

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6319889号
(P6319889)

(45) 発行日 平成30年5月9日 (2018.5.9)

(24) 登録日 平成30年4月13日 (2018.4.13)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 P 7/64 (2006.01)

C 1 2 P 7/64 Z N A

C 1 2 N 1/13 (2006.01)

C 1 2 N 1/13

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 9/16 (2006.01)

C 1 2 N 9/16 Z

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 A

請求項の数 12 (全 18 頁)

(21) 出願番号 特願2014-57203 (P2014-57203)
 (22) 出願日 平成26年3月19日 (2014.3.19)
 (65) 公開番号 特開2015-177771 (P2015-177771A)
 (43) 公開日 平成27年10月8日 (2015.10.8)
 審査請求日 平成28年12月16日 (2016.12.16)

(73) 特許権者 000000918
 花王株式会社
 東京都中央区日本橋茅場町1丁目14番1
 〇号
 (74) 代理人 100076439
 弁理士 飯田 敏三
 (74) 代理人 100155505
 弁理士 野明 千雪
 (74) 代理人 100141771
 弁理士 星野 宏和
 (72) 発明者 斎藤 猛
 和歌山県和歌山市湊1334 花王株式会
 社研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アシル-ACPチオエステラーゼ改変体を用いた脂質の製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

微生物を宿主とし、該宿主に下記 (a) 又は (b) のタンパク質をコードする遺伝子を導入して形質転換体を得る工程と、得られた形質転換体から脂質を採取する工程とを含む、脂質の製造方法。

(a) 配列番号1の128位~287位のアミノ酸配列において、下記 (1) ~ (4) から選ばれる少なくとも1つのアミノ酸置換を有するアミノ酸配列を有し、かつアシル-ACPチオエステラーゼ活性を有するタンパク質。

(1) 配列番号1の150位のアミノ酸がグルタミン酸からグリシンに置換。

(2) 配列番号1の200位のアミノ酸がアスパラギンからアスパラギン酸に置換。

(3) 配列番号1の222位のアミノ酸がアスパラギンからセリン又はアラニンに置換。

(4) 配列番号1の245位のアミノ酸がアルギニンからリジンに置換。

(b) (a) のタンパク質のアミノ酸配列において、アミノ酸置換されたアミノ酸以外の1~15個のアミノ酸が欠失、置換、挿入、又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつアシル-ACPチオエステラーゼ活性を有するタンパク質。

【請求項2】

前記微生物が微細藻類である、請求項1記載の製造方法。

【請求項3】

前記微生物が大腸菌である、請求項1記載の製造方法。

10

20

【請求項 4】

前記脂質が炭素数 12 の脂肪酸又はそのエステルを含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の製造方法。

【請求項 5】

前記脂質中に、炭素数 12 の脂肪酸が 5 質量 % 以上含有される、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の製造方法。

【請求項 6】

微生物を宿主とし、該宿主に下記 (a) 又は (b) のタンパク質をコードする遺伝子を導入して得られる形質転換体。

(a) 配列番号 1 の 128 位 ~ 287 位のアミノ酸配列において、下記 (1) ~ (4) から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸置換を有するアミノ酸配列を有し、かつアシル - ACP チオエステラーゼ活性を有するタンパク質。

(1) 配列番号 1 の 150 位のアミノ酸がグルタミン酸からグリシンに置換。

(2) 配列番号 1 の 200 位のアミノ酸がアスパラギンからアスパラギン酸に置換。

(3) 配列番号 1 の 222 位のアミノ酸がアスパラギンからセリン又はアラニンに置換。

(4) 配列番号 1 の 245 位のアミノ酸がアルギニンからリジンに置換。

(b) (a) のタンパク質のアミノ酸配列において、アミノ酸置換されたアミノ酸以外の 1 ~ 15 個のアミノ酸が欠失、置換、挿入、又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつアシル - ACP チオエステラーゼ活性を有するタンパク質。

【請求項 7】

前記微生物が微細藻類である、請求項 6 記載の形質転換体。

【請求項 8】

前記微生物が大腸菌である、請求項 6 記載の形質転換体。

【請求項 9】

下記 (a) 又は (b) のタンパク質。

(a) 配列番号 1 の 128 位 ~ 287 位のアミノ酸配列において、下記 (1) ~ (4) から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸置換を有するアミノ酸配列を有し、かつアシル - ACP チオエステラーゼ活性を有するタンパク質。

(1) 配列番号 1 の 150 位のアミノ酸がグルタミン酸からグリシンに置換。

(2) 配列番号 1 の 200 位のアミノ酸がアスパラギンからアスパラギン酸に置換。

(3) 配列番号 1 の 222 位のアミノ酸がアスパラギンからセリン又はアラニンに置換。

(4) 配列番号 1 の 245 位のアミノ酸がアルギニンからリジンに置換。

(b) (a) のタンパク質のアミノ酸配列において、アミノ酸置換されたアミノ酸以外の 1 ~ 15 個のアミノ酸が欠失、置換、挿入、又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつアシル - ACP チオエステラーゼ活性を有するタンパク質。

【請求項 10】

微生物を宿主とし、該宿主に下記 (a) 又は (b) のタンパク質をコードする遺伝子を導入して形質転換体を得る工程を含む、脂質の生産性を向上させる方法。

(a) 配列番号 1 の 128 位 ~ 287 位のアミノ酸配列において、下記 (1) ~ (4) から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸置換を有するアミノ酸配列を有し、かつアシル - ACP チオエステラーゼ活性を有するタンパク質。

(1) 配列番号 1 の 150 位のアミノ酸がグルタミン酸からグリシンに置換。

(2) 配列番号 1 の 200 位のアミノ酸がアスパラギンからアスパラギン酸に置換。

(3) 配列番号 1 の 222 位のアミノ酸がアスパラギンからセリン又はアラニンに置換。

(4) 配列番号 1 の 245 位のアミノ酸がアルギニンからリジンに置換。

(b) (a) のタンパク質のアミノ酸配列において、アミノ酸置換されたアミノ酸以外の 1 ~ 15 個のアミノ酸が欠失、置換、挿入、又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつ

アシル - A C P チオエステラーゼ活性を有するタンパク質。

【請求項 1 1】

前記微生物が微細藻類である、請求項 1 0 記載の方法。

【請求項 1 2】

前記微生物が大腸菌である、請求項 1 0 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、アシル - A C P チオエステラーゼ改変体及びこれを用いた脂質の製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

脂肪酸は脂質の主要構成成分の 1 つであり、生体内においてグリセリンとエステル結合をしてトリアシルグリセロール等の脂質を構成し、多くの動植物においてエネルギー源として貯蔵され利用される物質である。動植物内に蓄えられた脂肪酸や脂質は、食用又は工業用として広く利用されており、例えば、モノアシルグリセロール、ジアシルグリセロール等の食品の中間原料や、その他各種の工業製品の添加剤、中間原料として利用されている。また、炭素数 12 ~ 18 前後の高級脂肪酸を還元して得られる高級アルコールの誘導体は、界面活性剤として用いられている。例えば、アルキル硫酸エステル塩やアルキルベンゼンスルホン酸塩等は陰イオン性界面活性剤として、また、ポリオキシアルキレンアルキルエーテルやアルキルポリグリコシド等是非イオン性界面活性剤として、いずれも洗浄剤又は殺菌剤に利用されている。同じく高級アルコールの誘導体としてアルキルアミン塩やモノ又はジアルキル 4 級アミン塩は、繊維処理剤や毛髪リンス剤又は殺菌剤として、ベンザルコニウム型 4 級アンモニウム塩は殺菌剤や防腐剤として日常的に利用されている。さらに、炭素数 18 前後の高級アルコールは植物の成長促進剤としても有用である。

【0003】

このように脂肪酸や脂質の利用は多岐にわたり、そのため植物等において生体内での脂肪酸や脂質の生産性を向上させる試みがおこなわれている。さらに、脂肪酸の用途や有用性はその炭素数に依存するため、脂肪酸の炭素数、即ち鎖長を制御する試みも行われている。例えば、ゲッケイジュ (*Umbellularia californica* (California bay)) 由来のアシル - A C P チオエステラーゼの導入により炭素数 12 の脂肪酸を蓄積させる方法 (特許文献 1、非特許文献 1) 等が提案されている。

