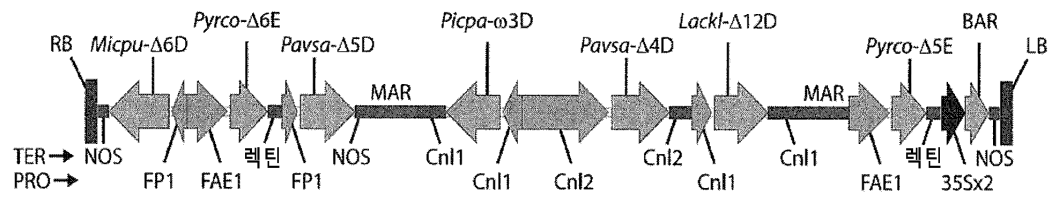
- [0780] Wu et al. (2005) Nat. Biotech. 23:1013-1017.
- [0781] Yang et al. (2003) Planta 216:597-603.
- [0782] Zank et al. (2002) Plant J. 31:255-268.
- [0783] Zank et al. (2005) WO 2005/012316
- [0784] Zhang et al. (2004) FEBS Lett. 556:81-85.
- [0785] Zhang et al. (2006) 20:3255-3268.
- [0786] Zhang et al. (2007) FEBS Letters 581: 315-319.
- [0787] Zhang et al. (2008) Yeast 25: 21-27.
- [0788] Zhou et al. (2007) Phytochem. 68:785-796.
- [0789] Zhou et al. (2008) Insect Mol Biol 17: 667-676.
- [0790] Zou et al. (1997) Plant Cell. 9:909-23.

도면

도면1

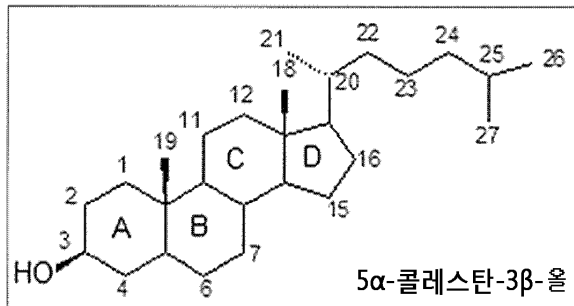


도면2

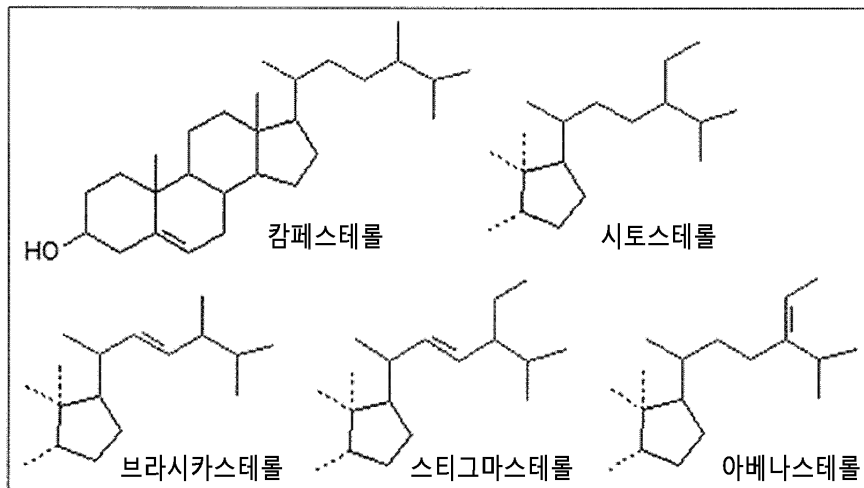


도면3

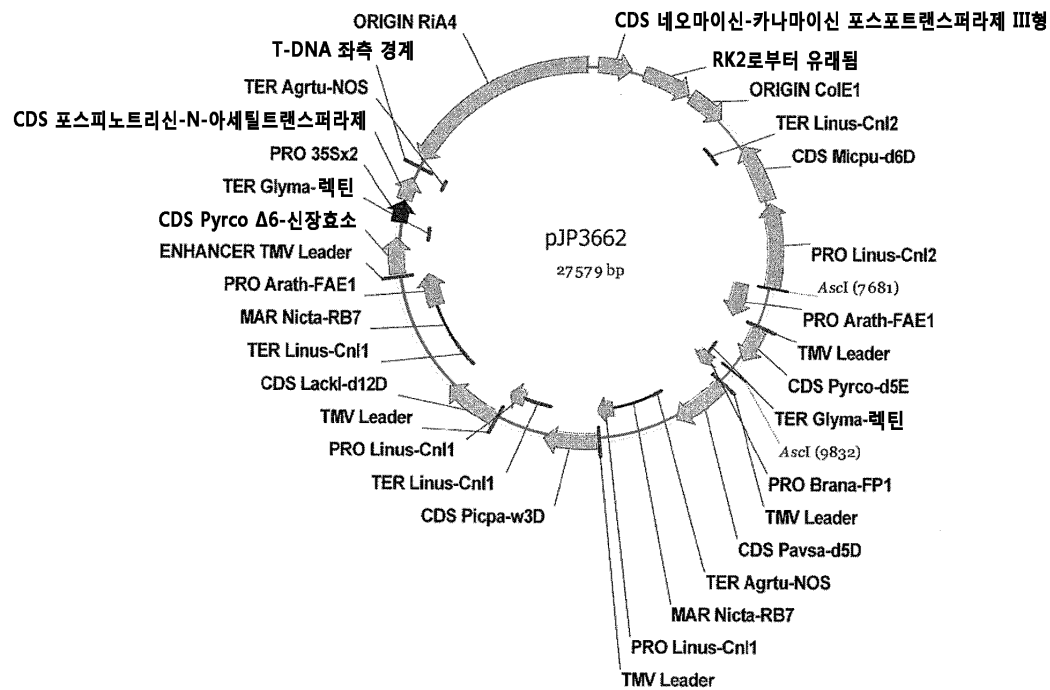
A)



B)



도면4



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Commonwealth Scientific and Industrial Research
Organisation
Grains Research and Development Corporation
Nuseed Pty Ltd
- <120> LIPID COMPRISING DOCOSAPENTAENOIC ACID
- <130> IPA161686-AU
- <150> AU 2014902471
- <151> 2014-06-27
- <150> AR 20140104761
- <151> 2014-12-18
- <150> PCT/AU2014/050433
- <151> 2014-12-18
- <150> US 14/575,756
- <151> 2014-12-18
- <160> 58
- <170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 21527

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pJP3416-GA7 nucleotide sequence.

<400> 1

tcctgtgggtt ggcatgcaca tacaatgga cgaacggata aaccttttca cgccctttta	60
aatatccgat tattctaata aacgctcttt tctcttaggt ttacccgcca atatatcctg	120
tcaaacactg atagttttaa ctgaaggcgg gaaacgacaa tctgctagt gatctcccag	180
tcacgacgtt gtaaacggg cgccccgcgg aaagcttgcg gccgcccgat ctagtaacat	240
agatgacacc gcgcgcgata atttacccta gtttgcgcgc tataatttgt tttctatcgc	300
gtattaaatg tataattgcg ggactctaata cataaaaacc catctcataa ataacgtcat	360
gcattacatg ttaattatta cgtgcttaac gtaattcaac agaaattata tgataatcat	420
cgcaagaccg gcaacaggat tcaatcttaa gaaactttat tgccaaatgt ttgaacgatc	480
ggcgcgcctc attagtgage cttctcagcc ttcccgtaa cgtagtagtg ctgtcccacc	540
ttatcaagggt tagagaaagt agccttccaa gcaccgtagt aagagagcac ctgttagttg	600
agtccccact tcttagcgaa aggaacgaat cttctgctaa cctcaggctg tctgaattga	660
ggcatatcag ggaagagggt gtggataacc tgacagttaa ggtatcccat aagccagttc	720
acgtatcctc tagaaggatc gatatcaacg gtgtgatcaa cagcgtagtt aaccaagaa	780
aggtgcttat cagatggaac aacagggagg tgagtatgag aagtagagaa gtgagcgaaa	840
aggtacatgt aagcgatcca gtttccgaaa gtgaaccacc agtaagcaac aggccaagag	900
tatccagtag caagcttgat aacagcgggt ctaacaacat gagaaacgag catccaagaa	960
gcctcttcgt agttcttctt acggagaact tgtctagggt ggagaacgta gatccagaaa	1020
gcttgaacaa gaagtcaga ggtaacagga acgaaagtcc aagcttgaag tctagcccaa	1080
gctctagaga atcctctagg tctgttatcc tcaacagcag tgttgaagaa agccacagca	1140
ggagtgggtat caagatccat atcgtgtcta accttttgag gggtagcatg gtgcttgta	1200
tgcatctggt tccacatctc accagaagta gaaagtccga atccacaagt catagcctga	1260
agtctcttgt ccacgtaaac agatccggtg agagagtat gtccaccctc atgttgaacc	1320
catccacatc tagctccgaa gaaagcaccg taaacaacag aagcaatgat agggatatcca	1380
gcgtacataa gagcagttcc aagagcgaat gtagcaagaa gctcgagaag tctgtaagcc	1440
acatgggtga tagaaggctt gaagaatcca tctctctcaa gctcagcacg ccatctagcg	1500

aaatcctcaa gcataggagc atcctcagac tcagatctct tgatctcagc aggtctagaa	1560
ggcaaagctc taagcatctt ccaagccttg agagaacgca tgtggaattc tttgaaagcc	1620
tcagtagcat cagcaccagt gttagcaagc atgtagaaga tcacagatcc accaggggtgc	1680
ttgaagttag tcacatcgta ctcaacgtcc tcaactctaa cccatctagt ctcgaaagta	1740
gcagcaagct catgaggctc aagagtctta agatcaacag gagcagtaga agcatcctta	1800
gcatcaagag cctcagcaga agatttagac ctggtaagtg gagatctagg agaagatctt	1860
ccatcagctt taggagggca catggtatgg taattgtaaa tgtaattgta atgttgtttg	1920
ttgtttgttg ttgttggtta ttgttgtaaa agatcctcgt gtatgttttt aatcttgttt	1980
glatcgtatga gttttggttt gagtaaagag tgaagcggat gagttaattt ataggctata	2040
aaggagattt gcatggcgat cacgtgtaat aatgcatgca cgcatgtgat tgtatgtgtg	2100
tgctgtgaga gagaagctct taggtgtttg aaggagtgta caagtggcga agaaaaacaa	2160
ttctccgagg ctgcatgcta tgtgtaacgt gtagctaatg ttctggcatg gcatcttatg	2220
aacgattctt tttaaaaaca aggtaaaaac ttaacttcat aaaattaaaa aaaaaaacgt	2280
ttactaagtt gggttaaaag gggatgagac tagtagattg gttggttggt ttccatgtac	2340
cagaaggctt accctattag ttgaaagtig aaactttgtt ccctactcaa ttccatgttg	2400
tgtaaatgta tgtatatgta atgtgtataa aacgtagtac ttaaatgact aggagtgggt	2460
cttgagaccg atgagagatg ggagcagaac taaagatgat gacataatta agaacgaatt	2520
tgaaaggctc ttaggtttga atcctattcg agaatgtttt tgtcaaagat agtggcgatt	2580
ttgaacaaa gaaaacattt aaaaaatcag tatccggtta cgttcatgca aatagaaagt	2640
ggtctaggat ctgattgtaa ttttagactt aaagagtctc ttaagattca atcctggctg	2700
tgtacaaaac tacaaataat atattttaga ctatttggcc ttaactaaac ttccactcat	2760
tatttactga ggtagagaa tagacttgcg aataaacaca ttcccgagaa atactcatga	2820
tcccataatt agtcagaggg tatgccaatc agatctaaga acacacattc cctcaaattt	2880
taatgcacat gtaatcatag tttagcaciaa ttcaaaaata atgtagtatt aaagacagaa	2940
attttaglac ttttttttgg cggttaaaaga agactaagtt tatacgtaca ttttatitta	3000
agtggaaaac cgaatttttc catcgaaata tatgaattta gtatatatat ttctgcaatg	3060
tactattttg ctattttggc aactttcagt ggactactac ttatttaciaa tgtgtatgga	3120
tgcagagatt tgagtataca catgtctaaa tgcagctttt gtaaaacgta acggaccaca	3180
aaagaggatc catacaata catctcatag ctctctccat tattttccga caciaaacaga	3240

gcattttaca acaattacca acaacaacaa acaacaaaca acattacaat tacatttaca 3300

attaccatac catggaattc gccagcctc ttgttgctat ggctcaagag caatacgtg 3360

ctatcgatgc tgttggtgct cctgctatct tctctgtac tgattctatc ggatggggac 3420

ttaagcctat ctcttctgct actaaggact tgcctcttgt tgagctctct acacctctca 3480

tcctttcttt gcttgcttac ttcgctatcg ttggatctgg actcgtttac agaaaggttt 3540

tccttagaac cgtgaaggga caagatccat tccttttgaa ggctcttatg ctgtctcaca 3600

acgtgttctt tatcggaatt tctctttaca tgtgcctcaa gcttgtgtac gaggcttacg 3660

ttaacaagta ctctttctgg ggaaacgctt acaaccctgc tcaaactgag atggctaagg 3720

ttatctggat ctctacgtg agcaagatct acgagttcat ggataccttc atcatgctcc 3780

tcaagggaaa tgtaaccag gttagcttcc ttcacgttta ccatcacgga tctatctctg 3840

gaatctgggt gatgattact tacgtctctc ctgggtggtga tgcctacttc tctgtctctc 3900

ttaactcttg gggtcacgtg tgtatgtaca cctactatct tatggctgcc gtgcttccca 3960

aggacgagaa aactaagaga aagtacctct ggtggggaag ataccttact caaatgcaga 4020

tgttccagtt ctcatgaac ctctccagg ctgtttacct tctctactct tcatctctt 4080

accctaagtt tatcgctcag ctctcgtgg tgtacatggg tactcttctc atgcttttcg 4140

gaaacttcta ctacatgaag caccacgcta gcaagtgatg aggcgcgccg ggccgccgcc 4200

atgtgacaga tcgaagggaag aaagtgtaat aagacgactc tcactactcg atcgctagtg 4260

attgtcattg ttatataata taatgttatc ttccacaact tatcgtaatg catgtgaaac 4320

tataacacat taatctact tgtcatatga taacactctc cccattttaa actcttgtea 4380

atttaagat ataagattct ttaaatgatt aaaaaaata tattataaat tcaatcactc 4440

ctactaataa attattaatt attatttatt gattaaaaaa atacttatac taatttagtc 4500

tgaatagaat aattagattc tagtctcatc cctttttaa ccaacttagt aaacgttttt 4560

ttttttaatt ttatgaagtt aagtttttac ctgttttta aaaagaatcg ttcataagat 4620

gccatgccag aacattagct acacgttaca catagcatgc agccgcggag aattgttttt 4680

cttcgccact tgcactccc ttcaaacacc taagagcttc tctctcacag cacacacata 4740

caatcacatg cgtgcatgca ttattacacg tgatgccat gcaaatctcc tttatagcct 4800

ataaattaac tcatccgctt cactctttac tcaaaccaaa actcatcgat acaacaaga 4860

ttaaaaacat acacgaggat cttttacaac aattaccaac aacaacaaac aacaacaac 4920

attacaatta catttacaat taccatacca tgcctccaag ggactcttac tcttatgctg 4980

ctcctccttc tgctcaactt cacgaagttg atactcctca agagcacgac aagaaagagc	5040
ttgttatcgg agatagggtt tacgatgtta ccaacttcgt taagagacac cctgggtgaa	5100
agatcattgc ttaccaagtt ggaactgatg ctaccgatgc ttacaagcag ttccatgtta	5160
gatctgctaa ggctgacaag atgcttaagt ctcttccttc tcgtcctgtt cacaagggat	5220
actctccaag aagggtgatg cttatcgctg atttccaaga gttaccaag caacttgagg	5280
ctgagggaat gttcgagcct tctcttcttc atgttgctta cagacttgct gaggttatcg	5340
ctatgcatgt tgctgggtgt gctcttatct ggcatggata cactttcgct ggaatcgcta	5400
tgcttggagt tggtcagga agatgtggat ggcttatgca tgagggtgga cattactctc	5460
tcactggaaa cattgctttc gacagagcta tccaagttgc ttgttacgga cttggatgtg	5520
gaatgtctgg tgcttgggtg cgtaaccagc ataacaagca ccatgctact cctcaaaagc	5580
ttcagcacga tgttgatctt gatacccttc ctctcgttgc tttccatgag agaatcgctg	5640
ctaaggttaa gtctcctgct atgaaggcct ggctttctat gcaagctaag cttttcgctc	5700
ctgttaccac tcttcttggt gctcttggat ggcatcttta ccttcacct agacacatgc	5760
tcaggactaa gcactacgat gagcttgcta tgctcggaat cagatcgga cttgttggat	5820
accttgcctgc taactacggt gctggatacg ttctcgcttg ttaccttctt tacgttcagc	5880
ttggagctat gtacatcttc tgcaacttcg ctgtttctca tactcacctc cctgttggtg	5940
agcctaagca gcatgctact tgggttgagt acgctgctaa ccacactact aactgttctc	6000
catcttgggt gtgtgattgg tggatgtctt accttaacta ccagatcgag caccaccttt	6060
acctttctat gcctcaattc agacacccta agatcgctcc tagagttaag cagcttttcg	6120
agaagcacgg acttcactac gatgttagag gatacttcca ggctatggct gatactttcg	6180
ctaaccttga taacgttgcc catgctcctg agaagaaaat gcagtaatga gatcgttcaa	6240
acatttggca ataaagtttc ttaagattga atcctgttgc cggctttgcg atgattatca	6300
tataatttct gtigaattac gttaagcacg taataattaa catgtaatgc atgacgttat	6360
ttatgagatg ggtttttatg attagagtc cgcaattata catttaatac gcgatagaaa	6420
acaaaatata gcgcgcaaac taggataaat tatcgcgcg cgtgtcatct atgttactag	6480
atcggtcgat taaaaatccc aattatattt ggtctaattt agtttggat tgagtaaaac	6540
aaattcgaac caaaccaaaa tataaatata tagtttttat atatatgcct ttaagacttt	6600
ttatagaatt ttctttaaaa aatatctaga aatatttgcg actcttctgg catgtaatat	6660
ttcgttaaat atgaagtgtt ccatttttat taactttaaa taattggttg tacgatcact	6720
ttcttatcaa gtgttactaa aatgcgtcaa tctctttgtt cttccatatt catatgtcaa	6780
aatctatcaa aattcttata tatctttttc gaatttgaag tgaaatttcg ataattttaa	6840

attaaataga acatatcatt atttaggtat catattgatt tttatactta attactaaat	6900
ttggttaact ttgaaagtg acatcaacga aaaattagtc aaacgactaa aataaataaa	6960
tatcatgtgt tattaagaaa attctcctat aagaatattt taatagatca tatgtttgta	7020
aaaaaaatta atttttacta acacatatat ttacttatca aaaatttgac aaagtaagat	7080
taaaataata ttcatctaac aaaaaaaaaa ccagaaaatg ctgaaaaccc ggcaaaaccg	7140
aaccaatcca aaccgatata gttggtttgg ttgattttg atataaacg aaccaactcg	7200
gtccatttgc acccctaate ataatagctt taatatttca agatattatt aagttaacgt	7260
tgtcaatate ctggaaattt tgcaaaatga atcaagccta tatggctgta atatgaattt	7320
aaaagcagct cgatgtgggt gtaatatgta atttacttga ttctaaaaaa atatccaag	7380
tattaataat ttctgctagg aagaagggtta gctacgattt acagcaaagc cagaatacaa	7440
agaaccataa agtgattgaa gctcgaaata tacgaaggaa caaatatttt taaaaaata	7500
cgcaatgact tggaacaaaa gaaagtata tttttttgt tcttaaaaa gcacccctc	7560
taaagaatgg cagttttcct ttgcatgtaa ctattatgct ccttcgtta caaaaatttt	7620
ggactactat tgggaacttc ttctgaaaat agtgatagaa cccacacgag catgtgcttt	7680
ccatttaatt ttaaaaaacca agaaacatac atacataaca ttccatcagc ctctctctct	7740
ttttattacg gttaatgact taaaacacat ctattatcc catcctaac acctagcagt	7800
gtctttatac gatctcatcg atcaccactt caaaaccatg cagactgctg ctgccctgg	7860
agctggcatc ggctaggctg ggtgccgcac tgtcccgaa ggtccctagc gacttgttta	7920
gattgatggg accacctctc aacttcctgc tgtgtccct gctgtggat gtccctgcctc	7980
atctggccga ttgcacgctc cagtcacctg catgtgact cgctcctcaa ttgcttaaga	8040
tcacgcagc agctatcgaa gtgctggctc tgttgcctc ctccacggcc ttggtttag	8100
tagtagctgc cgccgccctt ctggactttt tcccacagga accgccgaat aattcgatag	8160
aaccacaga gcatgtgctt tcatttattt taaaaacca gaaacataca taacatttca	8220
tcagcctctc tctctctctc tctctctctc tctctctctc tctctcttta	8280
ttacagctgt tacactaact taaaacacat tcatttcatt attattatta ttatecatec	8340
ttaacaccta gcagtgtctt tgtacgatct cataatcgat cacccttca tcaggtatcc	8400
ttaggettca ctccaacgtt gttgcagtta cggaacatgt acacaccatc atggttctca	8460
acgaactggc aagatctcca agttttccaa aggctaacc acatgttctc atcggtgtgt	8520
ctgtagtgct ctcccataac tttcttgatg cactcggtag cttctctagc atggtagaat	8580
gggatccttg aaacgtatgt atggagcaca tgagtctcga tgatgtcatg gaagatgatt	8640
ccgaggattc cgaactctct atcgatagta gcagcagcac ccttagcgaa agtccactct	8700

tgagcatcgt aatgaggcat agaagaatcg gtgtgctgaa ggaaggtaac gaaaacaagc	8760
cagtggttaa caaggatcca aggacagaac catgtgatga aagtaggcca gaatccgaaa	8820
accttgtaag cgggtgtaac agaagtgagg gtagcaagga ttccaagatc agaaagaacg	8880
atgtaccagt agtccttctt atcgaaaaca gggctagaag gccagtagtg agacttgaag	8940
aacttagaaa caccagggtg aggttgtcca gtagcgtag tagcaaggta aagagaaagt	9000
cctccaagct gttggaacaa gagagcgaaa acagagtaga taggagtttc ctcagcgata	9060
tcgtgaaggc tggtaacttg gtgcttctct ttgaattcct cggcgggtgta aggaacgaaa	9120
accatatctc tggtcatgtg tccagtagcc ttatggtgct tagcatgaga gaacttccag	9180
ctgaagtaag gaaccataac aagagagtgg agaaccatc caacgggtatc gttaacccat	9240
ccgtagttag agaaagcaga atgtccacac tcatgtccaa ggatccagat tccgaatccg	9300
aaacaagaga tagagaacac gtaagcagac caagcagcga atctaaggaa ttcgttaggg	9360
agaagaggga tgiaggtaag tccaacgtaa gcgatagcag agatagccac gatattcttc	9420
accacgtaag acatagactt cagcagagat ctctcgtaac agtgcttagg gatagcgta	9480
aggatatcct tgatggtgta atctggcacc ttgaaaacgt ttccgaaggt atcgatagcg	9540
gtcttttgct gcttgaaaga tgcaacgttt ccagaacgcc taacgggtctt agtagatccc	9600
tcaaggatct cagatccaga cacggtaac ttagacatgg tatggttaatt gtaaatgtaa	9660
ttgtaatggt gtttgttgtt tgttgttgtt ggtaattggt gtaaaatttt tggtagtgat	9720
tggttcttta aggtgtgaga gtgagttgtg agttgtgtgg tgggtttggt gagattgggg	9780
atggtgggtt tatatagtagg agactgagga atgggggtcgt gagtgttaac ttgcatggg	9840
ctacacgtgg gtctttttgg gcttacacgt agtattattc atgcaaatgc agccaataca	9900
tatacggtat ttaataatg tgtgggaata caatatgccg agtattttac taattttggc	9960
aatgacaagt gtacatttgg attatcttac ttggcctctc ttgctttaat ttggattatt	10020
tttattctct taccttggcc gttcatattc acatccctaa aggcaagaca gaattgaatg	10080
gtggccaaaa attaaaacga tggatatgac ctacatagtg taggatcaat taacgtcgaa	10140
ggaaaatact gattctctca agcatacgga caagggtaaa taacatagtc accagaacat	10200
aataaacaaa aagtcagaa gcaagactaa aaaaattagc tatggacatt caggttcata	10260
ttggaaacat cattatccta gtcttgtgac catcttctc cctgtcttag ttgagaggcc	10320
ttgggactaa cgagaggta gttgggatag cagatcctta tccaggacta gcctttctgg	10380
tgtttcagag tcttcgtgcc gccgtctaca tctatctcca ttaggtctga agatgactct	10440

