

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-513964

(P2014-513964A)

(43) 公表日 平成26年6月19日 (2014.6.19)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/13 (2006.01)	C 1 2 N 1/13 Z N A	4 B 0 6 4
C 1 2 P 7/64 (2006.01)	C 1 2 P 7/64	4 B 0 6 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C 0 8 3
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 108 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2014-509507 (P2014-509507)	(71) 出願人	509328423
(86) (22) 出願日	平成24年5月4日 (2012.5.4)		ソラザイム、インク
(85) 翻訳文提出日	平成25年11月5日 (2013.11.5)		SOLAZYME INC
(86) 国際出願番号	PCT/US2012/036690		アメリカ合衆国、94080 カリフォル
(87) 国際公開番号	W02012/154626		ニア州 南サンフランシスコ ブルーバー
(87) 国際公開日	平成24年11月15日 (2012.11.15)		ド ゲートウェイ 225
(31) 優先権主張番号	61/483,550		225 Gateway Bouleva
(32) 優先日	平成23年5月6日 (2011.5.6)		rd South San Franci
(33) 優先権主張国	米国 (US)		sco, CA 94080 United
(31) 優先権主張番号	61/497,501		States of America
(32) 優先日	平成23年6月15日 (2011.6.15)	(74) 代理人	100078282
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 山本 秀策
		(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 キシロースを代謝する遺伝子操作微生物

(57) 【要約】

本発明は、固定炭素源としてキシロースを用いて油保有微生物を培養する方法を提供する。固定炭素源としてキシロースを代謝して、キシロースを油に転化できるように遺伝子遺伝子操作されている微生物も提供される。本明細書中で提供される製法の特別な利点は、キシロースを利用する微生物発酵製法による、アルコールではなく、むしろ油の生産を包含する。本発明の一局面において、植物界の微生物であって、活性キシロース代謝経路酵素を産生するように作用可能な組換え核酸を含む微生物が提供される。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

植物界の微生物であって、活性キシロース代謝経路酵素を産生するように作用可能な組換え核酸を含む微生物。

【請求項 2】

本質的にキシロースからなる炭素源上で培養される際に、細胞数を増大し、または脂質を産生することができる請求項 1 記載の微生物。

【請求項 3】

キシロースをトリグリセリドに転化する請求項 1 または 2 記載の微生物。

【請求項 4】

グルコースを炭素源として用いて培養される際に、乾燥細胞重量単位で 10、20、30、40、50、60、70 または 80 % のトリグリセリドを蓄積することができる請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の微生物。

【請求項 5】

純キシロース上で培養される際に、乾燥細胞重量単位で少なくとも 10、20、30、40、50、60、70 または 80 % のトリグリセリドを蓄積することができる請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の微生物。

【請求項 6】

炭素源としてのグルコース上で培養される際に、前記微生物が、乾燥細胞重量単位で少なくとも 50 % のトリグリセリドを蓄積することができ、純キシロース上で培養される際に、乾燥細胞重量単位で少なくとも 20 % のトリグリセリドを蓄積することができる請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

前記微生物が、窒素制限条件下で 60 % グルコースおよび 40 % キシロースである炭素源上で培養される際に、炭素原子が、同位体追跡により測定して、少なくとも 5、10、20、30、40 または 50 % がキシロースの炭素元素に由来する脂質を細胞が産生する請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】

前記微生物が、21、14 または 7 日以下で、単独炭素源として 2.5 % キシロースを有する培地中のキシロースの少なくとも 90 % を消費することができる請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 9】

前記組換え核酸が、活性キシロース輸送体、キシロース - 5 - ホスフェート輸送体、キシロースイソメラーゼ、キシロキナーゼ、キシリトールデヒドロゲナーゼまたはキシロースレダクターゼのうちの 1 つ以上をコードするように作用可能である請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の微生物。

【請求項 10】

前記組換え核酸が、色素体ターゲティングシグナル配列と作用可能連結で活性キシロース - 5 - ホスフェート輸送体をコードし、前記キシロース - 5 - ホスフェート輸送体が色素体中にキシロース - 5 - ホスフェートを輸送するように作用可能である請求項 9 記載の微生物。

【請求項 11】

前記組換え核酸が、(a) 色素体中へのキシロース - 5 - ホスフェートの輸送を引き起こす；ように、色素体ターゲティングシグナル配列を有するキシロース - 5 - ホスフェート輸送体タンパク質を、(b) キシロキナーゼを、および (c) キシロースイソメラーゼ、またはキシリトールデヒドロゲナーゼおよびキシロースレダクターゼの両方をコードするように作用可能である請求項 1 ~ 10 のいずれかに記載の微生物。

【請求項 12】

緑色植物亜界に属するものである前記請求項のいずれかに記載の微生物。

【請求項 13】

10

20

30

40

50

緑藻植物下界または門の、テトラ藻亜門の、トレボウクシア藻綱の、またはクロレラ目に属するものである前記請求項のいずれかに記載の微生物。

【請求項 14】

クロレラ属またはプロトテカ属に属するものである前記請求項のいずれかに記載の微生物。

【請求項 15】

プロトテカ・モリフォルミスまたはクロレラ・プロトテコイデス種に属するものである前記請求項のいずれかに記載の微生物。

【請求項 16】

前記微生物により産生される脂質の脂肪酸プロフィールを変更するように作用可能である組換え修飾をさらに含む前記請求項のいずれかに記載の微生物。

10

【請求項 17】

前記組換え修飾が、活性アシル - A C P チオエステラーゼ、ケトアシル - A C P シンターゼまたは脂肪酸デサチュラーゼをコードする外因性遺伝子を含むか、あるいはアシル - A C P チオエステラーゼ、ケトアシル - A C P シンターゼまたは脂肪酸デサチュラーゼを低減するかまたは除去するように作用可能である請求項 16 記載の微生物。

【請求項 18】

微生物バイオマスまたは前記バイオマスから生産される製品の製造方法であって、キシロースを微生物バイオマスに転化させるためにキシロースを含む培地中で請求項 1 ~ 17 のいずれかに記載の組換え微生物を従属栄養的に培養することを包含する方法。

20

【請求項 19】

前記微生物バイオマスが微生物脂質を含む請求項 18 記載の方法。

【請求項 20】

前記脂質が、以下からなる群から選択される製品を製造するために用いられる請求項 18 または 19 記載の方法：化学製品、潤滑剤、洗剤、燃料、食用油および化粧品成分。

【請求項 21】

前記製品が、バイオディーゼルまたは再生可能ディーゼルから選択される燃料である請求項 20 記載の方法。

【請求項 22】

前記培地が、キシロース 50 % 超である炭素源を含む請求項 18 ~ 20 のいずれかに記載の方法。

30

【請求項 23】

前記炭素源が、キシロース 55 % 超、60 % 超、65 % 超、70 % 超、75 % 超、80 % 超、85 % 超、90 % 超または 95 % 超である請求項 22 記載の方法。

【請求項 24】

請求項 1 ~ 17 記載の微生物のいずれか、または請求項 18 ~ 23 記載の方法のいずれかにより産生される天然油。

【請求項 25】

請求項 24 記載の前記天然油から生産される油脂化学製品、食用油、燃料またはその他の製品。

40

【請求項 26】

キシローストランスロケータタンパク質をコードするように作用可能な外因性遺伝子を含む組換え油性微生物。

【請求項 27】

微細藻類、油性酵母、油性真菌および油性細菌からなる群から選択される請求項 26 記載の微生物。

【請求項 28】

微細藻類である請求項 27 記載の微生物。

【請求項 29】

プロトテカ属の一種である請求項 28 記載の微細藻類。

50

【請求項 30】

プロトテカ・モリフォルミスである請求項 29 記載の微細藻類。

【請求項 31】

前記外因性遺伝子が、組換え油性微生物中での発現のためにコドン最適化されている請求項 26 ~ 30 のいずれかに記載の微生物。

【請求項 32】

キシローストランスロケーターの自然色素体標的配列が、微細藻類からの色素体標的配列と取り替えられている請求項 26 記載の微生物。

【請求項 33】

前記キシローストランスロケーターが、シロイヌナズナ属 (Arabidopsis) からの XPT タンパク質のアミノ酸配列を含む請求項 26 ~ 32 のいずれか一項に記載の微生物。

10

【請求項 34】

1 つ以上の外因性遺伝子を含む組換え油性微生物であって、前記 1 つ以上の外因性遺伝子が、オキシドレダクターゼ経路タンパク質、キシロースイソメラーゼ経路タンパク質またはキシロース輸送体タンパク質のうちの 1 つ以上をコードするように作用可能である微生物。

【請求項 35】

少なくとも 1 つの追加の外因性遺伝子をさらに含む請求項 34 記載の微生物であって、前記追加外因性遺伝子が、スクロースインベルターゼ、脂肪アシル - ACP チオエステラーゼ、脂肪アシル - CoA / アルデヒドレダクターゼ、脂肪アシル - CoA レダクターゼ、脂肪アルデヒドレダクターゼ、脂肪アルデヒドデカルボニラーゼ、アシル輸送タンパク質、デサチュラーゼ、多糖分解酵素、ならびに抗生物質に対する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ように作用可能である微生物。

20

【請求項 36】

微細藻類、油性酵母、油性真菌および油性細菌からなる群から選択される請求項 34 または 35 記載の微生物。

【請求項 37】

微細藻類である請求項 36 記載の微生物。

【請求項 38】

プロトテカ属の一種である請求項 37 記載の微細藻類。

30

【請求項 39】

プロトテカ・モリフォルミスである請求項 38 記載の微細藻類。

【請求項 40】

前記 1 つ以上の外因性遺伝子が、キシロースレダクターゼ、キシリトールデヒドロゲナーゼおよびキシロキナーゼからなる群から選択されるオキシドレダクターゼ経路タンパク質をコードするように作用可能である請求項 34 ~ 39 のいずれか一項に記載の微生物。

【請求項 41】

前記 1 つ以上の外因性遺伝子が、キシロキナーゼをコードするように作用可能である請求項 40 記載の微生物。

40

【請求項 42】

前記キシロキナーゼが、ピキア属からの XYL3 タンパク質のアミノ酸配列を含む請求項 41 記載の微生物。

【請求項 43】

前記 1 つ以上の外因性遺伝子が、キシリトールデヒドロゲナーゼをコードするように作用可能である請求項 40 記載の微生物。

【請求項 44】

前記キシリトールデヒドロゲナーゼが、ピキア属からの XYL2 タンパク質のアミノ酸配列を含む請求項 43 記載の微生物。

【請求項 45】

50

前記 1 つ以上の外因性遺伝子が、キシロースレダクターゼをコードするように作用可能である請求項 40 記載の微生物。

【請求項 46】

前記キシロースレダクターゼが、ピキア属からの X Y L 1 タンパク質のアミノ酸配列を含む請求項 45 記載の微生物。

【請求項 47】

前記 1 つ以上の外因性遺伝子が、キシロースイソメラーゼおよびキシルロキナーゼからなる群から選択されるキシロースイソメラーゼ経路タンパク質をコードするように作用可能である請求項 34 ~ 39 のいずれか一項に記載の微生物。

【請求項 48】

前記キシロースイソメラーゼ経路タンパク質がキシロースイソメラーゼである請求項 47 記載の微生物。

【請求項 49】

前記キシロースイソメラーゼが、ピロミセス属からの X Y L A タンパク質のアミノ酸配列を含む請求項 48 記載の微生物。

【請求項 50】

前記キシロースイソメラーゼ経路タンパク質がキシルロキナーゼである請求項 47 記載の微生物。

【請求項 51】

前記キシルロキナーゼが、ピキア属からの X Y L 3 タンパク質のアミノ酸配列を含む請求項 50 記載の微生物。

【請求項 52】

前記 1 つ以上の外因性遺伝子が、X Y L A、X Y L 2、X Y L 3 および X P T からなる群から選択されるタンパク質をコードするように作用可能である請求項 34 ~ 39 のいずれか一項に記載の微生物。

【請求項 53】

前記キシローストランスロケータの自然色素体標的配列が、微細藻類からの色素体標的配列と取り替えられている請求項 52 記載の微生物。

【請求項 54】

前記キシロース輸送体が、シロイヌナズナ属からの X P T タンパク質のアミノ酸配列を含む請求項 53 記載の微生物。

【請求項 55】

前記 1 つ以上の外因性遺伝子が、キシロース輸送体をコードするように作用可能である請求項 34 ~ 39 のいずれか一項に記載の微生物。

【請求項 56】

前記キシロース輸送体が、トリコデルマ属からの X L T 1 タンパク質のアミノ酸配列を含む請求項 55 記載の微生物。

【請求項 57】

G P T - A - X P T (配列番号 45)、G P T - F - X P T (配列番号 47) または S 1 0 6 S A D - X P T (配列番号 49) から選択される 1 つ以上のキシローストランスロケータタンパク質をコードする第一の外因性遺伝子、S U T 1 (配列番号 37)、G X S 1 (配列番号 39)、X L T 1 (配列番号 43) または共輸送体 (配列番号 41) から選択される 1 つ以上のキシロース輸送体タンパク質をコードする第二の外因性遺伝子、X y l A (配列番号 15) または X Y L 3 (配列番号 51) から選択される 1 つ以上のオキシドレダクターゼ経路タンパク質をコードする第三の外因性遺伝子、および X Y L 1 (配列番号 35)、X Y L 2 (配列番号 50) または X Y L 3 (配列番号 51) から選択される 1 つ以上のキシロースイソメラーゼ経路タンパク質をコードする第四の外因性遺伝子を含む組換え油性微生物。

【請求項 58】

X y l A、X Y L 3、S U T 1 および G P T - F - X P T をコードするように作用可能

10

20

30

40

50

な外因性遺伝子を含む請求項 5 7 記載の微生物。

【請求項 5 9】

X y l A、X Y L 2、X Y L 3、X L T 1 および S 1 0 6 S A D - X P T をコードするように作用可能な外因性遺伝子を含む請求項 5 7 記載の微生物。

【請求項 6 0】

X y l A、X Y L 1、X Y L 3、X L T 1 および S 1 0 6 S A D - X P T をコードするように作用可能な外因性遺伝子を含む請求項 5 7 記載の微生物。

【請求項 6 1】

X y l A、X Y L 1、X Y L 3、G X S 1 および G P T - A - X P T をコードするように作用可能な外因性遺伝子を含む請求項 5 7 記載の微生物。

10

【請求項 6 2】

X Y L 1、X Y L 2、X Y L 3、共輸送体および G P T - F - X P T をコードするように作用可能な外因性遺伝子を含む請求項 5 7 記載の微生物。

【請求項 6 3】

X Y L 1、X Y L 2、X Y L 3、G X S 1 および G P T - F - X P T をコードするように作用可能な外因性遺伝子を含む請求項 5 7 記載の微生物。

【請求項 6 4】

X Y L 2、X Y L 3、共輸送体および S 1 0 6 S A D - X P T をコードするように作用可能な外因性遺伝子を含む請求項 5 7 記載の微生物。

【請求項 6 5】

X Y L 2、X Y L 3、X L T 1 および S 1 0 6 S A D - X P T をコードするように作用可能な外因性遺伝子を含む請求項 5 7 記載の微生物。

20

【請求項 6 6】

X Y L 2、X Y L 3、G X S 1 および G P T - A - X P T をコードするように作用可能な外因性遺伝子を含む請求項 5 7 記載の微生物。

【請求項 6 7】

キシロース 5 0 % 超である炭素源を含む培地中で増殖または脂質産生ができる請求項 2 6 ~ 6 6 のいずれか一項に記載の微生物。

【請求項 6 8】

キシロース 5 5 % 超、6 0 % 超、6 5 % 超、7 0 % 超、7 5 % 超、8 0 % 超、8 5 % 超、9 0 % 超または 9 5 % 超である炭素源を含む培地中で増殖または脂質産生ができる請求項 6 7 記載の微生物。

30

【請求項 6 9】

単独炭素源としてキシロースを含む培地中で増殖または脂質産生ができる請求項 6 8 記載の微生物。

【請求項 7 0】

単独炭素源としてグルコースを含む培地中で培養される、1 つ以上の外因性遺伝子を欠く同等の微生物細胞により産生される脂質の少なくとも 2 5 %、少なくとも 3 0 %、少なくとも 4 0 %、少なくとも 4 5 %、少なくとも 5 0 %、少なくとも 5 5 % または少なくとも 6 0 % を産生することができる請求項 6 9 記載の微生物。

40

【請求項 7 1】

請求項 2 6 ~ 6 6 のいずれか一項に記載の微生物を増殖させるかまたは培養することにより産生される微生物脂質組成物であって、前記産生は以下のステップを包含する組成物：

(a) キシロースを含む培地中で前記微生物を増殖させるかまたは培養すること、および

(b) 前記微生物を溶解し、そして前記微生物脂質組成物を単離すること。

。

【請求項 7 2】

前記培地がグルコースをさらに含む請求項 7 1 記載の微生物脂質組成物。

50

【請求項 7 3】

前記培地が、キシロース 5 0 % 超である炭素源を含む請求項 7 1 記載の微生物脂質組成物。

【請求項 7 4】

炭素源が、キシロース 5 5 % 超、6 0 % 超、6 5 % 超、7 0 % 超、7 5 % 超、8 0 % 超、8 5 % 超、9 0 % 超または 9 5 % 超である請求項 7 3 記載の微生物脂質組成物。

【請求項 7 5】

前記培地が単独炭素源としてキシロースを含む請求項 7 4 記載の微生物脂質組成物。

【請求項 7 6】

請求項 2 6 ~ 6 6 のいずれか一項に記載の微生物を増殖させるかまたは培養することにより産生される微生物脂質組成物であって、前記産生は以下のステップを包含する組成物：

(a) 培地中に微生物を提供すること、

(b) 前記培地に脱重合化セルロース系材料を付加すること（ここで、前記セルロース系材料はキシロースを含む）、

(c) 前記微生物が脂質としてその乾燥重量の少なくとも約 2 0 % を蓄積するまで、前記微生物を増殖させるかまたは培養すること、および

(d) 前記微生物を溶解し、そして前記微生物脂質組成物を単離すること。

【請求項 7 7】

前記脱重合化セルロース系材料のキシロース濃度が少なくとも約 1 0 0 g / L である請求項 7 6 記載の微生物脂質組成物。

【請求項 7 8】

前記脱重合化セルロース系材料のキシロース濃度が少なくとも約 4 0 0 g / L である請求項 7 7 記載の微生物脂質組成物。

【請求項 7 9】

前記脱重合化セルロース系材料がグルコースをさらに含む請求項 7 7 記載の微生物脂質組成物。

【請求項 8 0】

前記脱重合化セルロース系材料のグルコース濃度が少なくとも約 1 0 0 g / L である請求項 7 9 記載の微生物脂質組成物。

【請求項 8 1】

前記脱重合化セルロース系材料のグルコース濃度が少なくとも約 4 0 0 g / L である請求項 7 9 記載の微生物脂質組成物。

【請求項 8 2】

前記脱重合化セルロース系材料のキシロースおよびグルコースの総濃度が少なくとも約 1 0 0 g / L である請求項 8 1 記載の微生物脂質組成物。

【請求項 8 3】

前記脱重合化セルロース系材料のキシロースおよびグルコースの総濃度が少なくとも約 4 0 0 g / L である請求項 7 6 記載の微生物脂質組成物。

【請求項 8 4】

前記脱重合化セルロース系材料のキシロースおよびグルコースの総濃度が少なくとも約 6 0 0 g / L である請求項 7 6 記載の微生物脂質組成物。

【請求項 8 5】

前記脱重合化セルロース系材料のキシロースおよびグルコースの総濃度が少なくとも約 8 0 0 g / L である請求項 7 6 記載の微生物脂質組成物。

【請求項 8 6】

請求項 2 6 ~ 6 6 のいずれか一項に記載の微生物を増殖させるかまたは培養することを包含する微生物脂質組成物の産生方法であって、以下のステップを包含する方法：

(a) キシロースを含む培地中で前記微生物を増殖させるかまたは培養すること、および

10

20

30

40

50

(b) 前記微生物を溶解し、前記微生物脂質組成物を単離すること。

【請求項 87】

前記培地が、キシロース 50% 超である炭素源を含む請求項 86 記載の方法。

【請求項 88】

前記炭素源が、キシロース 55% 超、60% 超、65% 超、70% 超、75% 超、80% 超、85% 超、90% 超または 95% 超である請求項 87 記載の方法。

【請求項 89】

前記培地が単独炭素源としてキシロースを含む請求項 88 記載の方法。

【請求項 90】

単独炭素源としてグルコースを含む培地中で増殖されるかまたは培養される、1 つ以上の外因性遺伝子を欠く同等の微生物細胞により産生される脂質の少なくとも 25%、少なくとも 30%、少なくとも 40%、少なくとも 45%、少なくとも 50%、少なくとも 55% または少なくとも 60% を、前記微生物が産生する請求項 89 記載の方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連する出願の相互参照)

本出願は、米国特許法第 119 条 (e) に基づき、2011 年 5 月 6 日に米国仮出願第 61/483,550 号および 2011 年 6 月 15 日に米国仮出願第 61/497,501 号の利益を請求する。これらの出願は、それぞれ、あらゆる目的のために内容全体が参照により組み込まれる。

20

【0002】

(配列表の参照)

本明細書は、詳細な説明の最後に示されるように、配列表を含んでいる。

【0003】

(政府利益)

本発明は、カリフォルニア・エネルギー委員会補助金番号 PIR-08-018 に基づいたカリフォルニア州の支援でなされた。エネルギー委員会は、本発明に対して一定の権利を有する。

【0004】

30

本発明は、脂質またはその他の有用なバイオマスを生成するために、キシロースを代謝できるようにする油性微生物におけるキシロース代謝経路の発現に、ならびにそのバイオマスから生成される油脂化学製品、食品、燃料およびその他の製品に関する。

【背景技術】

【0005】

バイオテクノロジーにおける重要で且つ困難な課題は、液体燃料、化学製品、食品およびその他の製品のような有益な物質への変換のために、セルロース系材料中の炭素捕獲の膨大な可能性を開放することである。具体的課題の 1 つは、微生物の従属栄養的培養のための炭素源として、脱重合化ヘミセルロース中に一般に見出されるキシロースを用いることである。酵母を用いるエタノールの生成においてキシロースを使用して多くの研究が行われているが、ほとんどの酵母株は、キシロースを利用できないか、またはキシロース単独を利用するのは非常に非効率的である (Jeffries, 2006, Curr. Op. Biotech. 17: 320-326; および Wang et al., 2004, Biotechnol. Lett. 26(11): 885-890 参照)。

40

【0006】

ある種の油性微生物 (例えば、油性酵母および油性微細藻類) は、固定炭素エネルギーをより高価値の生成物、例えばトリグリセリド、脂肪酸、炭水化物およびタンパク質に転化することができる。さらに、微細藻類それ自体は、食物源として役に立ち得る。例えば、油性微細藻類のある種は、「テラードオイル」を生成するよう遺伝子操作されており、これは、それらのトリグリセリド含量が、それらが得られた系統に比して、脂肪酸鎖長および飽和の変更された分布を示す、ということを意味する。特許文献 1、特許文献 2、

50

特許文献 3、特許文献 4 および特許文献 5 ならびに P C T 出願 U S 1 1 / 0 3 8 , 4 6 3 号および U S 1 1 / 0 3 8 , 4 6 4 号参照。

【 0 0 0 7 】

油性微生物を用いて、有意量で、キシロースを脂質およびその他の生成物に転化する能力は、それが、化石燃料への依存を低減し、微生物油のコストを低減するという理由で、大きな環境的意義を有する。

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 0 8 】

【 特許文献 1 】 国際公開第 2 0 0 8 / 1 5 1 1 4 9 号

10

【 特許文献 2 】 国際公開第 2 0 0 9 / 1 2 6 8 4 3 号

【 特許文献 3 】 国際公開第 2 0 1 0 / 0 4 5 3 5 8 号

【 特許文献 4 】 国際公開第 2 0 1 0 / 0 6 3 0 3 1 号

【 特許文献 5 】 国際公開第 2 0 1 0 / 0 6 3 0 3 2 号

【 発明の概要 】

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 0 9 】

一態様において、本発明は、植物界の微生物であって、活性キシロース代謝経路酵素を産生するように作用可能な組換え核酸を含む微生物を提供する。いくつかの場合には、微生物は、本質的にキシロースからなる炭素源上で培養される場合、細胞数を増大し、または脂質を産生し得る。いくつかの場合には、微生物は、キシロースをトリグリセリドに転化する。いくつかの場合には、微生物は、グルコースを炭素源として用いて培養される場合、乾燥細胞重量単位で 1 0、2 0、3 0、4 0、5 0、6 0、7 0 または 8 0 % のトリグリセリドを蓄積することができる。いくつかの場合には、微生物は、純キシロース上で培養される場合、乾燥細胞重量単位で少なくとも 1 0、2 0、3 0、4 0、5 0、6 0、7 0 または 8 0 % のトリグリセリドを蓄積することができる。いくつかの場合には、微生物は、炭素源としてのグルコース上で培養される場合、乾燥細胞重量単位で少なくとも 5 0 % のトリグリセリドを蓄積することができ、そして純キシロース上で培養される場合、乾燥細胞重量単位で少なくとも 2 0 % のトリグリセリドを蓄積することができる。いくつかの場合には、微生物は、窒素制限条件下で 6 0 % グルコースおよび 4 0 % キシロースである炭素源上で培養され、炭素原子が、同位体追跡により測定して少なくとも 5、1 0、2 0、3 0、4 0 または 5 0 % がキシロースの炭素元素に由来する脂質を細胞は産生する。いくつかの場合には、微生物は、2 1、1 4 または 7 日以下で、単独炭素源として 2 . 5 % キシロースを有する培地中のキシロースの少なくとも 9 0 % を消費することができる。

20

30

【 0 0 1 0 】

いくつかの場合には、組換え核酸は、活性キシロース輸送体、キシロース - 5 - ホスフェート輸送体、キシロースイソメラーゼ、キシロキナーゼ、キシリトールデヒドロゲナーゼまたはキシロースレダクターゼのうちの 1 つ以上をコードするように作用できる。いくつかの場合には、組換え核酸は、色素体ターゲティングシグナル配列と作用可能に連結して活性キシロース - 5 - ホスフェート輸送体をコードし、そしてキシロース - 5 - ホスフェート輸送体は、色素体中にキシロース - 5 - ホスフェートを輸送するように作用可能である。いくつかの場合には、組換え核酸は、(a) 色素体中へのキシロース - 5 - ホスフェートの輸送を引き起こすように、色素体ターゲティングシグナル配列を有するキシロース - 5 - ホスフェート輸送体タンパク質、(b) キシロキナーゼ、および (c) キシロースイソメラーゼ、またはキシリトールデヒドロゲナーゼおよびキシロースレダクターゼの両方をコードするように作用可能である。

40

【 0 0 1 1 】

いくつかの場合には、微生物は、緑色植物亜界に属するものである。いくつかの場合には、微生物は、緑藻植物下界または門の、テトラ藻亜門の、トレボウクシア藻綱の、また

50

はクロレラ目に属するものである。いくつかの場合には、微生物は、クロレラ属またはプロトテカ属に属するものである。いくつかの場合には、微生物は、プロトテカ・モリフォルミスまたはクロレラ・プロトテコイデス種に属するものである。

【0012】

いくつかの場合には、微生物は、微生物により産生される脂質の脂肪酸プロファイルを変更するように作用可能である組換え修飾をさらに含む。いくつかの場合には、組換え修飾は、活性アシル - A C P チオエステラーゼ、ケトアシル - A C P シンターゼまたは脂肪酸デサチュラーゼをコードする、あるいはアシル - A C P チオエステラーゼ、ケトアシル - A C P シンターゼまたは脂肪酸デサチュラーゼを低減するかまたは除去するように作用可能である外因性遺伝子を含む。

10

【0013】

別の態様において、本発明は、微生物バイオマスまたはバイオマスから生産される製品の製造方法であって、キシロースを微生物バイオマスに転化させるように、キシロースを含む培地中で、本明細書中で上述のように、組換え微生物を従属栄養的に培養することを包含する方法を提供する。いくつかの場合には、微生物バイオマスは微生物脂質を含む。いくつかの場合には、脂質は、以下からなる群から選択される製品を製造するために用いられる：化学製品、潤滑剤、洗剤、燃料、食用油および化粧品成分。いくつかの場合には、製品は、バイオディーゼルまたは再生可能ディーゼルから選択される燃料である。

【0014】

いくつかの場合には、培地は、キシロース 50 % 超である炭素源を含む。いくつかの場合には、炭素源は、キシロースが 55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 % または 95 % より多い。

20

【0015】

別の態様では、本発明は、上記のまたは本明細書中に記載するような微生物のいずれかにより産生される、あるいは上記のまたは本明細書中に記載するような方法のいずれかにより生成される天然油を提供する。

【0016】

別の態様では、本発明は、上記の天然油から生産される油脂化学製品、食用油、燃料またはその他の製品を提供する。

【0017】

別の態様では、本発明は、炭素源としてキシロースを利用する組換え油性微生物を提供する。一実施形態では、油性微生物は、微細藻類、油性酵母、油性真菌または油性細菌である。別の実施形態では、組換え微生物は、細胞に、炭素源としてキシロースを利用することを可能にするか、またはより効率的に利用することを可能にする 1 つ以上の外因性遺伝子を含む微細藻類細胞、例えば、プロトテカ属の細胞（これに限定されない）である。いくつかの実施形態では、細胞は、プロトテカ・モリフォルミス、プロトテカ・クルガニ、プロトテカ・スタグノラまたはプロトテカ・ゾフィー種のうちの一系統であり、他の実施形態では、細胞は、配列番号 1 ~ 9 のうちの 1 つ以上と少なくとも 70、75、80、85 または 95 % のヌクレオチド同一性を有する 23SrRNA 配列を有する。外因性遺伝子は、プロモーターと作用可能連結でコード配列を含み、いくつかの実施形態では、プロモーターは、プロトテカ属の 1 つの種に内在する遺伝子に由来する。さらなる実施形態では、コード配列は、オキシドレダクターゼ経路タンパク質、キシロースイソメラーゼ経路タンパク質、キシローストランスロケータータンパク質およびキシロース輸送体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。

30

40

【0018】

種々の実施形態において、微細藻類細胞は、細胞に、炭素源としてキシロースを利用することを可能にするか、またはより効率的に利用することを可能にする 1 つ以上の外因性遺伝子を含む。例えば、本発明の微細藻類細胞は、以下を含むように遺伝子操作されているものを含む：(i) キシロースイソメラーゼ経路タンパク質をコードする 1 つ以上の遺伝子、または (ii) オキシドレダクターゼ経路タンパク質をコードする 1 つ以上の遺伝

50

子、または (i i i) キシロースイソメラーゼ経路タンパク質をコードする 1 つ以上の遺伝子、(i v) キシロース輸送体タンパク質をコードする 1 つ以上の遺伝子、または (v) キシローストランスロケータタンパク質をコードする 1 つ以上の遺伝子、あるいは (i)、(i i)、(i i i)、(i v) および (v) の組合せ。一実施形態では、微生物細胞は、キシロース輸送体タンパク質およびキシロースイソメラーゼ経路タンパク質を発現するよう遺伝子操作される。別の実施形態では、微生物細胞は、キシロース輸送体タンパク質およびオキシドレダクターゼ経路タンパク質を発現するよう遺伝子操作される。さらなる一実施形態では、微生物細胞は、キシロース輸送体タンパク質、オキシドレダクターゼ経路タンパク質およびキシロースイソメラーゼタンパク質を発現するよう遺伝子操作される。さらなる別の実施形態では、微生物細胞は、キシロース輸送体タンパク質、オキシドレダクターゼ経路タンパク質およびキシローストランスロケータタンパク質を発現するよう遺伝子操作される。別の実施形態では微生物細胞は、キシロース輸送体タンパク質、キシロースイソメラーゼ経路タンパク質およびキシローストランスロケータを発現するよう遺伝子操作される。別の実施形態では、微生物細胞は、キシロース輸送体タンパク質、キシロースイソメラーゼ経路タンパク質、キシロースイソメラーゼ経路タンパク質およびキシローストランスロケータタンパク質を発現するよう遺伝子操作される。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 9 】

本発明のいくつかの実施形態では、組換え油性微生物は、G P T - A - X P T (配列番号 4 5)、G P T - F - X P T (配列番号 4 7) または S 1 0 6 S A D - X P T (配列番号 4 9) から選択されるキシローストランスロケータタンパク質をコードする第一外因性遺伝子、S U T 1 (配列番号 3 7)、G X S 1 (配列番号 3 9)、X L T 1 (配列番号 4 3) または共輸送体 (配列番号 4 1) から選択されるキシロース輸送体タンパク質をコードする第二外因性遺伝子、X y 1 A (配列番号 1 5) または X Y L 3 (配列番号 5 1) から選択されるオキシドレダクターゼ経路タンパク質をコードする第三外因性遺伝子、および X Y L 1 (配列番号 3 5)、X Y L 2 (配列番号 5 0) または X Y L 3 (配列番号 5 1) から選択されるキシロースイソメラーゼ経路タンパク質をコードする第四外因性遺伝子を含む。

【 0 0 2 0 】

一実施形態では、組換え油性微生物は、X y 1 A、X Y L 3、S U T 1 および G P T - F - X P T をコードする外因性遺伝子を含む。一実施形態では、組換え油性微生物は、X y 1 A、X Y L 2、X Y L 3、X L T 1 および S 1 0 6 S A D - X P T をコードする外因性遺伝子を含む。一実施形態では、組換え油性微生物は、X y 1 A、X Y L 1、X Y L 3、X L T 1 および S 1 0 6 S A D - X P T をコードする外因性遺伝子を含む。一実施形態では、組換え油性微生物は、X y 1 A、X Y L 1、X Y L 3、G X S 1 および G P T - A - X P T をコードする外因性遺伝子を含む。一実施形態では、組換え油性微生物は、X Y L 1、X Y L 2、X Y L 3、共輸送体および G P T - F - X P T をコードする外因性遺伝子を含む。一実施形態では、組換え油性微生物は、X Y L 1、X Y L 2、X Y L 3、G X S 1 および G P T - F - X P T をコードする外因性遺伝子を含む。一実施形態では、組換え油性微生物は、X Y L 2、X Y L 3、X L T 1 および S 1 0 6 S A D - X P T をコードする外因性遺伝子を含む。一実施形態では、組換え油性微生物は、X Y L 2、X Y L 3、X L T 1 および S 1 0 6 S A D - X P T をコードする外因性遺伝子を含む。一実施形態では、組換え油性微生物は、X Y L 2、X Y L 3、G X S 1 および G P T - A - X P T をコードする外因性遺伝子を含む。

【 0 0 2 1 】

いくつかの場合には、組換え油性微生物は、キシロース 5 0 % 超である炭素源を含む培地中で増殖または培養される。いくつかの場合には、微生物は、キシロース 5 5 % 超、6 0 % 超、6 5 % 超、7 0 % 超、7 5 % 超、8 0 % 超、8 5 % 超、9 0 % 超または 9 5 % 超である炭素源を含む培地中で増殖または培養される。いくつかの場合には、微生物は、単独炭素源としてキシロースを含む培地中で増殖または培養される。いくつかの場合には、微生物は、キシロース 5 0 % 超である炭素源を含む培地または単独炭素源としてキシロース

スを含む培地中で増殖されるかまたは培養される場合、単独炭素源としてグルコースを含み、1つ以上の外因性遺伝子を欠く培地中で増殖されるかまたは培養される同等の微生物細胞により産生される脂質の少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%または少なくとも60%を産生する。

【0022】

別記しない限り、特定されたタンパク質をコードする外因性遺伝子への、上記のおよび本明細書全体を通しての言及は、特定されたタンパク質をコードするように作用可能である遺伝子を指す。

【0023】

本発明の別の実施形態は、キシロースの存在下で組換え油性微生物を増殖させるかまたは培養することにより産生される微生物脂質組成物である。一実施形態では、本明細書中で論じる組換え油性微生物は、キシロースを含むセルロース系材料の存在下で増殖されおよび/または培養される。任意に、セルロース系材料は、グルコースおよびスクロースをさらに含み得る。微生物脂質組成物は、微生物細胞を溶解し、油を単離することにより生成される。

【発明を実施するための形態】

【0024】

(本発明の詳細な説明)

I. 定義

「活性な」は、細胞内で機能を発揮する核酸を指す。例えば、微細藻類に抗生物質耐性を付与するために、抗生物質耐性遺伝子を作動させるために用いられるプロモーターは、微細藻類内で活性である。