【0004】

近年、バイオ燃料生産に有用であるとして、藻類が注目を集めている。藻類は、バイオディーゼル燃料として利用可能な脂質を光合成によって生産でき、しかも食料と競合しないことから、次世代のバイオマス資源として注目されている。また、藻類は、植物に比べ、高い脂質生産・蓄積能力を有するとの報告もある。

藻類の脂質合成メカニズムやそれを応用した生産技術について研究が始まってはいるが、未解明な部分も多い。例えば、上述のアシル - A C P 型チオエステラーゼについても、現在のところ、藻類由来のものはほとんど報告されておらず、珪藻綱等でわずかに報告例があるのみである (例えば、非特許文献 2)。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献 1】特表平 7 - 501924 号公報

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献 1】Voelker TA, Worrell AC, Anderson L, Bleibaum J, Fan C, Hawkins DJ, Radke SE, Davies HM., "Fatty acid biosynthesis redirected to medium chains in transgenic oilseed plants", Science. 1992 Jul

10

20

30

40

50

3;257(5066), p.72-74.

【非特許文献2】Yangmin Gong, Xiaojing Guo, Xia Wan, Zhuo Liang, Mulan Jiang, "Characterization of a novel thioesterase (PtTE) from *Phaeodactylum tricornutum*", Journal of Basic Microbiology, 2011 December, Volume 51, p.666-672.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は、野生型アシル - A C P チオエステラーゼのアミノ酸配列を改変したアシル - A C P チオエステラーゼ改変体、及びこれを用いた脂質の製造方法を提供することを課題とする。また、本発明は、アシル - A C P チオエステラーゼ改変体を導入し脂質の生産能が向上した形質転換体を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは、ナンノクロロプシス (*Nannochloropsis*) 属に属する藻類由来のアシル - A C P チオエステラーゼについて研究を行い、ナンノクロロプシス オキュラータ (*Nannochloropsis oculata*) の野生型アシル - A C P チオエステラーゼのアミノ酸配列にランダムな変異を導入し、複数のアシル - A C P チオエステラーゼ改変体を得た。そして、これらを用いて形質転換を行った結果、いくつかの形質転換体において、野生型アシル - A C P チオエステラーゼを導入した形質転換体と比較して、脂質、特に炭素数 12 又は 14 の脂肪酸の生産性が有意に向上することを見出した。本発明はこの知見に基づいて完成するに至ったものである。

【0009】

すなわち本発明は、宿主に下記 (a) 又は (b) のタンパク質をコードする遺伝子を導入して形質転換体を得る工程と、得られた形質転換体から脂質を採取する工程とを含む、脂質の製造方法 (以下、「本発明の製造方法」ともいう。) に関する。

(a) 配列番号 1 の 128 位 ~ 287 位のアミノ酸配列において、下記 (1) ~ (4) から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸置換を有するアミノ酸配列を有し、かつアシル - A C P チオエステラーゼ活性を有するタンパク質。

(1) 配列番号 1 の 150 位のアミノ酸がグルタミン酸からグリシンに置換。

(2) 配列番号 1 の 200 位のアミノ酸がアスパラギンからアスパラギン酸に置換。

(3) 配列番号 1 の 222 位のアミノ酸がアスパラギンからセリン又はアラニンに置換。

(4) 配列番号 1 の 245 位のアミノ酸がアルギニンからリジンに置換。

(b) (a) のタンパク質のアミノ酸配列において、アミノ酸置換されたアミノ酸以外の 1 又は数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入、又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつアシル - A C P チオエステラーゼ活性を有するタンパク質。

【0010】

また、本発明は、宿主に前記 (a) 又は (b) のタンパク質をコードする遺伝子を導入して得られる形質転換体 (以下、「本発明の形質転換体」ともいう。) に関する。

また、本発明は、前記 (a) 又は (b) のタンパク質 (以下、「本発明のアシル - A C P チオエステラーゼ改変体」ともいう。) に関する。

また、本発明は、宿主に前記 (a) 又は (b) のタンパク質をコードする遺伝子を導入して形質転換体を得る工程を含む、脂質の生産性を向上させる方法に関する。

【発明の効果】

【0011】

本発明の形質転換体は、野生型アシル - A C P チオエステラーゼを導入した形質転換体に比べ、脂質、特に炭素数 12 又は 14 の脂肪酸の生産性に優れる。そのため、当該形質転換体を用いた本発明の脂質の製造方法は、炭素数 12 又は 14 の脂肪酸及びこれらを構成成分とする脂質の生産性に特に優れる。本発明のアシル - A C P チオエステラーゼ改変

10

20

30

40

50

体、形質転換体、及び製造方法は、脂肪酸及び脂質の工業的生産に好適に用いることができる。

【発明を実施するための形態】

【0012】

以下、本発明のアシル - A C P チオエステラーゼ改変体、これを用いた形質転換体及び脂質の製造方法について順に説明する。

本発明において、脂質には、中性脂肪、ろう、セラミド等の単純脂質；リン脂質、糖脂質、スルホ脂質等の複合脂質；及びこれらの脂質から誘導される、脂肪酸、アルコール類、炭化水素類等の誘導脂質が含まれる。

【0013】

1. アシル - A C P チオエステラーゼ改変体

本発明のアシル - A C P チオエステラーゼ改変体は、配列番号 1 に示すアミノ酸配列を一部改変したアミノ酸配列を有し、アシル - A C P チオエステラーゼ活性を有するタンパク質である。配列番号 1 は、ナンノクロロプシス属に属する藻類であるナンノクロロプシス オキュラータ (*Nannochloropsis oculata*) 由来のアシル - A C P チオエステラーゼ (以下、野生型アシル - A C P チオエステラーゼともいい、N o T E と略記する) のアミノ酸配列である。

アシル - A C P (アシルキャリアープロテイン) チオエステラーゼは、脂肪酸やその誘導体 (トリアシルグリセロール (トリグリセリド) 等) の生合成系に關与する酵素である。当該酵素は、植物体や藻類では葉緑体等の色素体内において、細菌・真菌や動物体では細胞質内において、脂肪酸生合成過程の中間体であるアシル - A C P (脂肪酸残基であるアシル基とアシルキャリアープロテインとからなる複合体) のチオエステル結合を加水分解し、遊離の脂肪酸を生成する。アシル - A C P チオエステラーゼの作用によって、A C P 上での脂肪酸合成が終了し、切り出された脂肪酸はトリアシルグリセロール等の合成に供される。アシル - A C P チオエステラーゼには、基質であるアシル - A C P を構成するアシル基 (脂肪酸残基) の炭素原子数や不飽和結合数によって異なる反応特異性を示す複数のアシル - A C P チオエステラーゼが存在していることが知られており、生体内での脂肪酸組成を決める重要なファクターであると考えられている。

本発明において、「アシル - A C P チオエステラーゼ活性を有する」とは、アシル - A C P のチオエステル結合を加水分解する活性を有することをいう。

【0014】

本発明のアシル - A C P チオエステラーゼ改変体として、具体的には下記 (a) 又は (b) のタンパク質が挙げられる。

(a) 配列番号 1 の 128 位 ~ 287 位のアミノ酸配列において、下記 (1) ~ (4) から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸置換を有するアミノ酸配列を有し、かつアシル - A C P チオエステラーゼ活性を有するタンパク質。

(1) 配列番号 1 の 150 位のアミノ酸がグルタミン酸からグリシンに置換。

(2) 配列番号 1 の 200 位のアミノ酸がアスパラギンからアスパラギン酸に置換。

(3) 配列番号 1 の 222 位のアミノ酸がアスパラギンからセリン又はアラニンに置換。

(4) 配列番号 1 の 245 位のアミノ酸がアルギニンからリジンに置換。

(b) (a) のタンパク質のアミノ酸配列において、アミノ酸置換されたアミノ酸以外の 1 又は数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入、又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつアシル - A C P チオエステラーゼ活性を有するタンパク質。