tcacaccaac gacgtttaag gtctctatcc tactcctagc ttgcaatacc tggcttgcaa	10500
tacctggagc atcgtgcacg atgattggat actgtggagg aggagtgttt gctgatttag	10560
agctccccgt tgggtgattt gacttcgatt tcagtttagg cttgttgaaa tttttcaggt	10620
tccattgtga agcctttaga gcttgagcct ccttccatgt taatgccttg atcgaatact	10680
cctagagaaa agggaagtcg atctctgagt attgaaatcg aagtgcacat ttttttcaa	10740
cgtgtccaat caatccacaa acaaagcaga agacaggtaa tctttcatac ttatactgac	10800
aagtaatagt ctiaccgtca tgcataataa cgtctcgttc cttcaagagg ggttttccga	10860
catccataac gaccgaagc ctcatgaaag cattagggaa gaacttttgg ttcttcttgt	10920
catggccttt ataggtgtca gccgagctcg ccaattcccg tccgactggc tccgcaaat	10980
attcgaacgg caagttatgg acttgcaacc ataactccac ggtattgagc aggacctatt	11040
gtgaagactc atctcatgga gcttcagaat gtggttgtca gcaaaccaat gaccgaaatc	11100
catcacatga cggagctcca gtgggtgagc gaaacgaaac aggaagcgcc tatctttcag	11160
agtcgtgagc tccacaccgg attccggcaa ctacgtgttg ggcaggcttc gccgtattag	11220
agatatgttg aggcagaccc atctgtgcca ctcgtaaat tacgagagtt gtttttttg	11280
tgattttcct agtttctcgt tgatggtagc ctcatattct acatcgtagt gtctctcaac	11340
gtcgtttcct gtcactgat atcccgtcat ttgcatccac gtgcgccgcc tcccgtgcca	11400
agtccttagg tgcactgac gccaaattgg tgggtgtgag ggctgccctg tgctttctac	11460
cgatgggtgg aggttgagtt tgggggtctc cgcggcgatg gtagtgggtt gacggtttgg	11520
tgtgggttga cggcattgat caatttactt cttgcttcaa attctttggc agaaaacaat	11580
tcattagatt agaactggaa accagagtga tgagacggat taagtcagat tccaacagag	11640
ttacatctct taagaaataa tgtaaccctt ttagacttta tatatttgca attaaaaaa	11700
taatttaact tttagacttt atatatagtt ttaataacta agtttaacca ctctattatt	11760
tatatgaaa ctatttgtat gtctccctc taaataaact tggatttgtg ttacagaac	11820
ctataatcaa ataactaata ctcaactgaa gtttgtgcag ttaattgaag ggattaacgg	11880
ccaaatgca ctagtattat caaccgaata gattcacact agatggccat ttccatcaat	11940
atcatcgccg ttcttcttct gtccacatat cccctctgaa acttgagaga cacctgcact	12000
tcattgtcct tattacgtgt taaaaatga aacctatgca tccatgcaa ctgaagaatg	12060
gcgaagaac ccttccctc catttcttat gtggcgacca tccatttcac catctccgc	12120
tataaaacac ccccatcact tcacctagaa catcatcact acttgcttat ccatccaaaa	12180
gataccact tttacaacia ttaccaacaa caacaacaa caaacaacat tacaattaca	12240
ttacaatta ccataccatg ccacctagcg ctgctaagca aatgggagct tctactggtg	12300

ttcatgctgg tgttactgac tcttctgcit tcaccagaaa ggatgttgct gatagacctg	12360
atctcacat cgttggagat tctgtttacg atgctaaggc tttcagatct gagcatcctg	12420
gtgggtctca tttcgtttct ttgttcggag gaagagatgc tactgaggct ttcattggaat	12480
accatagaag ggcttggcct aagtctagaa tgtctagatt ccacgttggg tctcttgctt	12540
ctactgagga acctgttgct gctgatgagg gataccttca actttgtgct aggatcgcta	12600
agatgggtgcc ttctgtttct tctggattcg ctctgcttc ttactgggtt aaggctggac	12660
ttatccttgg atctgctatc gctcttgagg cttacatgct ttacgttggg aagagacttc	12720
tccctcttat cgttcttggg tggcttttcg ctcttatcgg tcttaacatc cagcatgatg	12780
ctaaccatgg tgctttgtct aagtctgcit ctgttaacct tgctcttggg ctttgcagg	12840
attggatcgg aggatctatg atcctttggc ttcaagagca tgttgttatg caccacctcc	12900
acactaacga tgttgataag gatcctgatc aaaaggctca cgggtgctctt agactcaagc	12960
ctactgatgc ttggtcacct atgcattggc ttcagcatct ttaccttttg cctgggtgaga	13020
ctatgtacgc tttcaagctt ttgttctcgc acatctctga gcttgttatg tggcgttggg	13080
agggtgagcc tatctctaag cttgtctggat acctctttat gccttctttg cttctcaagc	13140
ttaccttctg ggctagattc gttgttttgc ctctttacct tgctccttct gttcatactg	13200
ctgtgtgtat cgtctctact gttatgactg gatctttcta cctcgttttc ttcttcttca	13260
tctcccacaa cttcgagggt gttgttctg ttggacctga tggatctatc acttctatga	13320
ctagagggtc tagcttctct aagagacaag ctgagacttc ttctaactgt ggaggacctc	13380
ttcttgctac tcttaacggt ggactcaact accaaattga gcatcacttg ttccctagag	13440
ttcacatgg attctacct agacttgctc ctcttgtaa ggctgagctt gaggctagag	13500
gaatcgagta caagcactac cctactatct ggtctaacct tgcttctacc ctgagacata	13560
tgtacgtctt tggaagaagg cctagatcta aggctgagta atgacaagct tatgtgacgt	13620
gaaataataa cggtaaaata tatgtaataa taataataat aaagccacaa agtgagaatg	13680
aggggaaggg gaaatgtgta atgagccagt agccgggtgt gctaattttg tatcgtattg	13740
tcaataaate atgaattttg tggtttttat gtgttttttt aaatcatgaa ttttaaat	13800
tataaaataa tctccaatcg gaagaacaac attccatata catgcatgga tgtttcttta	13860
cccaaatcta gttcttgaga ggatgaagca tcaccgaaca gttctgcaac tatccctcaa	13920
aagctttaaa atgaacaaca aggaacagag caacgttcca aagatcccaa acgaaacata	13980
ttatctatac taatactata ttattaatta ctactgcccg gaatcacaat ccctgaatga	14040
ttctatttaa ctacaagcct tgttggcggc ggagaagtga tcggcgcggc gagaagcagc	14100
ggactcggag acgaggcctt ggaagatctg agtcgaacgg gcagaatcag tattttcctt	14160

cgacgttaat tgatcctaca ctatgtaggt catatccatc gttttaattt ttggccacca	14220
ttcaattctg tcttgccttt agggatgtga atatgaacgg ccaaggtaag agaataaaaa	14280
taatccaaat taaagcaaga gaggccaagt aagataatcc aaatgtacac ttgtcattgc	14340
caaaattagt aaaatactcg gcatattgta ttccacaca ttattaaaat accgtatatg	14400
tattggctgc atttgcata ataatactac gtgtaagccc aaaagaaccc acgtgtagcc	14460
catgcaaagt taacactcac gacccattc ctcagtctcc actatataaa cccaccatcc	14520
ccaatctcac caaaccacc acacaactca caactcactc tcacacctta aagaaccaat	14580
caccacaaa aattttacaa caattacaa caacaacaaa caacaacaa cattacaatt	14640
acatttacia ttaccatacc atgagcgtcg ttaccgttac tggatctgat cctaagaaca	14700
gaggatcttc tagcaacacc gagcaagagg ttccaaaagt tgctatcgat accaacggaa	14760
acgtgttctc tgttctgat ttaccatca aggacatcct tggagctatc cctcatgagt	14820
gttacgagag aagattggct acctctctct actacgtgtt cagagataac ttctgcatgc	14880
ttaccaccgg ataccttacc cataagatcc ttaccctct cctcatctct tacacctcta	14940
acagcatcat caagtctact ttctgggccc tttaactta cgttcaagga cttttcgaa	15000
ccggaatctg ggttctcgct catgagtgtg gacatcaagc tttctctgat tacggaatcg	15060
tgaacgattt cgttggatgg acccttact cttacctat ggttccttac ttcagctgga	15120
agtactctca tggaagcac cataaggcta ctggacacat gaccagagat atggttttcg	15180
ttctgccac caaagaggaa ttcaagaagt cttagaactt cttcggtaac ctgctgagt	15240
actctgagga ttctccactt agaacccttt acgagcttct tgttcaacaa cttggaggat	15300
ggatcgctta cctcttcgtt aacgttacag gacaacctta cctgatgtt ccttcttga	15360
aatggaacca cttctggctt acctctccac tttcgagca aagagatgct cttacatct	15420
tcctttctga tcttgaatc ctcaccagg gaatcgttct tactctttgg tacaagaaat	15480
tcggaggatg gtccttttc atcaactggi tcgttcctta catctgggtt aaccactggc	15540
tcgttttcat cacattcctt cagcacactg atcctactat gcctcattac aacgtgagg	15600
aatggacttt cgtaagggt gctgctgcta ctatcgatag aaagttcgga ttcacggac	15660
ctcacatctt ccatgatatc atcgagactc atgtgcttca ccactactgt tctaggatcc	15720
cattctacia cgctagacct gcttctgagg ctatcaagaa agttatggga aagcactaca	15780
ggtctagcga cgagaacatg tggaagtcac tttggaagtc tttcaggtct tgccaatacg	15840
ttgacggtga taacggtgtt ctcatgttcc gtaacatcaa caactgcgga gttggagctg	15900

ctgagaagta atgaaggggt gatcgattat gagatcgtag aaagacactg ctaggtgtta	15960
aggatggata ataataataa taatgagatg aatgtgtttt aagttagtgt aacagctgta	16020
ataaagagag agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag agagaggctg	16080
atgaaatgtt atgtatgttt cttaggttttt aaaataaatg aaagcacatg ctctgtgtgt	16140
tctatcgaat tattcggcgg ttctgtggg aaaaagtcca gaaggccgc cgcagctact	16200
actacaacca aggccgtgga ggagggaac agagccagca cttcgatagc tgctgcgatg	16260
atcttaagca attgaggagc gagtgcacat gcaggggact ggagcgtgca atcggccaga	16320
tgaggcagga catccagcag caggacagc agcaggaagt tgagaggtgg tcccatcaat	16380
ctaaacaagt cgtagggac ctccgggac agtgcggcac ccagcctagc cgatgccagc	16440
tccaggggca gcagcagctt gcatggtttt gaagtgtgga tcgatgagat cgtataaaga	16500
cactgctagg tgtaaggat gggataataa gatgtgtttt aagtcattaa ccgtaataaa	16560
aagagagaga ggctgatgga atgttatgta tgtatgtttc ttggttttta aaattaatg	16620
gaaagcacat gctcgtgtgg gttctatctc gattaaaaat cccaattata ttgtgtctaa	16680
tttagtttg tattgagtaa aacaaattcg aaccaaacca aaatataaat atatagtttt	16740
tatatatatg ccttaagac ttttataga attttctta aaaaatatct agaaatattt	16800
gcgactcttc tggcatgtaa tatttcgtta aatatgaagt gctccatttt tattaacttt	16860
aaataattgg ttgtacgac actttcttat caagtgttac taaaatgcgt caatctcttt	16920
gttcttccat attcatatgt caaaatctat caaaattctt atatatcttt ttcgaatttg	16980
aagtgaatt tcgataattt aaaattaat agaacatc attatttagg tatcatattg	17040
atttttatc ttaattacta aatttggtta actttgaaag tgtacatcaa cgaaaaatta	17100
gtcaaagcgc taaaataaat aaatatcatg tgttattaag aaaattctcc tataagaata	17160
ttttaataga tcatatgttt gtaaaaaaaaa ttaattttta ctaacacata tatttactta	17220
tcaaaaattt gacaaagtaa gattaaaata atattcatct aacaaaaaaaa aaaccagaaa	17280
atgctgaaaa cccggcaaaa ccgaaccaat ccaaaccgat atagttggtt tggtttgatt	17340
ttgatataaa ccgaaccaac tcggtccatt tgcacccta atcataatag cttaaatatt	17400
tcaagatatt attaaagtta cgttgtcaat atcctggaaa ttttgcaaaa tgaatcaagc	17460
ctatatggct gtaatatgaa tttaaaagca gctcgatgtg gtggtaatat gtaatttact	17520
tgattctaaa aaaatatccc aagtattaat aatttctgct aggaagaagg ttagctacga	17580
tttacagcaa agccagaata caaagaacca taaagtgatt gaagctcgaa atatacgaag	17640
gaacaaatat ttttaaaaaa atacgcaatg acttggaaca aaagaaagt atatatTTTT	17700
tgttcttaaa caagcatccc ctctaaagaa tggcagtttt cctttgcatg taactattat	17760

gtcccttcg ttacaaaaat ttggactac tattgggaac ttcttctgaa aatagtcctg	17820
caggctagta gattggttgg ttggtttcca tgtaccagaa ggcttacct attagttaa	17880
agttgaaact ttgttccta ctcaattcct agttgtgtaa atgtatgtat atgtaatgtg	17940
tataaaacgt agtacttaaa tgactaggag tggttcttga gaccgatgag agatgggagc	18000
agaactaaag atgatgacat aattaagaac gaatttgaaa ggctcttagg ttgaaatcct	18060
attcgagaat gttttgtca aagatagtgg cgattttgaa ccaaagaaaa catttaaaaa	18120
atcagtatcc ggttacgttc atgcaaatag aaagtggctc aggatctgat tgtaatttta	18180
gacttaaga gtctcttaag attcaatcct ggctgtgtac aaaactacaa ataatatatt	18240
ttagactatt tggccttaac taaacttcca ctcatattt actgaggta gagaatagac	18300
ttgcgaataa acacattccc gagaaatact catgatccca taattagtca gagggtatgc	18360
caatcagatc taagaacaca cattccctca aattttaatg cacatgtaat catagtttag	18420
cacaattcaa aaataatgta gtattaaaga cagaaatttg tagacttttt ttggcggtta	18480
aaagaagact aagttttatc gtacatttta ttttaagtgg aaaaccgaaa tttccatcg	18540
aaatatatga atttagtata tatatttctg caatgtacta ttttgctatt ttggcaactt	18600
tcagtggact actactttat tacaatgtgt atggatgcat gagtttgagt atacacatgt	18660
ctaaatgcat gctttgtaaa acgtaacgga ccacaaaaga ggatccatac aaatacatct	18720
catagcttcc tccattattt tccgacacaa acagagcatt ttacaacaat taccaacaac	18780
aacaacaac aaacaacatt acaattacat ttacaattac cataccatgg cctctatcg	18840
tatccctgct gctcttctg gaactcttgg atacgttacc tacaatgtgg ctaaccctga	18900
tatcccagct tcigagaaag ttcttgctta ctcatgcag gttgagtact ggggacctac	18960
tatcggaact attggatacc tctcttcat ctacttcgga aagcgtatca tgcagaacag	19020
atctcaacct ttcggaactc agaacgctat gctcgtttac aacttctacc agaccttctt	19080
caacagctac tgcacttacc ttttcgttac ttctcatagg gctcaggac ttaaggtttg	19140
gggaaacatc cctgatatga ctgctaactc ttggggaatc tctcaggta tctggcttca	19200
ctacaacaac aagtacgttg agcttctcga caccttcttc atggtgatga ggaagaagtt	19260
cgaccagctt tctttccttc acatctacca ccacactctt ctcatctggt catggttcgt	19320
tgttatgaag cttgagcctg ttggagattg ctacttcgga tcttctgtta acaccttcgt	19380
gcacgtgac atgtactctt actacggact tgctgctctt ggagttaact gtttctggaa	19440
gaagtacatc acccagatcc agatgcttca gttctgtatc tgtgcttctc actctatcta	19500
caccgcttac gttcagaata ccgctttctg gcttcttacc cttcaactct gggttatggt	19560
gaacatgttc gttctcttcg ccaacttcta ccgtaagagg tacaagtcta agggtgctaa	19620

gaagcagtga taagggccgc cgccatgtga cagatcgaag gaagaaagtg taataagacg	19680
actctcacta ctcgatcgct agtgattgtc attgttatat ataataatgt tatctttcac	19740
aacttatcgt aatgcatgtg aaactataac acattaatcc tacttgtcat atgataaacac	19800
tctccccatt taaaactctt gtcaatttaa agatataaga ttcittaaat gattaaaaaa	19860
aatatattat aaattcaatc actcctacta ataaattatt aattattatt tattgattaa	19920
aaaaatactt atactaatit agtctgaata gaataattag attctagcct gcagggcggc	19980
cgcggatccc atggagtcaa agattcaaat agaggaccta acagaactcg ccgtaagac	20040
tggcgaacag ttcatacaga gtctcttacg actcaatgac aagaagaaaa tcttcgtcaa	20100
catgggtggag caccgacacac ttgtctactc caaaaatatac aaagatacag tctcagaaga	20160
ccaaagggca attgagactt ttcaacaaag ggtaatatcc ggaaacctcc tcggattcca	20220
ttgccagct atctgtcact ttattgtgaa gatagtggaa aaggaagggtg gctcctacaa	20280
atgccatcat tgcgataaag gaaaggccat cgttgaagat gcctctgccg acagtgggtcc	20340
caaagatgga cccccacca cgaggagcat cgtggaaaaa gaagacgttc caaccacgtc	20400
ttcaaagcaa gtggattgat gtgatatctc cactgacgta agggatgacg cacaatccca	20460
ctatccttcg caagaccctt cctctatata aggaagtcca tttcatttgg agagaacacg	20520
ggggactgaa ttaaatatga gccctgagag gcgtcctgtt gaaatcagac ctgctactgc	20580
tgctgatatg gctgctgttt gtgatatcgt gaaccactac atcgagactt ctaccgttaa	20640
cttcagaact gagcctcaaa ctctcaaga gtggatcgat gatcttgaga gactccaaga	20700
tagataccct tggcttgttg ctgaggttga ggggtgtgtt gctggaatcg cttacgtgg	20760
accttgaag gctagaaacg cttacgattg gactgttgag tctaccgttt acgtttcaca	20820
cagacatcag agacttggac ttggatctac cctttacact caccttctca agtctatgga	20880
agctcagga ttcaagtctg ttgttgctgt tateggactc cctaacgac cttctgttag	20940
acttcatgag gctcttggat acactgctag aggaactctt agagctgctg gatacaagca	21000
cgggtggatg catgatgtg gattctggca aagagatttc gagcttctg ctctcctag	21060
acctgttaga ccagttactc agatctgaat ttgcgtgac gttcaaacaat ttggcaataa	21120
agtttcttaa gattgaatcc tgttgccgtt cttgcgatga ttatcatata atttctgttg	21180
aattacgtta agcatgtaat aattaacatg taatgcatga cgttatttat gagatgggtt	21240
tttatgatta gagtcccga attatacatt taatacgcga tagaaaacaa aatatagcgc	21300
gcaaactagg ataaattatc gcgcgcggtg tcacttatgt tactagatca ctagtgatgt	21360

acggttaaaa ccacccagct acattaaaaa cgtccgcaat gtgttattaa gttgtctaag 21420
 cgtcaatttg ttacaccac aatatatcct gccaccagcc agccaacagc tccccgaccg 21480
 gcagctcggc acaaaatcac cactcgatac aggagccca tcagtcc 21527

<210> 2
 <211> 23512
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pGA7- mod_B nucleotide sequence
 <400> 2

tcctgtgggt ggcatgcaca tacaatgga cgaacggata aaccttttca cgccctttta 60
 aatatccgat tattctaata aacgctcttt tctcttaggt ttaccgcca atatatcctg 120
 tcaaactg atagttttaa ctgaaggcgg gaaacgacaa tctgctagt gatctcccag 180

tcacgacgtt gtaaacggg cgccccgcgg aaagcttgcg gccgcggtac cgcccggttcg 240
 actcagatct tccaaggcct cgtctccgag tccgtgctt ctgccgcgc cgatcacttc 300
 tccgcgcca acaaggcttg tagttaatag gaatcattca gggattgtga ttccgggcag 360
 tagtaattaa taatatagta ttagtataga taatatgtt cgtttgggat ctttggaacg 420
 ttgctctgtt cttgttgtt cattttaaag cttttgagg atagttgcag aactgttcgg 480
 tgatgcttca tcctctcaag aactagattt gggtaaagaa acatccatgc atggatatgg 540
 aatgttggtc ttccgattgg agattatttt ataaaattta aaattcatga tttaaaaaaa 600

cacataaaaa ccacaaaatt catgatttat tgacaatacg atacaaaatt agcaccaccg 660
 gctactggct cattacacat tcccccttc cctcattctc actttgtggc ttattatta 720
 ttattattac atatatatta ccgttattat ttcacgtcac ataagcttgt taattaatca 780
 ttagtgagcc ttctcagcct ttccgttaac gtagtagtgc tgtccacct tatcaaggtt 840
 agagaaagta gccttcaaag caccgtagta agagagcacc ttgtagttga gtccccactt 900
 cttagcgaaa ggaacgaatc ttctgctaac ctgagctgt ctgaattgag gcataatcagg 960
 gaagagggtg tggataacct gacagttaag gtatccata agccagttca cgtatcctct 1020

agaaggatcg atatcaacgg tgtgatcaac agcgtagtta acccaagaaa ggtgcttatac 1080
 agatggaaca acaggagggt gagtatgaga agtagagaag tgagcgaaaa ggtacatgta 1140
 agcgatccag ttccgaaag tgaaccacca gtaagcaaca ggccaagagt atccagtagc 1200
 aaagctgata acagcggttc taacaacatg agaaacgagc atccaagaag cctcttcgta 1260
 gtctctctta cggagaactt gtctagggtg gagaacgtag atccagaaag cttgaacaag 1320
 aagtccagag gtaacaggaa cgaaagtcca agcttgaagt ctagcccaag ctctagagaa 1380

tcctctaggt ctgttatcct caacagcagt gttgaagaaa gccacagcag gagtggatc	1440
aagatccata tcgtgtctaa ccttttgagg ggtagcatgg tgcttggtat gcatctggtt	1500
ccacatctca ccagaagtag aaagtccgaa tccacaagtc atagcctgaa gtctcttgtc	1560
cacgtaaaca gatccggtaa gagagttaig tccaccctca tgttgaacct atccacatct	1620
agtcctgaag aaagcaccgt aaacaacaga agcaatgata gggtatccag cgtacataag	1680
agcagttcca agagcgaatg tagcaagaag ctcgagaagt ctgtaagcca catgggtgat	1740
agaaggcttg aagaatccat ctctctcaag ctcagcacgc catctagcga aatcctcaag	1800
cataggagca tctcagact cagatctctt gatctcagca ggtctagaag gcaaagctct	1860
aagcatcttc caagccttga gagaacgcat gtggaattct ttgaaagcct cagtagcatc	1920
agcaccagtg ttagcaagca tgtagaagat cacagatcca ccagggtgct tgaagttagt	1980
cacatcgta ccaagctcct caactctaac ccatctagtc tcgaaagtag cagcaagctc	2040
atgaggctca agagtcttaa gatcaacagg agcagtagaa gcatccttag catcaagagc	2100
ctcagcagaa gatttagacc tggtaagtgg agatctagga gaagatcttc catcagctct	2160
aggagggcac atggtatggt aattgtaaat gtaattgtaa tgttgtttgt tgtttgttgt	2220
tgttggtaat tgttgtaaaa ttaattaagt gggatctctt tggatggata agcaagtagt	2280
gatgatgttc taggtgaagt gatgggggtg ttttatagcg ggagatggtg aaatggatgg	2340
tcgccacata agaaatggag gggaagggtt cttgcgcat tcttcagttt gcatggatgc	2400
atgggtttca ttttgtaaca cgtaataagg acaatgaagt gcaggtgtct ctcaagtttc	2460
agaggggata tgtggacaga agaagaacgg cgatgatatt gatggaaatg gccatctagt	2520
gtgaatctat tcggttgata atactagtgc attttgccg ttaatccctt caattaactg	2580
cacaaacttc agttgagat tgaattttg attataggtt ctgtaaacac aataccaagt	2640
ttatttagag gggagacata caaatagttt cgatataaat aatagagtgg ttaaaacttag	2700
ttattaaaac tatatataaa gtctaaaagt taaattatth ttttaattgc aaatatataa	2760
agtctaaagg ggttacatta tttcttaaga gatgtaactc tgttggaatc tgacttaatc	2820
cgtctcatca ctctggtttc cagttctaata ctaatgaatt gttttctgcc aaagaatttg	2880
aagcaagaag taaattgac aatgccgtca acccacacca aaccgtcaac ccaactacat	2940
cgccgcggag acccccaaac tcaacctcca cccatcggtg agaagcacag ggcagcccg	3000
accaccacca atttggcgtg catgacacct agggacttgg cacgggaggc ggcgcacgtg	3060
gatgcaaatg acgggatatc agatgacagg aaacgacgtt gagagacat acgatgtaga	3120

atatgagctc accatcaacg agaaactagg aaaatcacia aaaaaacaac tctcgtaatt	3180
giacgagtgg cacagatggg tctgcctcaa catatctcta atacggcgaa gcctgccccaa	3240
cacgtagttg ccggaatccg gtgtggagct cagcactctg aaagataggc gcttcctgtt	3300
tcgtttcgct caccactgg acgtccgtca tgtgatggat ttcggtcatt ggtttgciga	3360
caaccacatt ctgaagctcc atgagatgag tcttcacaat aggtcctgct caataccgtg	3420
gagttatggt tgcaagtcca taacttgccg ttcgaatatt ttgcggagcc agtcggacgg	3480
gaattggcga gctcggctga cacctataaa ggccatgaca agaagaacca aaagtcttc	3540
cctaattgctt tcatgaggtc tcgggtcggt atggatgtcg gaaaaccctt ctgaaggaa	3600
cgagacgtta ttatgcatga cggtaagact attacttgct agtataagta tgaaagatta	3660
cctgtcttct gctttgtttg tggattgatt ggacacgttg aaaaaaatg tgcacttcga	3720
tttcaatact cagagatcga cttccctttt ctctaggagt attcgatcaa ggcattaaca	3780
tggaaggaag ctcaagctct aaaggcttca caatggaacc tgaaaaattt caacaagcct	3840
aaactgaaat cgaagtcaaa tcaccaacc gggagctcta aatcagcaaa cactcctcct	3900
ccacagtatc caatcatcgt gcacgatgct ccaggatatt caagccaggt attgcaagct	3960
aggagtagga tagagacctt aaacgtcggt ggtgtgaaga gtcacttca gacctaattg	4020
agatagatgt agacggcggc acgaagactc tgaaacacca gaaaggctag tccaggataa	4080
ggatctgcta tcccaactga cctctcggtt gtcccaaggc ctctcaacta gagcaggagg	4140
aaggatggtc acaagactag gataatgatg tttccaatat gaacctgaat gtccatagct	4200
aattttttta gtcttgcttc tgcacttttt gtttattatg ttctgggtgac tatgttattt	4260
acccttgctc gtatgcttga gggtagccta gtagattggt tggttgggtt ccatgtacca	4320
gaaggcttac cctattagtt gaaagttgaa actttgttcc ctactcaatt cctagtgtg	4380
taaatgtatg tatatgtaat gtgtataaaa cgtagtactt aaatgactag gagtggttct	4440
tgagaccgat gagagatggg agcagaacta aagatgatga cataattaag aacgaatttg	4500
aaaggctctt aggtttgaat cctattcgag aatgtttttg tcaaagatag tggcgatttt	4560
gaaccaaaaga aaacatttaa aaaatcagta tccggttacg ttcatgcaaa tagaaagtgg	4620
tctaggatct gattgtaatt ttagacttaa agagtctctt aagattcaat cctggctgtg	4680
tacaaaacta caaataatat attttagact atttggcctt aactaaactt ccactcatta	4740
tttactgagg ttagagaata gacttgcgaa taaacacatt cccgagaaat actcatgatc	4800
ccataattag tcagagggtg tgccaatcag atctaagaac acacattccc tcaaatttta	4860
atgcacatgt aatcatagtt tagcacaatt caaaaataat gtagtattaa agacagaaat	4920
ttgtagactt ttttttggcg ttaaaagaag actaagttaa tacgtacatt ttattttaag	4980

