【公報種別】特許法第１７条の２の規定による補正の掲載
【部門区分】第１部門第１区分
【発行日】平成25年1月17日(2013.1.17)

【公表番号】特表2012-513743(P2012-513743A)
【公表日】平成24年6月21日(2012.6.21)
【年通号数】公開・登録公報2012-024
【出願番号】特願2011-538718(P2011-538718)
【国際特許分類】
Ｃ１２Ｎ　15/09　(2006.01)
Ｃ１２Ｐ　7/64　(2006.01)
Ｃ１１Ｃ　3/00　(2006.01)
Ｃ１１Ｃ　3/10　(2006.01)
Ｃ１１Ｃ　1/04　(2006.01)
Ｃ１１Ｃ　3/12　(2006.01)
Ｃ１１Ｃ　3/14　(2006.01)
【ＦＩ】
Ｃ１２Ｎ　15/00　ＺＮＡＡ
Ｃ１２Ｐ　7/64
Ｃ１１Ｃ　3/00
Ｃ１１Ｃ　3/10
Ｃ１１Ｃ　1/04
Ｃ１１Ｃ　3/12
Ｃ１１Ｃ　3/14

【手続補正書】
【提出日】平成24年11月21日(2012.11.21)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
培地中で、油産生微生物の細胞集合を育てることによる、トリグリセリド油脂組成物を生成する方法であって、この細胞は、プロモーターに動作可能に連結した状態で外来遺伝子を含み、この方法は、
（ａ）前記細胞集合を与える工程と；
（ｂ）アセテート、フロリドシド、フルクトース、ガラクトース、グルクロン酸、グルコース、グリセロール、ラクトース、マンノース、Ｎ－アセチルグルコサミン、ラムノース、ショ糖、キシロース、黒液、トウモロコシデンプン、解重合されたセルロース系材料、サトウキビ汁、糖液、ジャガイモ、ソルガム、ソルガムシロップ、テンサイ、サトウキビからなる群から選択される固定炭素源を培地に加える工程と；
（ｃ）前記細胞が、細胞乾燥重量の少なくとも１０％を脂質として蓄積するまで、前記細胞集合を育てる工程と；
（ｄ）培養した前記細胞から、トリグリセリド油脂組成物を単離する工程とを含む、方法。
【請求項２】
前記固定炭素源が、ショ糖、グルコース、フルクトース、サトウキビ汁、解重合されたセルロース系材料からなる群から選択される、請求項１に記載の方法。