【0015】

前記 (a) のタンパク質は、配列番号 1 に示す野生型アシル - A C P チオエステラーゼのアミノ酸配列の 128 位 ~ 287 位のアミノ酸配列を少なくとも有する。本発明者らは、配列番号 1 に示す野生型アシル - A C P チオエステラーゼのアミノ酸配列において、128 位 ~ 287 位の領域は、アシル - A C P チオエステラーゼとして機能するために重要で、アシル - A C P チオエステラーゼ活性を示すために必要十分な領域であることを見出

10

20

30

40

50

した。配列番号1の128位～287位のアミノ酸配列からなるタンパク質はアシル - ACPチオエステラーゼ活性を有する。前記(a)のタンパク質は、このアシル - ACPチオエステラーゼ活性にとって必要十分な領域を有し、アシル - ACPチオエステラーゼとして機能する。

さらに、前記(a)のタンパク質のアミノ酸配列では、配列番号1の128位～287位のアミノ酸配列中の、配列番号1の150位、200位、222位、及び245位から選ばれる少なくとも1つの位置のアミノ酸が、下記(1)～(4)のように置換されている。

(1) 配列番号1の150位のアミノ酸がグルタミン酸(Glu;E)からグリシン(Gly;G)に置換。

10

(2) 配列番号1の200位のアミノ酸がアスパラギン(Asn;N)からアスパラギン酸(Asp;D)に置換。

(3) 配列番号1の222位のアミノ酸がアスパラギン(Asn;N)からセリン(Ser;S)、又はアスパラギン(Asn;N)からアラニン(Ala;A)に置換。

(4) 配列番号1の245位のアミノ酸がアルギニン(Arg;R)からリジン(Lys;K)に置換。

例えば、前記(1)のアミノ酸置換を有する場合、(a)のタンパク質が有するアミノ酸配列は、配列番号1の128位～287位のアミノ酸配列を基本とし、当該配列中の配列番号1の150位に相当するアミノ酸であるグルタミン酸がグリシンで置換されたアミノ酸配列である。

20

【0016】

以下、配列番号1の150位に相当するアミノ酸が、グリシンに置換されたアシル - ACPチオエステラーゼ改変体をNoTE(E150G)、200位に相当するアミノ酸が、アスパラギン酸に置換されたアシル - ACPチオエステラーゼ改変体をNoTE(N200D)、222位に相当するアミノ酸が、セリンに置換されたアシル - ACPチオエステラーゼ改変体をNoTE(N222S)、222位に相当するアミノ酸が、アラニンに置換されたアシル - ACPチオエステラーゼ改変体をNoTE(N222A)、245位に相当するアミノ酸が、リジンに置換されたアシル - ACPチオエステラーゼ改変体をNoTE(R245K)、とそれぞれ略記する。

【0017】

30

前記(a)のタンパク質は、配列番号1の128位～287位のアミノ酸配列に相当するアミノ酸配列の他に、他のアミノ酸配列を有していてもよい。他のアミノ酸配列としては、配列番号1の1位～127位のアミノ酸配列若しくはその一部の配列、タンパク質の輸送や分泌に関与するシグナルペプチド配列等が挙げられる。これらの配列は、配列番号1の128位～287位のアミノ酸配列のN末端側に付加されることが好ましい。他のアミノ酸配列は、脂質生産性の観点から、配列番号1の1位～127位のアミノ酸配列若しくはその一部の配列が好ましい。

【0018】

前記(a)のタンパク質として好ましくは、配列番号1の1位～128位の間の任意の位置から287位までのアミノ酸配列において前記(1)～(4)から選ばれる少なくとも1つのアミノ酸置換を有するアミノ酸配列からなり、かつアシル - ACPチオエステラーゼ活性を有するタンパク質である。より好ましくは、配列番号1のアミノ酸配列、配列番号1の49位～287位までのアミノ酸配列、配列番号1の58位～287位までのアミノ酸配列、配列番号1の78位～287位までのアミノ酸配列、配列番号1の87位～287位までのアミノ酸配列、配列番号1の88位～287位までのアミノ酸配列、配列番号1の98位～287位までのアミノ酸配列、配列番号1の108位～287位までのアミノ酸配列、配列番号1の118位～287位までのアミノ酸配列、又は配列番号1の128位～287位までのアミノ酸配列において前記(1)～(4)から選ばれる少なくとも1つのアミノ酸置換を有するアミノ酸配列からなり、かつアシル - ACPチオエステラーゼ活性を有するタンパク質である。なお、配列番号1のアミノ酸配列、並びに配列番

40

50

号1において49位～287位、58位～287位、78位～287位、87位～287位、88位～287位、98位～287位、及び108位～287位、128位～287位のアミノ酸配列からなるタンパク質が、アシル - ACPチオエステラーゼ活性を有することは本発明者らにより確認されている。

【0019】

また、前記(a)のタンパク質は、前記(1)～(4)から選ばれるいずれか1つのアミノ酸置換を有することが好ましい。

【0020】

前記(b)のタンパク質は、前記(a)のタンパク質のアミノ酸配列の一部に欠失、置換、挿入、又は付加の変異を有するアミノ酸配列を有し、かつアシル - ACPチオエステラーゼ活性を有するタンパク質である。ただし、欠失、置換、挿入、又は付加の変異を有するアミノ酸は、前記(a)において前記(1)～(4)から選ばれるアミノ酸置換が施されたアミノ酸以外のアミノ酸である。例えば、(a)のタンパク質が前記(1)のアミノ酸置換を有する場合、(b)のタンパク質が有するアミノ酸配列は、配列番号1の128位～287位のアミノ酸配列を基本とし、当該配列中の配列番号1の150位に相当するアミノ酸がアスパラギン酸からバリンで置換され、さらに、当該配列中の該置換が施された150位に相当するアミノ酸以外の1又は数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入、又は付加されたアミノ酸配列である。

【0021】

一般に、酵素タンパク質をコードしているアミノ酸配列は、必ずしも全領域の配列が保存されていなければ酵素活性を示さないというものではなく、アミノ酸配列が変化しても酵素活性に影響を与えない領域も存在することが知られている。このような酵素活性に必須でない領域においては、アミノ酸の欠失、置換、挿入又は付加といった変異が導入されても酵素本来の活性を維持することができる。本発明においても、このようにアシル - ACPチオエステラーゼ活性が保持され、かつアミノ酸配列が一部欠失等により変化した改変体を用いることができる。

アミノ酸配列に欠失等の変異を導入する方法としては、例えば、アミノ酸配列をコードする塩基配列に変異を導入する方法が挙げられる。

【0022】

前記(b)のタンパク質において、「1又は数個のアミノ酸」は、脂質生産性の観点から、1～15個であることが好ましく、1～10個であることがより好ましく、1～5個であることがさらに好ましく、1～2個であることよりさらに好ましい。

【0023】

本発明のアシル - ACPチオエステラーゼ改変体のアシル - ACPチオエステラーゼ活性を有することは、例えば、大腸菌等の宿主細胞内で機能するプロモーターの下流にアシル - ACPチオエステラーゼ遺伝子を連結した融合遺伝子を脂肪酸分解系が欠損した宿主細胞へ導入し、導入したアシル - ACPチオエステラーゼ遺伝子が発現する条件で培養して、宿主細胞又は培養液中の脂肪酸組成の変化をガスクロマトグラフィー解析等の方法を用いて分析することにより、確認することができる。

また、大腸菌等の宿主細胞内で機能するプロモーターの下流にアシル - ACPチオエステラーゼ遺伝子を連結した融合遺伝子を宿主細胞へ導入し、導入したアシル - ACPチオエステラーゼ遺伝子が発現する条件で細胞を培養した後、細胞の破碎液に対し、Yuanらの方法(Yuan L, Voelker TA, Hawkins DJ. "Modification of the substrate specificity of an acyl-acyl carrier protein thioesterase by protein engineering" Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Nov 7;92(23), p.10639-10643)によって調製した各種アシル - ACPを基質とした反応を行うことにより、アシル - ACPチオエステラーゼ活性を測定することができる。