tgaaaaaccg aaattttcca tcgaaatata tgaatttagt atatataatt ctgcaatgta	5040
ctattttgct attttggcaa ctttcagtgg actactactt tattacaatg tgtatggatg	5100
catgagtttg agtatacaca tgtctaaatg catgctttgt aaaacgtaac ggaccacaaa	5160
agaggatcca tacaatatata tctcatagct tcttccatta ttttccgaca caaacagagc	5220
attttacaac aattaccaac aacaacaaac aacaaacaac attacaatta catttacaat	5280
taccatacca tggcctctat cgctatccct gctgctcttg ctggaactct tggatacgtt	5340
acctacaatg tggctaaccg tgatatccca gcttctgaga aagttcctgc ttacttcatg	5400
caggttgagt actggggacc tactatcgga actattggat acctcctctt catctacttc	5460
ggaaagcgta tcatgcagaa cagatctcaa cctttcggac tcaagaacgc tatgctcggt	5520
tacaacttct accagacctt cttcaacagc tactgcatct accttttcgt tacttctcat	5580
agggctcagg gacttaaggt ttgggggaaac atccctgata tgactgctaa ctcttgggga	5640
atctctcagg ttatctggct tcaactacaac aacaagtagc ttgagcttct cgacaccttc	5700
ttcatgggtga tgaggaagaa gttagaccag ctttctttcc ttacatcta ccaccacact	5760
cttctcatct ggtagtggtt cggttgtatg aagcttgagc ctgttggaga ttgctacttc	5820
ggatcttctg ttaacacctt cgtgcacgtg atcatgtact cttactacgg acttgctgct	5880
cttggagtta actgtttctg gaagaagtac atcaccaga tccagatgct tcagtctgt	5940
atctgtgctt ctactctat ctacaccgct tacgttcaga ataccgctt ctggcttctt	6000
taccttcaac tctgggttat ggtgaacatg ttctgttctt tgcaccaatt ctaccgtaag	6060
aggtacaagt ctaaggggtg taagaagcag tgataaggcg cgcgcgcgcg cgggcccgcg	6120
ccatgtgaca gatcgaagga agaaagtga ataagacgac tctcactact cgatcgctag	6180
tgattgtcat tgttatafat aataatgtta tctttcaca cttatcgtaa tgcattgaa	6240
actataacac attaatccta cttgtcatat gataacactc tcccattta aaactctgt	6300
caatttaag atataagatt ctttaaatga ttaaaaaaa tatattataa attcaatcac	6360
tcctactaat aaattattaa ttattattta ttgattaaaa aaatacttat actaatttag	6420
tctgaataga ataattagat tctagtctca tcccctttta aaccaactta gtaaacgttt	6480
ttttttttaa ttttatgaag ttaagttttt acctgtttt taaaaagaat cgttcataag	6540
atgccatgcc agaaccatag ctacacgtta cacatagcat gcagccgagg agaattgttt	6600
ttcttcgcca ctgtcactc ctttcaaca cctaagagct tctctctcac agcacacaca	6660
tacaatcaca tgcgtgcatg cattattaca cgtgatcgcc atgcaaatct cttttatagc	6720
ctataaatta actcatccgc ttactctttt actcaaacca aaactcatcg atacaaacaa	6780
gattaaaaac atacacgagg atcttttaca acaattacca acaacaaca acaacaaca	6840

acattacaat tacatttaca attaccatac catgcctcca agggactctt actcttatgc 6900

tgctcctcct tctgctcaac ttcacgaagt tgatactcct caagagcacg acaagaaaga 6960

gcttggtatc ggagataggg cttacgatgt taccaacttc gttaagagac accctgggtg 7020

aaagatcatt gcttaccaag ttggaactga tgctaccgat gcttacaagc agttccatgt 7080

tagatctgct aaggctgaca agatgcttaa gtctcttctt tctcgtctcg ttcacaaggg 7140

atactctcca agaagggtcg atcttatcgc tgatttccaa gagttcacca agcaacttga 7200

ggctgaggga atgttcgagc cttctcttcc tcatgttgct tacagacttg ctgaggttat 7260

cgctatgcat gttgctgggtg ctgctcttat ctggcatgga tacactttcg ctggaatcgc 7320

tatgcttggg gtgttcagg gaagatgtgg atggcttatg catgagggtg gacattactc 7380

tctcactgga aacattgctt tcgacagagc tatccaagtt gcttggttacg gacttggatg 7440

tggaatgtct ggtgcttggg ggcgtaacca gcataacaag caccatgcta ctctcaaaa 7500

gcttcagcac gatgttgatc ttgataccct tcctctcggt gctttccatg agagaatcgc 7560

tgctaagggt aagtctcctg ctatgaaggc ttggctttct atgcaagcta agcttttcgc 7620

tcctgttacc actcttcttg ttgctcttgg atggcagctt taccttcac ctagacacat 7680

gctcaggact aagcactacg atgagcttgc tatgctcgga atcagatacg gacttgttgg 7740

ataccttgc gctaactacg gtgctggata cgttctcgct tgttaccttc ttacgttca 7800

gcttggagct atgtacatct tctgcaactt cgtgtttct catactcacc tccctgttgt 7860

tgagcctaac gagcatgcta cttgggttga gtacgtgct aaccacacta ctaactgttc 7920

tccatcttgg tgggtgtgatt ggtggatgtc ttaccttaac taccagatcg agcaccacct 7980

ttaccttct atgcctcaat tcagacaccc taagatcgct cctagagtta agcagctttt 8040

cgagaagcac ggacttcact acgatgttag aggatacttc gaggctatgg ctgatacttt 8100

cgctaacctt gataacgttg cccatgctcc tgagaagaaa atgcagtaat gagatcgttc 8160

aaacatttgg caataaagtt tcttaagatt gaatcctgtt gccggtcttg cgatgattat 8220

catataatct ctgttgaatt acgttaagca cgtataaatt aacatgtaat gcatgacgtt 8280

atttatgaga tgggttttta tgattagagt cccgcaatta tacatttaat acgcgataga 8340

aaacaaaata tagcgcgcaa actaggataa attatcgcgc gcggtgtcat ctatgttact 8400

agatcggtcg attaaaaac ccaattatat ttggtctaat ttagtttggg attgagtaaa 8460

acaaattcga accaaaccaa aatataaata tatagttttt atatatatgc ctttaagact 8520

ttttatagaa ttttcttta aaaatatcta gaaatatgtg cgactcttct ggcattgtaat 8580

atttcgttaa atatgaagtg ctccatTTTT attaacTTta aataattggT tgtacgatca	8640
ctttcttatac aagtgttact aaaatgcgtc aatctctttg tcttccata ttcataTgtc	8700
aaaatctatac aaaattctta tatatctttt tcgaatttga agtgaaattt cgataattta	8760
aaattaaata gaacataTca ttatttaggt atcataTtga tttttatact taattactaa	8820
atttggttaa ctttgaaagt gtacatcaac gaaaaattag tcaaacgact aaaataaata	8880
aatatcatgt gttattaaga aaattctcct ataagaatat tttaatagat catatgtttg	8940
taaaaaaat taatttttac taacacatat atttacttat caaaaatttg acaaagtaag	9000
attaaaaata tattcatcta aaaaaaaaaa aaccagaaaa tgctgaaaac cggcaaaac	9060
cgaaccaatc caaacgata tagttggttt ggtttgattt tgatataaac cgaaccaact	9120
cggTccattt gcaccctaa tcataatagc tttaatattt caagatatta ttaagttaac	9180
gttgtcaata tcttggaat tttgcaaat gaatcaagcc tatatggctg taatatgaat	9240
ttaaaagcag ctcgatgtgg tggtaatatg taatttactt gattctaaaa aaatatccca	9300
agtattaata atttctgcta ggaagaaggt tagctacgat ttacagcaa gccagaatac	9360
aaagaaccat aaagtattg aagctcgaat tatacgaagg aacaatat tttaaaaaa	9420
tacgcaatga ctTggaaca aagaaagtga tatatttttt gtTcttaaac aagcatcccc	9480
tctaaagaat ggcagtttTc ctttgcattg aactattatg ctcccttcgt tacaaaaatt	9540
ttggactact attgggaact tcttctgaaa atagtgatag aaccacacg agcatgtgct	9600
ttccatttaa ttttaaaac caagaacat acatacata cattccatca gcctctctct	9660
ctttttatta cgtttaatga cttaaaacac atcttattat cccatctta acacctagca	9720
gtgtctttat acgatctcat cgatcaccac ttcaaaacca tgcagactgc tgctgcccc	9780
ggagctggca tcggctaggc tgggtgccgc actgtcccg aaggtcccta gcgacttgtt	9840
tagattgatg ggaccacTc tcaacttctt gctgtgtTc ctgctgtTg atgtctgcc	9900
tcatctggcc gattgcacg tccagtcccc tgcatgtTca ctgctcctc aattgtTta	9960
gatcatgTca gcagctatcg aagtgtTgc tctgtTgcc tctccacgg cttgtTgt	10020
agtagtagct gccgcgccc ttctggactt tttccacag gaaccgccga ataattcgat	10080
agaaccacac gagcatgtgc ttTcatttat tttaaaaacc aagaacata cataacattt	10140
catcagctc tctctctc tctctctc tctctctc tctctctc tctctctc	10200
tattacagct gttactaa cttaaaacac attcatctca ttattattat tattatccat	10260
ccttaacacc tagcagtTc tttgtacgat ctcataatcg atcaccctt catcaggtat	10320
ccttaggctt cactccaacg ttgttgcatg tacggaacat gtacacacca tcatgtTct	10380
caacgaactg gcaagatctc caagttttcc aaaggctaac ccacatgtTc tcatcggTgt	10440

gtctgtagtg ctctccata actttcttga tgcactcggg agcttctcta gcatggtaga	10500
atgggaccc tgaacgtag tgatggagca catgagctc gatgatgtca tggaagatga	10560
ttccgaggat tccgaactct ctatcgatag tagcagcagc acccttagcg aaagtccact	10620
cttgagcatc gtaatgaggc atagaagaat cgggtgtgctg aaggaaggta acgaaaacaa	10680
gccagtgggt aacaaggatc caaggacaga accatgtgat gaaagtaggc cagaatccga	10740
aaaccttgta agcgggtgaa acagaagtga gggtagcaag gattccaaga tcagaaagaa	10800
cgatgtacca gtagtccttc ttatcgaaaa cagggctaga aggccagtag tgagacttga	10860
agaacttaga aacaccaggg taaggttgct cagtagcgtt agtagcaagg taaagagaaa	10920
gtcctccaag ctgttggaac aagagagcga aaacagagta gataggagtt tcctcagcga	10980
tatcgtgaag gctggtaact tgggtcttct ctttgaattc ctcgcggtg taaggaacga	11040
aaaccatata tctggatcatg tgtccagtag ctttatgggtg cttagcatga gagaacttcc	11100
agctgaagta aggaaccata acaagagagt ggagaacca tccaacggtg tcgttaaccc	11160
atccgtagtt agagaaagca gaatgtccac actcatgtcc aaggatccag attccgaatc	11220
cgaaacaaga gatagagaac acgtaagcag accaagcagc gaatctaagg aattcgttag	11280
ggagaagagg gatgtaggtg agtccaacgt aagcgatagc agagatagcc acgatatactc	11340
tcaccacgta agacatagac ttcacgagag atctctcgta acagtgtta gggatagcgt	11400
caaggatata cttgatgggtg taatctggca cttgaaaac gtttccgaag gtatcgatag	11460
cggctctttg ctgcttgaaa gatgcaacgt ttccagaacg cctaacggtc ttagtagatc	11520
cctcaaggat ctcatatcca gacacggtaa ccttagacat ggtaggtgaa ttgtaaatgt	11580
aattgtaatg ttgtttgttg ttgttgttg ttgtaattg ttgtaaaatt ttgtgtgtg	11640
attgttctt taaggtgtga gagtgaattg tgagttgtgt ggtgggttg gtgagattgg	11700
ggatgggtggg ttatataagt ggagactgag gaatgggtc gtgagtgtta actttgcatg	11760
ggctacacgt gggttctttt gggcttacac gtagtattat tcatgcaaat gcagccaata	11820
catatacgtt attttaataa tgtgtgggaa tacaatatgc cgagtatttt actaattttg	11880
gcaatgacaa gtgtacattt ggattatctt acttggcctc tcttgcttta atttgatta	11940
tttttattct cttaccttgg ccgttcata tcatatccct aaaggcaaga cagaattgaa	12000
tggtggccaa aaattaaaac gatggatatg acctacatag tgtaggatca attaacgtcg	12060
aaggaaaata ctgattctct caagcatacg gacaagggtg aataacatag tcaccagaac	12120
ataataaaca aaaagtgcag aagcaagact aaaaaaatta gctatggaca ttcaggttca	12180
tattggaac atcattatcc tagtcttgt accatcttc ctctgctct agttgagagg	12240
ccttgggact aacgagaggt cagttgggat agcagatcct tatcctggac tagcctttct	12300

gggttttcag agtcttcgtg ccgccgtctc catctatctc cattaggtct gaagatgact	12360
cttcacacca acgacgttta aggtctctat cctactccta gcttgcaata cctggcttgc	12420
aatacctgga gcatcgtgca cgatgattgg atactgtgga ggaggagtgt ttgctgattt	12480
agagctcccg gttaggtgat ttgacttcga ttccagtta ggcttggtga aatttttcag	12540
gttcattgt gaagccttta gagcttgagc ttccttccat gttaatgcct tgatcgaata	12600
ctcctagaga aaagggaagt cgatctctga gtattgaaat cgaagtgcac attttttttc	12660
aacgtgtcca atcaatccac aaacaaagca gaagacaggt aatctttcat acttatactg	12720
acaagtaata gtcttaccgt catgcataat aacgtctcgt tccttcaaga ggggttttcc	12780
gacatccata acgacccgaa gcctcatgaa agcattaggg aagaactttt ggttcttctt	12840
gtcatggcct ttatagggtg cagccgagct cgccaattcc cgtccgactg gctccgcaaa	12900
atattcgaac ggcaagttaa ggacttgcaa ccataactcc acggtattga gcaggaccta	12960
ttgtgaagac tcatctcatg gagcttcaga atgtggttgt cagcaaacca atgaccgaaa	13020
tccatcacat gacggacgtc cagtgggtga gcgaaacgaa acaggaagcg cctatctttc	13080
agagtcgtga gctccacacc ggattccggc aactacgtgt tgggcaggtc tcgccgtatt	13140
agagatatgt tgaggcagac ccatctgtgc cactcgtaca attacgagag ttgttttttt	13200
tgtgattttc ctagtcttc gttgatggtg agctcatatt ctacatcgta tggctctctca	13260
acgtcgtttc ctgtcatctg atatcccgtc atttgcatcc acgtgcgccg cctcccggtc	13320
caagtcctta ggtgtcatgc acgccaattt ggtggtggtg cgggctgccc tgtgtctctt	13380
accgatgggt ggaggttagg tttaggggtc tccgcggcga tggtagtggg ttgacggttt	13440
ggtgtgggtt gacggcattg atcaatttac ttcttgcttc aaattctttg gcagaaaaca	13500
attcattaga ttagaactgg aaaccagagt gatgagacgg attaagtcag attccaacag	13560
agttacatct cttagaatat aatgtaacc ctttagactt tataatattg caattaaaaa	13620
aataatttaa ctttagact ttatatatag ttttaataac taagttaac cactctatta	13680
tttatatcga aactatttgt atgtctcccc tctaaataaa cttggtattg tgtttacaga	13740
acctataatc aaataatcaa tactcaactg aagtttgtgc agttaattga agggattaac	13800
ggccaaaatg cactagtatt atcaaccgaa tagattcaca ctagatggcc atttccatca	13860
atatcatcgc cgttcttctt ctgtccacat atcccctctg aaacttgaga gacacctgca	13920
cttcattgtc cttattacgt gttacaaaat gaaacccatg catccatgca aactgaagaa	13980
tggcgcaaga acccttcccc tccatttctt atgtggcgac catccatttc accatctccc	14040

gctataaaac acccccatca cttcacctag aacatcatca ctacttgctt atccatccaa	14100
aagataccca cttttacaac aattaccaac aacaacaaac aacaacaaac attacaatta	14160
catttacaat taccatacca tgccacctag cgtgctaag caaatgggag cttctactgg	14220
tgttcatgct ggigtactg actcttctgc ttccaccaga aaggatgttg ctgatagacc	14280
tgatctcacc atcgttggag attctgttta cgatgctaag gctttcagat ctgagcatcc	14340
tggtggtgct catttcgttt ctttgttcgg aggaagagat gctactgagg ctttcatgga	14400
ataccataga agggcttggc ctaagtctag aatgtctaga ttccacgttg gatctcttgc	14460
ttctactgag gaacctgttg ctgctgatga gggatacctt caactttgtg ctaggatcgc	14520
taagatgggtg ccttctgttt cttctggatt cgtctctgct tcttactggg ttaaggctgg	14580
acttatcctt ggatctgcta tcgctcttga ggcttacatg ctttacgctg gaaagagact	14640
tctcccttct atcgttcttg gatgctttt cgtctcttgc ggtcttaaca tccagcatga	14700
tgctaaccat ggigtcttgt ctaagtctgc ttctgttaac cttgctcttg gactttgtca	14760
ggattggatc ggaggatcta tgatcctttg gcttcaagag catgttgta tgcaccacct	14820
ccacactaac gatgttgata aggatcctga tcaaaaggct cacggtgctc ttagactcaa	14880
gcctactgat gcttggtcac ctatgcattg gcttcagcat ctttacctt tgcctggatga	14940
gactatgtac gctttcaagc ttttgttctt cgacatctct gagcttgta tgtggcgttg	15000
ggagggtgag cctatctcta agcttgctgg atacctctt atgccttctt tgctttctaa	15060
gcttaccttc tgggctagat tcgttgcttt gcctctttac cttgctcctt ctgttcatac	15120
tgtgtgtgt atcgctgcta ctgttatgac tggatcttct tacctcgtt tcttcttctt	15180
catctccac aacttcgagg gtgttgcttc tgttgacct gatggatcta tcacttctat	15240
gactagaggt gctagcttcc ttaagagaca agctgagact tcttctaacg ttggaggacc	15300
tcttcttgct actcttaacg gtggactcaa ctaccaaatt gagcatcact tgttccttag	15360
agttcaccat ggattctacc ctagacttgc tctcttgtt aaggctgagc ttgaggctag	15420
aggaatcgag tacaagcact accctactat ctggtctaac cttgcttcta ccctcagaca	15480
tatgtacgct cttggaagaa ggcctagatc taaggctgag taatgacaag cttatgtgac	15540
gtgaaataat aacggtaaaa tataatgtaat aataataata ataaagccac aaagtgagaa	15600
tgaggggaag gggaaatgtg taatgagcca gtagccggtg gtgctaattt tgtatcgtat	15660
tgtcaataaa tcatgaattt tgtggttttt atgtgttttt ttaaatcatg aattttaaat	15720
tttataaaat aatctccaat cggaagaaca acattccata tccatgcatg gatgtttctt	15780
tacccaaatc tagttcttga gaggatgaag catcacgaa cagttctgca actatccctc	15840
aaaagcttta aaatgaacaa caaggaacag agcaacgttc caaagatccc aaacgaacaa	15900

tattatctat actaatacta tattattaat tactactgcc cggaatcaca atccctgaat	15960
gattcctatt aactacaagc cttgttggcg gcggagaagt gatcggcgcg gcgagaagca	16020
gcggactcgg agacgaggcc ttggaagatc tgagtcgaac gggcagaatc agtattttcc	16080
ttcgacgtta attgatccta cactatgtag gtcatatcca tcgttttaat ttttggccac	16140
cattcaattc tgtcttgctt ttagggatgt gaatatgaac ggccaaggta agagaataaa	16200
aataatccaa attaaagcaa gagaggccaa gtaagataat ccaaatgtac acttgtcatt	16260
gccaaaatta gtaaaatact cggcatattg tattcccaca cattattaaa ataccgtata	16320
tgtattggct gcatttgcac gaataatact acgtgtaagc caaaagaac ccacgtgtag	16380
cccatgcaaa gttaacactc acgaccccat tctcagtct ccactatata aaccacccat	16440
ccccaatctc accaaaccca ccacacaact cacaactcac tctcacacct taaagaacca	16500
atcaccacca aaaattttac aacaattacc aacaacaaca aacaacaac aacattacaa	16560
ttacatttac aattaccata ccatgagcgc tgttaccgtt actggatctg atcctaagaa	16620
cagaggatct tctagcaaca ccgagcaaga ggttccaaaa gttgctatcg ataccaacgg	16680
aaacgtgttc tctgttctcg atttcacat caaggacatc cttggagcta tccctcatga	16740
gtgttacgag agaagattgg ctacctctct ctactacgtg ttcagagata tcttctgcat	16800
gcttaccacc ggatacctta cccataagat cctttaccct ctctcatct cttacacctc	16860
taacagcatc atcaagtta ctttctgggc cttttacact tacgttcaag gacttttcgg	16920
aaccggaatc tgggttctcg ctcatgagtg tggacatcaa gctttctctg attacggaat	16980
cgtgaacgat ttctgttgat ggacccttca ctcttacctt atggttccct acttcagctg	17040
gaagtactct catggaaagc accataaggc tactggacac atgaccagag atatggtttt	17100
cgttctctgcc accaaagagg aattcaagaa gtctaggaac ttcttcggtt acctcgtga	17160
gtactctgag gattctccac ttagaacctt ttacgagctt cttgttcaac aacttggagg	17220
atggatcgct tacctcttcg ttaacgttac aggacaacct tacctgatg ttccttcttg	17280
gaaatggaac cacttctggc ttacctctcc acttttcgag caaagagatg ctctctacat	17340
cttcttttct gatcttggaa tcttcacca ggaatcggtt cttactcttt ggtacaagaa	17400
attcggagga tggtcctttt tcatcaactg gttcgttctt tacatctggg ttaaccactg	17460
gctcgttttc atcacattcc ttacgcacac tgatctact atgcctcatt acaacgtga	17520
ggaatggact ttcgctaagg gtgctgctgc tactatcgat agaaagtctg gattcatcgg	17580
acctcacatc ttccatgata tcatcgagac tcatgtgctt caccactact gttctaggat	17640
cccatcttac aacgctagac ctgcttctga ggctatcaag aaagtatatg gaaagcacta	17700
caggtctagc gacgagaaca tgtggaagtc actttggaag tctttcaggt cttgccaata	17760

cgttgacggt gataacggtg ttctcatgtt ccgtaacatc aacaactgcg gagttggagc	17820
tgctgagaag taatgaaggg gtgatcgatt atgagatcgt acaaagacac tgctaggtgt	17880
taaggatgga taataataat aataatgaga tgaatgtgtt ttaagttagt gtaacagctg	17940
taataaagag agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag agagagaggc	18000
tgatgaaatg ttatgtatgt ttcttggttt ttaaaataaa tgaaagcaca tgctcgtgtg	18060
gttctatcga attattcggc gggttcctgtg ggaaaaagtc cagaagggcc gccgcagcta	18120
ctactacaac caaggccgtg gaggagggca acagagccag cacttcgata gctgctgcga	18180
tgatcttaag caattgagga gcgagtgcac atgcagggga ctggagcgtg caatcggcca	18240
gatgaggcag gacatccagc agcagggaca gcagcaggaa gttgagaggt ggtcccatca	18300
atctaacaa gtcgctaggg accttcggg acagtgcggc acccagccta gccgatgcca	18360
gctccagggg cagcagcagt ctgcatggtt ttgaagtggg gatcgatgag atcgataaaa	18420
gacactgcta ggtgttaagg atgggataat aagatgtgtt ttaagtcatt aaccgtaata	18480
aaaagagaga gaggctgatg gaatgttatg tatgtatgtt tcttggtttt taaaattaaa	18540
tggaaagcac atgctcgtgt gggttctatc tcgattaaaa atcccaatta tatitggtct	18600
aatttagttt ggtattgagt aaaacaaatt cgaaccaaac caaaatataa atatatagtt	18660
tttatatata tgcctttaag actttttata gaattttctt taaaaaatat ctagaaatat	18720
ttgcgactct tciggcattg aatatttcgt taaatatgaa gtgctccatt tttattaaat	18780
ttaaataatt ggttgtacga tcactttctt atcaagtgtt actaaatgc gtcaatctct	18840
ttgttcttcc atattcatat gtcaaaatct atcaaaatc ttatatatct ttttcgaatt	18900
tgaagtgaag tticgataat ttaaaattaa atagaacata tcattattta ggtatcatat	18960
tgatttttat acttaattac taaatttggg taactttgaa agtgtacatc aacgaaaaat	19020
tagtcaaacg actaaaataa ataaatatca tgtgttatta agaaaattct cctataagaa	19080
tattttaata gatcatatgt ttgtaaaaaa aattaatttt tactaacaca tatatttact	19140
tatcaaaaat ttgacaaagt aagattaaaa taatattcat ctaacaaaaa aaaaaccaga	19200
aatgctgaa aacccggcaa aaccgaacca atccaaaccg atatagttgg ttggtttga	19260
ttttgatata aaccgaacca actcgggtcca ttgacacccc taatcataat agctttaata	19320
tttcaagata ttattaagtt aacgttgtca atatcctgga aattttgcaa aatgaatcaa	19380
gcctatatgg ctgtaatatg aatttaaaaag cagctcgatg tgggtggaat atgtaattta	19440
cttgattcta aaaaaatata ccaagtatta ataatttctg ctaggaagaa ggttagctac	19500