【0025】

「面積百分率」は、実験中に生成されるクロマトグラフ的、分光学的およびその他のピークのアreal面積百分率の決定を指す。ピークのアreal面積および特定ピークのアreal面積百分率の決定は、当業者により慣例的に達成される。例えば、試料中の脂肪酸分子が脂肪酸メチルエステル(FAME)に転化されるFAME GC/FID検出方法において、任意の他の脂肪酸、例えばC14:1と比較した場合、不飽和(C14:0)を有さない炭素原子14個の脂肪酸に関して、別個のピークが観察される。それぞれの種類のFAMEに対するピーク面積は、混合物中のその組成物における割合と正比例しており、試料中に存在する全ピークの合計に基づいて算出される(すなわち、[特定のピーク下の面積/測定した全ピークの合計面積]×100)。本発明の油及び細胞の脂質プロファイルについて述べる場合、「C8~C14が少なくとも4%」は、細胞中、又は抽出したグリセロ脂質組成物中の総脂肪酸のうち、少なくとも4%が、炭素原子が8個、10個、12個又は14個の鎖長を有することを意味している。

【0026】

「バイオディーゼル」は、ディーゼルエンジンの燃料として使用するのに適した、生物によって生成された脂肪酸アルキルエステルである。

【0027】

「バイオマス」は、細胞の成長及び/又は増殖によって生成する物質である。バイオマスは、細胞及び/又は細胞内成分、並びに、限定されないが、細胞によって分泌された化合物のような細胞外物質を含有していてもよい。

【0028】

「バイオリクター」は、細胞を場合により懸濁液中で培養する、閉じられた筐体又は部分的に閉じられた筐体である。

【0029】

「セルロース系材料」は、繊維性物質の消化産物であり、典型的には、グルコース及びキシロース(例えば、ヘミセルロースから)を、場合により、二糖類、オリゴ糖、リグニン、フルフラール類及び他の化合物のようなさらなる化合物を含む。セルロース系材料の

10

20

30

40

50

供給源の非限定的な例としては、サトウキビの絞りかす、テンサイパルプ、トウモロコシ茎葉、木片、おがくず、スイッチグラスが挙げられる。

【 0 0 3 0 】

「発現ベクター」または「発現構築物」または「プラスミド」または「組み換えDNA構築物」は、例えば、組み換え手段又は直接的な化学合成によって、人の介入によって発生した核酸を指し、一連の特定の核酸エレメントは、宿主細胞内で特定の核酸を転写及び／又は翻訳することができる。発現ベクターは、プラスミド、ウイルス又は核酸フラグメントの一部分であってもよい。典型的には、発現ベクターは、プロモーターに作用可能に連結した、転写されるべき核酸を含む。

【 0 0 3 1 】

「外因性遺伝子」は、細胞に導入された（「形質転換された」）RNA及び／又はタンパク質を発現するようなコードを有する核酸である。形質転換された細胞は、組み換え細胞と呼ばれることもあり、この細胞に、さらなる外因性遺伝子が導入されてもよい。外因性遺伝子は、形質転換される細胞と異なる種に由来していてもよく（つまり、異種）、同じ種に由来していてもよい（つまり、同種）。従って、外因性遺伝子は、この細胞のゲノムでは異なる位置にあるような同種遺伝子を含んでいてもよく、内在する遺伝子複製物と比較して、異なる制御下にある同種遺伝子を含んでいてもよい。外因性遺伝子は、この細胞の2種類以上の複製物中に存在していてもよい。外因性遺伝子は、ゲノムへの挿入物として細胞中に維持されてもよく、又はエピソーム分子として細胞中に維持されてもよい。

【 0 0 3 2 】

「外部から与えられた」は、細胞培養物の培地に与えられた分子を指す。

【 0 0 3 3 】

「脂肪酸プロファイル」は、鎖長および／または飽和パターンに関する細胞中のまたは細胞由来の油中の脂肪酸の分布を意味するものとする。この状況において、飽和パターンは、飽和对不飽和酸の測定値、あるいは細胞の種々の脂肪酸中の二重結合の一の分布のより詳細な分析を含み得る。

【 0 0 3 4 】

「固定炭素源」は、培地中で、周囲温度及び周囲圧力で固体又は液体の形態として存在し、培地で培養されている微生物が利用することが可能な、炭素を含有する分子（単数または複数）、典型的には有機分子である。

【 0 0 3 5 】

「従属栄養的培養」およびその変形、例えば「従属栄養的培養」および「従属栄養的発酵」は、固定炭素源の存在下での成長（細胞サイズ、細胞内容物および／または細胞活性の増大）の意図的促進を指す。典型的には、従属栄養的培養は、光の非存在下で実施される。しかしながら、光の非存在は、従属栄養的培養のための一要件ではない。光の非存在下での培養は、光の完全な非存在またはほぼ完全な非存在下での微生物細胞の培養を意味する。

【 0 0 3 6 】

「脂質収量の増加」は、例えば、培養物1リットルあたりの細胞乾燥重量が増加すること、脂質を構築する細胞の割合が増えること、又は、単位時間あたりの培養容積1リットルあたり、脂質の合計量が増えることのような、微生物培養物の生産性の増加を指す。

【 0 0 3 7 】

「作用可能に連結した状態で」は、制御配列（典型的には、プロモーター）、連結した配列（典型的には、タンパク質をコードする配列、コード配列とも呼ばれる）のような、2個の核酸配列間の機能的な連結である。プロモーターは、遺伝子の転写に介在することができる場合、外因性遺伝子と作用可能に連結した状態である。

【 0 0 3 8 】

「微細藻類」は、葉緑体又は色素体を含み、場合により、光合成を行うことができる真核性微生物であるか、又は、光合成を行うことができる原核性微生物である。微細藻類には、固定炭素源をエネルギーとして代謝することができない偏性光合成独立栄養生物と、

10

20

30

40

50

単に固定炭素源がないと生存することができない従属栄養生物とが存在する。微細藻類には、細胞分裂の直後に、姉妹細胞から分離するクラミドモナスのような単細胞生物体、2種類の別個の細胞型を有する単純な多細胞光合成微生物である、例えば、ボルボックスのような微生物が含まれる。微細藻類は、クロレラ、ドナリエラ、プロトテカのような細胞を含む。また、微細藻類には、アグメネルム (Agmenellum)、アナベナ、ピロボトリスのような、細胞 - 細胞接着性を示す他の微生物光合成生物体も含まれる。また、微細藻類には、ある種の渦鞭毛藻類種、及びプロトテカ属の種のような、光合成を行う能力が失われている偏性従属栄養微生物も含まれる。

【 0 0 3 9 】

「微生物 (Microorganism)」及び「微生物 (Microbe)」は、顕微鏡的単細胞生物体である。

10

【 0 0 4 0 】

「天然油」は、生物体から得られる優勢なトリグリセリド油を意味するものとし、この場合、油は、別の天然または合成油と配合されていないか、あるいはトリグリセリドの脂肪酸プロフィールを実質的に変更するために分留されていない。ここで、「分留」という用語は、生物体により産生されるプロフィールに比して、その脂肪酸プロフィールを変えるように、(任意の方法により)油から物質を除去することを意味する。天然油は、油が、トリグリセリドプロフィールを実質的に変えない、最低限の加工処理、例えば精製、漂白および/または脱ガム処理を受けているような、生物体から得られる油を包含する。天然油は、「非エステル交換天然油」でもあり得るが、これは、脂肪酸がそのアシル結合においてグリセロールに再配分されて、実質的に生物体から回収された時点と同一形状で残存する製法を天然油が受けていない、ということの意味する。

20

【 0 0 4 1 】

「自然に共発現する」は、2種類のタンパク質あるいは遺伝子に関して、例えば、2種類のタンパク質をコードする遺伝子が、共通の制御配列の制御下にあるため、又は、上述の2種類のタンパク質をコードする遺伝子が、同じ刺激に応答して発現するため、そのタンパク質又は遺伝子が、これらが誘導される組織又は生物体中で自然に共発現することを意味する。

【 0 0 4 2 】

「オキシドレダクターゼ経路」は、キシロースレダクターゼ (キシロースをキシリトールに転化する)、キシリトールデヒドロゲナーゼ (キシリトールをキシルロースに転化する) およびキシルロキナーゼ (キシルロースをキシルロース5 - ホスフェートに転化する) (これらに限定されない) を含めたキシリトールおよびキシルロース中間体を介して、キシロースをキシルロース5 - ホスフェートに転化し得るタンパク質および/またはそれをコードする遺伝子である。例示的オキシドレダクターゼ経路遺伝子としては、ピキア・スチピチスからの X Y L 1、X Y L 2 および X Y L 3 遺伝子が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【 0 0 4 3 】

「プロモーター」は、核酸の転写を指図する核酸制御配列である。本明細書で使用される場合、プロモーターは、転写開始部位の近くに、必要な核酸配列を含み、例えば、ポリメラーゼ II 型プロモーターの場合には、T A T A エlementを含む。また、プロモーターは、場合により、遠位エンハンサーElement又はリプレッサーElementを含み、これらは、転写開始部位から数千塩基対離れた位置にあってもよい。

40

【 0 0 4 4 】

「組み換え体」は、外因性の核酸を導入するか、又は天然の核酸を変えることによって改変された細胞、核酸、タンパク質又はベクターである。従って、例えば、組み換え細胞は、この細胞の天然の (組み換えされていない) 形態にはみられない遺伝子を発現するか、又は、組み換えされていない細胞によって発現される遺伝子とは異なる天然遺伝子を発現する。「組み換え核酸」は、例えば、in vitro で、一般的に核酸を遺伝子操作することによって元々作られている核酸が、ポリメラーゼ及びエンドヌクレアーゼ、又は

50

それ以外のものを用いて、天然には通常みられない形態になっているような核酸である。組み換え核酸は、例えば、作用可能に連結した状態にある２種類以上の核酸を配置するために生成させてもよい。従って、天然では通常は接続していないDNA分子を結紮することによって*in vitro*で生成した核酸又は発現ベクターの単離物は、両方とも本発明の目的のための組み換え体であると考えられる。組み換え核酸が作られ、宿主細胞又は生物体に導入されると、宿主細胞の細胞機構を用いて*in vivo*で複製し得るが、そのような核酸は、いったん組み換え状態で産生すると、その後に細胞内で複製されたものであっても、本発明の目的のための組み換え体とみなされる。同様に、「組み換えタンパク質」は、組み換え技術によって、すなわち、組み換え核酸の発現によって作られるタンパク質である。

10

【0045】

「再生可能なディーゼル」は、脂質の水素化及び脱酸素によって生成するアルカン混合物（例えば、C10：0、C12：0、C14：0、C16：0、C18：0）である。

【0046】

「糖化」は、バイオマス、通常はセルロース系バイオマス又はリグノセルロース系バイオマスを、グルコース及びキシロースのような単糖類に変換するプロセスである。「糖化された」又は「解重合された」セルロース系材料又はバイオマスは、糖化によって単糖類に変換されたセルロース系材料又はバイオマスを指す。

【0047】

「ショ糖利用遺伝子」は、発現すると、ショ糖をエネルギー（炭素）源として利用する能力を補助する遺伝子である。ショ糖利用遺伝子によってコードされるタンパク質は、本明細書では「ショ糖利用酵素」と呼ばれ、ショ糖トランスポーター、ショ糖インベルターゼ、グルコキナーゼやフルクトキナーゼのようなヘキソキナーゼを含む。

20

【0048】

「キシロースイソメラーゼ経路」は、キシロースイソメラーゼ（キシロースをキシロースに転化する）およびキシロキナーゼ（キシロースをキシロース5-ホスフェートに転化する）（これらに限定されない）を含めたキシロース中間体を介して、キシロースをキシロース5-ホスフェートに転化し得るタンパク質および/またはそれをコードする遺伝子である。例となるキシロースイソメラーゼ経路遺伝子としては、ピロミセス種遺伝子Xy1Aおよびピキア・スチピチス遺伝子XYL3が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0049】

「キシロース5-ホスフェート・トランスポーター」、「キシロース5-ホスフェート輸送体」または「色素体ペントースホスフェート・トランスポーター」は、キシロース5-ホスフェートを輸送する色素体膜タンパク質およびそのようなタンパク質をコードする遺伝子のファミリーである。キシロース・トランスポーターの非限定例は、シロイヌナズナからのキシロース5-ホスフェート・トランスポーターをコードするXPT遺伝子である。

【0050】

「キシロース輸送体」は、細胞培地から細胞中にキシロースを輸送するタンパク質およびそのようなタンパク質をコードする遺伝子であって、例としては、受動輸送体および能動輸送体ならびにトランスポーターが挙げられるが、これらに限定されない。受動輸送体は、エネルギーを消費せずに、濃度勾配を下降して（高濃度域から低濃度域へ）分子の輸送を助長し、例としては、ピキア・スチピチスSUT1、SUT2およびSUT3輸送体、ならびに出芽酵母HXT輸送体が挙げられるが、これらに限定されない。能動輸送体は、濃度勾配に逆らって分子を輸送する（したがって、低濃度域から高濃度域へと輸送する）に際して、エネルギーを消費する。能動輸送体としては、一次能動輸送体（エネルギー源としてATPを使用。すなわち、ATP結合カセット（ABC）輸送体）および二次能動輸送体（化学浸透圧性勾配からのエネルギーを使用。例としては、対向輸送体および共輸送体、すなわち、カンジダ・インターメディアのGXS1タンパク質、シロイヌナズ

40

50

ナからのH⁺ - 共輸送体様タンパク質（例えば、At5g59250n）およびトリコデルマ・リーセイからのXLT1タンパク質が挙げられるがこれらに限定されない）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0051】

「キシロース利用遺伝子」は、発現されると、（例えば、エネルギーを産生するため、および/または同化作用のため）炭素源としてキシロースを利用する細胞の能力を手助けする。キシロース利用遺伝子によりコードされるタンパク質は、本明細書中では「キシロース利用酵素」と呼ばれ、例としては、キシロース輸送体、キシロース・トランスロケーター、オキシドレダクターゼ経路タンパク質およびキシロースイソメラーゼ経路タンパク質が挙げられる。

10

II. 概要

【0052】

本発明の例証的实施形態は、キシロースを代謝する能力を従来は欠いていた生物体中にキシロース利用経路を遺伝子操作により組み入れることによる、キシロースを高値細胞バイオマスに転換するための細胞培養の使用で、長年の課題を克服する。種々の態様において、本発明の開示は、植物界の生物体、特に微生物（本明細書中では微細生物とも呼ばれる）への活性キシロース代謝経路の遺伝子操作による組み入れを提供する。そのような生物体としては、微細藻類が挙げられる。別の態様では、本開示は、色素体およびII型脂肪酸生合成経路の両方を有する生物体、特に微生物に活性キシロース代謝経路の遺伝子操作による組み込む入れを提供する。

20

【0053】

分裂酵母においてキシロースを用いたエタノール産生が他で得られているかもしれないが、そのような生物体は、脂質の商業的規模の生産には有用でない。それに対比して、油性微生物、例えば油性酵母および油性微細藻類は、ほとんどをトリグリセリドとして、乾燥細胞重量単位で20%超の脂質を蓄積することができる。油性酵母は脂質を産生するのに有用であるが、微細藻類は、II型脂肪酸生合成経路を有しており、これは、細胞により産生される脂質、特にトリグリセリドの脂肪酸プロファイルを適合させるための遺伝子遺伝子操作の使用を促す（PCT公告WO2011/151149、WO2010/063032およびWO2011/15040参照）。脂質を産生することに加えて、本明細書中に記載される生物体は、タンパク質、ビタミン、繊維、ならびに天然に、またはさらなる遺伝子遺伝子操作の結果として産生される他の物質を産生するために用いることができる。

30

【0054】

本発明の一実施形態に従うと、外因性核酸が、細胞の色素体中へのキシロース - 5 - ホスフェートの輸送を生じるよう作用可能であるキシロース - 5 - ホスフェート輸送体（例えばキシロース - 5 - ホスフェート・トランスロケーター）タンパク質を産生するよう作用可能である色素体を有する細胞中に導入される。特定の一実施形態では、細胞は、色素体標的配列と作用可能的連結しているキシロース - 5 - ホスフェート輸送体をコードする外因性DNAで形質転換される。色素体標的配列は、色素体中にキシロース - 5 - ホスフェートを有効に輸送するために、輸送体タンパク質を色素体膜（好ましくは色素体内膜）に向けることができ、そこでそれは、脂肪酸に代謝され得る。例えば、生物体は、色素体中に、キシロース - 5 - ホスフェートを代謝する内因性ペントース代謝経路を有し得る。以下の実施例で示すように、これは、細胞増殖および/または脂質産生と共存するキシロース利用を高める有効な方法であることが見出された。

40

【0055】

任意に、またはさらに、細胞は、外部環境からキシロースを取り込んで、キシロースをキシロース - 5 - ホスフェートに転化し得る。外因性遺伝子が、これらの機能を実施するために、活性タンパク質を産生するために必要とされ得る。例えば、そして以下の実施例で記載されるように、細胞は、外部環境から細胞中にキシロースを輸送するための活性キシロース輸送体を、ならびにキシロースをキシロース - 5 - ホスフェートに転化する

50

ための経路をコードするように作用可能なDNAで形質転換され得る。例えば、キシロースをキシルロース-5-ホスフェートに転化するための経路は、キシロースをキシルロース-5-ホスフェートに転化するためのキシルロキナーゼと、キシロースをキシルロースに転化するための経路との組合せであり得る。キシロースをキシルロースに転化するための経路は、キシロースイソメラーゼまたはキシロースレダクターゼとキシリトールデヒドロゲナーゼとの組合せを含み得る。代替的には、細胞中へのキシロース輸送は、自然のタンパク質、例えばヘキソース輸送タンパク質の活性に頼り得る。

【0056】

任意に、上記の実施形態のさらなる改良では、細胞は、活性キシリトールデヒドロゲナーゼを発現するように形質転換され得る。この修飾は、キシリトールによるキシロースイソメラーゼの抑制を低減するかまたは排除するよう機能し得る。

10

【0057】

種々の遺伝子は、生物体の染色体中に組み込まれ得るし、あるいはエピソームであり得る。好ましくは、遺伝子は安定的に発現され、多重コピーで存在し得る。種々の実施形態では、遺伝子は、調節または構成プロモーターの制御下にある。形質転換後、そして任意に安定性を保持するために、細胞は選択可能マーカーで形質転換され得る。

【0058】

細胞は、従属栄養的成長条件下で増殖しおよび/または脂質蓄積することができる。任意に、細胞は、偏性従属栄養のもの、例えば微細藻類のプロトテカ属に属するものであり得る。細胞は、例えばプロトテカ・モリフォルミスに属するものであり得る。下記の実施例において、プロトテカ細胞が、活性キシロース代謝経路を発現するよう形質転換される。しかしながら、本発明の実施形態は多数の他の種に適用可能である、ということに留意すべきである。好ましい種としては、植物界に属するもの、緑色植物亜界に属するもの、緑藻植物下界または門に属するもの、テトラ藻亜門に属するもの、トレボウクシア藻綱に属するもの、またはクロレラ目に属するものが挙げられる。具体例としては、プロトテカ・モリフォルミスおよびクロレラ・プロトテコイデスが挙げられる。

20

【0059】

好ましい一実施形態では、結果的に生じる組換え生物体は、炭素源としてグルコースを用いて培養される場合、乾燥細胞重量単位で少なくとも10、20、30、40、50、60、70または80%のトリグリセリドを蓄積することができる。さらに、当該生物体は、純キシロース上で培養される場合、乾燥細胞重量単位で少なくとも10、20、30、40、50、60、70または80%のトリグリセリドを蓄積することができる。例えば、微生物は、炭素源としてのグルコース上で培養される場合、乾燥細胞重量単位で少なくとも50%のトリグリセリドを蓄積することができ、そして純キシロース上で培養される場合、乾燥細胞重量単位で少なくとも20%のトリグリセリドを蓄積することができる。別の実施形態では、組換え生物体の細胞が窒素制限条件下で60%グルコースおよび40%キシロースである炭素源上で培養される場合、細胞は、炭素原子が同位体追跡により測定して少なくとも5、10、20、30、40または50%がキシロースの炭素元素に由来する脂質を産生する。さらに別の実施形態では、組換え生物体の細胞は、35、28、21、14または7日以下で、単独炭素源として2.5%キシロースを有する培地中のキシロースの少なくとも90%を消費することができる。

30

40

【0060】

キシロース代謝経路の導入のほかに、生物体は、微生物により産生される脂質の脂肪酸プロファイルを変更するように作用可能である遺伝子を導入することにより遺伝子遺伝子操作することができる。その結果、キシロースは、変更脂肪酸プロファイルを有するアシルグリセリドに転化され得る。例えば、細胞は、活性アシル-ACPチオエステラーゼ、ケトアシル-ACPシンターゼまたは脂肪酸デサチュラーゼをコードする1つ以上の外因性遺伝子を含む組換え修飾を有することができる。代替的には、またはさらに、細胞は、アシル-ACPチオエステラーゼ、ケトアシル-ACPシンターゼまたは脂肪酸デサチュラーゼを低減するかまたは除去するように作用可能である組換え修飾を有することができ

50

る。そのような遺伝子操作を実施するための方法は、PCT公告WO2011/151149、WO2010/063032およびWO2011/15040で提供されている。

【0061】

好ましい一実施形態では、キシロース代謝細胞は、キシロース含有培地中で培養される。その結果、バイオマスが産生される。具体的な一実施形態では、キシロースは、細胞バイオマス、特にトリグリセリドに転化される。これは、同位体追跡により、例えば同位体標識化キシロースを用いて、示され得る。トリグリセリドを産生するために、油性微生物が、栄養制限条件下で、例えば窒素制限下で培養され得る。その結果生じる天然油が採取される。採取は、油を放出するための細胞溶解を含み得る。次に、油は、油脂化学製品、潤滑剤、洗剤、燃料、食用油、化粧品成分またはその他の製品を生産するために用いられ得る。例えば、油は、バイオディーゼル（脂肪酸エステル）または再生可能ディーゼル（クラッキングにより油から生成される燃料）を生産するために用いられ得る。

【0062】

一実施形態では、当該方法は、キシロース50%以上である炭素源を含む培地中で細胞を培養することを包含する。例えば、炭素源は、キシロース55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%または95%以上であり得る。

【0063】

したがって、本発明の具体的一実施形態は、外因性遺伝子の導入および発現に起因する色素体および作用可能なキシロース代謝経路を有する微生物を含む。当該遺伝子は、キシロースをキシルロース-5-ホスフェートに転化するために、そしてキシルロース-5-ホスフェートをさらなる代謝のために色素体中に輸送するために活性である。微生物は、任意に、キシロースを外部環境から細胞中に輸送するためのキシロース輸送体を有する。外因性遺伝子の発現の結果として、細胞は、純キシロース上で増殖することとができ、好ましくは、例えば21、14または7日以下で、単独炭素源として2.5%キシロースを有する培地中のキシロースの少なくとも90%を消費することができる。

III. 培養

【0064】

本発明は、一般的に、油性微生物、例えば微細藻類、油性酵母、油性真菌および油性細菌（これらに限定されない）の培養に関する。いくつかの実施形態では、微細藻類株、特に組換えクロレラおよびプロトテカ株は、脂質の産生のために適している。読者が読みやすいように、この章をいくつかの節に分けている。第1節は、プロトテカ種及びプロトテカ株と、新しいプロトテカ種及びプロトテカ株、関連する微細藻類をゲノムDNA比較によって同定する方法について記載している。第2節は、培養に有用なバイオリアクターについて記載している。第3節は、培養のための培地について記載している。第4節は、本発明の例となる培養方法に従って油を生成することについて記載している。

1. プロトテカ種およびプロトテカ株

【0065】

プロトテカは、高濃度の脂質を産生することができ、特に、燃料生成に適した脂質を産生することができるため、脂質の生成に使用するのに卓越した微生物である。プロトテカによって産生される脂質は、他の微細藻類によって産生される脂質よりも鎖長が短く、飽和度が高い炭化水素鎖を含んでいる。さらに、プロトテカの脂質は、一般的に、色素を含まず（クロロフィル及び特定のカロチノイドの濃度が検出不可能なほど低く）、いかなる状況でも、他の微細藻類から得られる脂質よりもかなり色素の含有量が低い。さらに、本発明によって与えられる組み換えプロトテカ細胞を用い、炭素減としてキシロースを利用するその能力増大に基づいて、他の微生物から脂質を産生する場合と比較して、低コストで、高収率及び高効率で脂質を生成させることができる。それに加え、この微細藻類は、従属栄養性で成長し、遺伝子操作され得る。本発明の方法に用いるためのレイショウテキプロトテカ株としては、プロトテカ・ウィッカーハミー、プロトテカ・スタグノラ（UTEX 327を含む）、プロトテカ・ポルトリセンシス、プロトテカ・モリフォルミス（UTEX株1441、1435を含む）、プロトテカ・ゾフィーガ挙げられる。プロトテ

カ属の種は、偏性従属栄養生物である。

【0066】

本発明で使用するプロトテカの種は、ゲノムの特定標的領域を増幅させることによって同定することができる。例えば、特定のプロトテカ種又はプロトテカ株の同定は、プライマーを用いる核および/または葉緑体DNAの増幅およびシーケンシングと、任意のゲノム領域を用いる方法とによって、例えば、Wu et al., Bot. Bull. Acad. Sin. (2001) 42: 115-121 Identification of *Chlorella* spp. isolates using ribosomal DNA Sequencesに記載されている方法を用いて達成され得る。プロトテカだけではなく、同様の脂質プロファイル及び産生能を有する他の炭化水素及び脂質を産生する生物体の種を同定するために、リボソームの内部に転写されたスペーサー (ITS 1及びITS 2 rDNA)、23S rRNA、18S rRNA、及び他の保存されたゲノム領域を増幅させ、塩基配列を決定する、当業者によって十分に確率された系統発生解析の方法を用いてもよい。例えば、藻類を同定し、分類する方法は、例えば、Genetics、2005年8月; 170(4): 1601-10及びRNA、2005年4月; 11(4): 361-4を参照。

10

【0067】

したがって、ゲノムDNA比較を用いて、本発明で使用するべき微細藻類の適切な種を同定することができる。保存されたゲノムDNA領域、例えば、限定されないが、23S rRNAをコードするDNAを、微細藻類の種から増幅させ、本発明で使用する好ましい微細藻類に分類学的に関連する微細藻類の種をスクリーニングするために、コンセンサス配列を比較することができる。プロトテカ属に含まれる種に対し、そのようなDNA配列比較を行った例を以下に示す。ゲノムDNA比較は、株の収集中にうまく同定できなかった微細藻類の種を同定するのに有用な場合がある。株の収集では、表現型及び形態学的特徴に基づいて、微細藻類の種を同定することが多いだろう。これらの特徴を使用すると、微細藻類の種又は属を間違っカテゴリー分けしてしまうことがある。ゲノムDNA比較を用いることは、系統発生的関係に基づいて微細藻類種をカテゴリー分けする良好な方法であろう。

20

【0068】

本発明で使用する微細藻類は、典型的には、配列番号1~9に列挙されている少なくとも1つの配列に対するヌクレオチド同一性が少なくとも99%、少なくとも95%、少なくとも90%、又は少なくとも85%の23S rRNAをコードするゲノムDNA配列を有する。

30

【0069】

ヌクレオチド同一性又はアミノ酸同一性の割合を決定するために配列を比較する場合、典型的には、ある配列を参照配列とし、これと試験配列とを比較する。配列比較アルゴリズムを用いた場合、試験配列及び参照配列をコンピューターに入力し、部分配列の座標を指定し、必要な場合、配列アルゴリズムプログラムのパラメーターを指定する。次いで、配列比較アルゴリズムが、指定したプログラムパラメーターに基づいて、試験配列を参照配列と比較して配列同一性の割合を算出する。

40

【0070】

比較のために、例えば、Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981)による局地的ホモロジーアルゴリズムによって、Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 (1970)によるホモロジーアラインメントアルゴリズムによって、Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85: 2444 (1988)と同様の方法で検索することによって、これらのアルゴリズムをコンピューター制御によって実施することによって (Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WIの、GAP、BESTFIT、FASTA、TFA

50

S T A)、又は、視覚的な観察（一般的に、前出の A u s u b e l e t a l . を参照）によって、配列の最適アラインメントを行なうことができる。

【 0 0 7 1 】

配列同一性の割合及び配列類似性を決定するのに適した他のアルゴリズムの例は、B L A S T アルゴリズムであり、A l t s c h u l e t a l .、J . M o l . B i o l . 2 1 5 : 4 0 3 - 4 1 0 (1 9 9 0) に記載されている。B L A S T 分析を行うためのソフトウェアは、N a t i o n a l C e n t e r f o r B i o t e c h n o l o g y I n f o r m a t i o n (ウェブアドレスは www.ncbi.nlm.nih.gov) に公開されている。このアルゴリズムは、検索配列の中で、データベース配列中の同じ長さの文字列と整列させたときに、ある正の値である閾値 T とマッチするか、又は閾値 T を満足するような長さ W の短い文字列を特定することによって、スコアが最も大きくなる配列対 (H S P) をまず特定することを含む。T は、近隣の文字列スコアの閾値と呼ばれる (A l t s c h u l e t a l .、前出)。これらの初期の近隣の文字列ヒットが、これらの配列に含まれるもっと長い H S P をを見つけるための初期検索の出発点として作用する。この文字列のヒットを、累積アラインメントスコアが増加していく限りは、それぞれの配列に沿って両方向に拡張していく。累積スコアは、ヌクレオチド配列の場合、パラメーター M (マッチングした残基対に対するリワードスコア ; 常に 0 より大きい) 及びパラメーター N (マッチングしない残基に対するペナルティスコア ; 常に 0 より小さい) を用いて算出される。アミノ酸配列の場合、スコアの行列を用いて累積スコアを算出する。それぞれの方向への文字列ヒットの拡張は、累積アラインメントスコアが、到達した最大値から X の大きさだけ下がった場合、1 つ以上のマイナス値のスコアをもつ残基のアラインメントの累積のため、累積スコアが 0 又は 0 未満になった場合、又は、いずれかの配列が末端まできた場合に中止される。核酸又はポリペプチドが本発明の範囲内にあるかどうかを特定するためには、B L A S T プログラムのデフォルトパラメーターが適している。B L A S T N プログラム (ヌクレオチド配列の場合) は、文字列長 (W) 1 1、期待値 (E) 1 0、M = 5、N = - 4 をデフォルトとして用い、両鎖を比較する。アミノ酸配列の場合、B L A S T P プログラムを、文字列長 (W) 3、期待値 (E) 1 0、B L O S U M 6 2 スコア行列をデフォルトとして用いる。T B L A T N プログラム (ヌクレオチド配列のタンパク質配列を用いる) は、文字列長 (W) 3、期待値 (E) 1 0、B L O S U M 6 2 スコア行列をデフォルトとして用いる (H e n i k o f f & H e n i k o f f、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 8 9 : 1 0 9 1 5 (1 9 8 9) を参照)。

【 0 0 7 2 】

B L A S T アルゴリズムは、配列同一性の割合を算出することに加え、2 つの配列間の類似性の統計分析も行う (例えば、K a r l i n & A l t s c h u l、P r o c . N a t ' l . A c a d . S c i . U S A 9 0 : 5 8 7 3 - 5 7 8 7 (1 9 9 3) を参照)。B L A S T アルゴリズムによって与えられる類似性の測定値は、ひとつには最小合計確率 (P (N)) があり、この値は、2 つのヌクレオチド又はアミノ酸配列が偶然マッチする確率の指標を与える。例えば、試験核酸と参照核酸とを比較したときの最小合計確率が、0 . 1 未満、より好ましくは、約 0 . 0 1 未満、最も好ましくは、約 0 . 0 0 1 未満であるときに、この核酸は、参照配列と類似していると考える。

【 0 0 7 3 】

本発明で用いるための微生物の選択に影響を及ぼす他の考慮事項としては、油、燃料、油脂化学品を生成するのに適した脂質又は炭化水素の生成に加え、(1) 細胞重量を基準とした割合で脂質含有量が高いこと ; (2) 成長が容易であること ; (3) 遺伝子操作が容易であること ; (4) バイオマスの処理が容易であることが挙げられる。特定の実施形態では、野生型の微生物又は遺伝子操作された微生物から、少なくとも 4 0 %、少なくとも 4 5 %、少なくとも 5 0 %、少なくとも 5 5 %、少なくとも 6 0 %、少なくとも 6 5 %、又は少なくとも 7 0 %、又はそれ以上が脂質である細胞が得られる。好ましい有機体は、従属栄養的に成長する有機体である (光が存在しない状態で、糖を用いる)。

2. バイオリアクター

【0074】

微生物を、遺伝子操作を行うという目的で、及び炭化水素（例えば、脂質、脂肪酸、アルデヒド、アルコール、アルカン）を生成するという目的で培養する。前者の種類の培養では、小規模で実施し、最初は、少なくとも、原料微生物が成長可能な条件下で実施する。炭化水素を生成させるための培養は、通常は、バイオリアクター中、大規模で実施する（例えば、10,000リットル、40,000リットル、100,000リットル、又はそれより大きなバイオリアクター）。プロトテカを、典型的には、バイオリアクター内のキシロースを含有する液体培地にて、本発明の方法で培養する。一実施形態では、微細藻類、例えばプロトテカは、フェドバッチ法を用いてバイオリアクター中で培養する。典型的には、バイオリアクターは光を導入させず、微生物は従属栄養的に培養されて、実質的に光の非存在下で、固定炭素源を代謝する。

10

【0075】

バイオリアクター又は発酵槽を用い、生理学的周期の種々の段階を経て、微細藻類細胞を培養する。バイオリアクターは、従属栄養を成長及び増殖させる方法で用いると、多くの利点を与える。食品において用いるためのバイオマスを生成させるために、微細藻類を、好ましくは、液体中で、一例として懸濁培養物中で、大量に発酵させる。鋼鉄製発酵槽のようなバイオリアクターは、非常に大きな容積の培養物を収容する（種々の本発明の実施形態では、40,000リットル以上の容量を有するバイオリアクターを用いる）。また、バイオリアクターによって、典型的には、温度、pH、酸素圧、二酸化炭素濃度のよう

20

【0076】

バイオリアクターは、微細藻類が繁殖され、数が増える間、培地がバイオリアクターを流れるような構成であってもよい。いくつかの実施形態では、例えば、播種した後であるが、細胞が所望の密度になる前に、培地をバイオリアクターに注入してもよい。別の状況では、培養開始時にバイオリアクターを培地で満たし、培養物を播種した後は、培地を注

30

【0077】

スピニングブレード、インペラー、揺動機構、攪拌棒、加圧気体を注入する手段のようなデバイスを備えるバイオリアクターを用い、微細藻類の培養物を混合することができる。混合は、連続的であってもよく、断続的であってもよい。例えば、いくつかの実施形態では、微細藻類が望ましい数に増えるまで、気体及び培地を入れるのに乱流を用いる形態は維持されない。

40

【0078】

気体、固体、半固体、液体を、微細藻類を含むバイオリアクターチャンバーに入れるため、又は抽出するために、バイオリアクターポートを用いてもよい。多くのバイオリアクターは、2個以上のポートを備えているが（例えば、1つは培地を入れるため、他方はサンプリングのため）、1種類の基質だけを1個のポートから入れたり、出したりする必要はない。例えば、バイオリアクターに培地を流し、その後で、サンプリングしたり、ガスを入れたり、ガスを出したり、又は他の目的のために1個のポートを使用してもよい。好ましくは、培養物の純培養性を損なうことなく、サンプリングポートを繰り返し用いることができる。サンプリングポートは、サンプルの流れを止めるか、開始させるか、又は連続的なサンプリング手段を与えるようなバルブ又は他のデバイスを備えるような構成であ

50

ってもよい。バイオリアクターは、典型的には、培養物を播種することができるような少なくとも1個のポートを備えており、そのようなポートを、培地又は気体を入れるような他の目的で用いることもできる。

【0079】

バイオリアクターポートによって、微細藻類の培養物の気体内容物を操作することができる。説明のために、バイオリアクターの容積の一部分は、液体ではなく気体であってもよく、バイオリアクターの気体注入口から、ポンプによって気体をバイオリアクターに入れることができる。ポンプによってバイオリアクターへと有益に入れることが可能な気体としては、空気、空気/CO₂混合物、アルゴンのような希ガス、他の気体が挙げられる。バイオリアクターは、典型的には、バイオリアクターにガスを入れる速度をユーザーが制御することができるように取り付けられている。上述のように、バイオリアクターへの気体の流れを増やすことによって、培養物の混合性を高めることができる。