【0024】

本発明のアシル - ACPチオエステラーゼ改変体の取得方法については特に制限はなく、通常行われる化学的或いは遺伝子工学的手法等により得ることができる。例えば、配列

10

20

30

40

50

番号 1 に示すアミノ酸配列情報をもとに人工的に合成等することもでき、例えば、インビトロジェン社等のサービスを利用することができる。また、化学合成によりタンパク質合成を行ってもよく、遺伝子組み換え技術により組換えタンパク質を作製してもよい。例えば、ナンノクロロプシス・オキュラータ (*Nannochloropsis oculata*) からクローニングによって取得したアシル - A C P チオエステラーゼ遺伝子を遺伝子組み換え技術により改変したものをを用いることで、アシル - A C P チオエステラーゼ改変体を得ることができる。

【 0 0 2 5 】

2 . アシル - A C P チオエステラーゼ改変体をコードする遺伝子

前記 (a) 及び (b) のタンパク質をコードする遺伝子として具体的には、下記 (A) 及び (B) の D N A からなる遺伝子が例示できるが、本発明はこれらに限定されるものではない。

(A) 配列番号 2 の 3 8 2 位 ~ 8 6 4 位の塩基配列において、下記 (i) ~ (iv) から選ばれる少なくとも 1 つの塩基置換を有する塩基配列を有し、かつアシル - A C P チオエステラーゼ活性を有するタンパク質をコードする D N A 。

(i) 配列番号 2 の 4 4 8 位 ~ 4 5 0 位の塩基がグルタミン酸をコードする塩基からグリシンをコードする塩基に置換。

(ii) 配列番号 2 の 5 9 8 位 ~ 6 0 0 位の塩基がアスパラギンをコードする塩基からアスパラギン酸をコードする塩基に置換。

(iii) 配列番号 2 の 6 6 4 位 ~ 6 6 6 位の塩基がアスパラギンをコードする塩基からセリンをコードする塩基、又はアスパラギンをコードする塩基からアラニンをコードする塩基に置換。

(iv) 配列番号 2 の 7 3 3 位 ~ 7 3 5 位の塩基がアルギニンをコードする塩基からリジンに置換。

(B) (A) の D N A の塩基配列において、塩基置換された塩基以外の 1 又は数個の塩基が欠失、置換、挿入、又は付加された塩基配列を有し、かつアシル - A C P チオエステラーゼ活性を有するタンパク質をコードする D N A 。

【 0 0 2 6 】

配列番号 2 に示す塩基配列は、ナンノクロロプシス オキュラータ由来の野生型アシル - A C P チオエステラーゼをコードする遺伝子の塩基配列の一例である。

【 0 0 2 7 】

前記 (A) の D N A は、配列番号 2 の 3 8 2 位 ~ 8 6 4 位の塩基配列に相当する塩基配列の他に、他の塩基配列を有していてもよい。他の塩基配列としては、配列番号 2 の 1 位 ~ 3 8 1 位の塩基配列若しくはその一部の配列、タンパク質の輸送や分泌に關与するシグナルペプチド配列をコードする塩基配列等が挙げられる。これらの配列は、配列番号 2 の 3 8 2 位 ~ 8 6 4 位の塩基配列の 5 ' 末端側に付加されることが好ましい。他の塩基配列は、脂質生産性の観点から、配列番号 2 の 1 位 ~ 3 8 1 位の塩基配列若しくはその一部の配列が好ましい。

【 0 0 2 8 】

前記 (A) の D N A として好ましくは、配列番号 2 の 1 位 ~ 3 8 2 位の間の任意の位置から 8 6 4 位までの塩基配列において前記 (i) ~ (iv) から選ばれる少なくとも 1 つの塩基置換を有する塩基配列からなり、かつアシル - A C P チオエステラーゼ活性を有するタンパク質をコードする D N A である。より好ましくは、配列番号 2 の塩基配列、配列番号 2 の 1 4 5 位 ~ 8 6 4 位までの塩基配列、配列番号 2 の 1 7 2 位 ~ 8 6 4 位までの塩基配列、配列番号 2 の 2 3 2 位 ~ 8 6 4 位までの塩基配列、配列番号 2 の 2 5 9 位 ~ 8 6 4 位までの塩基配列、配列番号 2 の 2 6 2 位 ~ 8 6 4 位までの塩基配列、配列番号 2 の 2 9 2 位 ~ 8 6 4 位までの塩基配列、配列番号 2 の 3 2 2 位 ~ 8 6 4 位までの塩基配列、配列番号 2 の 3 5 2 位 ~ 8 6 4 位までの塩基配列、又は、配列番号 2 の 3 8 2 位 ~ 8 6 4 位までの塩基配列において前記 (i) ~ (iv) から選ばれる少なくとも 1 つの塩基置換を有する塩基配列からなり、かつアシル - A C P チオエステラーゼ活性を有するタンパク質をコ

10

20

30

40

50

ードするDNAである。

【0029】

前記(A)のDNAは、前記(i)～(iv)から選ばれるいずれか1つの塩基置換を有することが好ましい。

【0030】

前記(B)のDNAの塩基配列において、「1又は数個の塩基」は、脂質生産性の観点から、1～15個であることが好ましく、1～10個であることがより好ましく、1～5個であることがさらに好ましく、1～2個であることよりさらに好ましい。

欠失等の変異を導入する方法としては、例えば、部位特異的な変異導入法が挙げられる。具体的な部位特異的な変異の導入方法としては、Splicing overlap extension (SOE) PCR反応 (Horton et al., Gene 77, 61-68, 1989) を利用した方法、ODA法 (Hashimoto-Gotoh et al., Gene, 152, 271-276, 1995)、Kunkel法 (Kunkel, T. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1985, 82, 488) 等が挙げられる。また、Site-Directed Mutagenesis System Mutan-SuperExpress Kmキット (タカラバイオ社)、TransformerTM Site-Directed Mutagenesisキット (Clontech社)、KOD-Plus-Mutagenesis Kit (東洋紡社) 等の市販のキットを利用することもできる。また、ランダムな遺伝子変異を与えた後、適当な方法により酵素活性の評価及び遺伝子解析を行うことにより目的遺伝子を取得することもできる。

【0031】

アシル - ACPチオエステラーゼ改変体をコードする遺伝子の調製方法の一例としては、まず、ナンノクロロプシス オキュラータ (*Nannochloropsis oculata*) NIES2145株よりクローニングした野生型アシル - ACPチオエステラーゼ遺伝子の塩基配列 (配列番号2で示される塩基配列) を、In-Fusion (登録商標) HD Cloning Kit (Clontech, Mountain View, California) を用いてベクターに組み込む。次いで、得られたベクターDNAを鋳型にして、配列番号1で示されるアミノ酸配列において前記(1)～(4)のアミノ酸変異を有するアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むオリゴヌクレオチドをプライマーとして用い、PCR法によってDNA断片を増幅する。ここで、PCRの反応条件の好ましい一例としては、2本鎖DNAを1本鎖にする熱変性反応を94℃で30秒間行い、プライマー対を1本鎖DNAにハイブリダイズさせるアニーリング反応を55℃で約30秒間行い、DNAポリメラーゼを作用させる伸長反応を72℃で約70秒間行い、これらを1サイクルとしたものを30サイクル行うことが挙げられる。

PCR反応で増幅したDNAを、メチル化DNAを特異的に切断するDpn I 酵素で処理し、これを用いて大腸菌を形質転換し、抗生物質含有プレート培地で選択する。形質転換された大腸菌よりプラスミド抽出することで、目的のアミノ酸変異が導入されたアシル - ACPチオエステラーゼ改変体をコードする遺伝子を取得することができる。

【0032】

3. 形質転換体 (組換え体)

本発明の形質転換体は、宿主に前記(a)及び(b)のタンパク質をコードする遺伝子を導入して得られる。当該形質転換体では、野生型アシル - ACPチオエステラーゼ遺伝子を導入した形質転換体に比べ、脂質の生産能、特に炭素数12又は14の脂肪酸及びこれを構成成分とする脂質の生産能が有意に向上する。また、当該形質転換体では、野生型アシル - ACPチオエステラーゼ遺伝子を導入した形質転換体と比べ、脂質中の脂肪酸組成が改変される。なお、野生型アシル - ACPチオエステラーゼ及びアシル - ACPチオエステラーゼ改変体の脂肪酸及び脂質の生産能については、実施例で用いた方法により測定することができる。