gatttacagc aaagccagaa tacaagaac cataaagtga ttgaagctcg aaatatacga	19560
aggaacaaat atttttaaaa aaatacgcaa tgacttggaa caaaagaaag tgatatattt	19620
tttgttctta aacaagcatc cctctaaag aatggcagtt ttcctttgca tgtaactatt	19680
atgctccctt cgttacaaaa attttggact actattggga acttcttctg aaaatagtc	19740
tgcaggctag tagattgggt ggttggtttc catgtaccag aaggcttacc ctattagttg	19800
aaagtggaaa ctttgttccc tactcaattc ctagtgtgt aaatgtatgt atatgtaatg	19860
tgtataaac gtagtactta aatgactagg agtggttctt gagaccgatg agagatggga	19920
gcagaactaa agatgatgac ataattaaga acgaatttga aaggctctta ggtttgaatc	19980
ctattcgaga atgtttttgt caaagatagt ggcgattttg aaccaaagaa aacatttaaa	20040
aaatcagtat ccggttacgt tcatgcaaat agaaagtggc ctaggatctg attgtaattt	20100
tagacttaaa gagtctctta agattcaatc ctggctgtgt acaaaactac aaataatata	20160
ttttagacta ttitggcctta actaaacttc cactcattat ttactgaggt tagagaatag	20220
acttgcgaat aaacacattc ccgagaaata ctcatgatcc cataattagt cagagggtat	20280
gccaatcaga tctaagaaca cacattccct caaattttaa tgcacatgta atcatagttt	20340
agcacattc aaaaataatg tagtattaaa gacagaaatt tgtagacttt tttttggcgt	20400
taaaagaaga ctaagtttat acgtacattt tattttaagt ggaaaaccga aattttccat	20460
cgaaatatat gaatttagta tatatatttc tgcaatgtac tattttgcta ttttggcaac	20520
tttcagtgga ctactacttt attacaatgt gtatggatgc atgagtttga gtataacat	20580
gtctaaatgc atgcttttga aaacgtaacg gaccacaaaa gaggatccat acaaatacat	20640
ctcatagctt cctccattat ttcccgacac aaacagagca ttttacaaca attaccaaca	20700
acaacaaca acaacaaca ttacaattac atttacaatt accataccat ggaatttgct	20760
caacctctcg ttgctatggc tcaagagcag tacgtgcta tcgatgctgt tgttgcctc	20820
gctatcttct ctgctaccga ctctatttga tggggactca agcctatctc ttctgtact	20880
aaggatctcc ctctcgttga atctctacc cctcttatcc tttctctcct cgttacttc	20940
gctatcgttg gttctggact cgtttaccgt aaagtgttcc ctagaaccgt taagggacag	21000
gatcctttcc ttctcaaggc tcttatgctc gctcacaacg ttttcttat cggactcagc	21060
ctttacatgt gcctcaagct cgtttacgag gcttacgtga acaagtactc cttctgggga	21120
aacgcttaca accctgctca aaccgagatg gctaaggtga tctggatctt ctacgtgtcc	21180
aagatctacg agttcatgga caccttcac atgcttctca agggaaacgt taaccaggtt	21240
tccttctcc atgtttacca ccacggatct atctctggaa tctggtggat gatcattat	21300
gctgctccag gtggagatgc ttacttctct gctgctctca actcttgggt tcatgtgtgc	21360

atgtacacct actacttcat ggctgctgtt cttcctaagg acgaaaagac caagagaaag	21420
taccttttggg ggggaagata ccttaccag atgcaaagt tccagttctt catgaacctt	21480
ctccaggtcg tttacctcct ctactcttct tctccttacc ctaagttcat tgetcaactc	21540
ctcgtttgtt acatggttac cctcctcatg cttttcggaa acttctacta catgaagcac	21600
cacgcttcta agtgataagg gccgccgcca tgtgacagat cgaaggaaga aagtgtata	21660
agacgactct cactactcga tcgctagtga ttgtcattgt tataataat aatgttatct	21720
ttcacaactt atcgtaatgc atgtgaaact ataacacatt aatcctactt gtcatatgat	21780
aacactctcc ccatttaaaa ctcttgtaaa tttaaagata taagattctt taaatgatta	21840
aaaaaaaaat attataaatt caatcactcc tactaataaa ttattaatta ttatttattg	21900
attaaaaaaa tacttatact aatttagtct gaatagaata attagattct agcctgcagg	21960
gcggccgcgg atcccatgga gtcaaagatt caaatagagg acctaacaga actcgccgta	22020
aagactggcg aacagttcat acagagtctc ttacgactca atgacaagaa gaaaatcttc	22080
gtcaacatgg tggagcacga cacacttgtc tactccaaaa atatcaaaga tacagtctca	22140
gaagacaaaa gggcaattga gacttttcaa caaagggtaa tatccggaaa ctcctcgga	22200
ttccattgcc cagctatctg tcactttatt gtgaagatag tggaaaagga aggtggctcc	22260
tacaaatgcc atcattgcga taaaggaaag gccatcgttg aagatgcctc tgccgacagt	22320
ggtcccaag atggacccc acccagagg agcatcgtgg aaaaagaaga cgttccaacc	22380
acgtcttcaa agcaagtgga ttgatgtgat atctccactg acgtaaggga tgacgcacaa	22440
tcccactatc cttcgcaaga ccttctctct atataaggaa gttcatttca ttitggagaga	22500
acacggggga ctgaattaaa tatgagccct gagaggcgtc ctgttgaaat cagacctgct	22560
actgctgctg atatggctgc tgtttgtgat atcgtgaacc actacatcga gacttctacc	22620
gttaacttca gaactgagcc tcaaaactct caagagtga tcgatgatct tgagagactc	22680
caagatagat acccttggct tgttgctgag gttgagggtg ttgttgctgg aatcgcttac	22740
gctggacctt ggaaggctag aaacgcttac gattggactg ttgagtctac cgtttacgtt	22800
tcacacagac atcagagact tggacttga tctaccttt acactcacct tetcaagtct	22860
atggaagctc agggattcaa gtctgttgtt gctgttatcg gactccctaa cgatccttct	22920
gttagacttc atgaggctct tggatacact gctagaggaa ctcttagagc tgetggatac	22980
aagcacggtg gatggcatga tgttggattc tggcaaagag atttcgagct tcctgctcct	23040
cctagacctg ttagaccagt tactcagatc tgaatttgcg tgatcgttca aacatttggc	23100
aataaagttt cttaagattg aatcctgttg ccggtcttgc gatgattatc atataatttc	23160
tgttgaatta cgtaagcat gtaataatta acatgtaatg catgacgtta tttatgagat	23220

gggtttttat gattagagtc ccgcaattat acatttaata cgcgatagaa aacaaaatat 23280

agcgcgcaaa ctaggataaa ttatcgcgcg cgggtgtcatc tatgttacta gatcactagt 23340

gatgtacggt taaaaccacc ccagtacatt aaaaacgtcc gcaatgtgtt attaagttgt 23400

ctaagcgtca atttgtttac accacaatat atcctgccac cagccagcca acagctcccc 23460

gaccggcagc tcggcacaaa atcaccactc gatacaggca gcccacagt cc 23512

<210> 3

<211> 1254

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Codon-optimized open reading frame for expression of Lachancea kluyveri 12 desaturase in plants

<400> 3

atgagcgctg ttaccgttac tggatctgat cctaagaaca gaggatcttc tagcaacacc 60

gagcaagagg ttccaaaagt tgctatcgat accaacggaa acgtgttctc tgttctgat 120

ttccaccatca aggacatcct tggagctatc cctcatgagt gttacgagag aagattggct 180

acctctctct actacgtgtt cagagatatc ttctgcatgc ttaccaccgg ataccttacc 240

cataagatcc ttaccctct cctcatctct tacacctcta acagcatcat caagttcact 300

ttctggggccc ttacactta cgttcaagga cttttcggaa ccggaatctg ggttctcgct 360

catgagtgtg gacatcaagc ttctctgat tacggaatcg tgaacgattt cgttggatgg 420

acccttcact cttaccttat ggttccttac ttcagctgga agtactctca tggaaagcac 480

cataaggcta ctggacacat gaccagagat atggttttcg ttcttgccac caaagaggaa 540

ttcaagaagt ctaggaactt cttcggtaac ctgcgtgagt actctgagga ttctccactt 600

agaacccttt acgagcttct tgttcaacaa ctggaggat ggatcgctta cctcttcgtt 660

aacgttacag gacaacctta ccctgatgtt cttctttgga aatggaacca cttctggctt 720

acctctccac ttttcgagca aagagatgct ctctacatct tcctttctga tcttggaatc 780

ctcaccagg gaatcgttct tactctttgg tacaagaaat tcggaggatg gtcccttttc 840

atcaactggt tcgttcctta catctgggtt aaccactggc tcgttttcat cacattcctt 900

cagcacactg atcctactat gcctcattac aacgctgagg aatggacttt cgctaagggt 960

gctgctgcta ctatcgatag aaagttcgga ttcacatgac ctacatctt ccatgatatc 1020

atcgagactc atgtgcttca ccactactgt tctaggatcc cattctacaa cgctagacct 1080

gcttctgagg ctatcaagaa agttatggga aagcactaca ggtctagcga cgagaacatg 1140

tggaagtcac ttggaagtc ttccaggtct tgccaatacg ttgacggtga taacggtgtt 1200
 ctcatgttcc gtaacatcaa caactgcgga gttggagctg ctgagaagta atga 1254
 <210> 4
 <211> 416
 <212> PRT
 <213> Lachancea kluyveri

 <400> 4
 Met Ser Ala Val Thr Val Thr Gly Ser Asp Pro Lys Asn Arg Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Ser Asn Thr Glu Gln Glu Val Pro Lys Val Ala Ile Asp Thr Asn
 20 25 30
 Gly Asn Val Phe Ser Val Pro Asp Phe Thr Ile Lys Asp Ile Leu Gly
 35 40 45
 Ala Ile Pro His Glu Cys Tyr Glu Arg Arg Leu Ala Thr Ser Leu Tyr
 50 55 60

 Tyr Val Phe Arg Asp Ile Phe Cys Met Leu Thr Thr Gly Tyr Leu Thr
 65 70 75 80
 His Lys Ile Leu Tyr Pro Leu Leu Ile Ser Tyr Thr Ser Asn Ser Ile
 85 90 95
 Ile Lys Phe Thr Phe Trp Ala Leu Tyr Thr Tyr Val Gln Gly Leu Phe
 100 105 110
 Gly Thr Gly Ile Trp Val Leu Ala His Glu Cys Gly His Gln Ala Phe
 115 120 125

 Ser Asp Tyr Gly Ile Val Asn Asp Phe Val Gly Trp Thr Leu His Ser
 130 135 140
 Tyr Leu Met Val Pro Tyr Phe Ser Trp Lys Tyr Ser His Gly Lys His
 145 150 155 160
 His Lys Ala Thr Gly His Met Thr Arg Asp Met Val Phe Val Pro Ala
 165 170 175
 Thr Lys Glu Glu Phe Lys Lys Ser Arg Asn Phe Phe Gly Asn Leu Ala
 180 185 190

Glu Tyr Ser Glu Asp Ser Pro Leu Arg Thr Leu Tyr Glu Leu Leu Val
 195 200 205
 Gln Gln Leu Gly Gly Trp Ile Ala Tyr Leu Phe Val Asn Val Thr Gly
 210 215 220
 Gln Pro Tyr Pro Asp Val Pro Ser Trp Lys Trp Asn His Phe Trp Leu
 225 230 235 240
 Thr Ser Pro Leu Phe Glu Gln Arg Asp Ala Leu Tyr Ile Phe Leu Ser
 245 250 255

 Asp Leu Gly Ile Leu Thr Gln Gly Ile Val Leu Thr Leu Trp Tyr Lys
 260 265 270
 Lys Phe Gly Gly Trp Ser Leu Phe Ile Asn Trp Phe Val Pro Tyr Ile
 275 280 285
 Trp Val Asn His Trp Leu Val Phe Ile Thr Phe Leu Gln His Thr Asp
 290 295 300
 Pro Thr Met Pro His Tyr Asn Ala Glu Glu Trp Thr Phe Ala Lys Gly
 305 310 315 320

 Ala Ala Ala Thr Ile Asp Arg Lys Phe Gly Phe Ile Gly Pro His Ile
 325 330 335
 Phe His Asp Ile Ile Glu Thr His Val Leu His His Tyr Cys Ser Arg
 340 345 350
 Ile Pro Phe Tyr Asn Ala Arg Pro Ala Ser Glu Ala Ile Lys Lys Val
 355 360 365
 Met Gly Lys His Tyr Arg Ser Ser Asp Glu Asn Met Trp Lys Ser Leu
 370 375 380

 Trp Lys Ser Phe Arg Ser Cys Gln Tyr Val Asp Gly Asp Asn Gly Val
 385 390 395 400
 Leu Met Phe Arg Asn Ile Asn Asn Cys Gly Val Gly Ala Ala Glu Lys
 405 410 415

<210> 5

<211> 1251

<212> DNA

<213> *Pichia pastoris*

<400> 5

atgtctaagg ttaccgtgtc tggatctgag atccttgagg gatctactaa gaccgttagg	60
cgttctggaa acgttgcac tttcaagcag caaaagaccg ctatcgatac cttcggaaac	120
gttttcaagg tgccagatta caccatcaag gatatccttg acgctatccc taagcactgt	180
tacgagagat ctctcgtgaa gtctatgtct tacgtgggtga gagatatact ggctatctct	240
gctatcgctt acgttggact tacctacatc cctcttctcc ctaacgaatt ccttagattc	300
gctgcttggc ctgcttacgt gttctctatc tcttggttcg gattcggaa ctggatcctt	360
ggacatgagt gtggacattc tgccttctct aactacggat ggggttaacga taccgttggg	420
tgggttctcc acctctctgt tatggttctt tacttcagct ggaagtcttc tcatgctaag	480
caccataagg ctactggaca catgaccaga gatatgggtt tcgttctta caccgccgag	540
gaattcaaag agaagcacca agttaccagc cttcacgata tcgctgagga aactcctatc	600
tactctgttt tcgctctctt gttccaacag ctggaggac tttctcttta ccttgctact	660
aacgctactg gacaacctta ccctgggtgt tctaagtctt tcaagtctca ctactggcct	720
tctagccctg ttttcgataa gaaggactac tggatcatcg tttcttctga tcttggaatc	780
cttgctaccc tcacttctgt ttacaccgct tacaagggtt tcggattctg gcctactttc	840
atcacatggt tctgtccttg gatccttgtt aaccactggc ttgttttcgt taccttcctt	900
cagcacaccg attcttctat gcctcattac gatgtcaag agtggacttt cgctaagggt	960
gctgctgcta ctatcgatag agagttcgga atcctcgga tcactttcca tgacatcatc	1020
gagactcatg tgcctcatca ctacgtttca aggatcccat tctaccatgc tagagaagct	1080
accgagtga tcaagaaagt tatgggagag cactacagac acaccgatga gaacatgtgg	1140
gttagccttt ggaaaacttg gagatcttgc cagttcgttg agaaccatga tgggtgtgtac	1200
atgttccgta actgcaaca cgttggagtg aagcctaagg atacctgatg a	1251

<210> 6

<211> 415

<212> PRT

<213> Pichia pastoris

<400> 6

Met	Ser	Lys	Val	Thr	Val	Ser	Gly	Ser	Glu	Ile	Leu	Glu	Gly	Ser	Thr
1			5				10						15		

Lys	Thr	Val	Arg	Arg	Ser	Gly	Asn	Val	Ala	Ser	Phe	Lys	Gln	Gln	Lys
			20				25						30		

Thr Ala Ile Asp Thr Phe Gly Asn Val Phe Lys Val Pro Asp Tyr Thr
35 40 45

Ile Lys Asp Ile Leu Asp Ala Ile Pro Lys His Cys Tyr Glu Arg Ser
50 55 60

Leu Val Lys Ser Met Ser Tyr Val Val Arg Asp Ile Val Ala Ile Ser
65 70 75 80

Ala Ile Ala Tyr Val Gly Leu Thr Tyr Ile Pro Leu Leu Pro Asn Glu
85 90 95

Phe Leu Arg Phe Ala Ala Trp Ser Ala Tyr Val Phe Ser Ile Ser Cys
100 105 110

Phe Gly Phe Gly Ile Trp Ile Leu Gly His Glu Cys Gly His Ser Ala
115 120 125

Phe Ser Asn Tyr Gly Trp Val Asn Asp Thr Val Gly Trp Val Leu His
130 135 140

Ser Leu Val Met Val Pro Tyr Phe Ser Trp Lys Phe Ser His Ala Lys
145 150 155 160

His His Lys Ala Thr Gly His Met Thr Arg Asp Met Val Phe Val Pro
165 170 175

Tyr Thr Ala Glu Glu Phe Lys Glu Lys His Gln Val Thr Ser Leu His
180 185 190

Asp Ile Ala Glu Glu Thr Pro Ile Tyr Ser Val Phe Ala Leu Leu Phe
195 200 205

Gln Gln Leu Gly Gly Leu Ser Leu Tyr Leu Ala Thr Asn Ala Thr Gly
210 215 220

Gln Pro Tyr Pro Gly Val Ser Lys Phe Phe Lys Ser His Tyr Trp Pro
225 230 235 240

Ser Ser Pro Val Phe Asp Lys Lys Asp Tyr Trp Tyr Ile Val Leu Ser
245 250 255

Asp Leu Gly Ile Leu Ala Thr Leu Thr Ser Val Tyr Thr Ala Tyr Lys
260 265 270

Val Phe Gly Phe Trp Pro Thr Phe Ile Thr Trp Phe Cys Pro Trp Ile

275 280 285
 Leu Val Asn His Trp Leu Val Phe Val Thr Phe Leu Gln His Thr Asp
 290 295 300
 Ser Ser Met Pro His Tyr Asp Ala Gln Glu Trp Thr Phe Ala Lys Gly
 305 310 315 320
 Ala Ala Ala Thr Ile Asp Arg Glu Phe Gly Ile Leu Gly Ile Ile Phe
 325 330 335

 His Asp Ile Ile Glu Thr His Val Leu His His Tyr Val Ser Arg Ile
 340 345 350
 Pro Phe Tyr His Ala Arg Glu Ala Thr Glu Cys Ile Lys Lys Val Met
 355 360 365
 Gly Glu His Tyr Arg His Thr Asp Glu Asn Met Trp Val Ser Leu Trp
 370 375 380
 Lys Thr Trp Arg Ser Cys Gln Phe Val Glu Asn His Asp Gly Val Tyr
 385 390 395 400

Met Phe Arg Asn Cys Asn Asn Val Gly Val Lys Pro Lys Asp Thr
 405 410 415

<210> 7

<211> 1392

<212> DNA

<213> Micromonas pusilla

<400> 7

atgtgtcccg cgaagacgga cggccgatcg tccccgcgat cgccgctgac gcgcagcaaa 60
 tcctccgcgg aggcgctcga cgccaaggac gcgtcgaccg cgcccgtcga tctcaaaacg 120
 ctcgagccgc acgagctcgc ggcgacgttc gagacgcgat ggggtgcgct ggaggacgtc 180
 gagtagcagc tcacaaactt caaacacccg ggaggcagcg tgatattcta catgctcgcg 240
 aacacgggcg cggacgccac ggaggcgttc aaggagtcc acatgcgac gcttaaggcg 300

 tggaagatgc tcagagcgct gccgtcgcg cccgcggaga tcaaacgcag cgagagcgag 360
 gacgcgccga tgttggagga ttctgcgcgg tggcgcgcgg agctcgaac cgacgggttc 420
 tttaagccct cgataacgca cgtcgcgat cggttactcg agctcctcgc gaccttcgcc 480
 ctcggcaccg ccctcatgta cgccgggtac ccgatcatcg cgccgctcgt gtacggcgcg 540
 ttcttcggcg ctcggtgcgg ttgggtccag cagcagggcg ggcacaactc gctcacgggg 600

tccgtctacg tcgacaagcg cctccaagcg atgacgtgcg gggttcgggct gtccacgagc 660
 ggggagatgt ggaaccagat gcacaataag caccacgcga cgccgcagaa agtgaggcac 720

gacatggacc tggacacgac ccccgcggtg gcgtttttta acaccgccgt ggaggacaac 780
 cggccgaggg gggtctcccg cgcgtgggct cggcttcagg cgtggacgtt cgtcccgggtg 840
 acctccgggc tgctcgtcca ggcttcttgg atctacgtcc tgcacccgcg gcaggtgttg 900
 cgaaagaaga actacgagga ggctcgttgg atgctcgtct ctcacgtcgt caggaccgcg 960
 gtgattaaac tcgcgacggg gtactcgtgg cccgtcgcgt actggtggtt caccttcggc 1020
 aactggatcg cgtacatgta cctcttcgcg cacttctcca cgagccacac gcacctccc 1080
 gtcgtgccct cggataagca cctgagctgg gtgaactac cggtcgatca caccgtggac 1140

atcgacccgt cgcgcgggta cgtgaactgg ttgatgggat atctgaactg ccaggtcatt 1200
 catcacctgt tcccgacat gccgcagttt cgccagccgg aggtgagccg gcggttcgtc 1260
 ccgttcgcga agaagtgggg gctgaactac aaggtgctgt cctattacgg cgcctggaag 1320
 gcgacgttct cgaacttga taaggtcggg cagcactact acgtcaacgg caaggcggag 1380
 aaggcgact ga 1392

<210> 8
 <211> 1395
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Codon-optimized open reading frame for expression of Micromonas

pusilla 6 desaturase in plants (version 1)

<400> 8

atgtgccctc ctaagactga tggaagatct tctcctagat ctccacttac caggtctaaa 60
 tcttctgctg aggtctctga tgctaaggat gcttctactg ctctgttga tcttaagact 120
 cttgagcctc atgagcttgc tgctactttc gagactagat gggttagagt tgaggacgtt 180
 gagtacgatg tgactaactt caagcacctt ggtggatctg tgatcttcta catgcttget 240
 aacactgggtg ctgatgctac tgaggctttc aaagaattcc acatgcgttc tctcaaggct 300
 tggaagatgc ttagagcttt gccttctaga cctgctgaga tcaagagatc tgagtctgag 360

gatgctccta tgcttgagga tttcgttaga tggcgtgctg agcttgagag agatggattc 420
 ttcaagcctt ctatcaccca tgttgcttac agacttctcg agcttcttgc tacattcgtt 480
 cttggaactg ctcttatgta cgctggatac cctatcattg cttctgttgt ttacgttget 540
 ttcttcggag ctagatgtgg atgggttcaa catgagggtg gacataactc tcttaccgga 600

tctgtttacg tggacaagag acttcaggct atgacttggt gattcggact ttctacttct 660
 ggtgagatgt ggaaccagat gcataacaag caccatgcta cccctcaaaa ggtagacac 720
 gatatggatc ttgataccac tctgctgtg gctttcttca acactgctgt tgaggataac 780

agacctagag gattctctag agcttgggct agacttcaag cttggacttt cgttcctggt 840
 acctctggac ttcttggtca agctttctgg atctacgttc tccacctag acaagttctc 900
 cgtaagaaga actacgaaga ggcttcttgg atgctcgttt ctcattgtgt tagaaccgct 960
 gttatcaagc ttgctactgg atactcttgg cctgttgctt actggtggtt cactttcgga 1020
 aactggatcg cttacatgta cttttctgct cactttcteta cttctcatac tcacctccct 1080
 gtgtttccat ctgataagca cttttcttgg gttactacg ctgttgatca caccgttgat 1140
 atcgatcctt ctagaggata cgtgaactgg cttatgggat accttaactg tcaggttatc 1200

caccacctct tccctgatat gcctcaattc agacagcctg aggttagcag aagattcggt 1260
 cttttcgcta agaagtgggg actcaactac aaggtgctct cttactacgg tgcttggaag 1320
 gctactttct ctaaccttga taagtgaggga cagcactact acgttaacgg aaaggctgag 1380
 aaggctcact aatga 1395

<210> 9

<211> 463

<212> PRT

<213> Micromonas pusilla

<400> 9

Met Cys Pro Pro Lys Thr Asp Gly Arg Ser Ser Pro Arg Ser Pro Leu

1 5 10 15

Thr Arg Ser Lys Ser Ser Ala Glu Ala Leu Asp Ala Lys Asp Ala Ser

20 25 30

Thr Ala Pro Val Asp Leu Lys Thr Leu Glu Pro His Glu Leu Ala Ala

35 40 45

Thr Phe Glu Thr Arg Trp Val Arg Val Glu Asp Val Glu Tyr Asp Val

50 55 60

Thr Asn Phe Lys His Pro Gly Gly Ser Val Ile Phe Tyr Met Leu Ala

65 70 75 80

Asn Thr Gly Ala Asp Ala Thr Glu Ala Phe Lys Glu Phe His Met Arg

85 90 95

Ser Leu Lys Ala Trp Lys Met Leu Arg Ala Leu Pro Ser Arg Pro Ala
100 105 110

Glu Ile Lys Arg Ser Glu Ser Glu Asp Ala Pro Met Leu Glu Asp Phe
115 120 125

Ala Arg Trp Arg Ala Glu Leu Glu Arg Asp Gly Phe Phe Lys Pro Ser
130 135 140

Ile Thr His Val Ala Tyr Arg Leu Leu Glu Leu Leu Ala Thr Phe Ala
145 150 155 160

Leu Gly Thr Ala Leu Met Tyr Ala Gly Tyr Pro Ile Ile Ala Ser Val
165 170 175

Val Tyr Gly Ala Phe Phe Gly Ala Arg Cys Gly Trp Val Gln His Glu
180 185 190

Gly Gly His Asn Ser Leu Thr Gly Ser Val Tyr Val Asp Lys Arg Leu
195 200 205

Gln Ala Met Thr Cys Gly Phe Gly Leu Ser Thr Ser Gly Glu Met Trp
210 215 220

Asn Gln Met His Asn Lys His His Ala Thr Pro Gln Lys Val Arg His
225 230 235 240

Asp Met Asp Leu Asp Thr Thr Pro Ala Val Ala Phe Phe Asn Thr Ala
245 250 255

Val Glu Asp Asn Arg Pro Arg Gly Phe Ser Arg Ala Trp Ala Arg Leu
260 265 270

Gln Ala Trp Thr Phe Val Pro Val Thr Ser Gly Leu Leu Val Gln Ala
275 280 285

Phe Trp Ile Tyr Val Leu His Pro Arg Gln Val Leu Arg Lys Lys Asn
290 295 300

Tyr Glu Glu Ala Ser Trp Met Leu Val Ser His Val Val Arg Thr Ala
305 310 315 320

Val Ile Lys Leu Ala Thr Gly Tyr Ser Trp Pro Val Ala Tyr Trp Trp
325 330 335

Phe Thr Phe Gly Asn Trp Ile Ala Tyr Met Tyr Leu Phe Ala His Phe

340 345 350
 Ser Thr Ser His Thr His Leu Pro Val Val Pro Ser Asp Lys His Leu
 355 360 365
 Ser Trp Val Asn Tyr Ala Val Asp His Thr Val Asp Ile Asp Pro Ser
 370 375 380
 Arg Gly Tyr Val Asn Trp Leu Met Gly Tyr Leu Asn Cys Gln Val Ile
 385 390 395 400