10

【0080】

気体の流れを増やすことは、培地の濁度にも影響を及ぼす。乱流は、バイオリアクターに入った気体が培地表面でバブリングするように、水性培地の液量より低いところに気体注入ポートを配置することによって起こすことができる。1種類以上の気体がポートを出て行き、気体が外に逃げ、それにより、バイオリアクター中に圧力が蓄積されるのを防ぐ。好ましくは、気体流出ポートは、バイオリアクターに微生物が入り込んで汚染されることを防ぐような「一方向」バルブにつながっている。

20

3. 培地

【0081】

微細藻類の培地は、典型的には、固定窒素源、固定炭素源、微量元素、場合により、pHを維持するためのバッファ、ホスフェート（典型的には、リン酸塩として与えられる）のような成分を含有する。他の成分は、特に、海水微細藻類の場合には、塩化ナトリウムのような塩を含んでいてもよい。窒素源としては、有機窒素源及び無機窒素源が挙げられ、例えば、限定されないが、分子状窒素、硝酸エステル、硝酸塩、アンモニア（純水なもの、又は塩形態、例えば、(NH₄)₂SO₄及びNH₄OH）、タンパク質、大豆ミール、コーンステープリカー、酵母抽出物が挙げられる。微量元素の例としては、例えば、それぞれZnCl₂、H₃BO₃、CoCl₂・6H₂O、CuCl₂・2H₂O、MnCl₂・4H₂O、(NH₄)₆Mo₇O₂₄・4H₂Oのような形態の亜鉛、ホウ素、コバルト、銅、マンガン、モリブデンが挙げられる。

30

【0082】

固体及び液体の成長培地は、一般的に、さまざまな供給源から入手可能であり、さまざまな微生物株に適した特定の培地を調製する方法の説明は、例えば、オンラインでは、藻類の培養物を収集するためのAustin, 1 University Station A6700、Austin, Texas、78712-0183のテキサス大学によって運営されているサイト<http://www.utex.org/>で見つけることができる(UTEX)。例えば、種々の淡水培地及び塩水培地としては、PCT公開番号第2008/151149号に記載されているものが挙げられ、この文献は、参照により組み込まれる。

40

【0083】

特定の例では、プロテオース培地は、純培養の培地に適しており、培地1リットル(pH約6.8)は、プロテオースペプトン1gを、Bristol Medium 1リットルに加えることによって調製することができる。Bristol mediumは、水溶液中に、2.94mMのNaNO₃、0.17mMのCaCl₂・2H₂O、0.3mMのMgSO₄・7H₂O、0.43mM、1.29mMのKH₂PO₄、1.43mMのNaClを含む。1.5%寒天培地の場合、寒天15gを上述の溶液1リットルに加えればよい。この溶液に蓋をし、オートクレーブにかけ、次いで、使用するまで冷蔵温度で保存する。別の例は、プロトテカ単離培地(PIM)であり、10g/Lのフタル酸水素カリウム(KHP)、0.9g/Lの水酸化ナトリウム、0.1g/Lの硫酸マグネシウ

50

ム、0.2 g/Lのリン酸水素カリウム、0.3 g/Lの塩化アンモニウム、10 g/Lのグルコース、0.001 g/Lの塩酸チアミン、20 g/Lの寒天、0.25 g/Lの5-フルオロシトシンを含み、pH範囲が5.0~5.2である(Pore、1973、App. Microbiology、26:648-649を参照)。本発明の方法と共に用いるのに適した他の培地は、上に特定したURLを閲覧することによって、又はSAG、CCAP又はCCALAのような、微生物の培地を保有している他の機関に助言を求めることによって、簡単に特定することができる。SAGは、ゲッティンゲン大学(ドイツ、ゲッティンゲン)のCulture Collection of Algaeを指し、CCAPは、Scottish Association for Marine Science(英国、スコットランド)によって管理されている藻及び原生動物の培養株保存機関を指し、CCALAは、Institute of Botany(トシェボニユ、チェコ共和国)の藻研究所の培養株保存機関を指す。さらに、米国特許第5,900,370号は、プロトテカ種の従属栄養性発酵に適した培地の処方及び条件について記載している。

【0084】

油の生成について、固定炭素源の費用は、油生成を経済的なものにするには十分低くなければならないため、固定炭素源の選択が重要である。一実施形態では、固定炭素源はキシロースである。キシロースは、ヘミセルロースの構成成分として見出される五炭糖である。ヘミセルロースは、ほとんどすべての植物細胞壁中に見出される複合多糖類であって、全植物物質の約30%を構成する。キシロースのほかに、他の炭素源、例えばアセテート、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、及び/又はキシロースが含まれるが、これらの化合物、特にキシロースを含有する原材料の選択は、本発明の方法の重要な態様である。

【0085】

本発明の方法で有用なその他の適切な原材料としては、例えば、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、乳清、糖液、ジャガイモ、ソルガム、ショ糖、テンサイ、テンサイ汁、サトウキビ、サトウキビ汁、煮詰めたサトウキビ汁、イネ、小麦が挙げられる。また、炭素源は、混合物として、例えば、ショ糖またはキシロースと解重合されたテンサイパルプ、解重合セルロース系材料等の混合物として与えられてもよい。1つ以上の炭素源を、1つ以上の外から与えられた固定炭素源の少なくとも約50 μ M、少なくとも約100 μ M、少なくとも約250 μ M、少なくとも約500 μ M、少なくとも約1 mM、少なくとも約2.5 mM、少なくとも約5 mM、少なくとも約10 mM、少なくとも約25 mM、少なくとも約50 mM、少なくとも約100 mM、少なくとも約250 mMおよび少なくとも約500 mMの濃度で供給することができる。いくつかの場合に、フェドバッチ式発酵のための原料として、1つ以上の炭素源を、発酵培地中に外因的に提供される固定炭素源の少なくとも約100 g/L、少なくとも約200 g/L、少なくとも約300 g/L、少なくとも約400 g/L、少なくとも約500 g/L、少なくとも約600 g/L、少なくとも約700 g/L、少なくとも約800 g/Lまたはそれ以上の濃度で供給することができる。本発明のための特に関心のある炭素源としては、キシロース、解重合セルロース系材料、グリセロール、ショ糖、ソルガムが挙げられ、これらについては、以下にさらに詳細に記載する。

【0086】

本発明によれば、原材料として解重合されたセルロース系バイオマスを用い、微生物を培養し得る。セルロース系バイオマス(例えば、トウモロコシ茎葉のような茎葉)は安価であり、入手が容易である。微細藻類は、処理したセルロース系材料を用いて成長することができ、本発明の微細藻類は、高効率を有する炭素源としてキシロースを利用するよう特に意図されている。セルロース系材料は、一般的に、約40~60%のセルロースと；約20~40%のヘミセルロースと；10~30%のリグニンとを含む。

【0087】

10

20

30

40

50

適切なセルロース系材料としては、草及び木のエネルギー作物、及び農業用作物から得られた残渣、すなわち、主要な食品又は繊維製品の分野から除去されなかった植物の一部、主に茎及び葉が挙げられる。例としては、農業廃棄物、例えば、サトウキビの絞りかす、モミ殻、トウモロコシ繊維（茎、葉、皮及び穂軸を含む）、麦わら、稲わら、テンサイパルプ、シトラスパルプ、柑橘類の皮；森林の廃棄物、例えば、硬材及び軟材の間伐、伐採作業から得られる硬材及び軟材の残渣；木材廃棄物、例えば、製材工場の廃棄物（木片、おがくず）、パルプ工場の廃棄物；都市廃棄物、例えば、都市固形廃棄物の紙片、都会の廃材、都市の伐採した草のような、都市の緑廃棄物；木材製造の廃棄物が挙げられる。さらなるセルロース含有材料としては、スイッチグラス、ハイブリッドポプラ材、Miscanthus、テンサイ繊維、ソルガム繊維のような専用のセルロース含有作物が挙げられる。そのような材料から生成する五炭糖としては、キシロースが挙げられる。

10

【0088】

細菌が材料内に含まれる糖類を利用することができる効率を高めるために、セルロース系材料を処理する。上述のように、リグノセルロース系バイオマスは、セルロース、1,4結合したグルコース（六炭糖）の結晶性ポリマー、ヘミセルロース、主にキシロース（五炭糖）で構成され、少量のマンノース、ガラクトース、アラビノース、リグニンで構成されている、ゆるく会合したポリマー、シナビルアルコール及びその誘導体で構成される複雑な芳香族ポリマー、1,4結合したポリガラクトツロン酸の直鎖であるペクチンのような、種々の画分で構成されている。セルロース及びヘミセルロースがポリマー構造であるため、これらの中に含まれる糖類（例えば、単糖類のグルコース及びキシロース）は、多くの細菌によって有効に使用する（代謝する）ことができるような形態ではない。そのような細菌の場合、セルロース系バイオマスをさらに処理し、このポリマーを構成している単糖類を作成することは、セルロース系材料を原材料（炭素源）として有効に利用するのに非常に役立つ場合がある。

20

【0089】

セルロース又はセルロース系バイオマスに、「爆発」と呼ばれるプロセスを行い、このプロセスで、バイオマスは、高温高圧で、希硫酸（又は他の酸）で処理される。このプロセスは、セルロース系及びヘミセルロース系の画分をグルコースモノマー及びキシロースモノマーにする酵素加水分解を効率よく行うことができるようにバイオマスを調節する。得られた単糖類は、セルロース系糖と呼ばれる。その後、セルロース系糖が微生物に利用され、種々の代謝物（例えば、脂質）を産生する。酸爆発ステップによって、ヘミセルロース画分が、構成成分である単糖類へと部分的に加水分解する。これらの糖類を、さらなる処理によって、バイオマスから完全に遊離させることができる。いくつかの実施形態では、さらなる処理は、爆発した材料を熱水で洗浄することを含む熱水処理であり、これによって、塩のような混入物質が除去される。このステップは、セルロース系エタノール発酵では、そのようなプロセスで用いられる糖の濃度はもっと薄いため、必要ではない。他の実施形態では、さらなる処理は、さらなる酸処理である。さらに他の実施形態では、さらなる処理は、爆発した材料の酵素加水分解である。また、これらの処理を任意の組み合わせで用いてもよい。この種の処理は、遊離する糖の種類（例えば、五炭糖対六炭糖）、このプロセス中で糖類が遊離する段階に影響を及ぼし得る。その結果、五炭糖又は六炭糖のどちらかが主成分の異なる糖の流れを作成することができる。これらの五炭糖又は六炭糖を豊富に含む流れは、異なる炭素利用能を有する特定の微生物用に向けることができる。本発明の方法のある特定の実施形態では、五炭糖キシロース濃化流が選択される。他の実施形態では、五炭糖、六炭糖または五炭糖／六炭糖の組合せ（糖化されている）を含む異なる糖流が組み合わせられて、微生物発酵に用いられ、高細胞密度脂質産生微生物バイオマスを生じる。

30

40

【0090】

脂質製造に関する本発明の実施形態は、エタノール発酵で達成されるよりも高い細胞密度になるまで発酵することを含み得る。従属栄養セルロース系の油を生成するための培養物の密度が高いため、固定炭素源（例えば、セルロース系から誘導される糖の流れ）は、

50

好ましくは、濃縮された形態である。例えば、解重合されたセルロース系材料のグルコース濃度またはキシロース濃度、またはグルコースおよびキシロース濃度の合計は、培養ステップの前に、少なくとも約 100 g/L、少なくとも約 200 g/L、少なくとも約 300 g/L、少なくとも約 400 g/L、少なくとも約 500 g/L、少なくとも約 600 g/L、少なくとも約 700 g/L、少なくとも約 800 g/L またはそれ以上の原料中のグルコースまたはキシロースまたはグルコースとキシロースの組合せであり、場合により、細胞が成長し、脂質を蓄積する間ずっと、上述の物質を細胞に供給するような流加回分式の培養である。そのような糖化方法および微細藻類発酵に用いるためのセルロース系物質を加工処理するための他の方法といった種々の方法は、米国特許出願公開第 20100151112 号に記載されている。

10

【0091】

セルロース系材料の爆発プロセスによる処理は、かなりの量の硫酸、熱、圧力を利用するため、炭水化物の副産物、つまり、フルフラール類及びヒドロキシメチルフルフラール類が遊離する。フルフラール類及びヒドロキシメチルフルフラール類は、ヘミセルロースの加水分解中に、キシロースを水和してフルフラール及び水にすることによって生成する。キシロースの子の損失は本発明の多くの実施形態では望ましくなく、したがって非爆発プロセスが用いられるか、あるいはフルフラールおよびヒドロキシメチルフルフラールの生成は、それらが用いられる場合、最小限にされるが、これらの副産物（例えば、フルフラール類及びヒドロキシメチルフルフラール類）は、バイオリクターに入れる前に、糖化されたリグノセルロース系材料から除去され、そして爆発プロセスに起因するセルロース系材料の伝導度は、米国特許出願公開第 20100151112 号に記載される方法により低減され得る。

20

【0092】

他の実施形態では、爆発プロセス自体を、塩が許容されない高濃度で生成するのを避けるように変更する。例えば、セルロース系バイオマス硫酸（又は他の酸）で爆発させるのに代わる代替法は、セルロース系バイオマスが酵素加水分解（糖化）を受けやすくなるような機械的なパルプ化である。さらに他の実施形態では、高濃度の塩に耐性の天然微生物株、又は高濃度の塩に耐性を有するように遺伝子操作された株を用いる。本発明のための濃縮原料として用いるのに適しているようにセルロース系糖類を処置する方法の非限定例は、米国特許出願公開第 20100151538 号（この記載内容は参照により本明細書中で援用される）に記載されている。一実施形態では、糖化リグノセルロース系糖は、毒素（例えばフルフラールおよびヒドロキシメチルフルフラール）および塩レベルの両方を低減するように処理され、次いで、濃縮糖流または固定炭素源供給原料中の糖単量体の濃度を少なくとも 600 g/L に濃縮されている。他の実施形態では、そのような濃縮糖化リグノセルロース系糖は、700 mM 未満のナトリウム当量という塩レベルを有する。他の実施形態では、そのような濃縮糖化リグノセルロース系糖は、100 mM 未満のナトリウム当量、200 mM 未満のナトリウム当量、300 mM 未満のナトリウム当量、400 mM 未満のナトリウム当量、500 mM 未満のナトリウム当量、600 mM 未満のナトリウム当量、700 mM 未満のナトリウム当量または 1000 mM 未満のナトリウム当量を有する。さらなる他の実施形態では、そのような濃縮糖化リグノセルロース系糖供給原料は、20,000 $\mu\text{S}/\text{cm}$ 未満 15,000 $\mu\text{S}/\text{cm}$ 未満、10,000 $\mu\text{S}/\text{cm}$ 未満、7,500 $\mu\text{S}/\text{cm}$ 未満、5,000 $\mu\text{S}/\text{cm}$ 未満、1,000 $\mu\text{S}/\text{cm}$ 未満、500 $\mu\text{S}/\text{cm}$ 未満、300 $\mu\text{S}/\text{cm}$ 未満または 200 $\mu\text{S}/\text{cm}$ 未満の伝導度を有する。さらなる他の実施形態では、そのような濃縮糖化リグノセルロース系糖供給原料は、五炭糖単量体または六炭糖単量体または五炭糖および六炭糖単量体の組合せに関して富化されている。

30

40

【0093】

本発明の方法の別の実施形態では、炭素源は、グリセロール、例えばバイオディーゼルのトランスエステル化から得られる、酸性化された及び酸性化されていないグリセロール副産物を含む。一実施形態では、炭素源は、グリセロールおよびキシロースを含む。ある

50

場合では、グリセロール及びキシロースの全てが、発酵開始時に微生物に与えられる。ある場合では、グリセロール及びキシロースが、微生物に対して所定の比率で同時に与えられる。ある場合では、グリセロール及びキシロースが、発酵している間、所定の速度で細菌に供給される。

【0094】

ある種の微細藻類は、グルコースが存在する状態よりも、グリセロールが存在する状態ですばやく細胞分裂を経る（PCT公開番号第2008/151149号）。これがグリセロールおよびキシロースに当てはまる場合、細胞に、細胞の密度をすばやく上げるためにグリセロールを供給し、次いで、脂質の蓄積を高めるためにキシロースを供給するような二段階成長プロセスによって、脂質が産生する効率を改良し得る。トランスエステル化プロセスのグリセロール副産物を使用することによって、この物質が生成プロセスに戻されると、経済的に顕著な利点を与える。例えば、グリセロール及びキシロースの混合物のような他の供給方法も同様に与えられる。また、そのような混合物を供給することによって、同じ経済的な利点が得られる。したがって、本発明は、キシロースのような代わりとなる糖をグリセロールとの種々の組み合わせで微細藻類に供給する方法を提供する。

10

【0095】

本発明の方法の種々の実施形態では、炭素源はキシロースであり、キシロースを含む複合供給原料、例えば、セルロース化合物由来材料を含む。一実施形態では、培地は、少なくとも1つのキシロース利用酵素をさらに含む。キシロースを含有する複合供給原料の使用は、炭化水素およびその他の油の生成における有意の経費節減を提供し得る。

20

4. 油生成

【0096】

本発明の方法に従って油を生成する場合、例えば、光が培養物にあたらないような、きわめて大きな（40,000リットル以上の）発酵槽を用いる場合のように、細胞を暗所で（または実質的に暗所で）培養することが好ましい。プロトテカ種のような偏性従属栄養種は、固定炭素源を含有する培地内で、光が存在しない状態で、油を生成するように成長し、増殖する。そのような成長は、従属栄養性の成長として知られている。

【0097】

一例として、脂質を生成する微細藻類細胞の播種物質が培地に入れられ、細胞が増殖し始めるまでに遅延期間（遅延期）が存在する。遅延期間の後、増殖速度は徐々に上がっていき、対数期すなわち指数増殖期に入る。次いで、指数増殖期の後、窒素のような栄養物が少なくなったり、毒性基質が増えたり、菌体数感知機構のために増殖が遅くなる。このように増殖が遅くなった後、増殖が止まり、細胞は、細胞に与えられている特定の環境に依存して、静止期又は安定成長状態に入る。脂質を豊富に含むバイオマスを得るために、培養物は、典型的には、指数増殖期が終わった後に良好に収穫され、指数増殖期は、窒素又は別の鍵となる栄養物（炭素以外のもの）を枯渇させることによって初期に終わらせてもよく、細胞は、過剰に存在する炭素源を脂質に変換する。培養条件のパラメーターは、油の合計生成量、生成する脂質種の組み合わせ、及び/又は特定の油の生成を最適にするように操作することができる。

30

【0098】

上述のように、細胞が成長周期の種々の期間を経るように、バイオリクター又は発酵槽を用いる。一例として、脂質を生成する細胞の播種物質が培地に入れられ、細胞が増殖し始めるまでに遅延期間（遅延期）が存在する。遅延期間の後、増殖速度は徐々に上がっていき、対数期すなわち指数増殖期に入る。次いで、指数増殖期の後、栄養物が少なくなったり、及び/又は毒性基質が増えたりするために増殖が遅くなる。このように増殖が遅くなった後、増殖が止まり、細胞は、細胞に与えられている特定の環境に依存して、静止期又は安定成長状態に入る。本明細書に開示されている細胞による脂質の生成は、対数期の間に行ってもよく、細胞分裂しない状態で、脂質を生成し続けるように、栄養物を供給するか、又は栄養物がまだ利用可能であるような静止期を含め、log期の後に行ってもよい。

40

50

【0099】

好ましくは、本明細書に記載されている条件及び当該技術分野で既知の条件を用いて成長させた微生物は、脂質を少なくとも約20重量%、少なくとも約40重量%、少なくとも約50重量%、少なくとも約60重量%および少なくとも約70重量%含む。プロセスの条件は、特定の用途に適した脂質の収量を高めるように、及び/又は、生成費用を減らすように調節することができる。例えば、ある特定の実施形態では、微細藻類を、グルコースのような固定炭素エネルギーを過剰量与えつつ、制限濃度の1つ以上の栄養物、例えば、窒素、リン又は硫黄が存在する状態で培養する。窒素による制限は、窒素が過剰に与えられている培地における微生物脂質収量よりも、微生物脂質収量を増やす傾向がある。特定の実施形態では、脂質収量の増加率は、窒素が豊富な条件下で得られる場合より、少なくとも約10%、約50%、約100%、約200%、又は約500%大きい。全培養期間の一部又は全期間にわたって、制限量の栄養物が存在する状態で細菌を培養してもよい。特定の実施形態では、栄養物の濃度は、全培養期間の間に、制限濃度及び非制限濃度を少なくとも2回繰り返す。過剰量の炭素を与えつつ、窒素量を制限するか、又はまったく窒素を含まない状態で、時間を延長させて培養を続けることによって、細胞の脂質含有量を増やすことができる。

10

【0100】

別の実施形態では、脂質経路に関連する酵素（例えば、脂肪酸合成酵素）のための1つ以上の補因子が存在する状態で、脂質を産生する細菌（例えば、微細藻類）を培養することによって、脂質収量を増やす。一般的に、補因子の濃度は、補因子が存在しない状態での微生物脂質収量よりも、微生物脂質（例えば、脂肪酸）の量を増やすのに十分な濃度である。ある特定の実施形態では、補因子をコードする外因性遺伝子を含む細菌（例えば、微細藻類）を培養物に含むことによって、培養物に補因子を与える。又は、補因子の合成に関与するタンパク質をコードする外因性遺伝子を含有する細菌（例えば、微細藻類）を含むことによって、培養物に補因子を与えてもよい。特定の実施形態では、適切な補因子は、ビオチン、パントテン酸化合物のような、脂質経路に関連する酵素に必要な任意のビタミンを含む。本発明で使用するのに適した補因子をコードする遺伝子、又はそのような補因子の合成に関与する遺伝子は、十分に知られており、上述のような構築物及び技術を用い、細菌（例えば、微細藻類）に導入することができる。

20

【0101】

本明細書に記載されているバイオリアクター、培養条件、従属栄養性成長及び増殖方法の特定の例を任意の適切な様式で組み合わせ、微生物の成長効率、及び脂質及び/又はタンパク質の生成効率を高めることができる。

30

【0102】

乾燥重量で、高い割合の油/脂質が蓄積した微細藻類のバイオマスは、異なる培養方法を用いて作成されており、この方法は、当該技術分野で知られている（PCT公開番号第2008/151149号）。本明細書に記載されている培養方法で作成され、本発明で有用な微細藻類のバイオマスは、乾燥重量で、少なくとも10%の微細藻類の油を含む。いくつかの実施形態では、微細藻類のバイオマスは、乾燥重量で、微細藻類の油を少なくとも25%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%または少なくとも70%含む。いくつかの実施形態では、微細藻類のバイオマスは、乾燥重量で、微細藻類の油を10~90%、25~75%、40~75%、又は50~70%含む。

40

【0103】

本明細書に記載されているバイオマスの微細藻類の油、又は本発明の方法及び組成物で使用するために、バイオマスから抽出された微細藻類の油は、1つ以上の別個の脂肪酸エステル側鎖を有するグリセロ脂質を含む。グリセロ脂質は、1個、2個又は3個の脂肪酸分子でエステル化されたグリセロール分子から成り、脂肪酸分子は、長さはさまざまであってもよく、種々の飽和度を有していてもよい。脂肪酸分子（及び微細藻類の油）の長さ及び飽和度の特徴によって、以下の第V章にさらに詳細に記載されるように、培養条件又は脂質経路の遺伝子操作によって、本発明の微細藻類の油中の脂肪酸分子の性質又は比率

50

を改変するように操作することができる。従って、藻の油の特定のブレンドは、2種類以上の微細藻類に由来するバイオマス又は藻の油を混合することによって、1種類の藻の中で調製されてもよく、又は、本発明の藻の油と、大豆、菜種、キャノーラ、パーム、パーム核、ココナツ、トウモロコシ、野菜くず、ナンキンハゼ、オリーブ、ヒマワリ、綿実、鶏脂、牛脂、豚脂、微細藻類、大型藻類、クフェア、亜麻、ピーナッツ、上質のホワイトグリース、ラード、カメリナ・サティバ、カラシの種子、カシューナッツ、オーツ麦、ハウチワマメ、ケナフ、キンセンカ、麻、コーヒー、亜麻仁（亜麻）、ヘーゼルナッツ、ユーホルピア、カボチャの種、コリアンダー、ツバキ、ゴマ、ペニバナ、イネ、アブラギリ、ココア、コブラ、ケシ（*pium poppy*）、トウゴマの実、ピーカン、ホホバ、ジャトロファ、マカダミア、ブラジルナッツ、アボカド、石油、又は上述のいずれかの油の留分のような他の供給源に由来する油とをブレンドすることによって調製されてもよい。

10

【0104】

油の組成、すなわち、グリセロ脂質の脂肪酸構成要素の性質及び比率も、少なくとも2種類の別個の微細藻類に由来するバイオマス又は油を混ぜあわせることによって操作することができる。いくつかの実施形態では、少なくとも2種類の別個の微細藻類は、異なるグリセロ脂質プロファイルを有している。この別個の種類の微細藻類を、好ましくは、それぞれの油を生成するような従属栄養条件下で、本明細書に記載されるように一緒に培養してもよく、又は別個に培養してもよい。異なる種類の微細藻類は、細胞のグリセロ脂質の構成成分である別個の脂肪酸を異なる割合で含有していてもよい。

20

【0105】

一般的に、野生型プロトテカ株は、鎖長がC8～C14の脂肪酸をほとんど含まないか、まったく含まない。例えば、プロトテカ *moriformis* (UTEX 1435)、プロトテカ *krugani* (UTEX 329)、プロトテカ *stagnora* (UTEX 1442)、プロトテカ *zopfi* (UTEX 1438) は、C8脂肪酸をまったく含まず（又は検出可能な量含まず）、C10脂肪酸を0～0.01%、C12脂肪酸を0.03～2.1%、C14脂肪酸を1.0～1.7%含んでいる。

【0106】

また、微細藻類の油は、微細藻類が産生する他の構成要素を含んでいてもよく、培地から微細藻類の油に組み込まれた他の構成要素を含んでいてもよい。これらの他の構成要素は、微細藻類の種、バイオマスから微細藻類の油を回収するのに用いられる抽出方法、微細藻類の油組成に影響を与え得る他の因子のような微細藻類を培養するために用いられる培養条件に基づいて、さまざまな量で存在してもよい。そのような構成要素の非限定的な例としては、0.1～0.4 µg/mlの量で存在するカロチノイド、0～0.02 mg/kgの量で存在するクロロフィル、0.4～0.6 mg/油100gの量で存在する-トコフェロール、0.2～0.5 mg/油gの量で存在する総トコトリエノールが挙げられる。

30

【0107】

他の構成要素としては、限定されないが、リン脂質、トコフェロール、トコトリエノール、カロチノイド（例えば、-カロチン、-カロチン、リコピンなど）、キサントフィル（例えば、ルテイン、ゼアキサントシン、-クリプトキサントシン、-クリプトキサントシン）、及び種々の有機化合物又は無機化合物が挙げられる。

40

【0108】

ある場合では、プロトテカ種から抽出した油は、0.02 mg/kg以下のクロロフィルを含む。ある場合では、プロトテカ種から抽出した油は、0.4 mcg/ml以下の総カロチノイドを含む。ある場合では、プロトテカの油は、油100gあたり、0.40～0.60 mgの-トコフェロールを含む。その他の場合では、プロトテカの油は、油1gあたり、0.2～0.5 mgの総トコトリエノールを含む。

IV. 遺伝子操作方法および材料

【0109】

50

本発明の実施形態は、本発明の方法で有用な細胞及び組み換え宿主細胞、例えば組み換え油性微生物、微細藻類および油性微細藻類、例えばプロトテカ・モリフォルミス、プロトテカ・ゾフィー、プロトテカ・クルガニ、プロトテカ・スタグノラ宿主細胞（これらに限定されない）を遺伝的に修飾する方法及び材料を提供する。読者が読みやすいように、これらの方法及び材料の記載をいくつかの節に分けている。第1節では、形質転換方法について記載している。第2節では、相同組み換え法を記載している。第3節では、発現ベクター及びベクター構成成分について記載している。

1. 形質転換方法

【0110】

細胞を、例えば、微粒子銃、エレクトロポレーション（Maruyama et al. (2004)、Biotechnology Techniques 8:821-826）、ガラスビーズによる形質転換、及び炭化ケイ素ウィスカーによる形質転換のような任意の適切な技術によって形質転換することができる。使用可能な別の方法は、プロトプラストを作成し、CaCl₂及びポリエチレングリコール（PEG）を用い、組み換えDNAを微細藻類細胞に導入することを含む（Kim et al. (2002)、Mar. Biotechnol. 4:63-73、この論文は、Chorella ellipsoideaを形質転換するために、この方法を用いることを報告している）。微細藻類の共形質転換を利用し、2種類の別個のベクター分子を細胞に同時に導入することができる（例えば、Protist 2004 Dec; 155(4):381-93）。

【0111】

微粒子銃による方法（例えば、Sanford、Trends In Biotech. (1988) 6:299-302、米国特許第4,945,050号；エレクトロポレーション（Fromm et al.、Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA) (1985) 82:5824-5828）；レーザービーム、マイクロインジェクション、又はDNAを微細藻類に導入することが可能な任意の他の方法の使用を、プロトテカ細胞を形質転換するために用いることができる。

2. 相同組み換え方法

【0112】

相同組み換えは、相同領域を整列し、交換する宿主細胞中の相補的DNA配列の能力を指す。標的となるゲノム配列（「テンプレート」）と同種の配列を含むトランスジェニックDNA（「ドナー」）を宿主細胞に導入し、次いで、対応するゲノム同種配列の部位にあるゲノムで組み換えが起こる。このプロセスの機構的なステップは、ほとんどの場合、（1）同種DNAセグメントを対にすることと；（2）ドナーDNA分子内に二本鎖開裂部分を導入することと；（3）自由になったドナーDNA末端が、テンプレートDNA分子に侵入した後、DNA合成が起こることと；（4）二本鎖開裂部分の修復事象が起こり、最終的な組み換え産物が得られることとを含む。

【0113】

宿主又は有機体で相同組み換えを行う能力は、分子の遺伝子レベルで行うことができ、用途に応じた油を産生することができる油産生細菌の生成に有用であるといった多くの実用的意義がある。相同組み換えは、それ自体の本来の性質により、正確な遺伝子標的事象であり、従って、同じ標的配列を用いて作られたほとんどのトランスジェニック系は、表現型の観点では本質的に同一であり、それほど多くの形質転換事象をスクリーニングする必要はない。また、相同組み換えは、遺伝子が宿主の染色体に挿入される事象を標的としており、これにより、遺伝子の選択が存在しない状態であっても、優れた遺伝子安定性が得られる。染色体上の遺伝子座が異なることは、異種プロモーター/UTRに由来するものであっても、遺伝子発現に影響を与え得るため、相同組み換えは、よく知られていないゲノム環境にある遺伝子座を検索し、これらの環境が遺伝子発現に与える影響を評価する方法になり得る。

【0114】

相同組み換えを用いる特に有用な遺伝子操作は、プロモーター/UTRのような選択特

異的な宿主制御エレメントが、非常に特異的な様式で異種遺伝子を発現させることである。例えば、異種 C 1 2 : 0 特異的な F A T B (チオエステラーゼ) 遺伝子カセット及び適切な選択マーカーを用いて内在するステアロイル A C P デサチュラーゼ遺伝子を正確に切断すると、C 1 8 : 1 脂肪酸の内在濃度が顕著に減るとともに、C 1 2 : 0 脂肪酸の濃度が増加すると予想され得る (米国特許出願公開第 2 0 1 0 0 1 5 1 1 1 2 号参照)。

【 0 1 1 5 】

相同組み換えが、正確な遺伝子標的事象であるため、十分なフランキング領域が特定されていれば、目的の遺伝子又は領域の中にある任意のヌクレオチドを修飾するために用いることができる。従って、相同組み換えは、R N A 及び / 又はタンパク質の遺伝子発現に影響を及ぼす制御配列を改変する手段として用いることもできる。また、相同組み換えは、基質特異性、親和性及び K m のような酵素活性を改変する試みにおいて、タンパク質コード領域を修飾するために用いることもでき、これにより、宿主細胞の代謝に望ましい変化を起こすことができる。相同組み換えは、宿主ゲノムを操作して、遺伝子標的化、遺伝子変換、遺伝子欠失、遺伝子重複、遺伝子反転を、そしてプロモーター、エンハンサー、3 ' U T R のような遺伝子発現制御エレメントの交換を生じるための強力な手段を与える。

10

【 0 1 1 6 】

相同組み換えは、内在する宿主細胞ゲノム内にある目的の遺伝子又は領域を「標的とする」ために、内在する配列の一部を含む標的構築物を用いることによって達成され得る。そのような標的配列は、目的の遺伝子又は領域の 5 ' 末端に位置し、目的の遺伝子 / 領域の 3 ' 末端に位置し得るし、または目的の遺伝子 / 領域に隣接し得る。そのような標的構築物を、さらなるベクター骨格を有する超らせん構造のプラスミド D N A として、ベクター骨格を有さない P C R 産物として、又は線状分子として宿主細胞内で形質転換してもよい。ある場合では、まず、制限酵素を用いて、トランスジェニック D N A (ドナー D N A) 内にある同種配列にさらすことが有益な場合がある。このステップによって、組み換え効率が増し、望ましくない事象の発生を減らすことができる。組み換え効率を高める他の方法としては、処理されるゲノム配列に対して同種の線状末端を含有する形質転換されたトランスジェニック D N A を作成するために P C R を用いることが挙げられる。

20

3 . ベクターおよびベクター構成成分

【 0 1 1 7 】

本発明に従う微生物を形質転換するためのベクターは、本明細書の開示を考慮して、当業者には有名な既知の技術によって調製することができる。ベクターは、典型的には、1 つ以上の遺伝子を含有しており、それぞれの遺伝子は、望ましい生成物 (遺伝子産物) を発現するようにコードしており、この遺伝子発現を制御し、組み換え細胞内の特定の位置に向かうように遺伝子産物を標的化するような 1 つ以上の制御配列に作用可能に連結している (またはそれらを含有する)。読者の助けとなるように、この節をいくつかの副節に分けている。A 副節は、制御配列、典型的には、ベクター上に含まれている制御配列、ならびに、特に微細藻類、例えばプロトテカにおいて用いるための制御配列について記載している。B 副節は、遺伝子、典型的には、ベクターに含まれる遺伝子、ならびに特に微細藻類、例えばプロトテカにおいて用いるためのコドン最適化方法およびそれを用いて調製される遺伝子について記載している。

30

40

A . 制御配列

【 0 1 1 8 】

制御配列は、コード配列の発現を制御するか、又は遺伝子産物を、細胞内又は細胞外の特定の位置に向かわせる核酸である。発現を制御する制御配列としては、例えば、コード配列の転写を制御するプロモーター、コード配列の転写を止めるターミネーターが挙げられる。別の制御配列は、コード配列の末端に位置する 3 ' 非翻訳配列であり、ポリアデニル化シグナルをコードする。遺伝子産物を特定の位置に向かわせる制御配列としては、シグナルペプチドをコードする配列が挙げられ、この配列は、細胞内又は細胞外の特定の位置に、この配列が結合したタンパク質に向かわせる。

50

【0119】

従って、微細藻類において外因性遺伝子を発現するような例示的なベクターの設計は、望ましい遺伝子産物（例えば、選択可能なマーカー、脂質経路修飾酵素、またはキシロース利用酵素）のためのコード配列を、微細藻類内で活性なプロモーターと作用可能に連結した状態で含む。又は、ベクターが、目的のコード配列と作用可能に連結した状態でプロモーターを含まない場合、コード配列を、ベクターの組み込み位置で内在するプロモーターに作用可能に連結するように、細胞内で形質転換してもよい。

【0120】

多くのプロモーターは、微細藻類内で活性であり、形質転換される藻に内在するプロモーター、形質転換される藻に内在しないプロモーター（すなわち、他の藻に由来するプロモーター、高等植物に由来するプロモーター、植物ウイルス又は藻ウイルスに由来するプロモーター）を含む。微細藻類内で活性な、具体的な外因性のプロモーター及び／又は内在するプロモーター（微細藻類中で機能する抗生物質耐性のある遺伝子）は、PCT公開番号第2008/151149号及びこの明細書に引用されている参考文献に記載されている）。米国特許出願公開第20100151112号も参照。