【0033】

本発明の形質転換体は、アシル - ACPチオエステラーゼ改変体をコードする遺伝子を、通常の遺伝子工学的的方法によって宿主に導入することで得られる。具体的には、アシル - ACPチオエステラーゼ改変体をコードする遺伝子を宿主細胞中で発現させることのできる発現ベクターを調製し、これを宿主細胞に導入して宿主細胞を形質転換させることに

より作製できる。

【 0 0 3 4 】

形質転換体の宿主としては特に限定されず、微生物、植物体、又は動物体を用いることができる。なお、本発明において微生物には藻類や微細藻類が含まれる。製造効率及び得られた脂質の利用性の点から、宿主は微生物又は植物体であることが好ましく、微生物であることがより好ましい。

前記微生物は原核生物、真核生物のいずれであってもよく、エシェリキア (*Escherichia*) 属に属する微生物やバシラス (*Bacillus*) 属に属する微生物等の原核生物、又は酵母や糸状菌等の真核微生物を用いることができる。なかでも、脂質生産性の観点から、エシェリキア属に属する微生物である大腸菌 (*Escherichia coli*)、バシラス属に属する微生物である枯草菌 (*Bacillus subtilis*)、酵母に属する微生物である赤色酵母 (*Rhodospiridium toruloides*)、又は糸状菌に属する微生物であるモルチエレラ エスピー (*Mortierella* sp.) が好ましく、大腸菌がより好ましい。

また、前記微生物としては、微細藻類も好ましい。前記微細藻類としては、遺伝子組換え手法が確立している観点から、クラミドモナス (*Chlamydomonas*) 属に属する藻類、クロレラ (*Chlorella*) 属に属する藻類、ファエオダクティラム (*Phaeodactylum*) 属に属する藻類、又はナンノクロロプシス属に属する藻類が好ましく、ナンノクロロプシス属に属する藻類がより好ましい。ナンノクロロプシス属に属する藻類として具体的には、*Nannochloropsis oculata*、*Nannochloropsis gaditana*、*Nannochloropsis salina*、*Nannochloropsis oceanica*、*Nannochloropsis atomus*、*Nannochloropsis maculata*、*Nannochloropsis granulata*、又は *Nannochloropsis* sp.、等が挙げられる。なかでも、脂質生産性の観点から、*Nannochloropsis oculata*、又は *Nannochloropsis gaditana* が好ましく、*Nannochloropsis oculata* がより好ましい。

前記植物体としては、種子に脂質を高含有する観点から、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*)、ナタネ、ココヤシ、パーム、クフェア、又はヤトロファが好ましく、シロイヌナズナがより好ましい。

【 0 0 3 5 】

発現ベクターの母体となるベクターとしては、アシル - A C P チオエステラーゼ改変体をコードする遺伝子を宿主に導入することができ、宿主細胞内で当該遺伝子を発現可能なベクターであればよい。例えば、導入する宿主の種類に応じたプロモーターやターミネーター等の発現調節領域を有するベクターであって、複製開始点や選択マーカー等を有するベクターを用いることができる。また、プラスミド等の染色体外で自立増殖・複製するベクターであってもよいし、染色体内に組み込まれるベクターであってもよい。

具体的なベクターとしては、微生物を宿主とする場合には、例えば、pBluescript (pBS) II SK(-) (Stratagene社製)、pUC系ベクター (宝酒造社製)、pET系ベクター (タカラバイオ社製)、pGEX系ベクター (GEヘルスケア社製)、pCold系ベクター (タカラバイオ社製)、pHY300PLK (タカラバイオ社製)、pUB110 (McKenzie, T. et al., (1986), Plasmid 15 (2); p.93-103)、pBR322 (タカラバイオ社製)、pRS403 (ストラタジーン社製)、又はpMW218/219 (ニッポンジーン社製) が挙げられる。特に、宿主が大腸菌の場合は、pBluescript II SK(-)、又はpMW218/219が好ましく用いられる。

藻類を宿主とする場合には、例えば、P66 (*Chlamydomonas* Center)、P-322 (*Chlamydomonas* Center)、pPha-T1 (前記非特許文献2参照)、又はpJET1 (コスモ・バイオ社製) が挙げられる。特に、宿主がナンノクロロプシス属に属する藻類の場合は、pPha-T1、又はpJET1が好ましく用いられる。また、宿主がナンノクロロプシス属に属する藻類の場合には、Oliver Kilian, et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Dec 27;108(52), 2011、の文献記載の方法を参考にして、本発明の遺伝子、プロモーター及びターミネーターからなるDNA断片を用いて宿主を形質転換することもできる。このDNA断片としては、例えば、PCR増幅DNA断片や制限酵素切断DNA断片が挙げられる。

植物細胞を宿主とする場合には、例えば、pRI系ベクター (タカラバイオ社製)、pBI系

ベクター（クロンテック社製）、又はIN3系ベクター（インプラントイノベーションズ社製）が挙げられる。特に、宿主がシロイヌナズナの場合は、pRI系ベクター又はpBI系ベクターが好ましく用いられる。

【0036】

プロモーターやターミネーター等の発現調節領域や選択マーカーの種類も特に限定されず、通常使用されるプロモーターやマーカー等を導入する宿主の種類に応じて適宜選択して用いることができる。

具体的なプロモーターとしては、例えば、lacプロモーター、trpプロモーター、tacプロモーター、trcプロモーター、T7プロモーター、SpoVGプロモーター、カリフラワーモザイクウイルス35SRNAプロモーター、ハウスキーピング遺伝子（チューブリン、アクチン、ユビキチン等）のプロモーター、ナタネ由来Napin遺伝子プロモーター、植物由来Rubiscoプロモーター、又はナンノクロロプシス属由来のピオラキサンチン/クロロフィルa結合タンパク質遺伝子のプロモーターが挙げられる。

また、選択マーカーとしては、抗生物質耐性遺伝子（アンピシリン耐性遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子、エリスロマイシン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、スペクチノマイシン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、ブラストサイジンS耐性遺伝子、ピアラホス耐性遺伝子、ゼオシン耐性遺伝子、パロモマイシン耐性遺伝子、又はハイグロマイシン耐性遺伝子）等の薬剤耐性遺伝子が挙げられる。さらに、栄養要求性に関連する遺伝子の欠損等を選択マーカー遺伝子として使用することも可能である。

【0037】

上記ベクターにアシル - ACPチオエステラーゼ改変体をコードする遺伝子を、制限酵素処理やライゲーション等の通常の手法によって組み込むことにより形質転換に用いる発現ベクターを構築することができる。

形質転換方法としては、宿主に目的遺伝子を導入しうる方法であれば特に限定されるものではない。例えば、カルシウムイオンを用いる方法、一般的なコンピテントセル形質転換方法（J. Bacteriol. 93, 1925 (1967)）、プロトプラスト形質転換法（Mol. Gen. Genet. 168, 111 (1979)）、エレクトロポレーション法（FEMS Microbiol. Lett. 55, 135 (1990)）又はLP形質転換方法（T. Akamatsu及びJ. Sekiguchi, Archives of Microbiology, 1987, 146, p.353-357; T. Akamatsu及びH. Taguchi, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2001, 65, 4, p.823-829）等を用いることができる。宿主がナンノクロロプシス属に属する藻類の場合、Randor Radakovits, et al., Nature Communications, DOI:10.1038/ncomms1688, 2012、に記載のエレクトロポレーション法を用いて形質転換を行うこともできる。

【0038】

目的遺伝子断片が導入された形質転換体の選択は、選択マーカー等を利用することで行うことができる。例えば、ベクター由来の薬剤耐性遺伝子が、形質転換時に目的DNA断片とともに宿主細胞中に導入された結果、形質転換体が獲得する薬剤耐性を指標に行うことができる。また、ゲノムを鋳型としたPCR法等によって、目的DNA断片の導入を確認することもできる。