His His Leu Phe Pro Asp Met Pro Gln Phe Arg Gln Pro Glu Val Ser
 405 410 415
 Arg Arg Phe Val Pro Phe Ala Lys Lys Trp Gly Leu Asn Tyr Lys Val
 420 425 430
 Leu Ser Tyr Tyr Gly Ala Trp Lys Ala Thr Phe Ser Asn Leu Asp Lys
 435 440 445
 Val Gly Gln His Tyr Tyr Val Asn Gly Lys Ala Glu Lys Ala His
 450 455 460

<210> 10

<211> 1449

<212> DNA

<213> *Ostreococcus lucimarinus*

<400> 10

atgtgcgtcg aaacgaccga aggcacatcg cgaacgatgg cgaacgaacg cagagctcg	60
tcgtcgtcgc tgagcgaagg cggaacgccg acggtgacgg tcgggatggg aagcgaagac	120
gcggggaaga agactcgaaa cgcgagcgtc acggcgtgga cgaaagagtt ggagccgcac	180
gcgatcgca agacgttcga acggcggtac gtgacgatcg aaggcgtgga atacgatgtg	240
acggatttta agcatcccg aggatcggtt atttattaca tgctgtcgaa cacgggagcg	300
gacgcgacgg aggcctttta agagtttcat ttcggtcga aaaaggcgcg caaggcgttg	360
gcggcgttgc cgcataagcc agtggacgcg gcgacgcggg aaccgatcga agatgaggcg	420
atgtgaagg atttcgcgca gtggcgcaag gaattggagc gtgagggatt ttttaagccc	480
tcgccggcgc acgtggcgta tcgattcgcc gagctcgagg cgatgttcgc gctcggcacg	540
gcgttgatgc acgcgcgttg gcacgtcgct tccgtgatcg tgtactcgtg tttcttcggc	600
gcgcgatgcg gttgggtgca gcacgagggt gggcacaatt cgttgactgg aaacatttgg	660
tgggacaagc gaatccaagc cttcgccgcg gggttcggct tggcgtcgag tggcgacatg	720

tggaacaaca tgcacaacaa gcatcacgcg acgccccaaa aggtgcgaca cgatatggat 780

ctcgacacca ctcccacggt ggcgttcttc aactccgcgg ttgaagaaaa tcgcccgcgg 840

ggattcagta agttgtggtt gcgccttcaa gcgtggacct tcgtgcccgt gacgtccggt 900

atggttttgt tcttctggat gttcgtcttg caccgcgta acgcgctgcg acgcaaaagc 960

ttcgaagaag cggcttggat gttttccgcg cacgtcattc gcacggcggt tatcaaagcc 1020

gtcacggct actcctggat cgctcgtac ggcttgttcg cggcgacgat gtgggcgagc 1080

ggatgttact tgttcgca cttttccacg tctcacacgc acttggatgt cgtgccgagc 1140

gataaacacc tctcgtgggt gcgatacgcc gtcgatacaca cgatcgacat caatccgaac 1200

aacagcgtcg tcaactggtt gatgggctac ttgaactgcc aagtcacca tcacctgttc 1260

ccggatatgc ctcagttccg ccaacccgaa gtctccgcc gattcgtccc gtttgcaag 1320

aagtggaact taaactacaa ggtcttgacg tattatgggg cctggaagc gacgttcggc 1380

aacttgaacg acgtcgggaa gcactattac gtgcacggat ctcagcgcgt caaatcaaag 1440

tcggcgtga 1449

<210> 11

<211> 1449

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Codon-optimized open reading frame for expression of *Ostreococcus*

lucimarinus 6-desaturase in plants

<400> 11

atgtgtgttg agactactga gggaacctct agaactatgg ctaacgagag gacctcttct 60

tcttcttcac tctctgaggg tggaactcct actgttactg tgggaatggg atctgaggat 120

gctggaaaga aaaccagaaa cgcttctgtt actgcttggc ccaaagagct tgagcctcac 180

gctatcgcta agaccttcga gagaagatac gttaccatcg aggtgttga gtacgatgtg 240

accgatttca aacaccttgg tggatctgtg atctactaca tgctctctaa cactggtgct 300

gatgctactg aggccttcaa agagtccac taccgttcta agaaggctag aaaggctctt 360

gtctctcttc ctcaaacgc tgttgatgct gctactagag agcctattga ggacgaggct 420

atgcttaagg atttcgctca gtggagaaaa gagttggaga gagagggatt cttcaagcct 480

tctctgctc atgttgctta ccgttctgct gaactcgtg ctatgttcgc tcttgaacc 540

gtctttatgc atgctagatg gcacgttgc agcgttatcg tgtactcctg tttcttcgga 600

gctagatgtg gatgggttca acatgagggt ggacacaact ctcttaccgg aaacatctgg 660

tgggataaga gaatccaagc tttcgtctgt ggattcggac ttgcttcttc tggtagacatg 720
tggaacaaca tgcacaacaa gcaccatgct actcctcaga aagttagaca cgatatggat 780

cttgatacca ccctaccgt tgccttcttc aactctgctg tggaggaaaa cagacctagg 840
ggattctcta agctttggct cagacttcaa gcttggacct tcgttctgt tacctctgga 900
atggtgctct tcttctggat gttcgttctc cactctagaa acgctctccg tcgtaagtct 960
ttcgaagagg ctgcttggat gttctctgct cagcttatca gaaccgctgt tatcaaggct 1020
gttaccggat actcttggat cgctagctac ggacttttcg ctgctactat gtgggcttct 1080
ggatgctacc ttttcgtca cttctctact tctcacaccc acctcgatgt tgttccatct 1140
gataagcacc ttagctgggt taggtacgct gttgatcaca ccatcgacat caaccctaac 1200

aactctgttg tgaactggct tatgggatac cttaactgcc aggttatcca ccatctcttc 1260
cctgatatgc ctcaattcag acagcctgag gtgtcaagaa gattcgtccc tttcgttaag 1320
aagtgaacc tcaactacaa ggtgctcact tactacggtg cttggaaggc tactttcgga 1380
aacctcaacg atgttggaaa gcactactac gttcacggat ctcagagagt gaagagcaag 1440
agcgcttga 1449

<210> 12

<211> 482

<212> PRT

<213> *Ostreococcus lucimarinus*

<400> 12

Met Cys Val Glu Thr Thr Glu Gly Thr Ser Arg Thr Met Ala Asn Glu

1 5 10 15
Arg Thr Ser Ser Ser Ser Ser Leu Ser Glu Gly Gly Thr Pro Thr Val
20 25 30
Thr Val Gly Met Gly Ser Glu Asp Ala Gly Lys Lys Thr Arg Asn Ala
35 40 45
Ser Val Thr Ala Trp Thr Lys Glu Leu Glu Pro His Ala Ile Ala Lys
50 55 60
Thr Phe Glu Arg Arg Tyr Val Thr Ile Glu Gly Val Glu Tyr Asp Val

65 70 75 80
Thr Asp Phe Lys His Pro Gly Gly Ser Val Ile Tyr Tyr Met Leu Ser
85 90 95

Asn Thr Gly Ala Asp Ala Thr Glu Ala Phe Lys Glu Phe His Tyr Arg
 100 105 110
 Ser Lys Lys Ala Arg Lys Ala Leu Ala Ala Leu Pro His Lys Pro Val
 115 120 125
 Asp Ala Ala Thr Arg Glu Pro Ile Glu Asp Glu Ala Met Leu Lys Asp
 130 135 140
 Phe Ala Gln Trp Arg Lys Glu Leu Glu Arg Glu Gly Phe Phe Lys Pro
 145 150 155 160
 Ser Pro Ala His Val Ala Tyr Arg Phe Ala Glu Leu Ala Ala Met Phe
 165 170 175
 Ala Leu Gly Thr Ala Leu Met His Ala Arg Trp His Val Ala Ser Val
 180 185 190
 Ile Val Tyr Ser Cys Phe Phe Gly Ala Arg Cys Gly Trp Val Gln His
 195 200 205
 Glu Gly Gly His Asn Ser Leu Thr Gly Asn Ile Trp Trp Asp Lys Arg
 210 215 220
 Ile Gln Ala Phe Ala Ala Gly Phe Gly Leu Ala Ser Ser Gly Asp Met
 225 230 235 240
 Trp Asn Asn Met His Asn Lys His His Ala Thr Pro Gln Lys Val Arg
 245 250 255
 His Asp Met Asp Leu Asp Thr Thr Pro Thr Val Ala Phe Phe Asn Ser
 260 265 270
 Ala Val Glu Glu Asn Arg Pro Arg Gly Phe Ser Lys Leu Trp Leu Arg
 275 280 285
 Leu Gln Ala Trp Thr Phe Val Pro Val Thr Ser Gly Met Val Leu Phe
 290 295 300
 Phe Trp Met Phe Val Leu His Pro Arg Asn Ala Leu Arg Arg Lys Ser
 305 310 315 320
 Phe Glu Glu Ala Ala Trp Met Phe Ser Ala His Val Ile Arg Thr Ala
 325 330 335
 Val Ile Lys Ala Val Thr Gly Tyr Ser Trp Ile Ala Ser Tyr Gly Leu

340 345 350
 Phe Ala Ala Thr Met Trp Ala Ser Gly Cys Tyr Leu Phe Ala His Phe
 355 360 365
 Ser Thr Ser His Thr His Leu Asp Val Val Pro Ser Asp Lys His Leu
 370 375 380
 Ser Trp Val Arg Tyr Ala Val Asp His Thr Ile Asp Ile Asn Pro Asn

 385 390 395 400
 Asn Ser Val Val Asn Trp Leu Met Gly Tyr Leu Asn Cys Gln Val Ile
 405 410 415
 His His Leu Phe Pro Asp Met Pro Gln Phe Arg Gln Pro Glu Val Ser
 420 425 430
 Arg Arg Phe Val Pro Phe Ala Lys Lys Trp Asn Leu Asn Tyr Lys Val
 435 440 445
 Leu Thr Tyr Tyr Gly Ala Trp Lys Ala Thr Phe Gly Asn Leu Asn Asp

 450 455 460
 Val Gly Lys His Tyr Tyr Val His Gly Ser Gln Arg Val Lys Ser Lys
 465 470 475 480
 Ser Ala

<210> 13

<211> 456

<212> PRT

<213> *Ostreococcus tauri*

<400> 13

Met Cys Val Glu Thr Glu Asn Asn Asp Gly Ile Pro Thr Val Glu Ile
 1 5 10 15
 Ala Phe Asp Gly Glu Arg Glu Arg Ala Glu Ala Asn Val Lys Leu Ser
 20 25 30

 Ala Glu Lys Met Glu Pro Ala Ala Leu Ala Lys Thr Phe Ala Arg Arg
 35 40 45
 Tyr Val Val Ile Glu Gly Val Glu Tyr Asp Val Thr Asp Phe Lys His
 50 55 60

Pro Gly Gly Thr Val Ile Phe Tyr Ala Leu Ser Asn Thr Gly Ala Asp
65 70 75 80
Ala Thr Glu Ala Phe Lys Glu Phe His His Arg Ser Arg Lys Ala Arg
85 90 95
Lys Ala Leu Ala Ala Leu Pro Ser Arg Pro Ala Lys Thr Ala Lys Val
100 105 110
Asp Asp Ala Glu Met Leu Gln Asp Phe Ala Lys Trp Arg Lys Glu Leu
115 120 125
Glu Arg Asp Gly Phe Phe Lys Pro Ser Pro Ala His Val Ala Tyr Arg
130 135 140
Phe Ala Glu Leu Ala Ala Met Tyr Ala Leu Gly Thr Tyr Leu Met Tyr
145 150 155 160
Ala Arg Tyr Val Val Ser Ser Val Leu Val Tyr Ala Cys Phe Phe Gly
165 170 175
Ala Arg Cys Gly Trp Val Gln His Glu Gly Gly His Ser Ser Leu Thr
180 185 190
Gly Asn Ile Trp Trp Asp Lys Arg Ile Gln Ala Phe Thr Ala Gly Phe
195 200 205
Gly Leu Ala Gly Ser Gly Asp Met Trp Asn Ser Met His Asn Lys His
210 215 220
His Ala Thr Pro Gln Lys Val Arg His Asp Met Asp Leu Asp Thr Thr
225 230 235 240
Pro Ala Val Ala Phe Phe Asn Thr Ala Val Glu Asp Asn Arg Pro Arg
245 250 255
Gly Phe Ser Lys Tyr Trp Leu Arg Leu Gln Ala Trp Thr Phe Ile Pro
260 265 270
Val Thr Ser Gly Leu Val Leu Leu Phe Trp Met Phe Phe Leu His Pro
275 280 285
Ser Lys Ala Leu Lys Gly Gly Lys Tyr Glu Glu Leu Val Trp Met Leu
290 295 300
Ala Ala His Val Ile Arg Thr Trp Thr Ile Lys Ala Val Thr Gly Phe

305 310 315 320
 Thr Ala Met Gln Ser Tyr Gly Leu Phe Leu Ala Thr Ser Trp Val Ser
 325 330 335
 Gly Cys Tyr Leu Phe Ala His Phe Ser Thr Ser His Thr His Leu Asp
 340 345 350

Val Val Pro Ala Asp Glu His Leu Ser Trp Val Arg Tyr Ala Val Asp
 355 360 365
 His Thr Ile Asp Ile Asp Pro Ser Gln Gly Trp Val Asn Trp Leu Met
 370 375 380
 Gly Tyr Leu Asn Cys Gln Val Ile His His Leu Phe Pro Ser Met Pro
 385 390 395 400
 Gln Phe Arg Gln Pro Glu Val Ser Arg Arg Phe Val Ala Phe Ala Lys
 405 410 415

Lys Trp Asn Leu Asn Tyr Lys Val Met Thr Tyr Ala Gly Ala Trp Lys
 420 425 430
 Ala Thr Leu Gly Asn Leu Asp Asn Val Gly Lys His Tyr Tyr Val His
 435 440 445
 Gly Gln His Ser Gly Lys Thr Ala
 450 455

<210> 14

<211> 894

<212> DNA

<213> *Pyramimonas cordata*

<400> 14

atggagttcg ctcagcctct tgtggctatg gcacaggagc agtatgccgc aattgacgcg 60
 gtggtagccc ctgcaatttt ctcagctacc gacagcatcg gttgggggtct taagccatt 120

agcagcgcca caaaggatct tcctctcggt gagagtccga cgccgctcat actgagcctg 180
 ttggcctatt ttgcgatcgt cggctctggg ctggtgtacc gcaaagtatt ccctgcaca 240
 gtaaaggggc aagacccttt cctgctgaag gcgctcatgc ttgcgcacaa cgtgttcctc 300
 attggcctca gtctatacat gtgcttgaag cttgtctacg aggcttacgt caacaagtac 360
 tccttctggg gaaacgccta caaccccgca cagaccgaga tggcgaaggt catctggatt 420
 ttctacgtct ccaagatcta tgagttcatg gacacgttca tcatgctctt gaagggaac 480

gtcaaccagg tccttttctt gcatgtgtac catcatggct ccatctctgg tatctggtgg 540

atgatcacct acgtgcccc tggcgggtgac gcgtacttct cggcggcgct caactcgtgg 600

gtgcacgtgt gcatgtacac gtactacttc atggcggcgg tgctgcccac ggacgagaag 660

accaagcgca agtacctctg gtggggccgc tacctgaccc agatgcagat gttccagttc 720

ttcatgaacc tgctccagge ggtctacctc ctctactcct ctagccccta ccccaagtcc 780

atgcccagc tgctggtggt gtacatggtc acgtgctga tgctcttcgg caactcttac 840

tacatgaagc accacgcgag caagaagcag aagctggcca gcaagaagca gtag 894

<210> 15

<211> 870

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Codon-optimized open reading frame for expression of Pyramimonas
cordata 6 elongase in plants (truncated at 3' end and encoding
functional elongase) (version 1)

<400> 15

atggaattcg cccagcctct tgttgctatg gctcaagagc aatacgtgc tatcgatgct 60

gttggtgctc ctgtatcttt ctctgctact gattctatcg gatggggact taagcctatc 120

tcttctgcta ctaaggactt gcctcttggt gagtctccta cactctcat ctttctttg 180

cttgcttact tcgtatcgt tggatctgga ctggtttaca gaaaggtttt ccctagaacc 240

gtgaaggagc aagatccatt cttttgaag gctcttatgc ttgctcaca cgtgttcctt 300

atcggaattt ctctttacat gtgcctcaag ctgtgtacg aggcctacgt taacaagtac 360

tcttctggg gaaacgctta caacctgct caaactgaga tggetaaggt tatctggatc 420

ttctacgtga gcaagatcta cgagttcatg gatacttca tcatgctcct caagggaat 480

gttaaccagg ttagcttctt tcacgtttac catcacggat ctatctctgg aatctggtgg 540

atgattactt acgtgctcc tgggtggtgat gcttacttct ctgctgctct taactcttgg 600

gttcacgtgt gtatgtacac ctactatttt atggctgccg tgcttcctaa ggacgagaaa 660

actaagagaa agtacctctg gtggggaaga taccttactc aatgcagat gttccagttc 720

ttcatgaacc ttctccagge tggttacctt ctctactctt catctcctta ccctaagttt 780

atgctcagc tctcgtggt gtacatggtt actcttctca tgcttttcgg aaactcttac 840

tacatgaagc accacgctag caagtatga 870

<210> 16

<211> 297

<212> PRT

<213> *Pyramimonas cordata*

<400> 16

Met Glu Phe Ala Gln Pro Leu Val Ala Met Ala Gln Glu Gln Tyr Ala

1 5 10 15

Ala Ile Asp Ala Val Val Ala Pro Ala Ile Phe Ser Ala Thr Asp Ser

20 25 30

Ile Gly Trp Gly Leu Lys Pro Ile Ser Ser Ala Thr Lys Asp Leu Pro

35 40 45

Leu Val Glu Ser Pro Thr Pro Leu Ile Leu Ser Leu Leu Ala Tyr Phe

50 55 60

Ala Ile Val Gly Ser Gly Leu Val Tyr Arg Lys Val Phe Pro Arg Thr

65 70 75 80

Val Lys Gly Gln Asp Pro Phe Leu Leu Lys Ala Leu Met Leu Ala His

85 90 95

Asn Val Phe Leu Ile Gly Leu Ser Leu Tyr Met Cys Leu Lys Leu Val

100 105 110

Tyr Glu Ala Tyr Val Asn Lys Tyr Ser Phe Trp Gly Asn Ala Tyr Asn

115 120 125

Pro Ala Gln Thr Glu Met Ala Lys Val Ile Trp Ile Phe Tyr Val Ser

130 135 140

Lys Ile Tyr Glu Phe Met Asp Thr Phe Ile Met Leu Leu Lys Gly Asn

145 150 155 160

Val Asn Gln Val Ser Phe Leu His Val Tyr His His Gly Ser Ile Ser

165 170 175

Gly Ile Trp Trp Met Ile Thr Tyr Ala Ala Pro Gly Gly Asp Ala Tyr

180 185 190

Phe Ser Ala Ala Leu Asn Ser Trp Val His Val Cys Met Tyr Thr Tyr

195 200 205

Tyr Phe Met Ala Ala Val Leu Pro Lys Asp Glu Lys Thr Lys Arg Lys

210 215 220
 Tyr Leu Trp Trp Gly Arg Tyr Leu Thr Gln Met Gln Met Phe Gln Phe
 225 230 235 240
 Phe Met Asn Leu Leu Gln Ala Val Tyr Leu Leu Tyr Ser Ser Ser Pro
 245 250 255
 Tyr Pro Lys Phe Ile Ala Gln Leu Leu Val Val Tyr Met Val Thr Leu
 260 265 270

 Leu Met Leu Phe Gly Asn Phe Tyr Tyr Met Lys His His Ala Ser Lys
 275 280 285
 Lys Gln Lys Leu Ala Ser Lys Lys Gln
 290 295
 <210> 17
 <211> 288
 <212> PRT
 <213> *Pyramimonas cordata*
 <400> 17
 Met Glu Phe Ala Gln Pro Leu Val Ala Met Ala Gln Glu Gln Tyr Ala
 1 5 10 15
 Ala Ile Asp Ala Val Val Ala Pro Ala Ile Phe Ser Ala Thr Asp Ser
 20 25 30

 Ile Gly Trp Gly Leu Lys Pro Ile Ser Ser Ala Thr Lys Asp Leu Pro
 35 40 45
 Leu Val Glu Ser Pro Thr Pro Leu Ile Leu Ser Leu Leu Ala Tyr Phe
 50 55 60
 Ala Ile Val Gly Ser Gly Leu Val Tyr Arg Lys Val Phe Pro Arg Thr
 65 70 75 80
 Val Lys Gly Gln Asp Pro Phe Leu Leu Lys Ala Leu Met Leu Ala His
 85 90 95

 Asn Val Phe Leu Ile Gly Leu Ser Leu Tyr Met Cys Leu Lys Leu Val
 100 105 110
 Tyr Glu Ala Tyr Val Asn Lys Tyr Ser Phe Trp Gly Asn Ala Tyr Asn
 115 120 125

Pro Ala Gln Thr Glu Met Ala Lys Val Ile Trp Ile Phe Tyr Val Ser
130 135 140

Lys Ile Tyr Glu Phe Met Asp Thr Phe Ile Met Leu Leu Lys Gly Asn
145 150 155 160

Val Asn Gln Val Ser Phe Leu His Val Tyr His His Gly Ser Ile Ser
165 170 175

Gly Ile Trp Trp Met Ile Thr Tyr Ala Ala Pro Gly Gly Asp Ala Tyr
180 185 190

Phe Ser Ala Ala Leu Asn Ser Trp Val His Val Cys Met Tyr Thr Tyr
195 200 205

Tyr Phe Met Ala Ala Val Leu Pro Lys Asp Glu Lys Thr Lys Arg Lys
210 215 220

Tyr Leu Trp Trp Gly Arg Tyr Leu Thr Gln Met Gln Met Phe Gln Phe
225 230 235 240

Phe Met Asn Leu Leu Gln Ala Val Tyr Leu Leu Tyr Ser Ser Ser Pro
245 250 255

Tyr Pro Lys Phe Ile Ala Gln Leu Leu Val Val Tyr Met Val Thr Leu
260 265 270

Leu Met Leu Phe Gly Asn Phe Tyr Tyr Met Lys His His Ala Ser Lys
275 280 285

<210> 18

<211> 1278

<212> DNA

<213> Pavlova salina

<400> 18

atgccgccgc gcgatagcta ctcgtacgcc gccccgccgt cggcccagct gcacgaggtc	60
gataccccgc aggagcatga taagaaggag ctcgtcatcg gtgaccgcgc gtacgacgtg	120
accaactttg tgaagcgcca cccgggtggc aagatcatcg cataccaggt tggcacagat	180
gcgacggacg cgtacaagca gttccatgtg cggctctgcca aggcggacaa gatgctcaag	240
tcgtgcctt cgcgcccgtt gcacaagggc tactcgcccc gccgcgtga cctcattgcc	300
gacttccagg agttcaccaa gcagctggag gcggagggca tgtttgagcc gtcgctgccg	360

cacgtggcat accgcctggc ggaggtgatc gcgatgcacg tggccggcgc cgcgctcatc 420
 tggcacgggt acaccttcgc gggcattgcc atgctcggcg ttgtgcaggg ccgctgcggc 480
 tggctcatgc acgagggcgg ccactactcg ctacacggga acattgcttt tgaccgtgcc 540
 atccaagtgc cgtgctacgg ccttggctgc ggcatgtcgg gcgctgggtg gcgcaaccag 600
 cacaacaagc accacgcgac gccgcagaag ttgcagcacg acgtcgacct cgacaccctc 660
 ccgctcgtcg ccttccacga gcggatagcc gccaaggtga agagccccgc gatgaaggcg 720
 tggcttagta tgcaggcgaa gctcttcgcg ccagtgaacca cgctgctggt cgcgctgggc 780

tggcagctgt acctgcaccc gcgccatatg ctgcgcacca agcactacga cgagctcgcg 840
 atgctcggca ttgcctacgg ccttctcggc tacctcgcgg cgaactacgg cgcggggtac 900
 gtgctcgcgt gctacctgct gtacgtgcag ctcggcgcca tgtacatctt ctgcaacttt 960
 gccgtgtcgc acacacacct gccggttctc gagcctaacg agcacgcaac gtgggtggag 1020
 tacgcccgga accacacgac caactgctcg cctcgtggt ggtgcgactg gtggatgtcg 1080
 tacctcaact accagatcga gcaccacctc taccctcca tgccgcagtt ccgccaccg 1140
 aagattgcgc cgcgggtgaa gcagctcttc gagaagcacg gcctgcaacta cgacgtgcgt 1200

ggctacttgc aggccatggc ggacacgttt gccaaccttg acaacgtcgc gcacgcgccg 1260
 gagaagaaga tgcagtga 1278

<210> 19

<211> 1281

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Codon-optimized open reading frame for expression of Pavlova
 salina 5 desaturase in plants (version 1)