【0121】

外因性遺伝子を発現させるために用いられるプロモーターは、その外因性遺伝子に天然で連結しているプロモーターであってもよく、又は、異種遺伝子であってもよい。ある種のプロモーターは、1つより多い微細藻類において活性である。他のプロモーターは、種に特異的である。具体的なプロモーターとしては、以下の実施例で用いられる、*Chlamydomonas reinhardtii*に由来する - チュープリンのようなプロモーター、カリフラワーモザイクウイルス (CMV) 及びクロレラウイルスのような、微細藻類の複数の種の中で活性であることが示されているウイルスプロモーターが挙げられる（例えば、Plant Cell Rep. 2005 Mar; 23(10-11): 727-35; J Microbiol. 2005 Aug; 43(4): 361-5; Mar Biotechnol (NY). 2002 Jan; 4(1): 63-73）。プロトテカ内で外因性遺伝子を発現させるのに適切な別のプロモーターは、*Chlorella sorokiniana* グルタミン酸脱水素酵素プロモーター / 5' UTR (配列番号10) である。場合により、これらの配列のうち、プロモーターを含有し、少なくとも10、20、30、40、50、又は60ヌクレオチド、又はそれ以上が使用される。プロトテカ内で外因性遺伝子を発現させるのに有用な代表的なプロモーターは、本明細書の配列表に列挙されており、例えば、*Chlorella* HUP1 遺伝子のプロモーター (配列番号11)、*Chlorella ellipsoidea* 硝酸還元酵素プロモーター (配列番号12) がある。*Chlorella* ウイルスプロモーターを、プロトテカ内で遺伝子を発現させるために用いることもでき、例えば、米国特許第6,395,965号の配列番号1~7が挙げられる。プロトテカ内で活性なさらなるプロモーターは、例えば、Biochem Biophys Res Commun. 1994 Oct 14; 204(1): 187-94; Plant Mol Biol. 1994 Oct; 26(1): 85-93; Virology. 2004 Aug 15; 326(1): 150-9; 及び、Virology. 2004 Jan 5; 318(1): 214-23に見いだすことができる。

【0122】

プロモーターは、一般的に、構成的であるか、又は誘発性であると特徴づけることができる。構成的プロモーターは、一般的に、いつでも（又は、細胞周期の特定の時期に）同じレベルで活性であるか、又は発現を起こすように機能する。誘発性プロモーターは、これとは異なり、刺激に応答したときのみ、活性である（又は不活性化する）か、又は顕著に上方調節されるか、又は下方調節される。どちらの種類のプロモーターも、本発明の方法での用途がある。本発明で有用な誘発性プロモーターとしては、例えば、外から与えられる低分子（例えば、配列番号11の場合には、グルコース）、温度（熱いか、又は冷たい）、培地中の窒素不足などの刺激に応答して、作用可能に連結した遺伝子の転写に介在

10

20

30

40

50

するプロモーターが挙げられる。適切なプロモーターは、本質的にサイレント遺伝子である遺伝子の転写を活性化させることができるか、又は、低濃度で転写されるような作用可能に連結した遺伝子の転写を上方調節し、好ましくは、かなり上方調節することができる。

【0123】

停止領域の制御配列の包含は任意であり、利用される場合には、停止領域は比較的置き換え可能であるため、その選択は、主に簡便なものである。停止領域は、転写開始領域（プロモーター）に由来するものであってもよく、目的のDNA配列に由来するものであってもよく、又は、別の供給源から得られるものであってもよい。例えば、Chen and Orozco、Nucleic Acids Res. (1988) 16: 8411

10

【0124】

また、本発明は、制御配列及び組み換え遺伝子、及び目的の遺伝子を区画化して発現するための、これらを含むベクターを提供する。標的とするための細胞小器官は、葉緑体、色素体、ミトコンドリア、小胞体である。それに加え、本発明は、制御配列及び組み換え遺伝子、細胞の外側にタンパク質を分泌するための、これらを含むベクターを提供する。

【0125】

プロトテカの核ゲノム内で発現するタンパク質は、色素体標的シグナルを用い、色素体を標的としてもよい。Chlorellaに内在する色素体標的配列は知られており、例えば、色素体を標的とするタンパク質をコードする、Chlorella核ゲノム内の遺伝子、例えば、GenBank寄託番号AY646197及びAF499684が挙げられ、一実施形態では、そのような制御配列は、プロトテカ色素体でタンパク質を発現させることを標的とするために、本発明のベクター内で使用される。

20

【0126】

宿主細胞の正しい区画に異種タンパク質を向かわせるために、藻類色素体標的配列を使用することが、記載されている（米国特許出願公開第20100151112号の実施例11および12参照）。一実施形態では、異種タンパク質の自然色素体標的配列を用いて、異種タンパク質を色素体/葉緑体に輸送する。いくつかの実施形態では、色素体/葉緑体への組換えまたは異種タンパク質の輸送を増大するために、自然色素体標的配列は、異種色素体標的配列と取り替えられる。いくつかの実施形態では、自然色素体標的配列は、微細藻類タンパク質の色素体標的配列と取り替えられる。配列をBLASTに供し、色素体/葉緑体へと向かう既知のタンパク質に対する相同性について分析した。これらのタンパク質をコードするcDNAをクローン化し、これらのcDNAから色素体ターゲティング配列を単離した。そのような藻類の色素体標的配列を、本発明の細胞および方法において有用な発現ベクターに用いることができる。

30

【0127】

本発明の別の実施形態では、プロトテカ内でのポリペプチドの発現は、小胞体を標的としている。発現ベクター内の適切な保持シグナル又は選別シグナルによって、タンパク質が確実に小胞体（ER）に保持され、ゴルジ体の下流には行かない。例えば、Wagenin et al.、UR-Plant Research InternationalのIMPACTベクター1、3ベクターは、よく知られているKDEL保持シグナル又は選別シグナルを含んでいる。このベクターを用い、ERを保持することは、発現レベルが5倍以上に高まることが報告されているという点で、実益がある。この現象の主な理由は、ERが、細胞質に存在するプロテアーゼより低い濃度のプロテアーゼを含んでいるか、及び/又は、細胞質に存在するプロテアーゼとは異なる、発現したタンパク質の翻訳後の分解に関与するプロテアーゼを含んでいるからだと思われる。緑色微細藻類内で機能するER保持シグナルが知られている。例えば、Proc Natl Acad Sci USA, 2005 Apr 26; 102(17): 6225-30を参照。

40

【0128】

本発明の別の実施形態では、ポリペプチドは、細胞から出て、培地に分泌することを標

50

的としている。本発明の方法に従ってプロトテカ内で使用することが可能な、Chlorella内で活性なシグナルの分泌については、Hawkins et al., Current Microbiology Vol. 38 (1999)、pp. 335 - 341を参照。

B. 遺伝子およびコドン最適化

【0129】

典型的には、遺伝子は、プロモーターと、コード配列と、停止制御配列とを含む。組み換えDNA技術によって組み立てられる場合、遺伝子は、発現カセットと呼ばれることもあり、組み換え遺伝子を宿主細胞に導入するために使用されるベクターに簡便に挿入するために、制限配列に隣接していてもよい。発現カセットは、ゲノム由来のDNA配列、又は相同組み換えによって発現カセットをゲノムに安定に組み込みやすくすることを標的とした他の核酸に隣接していてもよい。又は、ベクター及びその発現カセットは、組み込まれないままであってもよく、この場合には、ベクターは、典型的には、異種ベクターDNAを複製するために与えることができるような、複製起源を含んでいてもよい。

10

【0130】

ベクター上に存在する共通の遺伝子は、タンパク質をコードする遺伝子であり、この発現によって、このタンパク質を含有する組み換え細胞が、このタンパク質を発現しない細胞と分化する。そのような遺伝子、及びその対応する遺伝子産物は、選択可能なマーカーと呼ばれる。選択可能なマーカーが、プロトテカを形質転換するのに有用な導入遺伝子構築物中で用いられてもよい。適切な選択可能なマーカーの例としては、G418耐性遺伝子、硝酸還元酵素遺伝子(Dawson et al. (1997)、Current Microbiology 35: 356 - 362を参照)、ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子(HPT; Kim et al. (2002)、Mar. Biotechnol. 4: 63 - 73を参照)、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子、フレオマイシンに対する耐性を付与するble遺伝子(Huang et al. (2007)、Appl. Microbiol. Biotechnol. 72: 197 - 205)が挙げられる。微細藻類の抗生物質に対する感度を決める方法はよく知られている。例えば、Mol Gen Genet. 1996 Oct 16; 252(5): 572 - 9。

20

【0131】

本発明の目的のために、本発明の組み換え宿主細胞を調製するために用いられる発現ベクターは、遺伝子のひとつが選択可能なマーカーである場合、少なくとも2個、多くは3個の遺伝子を含み得る。例えば、本発明の遺伝子遺伝子操作プロトテカは、選択可能なマーカーに加え、例えば、キシロース利用遺伝子またはキシロース利用遺伝子およびアシルACP-チオエステラーゼ遺伝子のような1つ以上の外因性遺伝子を含む本発明のベクターで形質転換させることによって作られ得る。1個又は全部の遺伝子が、誘発性プロモーターを用いて発現してもよく、これにより、これらの遺伝子が発現する相対的なタイミングを制御し、脂質収量及び脂肪酸エステルへの変換を高めることができる。2種以上の外因性遺伝子の発現は、同じ誘発性プロモーターで制御されていてもよく、異なる誘発性(又は構成的)プロモーターで制御されていてもよい。後者の状況では、第1の外因性遺伝子の発現は、第1の期間に誘発されてもよく(この間に、第2の外因性遺伝子の発現が誘発されてもよく、誘発されなくてもよく)、第2の外因性遺伝子の発現は、第2の期間に誘発されてもよい(この間に、第1の外因性遺伝子の発現が誘発されてもよく、誘発されなくてもよい)。

30

40

【0132】

他の実施形態では、2種以上の外因性遺伝子(任意の選択可能なマーカーに加えて)は、キシロース利用遺伝子、脂肪族アシル-ACPチオエステラーゼ、ケト-アシル-ACPシンターゼ、ステロイル-ACPデサチュラーゼ、脂肪酸デサチュラーゼおよび脂肪酸アシル-CoA/アルデヒド還元酵素であり、この組合せ作用がアルコール産物を産生する。さらに、キシロース利用遺伝子のほかに、限定されないが、アルデヒドを生成するた

50

めの脂肪族アシル - A C P チオエステラーゼ及び脂肪酸アシル - C o A 還元酵素を含めた外因性遺伝子の他の組み合わせも提供される。一実施形態では、ベクターは、キシロース利用遺伝子のほかに、アルカンを生成するための、脂肪族アシル - A C P チオエステラーゼ、脂肪酸アシル - C o A 還元酵素、脂肪族アルデヒド脱炭酸酵素の組み合わせを提供する。これらのそれぞれの実施形態では、1つ以上の外因性遺伝子は、誘発性プロモーターを用いて発現され得る。

【0133】

2種以上の外因性遺伝子を発現する他の例示的ベクターとしては、キシロース利用酵素および選択可能マーカーの両方をコードするものが挙げられる。本発明のベクターで形質転換された組み換えプロトテカは、炭素源としてキシロースを使用する遺伝子操作された能力のため、低い製造コストで脂質を産生するために用いられ得る。上記の外因性遺伝子の挿入は、定方向変異誘発法及び/又はランダム変異導入法によって多糖合成を乱すことと組み合わせることができ、脂質産生へと進む炭素の流れがさらに大きくなる方向に進む。個々に、及び組み合わせで、栄養転換、脂質の産生を変えるような遺伝子操作、外因性の酵素を用いた処理によって、微生物が産生する脂質の組成が変わる。この変化によって、産生する脂質の量、他の脂質に対する1つ以上の炭化水素種の相対量、及び/又は微生物が産生する脂質種の種類を変えることができる。例えば、微細藻類を、T A G の量及び/又は割合を増やすように遺伝子操作することができる。

10

【0134】

組み換えタンパク質の最適な発現のために、形質転換されるべき宿主細胞で優先的に用いられるコドンを用いてmRNAを生成するコード配列を利用することが有益である。従って、導入遺伝子の適切な発現は、導入遺伝子のコドンの使用が、導入遺伝子を発現する有機体の特定のコドンの偏りと適合していることが必要な場合がある。この影響の元になる正確な機構は多くあるが、利用可能なアミノアシル化されたtRNAプールと、細胞内で合成されるタンパク質との適切なバランス、この要求を満たす場合に、トランスジェニックメッセンジャーRNA (mRNA) をもっと効果的な翻訳との組み合わせを含む。導入遺伝子内のコドンの使用が最適化されていない場合、利用可能なtRNAプールは、異種mRNAの効率的な翻訳を可能にするのに十分ではなく、その結果、リボソームが失速し、停止し、トランスジェニックmRNAが不安定になる場合がある。

20

【0135】

本発明は、プロトテカ内で組み換えタンパク質が首尾よく発現するのに有用な、コドンが最適化された核酸を提供する。プロトテカ種内のコドンの使用を、プロトテカ *m o r i f o r m i s* から単離されたcDNA配列を研究することによって分析した。この分析から、24,000を超えるコドンを調べ、以下の表1に結果を示している。

30

【表 1】

表 1. プロトテカ株内での好ましいコドンの使用

Ala	GCG	345 (0.36)	Asn	AAT	8 (0.04)
	GCA	66 (0.07)		AAC	201 (0.96)
	GCT	101 (0.11)			
	GCC	442 (0.46)	Pro	CCG	161 (0.29)
				CCA	49 (0.09)
Cys	TGT	12 (0.10)		CCT	71 (0.13)
	TGC	105 (0.90)		CCC	267 (0.49)
Asp	GAT	43 (0.12)	Gln	CAG	226 (0.82)
	GAC	316 (0.88)		CAA	48 (0.18)
Glu	GAG	377 (0.96)	Arg	AGG	33 (0.06)
	GAA	14 (0.04)		AGA	14 (0.02)
				CGG	102 (0.18)
Phe	TTT	89 (0.29)		CGA	49 (0.08)
	TTC	216 (0.71)		CGT	51 (0.09)
				CGC	331 (0.57)
Gly	GGG	92 (0.12)	Ser	AGT	16 (0.03)
	GGA	56 (0.07)		AGC	123 (0.22)
	GGT	76 (0.10)		TCG	152 (0.28)
	GGC	559 (0.71)		TCA	31 (0.06)
His	CAT	42 (0.21)		TCT	55 (0.10)
	CAC	154 (0.79)		TCC	173 (0.31)
Ile	ATA	4 (0.01)	Thr	ACG	184 (0.38)
	ATT	30 (0.08)		ACA	24 (0.05)
	ATC	338 (0.91)		ACT	21 (0.05)
				ACC	249 (0.52)
Lys	AAG	284 (0.98)	Val	GTG	308 (0.50)
	AAA	7 (0.02)		GTA	9 (0.01)
Leu	TTG	26 (0.04)		GTT	35 (0.06)
	TTA	3 (0.00)		GTC	262 (0.43)
	CTG	447 (0.61)	Trp	TGG	107 (1.00)
	CTA	20 (0.03)			
	CTT	45 (0.06)	Tyr	TAT	10 (0.05)
	CTC	190 (0.26)		TAC	180 (0.95)
Met	ATG	191 (1.00)	停止	TGA/TAG/TAA	

10

20

30

【0136】

他の実施形態では、組み換えベクター内の遺伝子は、プロトテカ株以外の微細藻類株に関して言うと、コドンが最適化されている。例えば、微細藻類内で発現させるために遺伝子を記録する方法は、米国特許第7,135,290号に記載されている。コドンの最適化に関するさらなる情報は、例えば、GenBankのコドン利用に関するデータベースが利用可能である。

40

【0137】

本発明の方法及び材料によって、外因性遺伝子をプロトテカに導入することが可能であるが、キシロースの利用及び脂質経路の改変に関する遺伝子は、以下の章で記載するように、特に興味深い。

V. キシロース利用

【0138】

50

本発明の一実施形態は、セルロース系物質源中に豊富であるキシロースのようなペントース糖を含む異なる供給原料を代謝する微生物の能力を変更するよう修飾されている組換え油性微生物も提供する。そのような組換え油性微生物は、色素体およびⅡ型脂肪酸合成経路を有するものを包含し、植物界、微細藻類、油性酵母、油性細菌および油性真菌に属するものである。いくつかの実施形態では、組換え油性微生物は、微細藻類である。他の実施形態では、組換え油性微生物は、プロトテカ属の微細藻類である。一実施形態では、組換え油性微生物は、キシロース利用に関与する1つ以上の外因性遺伝子を含有するよう遺伝子操作される。キシロース利用に関与する遺伝子は、以下で詳細に記載される。キシロース利用に関与する遺伝子は、単独で、またはキシロース利用に関与する他の遺伝子と組合せて用いられ得る（そのような遺伝子の数または組合せ（単数または複数）は限定されない）、ということが、本発明の1つ以上の実施形態で意図される。キシロース利用に関与する遺伝子は、他の炭素源の利用または脂質産生に関与する他の外因性遺伝子と組合せて用いられ得る（そのような遺伝子の数または組合せ（単数または複数）は限定されない）、ということが本発明の1つ以上の実施形態で意図される。

10

20

30

40

50

【0139】

一実施形態では、本発明の組換え細胞は、1つ以上の外因性キシロース利用遺伝子をさらに含有する。キシロースを代謝するために真核生物により利用される少なくとも2つの異なる経路が存在する。そのような経路の1つは、オキソ還元（オキシドレダクターゼ）経路またはアルドケトレダクターゼ経路である。この経路における第一ステップでは、キシロースレダクターゼによりD-キシロースがキシリトールに還元される。次いで、キシリトールは、キシリトールデヒドロゲナーゼにより、キシルロースに酸化される。キシルロースは、次に、キシルロースキナーゼによりキシルロース-5-ホスフェートに転化され、次いで、ペントースホスフェート経路を介して代謝される。キシロースを代謝するために利用される別の経路は、キシロースイソメラーゼ経路である。キシロースイソメラーゼ経路における第一ステップでは、キシロースイソメラーゼにより、キシロースはキシルロースに異性体化される。キシルロースは、次に、キシルロースキナーゼによりキシルロース-5-ホスフェートに転化される。次いで、キシルロース-5-ホスフェートは、ペントースホスフェート経路を介して代謝される。

【0140】

いくつかの生物体では、これらの経路のうち1つ以上が存在し、同時に利用される。いくつかの生物体では、オキソ還元経路およびキシロースイソメラーゼ経路の両方が存在する。そのような生物体では、キシリトールの生成は、キシロースイソメラーゼ活性を抑制し得る。そのような場合、キシリトールデヒドロゲナーゼが発現されて、そのような抑制を軽減する。

【0141】

キシロースを利用しない、またはキシロースを効率的に利用できない生物体では、上記経路の一方または両方が存在しないか、これらの生物体中に部分的に存在するに過ぎない。キシロースを効率的に利用するためにそのような生物体を遺伝子操作することは、これらの経路の一方または両方の1つまたはいくつかの（またはすべての）成員の導入を包含し得る。輸送体タンパク質の導入は、細胞外環境から細胞中にキシロースを輸送するために、またはキシロースをより効率的に輸送するために必要であり得る。輸送体タンパク質、例えばキシロースのようなペントース糖に対する特異性を有する輸送体タンパク質は、細胞外環境、例えば培地から、細胞の細胞基質中に糖（例えばキシロース）を輸送する細胞膜タンパク質およびそのようなタンパク質をコードする遺伝子のファミリーである。輸送体は、能動的または受動的であり得る。受動輸送体は、エネルギーを消費せずに、濃度勾配を下降して（高濃度域から低濃度域へ）分子の輸送を助長する。いくつかの実施形態では、輸送体は、ペントース糖に対する特異性を有するペントース輸送体である。他の実施形態では、輸送体は、ピキア・スチピチス由来の輸送体である。さらなる他の実施形態では、輸送体は、ピキア・スチピチスSUT1（GenBank寄託番号XP_001387（参照により本明細書中に組入れられる）；配列番号37（これに限定されない））、S

U T 2 および / または S U T 3 輸送体由来の、ならびに出芽酵母 H X T 輸送体由来のものである。能動輸送体は、通常は、濃度勾配に逆らって分子を輸送するに際して、エネルギーを消費する。能動輸送体としては、一次能動輸送体（エネルギー源として A T P を使用。すなわち、A T P 結合カセット（A B C）輸送体）および二次能動輸送体（化学浸透圧性勾配からのエネルギーを使用。例としては、対向輸送体および共輸送体、すなわち、カンジダ・インターメディアの G X S 1 タンパク質（配列番号 3 9）（GenBank 寄託番号 C A I 4 4 9 3 2 . 1 ; 参照により本明細書中に組入れられる）（これに限定されない）、ならびに H + - 共輸送体様タンパク質（例えば、配列番号 4 1）が挙げられる。いくつかの実施形態では、輸送体は、シロイヌナズナからの A t 5 g 5 9 2 5 0 n 遺伝子由来のものである。他の実施形態では、輸送体は、トリコデルマ・リーセイからの X L T 1 タンパク質（配列番号 4 3）をコードする遺伝子由来のものである。

10

【0142】

加えて、輸送体タンパク質（例えば、キシロース - 5 - ホスフェート）の導入は、さらにまた、微生物の正しい副区画中に正しい基質を分配するために必要であるか、または好ましい。ペントース糖代謝は、ペントースホスフェート経路を通して生じると考えられるが、これは、色素体中で主に生じる。そのようなトランスロケーターは、細胞基質から色素体にこれらの分子のヘキソース、トリオースまたはペントースあるいはホスフェート・バージョンを輸送する色素体膜タンパク質およびそのようなタンパク質をコードする遺伝子の一ファミリーである。一実施形態では、そのようなトランスロケーターは、ヘキソース / ヘキソースホスフェートまたはトリオース / トリオースホスフェートを上回る、ペントースまたはペントースホスフェートに対する選択性を有する。別の実施形態では、トランスロケーターは、キシロース 5 - ホスフェート・トランスロケータータンパク質をコードする遺伝子に由来する。別の実施形態では、トランスロケーターは、シロイヌナズナからの X P T 遺伝子に由来する。いくつかの場合、トランスロケーターは、キシロースを利用するよう遺伝子操作されている微生物に対して内因性である輸送ペプチドを含むキメラタンパク質である。例えば、プロトテカに対して内因性である輸送ペプチドを有するキメラトランスロケーター（例えば、配列番号 4 5、4 7 および 4 9）は、いくつかの実施形態において有用である。

20

【0143】

いくつかの実施形態では、微生物中に導入される異種外因性遺伝子は、オキソ還元またはアルドケトレダクターゼ経路の一部である。いくつかの場合、異種外因性遺伝子は、キシロースレダクターゼである。他の場合、異種外因性遺伝子は、キシリトールデヒドロゲナーゼである。他の実施形態では、キシリトールデヒドロゲナーゼは、ピキア・スチピチスからの X Y L 2 遺伝子である。

30

【0144】

他の実施形態では、微生物中に導入される異種外因性遺伝子は、キシロースイソメラーゼ経路の一部である。いくつかの場合、異種外因性遺伝子は、キシロースイソメラーゼである。いくつかの場合、キシロースイソメラーゼは、ピロミセス種からの X Y L A 遺伝子によりコードされる。他の実施形態では、異種外因性遺伝子は、キシロースキナーゼである。いくつかの実施形態では、キシロースキナーゼは、ピキア・スチピチスからの X Y L 3 遺伝子によりコードされる。

40

【0145】

いくつかの実施形態では、異種外因性遺伝子は、トランスロケータータンパク質をコードする。他の実施形態では、そのようなトランスロケーターは、ペントースホスフェートトランスロケーターである。さらなる別の実施形態では、ペントースホスフェートトランスロケーターは、シロイヌナズナからの X P T 遺伝子によりコードされる。さらに他の実施形態では、遺伝子操作微生物は、前述の外因性異種遺伝子のうちの 1 つ以上を含む。他の実施形態では、遺伝子操作微生物は、前述の外因性異種遺伝子のすべてを含む。

【0146】

以下の実施例 3 は、従属栄養条件下で培養される場合に、固定炭素源としてキシロース

50

を利用できる遺伝子操作微細藻類細胞を生成するために、キシロースイソメラーゼ経路タンパク質、オキソ還元経路酵素およびキシローストランスロケーターの異なる成員を微細藻類に首尾よく導入したことを実証する。

【0147】

実施例7は、プロトテカ中への、キシロース輸送体、キシロースオキシドレダクターゼ/イソメラーゼ酵素、およびキシローストランスロケーターの種々の組合せ(表6参照)の導入を実証する。実施例8は、いくつかの選択株の脂質産生能力を実証する。

【0148】

いくつかの実施形態では、細胞は、米国特許出願公開第20100151112号に記載されたような1つ以上の外因性スクロース利用遺伝子をさらに含有し得る。そのような細胞は、キシロースおよびスクロースの両方を代謝することができる。

10

VI. 脂質経路遺伝子操作

【0149】

キシロース含有供給原料のような供給原料を利用するプロトテカの能力を変更することのほかに、本発明は、産生される脂質の特性および/または割合を変更するようさらに修飾されている組換えプロトテカも提供する。当該経路は、さらに、または代替的に、脂肪酸経路における脂質および中間体の酵素的処理により産生される種々の脂質分子の特性および/または割合を変更するよう修飾され得る。種々の実施形態において、本発明の組換えプロトテカ細胞は、それらの非形質転換同等物に比して、単位体積当たりのおよび/または単位時間当たりの最適化された脂質収率、炭素鎖長(例えば、再生可能ディーゼル生産のための、または脂質供給原料を必要とする産業的化学品用途のための)、二重または三重結合数の低減(任意にゼロへの低減)、ならびに特定種の脂質の、または異なる脂質の一集団の水素:炭素比の増大を示す。

20

【0150】

特定の実施形態では、脂肪酸合成に対して代謝を制御する1つ以上の鍵となる酵素は、脂質産生を改良するために、「上方調節」または「下方調節」されている。上方調節は、例えば、転写を増やす強力なプロモーターエレメント及び/又はエンハンサーエレメントを用い、例えば、目的の酵素をコードする遺伝子が発現するような発現構築物を用いて細胞を形質転換することによって達成することができる。そのような構築物は、形質転換体を選択することができるような選択可能なマーカーを含んでいてもよく、それにより、構築物が維持されるかまたは増幅され、コードされた酵素の発現量が増える。本発明の方法に従って上方調節するのに適した酵素の例は、米国特許出願公開第20100151112号に記載されている。

30

【0151】

遺伝子の上方調節及び/又は下方調節は、脂肪酸の生合成経路に関する遺伝子の発現を制御する包括的な制御因子に適用することができる。従って、脂肪酸合成の1つ以上の包括的な制御因子を、適切な場合に上方調節するか、又は下方調節し、それぞれ、複数の脂肪酸合成遺伝子の発現を阻害するか、又は高め、最終的に、脂質の産生量を増やすことができる。例としては、ステロール制御エレメント結合タンパク質(SREBP)、例えば、SREBP-1a及びSREBP-1c(例えば、Genbank寄託番号NP_035610及びQ9WTN3を参照)。

40

【0152】

本発明の実施形態は、さらにまた、脂質修飾酵素、例えば、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、脂肪族アルデヒド脱炭酸酵素、脂肪族アルデヒド還元酵素およびスクアレンシンターゼをコードする1つ以上の外因性遺伝子を含むように修飾されている組み換え微細藻類細胞を提供する(米国特許出願公開第20100151112号参照)。

【0153】

したがって、特定の実施形態では、本発明の細菌は、キシロース利用遺伝子、ならびにアシル-ACPチオエステラーゼ、アシル-CoA/アルデヒド還元酵素、脂肪酸アシル

50

- C o A 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、又は自然に共発現するアシルキャリアータンパク質から選択される 1 つ以上の外因性遺伝子を発現するように遺伝子操作される。適切な発現方法は、リパーゼ遺伝子の発現に関して上に記載されており、他の方法の中で、特に、誘発的発現及び区画化された発現が挙げられる。脂肪族アシル - A C P チオエステラーゼは、脂質合成中に、アシルキャリアータンパク質 (A C P) から脂肪酸を開裂させる。さらなる酵素処理によって、開裂した脂肪酸と補酵素とが組み合わさって、アシル - C o A 分子が得られる。このアシル - C o A は、脂肪酸アシル - C o A 還元酵素が酵素活性を発揮してアルデヒドを生じるための基質であり、脂肪酸アシル - C o A / アルデヒド還元酵素が酵素活性を発揮してアルコールを生じるための基質である。上述のように特定した、脂肪酸アシル - C o A 還元酵素の作用によって産生するアルデヒドは、さらに、脂肪族アルデヒド還元酵素が酵素活性を発揮してアルコールを生じるための基質であるか、又は、脂肪族アルデヒド脱炭酸酵素が酵素活性を発揮してアルカン又はアルケンを生じるための基質である。

【 0 1 5 4 】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法によって生成する脂肪酸、グリセロ脂質、又は対応する一級アルコール、アルデヒド、アルカン又はアルケンは、8 個、10 個、12 個、又は 14 個の炭素原子を含む。ディーゼル、バイオディーゼル、再生可能なディーゼル又はジェット燃料を生成するために好ましい脂肪酸、又は工業用途のための、対応する一級アルコール、アルデヒド、アルカン及びアルケンは、8 ~ 14 個の炭素原子を含む。ある特定の実施形態では、上述の脂肪酸、及び他の対応する炭化水素分子は、飽和であり (炭素 - 炭素二重結合又は三重結合を含まない) ; 一価飽和であり (二重結合が 1 個) ; 多価不飽和であり (2 種以上の二重結合) ; 直鎖であるか (環状ではない) 、又は分枝鎖である。燃料生成の場合、飽和度が高い方が好ましい。

【 0 1 5 5 】

すぐ上に記載されている酵素は、特定の数の炭素原子を含む基質の加水分解に対し、優先的な特異性を有する。例えば、脂肪族アシル - A C P チオエステラーゼは、炭素原子を 12 個含む脂肪酸を A C P から優先的に開裂させ得る。いくつかの実施形態では、A C P 及び長さ特異的なチオエステラーゼは、組み合わせると特に有用なような、お互いに対する親和性を有する場合がある (例えば、外因性の A C P 及びチオエステラーゼ遺伝子は、これらが誘導される特定の組織又は有機体で自然に共発現する場合がある) 。従って、種々の実施形態では、本発明の一実施形態の組み換え体細胞は、酵素活性 (例えば、A C P からの脂肪酸開裂、アシル - C o A をアルデヒド又はアルコールに還元すること、又は、アルデヒドからアルカンへの変換、または K A S 、 S A D または F A D 遺伝子の遺伝子産物) を、基質に含まれる炭素原子の数および飽和パターンによって特異的に触媒するようなタンパク質をコードする外因性遺伝子を含んでいてもよい。外因性チオエステラーゼを発現するための種々のベクターおよび方法に関しては、米国特許出願公開第 2 0 1 0 0 1 5 1 1 1 2 号参照。したがって、本発明の一実施形態では、遺伝的に修飾された細胞が、キシロースを代謝し、そして変更脂肪酸プロフィールを生成する (すなわち、細胞により産生される脂肪酸における鎖長および / または飽和パターンの分布) 。

【 0 1 5 6 】

したがって、本発明は、同じ種の野生型細胞と比較して、変更されたレベルでキシロース利用酵素および 1 つ以上の脂質経路酵素を発現するよう遺伝子操作された細胞 (具体的実施形態では、プロトテカ細胞) を提供する。ある場合では、遺伝子操作された細胞は、野生型細胞と同じ条件で成長させた場合に、野生型細胞と比べて脂質を多く産生する。ある場合では、上述の細胞は、野生型細胞よりも高いレベルで脂質経路に関連する酵素を発現するように遺伝子操作されているか、及び / 又は、野生型細胞よりも高いレベルで脂質経路に関連する酵素を発現するように選択される。ある場合では、脂質経路に関連する酵素は、ピルビン酸脱水素酵素、アセチル - C o A カルボキシラーゼ、アシルキャリアータンパク質、グリセロール - 3 ホスフェートアシルトランスフェラーゼからなる群から選択される。ある場合では、上述の細胞は、野生型細胞よりも低いレベルで脂質経路に関連

10

20

30

40

50

する酵素を発現するように遺伝子遺伝子操作されているか、及び／又は、野生型細胞よりも低いレベルで脂質経路に関連する酵素を発現するように選択される。細胞が、脂質経路に関連する酵素を低いレベルで発現する少なくとも１つの実施形態では、脂質経路に関連する酵素は、クエン酸シンターゼを含む。

【 0 1 5 7 】

いくつかの実施形態では、上述の細胞は、野生型細胞と比べ、異なるレベルで脂肪酸合成の包括的な制御因子を発現するように遺伝子操作されているか、及び／又は、異なるレベルで脂肪酸合成の包括的な制御因子を発現するように選択され、それにより、複数の脂肪酸合成遺伝子の発現レベルは、野生型細胞と比べて変化している。ある場合では、脂質経路に関連する酵素は、脂肪酸を修飾する酵素を含む。ある場合では、脂質経路に関連する酵素は、ステアロイル - A C P デサチュラーゼ、グリセロ脂質デサチュラーゼから選択される。

10

【 0 1 5 8 】

他の実施形態では、本発明は、１つ以上の外因性遺伝子を含有する油産生細菌に関し、ここで、外因性遺伝子は、キシロース利用酵素から選択されるタンパク質、ならびに脂肪酸アシル - A C P チオエステラーゼ、脂肪酸アシル - C o A 還元酵素、脂肪酸アルデヒド還元酵素、脂肪酸アシル - C o A / アルデヒド還元酵素、脂肪酸アルデヒド脱炭酸酵素、アシルキャリアー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。一実施形態では、外因性遺伝子は、プロモーターに作用可能に連結した状態であり、すなわち、刺激に応答して、誘発的であるか、又は抑制的である。いくつかの場合では、刺激は、外から与えられる低分子、熱さ、冷たさ、培地中の窒素が制限されていること、又は窒素がないことからなる群から選択される。いくつかの場合では、外因性遺伝子は、細胞内のある区画で発現する。いくつかの実施形態では、細胞内の区画は、葉緑体、色素体、ミトコンドリアからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、細菌は、プロトテカ・モリフォルミス、プロトテカ・クルガニ、プロトテカ・スタグノラまたはプロトテカ・ゾフィーである。脂質経路修飾のための種々の外因性遺伝子および遺伝子の組合せは、米国特許出願公開第 2 0 1 0 0 1 5 1 1 1 2 号に記載されている。

20

【 0 1 5 9 】

本発明の一実施形態は、アルコール産生方法であって、培地中で組換えプロトテカ細胞の集団を培養することを包含する方法も提供し、細胞は、キシロース利用酵素をコードする第一の外因性遺伝子；脂肪酸アシル - A C P チオエステラーゼをコードする第二の外因性遺伝子；および脂肪酸アシル C o A / アルデヒド還元酵素をコードする第三の外因性遺伝子を含有し、細胞は、アシルキャリアータンパク質 (A C P) に結合した脂肪酸を合成し、脂肪酸アシル - A C P チオエステラーゼは、A C P から脂肪酸が開裂するのを触媒して、さらなる処理によって脂肪酸アシル - C o A を得て、脂肪酸アシル - C o A / アルデヒド還元酵素は、アシル - C o A からアルコールへの還元を触媒する。

30

【 0 1 6 0 】

本発明の一実施形態は、プロトテカ細胞内でアルデヒドを生成する方法も提供する。一実施形態では、この方法は、培地中でプロトテカ細胞の集団を培養することを含み、この細胞は、キシロース利用酵素をコードする第一外因性遺伝子；脂肪酸アシル - A C P チオエステラーゼをコードする第二の外因性遺伝子；および脂肪酸アシル - C o A / アルデヒド還元酵素をコードする第三の外因性遺伝子を含有し、そして細菌は、アシルキャリアータンパク質 (A C P) に結合した脂肪酸を合成し、脂肪酸アシル - A C P チオエステラーゼは、A C P から脂肪酸が開裂するのを触媒し、さらなる処理によって脂肪酸アシル - C o A が得られ、脂肪酸アシル - C o A 還元酵素は、アシル - C o A からアルデヒドへの還元を触媒する。

40

【 0 1 6 1 】

本発明の一実施形態は、外因性キシロース利用遺伝子を含有するプロトテカ細胞内で、特定の炭素鎖長を有する脂肪酸分子を生成する方法も提供する。一実施形態では、この方法は、培地中でプロトテカ細胞の集合を培養することを含み、ここで、この細胞は、外因

50

性キシロース利用遺伝子および脂肪族アシル - A C P チオエステラーゼをコードする外因性遺伝子を含み、特定の炭素鎖長、例えば、炭素原子が 8 個、10 個、12 個、又は 14 個の炭素鎖長に対して特異的であるか、これらの鎖長を好む活性を有しており、細菌は、アシルキャリアータンパク質 (A C P) に結合した脂肪酸を合成し、チオエステラーゼは、脂肪酸が特定の炭素鎖長を有するように合成された場合には、A C P から、その脂肪酸を開裂することを触媒する。