【0039】

4. 脂質の製造方法

次いで、上記で得られた形質転換体を用いて脂質を生産する。

本発明の製造方法は、アシル - ACPチオエステラーゼ改変体をコードする遺伝子を導入した形質転換体から脂質を採取する工程を含む。当該工程は、脂質の生産性向上の観点から、アシル - ACPチオエステラーゼ改変体をコードする遺伝子を導入した形質転換体を適切な条件にて培養又は生育して培養物又は生育物を得る工程、及び得られた培養物又は生育物から脂質を採取する工程を含むことが好ましい。ここで、培養物とは、培養した後の培養液及び形質転換体をいい、生育物とは、生育した後の形質転換体をいう。

【0040】

培養又は生育条件は、形質転換体の宿主に応じて適宜選択することができ、その宿主に対して通常用いられる培養又は生育条件を使用できる。

また、脂質の生産効率の点から、培地中に、例えばアシル - A C P チオエステラーゼの基質或いは脂肪酸生合成系に關与する前駆物質としてグリセロール、酢酸、又はマロン酸等を添加してもよい。

【 0 0 4 1 】

一例として、大腸菌を宿主として用いた形質転換体の場合、L B 培地又は Overnight Express Instant TB Medium (Novagen 社) で、3 0 ~ 3 7 、0 . 5 ~ 1 日間培養を行うことが挙げられる。また、シロイヌナズナを宿主として用いた形質転換体の場合、土壤中温度条件 2 0 ~ 2 5 、白色光を連続照射又は明期 1 6 時間・暗期 8 時間等の光条件下で 1 ~ 2 か月間栽培を行うことが挙げられる。

10

【 0 0 4 2 】

形質転換体の宿主が藻類の場合、以下の培地及び培養条件を用いることができる。

培地は天然海水又は人工海水をベースにしたものを使用してもよいし、市販の培養培地を使用してもよい。具体的な培地としては、f / 2 培地、E S M 培地、ダイゴ I M K 培地、L 1 培地、M N K 培地、等を挙げることができる。なかでも、脂質の生産性向上及び栄養成分濃度の観点から、f / 2 培地、E S M 培地、又はダイゴ I M K 培地が好ましく、f / 2 培地、又はダイゴ I M K 培地がより好ましく、f / 2 培地がさらに好ましい。藻類の生育促進、中鎖脂肪酸の生産性向上のため、培地に、窒素源、リン源、金属塩、ビタミン類、微量金属等を適宜添加することができる。

20

培地に接種する藻類の量は特に限定されないが、生育性の点から、培地当り 1 ~ 5 0 % (vol / vol) が好ましく、1 ~ 1 0 % (vol / vol) がより好ましい。培養温度は、藻類の増殖に悪影響を与えない範囲であれば特に制限されないが、通常、5 ~ 4 0 の範囲である。藻類の生育促進、中鎖脂肪酸の生産性向上、及び生産コストの低減の観点から、好ましくは 1 0 ~ 3 5 であり、より好ましくは 1 5 ~ 3 0 である。

また、藻類の培養は、光合成ができるよう光照射下で行うことが好ましい。光照射は、光合成が可能な条件であればよく、人工光でも太陽光でもよい。光照射時の照度としては、藻類の生育促進、中鎖脂肪酸の生産性向上の観点から、好ましくは 1 0 0 ~ 5 0 0 0 0 ルクスの範囲、より好ましくは 3 0 0 ~ 1 0 0 0 0 ルクスの範囲、さらに好ましくは 1 0 0 0 ~ 6 0 0 0 ルクスの範囲である。また、光照射の間隔は、特に制限されないが、前記と同様の観点から、明暗周期で行うことが好ましく、2 4 時間のうち明期が好ましくは 8 ~ 2 4 時間、より好ましくは 1 0 ~ 1 8 時間、さらに好ましくは 1 2 時間である。

30

また、藻類の培養は、光合成ができるように二酸化炭素を含む気体の存在下、又は炭酸水素ナトリウムなどの炭酸塩を含む培地で行うことが好ましい。気体中の二酸化炭素の濃度は特に限定されないが、生育促進、中鎖脂肪酸の生産性向上の観点から 0 . 0 3 (大気条件と同程度) ~ 1 0 % が好ましく、より好ましくは 0 . 0 5 ~ 5 % 、さらに好ましくは 0 . 1 ~ 3 % 、よりさらに好ましくは 0 . 3 ~ 1 % である。炭酸塩の濃度は特に限定されないが、例えば炭酸水素ナトリウムを用いる場合、生育促進、中鎖脂肪酸の生産性向上の観点から 0 . 0 1 ~ 5 質量% が好ましく、より好ましくは 0 . 0 5 ~ 2 質量% 、さらに好ましくは 0 . 1 ~ 1 質量% である。

40

培養時間は特に限定されず、脂質を高濃度に蓄積する藻体が高い濃度で増殖できるように、長期間 (例えば 1 5 0 日程度) 行なってもよい。藻類の生育促進、中鎖脂肪酸の生産性向上、及び生産コストの低減の観点から、培養期間は、好ましくは 3 ~ 9 0 日間、より好ましくは 3 ~ 3 0 日間、さらに好ましくは 7 ~ 3 0 日間である。なお、培養は、通気攪拌培養、振とう培養又は静置培養のいずれでもよく、通気性の向上の観点から、振とう培養が好ましい。

【 0 0 4 3 】

形質転換体において産生された脂質を採取する方法としては、通常生体内の脂質成分等を単離する際に用いられる方法、例えば、前述の培養物、生育物又は形質転換体から、ろ過、遠心分離、細胞の破碎、ゲルろ過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー

50

一、クロロホルム/メタノール抽出法、ヘキサン抽出法、又はエタノール抽出法等により脂質成分を単離、回収する方法が挙げられる。より大規模な場合は、培養物、生育物又は形質転換体より油分を圧搾又は抽出により回収後、脱ガム、脱酸、脱色、脱蠟、脱臭等の一般的な精製を行い、脂質を得ることができる。このように脂質成分を単離した後、単離した脂質を加水分解することで脂肪酸を得ることができる。脂質成分から脂肪酸を単離する方法としては、例えば、アルカリ溶液中で70 程度の高温で処理する方法、リパーゼ処理する方法、又は高圧熱水を用いて分解する方法等が挙げられる。

【0044】

本発明の製造方法では、本発明のアシル - ACPチオエステラーゼ改変体を用いることで、野生型アシル - ACPチオエステラーゼを用いた場合と比べ、脂質の生産性、特に炭素数12又は14の脂肪酸及びこれを構成成分とする脂質の生産性を有意に向上させることができる。

10

本発明の製造方法において製造される脂質は、その利用性の点から、単純脂質及び誘導脂質から選ばれる1種以上を含んでいることが好ましく、誘導脂質を含んでいることがより好ましく、脂肪酸又はそのエステルを含んでいることがさらに好ましい。脂質中に含まれる脂肪酸又はそのエステルは、界面活性剤等への利用性から、炭素原子数12～16の脂肪酸又はそのエステルが好ましく、炭素原子数12～14の脂肪酸又はそのエステルがより好ましく、炭素原子数12の脂肪酸又はそのエステルがさらに好ましく、ラウリン酸又はそのエステルがよりさらに好ましい。これらの高級脂肪酸を還元して得られる高級アルコールの誘導体は、界面活性剤として利用できる。

20

採取された総脂質成分中の炭素原子数12～14の脂肪酸の含有量は、界面活性剤として利用する観点から、好ましくは20質量%以上、より好ましくは25質量%以上である。さらに、採取された総脂質成分中に含まれる炭素原子数12の脂肪酸の含有量は、界面活性剤として利用する観点から、好ましくは5質量%以上、より好ましくは7質量%以上である。ここで、「採取された総脂質成分」とは、実施例で用いられた方法により算出された総脂質成分をいう。

【0045】

本発明の製造方法、形質転換体により得られる脂肪酸や脂質は、食用として用いる他、化粧品等の乳化剤、石鹸や洗剤等の洗浄剤、繊維処理剤、毛髪リンス剤、又は殺菌剤や防腐剤として利用することができる。