<400> 19

atgcctccaa gggactctta ctcttatgct gctcctcctt ctgctcaact tcacgaagtt 60
 gatactctc aagagcacga caagaagag cttgttatcg gagatagggc ttacgatgtt 120
 accaacttcg ttaagagaca ccctggtgga aagatcattg cttaccaagt tggaactgat 180
 gctaccgatg cttacaagca gttccatgtt agatctgcta aggctgacaa gatgcttaag 240
 tctcttcctt ctgctcctgt tcacaaggga tactctccaa gaagggtga tcttatcgct 300
 gatttccaag agttcaccaa gcaacttgag gctgaggga tgttcgagcc ttctcttctt 360
 catgttgctt acagacttgc tgaggttatc gctatgcatg ttgctggtgc tgctcttatc 420
 tggcatggat acactttcgc tggaatcgct atgcttggag ttgttcaggg aagatgtgga 480

tggttatgc atgagggtgg acattactct ctcactggaa acattgcttt cgacagagct 540

atccaagttg cttgttacgg acttgatgt ggaatgtctg gtgcttggtg gcgtaaccag 600

cataacaagc accatgtac tcctcaaaag cttcagcacg atgttgatct tgataccctt 660

cctctcggtt ctttccatga gagaatcgct gctaagggtta agtctcctgc tatgaaggct 720

tggttttcta tgcaagctaa gcttttcgct cctgttacca ctcttcttgt tgctcttgga 780

tggcagcttt accttcatcc tagacacatg ctcaggacta agcactacga tgagcttgct 840

atgctcggaa tcagatacgg acttggttga taccttgctg ctaactacgg tgctggatac 900

gttctcgctt gttaccttct ttacgttcag ctggagctta tgtacatctt ctgcaacttc 960

gctgtttctc atactcacct ccctgttggt gagcctaacg agcatgtac ttgggttgag 1020

tacgttgcta accacactac taactgttct ccatcttggt ggtgtgattg gtggatgtct 1080

taccttaact accagatcga gcaccacctt tacccttcta tgctcaatt cagacacctt 1140

aagatcgctc ctagagttaa gcagcttttc gagaagcacg gacttcacta cgatgttaga 1200

ggatacttcg aggctatggc tgatactttc gctaaccttg ataacgttgc ccatgtctct 1260

gagaagaaaa tgcagtaatg a 1281

<210> 20

<211> 425

<212> PRT

<213> Pavlova salina

<400> 20

Met Pro Pro Arg Asp Ser Tyr Ser Tyr Ala Ala Pro Pro Ser Ala Gln

1 5 10 15

Leu His Glu Val Asp Thr Pro Gln Glu His Asp Lys Lys Glu Leu Val

20 25 30

Ile Gly Asp Arg Ala Tyr Asp Val Thr Asn Phe Val Lys Arg His Pro

35 40 45

Gly Gly Lys Ile Ile Ala Tyr Gln Val Gly Thr Asp Ala Thr Asp Ala

50 55 60

Tyr Lys Gln Phe His Val Arg Ser Ala Lys Ala Asp Lys Met Leu Lys

65 70 75 80

Ser Leu Pro Ser Arg Pro Val His Lys Gly Tyr Ser Pro Arg Arg Ala

85 90 95

Asp Leu Ile Ala Asp Phe Gln Glu Phe Thr Lys Gln Leu Glu Ala Glu
 100 105 110
 Gly Met Phe Glu Pro Ser Leu Pro His Val Ala Tyr Arg Leu Ala Glu
 115 120 125

 Val Ile Ala Met His Val Ala Gly Ala Ala Leu Ile Trp His Gly Tyr
 130 135 140
 Thr Phe Ala Gly Ile Ala Met Leu Gly Val Val Gln Gly Arg Cys Gly
 145 150 155 160
 Trp Leu Met His Glu Gly Gly His Tyr Ser Leu Thr Gly Asn Ile Ala
 165 170 175
 Phe Asp Arg Ala Ile Gln Val Ala Cys Tyr Gly Leu Gly Cys Gly Met
 180 185 190

 Ser Gly Ala Trp Trp Arg Asn Gln His Asn Lys His His Ala Thr Pro
 195 200 205
 Gln Lys Leu Gln His Asp Val Asp Leu Asp Thr Leu Pro Leu Val Ala
 210 215 220
 Phe His Glu Arg Ile Ala Ala Lys Val Lys Ser Pro Ala Met Lys Ala
 225 230 235 240
 Trp Leu Ser Met Gln Ala Lys Leu Phe Ala Pro Val Thr Thr Leu Leu
 245 250 255

 Val Ala Leu Gly Trp Gln Leu Tyr Leu His Pro Arg His Met Leu Arg
 260 265 270
 Thr Lys His Tyr Asp Glu Leu Ala Met Leu Gly Ile Arg Tyr Gly Leu
 275 280 285
 Val Gly Tyr Leu Ala Ala Asn Tyr Gly Ala Gly Tyr Val Leu Ala Cys
 290 295 300
 Tyr Leu Leu Tyr Val Gln Leu Gly Ala Met Tyr Ile Phe Cys Asn Phe
 305 310 315 320

 Ala Val Ser His Thr His Leu Pro Val Val Glu Pro Asn Glu His Ala
 325 330 335
 Thr Trp Val Glu Tyr Ala Ala Asn His Thr Thr Asn Cys Ser Pro Ser

340 345 350
 Trp Trp Cys Asp Trp Trp Met Ser Tyr Leu Asn Tyr Gln Ile Glu His
 355 360 365
 His Leu Tyr Pro Ser Met Pro Gln Phe Arg His Pro Lys Ile Ala Pro
 370 375 380

Arg Val Lys Gln Leu Phe Glu Lys His Gly Leu His Tyr Asp Val Arg
 385 390 395 400
 Gly Tyr Phe Glu Ala Met Ala Asp Thr Phe Ala Asn Leu Asp Asn Val
 405 410 415
 Ala His Ala Pro Glu Lys Lys Met Gln
 420 425

<210> 21

<211> 1329

<212> DNA

<213> *Pyramimonas cordata*

<400> 21

atgggaaagg gaggcaatgc tagcgtcct actgcgaaga aggaggtgtt gatcgagggg 60
 aagttttacg atgtcaccga cttcaggcac cccggtgggt cgatcatcaa gtttctctcg 120

ggttctggtg ctgacgccac cgcttctctac cgcgagtcc acgttaggtc agcgaaggca 180
 gacaagtctt tgaagacgct gccctccgc gaagccactc cccaggagct gaagcaggcg 240
 gttgagttct ccaagctcaa cccgccctcc gcggagagtg cctctgctcc cctgaccgac 300
 ctgccaagg tggaagcgt gaacaaggac ttcgaggtt tccgtgagca gtcattcag 360
 gagggcttct ttaagcccaa tatccgcat gtggtcaagc gcatcacgga agtcgtggcg 420
 atgatggcgg tagcctctg gatgatggtg cagaccaacg ctcttggtgt gaccctcgga 480
 gttctgatec gcggcattgc acagggccgg tgcggttgge ttatgcacga gggcggccac 540

tatagtctta ctgggaagat ctccattgat aggcgtctgc aggagtcaat ttacggattc 600
 ggctgtggaa tgtccggcgc ctggtggcgc aaccagcaca acaagcacca cgcaacccca 660
 cagaagctgc agcatgacgt cgacctggag acccttctc tgatggcttt caacaacgt 720
 gttaccgata gacgcaaggt gaagcctggt agtctccagg ctctgtggct caagtaccag 780
 gccttctct ttttcccggt gacctcctt ctggtcggcc tcggttgga caccgtctc 840
 caccacaggc acagcttgcg caccaagcac tatttcgagc tgctctgcat ggctgctct 900

tacgcgagtt tcgtgctctt ttctgctccc aagtacggac ttgcaggagc tgccgggctc 960

tacctgcca ccttcgctgt cgggtgcaac tatattttca tcaacttctc ggtctctcac 1020
actcacctgc ccgtgagcgg tgcgagcgag tacctgcatt gggctcgtga ttccggccatc 1080
cacaccacta acatcaaata cagcatgctg tgcgattggt ggatgtcatt cctcaacttc 1140
cagatcgagc atcacctgtt cccctcaatg ccccgattcc gccacaagat tatctccccg 1200
cgtgtaaagg ccttgtttga gaagcacggt cttgtgtatg atgtgcgccc ctattggggg 1260
gccatggctg acaccttcaa gaacttgaat gacgttggca ctcacgcac tcactccaag 1320
gcgcactag 1329

<210> 22

<211> 442

<212> PRT

<213> *Pyramimonas cordata*

<400> 22

Met Gly Lys Gly Gly Asn Ala Ser Ala Pro Thr Ala Lys Lys Glu Val

1 5 10 15

Leu Ile Glu Gly Lys Phe Tyr Asp Val Thr Asp Phe Arg His Pro Gly

20 25 30

Gly Ser Ile Ile Lys Phe Leu Ser Gly Ser Gly Ala Asp Ala Thr Ala

35 40 45

Ser Tyr Arg Glu Phe His Val Arg Ser Ala Lys Ala Asp Lys Phe Leu

50 55 60

Lys Thr Leu Pro Ser Arg Glu Ala Thr Pro Gln Glu Leu Lys Gln Ala

65 70 75 80

Val Glu Phe Ser Lys Leu Asn Pro Pro Ser Ala Glu Ser Ala Ser Ala

85 90 95

Pro Leu Thr Asp Leu Ala Lys Val Glu Ala Leu Asn Lys Asp Phe Glu

100 105 110

Ala Phe Arg Glu Gln Leu Ile Gln Glu Gly Phe Phe Lys Pro Asn Ile

115 120 125

Pro His Val Val Lys Arg Ile Thr Glu Val Val Ala Met Met Ala Val

130 135 140

Ala Ser Trp Met Met Val Gln Thr Asn Ala Leu Val Val Thr Leu Gly
145 150 155 160
Val Leu Ile Arg Gly Ile Ala Gln Gly Arg Cys Gly Trp Leu Met His
165 170 175
Glu Gly Gly His Tyr Ser Leu Thr Gly Lys Ile Ser Ile Asp Arg Arg
180 185 190
Leu Gln Glu Ser Ile Tyr Gly Phe Gly Cys Gly Met Ser Gly Ala Trp
195 200 205
Trp Arg Asn Gln His Asn Lys His His Ala Thr Pro Gln Lys Leu Gln
210 215 220
His Asp Val Asp Leu Glu Thr Leu Pro Leu Met Ala Phe Asn Asn Ala
225 230 235 240
Val Thr Asp Arg Arg Lys Val Lys Pro Gly Ser Leu Gln Ala Leu Trp
245 250 255
Leu Lys Tyr Gln Ala Phe Leu Phe Phe Pro Val Thr Ser Leu Leu Val
260 265 270
Gly Leu Gly Trp Thr Thr Val Leu His Pro Arg His Ser Leu Arg Thr
275 280 285
Lys His Tyr Phe Glu Leu Leu Cys Met Ala Ala Arg Tyr Ala Ser Phe
290 295 300
Ala Ala Leu Phe Ala Pro Lys Tyr Gly Leu Ala Gly Ala Ala Gly Leu
305 310 315 320
Tyr Leu Ala Thr Phe Ala Val Gly Cys Asn Tyr Ile Phe Ile Asn Phe
325 330 335
Ser Val Ser His Thr His Leu Pro Val Ser Gly Ala Ser Glu Tyr Leu
340 345 350
His Trp Val Val Tyr Ser Ala Ile His Thr Thr Asn Ile Lys Ser Ser
355 360 365
Met Leu Cys Asp Trp Trp Met Ser Phe Leu Asn Phe Gln Ile Glu His
370 375 380
His Leu Phe Pro Ser Met Pro Gln Phe Arg His Lys Ile Ile Ser Pro

385 390 395 400
 Arg Val Lys Ala Leu Phe Glu Lys His Gly Leu Val Tyr Asp Val Arg
 405 410 415
 Pro Tyr Trp Gly Ala Met Ala Asp Thr Phe Lys Asn Leu Asn Asp Val
 420 425 430
 Gly Thr His Ala Ser His Ser Lys Ala His
 435 440

<210> 23

<211> 804

<212> DNA

<213> *Pyramimonas cordata*

<400> 23

atggcgtcta ttgcgattcc ggctgcgctg gcagggactc ttggttatgt gacgtacaat 60
 gtgcgaaacc cagatatcc tgcacccgag aaggtgcctg cttactttat gcaggtcgag 120
 tattgggggc caacgattgg gaccatcggt tatcttctgt tcatctactt tggtaaaccg 180
 attatgcaaa acaggagcca gccgtttggc ctgaagaacg ctatgctggt gtacaacttc 240
 tatcagactt tcttcaactc gtactgcata tacctttttg tcacgtcgca ccgcgctcag 300
 gggctgaaag ttiggggaaa catccccgat atgactgcca acagctgggg gatctcacag 360

gtgatctggc tgcactacaa caacaagtac gttgagctgc tggacacgtt cttcatggtc 420
 atgcgcaaga agtttgacca gctttcgctc ctgcacatct accatcatac cctgttgatc 480
 tggctcttgg tctgttgatg gaaattggag cccgttgggg actgctactt tggctctagc 540
 gtcaaacagt ttgtgcacgt cattatgtac tctactatg gccttgccgc gctcgggggtg 600
 aattgcttct ggaagaagta cattacgcag attcagatgc tgcagttctg tatctgcgct 660
 tcgactcgca ttatataccg ctatgtgcag aacaccgcgt tctggttgcc ttacttgagc 720
 ctgtgggtga tggatgaacat gttcgtgttg ttccccaact tctatcgcaa gcgctacaag 780

agcaagggtg ccaagaagca gtaa 804

<210> 24

<211> 807

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Codon-optimized open reading frame for expression of *Pyramimonas*
cordata 5' elongase in plants (version 1)

<400> 24

atggcctcta tcgctatccc tgcctctctt gctggaactc ttggatacgt tacctacaat	60
gtggctaacc ctgatatccc agcttctgag aaagttcctg cttacttcat gcaggttgag	120
tactggggac ctactatcgg aactattgga tacctcctct tcatctactt cggaaagcgt	180
atcatgcaga acagatctca acctttcgga ctcaagaacg ctatgctcgt ttacaacttc	240
taccagacct tcttcaacag ctactgcac taccttttcg ttactttctca tagggctcag	300
ggacttaagg ttgggggaaa catccctgat atgactgcta actcttgggg aatctctcag	360
gttatctggc ttactacaa caacaagtac gttgagcttc tcgacacctt cttcatggtg	420
atgaggaaga agttcgacca gctttcttct cttcacatct accaccacac tcttctcatc	480
tggatcatggt tcgttggtat gaagcttgag cctgttggag attgctactt cggatcttct	540
gttaaacct tcgtgcacgt gatcatgtac tcttactacg gacttgctgc tcttggagtt	600
aactgtttct ggaagaagta catcaccag atccagatgc ttcagttctg tatctgtgct	660
tctcactcta tctacaccgc ttacgttcag aataccgctt tctggcttcc ttaccttcaa	720
ctctgggtta tggatgaacat gttcgttctc ttgcgaact tctaccgtaa gaggtacaag	780
tctaagggtg ctaagaagca gtgataa	807

<210> 25

<211> 267

<212> PRT

<213> *Pyramimonas cordata*

<400> 25

Met Ala Ser Ile Ala Ile Pro Ala Ala Leu Ala Gly Thr Leu Gly Tyr

1	5	10	15
---	---	----	----

Val Thr Tyr Asn Val Ala Asn Pro Asp Ile Pro Ala Ser Glu Lys Val

20	25	30
----	----	----

Pro Ala Tyr Phe Met Gln Val Glu Tyr Trp Gly Pro Thr Ile Gly Thr

35	40	45
----	----	----

Ile Gly Tyr Leu Leu Phe Ile Tyr Phe Gly Lys Arg Ile Met Gln Asn

50	55	60
----	----	----

Arg Ser Gln Pro Phe Gly Leu Lys Asn Ala Met Leu Val Tyr Asn Phe

65	70	75	80
----	----	----	----

Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Ser Tyr Cys Ile Tyr Leu Phe Val Thr Ser

85 90 95
His Arg Ala Gln Gly Leu Lys Val Trp Gly Asn Ile Pro Asp Met Thr
100 105 110
Ala Asn Ser Trp Gly Ile Ser Gln Val Ile Trp Leu His Tyr Asn Asn
115 120 125
Lys Tyr Val Glu Leu Leu Asp Thr Phe Phe Met Val Met Arg Lys Lys
130 135 140

Phe Asp Gln Leu Ser Phe Leu His Ile Tyr His His Thr Leu Leu Ile
145 150 155 160
Trp Ser Trp Phe Val Val Met Lys Leu Glu Pro Val Gly Asp Cys Tyr
165 170 175
Phe Gly Ser Ser Val Asn Thr Phe Val His Val Ile Met Tyr Ser Tyr
180 185 190
Tyr Gly Leu Ala Ala Leu Gly Val Asn Cys Phe Trp Lys Lys Tyr Ile
195 200 205

Thr Gln Ile Gln Met Leu Gln Phe Cys Ile Cys Ala Ser His Ser Ile
210 215 220
Tyr Thr Ala Tyr Val Gln Asn Thr Ala Phe Trp Leu Pro Tyr Leu Gln
225 230 235 240
Leu Trp Val Met Val Asn Met Phe Val Leu Phe Ala Asn Phe Tyr Arg
245 250 255
Lys Arg Tyr Lys Ser Lys Gly Ala Lys Lys Gln
260 265

<210> 26

<211> 1344

<212> DNA

<213> Pavlova salina

<400> 26

atgcctccga gcgcggcgaa gcagatgggc gcgagcacgg gcgtgcatgc gggcgtcaca 60
gattcgctcg ccttcacgcg caaggatgtc gccgacaggc cggacctcac gatcgtaggt 120
gacagcgtgt acgatgcgaa ggcgttccgc tccgagcatc cgggtggcgc gcactttgtg 180
tcgctgttcg gcgggcgcga tgccacggag gcgttcatgg agtaccaccg gcgcgcctgg 240

cccaagtcgc gcatgtcgcg cttccacgtc ggctctctgg catcgaccga ggagcccgtc 300
 gccgccgatg agggctacct ccagctgtgc gctcgcacgc ccaagatggt gccgtcggtc 360
 agcagcgggt tcgcgccggc gtcgtactgg gtgaaggccg ggctgatcct cggctccgcg 420

 atcgcgctcg aggcgctacat gctgtacgcg ggcaagcgcc tgctcccgtc gatcgtgctc 480
 ggggtggctgt ttgcgctgat tggcctgaac atccagcacg atgccaacca cggcgcgctc 540
 tccaagtccg cctcgggtcaa cctggcgcgc gggtttgtcc aggactggat cggcgggagc 600
 atgatcctct ggctgcagga gcacgttgtc atgcaccact tgcacaccaa cgacgttgac 660
 aaggaccgga accagaaggc gcacggcgcc ctgcgggtca agccgaccga cgcgtggagc 720
 ccgatgcact ggctgcagca cctctacctg ctgcctgggg agacgatgta cgccttcaag 780
 ctgctgtttc tcgacatcag cgagctgggt atgtggcggg gggagggcga gcccatcagc 840

 aagctggcgc ggtacctctt catgccctcg ctgctcctca agctcacctt ctgggcgcgc 900
 tttgtcgcgc tgcgctgta cctcgcgcgc agcgtgcaca cggcgggtgtg catcgcggcg 960
 acggtaatga cggggagctt ctacctgcc ttcttcttct tcatctcgca caacttcgag 1020
 ggctgtggca gcgtcgacc ggacggcagc atcaccagca tgacgcgcgg cgcaccttc 1080
 ctcaagcggc aggccgagac ctctccaac gtgggcggcc cgctgctcgc cagctcaac 1140
 ggccggcctca actacaaat cgagcaccac ctcttcccca gggcgcacca cggttctac 1200
 cctcgcctcg cgccgttggg caaggcggag ctgcaggcgc gcggcattga gtacaagcac 1260

 taccacacca tatggagcaa cctggcatcc acgtgagga acatgtacgc gctcggccgc 1320
 aggccgcgca gcaaggcggg gtga 1344

 <210> 27
 <211> 1347
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Codon-optimized open reading frame for expression of Pavlova
 salina 4 desaturase in plants (version 1)
 <400> 27
 atgccaccta gcgtgctaa gcaaatggga gcttctactg gtgttcatgc tgggtttact 60
 gactcttctg ctttcaccag aaaggatggt gctgatagac ctgatctcac catcgttga 120

 gattctgttt acgatgctaa ggctttcaga tctgagcatc ctgggtgtgc tcatttcgtt 180
 tctttgttcg gaggaagaga tgctactgag gctttcatgg aataccatag aagggttgg 240
 cctaagtcta gaatgtctag attccacgtt ggatctcttg cttctactga ggaacctgtt 300

gctgctgatg aggataacct tcaactttgt gctaggatcg ctaagatggt gccttctgtt 360
tcttctggat tcgctcctgc ttcttactgg gttaaggctg gacttaccct tggatctgct 420
atcgctcttg aggcttacat gctttacgct ggaaagagac ttctcccttc tategttctt 480
ggatggcttt tcgctcttat cggctttaac atccagcatg atgctaacca tggtgctttg 540

tctaagtctg cttctgttaa ccttgctctt ggactttgtc aggattggat cggaggatct 600
atgatccttt ggcttcaaga gcatgttgtt atgcaccacc tccacactaa cgatgttgat 660
aaggatcctg atcaaaaggc tcacggtgct cttagactca agcctactga tgcttggtca 720
cctatgcatt ggcttcagca tctttacctt ttgcctgggtg agactatgta cgctttcaag 780
cttttgttcc tcgacatctc tgagcttggtt atgtggcggtt gggaggggtga gcctatctct 840
aagcttgctg gataaccttt tatgccttct ttgcttctca agcttacctt ctgggctaga 900
ttcgttgctt tgcctcttta ccttgctcct tctgttcata ctgctgtgtg tategtgct 960

actgttatga ctggatcttt ctacctcgct ttcttcttct tcacttccca caacttcgag 1020
ggtgttgctt ctgttgacc tgatggatct atcacttcta tgactagagg tgctagcttc 1080
cttaagagac aagctgagac ttcttctaac gttggaggac ctcttcttgc tactcttaac 1140
ggtggactca actacaaat tgagcatcac ttgttccta gagttcacca tggattctac 1200
cctagacttg ctctcttgt taagctgag cttgaggcta gaggaatcga gtacaagcac 1260
tacctacta tctggtctaa ccttgcttct accctcagac atatgtacgc tcttggaaga 1320
aggcctagat ctaaggctga gtaatga 1347

<210> 28

<211> 447

<212> PRT

<213> Pavlova salina

<400> 28

Met Pro Pro Ser Ala Ala Lys Gln Met Gly Ala Ser Thr Gly Val His

1 5 10 15

Ala Gly Val Thr Asp Ser Ser Ala Phe Thr Arg Lys Asp Val Ala Asp

20 25 30

Arg Pro Asp Leu Thr Ile Val Gly Asp Ser Val Tyr Asp Ala Lys Ala

35 40 45

Phe Arg Ser Glu His Pro Gly Gly Ala His Phe Val Ser Leu Phe Gly

50

55

60

Gly Arg Asp Ala Thr Glu Ala Phe Met Glu Tyr His Arg Arg Ala Trp
 65 70 75 80
 Pro Lys Ser Arg Met Ser Arg Phe His Val Gly Ser Leu Ala Ser Thr
 85 90 95
 Glu Glu Pro Val Ala Ala Asp Glu Gly Tyr Leu Gln Leu Cys Ala Arg
 100 105 110
 Ile Ala Lys Met Val Pro Ser Val Ser Ser Gly Phe Ala Pro Ala Ser

 115 120 125
 Tyr Trp Val Lys Ala Gly Leu Ile Leu Gly Ser Ala Ile Ala Leu Glu
 130 135 140
 Ala Tyr Met Leu Tyr Ala Gly Lys Arg Leu Leu Pro Ser Ile Val Leu
 145 150 155 160
 Gly Trp Leu Phe Ala Leu Ile Gly Leu Asn Ile Gln His Asp Ala Asn
 165 170 175
 His Gly Ala Leu Ser Lys Ser Ala Ser Val Asn Leu Ala Leu Gly Leu

 180 185 190
 Cys Gln Asp Trp Ile Gly Gly Ser Met Ile Leu Trp Leu Gln Glu His
 195 200 205
 Val Val Met His His Leu His Thr Asn Asp Val Asp Lys Asp Pro Asp
 210 215 220
 Gln Lys Ala His Gly Ala Leu Arg Leu Lys Pro Thr Asp Ala Trp Ser
 225 230 235 240
 Pro Met His Trp Leu Gln His Leu Tyr Leu Leu Pro Gly Glu Thr Met

 245 250 255
 Tyr Ala Phe Lys Leu Leu Phe Leu Asp Ile Ser Glu Leu Val Met Trp
 260 265 270
 Arg Trp Glu Gly Glu Pro Ile Ser Lys Leu Ala Gly Tyr Leu Phe Met
 275 280 285
 Pro Ser Leu Leu Leu Lys Leu Thr Phe Trp Ala Arg Phe Val Ala Leu
 290 295 300
 Pro Leu Tyr Leu Ala Pro Ser Val His Thr Ala Val Cys Ile Ala Ala

305 310 315 320
 Thr Val Met Thr Gly Ser Phe Tyr Leu Ala Phe Phe Phe Phe Ile Ser
 325 330 335
 His Asn Phe Glu Gly Val Ala Ser Val Gly Pro Asp Gly Ser Ile Thr
 340 345 350
 Ser Met Thr Arg Gly Ala Ser Phe Leu Lys Arg Gln Ala Glu Thr Ser
 355 360 365
 Ser Asn Val Gly Gly Pro Leu Leu Ala Thr Leu Asn Gly Gly Leu Asn

 370 375 380
 Tyr Gln Ile Glu His His Leu Phe Pro Arg Val His His Gly Phe Tyr
 385 390 395 400
 Pro Arg Leu Ala Pro Leu Val Lys Ala Glu Leu Glu Ala Arg Gly Ile
 405 410 415
 Glu Tyr Lys His Tyr Pro Thr Ile Trp Ser Asn Leu Ala Ser Thr Leu
 420 425 430
 Arg His Met Tyr Ala Leu Gly Arg Arg Pro Arg Ser Lys Ala Glu

 435 440 445
 <210> 29
 <211> 263
 <212> PRT
 <213> Isochrysis galbana
 <400> 29
 Met Ala Leu Ala Asn Asp Ala Gly Glu Arg Ile Trp Ala Ala Val Thr
 1 5 10 15
 Asp Pro Glu Ile Leu Ile Gly Thr Phe Ser Tyr Leu Leu Leu Lys Pro
 20 25 30
 Leu Leu Arg Asn Ser Gly Leu Val Asp Glu Lys Lys Gly Ala Tyr Arg
 35 40 45