【0162】

上述の種々の実施形態では、細胞は、脂質経路に関連する酵素をコードする少なくとも 1 つの外因性遺伝子を含むことができる。ある場合では、脂質経路に関連する酵素は、ステアロイル - A C P デサチュラーゼ、グリセロ脂質デサチュラーゼ、ビルビン酸脱水素酵素、アセチル - C o A カルボキシラーゼ、アシルキャリアータンパク質、グリセロール - 3 ホスフェートアシルトランスフェラーゼからなる群から選択される。他の場合では、細胞は、脂肪族アシル - A C P チオエステラーゼ、脂肪酸アシル - C o A / アルデヒド還元酵素、脂肪酸アシル - C o A 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、及び / 又はアシルキャリアータンパク質からなる群から選択される脂質修飾酵素を含有する。

V I I . 燃料および化学物質または他の製品の生成

【0163】

本発明の実施形態に従って燃料を生成するために、本発明の細胞が産生する細胞を収穫するか、又は任意の便利な方法により、それ以外の方法で集める。全細胞の抽出によって脂質を単離することができる。まず、細胞を破壊し、次いで、例えば、上述のような遠心分離を用いることによって、細胞内の脂質及び細胞膜 / 細胞壁に関連する脂質、及び細胞外の炭化水素を細胞塊から分けることができる。微生物中で生成する細胞内脂質を、いくつかの実施形態では、微生物の細胞を溶解させた後に抽出する。抽出したら、脂質をさらに精製し、油、燃料又は油脂化学製品を作り出す。

【0164】

培養が終了したら、微生物を発酵ブロスから分離することができる。場合により、分離は、遠心分離によって行い、濃縮ペーストを作成する。次いで、バイオマスの場合により、洗浄溶液 (例えば、脱イオン水) を用いて洗浄し、発酵ブロス及び発酵片を取り除く。場合により、洗浄した微生物バイオマスを乾燥させ (乾燥機で乾燥させる、凍結乾燥させる、など)、その後に細胞を破壊してもよい。又は、発酵が完全に終わっている場合には、細胞を発酵ブロスの一部又は全部と分離することなく溶解させてもよい。例えば、細胞を溶解させたときに、細胞と細胞外の液体との v : v 比が 1 : 1 未満であってもよい。

【0165】

脂質を含有する微生物を溶解し、溶解物を作成してもよい。本明細書で詳細に記載するように、微生物を溶解するステップ (細胞溶解とも呼ばれる) は、熱による溶解、塩基を加えること、酸を加えること、プロテアーゼのような酵素および多糖分解酵素を用いること、超音波を用いること、機械的な溶解、浸透圧衝撃を用いること、溶解性ウイルスに感染させること、及び / 又は 1 つ以上の溶解遺伝子の発現を含む、任意の簡便な手段によって行うことができる。溶解を行い、微生物によって産生された細胞内分子を放出させる。微生物を溶解させるための、これらのそれぞれの方法を単独の方法として用いてもよく、同時又は連続して、組み合わせとして用いてもよい。細胞の破壊度は、顕微鏡分析によって観察することができる。本明細書に記載した 1 つ以上の方法を用い、典型的には、70 % を超える細胞の破壊が観察される。好ましくは、細胞の破壊は、80 % を超えており、より好ましくは、90 % を超えており、最も好ましくは、約 100 % である。

【0166】

特定の実施形態では、成長した後に微生物を溶解させ、例えば、抽出又はさらなる処理のために、細胞内の脂質及び / 又は炭化水素がさらされる程度を増やす。リパーゼ発現 (例えば、誘発性プロモーターによる) 又は細胞溶解のタイミングは、脂質及び / 又は炭水化物の収量を最適化するように調節することができる。以下に、いくつかの溶解技術を記

載している。これらの技術を個々に用いてもよく、組み合わせて用いてもよい。

【0167】

本発明の一実施形態では、微生物を溶解するステップは、微生物を含有する細胞懸濁物を加熱することを含む。この実施形態では、微生物を含む発酵ブロス（又は、発酵ブロスから単離した微生物の懸濁物）を、微生物、すなわち、微生物の細胞壁及び細胞膜が分解するか、又は破壊するまで加熱する。典型的には、かけられる温度は、少なくとも50である。もっと効率よく細胞を溶解させるために、もっと高い温度、例えば、少なくとも60、少なくとも70、少なくとも80、少なくとも90、少なくとも100、少なくとも110、少なくとも120、少なくとも130、又はそれ以上の温度を使用する。熱処理によって細胞を溶解することは、微生物を沸騰させることによって行ってもよい。又は、熱処理（沸騰させない）をオートクレーブ中に行ってもよい。熱処理された溶解物を、さらなる処理のために冷却してもよい。また、細胞の破壊は、蒸気による処理によって、すなわち、加圧した蒸気を加えることによって行ってもよい。細胞を破壊するための微細藻類の蒸気処理は、例えば、米国特許第6,750,048号に記載されている。いくつかの実施形態では、蒸気処理は、蒸気を発酵槽に吹き込み、ブロスを所望の温度に約90分未満、好ましくは約60分未満、より好ましくは約30分未満維持することによって行ってもよい。

10

【0168】

本発明の別の実施形態では、微生物を溶解するステップは、微生物を含有する細胞懸濁物に塩基を加えることを含む。塩基は、少なくとも、使用した微生物の水系タンパク質化合物の一部分を加水分解するのに十分なほど強いことが必要である。タンパク質を溶解するのに有用な塩基は、化学分野で知られている。本発明の方法で有用な、例示的な塩基としては、限定されないが、リチウム、ナトリウム、カリウム、カルシウムの水酸化物、炭酸塩、炭酸水素塩、及びこれらの混合物が挙げられる。好ましい塩基はKOHである。細胞を破壊するための微細藻類の塩基処理は、例えば、米国特許第6,750,048号に記載されている。

20

【0169】

本発明の別の実施形態では、微生物を溶解するステップは、微生物を含有する細胞懸濁物に酸を加えることを含む。酸による溶解は、10~500mNの濃度、又は好ましくは、40~160mNの濃度の酸を用いて行うことができる。酸による溶解は、好ましくは、室温より高い温度（例えば、40~160、好ましくは、50~130の温度）で行われる。中程度の温度（例えば、室温~100、特に、室温~65）の場合、酸による処理は、有益には、音波処理又は他の細胞破壊方法と組み合わせてもよい。

30

【0170】

本発明の別の実施形態では、微生物を溶解するステップは、酵素を用いることによって微生物を溶解することを含む。微生物を溶解するのに好ましい酵素は、プロテアーゼ、及びヘミセルラーゼのような多糖分解酵素（例えば、*Aspergillus niger*に由来するヘミセルラーゼ；*Sigma Aldrich*、セントルイス、モンリオール；#H2125）、ペクチナーゼ（例えば、*Rhizopus* sp.に由来するペクチナーゼ；*Sigma Aldrich*、セントルイス、モンリオール；#P2401）、*Mannaway 4.0L (Novozymes)*、セルラーゼ（例えば、*Trichoderma viride*に由来するセルロース；*Sigma Aldrich*、セントルイス、モンリオール；#C9422）、ドリセラーゼ（例えば、*Basidiomycetes* sp.に由来するドリセラーゼ；*Sigma Aldrich*、セントルイス、モンリオール；#D9515）である。

40

【0171】

本発明の他の実施形態では、溶解は、例えば、多糖分解酵素のようなセルラーゼ、場合により、*Chlorella*又は*Chlorella*ウイルスに由来するもの、又は、プロテアーゼ、例えば、*Streptomyces griseus*プロテアーゼ、キモトリプシン、プロテイナーゼK、*Degradation of Polylactide*

50

by Commercial Proteases, Oda Yet al., Journal of Polymers and the Environment, 第8巻、Number 1、2000年1月、pp. 29 - 32 (4)、Alcalase 2.4 FG (Novozymes)、に列挙されているプロテアーゼ、Flavourzyme 100L (Novozymes) のような酵素によって行われる。先に示したプロテアーゼ及び多糖分解酵素の任意の組み合わせを含む、プロテアーゼと多糖分解酵素の任意の組み合わせを用いてもよい。

【0172】

溶解は、連続圧搾機を用いて行うことができる。このプロセスでは、バイオマスに、高圧状態で、スクリュウ型デバイスを用いて力を加え、細胞を溶解させ、細胞内脂質を放出させ、細胞内のタンパク質及び繊維（及び他の成分）と分離させる。PCT特許出願US 10/031108 参照（参照により本明細書中に組入れられる）。

10

【0173】

いくつかの場合には、微生物を溶解するステップは、超音波を用いて、すなわち、音波処理によって行われる。従って、高周波数の音を用いて細胞を溶解させることができる。音は、電子的に発生させ、適切に濃縮した細胞懸濁物に対し、金属片を介して伝搬させてもよい。この音波処理（又は超音波処理）は、細胞懸濁物中に空洞を作り出すことに基づいて、細胞の一体性を破壊する。

【0174】

いくつかの場合には、微生物を溶解するステップは、機械的な溶解によって行われる。細胞は、機械的に溶解されてもよく、場合により、炭化水素（例えば、脂質）を集めやすいように均質化してもよい。例えば、加圧による破壊を利用し、細胞を含有するスラリーを制水型オリフィス弁にポンプで圧送してもよい。高圧（1500 bar まで）をかけ、その後、出口ノズルを通して瞬間的に拡散させてもよい。細胞の破壊は、弁での衝撃、オリフィス内での大きな液体剪断力、放出による急な圧力低下といった3種類の異なる機構によって行われ、これにより、細胞が爆発する。この方法によって、細胞内の分子が放出される。又は、ボールミルを用いてもよい。ボールミルの場合、ビーズのような小さな研磨粒子を含む懸濁物中で細胞を撹拌する。細胞は、剪断力、ビーズ間で研磨されること、ビーズと衝突することによって破壊される。ビーズは、細胞を破壊して、細胞内容物を放出させる。また、細胞は、細胞を破壊するためのブレンダー（例えば、例として高速ブレンダー又はWaring ブレンダー）を用いるか、フレンチプレスを用いるか、又は細胞壁が弱い場合には、遠心分離を用い、剪断力によって破壊されてもよい。

20

30

【0175】

いくつかの場合には、微生物を溶解するステップは、浸透圧衝撃を与えることによって行われる。

【0176】

いくつかの場合には、微生物を溶解するステップは、微生物を溶解性ウイルスに感染させることを含む。本発明で用いるのに微生物を溶解するのに適したさまざまなウイルスが知られており、特定の微生物に特定の溶解性ウイルスを選択し、使用することは、当業者の知識の範囲内である。例えば、緑ゾウリムシ・クロレラウイルス（PBCV-1）は、特定の単細胞性の、真核性のクロレラに似た緑色の藻の中で複製し、溶解させる、大きな20面体のプラークを形成する二本鎖DNAウイルスのグループ（フィコドナウイルス科、クロロウイルス属）の原型である。従って、培養物を任意の適切なクロレラウイルスに感染させることによって、任意の感染しやすい微細藻類を溶解させることができる。クロレラ種を、クロレラウイルスを用いて感染させる方法は知られている。例えば、Adv. Virus Res. 2006; 66: 293 - 336; Virology, 1999年4月25日; 257 (1): 15 - 23; Virology, 2004年1月5日; 318 (1): 214 - 23; Nucleic Acids Symp. Ser. 2000; (44): 161 - 2; J. Virol. 2006年3月; 80 (5): 2437 - 44; Annu. Rev. Microbiol. 1999; 53: 447 - 94 を参照。

40

50

【0177】

いくつかの場合には、微生物を溶解するステップは、自己消化を含む。この実施形態では、本発明の微生物を、微生物を溶解する溶解性タンパク質を生成するように遺伝子遺伝子操作する。この溶解遺伝子を、誘発性プロモーターを用いて発現させ、まず、細胞は、発酵槽内で望ましい密度まで成長し、その後、プロモーターの誘発によって、細胞を溶解させる溶解遺伝子が発現する。一実施形態では、溶解遺伝子は、多糖分解酵素をコードしている。特定の他の実施形態では、溶解遺伝子は、溶解性ウイルスに由来する遺伝子である。従って、例えば、クロレラウイルスに由来する溶解遺伝子を、藻の細胞中で発現させてもよい。Virology 260、308-315(1999); FEMS Microbiology Letters 180(1999)45-53; Virology 263、376-387(1999); Virology 230、361-368(1997)を参照。溶解遺伝子の発現は、好ましくは、誘発性プロモーター、例えば、低分子、光、熱及び他の刺激の存在のような刺激によって誘発される、微細藻類内で活性なプロモーターを用いてなされる。

10

【0178】

上述の方法によって生成した細胞溶解物から脂質を分離するための種々の方法が利用可能である。例えば、脂質及び脂質誘導体、例えば、脂肪族アルデヒド、脂肪族アルコール、アルカンのような炭化水素を、疎水性溶媒、例えば、ヘキサンで抽出してもよい(Frenz et al., 1989、Enzyme Microb. Technol., 11: 717を参照)。また、脂質及び脂質誘導体を、液化によって抽出してもよく(例えば、Sawayama et al., 1999、Biomass and Bioenergy 17: 33-39、及びInoue et al., 1993、Biomass Bioenergy 6(4): 269-274を参照); 油の液化によって抽出してもよく(例えば、Minowa et al., 1995、Fuel 74(12): 1735-1738を参照); 超臨界CO₂抽出によって抽出してもよい(例えば、Mendes et al., 2003、Inorganica Chimica Acta 356: 328-334を参照)。Miao及びWuは、Chlorella protothecoidesの培養物から、微細藻類の脂質を回収するプロトコルを記載しており、このプロトコルでは、細胞を遠心分離処理によって集め、蒸留水で洗浄し、凍結乾燥によって乾燥させた。得られた細胞粉末を乳鉢で細かく粉碎し、次いで、n-ヘキサンで抽出した。Miao及びWu、Biosource Technology(2006)97: 841-846。

20

30

【0179】

従って、本発明の微生物によって生成した脂質、脂質誘導体、炭化水素を、有機溶媒を用いた抽出によって回収することができる。ある場合では、好ましい有機溶媒は、ヘキサンである。典型的には、事前に溶解物成分を分離させることなく、溶解物に有機溶媒を直接加える。一実施形態では、上述の1つ以上の方法によって生成した溶解物を、脂質及び/又は炭化水素成分が有機溶媒と溶液を形成するのに十分な時間、有機溶媒と接触させる。ある場合では、溶液をその後さらに精製し、特定の望ましい脂質成分又は炭化水素成分を回収する。ヘキサンによる抽出方法は、当該技術分野でよく知られている。

40

【0180】

本明細書に記載されるように、細胞によって産生される脂質及び脂質誘導体、例えば、脂肪族アルデヒド、脂肪族アルコール、アルカンのような炭化水素を、上述のように、リパーゼのような1つ以上の酵素を用いて改変してもよい。炭化水素が、細胞の外の環境に存在する場合、1つ以上の酵素を、この酵素が炭化水素を改変するか、又は炭化水素前駆体からの合成を完結させるような条件下で、この環境に加えてもよい。又は、炭化水素を、細胞材料から部分的又は完全に単離してから、酵素のような1つ以上の触媒を加えてもよい。そのような触媒は、外から加えられ、触媒の活性は、細胞の外で生じるか、又はin vitroで生じる。

【0181】

50

従って、*in vivo*で細胞によって産生されるか、又は、*in vitro*で酵素によって改変される脂質及び炭化水素は、本明細書に記載されるように、従来の手段によってさらに処理されてもよい。処理は、「クラッキング」して、炭化水素分子を小さくし、水素：炭素比を大きくすることを含んでいてもよい。触媒によるクラッキング方法及び熱によるクラッキング方法は、炭化水素及びトリグリセリド油脂の処理において通常用いられる。触媒による方法は、固体酸触媒のような触媒の使用を含む。例えば触媒は、シリカ-アルミナ又はゼオライトであってもよく、この触媒により、炭素-炭素結合が不均衡又は非対称に破壊され、カルボカチオンとヒドリドアニオンが生じる。これらの反応性中間体は、次いで、転移するか、又は別の炭化水素にヒドリドが移動する。このように、この反応によって、中間体が再生し、自己連鎖的な機構を生じ得る。また、炭化水素を処理し、炭化水素中の炭素-炭素二重結合又は三重結合を減らしてもよく、場合によりゼロにしてもよい。また、炭化水素を処理し、炭化水素中の環又は環状構造を除去するか、又は取り除いてもよい。また、水素：炭素比が大きくなるように、炭化水素を処理してもよい。この処理は、水素添加（「水素化」）及び/又は炭化水素を小さな炭化水素にする「クラッキング」を含んでいてもよい。

10

20

30

40

50

【0182】

熱による方法は、炭化水素を小さくするために、高温及び高圧の使用を含む。約800の高温及び約700 kPaの高圧を用いてもよい。これらの条件によって「軽質」のものが発生し、軽質との用語は、水素を多く含む炭化水素分子を指すために用いられ（光量子束によって区別する場合）、また、縮合により、水素が相対的に失われた、重い炭化水素分子によっても生成する。この方法によって、均衡、又は対称的に破壊され、アルケンを生じ、このアルケンは、場合により、上述のように酵素によって飽和になってもよい。

【0183】

触媒による方法及び熱による方法は、植物において、炭化水素の処理及び油の精製を行うのに標準的な方法である。従って、本明細書に記載されるような細胞が産生した炭化水素を集め、従来の手段によって処理するか、又は精製することができる。微細藻類が産生した炭化水素のハイドロクラッキングに関する論文は、Hillen et al. (Biotechnology and Bioengineering, Vol. XXIV: 193-205 (1982))を参照。代替的な実施形態では、画分を、有機化合物、熱及び/又は無機化合物のような別の触媒で処理する。バイオディーゼル内の脂質を処理する場合、本明細書の第V章に記載されているようにトランスエステル化プロセスを使用し得る。

【0184】

本発明の方法によって生成する炭化水素は、さまざまな工業用途で有用である。例えば、ほぼあらゆる種類の洗浄剤及び洗浄調製物で用いられるイオン系界面活性剤である直鎖アルキルベンゼンスルホネート(LAS)の生成は、一般的に、炭素原子が10~14の鎖を含む炭化水素を利用する。例えば、米国特許第6,946,430号；第5,506,201号；第6,692,730号；第6,268,517号；第6,020,509号；第6,140,302号；第5,080,848号；第5,567,359号を参照。例えば、米国特許第5,942,479号；第6,086,903号；第5,833,999号；第6,468,955号；第6,407,044号に記載されるように、界面活性剤、例えば、LASを、パーソナルケア組成物及び洗浄剤で用いてもよい。

【0185】

再生可能な生物由来の出発物質を、化石燃料から誘導される出発物質と置き換えて利用可能であり、その使用が望ましいために、バイオディーゼル、再生可能なディーゼル、ジェット燃料といった燃料に、生物由来の炭化水素成分を用いることに関心が高まっている。生物由来の材料から炭化水素成分を生成する方法が緊急に必要とされている。本発明は、本明細書に記載の方法によって生成した脂質を生物由来の原料として用い、バイオディーゼル、再生可能なディーゼル、ジェット燃料を生成するような、バイオディーゼル、再生可能なディーゼル、ジェット燃料を生成する方法を提供することによって、この要求を

満たす。

【0186】

従来のディーゼル燃料は、パラフィン系炭化水素を豊富に含む石油留分である。これらの沸点範囲は、 $370^{\circ}\text{F} \sim 780^{\circ}\text{F}$ (約 $188^{\circ}\text{C} \sim 416^{\circ}\text{C}$)と広範囲であり、ディーゼルエンジン車のような圧縮点火エンジンでの燃焼に適している。American Society of Testing and Materials (ASTM)は、例えば、セタン価、曇り点、引火点、粘度、アニリン点、硫黄含有量、含水量、灰分、銅板腐食、炭素残渣のような他の燃料特性の許容範囲とともに、沸点範囲に従って、ディーゼルのグレードを確立している。技術的には、バイオマス、又は適切なASTM仕様を満たすそれ以外のものから誘導される任意の炭化水素留分を、ディーゼル燃料 (ASTM D975)、ジェット燃料 (ASTM D1655)、又は脂肪酸メチルエステルである場合にはバイオディーゼル (ASTM D6751)と定義できる。

10

【0187】

抽出の後、本明細書に記載されているような微生物バイオマスから回収した脂質成分及び/又は炭化水素成分を、化学処理し、ディーゼル車及びジェットエンジン用の燃料を製造することができる。

【0188】

バイオディーゼルは、生成物の原材料に依存して、金色から濃い褐色までの色をした液体である。実質的に水には混和せず、高い沸点を有し、蒸気圧が低い。バイオディーゼルは、ディーゼルエンジン車で使用するために、ディーゼルと等価な処理した燃料を指す。バイオディーゼルは、生分解性であり、毒性がない。従来のディーゼル燃料に比べて、バイオディーゼルのさらなる利点は、エンジンの摩耗が少ないことである。典型的には、バイオディーゼルは、 $\text{C}14 \sim \text{C}18$ のアルキルエステルを含む。種々のプロセスによって、バイオマス又は脂質が生成し、本明細書に記載されるように、単離してディーゼル燃料にする。バイオディーゼルの生成する好ましい方法は、本明細書に記載されるような脂質のトランスエステル化である。バイオディーゼルで用いるのに好ましいアルキルエステルは、メチルエステル又はエチルエステルである。

20

【0189】

本明細書に記載の方法によって生成するバイオディーゼルは、単独で用いてもよく、ほとんどのディーゼルエンジン車における任意の濃度で、従来のディーゼル燃料とブレンドしてもよい。従来のディーゼル燃料 (石油ディーゼル) とブレンドする場合、バイオディーゼルは、約 $0.1\% \sim 99.9\%$ 存在してもよい。世界のほとんどで、燃料混合物中のバイオディーゼルの量を述べるために、「B」ファクターとして知られるシステムを用いる。例えば、 20% のバイオディーゼルを含む燃料は、B20というラベルが付けられる。純粋なバイオディーゼルは、B100と呼ばれる。

30

【0190】

また、バイオディーゼルの、家庭用ボイラ及び商業用ボイラの加熱燃料として用いてもよい。既存の灯油式ボイラは、ゴム部材を備える可能性があり、バイオディーゼルで動かすために改造する必要がある。改造プロセスは、通常は、比較的単純なものであり、バイオディーゼルが強い溶媒であるため、ゴム部材を合成部材と交換することを含む。バイオディーゼルの溶媒力が強いと、バイオディーゼルの燃やすと、ボイラの効率上がるだろう。バイオディーゼルの、純粋な超低硫黄ディーゼル (ULSD) 燃料の潤滑性を向上させるために、ディーゼル配合物の添加剤として用いてもよく、バイオディーゼルは硫黄を含有しないため、有益である。バイオディーゼルは、石油系ディーゼルよりも良好な溶媒であり、石油系ディーゼルで走っていた車両の燃料ラインに残る残留分の沈殿を分解するために用いてもよい。

40

【0191】

バイオディーゼルは、油を豊富に含むバイオマスに含まれるトリグリセリドのトランスエステル化によって生成することができる。従って、本発明の別の態様では、バイオディーゼルの生成する方法が提供されている。好ましい実施形態では、バイオディーゼルの生

50

成する方法は、(a) 本明細書に開示されている方法を用い、脂質を含有する微生物を育てるステップと、(b) 脂質を含有する微生物を溶解させ、溶解物を生成するステップと、(c) 溶解した微生物から脂質を単離するステップと、(d) 脂質組成物をトランスエステル化するステップとを含み、これによってバイオディーゼルが生成する。微生物を成長させ、微生物を溶解させ、溶解物を生成し、有機溶媒を含む培地中、溶解物を処理し、不均一な混合物を生成し、処理した溶解物を脂質組成物に分離する方法は、上に記載されており、バイオディーゼルの生成する方法でも用いることができる。

【0192】

バイオディーゼルの脂質プロフィールは、通常は、原材料である油の脂質プロフィールと非常によく似ている。本発明の方法及び組成物によって与えられる他の油をトランスエステル化し、(a) C8 ~ C14 が少なくとも4%であり；(b) C8 が少なくとも0.3%であり；(c) C10 が少なくとも2%であり；(d) C12 が少なくとも2%であり；(3) C8 ~ C14 が少なくとも30%である脂質プロフィールを有するバイオディーゼルの得ることができる。

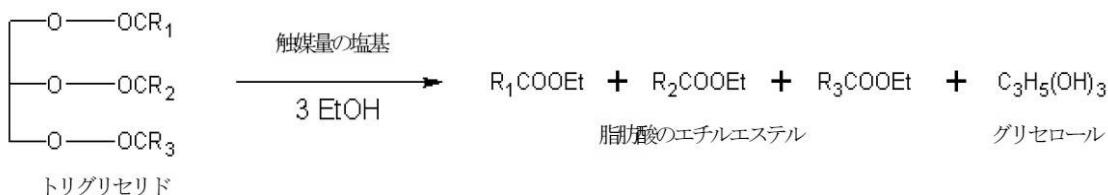
【0193】

脂質組成物をトランスエステル化し、バイオディーゼルとして有用な長鎖脂肪酸エステルを得ることができる。好ましいトランスエステル化反応について、以下に概略を説明しており、塩基触媒によるトランスエステル化と、組み換えリパーゼを用いたトランスエステル化を含む。塩基触媒によるトランスエステル化プロセスでは、トリアシルグリセリドを、アルカリ触媒、典型的には、水酸化カリウム存在下、メタノール又はエタノールのようなアルコールと反応させる。この反応から、メチルエステル又はエチルエステルと、副生成物としてグリセリン(グリセロール)とが生成する。

【0194】

動物性油及び植物性油は、典型的には、遊離脂肪酸と三価アルコールであるグリセロールとのエステルであるトリグリセリドから作られる。トランスエステル化において、トリアシルグリセリド(TAG)中のグリセロールを、メタノール又はエタノールのような短鎖アルコールと交換する。典型的な反応スキームは、以下のとおりである。

【化1】



この反応では、アルコールを塩基で脱プロトン化し、もっと強い求核試薬にする。一般的に、エタノール又はメタノールを大過剰に用いる(最大50倍まで)。通常は、この反応は、非常にゆっくりと進むか、まったく進まないであろう。反応をもっとすばやく進めるために、熱とともに、酸又は塩基を用いてもよい。トランスエステル化反応によって酸又は塩基は消費されず、従って、これらは反応剤ではなく、触媒である。ほとんど全てのバイオディーゼルは、低い温度及び低い圧力のみを必要とし、変換収率が98%を超えるため、塩基触媒による技術を用いて生成されている(但し、出発原料の油は、水分量が低く、遊離脂肪酸の量が少ないことを条件とする)。

【0195】

また、トランスエステル化は、塩基の代わりに、リパーゼのような酵素を用いて上述のように行われている。リパーゼによって触媒されるトランスエステル化は、例えば、TAGと低級アルコールとのモル比が、1:1より大きく、好ましくは約3:1の比率で、室温~80の温度で行われ得る。トランスエステル化で用いるのに適したリパーゼとしては、限定されないが、表7に列挙されるものが挙げられる。トランスエステル化に有用なリパーゼの他の例は、例えば、米国特許第4,798,793号；第4,940,845号、第5,156,963号；第5,342,768号；第5,776,741号、WO

89/01032号に見いだされる。そのようなリパーゼとしては、クモノスカビ、アスペルギルス、カンジダ、ケカビ、シュドモナス、リゾムコール、カンジダおよびフミコラ属の微生物によって産生されるリパーゼ、ならびに膵臓リパーゼが挙げられるが、これらに限定されない。トランスエステル化に用いるのに適したリパーゼは、米国特許出願公開第20100151112号の表7に記載されている。

【0196】

バイオディーゼルに適した脂肪酸エステルを生成するために、リパーゼを用いることの課題の1つは、リパーゼの価格が、強塩基プロセスで用いる水酸化ナトリウム(NaOH)の価格よりもかなり高いことである。この課題は、リサイクル可能な固定化されたりリパーゼを用いることによって対処されている。しかし、固定化されたりリパーゼの活性は、生成費用の観点で、リパーゼによるプロセスが、強塩基プロセスと匹敵するようになるような最低限のサイクル数リサイクルした後にも維持されていなければならない。固定化されたりリパーゼは、典型的にトランスエステル化で用いられる低級アルコールによって毒化されやすい。米国特許第6,398,707号(Wu et al. に対し、2002年6月4日発行)は、固定化されたりリパーゼを高める方法、及び活性が低下した、固定化されたりリパーゼを再生する方法を記載している。いくつかの適切な方法は、固定化されたりリパーゼを、炭素原子数が3個未満のアルコールに所定時間、好ましくは、0.5~48時間、より好ましくは、0.5~1.5時間浸すことを含む。また、いくつかの適切な方法は、不活性化した、固定化されたりリパーゼを、炭素原子が3個を超えないアルコールで洗浄し、次いで、この不活性化した、固定化されたりリパーゼを、植物油に0.5~48時間浸すことを含む。

10

20

【0197】

特定の実施形態では、組み換えリパーゼを、リパーゼが作用して脂質を産生するのと同じ微生物中で発現する。適切な組み換えリパーゼとしては、上に列挙されているもの、及び/又は米国特許出願公開第20100151112号の表7に列挙されているGenbank寄託番号を有するもの、又は、その表7に列挙されているリパーゼの1つとのアミノ酸同一性が少なくとも70%であり、リパーゼ活性を示すポリペプチドが挙げられる。さらなる実施形態では、酵素活性は、上に記載した配列の1つとの同一性が少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、又は少なくとも約99%の配列に存在し、これらは全て、完全に記載されているかのように参照により組み込まれる。リパーゼ及び選択可能なマーカーをコードするDNAは、好ましくは、コドンが最適化されたcDNAである。微細藻類において発現させるための遺伝子を書き換える方法は、本明細書中に、ならびに米国特許第7,135,290号に記載されている。

30

【0198】

バイオディーゼルに関する一般的な国際標準は、EN 14214である。ASTM D6751は、米国及びカナダで参照されている最も一般的なバイオディーゼル標準である。ドイツは、DIN EN 14214を使用しており、英国は、BS EN 14214の順守が必要である。上述の製品がこれらの標準を満たしているか否かを決定するための基本的な工業用試験としては、典型的には、ガスクロマトグラフィー、HPLCなどが挙げられる。上述の品質表を満すバイオディーゼルは、非常に毒性が低く、毒性の評価(LD₅₀)は、50mL/kgより大きい。

40

【0199】

ASTM標準を満たすバイオディーゼルは、毒性が低くならないが、堆積物として溶液から結晶化し、及び/又は沈殿し、沈む傾向のある混入物質が存在している場合がある。堆積物の生成は、バイオディーゼルが低い温度で 사용되는場合、特に問題である。堆積物又は沈殿は、燃料の流れを減らし、燃料ラインを詰まらせ、フィルターを詰まらせるなどの問題を引き起こす場合がある。もっと品質の高い製品を製造するために、バイオディーゼル中の上述の混入物質及び堆積物を除去することに特に対処するプロセスが、当該技術分野でよく知られている。そのようなプロセスの例としては、限定されないが

50

、リン脂質及び遊離脂肪酸のような混入物質を除去するための、油の前処理（例えば、ガム状物質の除去、苛性ソーダによる精製、シリカ吸着剤による濾過）及び冷却状態での濾過が挙げられる。冷却状態での濾過は、生成した後のバイオディーゼル中に存在する任意の粒状物及び堆積物を除去するために特に開発されたプロセスである。このプロセスは、バイオディーゼルの冷却し、低い温度で燃料を用いる場合に生成するかもしれない任意の堆積物又は沈殿を濾別する。そのようなプロセスは、当該技術分野でよく知られており、米国特許公開第2007-0175091号に記載されている。適切な方法は、バイオディーゼルの約38より低い温度まで冷却し、不純物及び混入物質をバイオディーゼル液体中、粒状物として析出させる。次いで、この冷却したバイオディーゼル材料に、珪藻土又は他の濾過材料を加えてスラリーを作成し、次いで、これを葉状圧力フィルター又は他の種類のフィルターで濾過し、粒状物を除去する。次いで、濾過したバイオディーゼルの最終的なバイオディーゼル製品が得られるように、研磨フィルターに通し、残った任意の堆積物及び珪藻土を除去する。

10

20

30

40

50

【0200】

米国特許出願公開第20100151112号の実施例14は、プロトテカ *moriformis* に由来するトリグリセリド油脂を用いた、バイオディーゼルの生成について記載している。その実施例14で生成したバイオディーゼルのASTM D6751 A1法による、Cold Soak Filterabilityは、容積300mlで120秒であった。この試験は、B100 300mlを濾過し、これを、40°F（約4.5°C）で16時間冷却し、室温まで加温し、減圧下、ステンレス鋼の支持材を取り付けた0.7マイクロメートルガラス繊維を用いて濾過する。本発明の油を、トランスエステル化し、冷状態浸漬時間が、120秒未満、100秒未満、90秒未満のバイオディーゼルを得ることができる。

【0201】

バイオディーゼルが、特定の冷温で使用される場合、次のプロセスを用いてもよい。そのようなプロセスは、脱ろう及び画分化を含む。両プロセスは、曇り点（バイオディーゼルが結晶化し始める温度）を下げることによって、冷状態での流動性を高め、冬の燃料の性能を高める。バイオディーゼルの脱ろうするために、いくつかのアプローチが存在する。アプローチのひとつは、バイオディーゼルと、石油ディーゼルとをブレンドすることである。別のアプローチは、バイオディーゼルの曇り点を下げることが可能な添加剤を使用することである。別のアプローチは、添加剤中で混合し、飽和物質を結晶化させ、次いで結晶を濾別することによって、飽和メチルエステルを無差別に除去することである。画分化は、メチルエステルを個々の成分又は画分に選択的に分離し、これにより、特定のメチルエステルを除去するか、又は含むようにすることができる。画分化方法は、尿素による画分化、溶媒による画分化、熱による蒸留が挙げられる。

【0202】

本発明の方法によって提供される別の価値の高い燃料は、再生可能なディーゼルであり、C10:0、C12:0、C14:0、C16:0及びC18:0のようなアルカンを含み、従って、バイオディーゼルとは区別することができる。高品質の再生可能なディーゼルは、ASTM D975の標準に適合している。本発明の方法によって生成する脂質は、再生可能なディーゼルの製造する原材料として役立たせることができる。従って、本発明の別の態様では、再生可能なディーゼルの製造する方法が提供される。再生可能なディーゼルは、熱水で処理すること（熱水処理）；水素化処理；間接的な液化といった、少なくとも3種類のプロセスで製造することができる。これらのプロセスによって、エステルではない留分が得られる。これらのプロセスの間、本明細書に記載されるように生成し、単離されたトリアシルグリセリドを、アルカンへと変換する。

【0203】

一実施形態では、再生可能なディーゼルの生成する方法は、（a）脂質を含有する微生物を本明細書に開示されている方法を用いて育てることと、（b）微生物を溶解させ、溶解物を生成するステップと、（c）溶解した微生物から脂質を単離するステップと、（d

）脂質を脱酸素し、熱水処理してアルカンを生成することを含み、これによって再生可能なディーゼルが得られる。再生可能なディーゼルを製造するのに適した脂質は、ヘキサンのような有機溶媒を用い、微生物バイオマスから抽出することによって、又は米国特許第5,928,696号に記載されるような他の方法によって得ることができる。いくつかの適切な方法は、機械的に加圧し、遠心分離処理することを含んでいてもよい。PCT特許出願US10/031108（参照により本明細書中に組入れられる）参照。

【0204】

いくつかの方法では、まず、微生物脂質を、熱処理と組み合わせてクラッキングし、それぞれ、炭素鎖長を短くし、二重結合を飽和させる。次いで、この物質を異性化し、これも熱水処理と組み合わせる。次いで、ナフサ画分を蒸留によって除去し、次いで、さらに蒸留し、ASTM D975の標準を満たすように、ディーゼル燃料中の望ましい成分を蒸気にし、蒸留しつつ、D975の標準を満たすのに望ましいものよりも重い成分は残す。トリグリセリド油脂を含む油を化学的に改変する熱水処理方法、ハイドロクラッキング方法、脱酸素方法、異性化方法は、当該技術分野でよく知られている。例えば、European patent applications EP1741768(A1); EP1741767(A1); EP1682466(A1); EP1640437(A1); EP1681337(A1); EP1795576(A1); 米国特許第7,238,277号; 第6,630,066号; 第6,596,155号; 第6,977,322号; 第7,041,866号; 第6,217,746号; 第5,885,440号; 第6,881,873号を参照。