30

【0046】

上述した実施形態に関し、本発明はさらに以下の方法、形質転換体、タンパク質を開示する。

【0047】

<1> 宿主に下記(a)又は(b)のタンパク質をコードする遺伝子を導入して形質転換体を得る工程と、得られた形質転換体から脂質を採取する工程とを含む、脂質の製造方法。

(a) 配列番号1の128位～287位のアミノ酸配列において、下記(1)～(4)から選ばれる少なくとも1つのアミノ酸置換を有するアミノ酸配列を有し、かつアシル - ACPチオエステラーゼ活性を有するタンパク質。

40

(1) 配列番号1の150位のアミノ酸がグルタミン酸からグリシンに置換。

(2) 配列番号1の200位のアミノ酸がアスパラギンからアスパラギン酸に置換。

(3) 配列番号1の222位のアミノ酸がアスパラギンからセリン又はアラニンに置換。

(4) 配列番号1の245位のアミノ酸がアルギニンからリジンに置換。

(b) (a)のタンパク質のアミノ酸配列において、アミノ酸置換されたアミノ酸以外の1又は数個、好ましくは1～15個、より好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～5個、よりさらに好ましくは1～2個のアミノ酸が欠失、置換、挿入、又は付加されたアミノ酸配列を有し、かつアシル - ACPチオエステラーゼ活性を有するタンパク質。

【0048】

50

- < 2 > 前記宿主が微生物である、< 1 > 項記載の製造方法。
- < 3 > 前記微生物が微細藻類、好ましくはナンノクロロプシス属に属する藻類である、< 2 > 項記載の製造方法。
- < 4 > 前記微生物が大腸菌である、< 2 > 項記載の製造方法。
- < 5 > 前記脂質が炭素数 12 の脂肪酸又はそのエステルを含む、< 1 > ~ < 4 > のいずれか 1 項に記載の製造方法。
- < 6 > 前記脂質中に、炭素数 12 の脂肪酸が 5 質量 % 以上含有される、< 1 > ~ < 5 > のいずれか 1 項に記載の製造方法。
- < 7 > 前記 (a) のタンパク質が、配列番号 1 の 1 位 ~ 128 位の間の任意の位置から 287 位までのアミノ酸配列において前記 (1) ~ (4) から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸置換を有するアミノ酸配列からなり、かつアシル - ACP チオエステラーゼ活性を有するタンパク質である、< 1 > ~ < 6 > のいずれか 1 項に記載の製造方法。
- < 8 > 前記 (a) のタンパク質が、配列番号 1 のアミノ酸配列、配列番号 1 の 49 位 ~ 287 位までのアミノ酸配列、配列番号 1 の 58 位 ~ 287 位までのアミノ酸配列、配列番号 1 の 78 位 ~ 287 位までのアミノ酸配列、配列番号 1 の 87 位 ~ 287 位までのアミノ酸配列、配列番号 1 の 88 位 ~ 287 位までのアミノ酸配列、配列番号 1 の 98 位 ~ 287 位までのアミノ酸配列、配列番号 1 の 108 位 ~ 287 位までのアミノ酸配列、配列番号 1 の 118 位 ~ 287 位までのアミノ酸配列、又は配列番号 1 の 128 位 ~ 287 位までのアミノ酸配列において前記 (1) ~ (4) から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸置換を有するアミノ酸配列からなり、かつアシル - ACP チオエステラーゼ活性を有するタンパク質である、< 1 > ~ < 6 > のいずれか 1 項に記載の製造方法。

10

20

【 0049 】

- < 9 > 宿主に前記 (a) 又は (b) のタンパク質をコードする遺伝子を導入して得られる形質転換体。
- < 10 > 前記宿主が微生物である、< 9 > 項記載の形質転換体。
- < 11 > 前記微生物が微細藻類、好ましくはナンノクロロプシス属に属する藻類である、< 10 > 項記載の形質転換体。
- < 12 > 前記微生物が大腸菌である、< 10 > 項記載の形質転換体。
- < 13 > 前記 (a) 又は (b) のタンパク質をコードする遺伝子を含有する組換えベクター。

30

【 0050 】

- < 14 > 前記 (a) 又は (b) のタンパク質。

【 0051 】

- < 15 > 宿主に前記 (a) 又は (b) のタンパク質をコードする遺伝子を導入して形質転換体を得る工程を含む、脂質の生産性を向上させる方法。
- < 16 > 宿主に下記 (a) 又は (b) のタンパク質をコードする遺伝子を導入する工程を含む、脂質中の脂肪酸組成を改変する方法。

【 0052 】

- < 17 > 脂質を製造するための、< 9 > ~ < 12 > のいずれか 1 項に記載の形質転換体の使用。
- < 18 > 前記脂質が炭素数 12 の脂肪酸又はそのエステルである、< 17 > 項に記載の形質転換体の使用。

40

【 実施例 】

【 0053 】

以下、本発明を実施例に基づきさらに詳細に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

【 0054 】

実施例

1. 野生型アシル - ACP チオエステラーゼ遺伝子発現プラスミドの構築

配列番号 2 に示す塩基配列からなる野生型アシル - ACP チオエステラーゼ (N o T E

50

）遺伝子を鋳型として、下記表 1 に示す配列番号 3 及び配列番号 4 のプライマー対を用いた P C R 反応により、配列番号 2 の 2 5 9 位～ 8 6 4 位までの塩基配列からなる N o T E 遺伝子断片を取得した。なお、配列番号 2 の塩基配列を有する遺伝子は人工遺伝子の受託合成サービスを利用して取得した。また、プラスミドベクター pBluescriptII SK(-) (Stratagene社製、配列番号 1 7) を鋳型として、下記表 1 に示す配列番号 5 及び 6 のプライマー対を用いた P C R 反応により pBluescriptII SK(-) を増幅し、制限酵素 DpnI (東洋紡株式会社製) 処理により鋳型の消化を行った。これら 2 つの断片を、High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Applied Science社製) を用いて精製した後に、In-Fusion HD Cloning Kit (Clontech社製) を用いて融合し、N o T E 遺伝子発現用プラスミドを構築した。なお、本発現プラスミドは、N o T E 遺伝子がコードするアミノ酸配列 (配列番号 1) の N 末端側 1 位～ 8 6 位までのアミノ酸配列を除去し、8 7 位～ 2 8 7 位のアミノ酸配列で構築した。

10

【 0 0 5 5 】

2 . アシル - A C P チオエステラーゼ改変体発現プラスミドの構築

前記 1 . で構築した N o T E 遺伝子発現プラスミドを鋳型として、表 1 に示す配列番号 7 及び配列番号 8 のプライマー対を用いて P C R 反応を行い、配列番号 2 の 4 4 8 位～ 4 5 0 位の塩基を G A G から G G G に置換することでコードする 1 5 0 位のアミノ酸をグルタミン酸からグリシンに変異させた、N o T E 改変体 (E 1 5 0 G) 発現プラスミドを取得した。

同様にして、配列番号 9 及び配列番号 1 0 のプライマー対を用いて、配列番号 2 の 5 9 8 位～ 6 0 0 位の塩基を A A T から G A T に置換することでコードする 2 0 0 位のアミノ酸をアスパラギンからアスパラギン酸に変異させた、N o T E 改変体 (N 2 0 0 D) 発現プラスミドを取得した。

20

配列番号 1 1 及び配列番号 1 2 のプライマー対、配列番号 1 3 及び配列番号 1 4 のプライマー対を用いて、配列番号 2 の 6 6 4 位～ 6 6 6 位の塩基を A A C から G C C に置換することでコードする 2 2 2 位のアミノ酸をアスパラギンからアラニンに変異させた、N o T E 改変体 (N 2 2 2 A) 発現プラスミド、配列番号 2 の 6 6 4 位～ 6 6 6 位の塩基を A A C から A G C に置換することでコードする 2 2 2 位のアミノ酸をアスパラギンからセリンに変異させた、N o T E 改変体 (N 2 2 2 S) 発現プラスミドをそれぞれ取得した。