 Thr Ser Met Ile Trp Tyr Asn Val Leu Leu Ala Leu Phe Ser Ala Leu
 50 55 60
 Ser Phe Tyr Val Thr Ala Thr Ala Leu Gly Trp Asp Tyr Gly Thr Gly
 65 70 75 80

Ala Trp Leu Arg Arg Gln Thr Gly Asp Thr Pro Gln Pro Leu Phe Gln
85 90 95

Cys Pro Ser Pro Val Trp Asp Ser Lys Leu Phe Thr Trp Thr Ala Lys
100 105 110

Ala Phe Tyr Tyr Ser Lys Tyr Val Glu Tyr Leu Asp Thr Ala Trp Leu
115 120 125

Val Leu Lys Gly Lys Arg Val Ser Phe Leu Gln Ala Phe His His Phe
130 135 140

Gly Ala Pro Trp Asp Val Tyr Leu Gly Ile Arg Leu His Asn Glu Gly
145 150 155 160

Val Trp Ile Phe Met Phe Phe Asn Ser Phe Ile His Thr Ile Met Tyr
165 170 175

Thr Tyr Tyr Gly Leu Thr Ala Ala Gly Tyr Lys Phe Lys Ala Lys Pro
180 185 190

Leu Ile Thr Ala Met Gln Ile Cys Gln Phe Val Gly Gly Phe Leu Leu
195 200 205

Val Trp Asp Tyr Ile Asn Val Pro Cys Phe Asn Ser Asp Lys Gly Lys
210 215 220

Leu Phe Ser Trp Ala Phe Asn Tyr Ala Tyr Val Gly Ser Val Phe Leu
225 230 235 240

Leu Phe Cys His Phe Phe Tyr Gln Asp Asn Leu Ala Thr Lys Lys Ser
245 250 255

Ala Lys Ala Gly Lys Gln Leu
260

<210> 30

<211> 801

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Codon-optimized open reading frame for expression of *Emiliana*

huxleyi 9 elongase in plants

<400> 30

atgcttgata gagcttcac tgatgctgct atttggagcg ctgtttctga tcctgagatc 60

cttatcggaa ccttctctta ccttttgctt aagcctctcc tcagaaactc tggacttgtg 120

gatgagagaa agggagctta ccgtacttct atgatctggt acaacgttgt tcttgctctt 180

ttctctgcta cctctttcta cgttactgct actgctcttg gatgggataa gggaaactggt 240

gagtggctta gatctcttac tgggtattct cctcaacaac tttggcagtg cctttctaga 300

gtttgggaca gcaaactctt cttgtggact gctaaagcct tctactactc caagtacgtt 360

gagtaccttg atactgcttg gcttgttctc aagggaaga aggtttcatt cctccaggga 420

ttccatcatt tcggtgctcc atgggatgtt taccttggaa tcaggcttaa gaacgaggga 480

gtttggatct tcatgttctt caacagcttc atccacactg ttatgtacac ttactacgga 540

cttactgctg ctggatacaa gatcagagga aagcctatca tcaccgctat gcaaactctt 600

caattcgttg gtggattcgt tcttgtgtgg gactacatca acgttccttg tttccatgct 660

gatgctggac aagttttctc ttgggtgttc aactacgctt atgtgggac tgttttcctt 720

ctttctgcc acttcttcta catggacaac attgctaagg ctaaggctaa aaaggctgtt 780

gctaccagaa aggtctcttg a 801

<210> 31

<211> 266

<212> PRT

<213> *Emiliana huxleyi*

<400> 31

Met Leu Asp Arg Ala Ser Ser Asp Ala Ala Ile Trp Ser Ala Val Ser

1 5 10 15

Asp Pro Glu Ile Leu Ile Gly Thr Phe Ser Tyr Leu Leu Leu Lys Pro

20 25 30

Leu Leu Arg Asn Ser Gly Leu Val Asp Glu Arg Lys Gly Ala Tyr Arg

35 40 45

Thr Ser Met Ile Trp Tyr Asn Val Val Leu Ala Leu Phe Ser Ala Thr

50 55 60

Ser Phe Tyr Val Thr Ala Thr Ala Leu Gly Trp Asp Lys Gly Thr Gly

65 70 75 80

Glu Trp Leu Arg Ser Leu Thr Gly Asp Ser Pro Gln Gln Leu Trp Gln

85 90 95

Cys Pro Ser Arg Val Trp Asp Ser Lys Leu Phe Leu Trp Thr Ala Lys

100	105	110	
Ala Phe Tyr Tyr Ser Lys Tyr Val Glu Tyr Leu Asp Thr Ala Trp Leu			
115	120	125	
Val Leu Lys Gly Lys Lys Val Ser Phe Leu Gln Gly Phe His His Phe			
130	135	140	
Gly Ala Pro Trp Asp Val Tyr Leu Gly Ile Arg Leu Lys Asn Glu Gly			
145	150	155	160
Val Trp Ile Phe Met Phe Phe Asn Ser Phe Ile His Thr Val Met Tyr			
165	170	175	
Thr Tyr Tyr Gly Leu Thr Ala Ala Gly Tyr Lys Ile Arg Gly Lys Pro			
180	185	190	
Ile Ile Thr Ala Met Gln Ile Ser Gln Phe Val Gly Gly Phe Val Leu			
195	200	205	
Val Trp Asp Tyr Ile Asn Val Pro Cys Phe His Ala Asp Ala Gly Gln			
210	215	220	
Val Phe Ser Trp Val Phe Asn Tyr Ala Tyr Val Gly Ser Val Phe Leu			
225	230	235	240
Leu Phe Cys His Phe Phe Tyr Met Asp Asn Ile Ala Lys Ala Lys Ala			
245	250	255	
Lys Lys Ala Val Ala Thr Arg Lys Ala Leu			
260	265		

<210> 32

<211> 819

<212> DNA

<213> Pavlova pinguis

<400> 32

atggttgccg caccatcac gctcgagtgg ctgctttcgc cgaagctcaa ggatgcagtg	60
ttcgggtgggg aggtgctcta cttctccatt gctacctgt ttcttgccgc catTTTgaag	120
cgcaccccgT tggTggacac gcggaagggc gcgtataaga gtggtatgat cgcgtacaac	180
gtgatcatgt gcgtgttctc gctggtgtgc ttcattgcc agctgcagc cctgggctat	240
gacatgggct acttgcaTg ggtgcgtgac ctcacagggg acgagattgt cccctctac	300

caggacgtgt ccccgcccc cgccttctcc aacaagctct tcaagtattc gtctattgcc 360

ttccactact ccaagtaagt tgagtacatg gacaccgcat ggctggatga gaagggaag 420

cccggtgctt tgcctcaggc cttccaccac ttggcgccg cctgggacac ctactttggc 480

atcaccttcc agaacgaggc catctacgtg ttctgtgtgc tcaacgcctt catccacacg 540

atcatgtacg catactacgc ggccactgcg gcgggtctca agttctcact gaagttcgtc 600

atcacgctca tgcagatcac ccaattcaac gtgggcttcg taatggtgta tcactacatc 660

accctggagt acttccgcaa ctaccggag ctgctcttct cctacctttt caactatgcg 720

tacgtctgca cggttctcct cctcttcatg cagttcttct acatggacaa ctttggcaag 780

aagaaggccg ctgccgccgc gggcaagaag aagaagtag 819

<210> 33

<211> 272

<212> PRT

<213> Pavlova pinguis

<400> 33

Met Val Ala Pro Pro Ile Thr Leu Glu Trp Leu Leu Ser Pro Lys Leu

1 5 10 15

Lys Asp Ala Val Phe Gly Gly Glu Val Leu Tyr Phe Ser Ile Ala Tyr

20 25 30

Leu Phe Leu Ala Pro Ile Leu Lys Arg Thr Pro Leu Val Asp Thr Arg

35 40 45

Lys Gly Ala Tyr Lys Ser Gly Met Ile Ala Tyr Asn Val Ile Met Cys

50 55 60

Val Phe Ser Leu Val Cys Phe Ile Cys Gln Leu Ala Ala Leu Gly Tyr

65 70 75 80

Asp Met Gly Tyr Leu Gln Trp Val Arg Asp Leu Thr Gly Asp Glu Ile

85 90 95

Val Pro Leu Tyr Gln Asp Val Ser Pro Ser Pro Ala Phe Ser Asn Lys

100 105 110

Leu Phe Lys Tyr Ser Ser Ile Ala Phe His Tyr Ser Lys Tyr Val Glu

115 120 125

Tyr Met Asp Thr Ala Trp Leu Val Met Lys Gly Lys Pro Val Ser Leu

130 135 140
 Leu Gln Gly Phe His His Phe Gly Ala Ala Trp Asp Thr Tyr Phe Gly
 145 150 155 160
 Ile Thr Phe Gln Asn Glu Gly Ile Tyr Val Phe Val Val Leu Asn Ala
 165 170 175

Phe Ile His Thr Ile Met Tyr Ala Tyr Tyr Ala Ala Thr Ala Ala Gly
 180 185 190
 Leu Lys Phe Ser Leu Lys Phe Val Ile Thr Leu Met Gln Ile Thr Gln
 195 200 205
 Phe Asn Val Gly Phe Val Met Val Tyr His Tyr Ile Thr Leu Glu Tyr
 210 215 220
 Phe Arg Asn Ser Pro Glu Leu Val Phe Ser Tyr Leu Phe Asn Tyr Ala
 225 230 235 240

Tyr Val Cys Thr Val Leu Leu Leu Phe Met Gln Phe Phe Tyr Met Asp
 245 250 255
 Asn Phe Gly Lys Lys Lys Ala Ala Ala Ala Ala Gly Lys Lys Lys Lys
 260 265 270

<210> 34

<211> 840

<212> DNA

<213> Pavlova salina

<400> 34

atggcgactg aagggatgcc ggcgataacg ctggactggc tgctctcgcc cgggctgaag	60
gatgccgtaa ttggcgggga ggtgctctac ttttcgcttg ggtatctgct gctcgagccc	120
atcctcaagc gtcaccgtt tgtggacaag cgcaagggcg cataccgcaa cggcatgac	180
gcgtacaaca tcctcatgtg cggtttctcg ctggtatgct tcgtgtgcca gatggcggcg	240
ctcggccttg atcgcggcca cctgcagttt gtccgcgacc tcacgggcga cagcgtggtg	300
cagctctacc aggacgtgag cccatcccct gcattcgca acaagctctt ccggtactca	360
gcggtggcgt tcactactc aaagtacgtg gattacatgg acacagcgtg gcttgtgctg	420
aagggaagc ccgtctcgtt cctgcagggc ttccaccact tcggcgccgc gtgggacacc	480
tactttggca tcacgtttca gaacgagggc acctacgtct ttgtgctgct caacgcattc	540

atccacacaa tcattgtacac ctactacggc gcgacggcag cgggcatcaa aatctcgatg 600

aagccgctga tcacctcat gcagatcacg cagttcctgc tgggcttcgc gctcgtctac 660

ccgtacattg acctcggtta ctcccgtagc tcgcccagag tcgtgtggag ctacctgttc 720

aactatgcgt acgtactcat ggtgctcttc ctcttcacgc gcttcttcta ccacgacaac 780

tttagcaagc acaagccaat ctgcgcacac gactccagca accgcatgaa aaccgagtag 840

<210> 35

<211> 279

<212> PRT

<213> Pavlova salina

<400> 35

Met Ala Thr Glu Gly Met Pro Ala Ile Thr Leu Asp Trp Leu Leu Ser

1 5 10 15

Pro Gly Leu Lys Asp Ala Val Ile Gly Gly Glu Val Leu Tyr Phe Ser

20 25 30

Leu Gly Tyr Leu Leu Leu Glu Pro Ile Leu Lys Arg Ser Pro Phe Val

35 40 45

Asp Lys Arg Lys Gly Ala Tyr Arg Asn Gly Met Ile Ala Tyr Asn Ile

50 55 60

Leu Met Cys Gly Phe Ser Leu Val Cys Phe Val Cys Gln Met Ala Ala

65 70 75 80

Leu Gly Leu Asp Arg Gly His Leu Gln Phe Val Arg Asp Leu Thr Gly

85 90 95

Asp Ser Val Val Gln Leu Tyr Gln Asp Val Ser Pro Ser Pro Ala Phe

100 105 110

Ala Asn Lys Leu Phe Arg Tyr Ser Ala Val Ala Phe His Tyr Ser Lys

115 120 125

Tyr Val Glu Tyr Met Asp Thr Ala Trp Leu Val Leu Lys Gly Lys Pro

130 135 140

Val Ser Phe Leu Gln Gly Phe His His Phe Gly Ala Ala Trp Asp Thr

145 150 155 160

Tyr Phe Gly Ile Thr Phe Gln Asn Glu Gly Thr Tyr Val Phe Val Leu

165 170 175
 Leu Asn Ala Phe Ile His Thr Ile Met Tyr Thr Tyr Tyr Gly Ala Thr
 180 185 190
 Ala Ala Gly Ile Lys Ile Ser Met Lys Pro Leu Ile Thr Leu Met Gln
 195 200 205

Ile Thr Gln Phe Leu Leu Gly Phe Ala Leu Val Tyr Pro Tyr Ile Asp
 210 215 220
 Leu Gly Tyr Phe Arg Ala Ser Pro Glu Leu Val Trp Ser Tyr Leu Phe
 225 230 235 240
 Asn Tyr Ala Tyr Val Leu Met Val Leu Phe Leu Phe Met Arg Phe Phe
 245 250 255
 Tyr His Asp Asn Phe Ser Lys His Lys Pro Ile Ser Arg Ile Asp Ser
 260 265 270

Ser Asn Arg Met Lys Thr Glu

275

<210> 36

<211> 1284

<212> DNA

<213> Pavlova salina

<400> 36

atgggacgcg gcggagacag cagtgggcag ggcacatccgg cggcggagct ggcgggtcccg 60
 agcgaccgcg cggagggtgag caacgctgac agcaaagcgc tgcacatcgt gctgtatggc 120
 aagcgcgtgg atgtgaccaa gttccaacgc acgcacccgg gtggtagcaa ggtcttccgg 180
 atcttccagg accgcgatgc gacggagcag ttcgagtctt accactcgaa gcgcgcgatc 240
 aagatgatgg agggcatgct caagaagtct gaggatgctc ccgccgacac gcccttgccc 300

 tcccagtcac cgatggggaa ggacttcaag gcgatgatcg agcggcacgt tgcagcgggt 360
 tactacgac catgcccgt cgatgagctg ttcaagctca gctcgtgct cctcccgacc 420
 ttgctgggca tgiacatgct caaggcgggc gtcggctccc cgctctgcgg cgcctcatg 480
 gtgagctttg gctggtagct cgatggctgg ctgcgcacg actatctgca cactccgtc 540
 ttcaagggtt ccgtgcacg caccgtcggg tggaacaacg cggcgggcta ctctctcggc 600
 ttcgtgcagg ggtatgcggt cgagtgggtg gcgcgcggc ataacacgca ccacgtgtgc 660

accaatgagg acggctcgga ccccgacatc aaaacggcgc cgctgctcat atacgtgcgc 720

aacaagccga gcatcgccaa gcgcctgaac gccttcagc gctaccagca gtactactat 780

gtgccggtga tggcaatcct cgacctgtac tggcggetcg agtcgatcgc ctacgtcgcg 840

atgcgcctgc cgaagatgct gccgcaggcc ctgcactcg tcgcgacta cgccatcgtc 900

gcgtgggtct ttgcgggcaa ctaccacctg ctcccgtcg tgacggttct gcgcgggttt 960

ggcactggga tcaccgtttt cgcgacgcac tacggtgagg acattctcga cgcggaccag 1020

gtgcgtcaca tgacgtcgt cgagcagacg gcactcacct cgcgcaacat ctcgggcggc 1080

tggtcgtga acgtgctcac cggcttcac tactgcaga cggagcacca cctgttccc 1140

atgatgcaa ccggcaacct catgactatc cagcccaggg tgcgcgcctt cttcaagaag 1200

cacggacttg agtaccgca gggcaacctc attgagtgcg tgcggcagaa catccgtgcg 1260

cttgcatcgc agcacctgct ttga 1284

<210> 37

<211> 427

<212> PRT

<213> Pavlova salina

<400> 37

Met Gly Arg Gly Gly Asp Ser Ser Gly Gln Ala His Pro Ala Ala Glu

1 5 10 15

Leu Ala Val Pro Ser Asp Arg Ala Glu Val Ser Asn Ala Asp Ser Lys

20 25 30

Ala Leu His Ile Val Leu Tyr Gly Lys Arg Val Asp Val Thr Lys Phe

35 40 45

Gln Arg Thr His Pro Gly Gly Ser Lys Val Phe Arg Ile Phe Gln Asp

50 55 60

Arg Asp Ala Thr Glu Gln Phe Glu Ser Tyr His Ser Lys Arg Ala Ile

65 70 75 80

Lys Met Met Glu Gly Met Leu Lys Lys Ser Glu Asp Ala Pro Ala Asp

85 90 95

Thr Pro Leu Pro Ser Gln Ser Pro Met Gly Lys Asp Phe Lys Ala Met

100 105 110

Ile Glu Arg His Val Ala Ala Gly Tyr Tyr Asp Pro Cys Pro Leu Asp

115	120	125	
Glu Leu Phe Lys Leu Ser Leu Val Leu Leu Pro Thr Phe Ala Gly Met			
130	135	140	
Tyr Met Leu Lys Ala Gly Val Gly Ser Pro Leu Cys Gly Ala Leu Met			
145	150	155	160
Val Ser Phe Gly Trp Tyr Leu Asp Gly Trp Leu Ala His Asp Tyr Leu			
165	170	175	
His His Ser Val Phe Lys Gly Ser Val Ala Arg Thr Val Gly Trp Asn			
180	185	190	
Asn Ala Ala Gly Tyr Phe Leu Gly Phe Val Gln Gly Tyr Ala Val Glu			
195	200	205	
Trp Trp Arg Ala Arg His Asn Thr His His Val Cys Thr Asn Glu Asp			
210	215	220	
Gly Ser Asp Pro Asp Ile Lys Thr Ala Pro Leu Leu Ile Tyr Val Arg			
225	230	235	240
Asn Lys Pro Ser Ile Ala Lys Arg Leu Asn Ala Phe Gln Arg Tyr Gln			
245	250	255	
Gln Tyr Tyr Tyr Val Pro Val Met Ala Ile Leu Asp Leu Tyr Trp Arg			
260	265	270	
Leu Glu Ser Ile Ala Tyr Val Ala Met Arg Leu Pro Lys Met Leu Pro			
275	280	285	
Gln Ala Leu Ala Leu Val Ala His Tyr Ala Ile Val Ala Trp Val Phe			
290	295	300	
Ala Gly Asn Tyr His Leu Leu Pro Leu Val Thr Val Leu Arg Gly Phe			
305	310	315	320
Gly Thr Gly Ile Thr Val Phe Ala Thr His Tyr Gly Glu Asp Ile Leu			
325	330	335	
Asp Ala Asp Gln Val Arg His Met Thr Leu Val Glu Gln Thr Ala Leu			
340	345	350	
Thr Ser Arg Asn Ile Ser Gly Gly Trp Leu Val Asn Val Leu Thr Gly			
355	360	365	

Phe Ile Ser Leu Gln Thr Glu His His Leu Phe Pro Met Met Pro Thr
 370 375 380
 Gly Asn Leu Met Thr Ile Gln Pro Glu Val Arg Ala Phe Phe Lys Lys
 385 390 395 400
 His Gly Leu Glu Tyr Arg Glu Gly Asn Leu Ile Glu Cys Val Arg Gln
 405 410 415

Asn Ile Arg Ala Leu Ala Phe Glu His Leu Leu
 420 425

<210> 38

<211> 116

<212> PRT

<213> Tomato yellow leaf curl virus

<400> 38

Met Trp Asp Pro Leu Leu Asn Glu Phe Pro Glu Ser Val His Gly Phe
 1 5 10 15
 Arg Cys Met Leu Ala Ile Lys Tyr Leu Gln Ser Val Glu Glu Thr Tyr
 20 25 30
 Glu Pro Asn Thr Leu Gly His Asp Leu Ile Arg Asp Leu Ile Ser Val

35 40 45
 Val Arg Ala Arg Asp Tyr Val Glu Ala Thr Arg Arg Tyr Asn His Phe
 50 55 60
 His Ala Arg Leu Glu Gly Ser Pro Lys Ala Glu Leu Arg Gln Pro Ile
 65 70 75 80
 Gln Gln Pro Cys Cys Cys Pro His Cys Pro Arg His Lys Gln Ala Thr
 85 90 95
 Ile Met Asp Val Gln Ala His Val Pro Glu Ala Gln Asn Ile Gln Asn

100 105 110
 Val Ser Lys Pro
 115

<210> 39

<211> 351

<212> DNA

<213> Tomato yellow leaf curl virus

<400> 39

atgtgggatac cacttctaaa tgaatttcct gaatctgttc acggatttcg ttgtatgtta 60
gctattaaat atttgcagtc cgttgaggaa acttacgagc ccaatacatt gggccacgat 120
ttaattaggg atcttatatc tgttgtaagg gcccgtagt atgtcgaagc gaccaggcga 180
tataatcatt tccacgcccg cctcgaaggt tcgccgaagg ctgaacttcg acagcccata 240
cagcagccgt gctgctgtcc ccattgtcca aggcacaaac aagcgacgat catggacgta 300

caggcccatg taccggaagc ccagaatata cagaatgtat cgaagccctg a 351

<210> 40

<211> 389

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 40

Met Val Ile Ala Ala Ala Val Ile Val Pro Leu Gly Leu Leu Phe Phe

1 5 10 15

Ile Ser Gly Leu Ala Val Asn Leu Phe Gln Ala Val Cys Tyr Val Leu

20 25 30

Ile Arg Pro Leu Ser Lys Asn Thr Tyr Arg Lys Ile Asn Arg Val Val

35 40 45

Ala Glu Thr Leu Trp Leu Glu Leu Val Trp Ile Val Asp Trp Trp Ala

50 55 60

Gly Val Lys Ile Gln Val Phe Ala Asp Asn Glu Thr Phe Asn Arg Met

65 70 75 80

Gly Lys Glu His Ala Leu Val Val Cys Asn His Arg Ser Asp Ile Asp

85 90 95

Trp Leu Val Gly Trp Ile Leu Ala Gln Arg Ser Gly Cys Leu Gly Ser

100 105 110

Ala Leu Ala Val Met Lys Lys Ser Ser Lys Phe Leu Pro Val Ile Gly

115 120 125

Trp Ser Met Trp Phe Ser Glu Tyr Leu Phe Leu Glu Arg Asn Trp Ala

130 135 140

Lys Asp Glu Ser Thr Leu Lys Ser Gly Leu Gln Arg Leu Ser Asp Phe

145 150 155 160
 Pro Arg Pro Phe Trp Leu Ala Leu Phe Val Glu Gly Thr Arg Phe Thr
 165 170 175

 Glu Ala Lys Leu Lys Ala Ala Gln Glu Tyr Ala Ala Ser Ser Glu Leu
 180 185 190
 Pro Ile Pro Arg Asn Val Leu Ile Pro Arg Thr Lys Gly Phe Val Ser
 195 200 205
 Ala Val Ser Asn Met Arg Ser Phe Val Pro Ala Ile Tyr Asp Met Thr
 210 215 220
 Val Thr Ile Pro Lys Thr Ser Pro Pro Pro Thr Met Leu Arg Leu Phe
 225 230 235 240

 Lys Gly Gln Pro Ser Val Val His Val His Ile Lys Cys His Ser Met
 245 250 255
 Lys Asp Leu Pro Glu Ser Asp Asp Ala Ile Ala Gln Trp Cys Arg Asp
 260 265 270
 Gln Phe Val Ala Lys Asp Ala Leu Leu Asp Lys His Ile Ala Ala Asp
 275 280 285
 Thr Phe Pro Gly Gln Gln Glu Gln Asn Ile Gly Arg Pro Ile Lys Ser
 290 295 300

 Leu Ala Val Val Leu Ser Trp Ala Cys Val Leu Thr Leu Gly Ala Ile
 305 310 315 320
 Lys Phe Leu His Trp Ala Gln Leu Phe Ser Ser Trp Lys Gly Ile Thr
 325 330 335
 Ile Ser Ala Leu Gly Leu Gly Ile Ile Thr Leu Cys Met Gln Ile Leu
 340 345 350
 Ile Arg Ser Ser Gln Ser Glu Arg Ser Thr Pro Ala Lys Val Val Pro
 355 360 365

 Ala Lys Pro Lys Asp Asn His His Pro Glu Ser Ser Ser Gln Thr Glu
 370 375 380
 Thr Glu Lys Glu Lys
 385