10

20

【0205】

再生可能なディーゼルを生成する方法の一実施形態では、脂質を処理してアルカンを得ることは、脂質組成物の熱水処理によって行われる。熱水処理において、典型的には、バイオマスを、高温高压下、水中で反応させて、油と残留する固体を生成させる。変換温度は、典型的には、300°F～660°F（約149°C～約349°C）であり、圧力は、水が主に液体のままであるのに十分な圧力であり、100～170標準大気圧(atm)である。反応時間は、15～30分程度である。反応が終了した後、有機物を水から分離する。それにより、ディーゼルに適した留分が得られる。

【0206】

再生可能なディーゼルを製造するいくつかの方法では、トリグリセリドを処理する第1のステップは、二重結合を飽和させる水素化処理であり、次いで、水素及び触媒存在下、高温で脱酸素させる。いくつかの方法では、水素化及び脱酸素は、同じ反応中に起こる。他の方法では、水素化の前に脱酸素が起こる。次いで、場合により、これも水素及び触媒が存在する条件で、異性化を行う。ナフサ成分は、好ましくは、蒸留によって除去される。例えば、米国特許第5,475,160号(hydrogenation of triglycerides); 第5,091,116号(deoxygenation, hydrogenation and gas removal); 第6,391,815号(hydrogenation); 第5,888,947号(isomerization)を参照。

30

【0207】

トリグリセリドを水素化するのに適した方法のひとつは、銅、亜鉛、マグネシウム、ランタニウムの塩の水溶液と、アルカリ金属、又は好ましくは、炭酸アンモニウムの別の溶液とを調製することを含む。この2種類の溶液を、約20～約85の温度まで加熱し、触媒を生成させるために、沈殿容器のpHが5.5～7.5に維持されるように、沈殿容器に秤量しながら一緒に加える。沈殿容器にさらなる水を最初に入れておいてもよく、又は、塩溶液及び沈殿溶液と同時に入れてもよい。得られた沈殿を十分に洗浄し、乾燥させ、約300で焼結し、約100～約400の範囲の温度で、水素で活性化する。次いで、容器中、1つ以上のトリグリセリドを接触させ、上述の触媒存在下、水素と反応させてもよい。この反応槽は、トリクルベッド反応槽、固定床気体-固体反応槽、充填気泡反応槽、連続攪拌型タンク反応槽、スラリー相反応槽、又は当該技術分野で既知の任意

40

50

の他の適切な反応槽であってもよい。このプロセスは、バッチ式で行ってもよく、連続的な様式で行ってもよい。反応温度は、典型的には、約 170 ~ 約 250 の範囲であり、一方、反応圧力は、典型的には、約 300 psig ~ 約 2000 psig の範囲内にある。さらに、本発明のプロセスにおいて、水素とトリグリセリドとのモル比は、典型的には、約 20 : 1 ~ 約 700 : 1 の範囲にある。このプロセスは、典型的には、約 0.1 hr⁻¹ ~ 約 5 hr⁻¹ の範囲の重量空間速度 (WHSV) で行われる。当業者は、反応に必要な時間は、使用する温度、水素とトリグリセリドとのモル比、水素の分圧によってさまざまであることを認識するだろう。そのような水素化プロセスで生成する生成物は、脂肪族アルコール、グリセロール、微量のパラフィン及び未反応のトリグリセリドを含む。これらの生成物を、典型的には、例えば、蒸留、抽出、濾過、結晶化などの従来の手段によって分離する。

10

【0208】

石油精製業者は、水素化処理を利用し、原料を水素で処理することによって不純物を除去する。水素化処理による変換温度は、典型的には、300 °F ~ 700 °F (約 149 °C ~ 約 371 °C) である。圧力は、典型的には、40 ~ 100 atm である。反応時間は、典型的には、10 ~ 60 分程度である。固体触媒を利用し、特定の反応速度を上げ、特定の生成物の選択性を上げ、水素の消費量を最適化する。

【0209】

油を脱酸素するのに適した方法は、油を約 350 °F ~ 約 550 °F (約 177 °C ~ 約 288 °C) の範囲の温度まで加熱することと、少なくとも大気圧よりも高い圧力で、少なくとも 5 分間、加熱した油を窒素と連続的に接触させることとを含む。

20

【0210】

異性化に適した方法は、アルカリ異性化、及び当該技術分野で既知の他の油異性化を含む。

【0211】

熱水処理及び水素化処理によって、最終的に、トリグリセリド供給物の分子量が低下する。トリグリセリド分子は、水素化処理条件で、プロパン分子と、3 種類のこれより重い炭化水素分子、典型的には、C8 ~ C18 の範囲の炭化水素分子の 4 種類の炭化水素へと還元される。

【0212】

従って、一実施形態では、本発明の脂質組成物で行われる 1 つ以上の化学反応の生成物は、ASTM D975 の再生可能なディーゼルを有するアルカン混合物である。微生物による炭化水素の産生は、Metzger et al., Appl Microbiol Biotechnol (2005) 66 : 486 - 496 及び A Look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program: Biodiesel from Algae, NREL/TP-580-24190, John Sheehan, Terri Dunahay, John Benemann and Paul Roessler (1998) にまとめられている。

30

【0213】

ディーゼル燃料の蒸留特性は、T10 - T90 (それぞれ、容積で 10 % 及び 90 % が留出した温度) の観点で記載される。再生可能なディーゼルは、米国特許出願公開第 20100151112 号の実施例 14 に記載されているように、プロトテカ・モリフォルミストリグリセリド油脂から生成することができる。その実施例 14 で作られた物質の T10 - T90 は、57.9 であった。本明細書に開示されている油の水素化処理、異性化、他の共有結合の改変、及び、本明細書に開示されている蒸留及び画分化 (例えば、冷状態での濾過) を利用し、本明細書に開示されている方法に従って作られるトリグリセリド油脂を用い、他の T10 - T90 範囲、例えば、20、25、30、35、40、45、50、60、65 の再生可能なディーゼル組成物を生成することができる。

40

50

【0214】

米国特許出願公開第20100151112号の実施例14で作られる材料のT10は、242.1であった。本明細書に開示されている油の方法水素化処理、異性化、他の共有結合の改変、及び、本明細書に開示されている蒸留及び画分化（例えば、冷状態での濾過）を利用し、他のT10値、例えば、T10が180～295、190～270、210～250、225～245、少なくとも290の再生可能なディーゼル組成物を生成してもよい。

【0215】

米国特許出願公開第20100151112号の実施例14で作られる材料のT90は、300であった。本明細書に開示されている油の方法水素化処理、異性化、他の共有結合の改変、及び、本明細書に開示されている蒸留及び画分化（例えば、冷状態での濾過）を利用し、他のT90値、例えば、T90が280～380、290～360、300～350、310～340、少なくとも290の再生可能なディーゼル組成物を生成してもよい。

【0216】

米国特許出願公開第20100151112号の実施例14で作られる材料の最終沸点（FBP）は、300であった。本明細書に開示されている油の方法は、水素化処理、異性化、他の共有結合の改変、及び、本明細書に開示されている蒸留及び画分化（例えば、冷状態での濾過）を利用し、他のFBP値、例えば、FBPが290～400、300～385、310～370、315～360、少なくとも300の再生可能なディーゼル組成物を生成してもよい。

【0217】

本発明の方法及び組成物によって提供される他の油に、水素化処理、異性化、他の共有結合の改変を組み合わせてもよく、（a）C8～C14が少なくとも4%であり、；（b）C8が少なくとも0.3%；（c）C10が少なくとも2%；（d）C12が少なくとも2%；（3）C8～C14が少なくとも30%の脂質プロフィールを有する油を含む。

【0218】

従来の超低硫黄ディーゼルは、2ステッププロセスによって、バイオマスの任意の形態から製造してもよい。第1に、バイオマスを、水素及び一酸化炭素を豊富に含む気体状混合物である合成ガスに変換する。次いで、この合成ガスを、触媒によって液体に変換する。典型的には、液体の生成は、Fischer-Tropsch（FT）合成を用いて行われる。この技術は、石炭、天然ガス、重油に応用される。従って、再生可能なディーゼルを製造する方法のさらに別の好ましい実施形態では、脂質組成物を処理し、アルカンを得ることは、脂質組成物を間接的に液状化することによって行われる。

【0219】

また、本発明は、ジェット燃料を生成する方法を提供する。ジェット燃料は、透明から麦わら色である。最も一般的な燃料は、航空機A-1と分類される、鉛を含んでいない/パラフィン油系の燃料であり、国際的な標準化された一連の仕様を満たすように製造される。ジェット燃料は、多種類の異なる炭化水素の混合物であり、おそらく、数千種類以上が含まれているだろう。これらの物質の大きさの範囲（分子量又は炭素数）は、例えば、凍結点又は発煙点のような生成物の要求によって制限される。ケロシン（Kerosene）型の航空機燃料（Jet A及びJet A-1を含む）は、炭素数が約8～16の炭素分布を有する。ワイドカット型又はナフサ型の航空機燃料（Jet Bを含む）は、典型的には、炭素数が約5～15の炭素分布を有する。

【0220】

両方の航空機燃料（Jet A及びJet B）は、多くの添加剤を含み得る。有用な添加剤としては、限定されないが、酸化防止剤、帯電防止剤、腐食阻害剤、燃料計凍結阻害（FSII）剤が挙げられる。酸化防止剤は、ガム化を防ぎ、通常は、アルキル化フェノール系のものであり、例えば、AO-30、AO-31又はAO-37である。帯電防

10

20

30

40

50

止剤は、静電気を発散させ、火花を防ぐ。ジノニルナフチルスルホン酸 (D I N N S A) を活性な成分として含む S t a d i s 450 は、一例である。腐食阻害剤、例えば、D C I - 4 A は、民間用燃料及び軍用燃料に用いることができ、D C I - 6 A は、軍用燃料に用いられる。F S I I 剤としては、例えば、D i - E G M E が挙げられる。

【0221】

本発明の一実施形態では、ジェット燃料は、藻の燃料と、既存のジェット燃料とをブレンドすることによって作られる。本発明の方法によって生成した脂質を、原材料として使い、ジェット燃料を製造する。従って、本発明の別の態様では、ジェット燃料を生成する方法が提供される。これとともに、本発明の方法によって生成される脂質からジェット燃料を製造する、流体触媒クラッキング (F C C) 及び水素化脱酸素 (H D O) の2つの方法が提供される。

10

【0222】

流体触媒クラッキング (F C C) は、重い未精製画分から、オレフィン、特にプロピレンを製造するのに用いられる方法のひとつである。本発明の方法によって生成した脂質を、オレフィンへと変換することができる。このプロセスは、生成した脂質を F C C ゾーンに流すことと、ジェット燃料として有用な、オレフィンを含む生成物流を集めることとを含む。生成した脂質を、クラッキング条件で、クラッキング触媒と接触させ、ジェット燃料として有用なオレフィン及び炭化水素を含む生成物流を得る。

【0223】

一実施形態では、ジェット燃料を生成する方法は、(a) プロトテカ細胞および本明細書中に開示される方法を用いて、キシロース含有培地中で脂質含有微細微生物を培養すること、(b) 微生物を溶解させ、溶解物を生成するステップと、(c) 溶解した微生物から脂質を単離するステップと、(d) 脂質組成物を処理することとを含み、それによって、ジェット燃料が作られる。ジェット燃料を生成する方法の一実施形態では、脂質組成物は、流体触媒クラッキングゾーンへと流れてもよく、一実施形態では、脂質組成物と、クラッキング触媒とをクラッキング条件で接触させ、C₂ ~ C₅ オレフィンを含む生成物流を得てもよい。

20

【0224】

この方法のある特定の実施形態では、脂質組成物に存在し得る任意の混入物質を除去することが望ましい場合がある。従って、脂質組成物を、流体触媒クラッキングゾーンに流す前に、脂質組成物を前処理する。前処理は、脂質組成物と、イオン交換樹脂とを接触させることを含み得る。イオン交換樹脂は、AmberlystTM - 15 のような酸性イオン交換樹脂であり、脂質組成物が上向又は下向に流れる、反応槽中の床として用いてもよい。他の前処理は、脂質組成物を、硫酸、酢酸、硝酸又は塩酸のような酸と接触させることによる、穏和な酸洗浄を含んでいてもよい。接触は、通常は、周囲温度及び周囲圧力で、希釈酸溶液を用いて行われる。

30

【0225】

脂質組成物は、場合により前処理されており、これを F C C ゾーンに流し、このゾーンで、炭化水素系成分をクラッキングしてオレフィンにする。触媒クラッキングは、反応ゾーンで、脂質組成物を、細かく分割した粒状物質で構成される触媒と接触させることによって行われる。反応は、ハイドロクラッキングとは対照的な触媒クラッキングであり、水素を加えない状態で行われるか、又は水素を消費する状態で行われる。クラッキング反応が進むにつれて、かなりの量のコークスが触媒上に蓄積する。再生ゾーンで、触媒から高温でコークスを燃焼させることによって、触媒は再生する。コークスを含有する触媒は、本明細書では「コークス化触媒」と呼ばれ、反応ゾーンから再生ゾーンへと連続的に移動し、再生し、再生ゾーンから、本質的にコークスを含まない再生された触媒に置き換わる。種々の気体流によって触媒粒子を流動化すると、反応ゾーンと再生ゾーンとの間を触媒が移動することができる。炭化水素をクラッキングする方法、例えば、流動化した触媒流の中で本明細書に記載の脂質組成物の炭化水素をクラッキングし、反応ゾーンと再生ゾーンとの間を触媒が移動し、再生槽でコークスを燃焼させる方法は、F C C プロセスの分野

40

50

で当業者には周知である。例示的なFCC用途、及びC₂～C₅オレフィンを得るために、脂質組成物をクラッキングするのに有用な触媒は、米国特許第6,538,169号および第7,288,685号に記載されており、これらの文献は、内容全体が参照により本明細書中に組み込まれる。

【0226】

適切なFCC触媒は、一般的に、少なくとも2つの成分を含み、この2つの成分は、同じマトリックス上にあってもよく、同じマトリックス上になくてもよい。いくつかの実施形態では、両成分は、反応容器全体を循環していてもよい。第1の成分は、一般的に、流動化した触媒クラッキングの分野で用いられる、よく知られている任意の触媒、例えば、活性アモルファスクレイ型触媒及び/又は高い活性を有する結晶性分子ふるいを含んでいる。分子ふるい触媒は、時としては、望ましい生成物に対する選択性がかなり向上しているため、アモルファス触媒よりも好ましい場合がある。いくつかの好ましい実施形態では、ゼオライトを、FCCプロセスの分子ふるいとして用いてもよい。好ましくは、第1の触媒成分は、大きな孔のゼオライト、例えば、Y型ゼオライト、活性アルミナ材料、シリカ又はアルミナのいずれかを含むバインダー材料、カオリンのような不活性フィラーを含んでいる。

10

【0227】

一実施形態では、本発明の脂質組成物のクラッキングは、FCCゾーンのライザー部分、又はリフト部分で起こる。脂質組成物は、ノズルによってライザー部分に導入され、その結果、脂質組成物がすばやく蒸気になる。触媒を接触させる前に、脂質組成物は、一般的には、約149～約316(300°F～600°F)の温度を有しているであろう。この触媒は、ブレンダー容器からライザー部分に流れ、この部分で、約2秒又はそれより短い時間、脂質組成物と接触する。

20

【0228】

ブレンダーされた触媒及び反応した脂質組成物の蒸気は、出口を通して、ライザー上部から排出され、オレフィンを含むクラッキングした生成物の蒸気流の中で分離し、かなりの量のコークスで覆われた、一般的に「コークス触媒」と呼ばれる触媒粒子を集める。望ましい生成物が望ましくない他の生成物にさらに変換されるのを促進するおそれがある、脂質組成物と触媒とが接触している時間を最小限にする試みにおいて、旋回アームの配置のような、セパレーターの配置を利用し、生成物流からコークス化触媒をすばやく離すことができる。セパレーター、例えば、旋回アームセパレーターは、チャンバの下側部分に位置するストリップングゾーンを備えるチャンバの上側部分に位置している。旋回アームの配置から離れた触媒は、ストリップングゾーンに落ちる。軽質オレフィン及びいくらかの触媒を含む、クラッキングした炭化水素を含むクラッキングした生成物の蒸気流は、サイクロンとつながった管を通してチャンバを出る。サイクロンは、生成物の蒸気流から、残留する触媒粒子を除去し、粒子の濃度を非常に低いレベルまで下げる。次いで、生成物の蒸気流は、分離容器の上側を出る。サイクロンによって分離された触媒は、分離容器に戻り、次いで、ストリップングゾーンに戻る。ストリップングゾーンは、蒸気と向流で接触させることによって、触媒表面から吸着した炭化水素を除去する。

30

【0229】

炭化水素の分圧は、低い状態で軽質オレフィンを生成しやすくするように働く。従って、ライザーの圧力は、約172～約241kPa(25～35psia)に設定し、炭化水素の分圧は約35～172kPa(5～25psia)に設定し、好ましい炭化水素の分圧は、約69～138kPa(10～20psia)である。このように比較的低い炭化水素の分圧は、希釈剤が脂質組成物の10～55wt%、好ましくは、約15wt%になる程度まで、蒸気を希釈剤として用いることによって達成される。同等な炭化水素分圧を達成するために、乾燥ガスのような他の希釈剤を用いてもよい。

40

【0230】

ライザー出口でのクラッキングした蒸気の温度は、約510～621(950°F～1150°F)であろう。しかし、ライザー出口の温度が566(1050°F)よ

50

り高いと、もっと気体は乾燥し、もっとオレフィンが増える。一方、ライザー出口の温度が 566 (1050 °F) より低いと、エチレン及びプロピレンが減る。従って、約 566 ~ 約 630 の好ましい温度で、約 138 kPa ~ 約 240 kPa (20 ~ 35 psia) の好ましい圧力で、FCC プロセスを行うことが好ましい。このプロセスの別の条件は、脂質組成物に対する触媒の比率であり、この比率は、約 5 ~ 約 20、好ましくは、約 10 ~ 約 15 の間で異なる。

【0231】

ジェット燃料を生成する方法の一実施形態では、脂質組成物は、FCC 反応槽のリフト部分に導入される。リフト部分での温度は、非常に熱く、約 700 (1292 °F) ~ 約 760 (1400 °F) の範囲であり、脂質組成物に対する触媒の比率は、約 100 ~ 約 150 であろう。脂質組成物をリフト部分に導入すると、かなりの量のプロピレン及びエチレンを生成するであろうことが予測される。

10

【0232】

本明細書で記載されるように生成した脂質組成物及び脂質を用い、ジェット燃料を生成する方法の別の実施形態では、脂質組成物又は脂質の構造は、水素化脱酸素 (HDO) と呼ばれるプロセスによって破壊される。HDO は、水素を用いて酸素を除去することを意味し、つまり、この材料の構造を破壊しつつ、酸素を除去することを意味する。オレフィン系二重結合を水素化し、任意の硫黄化合物及び窒素化合物を除去する。硫黄の除去は、水素化脱硫黄 (HDS) と呼ばれる。原材料 (脂質組成物又は脂質) の前処理及び純度は、触媒の寿命に関わる。

20

【0233】

一般的に、HDO / HDS ステップにおいて、水素を、供給原料 (脂質組成物又は脂質) と混合し、この混合物を、並流として、単一成分又は二成分の供給原料として触媒床に流す。HDO / HDS ステップの後、生成物の画分を分離し、別個の異性化反応槽に流す。生物学的出発物質のための異性化反応槽は、並流反応槽として文献に記載されている (FI 100 248)。

【0234】

供給される炭化水素、例えば、本明細書の脂質組成物又は脂質を水素化することによって燃料を生成するプロセスは、脂質組成物又は脂質を、第 1 の水素化ゾーンを通過して水素ガスとともに並流として流すことによって行われ、その後、水素ガスを、炭化水素流出物に対して向流で第 2 の水素化ゾーンに流すことによって、炭化水素流出物を第 2 の水素化ゾーンでさらに水素化する。C₂ ~ C₅ オレフィンを生成するために、脂質組成物をクラッキングするのに有用な、例示的な HDO 用途及び触媒は、米国特許第 7,232,935 号に記載されており、内容全体が参照により組み込まれる。

30

【0235】

典型的には、水素化脱酸素ステップにおいて、本明細書の脂質組成物又は脂質のような生物学的成分の構造は分解され、酸素化合物、窒素化合物、リン化合物、硫黄化合物、軽質炭化水素が気体として除去され、オレフィン性結合は水素化される。このプロセスの第 2 のステップ、すなわち、いわゆる異性化ステップでは、炭化水素鎖を分岐させ、低温でパラフィンの性能を向上させるために、異性化が起こる。

40

【0236】

クラッキングプロセスの第 1 のステップ、すなわち、HDO ステップでは、水素ガス及び水素化されるべき本明細書の脂質組成物又は脂質は、HDO 触媒床系に向かって並流又は向流で流れ、この触媒床系は、1 つ以上の触媒床、好ましくは、1 ~ 3 個の触媒床を有する。HDO ステップは、典型的には、並流の様式で行われる。2 種以上の触媒床を含む HDO 触媒床系の場合には、床のうち 1 つ以上を、向流の原理を用いて行ってもよい。HDO ステップでは、圧力は、20 ~ 150 bar を変動し、好ましくは、50 ~ 100 bar を変動し、温度は、200 ~ 500 で変動し、好ましくは、300 ~ 400 の範囲で変動する。HDO ステップでは、周期律表の V I I 族及び / 又は V I B 族の金属を含む既知の水素化触媒を用いてもよい。好ましくは、水素化触媒は、担持された Pd、Pt

50

、Ni、NiMo又はCoMoの触媒であり、担持体は、アルミナ及び／又はシリカである。典型的には、NiMo/Al₂O₃触媒及びCoMo/Al₂O₃触媒を用いる。

【0237】

HDOステップの前に、本明細書の脂質組成物又は脂質を、場合により、穏和な条件下で前水素化することにより処理し、二重結合の副作用を避けることができる。そのような前水素化は、前水素化触媒存在下、温度が50～400、水素圧が1200bar、好ましくは、150～250の温度で、水素圧が10～100barで行われる。触媒は、周期律表のVIII族及び／又はVIB族の金属を含んでもよい。好ましくは、前水素化触媒は、担持されたPd、Pt、Ni、NiMo又はCoMoの触媒であり、担持体は、アルミナ及び／又はシリカである。

10

【0238】

HDOステップからの水素を含む気体の流れを冷却し、次いで、一酸化炭素、二酸化炭素、窒素化合物、リン化合物、硫黄化合物、気体状軽質炭化水素及び他の不純物をここから除去する。圧縮した後、精製された水素又はリサイクルされた水素を第1の触媒床に戻すか、及び／又は、触媒床の間に戻し、抜き取られた気体の流れを構成する。圧縮された液体から水が取り除かれる。この液体を第1の触媒又は触媒床の間に流す。

【0239】

HDOステップの後、生成物に対し、異性化ステップを行う。このプロセスにとって、炭化水素を異性化触媒と接触させる前に、可能な限り完全に不純物が除去されることが重要である。異性化ステップは、場合により、ストリッピングステップを含んでおり、HDOステップの反応生成物を、水蒸気又は軽質炭化水素、窒素又は水のような適切な気体を用いてストリッピングすることによって精製してもよい。この場合によって行われるストリッピングステップは、異性化触媒の上流にあるユニットで、向流様式で行われ、気体及び液体が互いに接触するか、又は向流の原理を利用する別個のストリッピングユニット中、実際の異性化反応槽の前に行われる。

20

【0240】

ストリッピングステップの後、水素ガス及び本明細書の水素化された脂質組成物又は脂質と、場合により、n-パラフィン混合物は、1個又は複数個の触媒床を含む反応異性化ユニットを通る。異性化ステップの触媒床は、並流又は向流の様式で操作されてもよい。

【0241】

このプロセスについて、異性化ステップに向流の原理が適用されることが重要である。異性化ステップでは、このことは、場合により行われるストリッピングステップ、又は異性化反応ステップ、又はこの両方のステップに向流の様式で行うことによってなされる。異性化ステップでは、圧力は、20～150bar、好ましくは、20～100barの範囲で変動し、温度は、200～500、好ましくは、300～400である。異性化ステップでは、当該技術分野で知られている異性化触媒を用いてもよい。適切な異性化触媒は、分子ふるい及び／又はVIII属の金属及び／又はキャリアを含んでいる。好ましくは、異性化触媒は、SAPO-11又はSAPO41又はZSM-22又はZSM-23又はフェライト、Pt、Pd又はNi、Al₂O₃又はSiO₂を含む。典型的な異性化触媒は、例えば、Pt/SAPO-11/Al₂O₃、Pt/ZSM-22/Al₂O₃、Pt/ZSM-23/Al₂O₃、Pt/SAPO-11/SiO₂である。異性化ステップ及びHDOステップは、同じ加圧容器で行われてもよく、別個の加圧容器で行われてもよい。場合により行われる前水素化は、HDOステップ及び異性化ステップと同じ加圧容器で行われてもよく、別個の加圧容器で行われてもよい。

30

40

【0242】

従って、一実施形態では、1つ以上の化学反応の生成物は、ASTM D1655ジェット燃料を含むアルカン混合物である。いくつかの実施形態では、ASTM 1655ジェット燃料の仕様に適合する組成物は、硫黄含有量が10ppm未満である。他の実施形態では、ASTM 1655ジェット燃料の仕様に適合する組成物は、蒸留曲線のT10値が、205未満である。別の実施形態では、ASTM 1655ジェット燃料の仕様

50

に適合する組成物は、最終沸点 (F B P) が 3 0 0 未満である。別の実施形態では、A S T M 1 6 5 5 ジェット燃料の仕様に適合する組成物は、引火点が少なくとも 3 8 である。別の実施形態では、A S T M 1 6 5 5 ジェット燃料の仕様に適合する組成物は、密度が $775 \text{ K} / \text{M}^3 \sim 840 \text{ K} / \text{M}^3$ である。さらに別の実施形態では、A S T M 1 6 5 5 ジェット燃料の仕様に適合する組成物は、凍結点が - 4 7 未満である。別の実施形態では、A S T M 1 6 5 5 ジェット燃料の仕様に適合する組成物は、正味の燃焼熱が、少なくとも $42.8 \text{ MJ} / \text{K}$ である。別の実施形態では、A S T M 1 6 5 5 ジェット燃料の仕様に適合する組成物は、水素含有量が、少なくとも 1 3 . 4 質量 % である。別の実施形態では、A S T M 1 6 5 5 ジェット燃料の仕様に適合する組成物は、定量重量分析 J F T O T で、2 6 0 で試験した場合、熱安定性を有し、H g 3 m m 未満である。別の実施形態では、A S T M 1 6 5 5 ジェット燃料の仕様に適合する組成物は、存在するガム状物が $7 \text{ mg} / \text{dl}$ 未満である。

10

【 0 2 4 3 】

従って、本発明は、微細藻類の脂質を化学的に改変し、種々の工業用途及び他の用途で有用な生成物を得る種々の方法を開示している。本明細書に開示されている方法によって精製する油を改変するプロセスの例としては、限定されないが、油の加水分解、油の水素化処理、油のエステル化が挙げられる。微細藻類の油の改変によって、望ましい機能のために選択された誘導体の油脂化学品へとさらに改変することが可能な、基本的な油脂化学品が得られる。燃料生成プロセスについて上述と類似した様式で、これらの化学的な改変を、本明細書に記載されている微生物の培養物から生成した油に対して行ってもよい。基本的な油脂化学品の例としては、限定されないが、石鹼、脂肪酸、脂肪酸メチルエステル、グリセロールが挙げられる。誘導体の油脂化学品としては、限定されないが、脂肪族ニトリル、エステル、ダイマー酸、四級アンモニウムカチオン、界面活性剤、脂肪族アルカノールアミド、脂肪族アルコールサルフェート、樹脂、乳化剤、脂肪族アルコール、オレフィン、高級アルカンが挙げられる。

20

【 0 2 4 4 】

本発明の方法によって生成するグリセロ脂質に由来する脂肪酸構成要素を加水分解することによって、他の有用な化学物質を生成するように誘導体化することが可能な遊離脂肪酸が得られる。加水分解は、水及び触媒の存在下で起こり、触媒は、酸であっても、塩基であってもよい。以下に報告されているように、放出された遊離脂肪酸を誘導体化して、種々の生成物を得ることができる。米国特許第 5 , 3 0 4 , 6 6 4 号 (H i g h l y s u l f a t e d f a t t y a c i d s) ; 第 7 , 2 6 2 , 1 5 8 号 (C l e a n s i n g c o m p o s i t i o n s) ; 第 7 , 1 1 5 , 1 7 3 号 (F a b r i c s o f t e n e r c o m p o s i t i o n s) ; 第 6 , 3 4 2 , 2 0 8 号 (E m u l s i o n s f o r t r e a t i n g s k i n) ; 第 7 , 2 6 4 , 8 8 6 号 (W a t e r r e p e l l a n t c o m p o s i t i o n s) ; 第 6 , 9 2 4 , 3 3 3 号 (P a i n t a d d i t i v e s) ; 第 6 , 5 9 6 , 7 6 8 号 (L i p i d - e n r i c h e d r u m i n a n t f e e d s t o c k) ; 第 6 , 3 8 0 , 4 1 0 号 (S u r f a c t a n t s f o r d e t e r g e n t s a n d c l e a n e r s) 。

30

【 0 2 4 5 】

加水分解に関し、本発明の一実施形態では、トリグリセリド油脂を、場合により、まず、水又は水酸化ナトリウムのような液体培地中で加水分解し、グリセロール及び石鹼を得る。種々の適切なトリグリセリド加水分解方法が存在し、限定されないが、鹼化、酸加水分解、アルカリ加水分解、酵素加水分解 (本明細書で、分解とも呼ばれる) 、加圧熱水を用いた加水分解が挙げられる。当業者は、油脂化学品を生成するためにトリグリセリド油脂を加水分解する必要はないことを理解するだろう。むしろ、油を、他の既知のプロセスによって、望ましい油脂化学品に直接変換してもよい。例えば、トリグリセリド油脂を、エステル化によって、メチルエステル脂肪酸に直接変換してもよい。

40

【 0 2 4 6 】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されている方法によって生成した油の触媒的

50

加水分解は、油をグリセロールと脂肪酸とに分解することによって起こる。上述のように、脂肪酸を、誘導体の油脂化学品を得るためのいくつかの他の改変によって、さらに処理してもよい。例えば、一実施形態では、脂肪酸は、アミノ化反応を受け、脂肪族窒素化合物を生成してもよい。別の実施形態では、脂肪酸は、オゾン分解を受け、一塩基酸及び二塩基酸を生成してもよい。

【0247】

他の実施形態では、加水分解は、本明細書で生成した油の分解によって起こり、油脂化学品を生成してもよい。いくつかの本発明の好ましい実施形態では、トリグリセリド油脂を分解してから、他のプロセスを行ってもよい。当業者は、限定されないが、酵素分解及び加圧分解を含む多くの適切なトリグリセリド分解方法が存在することを認識しているであらう。

10

【0248】

一般的に、酵素による油分解方法は、酵素リパーゼを、水/油混合物に作用する生体触媒として使用する。次いで、酵素分解によって、油又は脂肪を、それぞれグリセロールと遊離脂肪酸とに分解する。次いで、グリセロールは、水相に移動し、それにより、有機相は、遊離脂肪酸が豊富に含まれる。

【0249】

酵素分解反応は、一般的に、有機相と水相との間の相の境界で起こり、酵素は、相の境界にしか存在しない。相の境界にきたトリグリセリドが、分解反応に寄与するか、又は分解反応に参加する。反応が進むにつれて、脂肪酸の占有密度又は濃度が、遊離脂肪酸と比較すると、まだグリセリドと化学的に結合しており、相の境界での占有密度又は濃度が低くなり、その結果、反応が遅くなる。ある特定の実施形態では、酵素分解を室温で行ってもよい。当業者は、所望な脂肪酸へと分解するのに適切な条件を知っている。

20

【0250】

例として、反応速度は、界面の境界面が増えることによって速くすることができる。反応が終了したら、遊離脂肪酸を、有機相から酵素を含まずに分離し、まだグリセリドと化学的に結合した脂肪酸を含む残渣を、再び再び供給するか、又はリサイクルし、分解させるべき新しい油又は脂肪と混合する。このように、リサイクルされたグリセリドについて、次いで、さらなる酵素分解プロセスを行う。いくつかの実施形態では、遊離脂肪酸を、そのような様式で部分的に分解した油又は脂肪から抽出する。この様式で、化学的に結合している脂肪酸(トリグリセリド)が、分解プロセスに戻されるか、又は再び供給される場合、酵素の消費を顕著に減らすことができる。

30

【0251】

分解度は、測定した酸価を、所与の油又は脂肪からコンピューターで割り出すことが可能な理論的に可能な酸価で割った比率として決定される。好ましくは、酸価は、標準的な一般的な方法による滴定手段によって測定される。又は、グリセロール水相の密度は、分解度の測定値として測ることができる。

【0252】

一実施形態では、本明細書に記載されているような分解プロセスは、生成した油のアルカリ精製プロセスから得られる、いわゆる石鹼ストックに含まれるモノグリセリド、ジグリセリド、トリグリセリドを分解するのにも適している。このように、石鹼ストックは、それより前に天然の油が脂肪酸へと鹼化されることなく、定量的に変換することができる。この目的で、石鹼に化学的に結合している脂肪酸は、好ましくは、酸を加えることによって、分解の前に放出される。ある特定の実施形態では、分解プロセスのために、水及び酵素に加えて、緩衝溶液を用いる。

40

【0253】

一実施形態では、本発明の方法に従って生成した油に対し、加水分解方法として鹼化を行うことができる。動物性油及び植物性油は、典型的には、遊離脂肪酸と三価アルコールであるグリセロールとのエステルであるトリグリセリド(TAG)から作られる。アルカリ加水分解反応において、TAG中のグリセロールが除去され、ナトリウム又はカリウム

50

のようなアルカリ金属と会合し、脂肪酸塩を生成することができる、3個のカルボン酸アニオンが残る。このスキームで、カルボン酸の構成要素が、グリセロール部分から開裂し、ヒドロキシル基によって置き換えられる。この反応で用いられる塩基（例えば、KOH）の量は、望ましい鹸化度によって決定される。目的が、例えば、TAG組成物に元も存在している油をいくらか含んでいる石鹸を生成することである場合、TAGの全てを脂肪酸に変換するのには十分でない塩基の量が、反応混合物に入れられる。通常は、この反応は水溶液中で行われ、ゆっくりと進むが、熱を加えて反応を速め得る。脂肪酸塩の沈殿は、例えば、水溶性のアルカリ金属ハロゲン化物（例えば、NaCl又はKCl）のような塩を反応混合物に加えることによって促進され得る。好ましくは、塩基は、NaOH又はKOHのようなアルカリ金属の水酸化物である。又は、例えば、トリエタノールアミン及びアミノメチルプロパノールを含め、アルカノールアミンのような他の塩基を反応スキームで用いてもよい。ある場合では、これらの代替法は、透明な石鹸製品を作るのに好ましい場合がある。

10

【0254】

いくつかの方法では、化学的な改変の第1のステップは、二重結合を飽和させるための水素化処理であってもよく、次いで、水素及び触媒が存在する条件下、高温で脱酸素を行う。他の方法では、水素化及び脱酸素は、同じ反応で行ってもよい。さらに他の方法では、脱酸素は、水素化の前に行う。次いで、場合により、異性化を行ってもよく、これも水素及び触媒の存在下で行ってもよい。最後に、所望の場合、気体及びナフサ成分を除去することができる。例えば、米国特許第5,475,160号(hydrogenation of triglycerides);第5,091,116号(deoxygenation, hydrogenation and gas removal);第6,391,815号(hydrogenation);第5,888,947号(isomerization)を参照。

20

【0255】

本発明のいくつかの実施形態では、トリグリセリド油脂を、部分的に脱酸素するか、又は完全に脱酸素する。脱酸素反応によって、限定されないが、脂肪酸、脂肪族アルコール、ポリオール、ケトン、アルデヒドのような所望な生成物が得られる。一般的に、いかなる特定の理論によっても限定されないが、脱酸素反応は、限定されないが、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を含む種々の異なる反応経路の組み合わせを含んでおり、その結果、脂肪酸又は脂肪酸エステルから酸素が少なくとも部分的に除去され、脂肪族アルコールのような反応生成物が生成し、さらなるプロセスによって、この生成物を所望な化学物質へと簡単に変換することができる。例えば、一実施形態では、脂肪族アルコールを、FCC反応によってオレフィンへと変換してもよく、縮合反応によって高級アルカンへと変換してもよい。