【請求項３】
前記外来遺伝子が、ショ糖インベルターゼ、脂肪族アシル－ＡＣＰチオエステラーゼ、脂肪酸アシル－ＣｏＡ／アルデヒド還元酵素、脂肪酸アシル－ＣｏＡ還元酵素、脂肪族アルデヒド還元酵素、脂肪族アルデヒド脱炭酸酵素、アシルキャリアータンパク質、抗生物質への耐性を付与するタンパク質からなる群から選択されるタンパク質をコードする、請求項２に記載の方法。
【請求項４】
前記細胞は、脂肪族アシル－ＡＣＰチオエステラーゼをコードする外来遺伝子を含む、請求項３に記載の方法。
【請求項５】
前記細胞が、ショ糖インベルターゼをコードする外来遺伝子をさらに含む、請求項４に記載の方法。
【請求項６】
前記外来遺伝子が、脂肪酸デサチュラーゼをコードする、請求項１に記載の方法。
【請求項７】
前記脂肪酸デサチュラーゼが、ω－６脂肪酸デサチュラーゼ、ω－３脂肪酸デサチュラーゼ、ω－６－オレイン酸デサチュラーゼ、およびステアロイル－ＡＣＰデサチュラーゼからなる群から選択される、請求項６に記載の方法。
【請求項８】
前記細胞は、ノックアウトまたは下方調節された外来デサチュラーゼ遺伝子をさらに含む、請求項１～５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９】
油産生微生物が、微細藻類である、請求項１～８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１０】
前記微細藻類は、Ｐｒｏｔｏｔｈｅｃａ属の微細藻類である、請求項９に記載の方法。
【請求項１１】
前記外来遺伝子が、Ｐｒｏｔｏｔｈｅｃａ内での発現のためにコドンが最適化されたコード配列を含み、前記コード配列は、前記コドンが最適化された配列が、前記外来遺伝子をコードする天然の配列よりもＰｒｏｔｏｔｈｅｃａ内でより効率的に翻訳されるように、前記コード配列のコドンの少なくとも６０％に対し、表１の最も好ましいコドンまたは２番目に好ましいコドンを含む、請求項１０に記載の方法。
【請求項１２】
前記細胞が、Ｐｒｏｔｏｔｈｅｃａ内での発現のためにコドンが最適化された第２のコード配列を含む、第２の外来遺伝子をさらに含み、前記第２のコード配列は、前記コドンが最適化された配列が、前記第２の外来遺伝子をコードする天然の配列よりもＰｒｏｔｏｔｈｅｃａ内でより効率的に翻訳されるように、前記第２のコード配列のコドンの少なくとも６０％に対し、表１の最も好ましいコドンまたは２番目に好ましいコドンを含む、請求項１１に記載の方法。
【請求項１３】
各コード配列が、各コード配列のコドンの少なくとも８０％に対し、表１の最も好ましいコドンを含む、請求項１１または１２に記載の方法。
【請求項１４】
前記細胞は、配列番号１１～１９のヌクレオチド配列に対するヌクレオチド同一性が少なくとも７５％の配列を含む２３Ｓ　ｒＲＮＡを有している、請求項１～１３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１５】
前記細胞が、Ｐｒｏｔｏｔｈｅｃａ　ｍｏｒｉｆｏｒｍｉｓ、Ｐｒｏｔｏｔｈｅｃａ　ｋｒｕｇａｎｉ、Ｐｒｏｔｏｔｈｅｃａ　ｓｔａｇｎｏｒａ、Ｐｒｏｔｏｔｈｅｃａ　ｚｏｐｆｉｉからなる群から選択される、請求項１～１４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１６】

前記トリグリセリド油脂組成物が、
（ａ）Ｃ８～Ｃ１４が少なくとも４％、および
（ｂ）以下の１つ以上の属性：
ｉ．総カロチノイドが約０．４マイクログラム／ｍｌ未満；
ｉｉ．リコピンが約０．００１マイクログラム／ｍｌ未満；
ｉｉｉ．βカロチンが約０．０２マイクログラム／ｍｌ未満；
ｉｖ．油脂１ｋｇあたり、クロロフィルが約０．０２ミリグラム未満；
ｖ．油脂１００ｇあたり、γ－トコフェロールが約０．４０～０．６０ミリグラム；
ｖｉ．油脂１００ｇあたり、カンペステロールが約３～９ｍｇ；
ｖｉｉ．油脂１ｇあたり、総トコトリエノール量が約０．５ミリグラム未満
の脂質プロフィールを有する、請求項１～１５のいずれか１項に記載の方法によって生成するトリグリセリド油脂組成物。

【請求項１７】
請求項１６の油を、大豆油、菜種油、キャノーラ油、パーム油、パーム核油、ココナツ油、トウモロコシ油、野菜くず油、ナンキンハゼ油、オリーブ油、ヒマワリ油、綿実油、鶏脂、牛脂、豚脂、微細藻類油、大型藻類油、クフェア油、亜麻油、ピーナッツ油、上質のホワイトグリース、ラード、カメリナ・サティバ油、カラシの種子油、カシューナッツ油、オーツ麦油、ハウチワマメ油、ケナフ油、キンセンカ油、麻油、コーヒー油、亜麻仁（亜麻）油、ヘーゼルナッツ油、ユーホルビア油、カボチャの種油、コリアンダー油、ツバキ油、ゴマ油、ベニバナ油、イネ油、アブラギリ油、ココア油、コプラ油、ケシ油、トウゴマの実油、ピーカン油、ホホバ油、ジャトロファ油、マカダミア油、ブラジルナッツ油、アボカド油、石油、または上述のいずれかの油の留分からなる群から選択される油とブレンドする、ブレンドした油。