<210> 41

<211> 281

<212> PRT

<213> Limnanthes alba

<400> 41

Met Ala Lys Thr Arg Thr Ser Ser Leu Arg Asn Arg Arg Gln Leu Lys

1 5 10 15

Thr Ala Val Ala Ala Thr Ala Asp Asp Asp Lys Asp Gly Ile Phe Met

20 25 30

Val Leu Leu Ser Cys Phe Lys Ile Phe Val Cys Phe Ala Ile Val Leu

35 40 45

Ile Thr Ala Val Ala Trp Gly Leu Ile Met Val Leu Leu Leu Pro Trp

50 55 60

Pro Tyr Met Arg Ile Arg Leu Gly Asn Leu Tyr Gly His Ile Ile Gly

65 70 75 80

Gly Leu Val Ile Trp Leu Tyr Gly Ile Pro Ile Glu Ile Gln Gly Ser

85 90 95

Glu His Thr Lys Lys Arg Ala Ile Tyr Ile Ser Asn His Ala Ser Pro

100 105 110

Ile Asp Ala Phe Phe Val Met Trp Leu Ala Pro Ile Gly Thr Val Gly

115 120 125

Val Ala Lys Lys Glu Val Ile Trp Tyr Pro Leu Leu Gly Gln Leu Tyr

130 135 140

Thr Leu Ala His His Ile Arg Ile Asp Arg Ser Asn Pro Ala Ala Ala

145 150 155 160

Ile Gln Ser Met Lys Glu Ala Val Arg Val Ile Thr Glu Lys Asn Leu

165 170 175

Ser Leu Ile Met Phe Pro Glu Gly Thr Arg Ser Gly Asp Gly Arg Leu

180 185 190

Leu Pro Phe Lys Lys Gly Phe Val His Leu Ala Leu Gln Ser His Leu

195 200 205

Pro Ile Val Pro Met Ile Leu Thr Gly Thr His Leu Ala Trp Arg Lys

210	215	220
Gly Thr Phe Arg Val Arg Pro Val Pro Ile Thr Val Lys Tyr Leu Pro		
225	230	235
Pro Ile Asn Thr Asp Asp Trp Thr Val Asp Lys Ile Asp Asp Tyr Val		
245	250	255
Lys Met Ile His Asp Ile Tyr Val Arg Asn Leu Pro Ala Ser Gln Lys		
260	265	270
Pro Leu Gly Ser Thr Asn Arg Ser Lys		
275	280	
<210>	42	
<211>	303	
<212>	PRT	
<213>	Saccharomyces cerevisiae	
<400>	42	
Met Ser Val Ile Gly Arg Phe Leu Tyr Tyr Leu Arg Ser Val Leu Val		
1	5	10
Val Leu Ala Leu Ala Gly Cys Gly Phe Tyr Gly Val Ile Ala Ser Ile		
20	25	30
Leu Cys Thr Leu Ile Gly Lys Gln His Leu Ala Gln Trp Ile Thr Ala		
35	40	45
Arg Cys Phe Tyr His Val Met Lys Leu Met Leu Gly Leu Asp Val Lys		
50	55	60
Val Val Gly Glu Glu Asn Leu Ala Lys Lys Pro Tyr Ile Met Ile Ala		
65	70	75
Asn His Gln Ser Thr Leu Asp Ile Phe Met Leu Gly Arg Ile Phe Pro		
85	90	95
Pro Gly Cys Thr Val Thr Ala Lys Lys Ser Leu Lys Tyr Val Pro Phe		
100	105	110
Leu Gly Trp Phe Met Ala Leu Ser Gly Thr Tyr Phe Leu Asp Arg Ser		
115	120	125
Lys Arg Gln Glu Ala Ile Asp Thr Leu Asn Lys Gly Leu Glu Asn Val		

130 135 140
 Lys Lys Asn Lys Arg Ala Leu Trp Val Phe Pro Glu Gly Thr Arg Ser
 145 150 155 160
 Tyr Thr Ser Glu Leu Thr Met Leu Pro Phe Lys Lys Gly Ala Phe His
 165 170 175
 Leu Ala Gln Gln Gly Lys Ile Pro Ile Val Pro Val Val Val Ser Asn
 180 185 190

 Thr Ser Thr Leu Val Ser Pro Lys Tyr Gly Val Phe Asn Arg Gly Cys
 195 200 205
 Met Ile Val Arg Ile Leu Lys Pro Ile Ser Thr Glu Asn Leu Thr Lys
 210 215 220
 Asp Lys Ile Gly Glu Phe Ala Glu Lys Val Arg Asp Gln Met Val Asp
 225 230 235 240
 Thr Leu Lys Glu Ile Gly Tyr Ser Pro Ala Ile Asn Asp Thr Thr Leu
 245 250 255

 Pro Pro Gln Ala Ile Glu Tyr Ala Ala Leu Gln His Asp Lys Lys Val
 260 265 270
 Asn Lys Lys Ile Lys Asn Glu Pro Val Pro Ser Val Ser Ile Ser Asn
 275 280 285
 Asp Val Asn Thr His Asn Glu Gly Ser Ser Val Lys Lys Met His
 290 295 300

 <210> 43
 <211> 373
 <212> PRT
 <213> Micromonas pusilla
 <400> 43

 Met Thr Pro Tyr Gln Trp Phe Asn Val Val Ser Ser Leu Gly Tyr Val

 1 5 10 15
 Leu Phe Thr Ala Thr Thr Ser Thr Val Thr Met Leu Val Pro Ala Ile
 20 25 30
 Ile Leu Leu Arg Pro Val Ser Ala Asn Leu Tyr Ala Arg Cys Thr Ser
 35 40 45

Trp Ile Phe Ala Cys Trp Trp Thr Ser Cys Leu Phe Ile Thr Glu Arg
 50 55 60
 Leu Asn Gly Val Lys Val Arg Val Thr Gly Asp Ala Leu Pro Leu Asn

 65 70 75 80
 Ala Pro Leu Leu Ile Met Ser Asn His Lys Cys Asn Leu Asp Trp Met
 85 90 95
 Phe Leu Trp Ser Ser Ala Ile Arg Thr Gly Ser Met Phe His Val Gly
 100 105 110
 Val Phe Lys Ala Val Ala Lys Ser Glu Ile Arg Val Ile Pro Ile Phe
 115 120 125
 Gly Trp Gly Cys Lys Leu Asn Gly Phe Ala Tyr Val Arg Arg Arg Trp

 130 135 140
 Ser Ser Asp Ala Ser His Leu Thr Ser Trp Ile Gln Ser Gln Ile Arg
 145 150 155 160
 Arg Arg Leu Asn Ala Asn Trp Thr Leu Ile Phe Pro Glu Gly Thr Arg
 165 170 175
 Tyr Thr Asp Arg Asn Lys Glu Arg Ser Asp Leu Ser Cys Ala Lys Asp
 180 185 190
 Gly Leu Glu Pro Met Ala Gly Glu Ile Leu Arg Pro Arg Thr Lys Gly

 195 200 205
 Leu Ala Leu Leu Leu Arg Glu Ser Ala Lys Gly Gly Gly Tyr Tyr Arg
 210 215 220
 Lys Ile Val Asp Met Thr Ile Gln Tyr Thr Asp Ala Asp Gly Lys Pro
 225 230 235 240
 Leu Lys Gly Ala Ala Leu Gly Thr Arg Cys Phe Gly Gln Leu Ala Lys
 245 250 255
 Gly Gln Leu Pro Val Ala Thr Cys His Val His Phe Asp Val Phe Ser

 260 265 270
 His Lys Asp Val Pro Ala Gly Glu Asp Glu Asp Glu Val Glu Ala Trp
 275 280 285
 Val Trp Lys Arg Trp Arg Lys Lys Ala Asn Met Leu Glu Ala Cys Ala

290 295 300
 Ser Ala Gly Gln Phe Glu Gly Val Arg Glu Trp Ser Thr Ser Gly Thr
 305 310 315 320
 Ala Val Pro Leu Lys Thr Gln Thr Ala Leu Arg Cys Phe Phe Val Leu

325 330 335
 Gln Gly Leu Val Cys Val Gly Val Ala Cys Ser Ser Thr Ala Phe Leu
 340 345 350
 Ala Tyr Val Ala Cys Ala Ala Val Gly Ala Ala Val Ile Ala Gln Thr
 355 360 365
 Asp Pro Ala Trp Trp
 370

<210> 44

<211> 314

<212> PRT

<213> Mortierella alpina

<400> 44

Met Ser Ile Gly Ser Ser Asn Pro Val Leu Leu Ala Ala Ile Pro Phe

1 5 10 15
 Val Tyr Leu Phe Val Leu Pro Arg Val Leu Ala Phe Leu Pro Gln Lys
 20 25 30
 Ala Gln Phe Leu Ala Lys Cys Ile Val Val Leu Ile Ala Thr Leu Ile
 35 40 45
 Met Ser Val Ala Gly Cys Phe Ile Ser Ile Val Cys Ala Leu Leu Asp
 50 55 60
 Lys Arg Tyr Val Ile Asn Tyr Val Val Ser Arg Leu Phe Ser Phe Leu

65 70 75 80
 Ala Ala Arg Pro Cys Gly Val Thr Tyr Lys Ile Val Gly Glu Glu His
 85 90 95
 Leu Asp Lys Tyr Pro Ala Ile Val Val Cys Asn His Gln Ser Ser Met
 100 105 110
 Asp Met Met Val Leu Gly Arg Val Phe Pro Lys His Cys Val Val Met
 115 120 125

Ala Lys Lys Glu Leu Leu Tyr Phe Pro Phe Leu Gly Met Phe Met Lys

130 135 140

Leu Ser Asn Ala Ile Phe Ile Asp Arg Lys Asn His Lys Lys Ala Ile

145 150 155 160

Glu Ser Thr Thr Gln Ala Val Ala Asp Met Lys Lys His Asn Ser Gly

165 170 175

Ile Trp Ile Phe Pro Glu Gly Thr Arg Ser Arg Leu Asp Lys Ala Asp

180 185 190

Leu Leu Pro Phe Lys Lys Gly Ala Phe His Leu Ala Ile Gln Ala Gln

195 200 205

Leu Pro Ile Leu Pro Ile Ile Ser Gln Gly Tyr Ser His Ile Tyr Asp

210 215 220

Ser Ser Lys Arg Tyr Phe Pro Gly Gly Glu Leu Glu Ile Arg Val Leu

225 230 235 240

Glu Pro Ile Pro Thr Thr Gly Leu Thr Thr Asp Asp Val Asn Asp Leu

245 250 255

Met Asp Lys Thr Arg Asn Leu Met Leu Lys His Leu Lys Glu Met Asp

260 265 270

Ser Gln Tyr Ser Ser Ser Thr Ala Glu Asn Gly Ser Thr His Ile Asp

275 280 285

Ala Asp Ile Ala Lys Ser Thr Ala Thr Ser Ile Gly Asn Thr Asp Asp

290 295 300

Ala Ile Thr Lys Arg Arg Thr Pro Lys Glu

305 310

<210> 45

<211> 391

<212> PRT

<213> Braccisa napus

<400> 45

Met Ala Met Ala Ala Ala Ala Val Ile Val Pro Leu Gly Ile Leu Phe

1 5 10 15

Phe Ile Ser Gly Leu Val Val Asn Leu Leu Gln Ala Val Cys Tyr Val
 20 25 30
 Leu Ile Arg Pro Leu Ser Lys Asn Thr Tyr Arg Lys Ile Asn Arg Val
 35 40 45
 Val Ala Glu Thr Leu Trp Leu Glu Leu Val Trp Ile Val Asp Trp Trp
 50 55 60
 Ala Gly Val Lys Ile Gln Val Phe Ala Asp Asp Glu Thr Phe Asn Arg

 65 70 75 80
 Met Gly Lys Glu His Ala Leu Val Val Cys Asn His Arg Ser Asp Ile
 85 90 95
 Asp Trp Leu Val Gly Trp Ile Leu Ala Gln Arg Ser Gly Cys Leu Gly
 100 105 110
 Ser Ala Leu Ala Val Met Lys Lys Ser Ser Lys Phe Leu Pro Val Ile
 115 120 125
 Gly Trp Ser Met Trp Phe Ser Glu Tyr Leu Phe Leu Glu Arg Asn Trp

 130 135 140
 Ala Lys Asp Glu Ser Thr Leu Lys Ser Gly Leu Gln Arg Leu Asn Asp
 145 150 155 160
 Phe Pro Arg Pro Phe Trp Leu Ala Leu Phe Val Glu Gly Thr Arg Phe
 165 170 175
 Thr Glu Ala Lys Leu Lys Ala Ala Gln Glu Tyr Ala Ala Ser Ser Gln
 180 185 190
 Leu Pro Val Pro Arg Asn Val Leu Ile Pro Arg Thr Lys Gly Phe Val

 195 200 205
 Ser Ala Val Ser Asn Met Arg Ser Phe Val Pro Ala Ile Tyr Asp Met
 210 215 220
 Thr Val Ala Ile Pro Lys Thr Ser Pro Pro Pro Thr Met Leu Arg Leu
 225 230 235 240
 Phe Lys Gly Gln Pro Ser Val Val His Val His Ile Lys Cys His Ser
 245 250 255
 Met Lys Asp Leu Pro Glu Ser Asp Asp Ala Ile Ala Gln Trp Cys Arg

260 265 270
 Asp Gln Phe Val Ala Lys Asp Ala Leu Leu Asp Lys His Ile Ala Ala
 275 280 285
 Asp Thr Phe Pro Gly Gln Lys Glu His Asn Ile Gly Arg Pro Ile Lys
 290 295 300
 Ser Leu Ala Val Val Val Ser Trp Ala Cys Leu Leu Thr Leu Gly Ala
 305 310 315 320
 Met Lys Phe Leu His Trp Ser Asn Leu Phe Ser Ser Leu Lys Gly Ile

325 330 335
 Ala Leu Ser Ala Leu Gly Leu Gly Ile Ile Thr Leu Cys Met Gln Ile
 340 345 350
 Leu Ile Arg Ser Ser Gln Ser Glu Arg Ser Thr Pro Ala Lys Val Ala
 355 360 365
 Pro Ala Lys Pro Lys Asp Lys His Gln Ser Gly Ser Ser Ser Gln Thr
 370 375 380
 Glu Val Glu Glu Lys Gln Lys
 385 390

<210> 46

<211> 390

<212> PRT

<213> Braccisa napus

<400> 46

Met Ala Met Ala Ala Ala Val Ile Val Pro Leu Gly Ile Leu Phe Phe
 1 5 10 15
 Ile Ser Gly Leu Val Val Asn Leu Leu Gln Ala Ile Cys Tyr Val Leu
 20 25 30
 Ile Arg Pro Leu Ser Lys Asn Thr Tyr Arg Lys Ile Asn Arg Val Val
 35 40 45
 Ala Glu Thr Leu Trp Leu Glu Leu Val Trp Ile Val Asp Trp Trp Ala

50 55 60
 Gly Val Lys Ile Gln Val Phe Ala Asp Asn Glu Thr Phe Asn Arg Met
 65 70 75 80

Gly Lys Glu His Ala Leu Val Val Cys Asn His Arg Ser Asp Ile Asp
 85 90 95
 Trp Leu Val Gly Trp Ile Leu Ala Gln Arg Ser Gly Cys Leu Gly Ser
 100 105 110
 Ala Leu Ala Val Met Lys Lys Ser Ser Lys Phe Leu Pro Val Ile Gly

 115 120 125
 Trp Ser Met Trp Phe Ser Glu Tyr Leu Phe Leu Glu Arg Asn Trp Ala
 130 135 140
 Lys Asp Glu Ser Thr Leu Lys Ser Gly Leu Gln Arg Leu Asn Asp Phe
 145 150 155 160
 Pro Arg Pro Phe Trp Leu Ala Leu Phe Val Glu Gly Thr Arg Phe Thr
 165 170 175
 Glu Ala Lys Leu Lys Ala Ala Gln Glu Tyr Ala Ala Ser Ser Glu Leu

 180 185 190
 Pro Val Pro Arg Asn Val Leu Ile Pro Arg Thr Lys Gly Phe Val Ser
 195 200 205
 Ala Val Ser Asn Met Arg Ser Phe Val Pro Ala Ile Tyr Asp Met Thr
 210 215 220
 Val Ala Ile Pro Lys Thr Ser Pro Pro Pro Thr Met Leu Arg Leu Phe
 225 230 235 240
 Lys Gly Gln Pro Ser Val Val His Val His Ile Lys Cys His Ser Met

 245 250 255
 Lys Asp Leu Pro Glu Ser Asp Asp Ala Ile Ala Gln Trp Cys Arg Asp
 260 265 270
 Gln Phe Val Ala Lys Asp Ala Leu Leu Asp Lys His Ile Ala Ala Asp
 275 280 285
 Thr Phe Pro Gly Gln Gln Glu Gln Asn Ile Gly Arg Pro Ile Lys Ser
 290 295 300
 Leu Ala Val Val Leu Ser Trp Ser Cys Leu Leu Ile Leu Gly Ala Met

 305 310 315 320
 Lys Phe Leu His Trp Ser Asn Leu Phe Ser Ser Trp Lys Gly Ile Ala

325 330 335
 Phe Ser Ala Leu Gly Leu Gly Ile Ile Thr Leu Cys Met Gln Ile Leu
 340 345 350
 Ile Arg Ser Ser Gln Ser Glu Arg Ser Thr Pro Ala Lys Val Val Pro
 355 360 365
 Ala Lys Pro Lys Asp Asn His Asn Asp Ser Gly Ser Ser Ser Gln Thr

 370 375 380
 Glu Val Glu Lys Gln Lys
 385 390
 <210> 47
 <211> 361
 <212> PRT
 <213> Phytophthora infestans
 <400> 47
 Met Ala Thr Lys Glu Ala Tyr Val Phe Pro Thr Leu Thr Glu Ile Lys
 1 5 10 15
 Arg Ser Leu Pro Lys Asp Cys Phe Glu Ala Ser Val Pro Leu Ser Leu
 20 25 30
 Tyr Tyr Thr Val Arg Cys Leu Val Ile Ala Val Ala Leu Thr Phe Gly

 35 40 45
 Leu Asn Tyr Ala Arg Ala Leu Pro Glu Val Glu Ser Phe Trp Ala Leu
 50 55 60
 Asp Ala Ala Leu Cys Thr Gly Tyr Ile Leu Leu Gln Gly Ile Val Phe
 65 70 75 80
 Trp Gly Phe Phe Thr Val Gly His Asp Ala Gly His Gly Ala Phe Ser
 85 90 95
 Arg Tyr His Leu Leu Asn Phe Val Val Gly Thr Phe Met His Ser Leu

 100 105 110
 Ile Leu Thr Pro Phe Glu Ser Trp Lys Leu Thr His Arg His His His
 115 120 125
 Lys Asn Thr Gly Asn Ile Asp Arg Asp Glu Val Phe Tyr Pro Gln Arg
 130 135 140

Lys Ala Asp Asp His Pro Leu Ser Arg Asn Leu Ile Leu Ala Leu Gly
 145 150 155 160
 Ala Ala Trp Leu Ala Tyr Leu Val Glu Gly Phe Pro Pro Arg Lys Val

 165 170 175
 Asn His Phe Asn Pro Phe Glu Pro Leu Phe Val Arg Gln Val Ser Ala
 180 185 190
 Val Val Ile Ser Leu Leu Ala His Phe Phe Val Ala Gly Leu Ser Ile
 195 200 205
 Tyr Leu Ser Leu Gln Leu Gly Leu Lys Thr Met Ala Ile Tyr Tyr Tyr
 210 215 220
 Gly Pro Val Phe Val Phe Gly Ser Met Leu Val Ile Thr Thr Phe Leu

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

 290 295 300
 His Gln Ala Phe Pro Glu Leu Val Arg Lys Ser Asp Glu Pro Ile Ile
 305 310 315 320
 Lys Ala Phe Phe Arg Val Gly Arg Leu Tyr Ala Asn Tyr Gly Val Val
 325 330 335
 Asp Gln Glu Ala Lys Leu Phe Thr Leu Lys Glu Ala Lys Ala Ala Thr
 340 345 350
 Glu Ala Ala Ala Lys Thr Lys Ser Thr
 355 360

<210> 48
 <211> 418
 <212> PRT

<213> Thalassiosira pseudonana

<400> 48

Met Tyr Arg Leu Thr Ser Thr Phe Leu Ile Ala Leu Ala Phe Ser Ser

1 5 10 15

Ser Ile Asn Ala Phe Ser Pro Gln Arg Pro Pro Arg Thr Ile Thr Lys

20 25 30

Ser Lys Val Gln Ser Thr Val Leu Pro Ile Pro Thr Lys Asp Asp Leu

35 40 45

Asn Phe Leu Gln Pro Gln Leu Asp Glu Asn Asp Leu Tyr Leu Asp Asp

50 55 60

Val Asn Thr Pro Pro Arg Ala Gly Thr Ile Met Lys Met Leu Pro Lys

65 70 75 80

Glu Thr Phe Asn Ile Asp Thr Ala Thr Ser Leu Gly Tyr Phe Gly Met

85 90 95

Asp Met Ala Ala Val Val Ser Ser Met Thr Leu Leu Asn Ala Ile Val

100 105 110

Thr Ser Asp Gln Tyr His Ala Leu Pro Leu Pro Leu Gln Ala Ala Thr

115 120 125

Val Ile Pro Phe Gln Leu Leu Ala Gly Phe Ala Met Trp Cys Met Trp

130 135 140

Cys Ile Gly His Asp Ala Gly His Ser Thr Val Ser Lys Thr Lys Trp

145 150 155 160

Ile Asn Arg Val Val Gly Glu Val Ala His Ser Val Val Cys Leu Thr

165 170 175

Pro Phe Val Pro Trp Gln Met Ser His Arg Lys His His Leu Asn His

180 185 190

Asn His Ile Glu Lys Asp Tyr Ser His Lys Trp Tyr Ser Arg Asp Glu

195 200 205

Phe Asp Asp Ile Pro Gln Leu Tyr Lys Thr Phe Gly Tyr Asn Pro Arg

210 215 220

Met Met Gln Leu Pro Phe Leu Tyr Phe Met Tyr Leu Ala Leu Gly Ile

225 230 235 240

Pro Asp Gly Gly His Val Val Phe Tyr Gly Arg Met Trp Glu Gly Val

245 250 255

Ser Leu Gln Lys Lys Phe Asp Ala Ala Ile Ser Val Ala Val Ser Cys

260 265 270

Ala Thr Ala Gly Ser Leu Trp Met Asn Met Gly Thr Ala Asp Phe Thr

275 280 285

Val Val Cys Met Val Pro Trp Leu Val Leu Ser Trp Trp Leu Phe Met

290 295 300

Val Thr Tyr Leu Gln His His Ser Glu Asp Gly Lys Leu Tyr Thr Asp

305 310 315 320

Glu Thr Phe Thr Phe Glu Lys Gly Ala Phe Glu Thr Val Asp Arg Ser

325 330 335

Tyr Gly Lys Leu Ile Asn Arg Met Ser His His Met Met Asp Gly His

340 345 350

Val Val His His Leu Phe Phe Glu Arg Val Pro His Tyr Arg Leu Glu

355 360 365

Ala Ala Thr Glu Ala Leu Val Lys Gly Met Asp Glu Thr Gly Gln Lys

370 375 380

His Leu Tyr Lys Tyr Ile Asp Thr Pro Asp Phe Asn Ala Glu Ile Val

385 390 395 400

Asn Gly Phe Arg Asp Asn Trp Phe Leu Val Glu Glu Glu Asn Ile Lys

405 410 415

Arg Glu

<210> 49

<211> 363

<212> PRT

<213> Pythium irregulare

<400> 49

Met Ala Ser Thr Ser Ala Ala Gln Asp Ala Ala Pro Tyr Glu Phe Pro

1 5 10 15

Ser Leu Thr Glu Ile Lys Arg Ala Leu Pro Ser Glu Cys Phe Glu Ala
20 25 30

Ser Val Pro Leu Ser Leu Tyr Tyr Thr Ala Arg Ser Leu Ala Leu Ala
35 40 45

Gly Ser Leu Ala Val Ala Leu Ser Tyr Ala Arg Ala Leu Pro Leu Val
50 55 60

Gln Ala Asn Ala Leu Leu Asp Ala Thr Leu Cys Thr Gly Tyr Val Leu
65 70 75 80

Leu Gln Gly Ile Val Phe Trp Gly Phe Phe Thr Val Gly His Asp Cys
85 90 95

Gly His Gly Ala Phe Ser Arg Ser His Val Leu Asn Phe Ser Val Gly
100 105 110

Thr Leu Met His Ser Ile Ile Leu Thr Pro Phe Glu Ser Trp Lys Leu
115 120 125

Ser His Arg His His His Lys Asn Thr Gly Asn Ile Asp Lys Asp Glu
130 135 140

Ile Phe Tyr Pro Gln Arg Glu Ala Asp Ser His Pro Val Ser Arg His
145 150 155 160

Leu Val Met Ser Leu Gly Ser Ala Trp Phe Ala Tyr Leu Phe Ala Gly
165 170 175

Phe Pro Pro Arg Thr Met Asn His Phe Asn Pro Trp Glu Ala Met Tyr
180 185 190

Val Arg Arg Val Ala Ala Val Ile Ile Ser Leu Gly Val Leu Phe Ala
195 200 205

Phe Ala Gly Leu Tyr Ser Tyr Leu Thr Phe Val Leu Gly Phe Thr Thr
210 215 220

Met Ala Ile Tyr Tyr Phe Gly Pro Leu Phe Ile Phe Ala Thr Met Leu
225 230 235 240

Val Val Thr Thr Phe Leu His His Asn Asp Glu Glu Thr Pro Trp Tyr
245 250 255

Ala Asp Ser Glu Trp Thr Tyr Val Lys Gly Asn Leu Ser Ser Val Asp

260 265 270

Arg Ser Tyr Gly Ala Leu Ile Asp Asn Leu Ser His Asn Ile Gly Thr

275 280 285

His Gln Ile His His Leu Phe Pro Ile Ile Pro His Tyr Lys Leu Asn

290 295 300

Asp Ala Thr Ala Ala Phe Ala Lys Ala Phe Pro Glu Leu Val Arg Lys

305 310 315 320

Asn Ala Ala Pro Ile Ile Pro Thr Phe Phe Arg Met Ala Ala Met Tyr

325 330 335

Ala Lys Tyr Gly Val Val Asp Thr Asp Ala Lys Thr Phe Thr Leu Lys

340 345 350

Glu Ala Lys Ala Ala Ala Lys Thr Lys Ser Ser

355 360

<210> 50

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide primer

<400> 50

gcgaagcaca tcgagtca

18

<210> 51

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide primer

<400> 51

ggttgaggtg gtagctgagg

20

<210> 52

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide primer

<220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> N = Hex
 <220><221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> N = Zen
 <220><221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> N = 3IABkFQ
 <400> 52
 ntctctacnc cgtctcacat gacgcn 26
 <210> 53
 <211> 19
 <212> DNA
 <213>
 > Artificial Sequence
 <220><223> Oligonucleotide primer
 <400> 53
 atacaagcac ggtggatgg 19
 <210> 54
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Oligonucleotide primer
 <400> 54
 tgggtctaaca ggtctaggag ga 22
 <210> 55
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Oligonucleotide primer
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> N = FAM
 <220>

<221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> N = Zen
 <220><221> misc_feature
 <222> (29)..(29)
 <223> N = 3IABkFQ
 <400> 55
 ntggcaaaga ngatttcgag cttcctgcn 29
 <210> 56
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Oligonucleotide primer
 <400> 56
 caagcaccgt agtaagagag ca 22
 <210> 57
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Oligonucleotide primer
 <400>
 > 57
 cagacagcct gaggttagca 20
 <210> 58
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Oligonucleotide primer
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> N = FAM
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> N = Zen
 <220><221> misc_feature

<222> (29)..(29)

<223> N = 3IABkFQ

<400> 58

ntccccactt ncttagcgaa aggaacgan

29