30

【0256】

そのような化学的な改変のひとつは水素化であり、水素化は、グリセロ脂質又は遊離脂肪酸の脂肪酸構成要素中にある二重結合に水素を添加することである。水素化プロセスによって、液体の油が、特定の用途ではさらに適切な場合がある半固体又は固体の脂肪へと変換される。

40

【0257】

本明細書に記載の方法によって生成する油の水素化は、米国特許第7,288,278号(Food additives or medicaments);第5,346,724号(Lubrication products);第5,475,160号(Fatty alcohols);第5,091,116号(Edible oils);第6,808,737号(Structural fats for margarine and spreads);第5,298,637号(Reduced-calorie fat substitutes);第6,391,815号(Hydrogenation catalyst and sulfur adsorbent);第5,

50

233, 099号及び第5, 233, 100号(Fatty alcohols); 第4, 584, 139号(Hydrogenation catalysts); 第6, 057, 375号(Foam suppressing agents); 第7, 118, 773号(Edible emulsion spreads)に報告されているように、本明細書で提供している1つ以上の方法及び/又は材料と組み合わせで行うことができる。

【0258】

当業者は、種々のプロセスを用いて油を水素化してもよいことを認識するだろう。適切な方法のひとつは、油を、水素化反応槽中で、水素化生成物を得るのに十分な条件で、水素又は適切な気体と混合した水素及び触媒と接触させることを含む。水素化触媒は、一般的に、Cu、Re、Ni、Fe、Co、Ru、Pd、Rh、Pt、Os、Ir、及びこれらの合金又は任意の組み合わせを、単独で、又は、W、Mo、Au、Ag、Cr、Zn、Mn、Sn、B、P、Bi、及びこれらの合金又は任意の組み合わせのようなプロモーターとともに含んでいてもよい。他の有効な水素化触媒材料としては、レニウムで改変された、担持されたニッケル又はルテニウムが挙げられる。一実施形態では、水素化触媒も、触媒の望ましい機能性に依存して、任意の担持体を含んでいてもよい。水素化触媒を、当業者に既知の方法によって調製してもよい。

10

【0259】

いくつかの実施形態では、水素化触媒は、担持されたV I I I属の金属触媒、金属スポンジ材料(例えば、スポンジニッケル触媒)を含んでいる。ラネーニッケルは、本発明で用いるのに適した、活性化されたスポンジニッケルの一例である。他の実施形態では、本発明の水素化反応は、ニッケル-レニウム触媒又はタングステンによって改変されたニッケル触媒を含む触媒を用いて行われる。本発明の水素化反応に適切な触媒の一例は、炭素に担持されたニッケル-レニウム触媒である。

20

【0260】

一実施形態では、適切なラネーニッケル触媒を、適切な等重量のニッケル及びアルミニウムの合金を、アルカリ水溶液、例えば、約25重量%の水酸化ナトリウムを含むアルカリ水溶液で処理することによって調製し得る。アルミニウムを、アルカリ水溶液によって選択的に溶解し、ほとんどがニッケルで、少量のアルミニウムを含むスポンジ型の材料を得る。最初の合金は、生成したスポンジニッケル触媒に約1~2重量%が残るような量で、プロモーター金属(すなわち、モリブデン又はクロム)を含んでいる。別の実施形態では、水素化触媒は、ニトロシル硝酸ルテニウム(I I I)、塩化ルテニウム(I I I)の水溶液を用い、適切な支持材料に含浸させて調製する。次いで、この溶液を乾燥させ、含水量が約1重量%未満の固体を得る。次いで、回転式のボール型炉で、水素を流しつつ、300(焼成しない)~400(焼成する)で4時間かけて、この固体を大気圧で還元してもよい。冷却し、触媒を窒素で不活性化した後、窒素中、5容積%の酸素を触媒に2時間流す。

30

【0261】

ある特定の実施形態では、記載されている触媒は、触媒担持体を含む。触媒担持体は、触媒を安定化し、担持する。使用される触媒担持体の種類は、選択した触媒及び反応条件に依存する。本発明に適した担持体としては、限定されないが、炭素、シリカ、シリカ-アルミナ、ジルコニア、チタニア、セリア、バナジア、窒化物、窒化ホウ素、ヘテロポリ酸、ヒドロキシアパタイト、酸化亜鉛、クロミア、ゼオライト、カーボンナノチューブ、炭素フラーレン、及びこれらの任意の組み合わせが挙げられる。

40

【0262】

本発明で用いられる触媒は、当業者に既知の従来の方法を用いて調製することができる。適切な方法としては、限定されないが、初期湿潤法、蒸発させ、含浸させる方法、化学蒸着法、洗浄-コーティング、マグネトロンスパッタリング技術などが挙げられる。

【0263】

水素化反応を行う際の条件は、出発物質及び望ましい生成物の種類によって変わるだろ

50

う。当業者は、本開示の利益とともに、適切な反応条件を認識しているであろう。一般的に、水素化反応は、80 ~ 250 の温度で行われ、好ましくは、90 ~ 200、最も好ましくは、100 ~ 150 の温度で行われる。いくつかの実施形態では、水素化反応は、500 KPa ~ 14000 KPa の圧力で行われる。

【0264】

本発明の水素化分解反応で用いられる水素としては、外から加えられる水素、リサイクルした水素、系中で生成した水素、及びこれらの任意の組み合わせが挙げられる。本明細書で使用される場合、用語「外から加えられる水素」は、バイオマス反応自体に由来する水素ではなく、別の供給源からシステムに加えられた水素を指す。

【0265】

本発明のいくつかの実施形態では、出発トリグリセリドまたは脂肪酸を、小さな分子に変換することが望ましく、この小さな分子は、望ましい高級炭化水素へと簡単に変換されるだろう。この変換の適切な方法のひとつは、水素化分解反応によるものである。油の水素化分解を行う種々のプロセスが知られている。適切な方法のひとつは、水素化分解反応槽中で、小さな分子又はポリオールを含む反応生成物を得るのに十分な条件で、油を水素又は適切な気体と混合した水素及び水素化分解触媒と接触させることを含む。本明細書で使用される場合、用語「小さな分子又はポリオール」は、小さな分子量を有する任意の分子を含み、出発油よりも炭素原子又は酸素原子の数が少ないものを含み得る。一実施形態では、この反応生成物は、ポリオール及びアルコールを含む小さな分子を含む。当業者は、水素化分解反応を行うのに適切な方法を容易に選択することができる。

【0266】

いくつかの実施形態では、5炭糖及び/又は6炭糖又は糖アルコールを、水素化分解触媒を用い、プロピレングリコール、エチレングリコール、グリセロールに変換してもよい。水素化分解触媒としては、Cr、Mo、W、Re、Mn、Cu、Cd、Fe、Co、Ni、Pt、Pd、Rh、Ru、Ir、Os及びこれらの合金又は任意の組み合わせを、単独で、又は、Au、Ag、Cr、Zn、Mn、Sn、Bi、B、O、及びこれらの合金又は任意の組み合わせのようなプロモーターとともに含んでもよい。また、水素化分解触媒は、遷移金属（例えば、クロム、モリブデン、タングステン、レニウム、マンガン、銅、カドミウム）又はV I I I族の金属（例えば、鉄、コバルト、ニッケル、白金、パラジウム、ロジウム、ルテニウム、イリジウム、オスミウム）を含む炭素系パイロポリマー触媒を含んでもよい。ある特定の実施形態では、水素化分解触媒は、上述の金属を、アルカリ土類金属酸化物と組み合わせたもの、又は、触媒活性のある担持体に接着したものを含んでもよい。ある特定の実施形態では、水素化分解反応で記載されている触媒は、水素化反応について上に記載したような触媒担持体を含んでもよい。

【0267】

水素化分解反応を行う際の条件は、出発物質及び望ましい生成物の種類によって変わるだろう。当業者は、本開示の利益とともに、この反応を行うのに適切な反応条件を認識しているであろう。一般的に、水素化分解反応は、110 ~ 300 の温度で行われ、好ましくは、170 ~ 220、最も好ましくは、200 ~ 225 の温度で行われる。いくつかの実施形態では、水素化分解反応は、塩基性条件で行われ、好ましくは、pHが8 ~ 13、さらにより好ましくは、pHが10 ~ 12の条件で行われる。いくつかの実施形態では、水素化分解反応は、60 KPa ~ 16500 KPaの範囲の圧力で、好ましくは、1700 KPa ~ 14000 KPa、さらにより好ましくは、4800 KPa ~ 11000 KPaの圧力で行われる。

【0268】

本発明の水素化分解反応で用いられる水素は、外から加えられる水素、リサイクルした水素、系中で生成した水素、及びこれらの任意の組み合わせを含むことができる。

【0269】

いくつかの実施形態では、上述の反応生成物を、縮合反応槽中で縮合反応によって高級な炭化水素へと変換されてもよい。そのような実施形態では、反応生成物の縮合は、高級

10

20

30

40

50

な炭化水素を生成することが可能な触媒が存在する条件で行われる。理論によって限定されることを意図していないが、高級な炭化水素の生成は、炭素 - 炭素結合、又は炭素 - 酸素結合の生成を含む、段階的な付加反応によって進むと考えられる。得られた反応生成物は、以下にさらに詳細に記載されるように、これらの部分を含む任意の数の化合物を含んでいる。

【0270】

ある特定の実施形態では、適切な縮合触媒としては、酸触媒、塩基触媒、又は酸 / 塩基触媒が挙げられる。本明細書で使用される場合、用語「酸 / 塩基触媒」は、酸と塩基の両方の機能を有する触媒を指す。いくつかの実施形態では、縮合触媒としては、限定されないが、ゼオライト、カーバイド、窒化物、ジルコニア、アルミナ、シリカ、アルミノシリケート、ホスフェート、酸化チタン、酸化亜鉛、酸化バナジウム、酸化ランタン、酸化イットリウム、酸化スカンジウム、酸化マグネシウム、酸化セリウム、酸化バリウム、酸化カルシウム、水酸化物、ヘテロポリ酸、無機酸、酸で改変された樹脂、塩基で改変された樹脂、及びこれらの任意の組み合わせが挙げられる。いくつかの実施形態では、縮合触媒としては、改変剤も含まれる。適切な改変剤としては、La、Y、Sc、P、B、Bi、Li、Na、K、Rb、Cs、Mg、Ca、Sr、Ba、及びこれらの任意の組み合わせが挙げられる。いくつかの実施形態では、縮合触媒は、金属を含んでいてもよい。適切な金属としては、Cu、Ag、Au、Pt、Ni、Fe、Co、Ru、Zn、Cd、Ga、In、Rh、Pd、Ir、Re、Mn、Cr、Mo、W、Sn、Os、合金、及びこれらの組み合わせが挙げられる。

10

20

【0271】

ある特定の実施形態では、縮合反応で記載されている触媒は、水素化反応について上に記載した触媒担持体を含んでいてもよい。ある特定の実施形態では、縮合触媒は、自立型である。本明細書で使用される場合、用語「自立型」は、触媒が、担持体として機能する別の材料を必要としないことを意味する。他の実施形態では、縮合触媒を、触媒を担持するのに適した別個の担持体と組み合わせて使用する。一実施形態では、縮合触媒担持体は、シリカである。

【0272】

縮合反応が起こる条件は、出発物質及び望ましい生成物の種類によって変わるだろう。当業者は、本開示の利益とともに、この反応を行うのに適切な反応条件を認識しているであろう。いくつかの実施形態では、縮合反応は、提示されている反応の熱力学が好ましくなるような温度で行われる。縮合反応の温度は、出発物質の特定のポリオール又はアルコールによって変わるだろう。いくつかの実施形態では、縮合反応の温度は、80 ~ 500 の範囲であり、好ましくは、125 ~ 450、最も好ましくは、125 ~ 250 の範囲である。いくつかの実施形態では、縮合反応は、0 KPa ~ 9000 KPa の範囲の圧力で行われ、好ましくは、0 KPa ~ 7000 KPa、さらにより好ましくは、0 KPa ~ 5000 KPa の範囲の圧力で行われる。

30

【0273】

本発明のある特定の方法により得られる高級なアルカンとしては、限定されないが、炭素原子が4 ~ 30個の分枝鎖又は直鎖のアルカン、炭素原子が4 ~ 30個の分枝鎖又は直鎖のアルケン、炭素原子が5 ~ 30個のシクロアルカン、炭素原子が5 ~ 30個のシクロアルケン、アリール、縮合アリール、アルコール、ケトンが挙げられる。適切なアルカンとしては、限定されないが、ブタン、ペンタン、ペンテン、2 - メチルブタン、ヘキサン、ヘキセン、2 - メチルペンタン、3 - メチルペンタン、2, 2, - ジメチルブタン、2, 3 - ジメチルブタン、ヘプタン、ヘプテン、オクタン、オクテン、2, 2, 4 - トリメチルペンタン、2, 3 - ジメチルヘキサン、2, 3, 4 - トリメチルペンタン、2, 3 - ジメチルペンタン、ノナン、ノネン、デカン、デセン、ウンデカン、ウンデセン、ドデカン、ドデセン、トリデカン、トリデセン、テトラデカン、テトラデセン、ペンタデカン、ペンタデセン、ノニルデカン、ノニルデセン、エイコサン、エイコセン、ウンエイコサン、ウンエイコセン、ドエイコサン、ドエイコセン、トリエイコサン、トリエイコセン、テ

40

50

トラエイコサン、テトラエイコセン、及びこれらの異性体が挙げられる。これらの生成物のいくつかは、燃料として用いるのに適し得る。

【0274】

いくつかの実施形態では、シクロアルカン及びシクロアルケンは置換されていない。他の実施形態では、シクロアルカン及びシクロアルケンは、一置換されている。さらに他の実施形態では、シクロアルカン及びシクロアルケンは、多置換されている。置換されたシクロアルカン及びシクロアルケンを含む実施形態では、置換された基としては、限定されないが、炭素原子が1～12個の分枝鎖又は直鎖のアルキル、炭素原子が1～12個の分枝鎖又は直鎖のアルキレン、フェニル、及びこれらの任意の組み合わせが挙げられる。適切なシクロアルカン及びシクロアルケンとしては、限定されないが、シクロペンタン、シクロペンテン、シクロヘキサン、シクロヘキセン、メチル-シクロペンタン、メチル-シクロペンテン、エチル-シクロペンタン、エチル-シクロペンテン、エチル-シクロヘキサン、エチル-シクロヘキセン、及びこれらの異性体、及び任意のこれらの組み合わせが挙げられる。

10

【0275】

いくつかの実施形態では、生成したアリールは、置換されていない。別の実施形態では、生成したアリールは、一置換されている。置換アリールを含む実施形態では、置換された基としては、限定されないが、炭素原子が1～12個の分枝鎖又は直鎖のアルキル、炭素原子が1～12個の分枝鎖又は直鎖のアルキレン、フェニル、及び任意のこれらの組み合わせが挙げられる。本発明に適したアリールとしては、限定されないが、ベンゼン、トルエン、キシレン、エチルベンゼン、パラキシレン、メタキシレン、及び任意のこれらの組み合わせが挙げられる。

20

【0276】

本発明のある特定の方法で生成したアルコールは、炭素原子を4～30個有している。いくつかの実施形態では、アルコールは環状である。他の実施形態では、アルコールは、分岐している。別の実施形態では、アルコールは、直鎖である。本発明に適したアルコールとしては、限定されないが、ブタノール、ペンタノール、ヘキサノール、ヘプタノール、オクタノール、ノナノール、デカノール、ウンデカノール、ドデカノール、トリデカノール、テトラデカノール、ペンタデカノール、ヘキサデカノール、ヘプチルデカノール、オクチルデカノール、ノニルデカノール、エイコサノール、ウンエイコサノール、ドエイコサノール、トリエイコサノール、テトラエイコサノール、及びこれらの異性体が挙げられる。

30

【0277】

本発明のある特定の方法で生成するケトンは、炭素原子を4～30個有している。一実施形態では、ケトンは環状である。別の実施形態では、ケトンは、分岐している。別の実施形態では、ケトンは、直鎖である。本発明に適したケトンとしては、限定されないが、ブタノン、ペンタノン、ヘキサノン、ヘプタノン、オクタノン、ノナノン、デカノン、ウンデカノン、ドデカノン、トリデカノン、テトラデカノン、ペンタデカノン、ヘキサデカノン、ヘプチルデカノン、オクチルデカノン、ノニルデカノン、エイコサノン、ウンエイコサノン、ドエイコサノン、トリエイコサノン、テトラエイコサノン、及びこれらの異性体が挙げられる。

40

【0278】

本発明の方法により生成される微細藻類油に対して実施され得る別の化学的修飾は、インターエステル化である。天然で生成するグリセロ脂質は、脂肪酸の構成要素が均一に分布していない。油に関しては、インターエステル化は、異なるグリセロ脂質の2個のエステル間のアシル基が交換することを指す。インターエステル化のプロセスは、グリセロ脂質の混合物の脂肪酸構成要素を、分布パターンを改変するように再配置することができるという機構を与える。インターエステル化は、よく知られている化学プロセスであり、一般的には、アルカリ金属又はアルカリ金属アルキレート（例えば、ナトリウムメトキシド）のような触媒存在下、油混合物を所定時間（例えば、30分）加熱すること（約200

50

まで)を含む。このプロセスを用い、油混合物の脂肪酸構成要素の分布パターンをランダム化することができ、又は、望ましい分布パターンを作成することができる。そのような脂質の化学的な改変方法は、本明細書に与えられている材料、例えば、細胞乾燥重量の割合で、脂質として少なくとも20%含む微生物バイオマスで行うことができる。

【0279】

脂肪酸の特定の分布パターンを求める、方向性を持ったインターエステル化は、油混合物を、融解が起こり得るいくつかのTAGの融点よりも低い温度に維持することによって行うことができる。これにより、これらのTAGが選択的に結晶化し、それらが結晶化する際に、反応混合物から効果的に除去される。このプロセスを、例えば、油中のほとんどの脂肪酸が沈殿するまで行ってもよい。方向性を持ったインターエステル化を、例えば、長鎖脂肪酸を、これよりも鎖が短い対応する脂肪酸と置き換えることによって、カロリー含有量が低い生成物を得るために使用してもよい。また、方向性を持ったインターエステル化を用い、望ましくないtrans異性体を生じてしまう可能性がある水素化を行うことなく、所望の融解特性を有しており、食品添加物又は製品(例えば、マーガリン)中で求められている構造的特徴を有するような脂肪混合物を含む生成物を得ることができる。

【0280】

本明細書で記載されている方法によって生成する油のインターエステル化は、1つ以上の方法及び/又は材料、又は米国特許第6,080,853号(Nondigestible fat substituted);第4,288,378号(Peanut butter stabilizer);第5,391,383号(Edible spray oil);第6,022,577号(Edible fats for food products);第5,434,278号(Edible fats for food products);第5,268,192号(Low calorie nut products);第5,258,197号(Reduce calorie edible compositions);第4,335,156号(Edible fat product);第7,288,278号(Food additives or medicaments);第7,115,760号(Fractionation process);第6,808,737号(Structural fats);第5,888,947号(Engine lubricants);第5,686,131号(Edible oil mixtures);第4,603,188号(Curable urethane compositions)で報告されているように、生成物を生成するための1つ以上の方法及び材料と組み合わせて行うことができる。

【0281】

一実施形態では、本発明によれば、上に記載されているように、油をトランスエステル化した後に、米国第6,465,642号で報告されているように、ポリオールポリオールを用いてトランスエステル化した生成物の反応を行う。そのようなエステル化及び分離プロセスは、石鹸存在下、低級アルキルエステルとポリオールとを反応させるステップと;生成物の混合物から、残った石鹸を除去するステップと;生成物の混合物を水で洗浄し、乾燥させ、不純物を取り除くステップと;生成物の混合物を精製のために漂白するステップと;生成物の混合物中のポリオール脂肪酸ポリエステルから、未反応の低級アルキルエステルの少なくとも一部分を分離するステップと;未反応の低級アルキルエステルを分離させたものをリサイクルするステップとを含んでいてもよい。

【0282】

また、トランスエステル化は、米国特許第6,278,006号に報告されているように、短鎖脂肪酸エステルを有する微生物バイオマスを用いて行ってもよい。一般的に、トランスエステル化は、適切な触媒存在下、短鎖脂肪酸エステルを、油に加え、この混合物を加熱することによって行われてもよい。いくつかの実施形態では、油は、反応混合物の約5重量%~約90重量%含まれる。いくつかの実施形態では、短鎖脂肪酸エステルは、反応混合物の約10重量%~約50重量%含まれていてもよい。触媒の非限定的な例とし

ては、塩基触媒、ナトリウムメトキシド、硫酸及び酸性クレイのような無機酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、トルエンスルホン酸のような有機酸、Amberlyst 15のような酸性樹脂を含む酸触媒が挙げられる。ナトリウム及びマグネシウムのような金属、金属ヒドリドも有用な触媒である。

【0283】

別のそのような化学的な改変は、ヒドロキシル化であり、二重結合に水を付加し、飽和状態にし、ヒドロキシル部分を組み込むことを含む。ヒドロキシル化プロセスは、グリセロ脂質の1つ以上の脂肪酸構成要素をヒドロキシ脂肪酸に変換する機構を与える。ヒドロキシル化は、例えば、米国特許第5,576,027号に報告されている方法によって行うことができる。ヒマシ油及びその誘導体を含むヒドロキシル化脂肪酸は、食品添加物、界面活性剤、顔料湿潤剤、消泡剤、撥水添加剤、可塑剤、香粧品用乳化剤及び/又は消臭剤、及びエレクトロニクス、医薬、塗料、インク、接着剤、滑沢剤のような、いくつかの工業用途での成分として有用である。グリセリドのヒドロキシル化をどのように行うかの一例を以下に示す。脂肪を、好ましくは、ヘプタンと組み合わせて約30~50の温度まで加熱し、この温度に30分以上維持してもよく；次いで、この混合物に酢酸を加えた後、硫酸水溶液を加え、次いで、過酸化水素水溶液を1時間かけて混合物に少量ずつ加えてもよく；過酸化水素水溶液を加えた後、温度を少なくとも約60まで上げ、少なくとも6時間撹拌してもよく；撹拌した後、この混合物を静置し、反応によって生成した下側の水層を除去しつつ、反応によって生成した上側のヘプタン層を約60の温度を有する熱水で洗浄してもよく；次いで、洗浄したヘプタン層を水酸化カリウム水溶液でpHが約5~7になるまで中和し、次いで、減圧下で蒸留によって除去してもよく；次いで、反応生成物を減圧下、100で乾燥させ、乾燥した生成物を、減圧条件下、蒸気で消臭し、珪藻土を用いて約50~60で濾過してもよい。

【0284】

本明細書に記載されている微生物油のヒドロキシル化を、1つ以上の方法及び/又は材料と組み合わせて行うことができ、米国特許第6,590,113号(Oil-based coatings and ink)；第4,049,724号(Hydroxylation process)；第6,113,971号(Olive oil butter)；第4,992,189号(Lubricants and lube additives)；第5,576,027号(Hydroxylated milk)；第6,869,597号(Cosmetics)で報告されているように、生成物を生成するための1つ以上の方法及び材料と組み合わせて行うことができる。

【0285】

ヒドロキシル化されたグリセロ脂質をエストライドに変換することができる。エストライドは、ヒドロキシル化された脂肪酸構成要素が、別の脂肪酸分子でエステル化されたグリセロ脂質からなる。ヒドロキシル化されたグリセロ脂質をエストライドに変換することは、Isbell et al., JAOCS 71(2):169-174(1994)に記載されるように、グリセロ脂質及び脂肪酸の混合物を加熱し、この混合物を鉱物酸と接触させることによって行うことができる。エストライドは、米国特許第7,196,124号(エラストマー材料および床仕上げ材)；第5,458,795号(高温での用途のための濃化油)；第5,451,332号(工業用途のための液体)；第5,427,704号(燃料添加剤)；第5,380,894号(潤滑油、グリース、可塑剤、印刷インク)で報告されているものに限定されないが、種々の用途で有用である。

【0286】

微生物油で行うことができる他の化学反応としては、米国特許第6,051,539号で報告されているように、トリアシルグリセロールと、シクロプロパン化剤と反応させ、流動性及び/又は酸化安定性を高めること；米国特許第6,770,104号で報告されているように、トリアシルグリセロールからワックスを製造すること；「The effect of fatty acid composition on the acrylation kinetics of epoxidized triacylglycerols」

ycerols」、Journal of the American Oil Chemists' Society、79:1、59-63(2001)及びFree Radical Biology and Medicine、37:1、104-114(2004)に報告されているように、トリアシルグリセロールをエポキシ化することが挙げられる。

【0287】

上述のような燃料及び化学製品のために、油を生み出す微生物バイオマスを作成すると、脱脂したバイオマス食料が生成される。脱脂した食料は、藻の油を調製したときの副産物であり、例えば、反すう動物、鳥類、ブタ、水産養殖のような農場動物用の動物の餌として有用である。得られた食料は、油含有量が減ってはいるが、高品質のタンパク質、炭水化物、繊維、灰分、残留油、及び動物の餌に適した他の栄養物はいまだ含まれている。油分離プロセスによって細胞は大部分が溶解しているため、脱脂した食料は、そのような動物によって簡単に消化される。脱脂した食料を、場合により、例えば、動物の餌の中で、穀物のような他の成分と組み合わせてもよい。脱脂した食料は、均一な粉末であるため、押出機、エクパンダー又は市販されている別の種類の機械を用いてペレットへと圧縮することができる。

10

【0288】

本発明について上に詳細に説明し、以下の実施例で例示するが、これらは説明のために与えられるものであり、特許請求の範囲に書かれた発明を限定するために与えられるものではない。

20

VIII. 実施例

実施例1：プロトテカの培養方法

【0289】

細胞乾燥重量で高い割合の油を得るようにプロトテカ株を育てた。凍結保存した細胞を室温で解凍し、細胞500 μ lを、2%グルコースを含む培地4.5ml(4.2g/L K_2HPO_4 、3.1g/L NaH_2PO_4 、0.24g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、0.25g/L クエン酸一水和物、0.025g/L $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 、2g/L 酵母抽出物)に入れ、6ウェルプレートで撹拌しつつ(200rpm)、28で7日間成長させた。細胞乾燥重量は、あらかじめ秤量しておいたエッペンドルフ管中、培養物1mlを14,000rpmで5分間遠心分離することによって決定した。培養物の上澄みを棄て、得られた細胞ペレットを脱イオン水1mlで洗浄した。培養物を再び遠心分離処理し、上澄みを棄て、細胞ペレットを凍結するまで-80に置いた。次いで、サンプルを24時間凍結乾燥し、細胞乾燥重量を算出した。

30

【0290】

培養物中の総脂質を決定するために、培養物3mlを取り出し、Ankomシステム(Ankom Inc.、Macedon、NY)を用い、製造業者のプロトコルに従って分析した。サンプルを、Amkom XT10抽出機を用い、製造業者のプロトコルに従って、溶媒抽出した。酸によって加水分解して乾燥させたサンプルと、溶媒抽出して乾燥させたサンプルとの質量差として、総脂質を決定した。細胞乾燥重量での油の割合(%)を測定した値を表2に示す。

40

【0291】

【表2】

表2. 細胞乾燥重量による油の割合

種	株	油%
プロトテカ・スタグノラ	UTEX 327	13.14
プロトテカ・モリフォルミス	UTEX 1441	18.02
プロトテカ・モリフォルミス	UTEX 1435	27.17

【0292】

50

米国特許出願公開第20100151112号の表22に列挙した微細藻類サンプルの遺伝子型を解析した。藻のバイオマスからゲノムDNAを以下のように単離した。液体培養物から、細胞(約200mg)を14,000×gで5分間遠心分離処理した。次いで、細胞を滅菌蒸留水に再び懸濁させ、14,000×gで5分間遠心分離処理し、上澄みを棄てた。このバイオマスに、直径約2mmの1個のガラスビーズを加え、この管を-80で少なくとも15分間置いた。サンプルを取り出し、研磨バッファー(1% Sarkosyl、0.25M ショ糖、50mM NaCl、20mM EDTA、100mM Tris-HCl、pH 8.0、RNase A 0.5ug/μl)150μlを加えた。ペレットを簡単にボルテックスすることによって再び懸濁させた後、5M NaCl 40μlを加えた。サンプルを短時間ボルテックスした後、5% CTAB(セチルトリメチルアンモニウムブロミド)66μlを加え、最後に短時間ボルテックスした。次いで、サンプルを65で10分間インキュベートした後、14,000×gで10分間遠心分離処理した。新しい管に上澄みを移し、フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール 12:12:1 300μlで1回抽出し、次いで、14,000×gで5分間遠心分離処理した。0.7体積部のイソプロパノール(約190μl)を含む新たな管に、得られた水相を移し、ひっくり返すことによって混合し、室温で30分間インキュベートするか、又は4で一晩インキュベートした。14,000×gで10分間遠心分離処理することによってDNAを回収した。次いで、得られたペレットを70%エタノールで2回洗浄した後、100%エタノールで最後に洗浄した。ペレットを室温で20~30分風乾した後、10mM TrisCl、1mM EDTA(pH 8.0)50μlで再び懸濁させた。

【0293】

上述のように調製した藻の全DNA5μlを、10mM Tris、pH 8.0で1:50に希釈した。最終容積が20μlのPCR反応を以下のように設定した。2×iPr of HFマスターミックス(BIO-RAD)10μlを、0.4μlのプライマーSZ02613(10mMストック濃度の5'-TGTTGAAGAAATGAGCCGGCGAC-3'(配列番号13))に加えた。このプライマー配列は、Gen Bank 寄託番号L43357の位置567~588であり、高等植物及び藻の色素体ゲノムにおいて高度に保存されている。次いで、これに0.4μlのプライマーSZ02615(10mMストック濃度の5'-CAGTGAGCTATTACGCACCTC-3'(配列番号14))を加えた。このプライマー配列は、Gen Bank 寄託番号L43357の位置1112~1093と相補性であり、高等植物及び藻の色素体ゲノムにおいて高度に保存されている。次いで、希釈した全DNA5μl及びdH₂O 3.2μlを加えた。PCR反応を以下のように行った。98、45秒;98、8秒;53、12秒;72、20秒を35サイクル繰り返した後、72で1分、25で保持。PCR産物を精製するために、核反応物に10mM Tris、pH 8.0 20μlを加えた後、フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール 12:12:1 40μlで抽出し、ボルテックスし、14,000×gで5分間遠心分離処理した。PCR反応物をS-400カラム(GE Healthcare)に入れ、3,000×gで2分間遠心分離処理した。次いで、精製したPCR産物を、PCR8/GW/TOPOへとTOPOGRAPHYクローン化し、LB/Specプレートで陽性クローンを選択した。

【0294】

精製したプラスミドDNAについて、M13の順プライマー及び逆プライマーを用い、両方向で配列を決定した。23S rRNA DNAの配列が決定された全部で12種類のプロトテカ株を選択し、これらの配列を、配列表に列挙している。株及び配列表の番号のまとめは、以下にある。UTEX 1435(配列番号5)配列との全体的な違いについて、配列を分析した。最も違う配列として、2対があらわれた(UTEX 329/UTEX 1533及びUTEX 329/UTEX 1440)。これら両者の場合で、ペアワイズアラインメントから、一対の配列同一性が75.0%であった。UTEX 1435の配列同一性の割合も、以下に示している。

10

20

30

40

50

【化 2】

種	株	ヌクレオチド同一性%	配列番号
プロトテカ・クルエガニ	UTEX 329	75.2	配列番号 1
プロトテカ・ウィッカーハ ミー	UTEX 1440	99	配列番号 2
プロトテカ・スタグノラ	UTEX 1442	75.7	配列番号 3
プロトテカ・モリフォルミ ス	UTEX 288	75.4	配列番号 4
プロトテカ・モリフォルミ ス	UTEX 1439; 1441; 1435; 1437	100	配列番号 5
プロトテカ・ウィッカーハ ミー	UTEX 1533	99.8	配列番号 6
プロトテカ・モリフォルミ ス	UTEX 1434	75.9	配列番号 7
プロトテカ・ゾフィー	UTEX 1438	75.7	配列番号 8
プロトテカ・モリフォルミ ス	UTEX 1436	88.9	配列番号 9

10

【0295】

上に列挙した株の部分集合から得られた脂質サンプルについて、HPLCを用いて脂質プロファイルを分析した。結果を以下の表3に示す。

【表 3】

20

表3. 微細藻類の種における脂質鎖の違い

株	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0	C20:1
UTEX 327	0	12.01	0	0	50.33	17.14	0	0	0
UTEX 1441	1.41	29.44	0.70	3.05	57.72	12.37	0.97	0.33	0
UTEX 1435	1.09	25.77	0	2.75	54.01	11.90	2.44	0	0

実施例 2：プロトテカの形質転換方法

A. プロトテカの微粒子銃形質転換のための一般的方法

【0296】

Seashell Technology製のS550d金担体を、製造業者のプロトコルに従って調製した。線状プラスミド(20 µg)を、結合バッファ50 µl及びS550d金担体60 µl(30 mg)と混合し、氷中、1分間インキュベートした。沈殿バッファ(100 µl)を加え、この混合物を氷中でさらに1分間インキュベートした。ボルテックスした後、DNAでコーティングされた粒子を、5415C微量遠心器で10,000 rpmで10秒間回転させることによって、ペレット状にした。この金ペレットを冷たい100%エタノール500 µlで洗浄し、微量遠心器で軽く攪拌することによってペレット状にし、氷冷したエタノール50 µlで再び懸濁させた。軽く(1~2秒)音波処理した後、10 µlのDNAコーティングされた粒子を、すぐにキャリア膜に移した。

30

【0297】

プロトテカ株を、プロテオース培地(2 g/L 酵母抽出物、2.94 mM NaNO₃、0.17 mM CaCl₂・2H₂O、0.3 mM MgSO₄・7H₂O、0.4 mM K₂HPO₄、1.28 mM KH₂PO₄、0.43 mM NaCl)中、旋回シェーカー上に置いて細胞密度が2×10⁶細胞/mlになるまで成長させた。この細胞を収穫し、滅菌蒸留水で1回洗浄し、培地50 µlに再び懸濁させた。非選択的なプロテオース培地プレートの中央の1/3に1×10⁷細胞を広げた。この細胞を、PDS-1000/He Biolistic Particle Deliveryシステム(Bio-Rad)で撃った。破裂ディスク(1100 psi及び1350 psi)を用い、上述のプレートを、スクリーン/マクロキャリアの集合体から9 cm及び12 cm下に置く。細胞を25℃で12~24時間回復させた。回復したら、ゴム製スパチュラで細胞を

40

50

プレートから掻き取り、培地 100 μ l と混合し、適切に選別した抗生物質を含むプレートに広げた。播種してから 25 で 7 ~ 10 日経過後、形質転換された細胞を示すコロニーが、1100 psi 及び 1350 psi の破裂ディスクからのプレート上にあるのが目視で確認され、距離は 9 cm 及び 12 cm であった。コロニーを取り出し、2 回目の選択のために選択的な寒天プレートにスポットとして載せた。

実施例 3：キシロースを代謝し得る微細藻類株の生成

【0298】

プロトテカ種において異種外因性遺伝子を発現する方法および効果、例えばコドン最適化および染色体組換え部位は、PCT 出願 PCT/US2009/66142（これらの教示に関しては、参照により本明細書中に組入れられる）に以前に記載されている。本実施例は、キシロースの代謝および輸送のための外因性遺伝子を含有するプロトテカ・モリフォルミス（UTEX 1435）由来のトランスジェニック株の生成を実証する。その結果としての生成されるトランスジェニックプロトテカ株は、単独炭素源としてキシロースを含有する培地上で成長する能力を有した。上記のように、（ペントースである）キシロースはセルロース系物質由来の供給原料の有意の構成成分であるため、キシロースを代謝する能力は重要である。キシロースは、ヘミセルロースの主な糖単量体構成成分であり、これは、セルロースとともに、ほとんどの植物物質の主な構造構成成分を形成する。

【0299】

経時的な液体培地中での糖レベルの分析的測定により示されるように、プロトテカ・モリフォルミス（UTEX 1435）が少量のキシロースをキシリトールに転化し得る、ということを示す予備的結果は示した。培地中の炭素源として 0.25% グルコースを伴う 4% キシロース中で、上記の実施例 1 に記載したような培地および条件で、プロトテカ・モリフォルミス（UTEX 1435）を培養した。非細胞付加陰性対照、ならびに成長に関する陽性対照として 4% グルコース条件およびキシリトール産生に関する陰性対照も包含した。表 4 は、陰性対照条件ではキシリトールは産生されなかったが、一方、プロトテカ細胞を有するキシロース含有培地は、培養中で 5 日後の培養上清中に、検出可能量のキシリトールを産生した、ということを示している。グルコースのみの条件では活発な細胞成長が認められたが、検出可能レベルのキシリトールは産生されなかった。

【表 4】

表 4.