【請求項１８】
請求項１６又は請求項１７に記載のトリグリセリド油脂組成物に対して、トランスエステル化、水素化、ハイドロクラッキング、脱酸素、異性化、エステル化、ヒドロキシル化、加水分解、エポキシ化、および鹸化からなる群から選択される１つ以上の化学反応を行う工程を含む、化学物質を生産する方法。

【請求項１９】
前記トリグリセリド油脂組成物の加水分解反応によって、グリセロール及び脂肪酸が生成し、前記加水分解反応が、酸加水分解、アルカリ加水分解、酵素加水分解、触媒的加水分解、加圧熱水による加水分解からなる群から選択される、請求項１８に記載の方法。

【請求項２０】
前記エステル化反応が、トランスエステル化、方向性を持ったインターエステル化、及びインターエステル化からなる群から選択される、請求項１８に記載の方法。

【請求項２１】
前記脂肪酸に対し、アミノ化及びオゾン分解からなる群から選択されるさらなる化学反応を行う、請求項１９に記載の方法。

【請求項２２】
化学化合物を生産する方法であって、この方法が、請求項１６又は請求項１７に記載のトリグリセリド油脂組成物に対して、水素化処理、脱酸素、異性化、気体の除去からなる群から選択される１つ以上の化学反応を行う工程を含む、方法。

【請求項２３】
前記脱酸素反応が、水素化分解、水素化、連続的な水素化－水素化分解、連続的な水素化分解－水素化、水素化－水素化分解反応の組み合わせからなる群から選択される、請求項１８又は請求項２２に記載の方法。

【請求項２４】
縮合反応が、前記化学反応の前、前記化学反応と同時、又は前記化学反応の後に行われる、請求項１８～２３のいずれか１項に記載の方法。

【請求項２５】

細胞外の環境が、少なくとも５ｍＭの窒素を含む状態から、０ｍＭの窒素を含む状態に変わると、Ｐｒｏｔｏｔｈｅｃａ属の細胞において、少なくとも３倍上方調節されるようなプロモーターをコードする、組み換え核酸。

【請求項２６】

前記核酸が、配列番号９１～１０２のヌクレオチド配列からなる群から選択される５０ヌクレオチド以上のセグメントを含む、請求項２５に記載の組み換え核酸。

【請求項２７】

（ａ）Ｐｒｏｔｏｔｈｅｃａ属の細胞内で活性なプロモーターと；

（ｂ）コード配列のコドンの少なくとも２０％に対し、表１の最も好ましいコドンまたは２番目に好ましいコドンを含むような、タンパク質をコードする遺伝子とをさらに含む、請求項２５又は請求項２６に記載の組み換え核酸。

【請求項２８】

前記組み換え核酸がプラスチド標的配列を含む、請求項２５～２７のいずれか１項に記載の組み換え核酸。

【請求項２９】

前記組み換え核酸が、ショ糖インベルターゼ、脂肪族アシル－ＡＣＰチオエステラーゼ、脂肪酸アシル－ＣｏＡ／アルデヒド還元酵素、脂肪酸アシル－ＣｏＡ還元酵素、脂肪族アルデヒド還元酵素、脂肪族アルデヒド脱炭酸酵素、アシルキャリアータンパク質、抗生物質への耐性を付与するタンパク質からなる群から選択されるタンパク質をコードする遺伝子をさらに含む、請求項２５～２８のいずれか１項に記載の組み換え核酸。

【請求項３０】

前記組み換え核酸が、Ｐｒｏｔｏｔｈｅｃａ属の細胞の核ゲノムに内在するフランキング核酸配列をさらに含み、このフランキング核酸配列が、少なくとも２００ヌクレオチド長である、請求項２５～２９のいずれか１項に記載の組み換え核酸。

【請求項３１】

前記フランキング核酸配列が、第１のフランキング核酸配列及び第２のフランキング核酸配列を含み、ここで、第１のフランキング核酸配列及び第２のフランキング核酸配列が、（ａ）それぞれ、少なくとも２００ヌクレオチド長であり、（ｂ）Ｐｒｏｔｏｔｈｅｃａの同じ染色体上に、２０ｋＢを超えて離れることがない場所に位置している、請求項３０に記載の組み換え核酸。