配列番号 1 5 及び配列番号 1 6 のプライマー対を用いて、配列番号 2 の 7 3 3 位～ 7 3 5 位の塩基を C G C から A A G に置換することでコードする 2 4 5 位のアミノ酸をアルギニンからリジンに変異させた、N o T E 改変体発現 (R 2 4 5 K) プラスミドをそれぞれ取得した。

30

【 0 0 5 6 】

【表 1】

表 1

配列番号	プライマー	塩基配列
配列番号 3	Insert TE F	TGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATG
配列番号 4	Insert TE R	AAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGCCTA
配列番号 5	pBS F	TTCGCGTTAAATTTTGTTAAATCAG
配列番号 6	pBS R	ATTGTTATCCGCTCACAATTCC
配列番号 7	E150G F	TCCACGGGACGCTCCGAGGCAAAGAGAAAATTGATGG
配列番号 8	E150G R	GCGTCCCGTGGATAAGGTGGAACCTCAGGAATTCAG
配列番号 9	N200D F	TGCTGGACGATACCATGGGAGTTGCCTTTTTCG
配列番号 10	N200D R	TGGTATCGTCCAGCAAAGCCGCAATGGACCCTC
配列番号 11	N222A	ACCATCGCTACAAGCGACCCATCACG
配列番号 12	N222A rev	CTTGTAGGCGATGGTGAGATTTGCTGTAAAC
配列番号 13	N222S	ACCATCAGCTACAAGCGACCCATCACG
配列番号 14	N222S rev	CTTGTAGCTGATGGTGAGATTTGCTGT
配列番号 15	R245K	GAAGGGAAGAAGGTCTTCTTGCGGGCC
配列番号 16	R245K rev	GACCTTCTCCCTTCCACCTTCTCTAC

10

【0057】

20

3. N o T E 遺伝子発現プラスミドの大腸菌への導入

前記で構築した N o T E 遺伝子発現プラスミド、及び各 N o T E 改変体発現プラスミドを用いて、大腸菌突然変異株である K27 株 (fadD88) (Overath et al, Eur. J. Biochem. 7, 559-574, 1969) をコンピテントセル形質転換法により形質転換した。形質転換処理をした K27 株を 37 で一晩静置し、得られたコロニーを LB Amp 液体培地 (Bacto Trypton 1%, Yeast Extract 0.5%, NaCl 1%, アンピシリンナトリウム 50 µg/mL) 1 mL に接種し、37 で一晩培養した。前記培養液 20 µL を、2 mL の Overnight Express Instant TB Medium (Novagen 社) に接種し、30 で振とう培養した。培養 24 時間後、培養液に含まれる脂質成分を、下記 4. の方法にて解析した。なお、陰性対照として、プラスミドベクター pBluescript II SK(-) で形質転換した大腸菌 K27 株についても同様に実験を行った。

30

【0058】

4. 大腸菌培養液中の脂質の抽出及び構成脂肪酸の分析

培養液 1 mL に、内部標準として 1 mg/mL の 7 - ペンタデカノンを 50 µL 添加後、0.5 mL のクロロホルム、1 mL のメタノール及び 10 µL の 2 N 塩酸を培養液に添加して激しく攪拌後 30 分間放置した。その後さらに、0.5 mL のクロロホルム及び 0.5 mL の 1.5% KCl を添加して攪拌後、3,000 rpm にて 15 分間遠心分離を行い、パスツールピペットにてクロロホルム層 (下層) を回収した。得られたクロロホルム層に窒素ガスを吹き付けて乾固し、0.5 N 水酸化カリウム / メタノール溶液 0.7 mL を添加し、80 で 30 分間恒温した。続いて 1 mL の 14% 三フッ化ホウ素溶液 (SIGMA 社製) を添加し、80 にて 10 分間恒温した。その後、ヘキサン、飽和食塩水を各 1 mL 添加し激しく攪拌し、室温にて 30 分間放置後、上層であるヘキサン層を回収して脂肪酸エステルを得た。

40

【0059】

得られた脂肪酸エステルをガスクロマトグラフィー解析に供した。測定条件を以下に示す。

キャピラリーカラム: DB-1 MS 30 m × 200 µm × 0.25 µm (J&W Scientific)、

移動相: 高純度ヘリウム、

カラム内流量: 1.0 mL / 分、

50

昇温プログラム：１００（１分間）→１０／分→３００（５分間）、
 平衡化時間：１分間、
 注入口：スプリット注入（スプリット比：１００：１）、
 圧力１４．４９ｐｓｉ，１０４ｍＬ／分，
 注入量１μＬ、
 洗浄バイアル：メタノール・クロロホルム、
 検出器温度：３００

【００６０】

また、脂肪酸エステルの特異性は、同サンプルを同条件でガスクロマトグラフ質量分析解析に供することにより行った。

10

ガスクロマトグラフィー解析により得られた波形データのピーク面積より、各脂肪酸のメチルエステル量を定量した。各ピーク面積を、内部標準である７－ペンタデカノンのピーク面積と比較することで試料間の補正を行い、培養液１リットルあたりの各脂肪酸量を算出した。さらに、各脂肪酸量の総和を総脂肪酸量とし、総脂肪酸量に占める各脂肪酸量の割合を算出した。

ＮｏＴＥ遺伝子導入株、５つのＮｏＴＥ改変体導入株、及び陰性対照であるプラスミドベクターｐＢＳ導入株での総脂肪酸量（脂質量）及び総脂肪酸量に占める各脂肪酸量の割合を、表２及び３に示す。なお、表中の脂肪酸組成において、Cxとあるのは炭素原子数xの脂肪酸を、x：yとあるのは炭素原子数xで二重結合数がyの脂肪酸を表す。

【００６１】

20

【表２】

表２

導入 プラスミド	総脂肪 酸量 (mg/L)	脂肪酸組成(%)										
		C12		C14		C16		C17	C18			C19
		12:1	12:0	14:1	14:0	16:1	16:0	17:0	18:n (n≥2)	18:1	18:0	19:0
pBS	103.1	0.0	0.0	0.0	3.9	2.4	46.7	25.2	2.1	7.6	1.8	10.3
NoTE (野生型)	205.0	2.6	2.2	11.4	9.0	24.6	26.1	9.6	0.6	10.8	0.6	2.6
E150G	245.7	3.6	2.9	12.8	9.1	19.1	26.3	10.3	1.5	10.9	0.8	2.7
N200D	288.9	4.3	3.9	13.2	12.6	26.4	23.0	7.0	0.6	7.0	0.4	1.7
N222A	205.3	4.5	2.4	13.9	9.3	26.5	22.9	8.5	0.7	9.7	0.1	1.3
N222S	240.4	4.6	2.5	14.6	9.3	27.2	21.9	8.1	0.7	9.0	0.7	1.5
R245K	216.5	4.4	2.8	13.7	9.8	23.7	24.1	8.9	0.7	9.5	0.7	1.7

30

【００６２】

表２から明らかなように、５つのＮｏＴＥ改変体導入株では、ＮｏＴＥ遺伝子導入株に比べて、総脂肪酸生産量が増加した。また、５つのＮｏＴＥ改変体導入株では、ＮｏＴＥ遺伝子導入株に比べて、総脂肪酸量に占めるＣ１２脂肪酸及びＣ１４脂肪酸の含有率が高かった。このことから、これらのＮｏＴＥ改変体は、野生型ＮｏＴＥに比べてＣ１２脂肪酸及びＣ１４脂肪酸の選択性が向上していることがわかった。

40

【配列表】

0006319889000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 尾崎 達郎
和歌山県和歌山市湊1334 花王株式会社研究所内
- (72)発明者 東條 卓人
和歌山県和歌山市湊1334 花王株式会社研究所内
- (72)発明者 崔 天蔚
東京都中央区日本橋茅場町一丁目14番10号 花王株式会社内

審査官 吉田 知美

- (56)参考文献 国際公開第2014/103930(WO, A1)
Biochemistry, 1998年, 37, p.16130-16138
Biochemistry, 1996年, 35, p.9967-9973

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12P 7/64
C12N 9/16
C12N 15/00 - 15/90
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
CPlus/REGISTRY/MEDLINE/WPIDS/BIOSIS(STN)