株	培地	5 日目		
		OD750	キシロース (g/L)	キシリトール (g/L)
無細胞対照	4%キシロース +0.25%グルコース	0.0	41.0	検出されず
UTEX 1435	4%キシロース +0.25%グルコース	2.4	37.7	<2.5g/L で検出
UTEX 1435	4%グルコース 対照	15.4	検出されず	検出されず

【0300】

この結果は、プロトテカ・モリフォルミスにおける内因性アルド - ケトレダクターゼ酵素活性により、キシロースがキシリトールに転化され得る、ということを示し得る。NADPH 依存性オキシドレダクターゼのこのファミリーに属する酵素は、形質膜の境界内に存在し、そのような酵素がキシロースがキシリトールに転化するのに関与するならば、培地中のキシロースは内因性糖輸送体を介して細胞中に進入していなければならない。

【0301】

キシロースを代謝し得る生物体では、キシロースはキシロース - 5 - ホスフェートに

転化され、これはさらに、ペントースホスフェート経路を介して代謝される。プロトテカ・モリフォルミスは、その周囲からキシロースを取込み得るが、しかしキシロースをキシルロース - 5 - ホスフェートに効率的に転化するその能力を欠いている。上記の表 4 に示した結果は、これが実情である、ということを示唆している。この仮説を試験するために、先ずキシロースをキシルロースに転化するためのキシロースイソメラーゼ、およびキシルロースをキシルロース - 5 - ホスフェートに転化するためのキシルロキナーゼを発現するための方法および試薬を、本発明は提供する。そのようなトランスジェニック微細藻類細胞の例示的説明は、プロトテカ・モリフォルミス (U T E X 1 4 3 5) を用いて以下で記載される。

【 0 3 0 2 】

ピロミセス種からのキシロースイソメラーゼ (X y 1 A) 遺伝子、およびピキア・スチピチスからのキシルロキナーゼ (X Y L 3) 遺伝子、および出芽酵母からのインベルターゼ遺伝子 (s u c 2 、選択可能マーカー) を発現するプロトテカ・モリフォルミスのトランスジェニック・レシピエント株を、P C T 特許公開 W O 2 0 1 0 / 0 6 3 0 3 1 および W O 2 0 1 0 / 0 6 3 0 3 2 (これらの方法のその教示に関しては、参照により本明細書中に組入れられる) に以前に記載された方法および形質転換を用いて生成した。陽性クローンを、スクロース含有培地およびプレート上で選択した。プロミセス種 X y 1 A の一次アミノ酸配列 (GenBank 寄託番号 C A B 7 6 5 7 1) を、配列番号 1 5 として記載する。ピキア・スチピチス X Y L 3 の一次アミノ酸配列 (GenBank 寄託番号 C A A 3 9 0 6 6 . 1 、参照により本明細書中に組入れられる) を、配列番号 5 1 として記載する。プロミセス種 X y 1 A / ピキア・スチピチス X Y L 形質転換カセットの関連部分を、以下に記載する。このカセットは、ゲノム組込みに関する 5 ' および 3 ' プロトテカ・モリフォルミス K E 8 5 8 相同組換え標的配列を含有した。これを、配列番号 1 6 および 1 7 として記載する。(1) コナミドリムシ - チュープリンプロモーターおよびクロレラ・ブルガリス硝酸塩レダクターゼ 3 ' U T R (配列番号 1 8) の制御下の出芽酵母 s u c 2 スクロースインベルターゼ遺伝子 ; (2) クロレラ・プロトテコイデス E F 1 a プロモーターおよび 3 ' U T R の制御下のピキア・スチピチス X Y L 3 ; ならびに (3) クロレラ・プロトテコイデス アクチンプロモーターおよび E F 1 a 3 ' U T R の制御下のピロミセス種 X y 1 A も含有される。陽性クローンをスクロース含有培地およびプレート上で選択し、ウエスタンブロットで、X y 1 A または X Y L 3 に対して生成されるウサギポリクローナル抗体を用いて、導入遺伝子の発現を確認した。

【 化 3 】

要素

配列番号

5' プロトテカ・モリフォルミス K E 8 5 8 相同組換え標的配列
3' プロトテカ・モリフォルミス K E 8 5 8 相同組換え標的配列
出芽酵母 s u c 2 インベルターゼカセット
クロレラ・プロトテコイデス アクチンプロモーター
コドン最適化ピキア・スチピチス X Y L 3 コード領域
クロレラ・プロトテコイデス E F 1 a 3' U T R
クロレラ・プロトテコイデス E F 1 a プロモーター
コドン最適化ピロミセス種 X y 1 A コード領域
クロレラ・プロトテコイデス E F 1 a 3' U T R

1 6
1 7
1 8
1 9
2 0
2 1
2 2
2 3
2 1

【 0 3 0 3 】

一旦、X y 1 A / X Y L 3 レシピエント株を生成し、ウエスタンブロットを用いて確認したら、次いで当該株を 2 つのカセットのうちの 1 つで形質転換した。第一のカセットは、抗生物質 G 4 1 8 に対する耐性を付与する遺伝子、ならびにプロトテカ・モリフォルミスからの同一トランスロケーターファミリーに属するオルソロガス遺伝子からの輸送ペプチドと取り替えられた色素体輸送ペプチドを有するシロイヌナズナからの付加的ホスフェ

ート／ペントースホスフェート・トランスロケーター遺伝子XPTを保有する組込み形質転換ベクターであった。一次アミノ酸配列（取替えられた輸送ペプチド配列番号25を含む）を、配列番号24で記載する。代替的色素体輸送ペプチド（配列番号26）も試みて、同様にうまくいった。第二のカセットは、抗生物質G418に対する耐性を付与する遺伝子、ならびにプロトテカ・モリフォルミスからの同トランスロケーターファミリーに属するオルソロガス遺伝子からの輸送ペプチドと取り替えられた色素体輸送ペプチドを有するシロイヌナズナからの付加的ホスフェート／ペントースホスフェート・トランスロケーター遺伝子XPT、ならびにピキア・スチピチスXYL2遺伝子、キシリトールデヒドロゲナーゼを含有するエピソード（非組込み型）形質転換ベクターであった。酵母（例えば、ピキア属）では、Xy1Aは、キシリトールによりある程度抑制され得る。非形質転換プロトテカ細胞を用いて培養上清を調べる上記の予備実験は、キシロースから直接キシリトールを生成する内因性レダクターゼ活性を示す培地中の検出可能な低レベルキシリトールを示した。XYL2キシリトールデヒドロゲナーゼを含有するこの第二の構築物は、Xy1Aにおけるそのようなキシリトール抑制を軽減する方法を提供する。これら2つのベクターの各々の関連部分は、下記の個々のカセット構成成分とともに、それぞれ配列番号32および配列番号23として記載する。XPT単独組込みカセットは、5'および3'プロトテカ・モリフォルミス6S相同組換え標的配列およびネオマイシン耐性遺伝子（コナミドリムシβ-チューブリンプロモーターおよびクロレラ・ブルガリス硝酸塩レダクターゼ3'UTRの制御下）、（上記のような）取替え輸送ペプチド配列を有するシロイヌナズナXPT遺伝子（クロレラ・プロトテコイデスアクチンプロモーターおよびEF1a3'UTRの制御下）を含有した。エピソードカセットは、ネオマイシン耐性遺伝子（クロレラ・ソロキニアナGdhプロモーターおよびクロレラ・ブルガリス硝酸塩レダクターゼ3'UTRの制御下）；ピキア・スチピチスXYL2遺伝子（クロレラ・プロトテコイデスアクチンプロモーターおよびEF1a3'UTRの制御下）；およびシロイヌナズナXPT遺伝子（コナミドリムシβ-チューブリンプロモーターおよびクロレラ・プロトテコイデスEF1a3'UTRの制御下）を含有した。

10

20

30

40

50

【化4】

要素

配列番号

組込みカセット

5'プロトテカ・モリフォルミス6S相同組換え標的配列	配列番号27
3'プロトテカ・モリフォルミス6S相同組換え標的配列	配列番号28
ネオマイシンカセット（コナミドリムシβ-チューブリンプロモーターおよびクロレラ・ブルガリス硝酸塩レダクターゼ3'UTR）	配列番号29
クロレラ・プロトテコイデスアクチンプロモーター	配列番号19
コドン最適化シロイヌナズナXTPコード領域	配列番号30
クロレラ・プロトテコイデスEF1a3'UTR	配列番号21

非組込みカセット

ネオマイシンカセット（クロレラ・ソロキニアナGdhプロモーターおよびクロレラ・ブルガリス硝酸塩レダクターゼ3'UTR）	配列番号31
クロレラ・プロトテコイデスアクチンプロモーター	配列番号19
コドン最適化ピキア・スチピチスXYL2コード領域	配列番号32
コナミドリムシβ-チューブリンプロモーター	配列番号33
コドン最適化シロイヌナズナXPTコード領域	配列番号30
クロレラ・プロトテコイデスEF1a3'UTR	配列番号21

50 μg/ml G418を有するスクロース含有培地／プレートを用いて、両形質転換からの陽性クローンを選択した。

【0304】

形質転換からの多数の陽性クローンのうち、2つの株（各形質転換から1つ）を、さら

に詳細な特性決定のために選択した。両株を、単独炭素源として2%キシロースを含有する固体培地プレート上で増殖させた。3～4週間のインキュベーション後、これらのトランスジェニック株に関して増殖を測定し、両トランスジェニック株に関して増殖を観察したが、しかし、XylAおよびXyl3導入遺伝子のみを含有する親レシピエント株に関しては観察されなかった。これらの結果の確証を実施して、液体培地環境を用いてキシロース消費を調べた。両トランスジェニック株(XylA、Xyl3、XPTおよびXyl2；XylA、Xyl3およびXPT)および親レシピエント株(XylAおよびXyl3のみ)を含有する液体培養を、単独炭素源として2%キシロースを用いて、実施した。増殖(OD750読取により測定)およびキシロース消費(培地中に残存するキシロースの量を測定)を、培養中の種々の時点で測定した。増殖またはキシロース消費は親レシピエント株においては観察されなかったが、一方、両トランスジェニック株は、増殖およびキシロース消費を示した。表5は、増殖およびキシロース消費結果を要約する。

【表5】

表5. 増殖およびキシロース消費結果

発現遺伝子	Carbon source	6日目		8日目	
		OD750	キシロース (g/L)	OD750	キシロース (g/L)
無細胞 対照	2%キシロース+0.5%グルコース	0.0	21.3	0.0	20.5
XylA, XYL3	2%キシロース+0.5%グルコース	4.7	20.4	5.1	17.9
XylA, XYL3	2%キシロース+0.5%グルコース	4.4	21.3	4.6	19.1
XylA, XYL3, XPT, XYL2 (duplicate 1)	2%キシロース+0.5%グルコース	6.8	15	8.2	9.1
XylA, XYL3, XPT, XYL2 (duplicate 2)	2%キシロース+0.5%グルコース	6.3	16	7.4	11.4
なし	2%キシロース	0.0	23.9	0.0	23.9
XylA, XYL3	2%キシロース	0.0	23.9	0.1	21.7
XylA, XYL3, XPT, XYL2	2%キシロース	1.0	21.2	2.6	19.3
発現遺伝子	Carbon source	7日目		25日目	
		OD750	キシロース (g/L)	OD750	キシロース (g/L)
無細胞 対照	2%キシロース+0.5%グルコース	0	24.2	0	25.7
XylA, XYL3	2%キシロース+0.5%グルコース	5.2	21.6	4.8	20.4
XylA, XYL3, XPT	2%キシロース+0.5%グルコース	5.6	18.3	10.6	検出せず

実施例4：細胞質中にキシロースを輸送するための輸送体を発現する遺伝子操作微生物株の生成

【0305】

4つのキシロース特異的輸送体(SUT1、GXS1、共輸送体およびXLT1；それぞれ、配列番号37、39、41および43)(このうちのいくつかはキシロースを能動的に輸送し、そしていくつかは細胞中へのキシロースの受動的拡散を可能にする)を、ブ

ロトテカ・モリフォルミスにおいて導入遺伝子として発現させた。各キシロース輸送体に関する遺伝子をコドン最適化して（コドン最適化コード領域を、それぞれ配列番号36、38、40および42で示す）、プロトテカ・モリフォルミス中での最大発現を可能にし、そしてクロレラ・プロトテコイデス アクチンプロモーターおよびEF1a 3'UTRの制御下で微細藻類のゲノム中に挿入した。4つの遺伝子の各々の発現を、それらの挿入および細胞膜への局在化が認められたとして確証した。細胞膜への局在化の確証は、インフレイムでの蛍光タンパク質をコードするDNA配列を輸送体導入遺伝子の各々のカルボキシル末端と融合すること、そして蛍光顕微鏡を利用して当該構築物を発現する細胞を観察することを包含した。

【0306】

そのカルボキシル末端と融合された蛍光タンパク質を有する4つの輸送体の各々を発現する細胞の顕微鏡写真は、輸送体が発現され、細胞膜に局在化される、ということを示した。

実施例5：キシロースのキシルロース-5-ホスフェートへの転化のための酵素を発現する遺伝子操作微細藻類株の生成

【0307】

キシロースのキシルロース-5-ホスフェートへの生化学的転化のための2つの代替的経路に対応する)、オキシドレダクターゼ経路酵素をコードするコドン最適化遺伝子XYL1、XYL2またはXYL3(それぞれ、配列番号34、32および20)、あるいはイソメラーゼ経路酵素をコードする遺伝子XylAまたはXYL3(それぞれ、配列番号23および20)を発現するよう、プロトテカ・モリフォルミスに遺伝子操作した。2つの経路は、同一末端酵素(XYL3)を共有する。各遺伝子の発現を、RNAレベルで確証した。さらに、各遺伝子産物に対して抗体を生成して、ウエスタンブロット分析を用いたタンパク質レベルでの発現のさらなるモニタリングを可能にした。予測サイズ帯域に対応するタンパク質は、対応する挿入された導入遺伝子を含むトランスジェニック株から作られた抽出物中で観察されたが、しかし非形質転換親細胞では観察されなかった。

【0308】

キシロースのキシルロース-5-ホスフェートへの転化に関与する酵素の発現はプロトテカ・モリフォルミス細胞においてキシロースを代謝する能力を最初に付与するとは思えなかったが、しかしキシロース上で増殖する能力は、導入遺伝子のコピー数を増大することにより付与された。選択可能マーカーを用いて、これらの酵素をコードする遺伝子のコピー数を増大した。元の親細胞は、3つの導入遺伝子(suc2、XylAおよびXYL3)すべてに関して1つのコピー数を有し、キシロース上で増殖するようには見えなかったが、しかしスクロース上で増殖する能力がキシロース代謝酵素をコードする遺伝子に隣接する遺伝子(suc2)により付与される選択下での増殖後、特性化された3つの個々の単離物が、3つの導入遺伝子のすべてのコピー数を3~50倍増大した。コピー数増大を示す単離物を、キシロース上での増殖に関して査定した。コピー数の最大増加(約50倍)を示した単離物Aは、キシロース上で増殖する能力を獲得していた。元の親はキシロース上で増殖できなかった(2つの単離物(BおよびC)は、コピー数の中等度の増大(約3~4倍)を示しただけであった)。キシロース上で増殖する単離物Aの能力は、導入遺伝子が発現され、異種生物体中でその酵素活性を保持し、そしてキシロースを利用する能力をその生物体に付与し得る、ということを実証している。

実施例6：ペントースホスフェート代謝経路へのキシルロース-5-ホスフェートの送達のためのトランスロケーターを発現する遺伝子操作微細藻類株の生成

【0309】

キシルロース-5-ホスフェートを特異的に輸送する3つのキメラ植物トランスロケーターのうちの1つを発現するよう、プロトテカ・モリフォルミスに遺伝子操作した。最終細胞送達先/区画へのキシルロース-5-ホスフェートの輸出を改良するために、植物ト

10

20

30

40

50

ランスロケーター遺伝子（シロイヌナズナXPT）によりコードされる輸送ペプチドを、プロトテカ・モリフォルミスに見出される内因性トランスロケーターまたはクロレラ・プロトコイデスのSAD遺伝子において特定される3つの輸送ペプチドのうちの1つと取り替えることにより、キメラ遺伝子を生成した。コンティグ集合体からプロトテカ・モリフォルミス中のトランスロケーター・オルソログの部分DNA配列を選択し、選択配列を増幅することにより、内因性プロトテカ輸送ペプチドを特定した。増幅から生成されている生成物をクローン化し、配列決定して、得られた配列からシグナルペプチドを得た。キメラ遺伝子産物は、色素体の内膜に局在した；これは、蛍光タンパク質をトランスロケーターキメラのカルボキシル末端と融合し、蛍光顕微鏡を用いて融合を発現する細胞を検査することにより確定した。蛍光シグナルは、色素体の内膜における局在化と一致して、細胞内のオルガネラ様構造の周囲に濃縮されているように見えた。3つのキメラトランスロケーターGPT-A-XPT、GPT-F-XPTおよびS106SAD-XPTを、それぞれ配列番号45、47および49で示す。

10

実施例7：キシロース代謝のための遺伝子の組合せを発現する遺伝子操作微細藻類株の生成

【0310】

本明細書中の実施例で実証されたように、キシロース代謝酵素をコードする個々の導入遺伝子は、プロトテカ・モリフォルミス中に首尾よく挿入された。単一細胞中でこれらの種々の導入遺伝子を組合せることの効果を調べるために、実施例4～6で論じた導入遺伝子のある組合せ（表6の遺伝子型を参照）を含有するプロトテカ・モリフォルミスの株を調製し、キシロース代謝に関してスクリーニングした。

20

【0311】

各々の独自の遺伝子型を有する10種の個々の形質転換体をクローン精製し、単独炭素源として2.5%キシロースのみを含有する固体培地上での増殖に関して査定した。単独炭素源としてキシロースを含有する液体培養中で、可能性のある陽性クローンをさらに試験した。培養の光学密度を測定することにより、細胞の増殖をモニタリングした。実験終了時に、キシロース含量に関して培養上清を分析した。表6は、陰性対照（株A、BおよびC）と比較した場合の、最良の10株（株D～M）の最終増殖およびキシロース消費を示す。株D～Mは、培地中のキシロースのすべてが実験収量までに消失していたので、明らかにキシロースを消費できる。これに対比して、実験開始時に存在した同量のキシロースが、陰性対照株A、BおよびCを増殖させている培地中では、実験終了時にも依然として検出された。キシロースの消失は細胞密度を増大することにより成し遂げられたが、これは、キシロースからの炭素が細胞増殖を指示するために用いられていたことを示している。これに対比して、陰性対照は、実験経過全体を通して細胞密度を増大せず、実験終了時に、培地は、実験開始時に培地中に存在していたキシロースとほぼ同量のキシロースを含有しており、これは、キシロースが全く消費されなかったか、あるいはキシロース消費が非常に少量であった、ということを示している。

30

【表 6】

表 6. 陰性対照と比較した場合の遺伝子操作株のキシロース利用および増殖

株	遺伝子型	達成最高OD の割合	培地中に残存す るキシロース、 g/L
A	野生型プロトテカ・モリフォルミス UTEX1435	5.0	27.1
B	XylA, XYL3	5.7	24.4
C	XYL2, XYL3	5.7	26.4
D	XylA, XYL3, SUT1, GPT-F-XPT	80.1	0.0
E	XylA, XYL3, SUT1, GPT-F-XPT	68.6	0.0
F	XylA, XYL2, XYL3, XLT1, S106SAD-XPT	100.0	0.0
G	XylA, XYL1, XYL3, XLT1, S106SAD-XPT	81.9	0.0
H	XylA, XYL1, XYL3, GXS1, GPT-A-XPT	62.8	0.0
I	XYL1, XYL2, XYL3, 共輸送体, GPT-F-XPT	67.9	0.0
J	XYL1, XYL2, XYL3, GXS1, GPT-F-XPT	81.8	0.0
K	XYL2, XYL3, 共輸送体, S106SAD-XPT	74.4	0.0
L	XYL2, XYL3, XLT1, S106SAD-XPT	82.9	0.0
M	XYL2, XYL3, GXS1, GPT-A-XPT	92.0	0.0

10

【0312】

独自の遺伝子型を有する多数の株が、単独炭素源としてキシロースを用いてバイオマスにおける明らかな増大を示した。これらの結果は、キシロースをキシロース - 5 - ホスフェートに生化学的に転化された細胞中にキシロースを輸送し、内因性中枢代謝経路にキシロース - 5 - ホスフェートを送達するする多数の導入遺伝子または導入遺伝子の群での形質転換によりキシロース上で増殖するよう微細藻類が遺伝子操作された、ということを実証している。

20

実施例 8：キシロース代謝化部の脂質産生能力

【0313】

実施例 7 からのキシロース代謝株 A ~ M を、単独炭素源としてキシロースを用いて増殖させた場合に油を産生する能力に関して評価した。キシロース代謝株を、陰性対照株とともに、脂質生産力検定に付した。まず、グルコースを含有する培地中で細胞を増殖させて、次に、単独炭素源としてグルコースまたはキシロースを用いた脂質生産力期に付した。糖が培養から枯渇するようになった場合、消費が終結するまで、もっと多くの対応する糖を細胞に供給した。この時点で、実験を終結して、細胞を脂質含量に関して分析した。表 7 は、脂質分析の結果を示す。全株を、乾燥細胞重量の割合として脂質と同様に表されるグルコースに関して、株 A の成果に対して正規化した。遺伝子操作株はすべて、培養にグルコースを供給した場合、親非遺伝子操作対照株と同様な結果を示した。陰性対照株 (A、B、C) は、キシロース上で培養した場合、少量の脂質を産生した (グルコース中の株 A により通常生成される量の 6 ~ 8 %)。これに对比して、キシロース代謝株は 10 株すべてが、キシロース中で培養した場合、有意量の脂質を産生することができた。最良株である L は、グルコース上で増殖した場合、株 A により通常生成される脂質の量の 60 % までを蓄積した。

30

40

【表 7】

表 7. グルコースまたはキシロース中で増殖したキシロース代謝株の脂質生産力

株	遺伝子型	グルコース中の対照脂質生産に対するパーセント	キシロース中の対照脂質生産に対するパーセント
A	野生型プロトテカ・モリフォルミス UTEX1435	100	8.9
B	XylA, XYL3	93.8	6.6
C	XYL2, XYL3	93.5	6.2
D	XylA, XYL3, SUT1, GPT-F-XPT	93.5	32.4
E	XylA, XYL3, SUT1, GPT-F-XPT	103.8	34
F	XylA, XYL2, XYL3, XLT1, S106SAD-XPT	101	30.5
G	XylA, XYL1, XYL3, XLT1, S106SAD-XPT	100.8	32.2
H	XylA, XYL1, XYL3, GXS1, GPT-A-XPT	100	32.4
I	XYL1, XYL2, XYL3, 共輸送体, GPT-F-XPT	104.7	45.7
J	XYL1, XYL2, XYL3, GXS1, GPT-F-XPT	99.9	30.6
K	XYL2, XYL3, 共輸送体, S106SAD-XPT	102.5	35
L	XYL2, XYL3, XLT1, S106SAD-XPT	100.8	60.2
M	XYL2, XYL3, GXS1, GPT-A-XPT	102	27.8

10

【0314】

20

これらの結果は、挿入経路がキシロースからの炭素を転じて、それを利用して脂質を生産し得る、ということを示している。

【0315】

本発明を、その具体的実施形態と関連づけて記載してきたが、それはさらなる修正が可能であることが理解されるであろう。本出願は、概して、本発明の原則に従って、そして本発明が関する当該技術分野内の既知のまたは慣例的実行内であるような、ならびに本明細書中に前記した本質的特徴に当てはまり得るような本発明からの逸脱を含めて、本発明のあらゆる変形、使用または適応を網羅するよう意図される。

配列表

30

配列番号 1

UTEX 329 プロトテカ・クルエガニ

T G T T G A A G A A T G A G C C G G C G A G T T A A A A G A G T G G C A T G G
T T A A A G A A A A T A C T C T G G A G C C A T A G C G A A A G C A A G T T T A
G T A A G C T T A G G T C A T T C T T T T A G A C C C G A A A C C G A G T G A
T C T A C C C A T G A T C A G G G T G A A G T G T T A G T A A A A T A A C A T G
G A G G C C C G A A C C G A C T A A T G T T G A A A A A T T A G C G G A T G A A
T T G T G G G T A G G G G C G A A A A A C C A A T C G A A C T C G G A G T T A G
C T G G T T C T C C C C G A A A T G C G T T T A G G C G C A G C A G T A G C A G
T A C A A A T A G A G G G G T A A A G C A C T G T T T C T T T T G T G G G C T T
C G A A A G T T G T A C C T C A A A G T G G C A A A C T C T G A A T A C T C T A
T T T A G A T A T C T A C T A G T G A G A C C T T G G G G G A T A A G C T C C T
T G G T C A A A A G G G A A A C A G C C C A G A T C A C C A G T T A A G G C C C
C A A A A T G A A A A T G A T A G T G A C T A A G G A T G T G G G T A T G T C A
A A A C C T C C A G C A G G T T A G C T T A G A A G C A G C A A T C C T T T C A
A G A G T G C G T A A T A G C T C A C T G

40

配列番号 2

UTEX 1440 プロトテカ・ウィッカーハミー

50

T G T T G A A G A A T G A G C C G G C G A C T T A A A A T A A A T G G C A G G C
T A A G A G A T T T A A T A A C T C G A A A C C T A A G C G A A A G C A A G T C
T T A A T A G G G C G T C A A T T T A A C A A A A C T T T A A A T A A A T T A T
A A A G T C A T T T A T T T T A G A C C C G A A C C T G A G T G A T C T A A C C
A T G G T C A G G A T G A A A C T T G G G T G A C A C C A A G T G G A A G T C C
G A A C C G A C C G A T G T T G A A A A A T C G G C G G A T G A A C T G T G G T
T A G T G G T G A A A T A C C A G T C G A A C T C A G A G C T A G C T G G T T C
T C C C C G A A A T G C G T T G A G G C G C A G C A A T A T A T C T C G T C T A
T C T A G G G G T A A A G C A C T G T T T C G G T G C G G G C T A T G A A A A T
G G T A C C A A A T C G T G G C A A A C T C T G A A T A C T A G A A A T G A C G
A T A T A T T A G T G A G A C T A T G G G G G A T A A G C T C C A T A G T C G A
G A G G G A A A C A G C C C A G A C C A C C A G T T A A G G C C C C A A A A T G
A T A A T G A A G T G G T A A A G G A G G T G A A A A T G C A A A T A C A A C C
A G G A G G T T G G C T T A G A A G C A G C C A T C C T T T A A A G A G T G C G
T A A T A G C T C A C T G

10

配列番号 3

U T E X 1 4 4 2 プロトテカ・スタグノラ

20

T G T T G A A G A A T G A G C C G G C G A G T T A A A A A A A A T G G C A T G G
T T A A A G A T A T T T C T C T G A A G C C A T A G C G A A A G C A A G T T T T
A C A A G C T A T A G T C A T T T T T T T T A G A C C C G A A A C C G A G T G A
T C T A C C C A T G A T C A G G G T G A A G T G T T G G T C A A A T A A C A T G
G A G G C C C G A A C C G A C T A A T G G T G A A A A A T T A G C G G A T G A A
T T G T G G G T A G G G G C G A A A A A C C A A T C G A A C T C G G A G T T A G
C T G G T T C T C C C C G A A A T G C G T T T A G G C G C A G C A G T A G C A A
C A C A A A T A G A G G G G T A A A G C A C T G T T T C T T T T G T G G G C T T
C G A A A G T T G T A C C T C A A A G T G G C A A A C T C T G A A T A C T C T A
T T T A G A T A T C T A C T A G T G A G A C C T T G G G G G A T A A G C T C C T
T G G T C A A A A G G G A A A C A G C C C A G A T C A C C A G T T A A G G C C C
C A A A A T G A A A A T G A T A G T G A C T A A G G A C G T G A G T A T G T C A
A A A C C T C C A G C A G G T T A G C T T A G A A G C A G C A A T C C T T T C A
A G A G T G C G T A A T A G C T C A C T G

30

配列番号 4

U T E X 2 8 8 プロトテカ・モリフォルミス

40

T G T T G A A G A A T G A G C C G G C G A G T T A A A A A G A G T G G C A T G G
T T A A A G A T A A T T C T C T G G A G C C A T A G C G A A A G C A A G T T T A
A C A A G C T A A A G T C A C C C T T T T T A G A C C C G A A A C C G A G T G A
T C T A C C C A T G A T C A G G G T G A A G T G T T G G T A A A A T A A C A T G
G A G G C C C G A A C C G A C T A A T G G T G A A A A A T T A G C G G A T G A A
T T G T G G G T A G G G G C G A A A A A C C A A T C G A A C T C G G A G T T A G
C T G G T T C T C C C C G A A A T G C G T T T A G G C G C A G C A G T A G C A A
C A C A A A T A G A G G G G T A A A G C A C T G T T T C T T T T G T G G G C T T
C G A A A G T T G T A C C T C A A A G T G G C A A A C T C T G A A T A C T C T A
T T T A G A T A T C T A C T A G T G A G A C C T T G G G G G A T A A G C T C C T
T G G T C A A A A G G G A A A C A G C C C A G A T C A C C A G T T A A G G C C C
C A A A A T G A A A A T G A T A G T G A C T A A G G A T G T G G G T A T G T T A

50

A A A C C T C C A G C A G G T T A G C T T A G A A G C A G C A A T C C T T T C A
A G A G T G C G T A A T A G C T C A C T G

配列番号 5

U T E X 1 4 3 9、U T E X 1 4 4 1、U T E X 1 4 3 5、U T E X 1 4 3 7
プロトテカ・モリフォルミス

T G T T G A A G A A T G A G C C G G C G A C T T A A A A T A A A T G G C A G G C
T A A G A G A A T T A A T A A C T C G A A A C C T A A G C G A A A G C A A G T C
T T A A T A G G G C G C T A A T T T A A C A A A A C A T T A A A T A A A A T C T 10
A A A G T C A T T T A T T T T A G A C C C G A A C C T G A G T G A T C T A A C C
A T G G T C A G G A T G A A A C T T G G G T G A C A C C A A G T G G A A G T C C
G A A C C G A C C G A T G T T G A A A A A T C G G C G G A T G A A C T G T G G T
T A G T G G T G A A A T A C C A G T C G A A C T C A G A G C T A G C T G G T T C
T C C C C G A A A T G C G T T G A G G C G C A G C A A T A T A T C T C G T C T A
T C T A G G G G T A A A G C A C T G T T T C G G T G C G G G C T A T G A A A A T
G G T A C C A A A T C G T G G C A A A C T C T G A A T A C T A G A A A T G A C G
A T A T A T T A G T G A G A C T A T G G G G G A T A A G C T C C A T A G T C G A
G A G G G A A A C A G C C C A G A C C A C C A G T T A A G G C C C C A A A A T G
A T A A T G A A G T G G T A A A G G A G G T G A A A A T G C A A A T A C A A C C 20
A G G A G G T T G G C T T A G A A G C A G C C A T C C T T T A A A G A G T G C G
T A A T A G C T C A C T G

配列番号 6

U T E X 1 5 3 3 プロトテカ・ウィッカーハミー

T G T T G A A G A A T G A G C C G T C G A C T T A A A A T A A A T G G C A G G C
T A A G A G A A T T A A T A A C T C G A A A C C T A A G C G A A A G C A A G T C
T T A A T A G G G C G C T A A T T T A A C A A A A C A T T A A A T A A A A T C T 30
A A A G T C A T T T A T T T T A G A C C C G A A C C T G A G T G A T C T A A C C
A T G G T C A G G A T G A A A C T T G G G T G A C A C C A A G T G G A A G T C C
G A A C C G A C C G A T G T T G A A A A A T C G G C G G A T G A A C T G T G G T
T A G T G G T G A A A T A C C A G T C G A A C T C A G A G C T A G C T G G T T C
T C C C C G A A A T G C G T T G A G G C G C A G C A A T A T A T C T C G T C T A
T C T A G G G G T A A A G C A C T G T T T C G G T G C G G G C T A T G A A A A T
G G T A C C A A A T C G T G G C A A A C T C T G A A T A C T A G A A A T G A C G
A T A T A T T A G T G A G A C T A T G G G G G A T A A G C T C C A T A G T C G A
G A G G G A A A C A G C C C A G A C C A C C A G T T A A G G C C C C A A A A T G
A T A A T G A A G T G G T A A A G G A G G T G A A A A T G C A A A T A C A A C C 40
A G G A G G T T G G C T T A G A A G C A G C C A T C C T T T A A A G A G T G C G
T A A T A G C T C A C T G

配列番号 7

U T E X 1 4 3 4 プロトテカ・モリフォルミス

T G T T G A A G A A T G A G C C G G C G A G T T A A A A A G A G T G G C G T G G
T T A A A G A A A A T T C T C T G G A A C C A T A G C G A A A G C A A G T T T A
A C A A G C T T A A G T C A C T T T T T T T A G A C C C G A A A C C G A G T G A
T C T A C C C A T G A T C A G G G T G A A G T G T T G G T A A A A T A A C A T G
G A G G C C C G A A C C G A C T A A T G G T G A A A A A T T A G C G G A T G A A 50

TTGTTGGGTAGGGGCGAAAAACCAATCGAAACTTCGGAGTTTAG
CTGGTTCTCCCCGAAATGCGTTTAGGCGCAGCAGTAGCAAA
CACAAATAGAGGGGTAAAGCAGCTGTTTCTTTTGTGGGCTC
CGAAAGTTGTACCTCAAAAGTGGCAAACTCTGAATACTCTA
TTTAGATATCTACTAGTGAGACCTTGGGGGGATAAGCTCCT
TGGTCGAAAGGGGAAACAGCCCCAGATCACCAAGTTAAAGGCC
CAAAATGAAATGATAGTGACTAAGGATGTGAGTATGTCA
AAACCTCCAGCAGGTTAGCTTAGAAAGCAGCAATCCTTTCA
AGAGTGCGTAAATAGCTCACTG

10

配列番号 8

UTEX 1438 プロテカ・ゾフィー

TGTTGAAGAATGAGCCGGCGAGTTAAAAAGAGTGGCATGG
TTAAAGAAAAATTCTCTGGAGCCATAGCGAAAGCAAGTTTA
ACAAGCTTAAGTCACTTTTTTTAGACCCGAAACCGAGTGA
TCTACCCCATGATCAGGGGTGAAGTGTGTTGGTAAAAATAACATG
GAGGCCCGAAACCGACTAATGGTGA AAAAATTAGCGGATGAA
TTGTGGGTAGGGGCGAAAAAACCAATCGAAACTTCGGAGTTAG
CTGGTTCTCCCCGAAATGCGTTTAGGCGCAGCAGTAGCAAA
CACAAATAGAGGGGTAAAGCAGCTGTTTCTTTCTGTGGGCTT
CGAAAGTTGTACCTCAAAAGTGGCAAACTCTGAATACTCTA
TTTAGATATCTACTAGTGAGACCTTGGGGGGATAAGCTCCT
TGGTCAAAAAGGGGAAACAGCCCCAGATCACCAAGTTAAAGGCC
CAAAATGAAATGATAGTGACTAAGGATGTGAGTATGTCA
AAACCTCCAGCAGGTTAGCTTAGAAAGCAGCAATCCTTTCA
AGAGTGCGTAAATAGCTCACTG

20

配列番号 9

UTEX 1436 プロテカ・モリフォルミス

TGTTGAAGAATGAGCCGGCGACTTAGAAAAAGGTGGCATGG
TTAAGGAATAATTC CGAAGCCGTAAGCAAAAAGCGAGTCTGA
ATAGGGCGATAAAAATATATTTAATATTTAGAAATCTAGTCAT
TTTTTTCTAGACCCGAAACCCGGGTGATCTAACCATGACCAAG
GATGAAGCTTTGGGTGATACCAAGTGAAGGTCCGAACCGAC
CGATGTTGA AAAAATCGGGCGGATGAGTTGTGGTTAGCGGTG
AAATACCAAGTCGAACCCGGAGCTAGCTGGTTCTCCCCGAA
ATGCGTTTGAGGCGCAGCAGTACATCTAGTCTATCTAGGGG
TAAAGCAGCTGTTTCTGGTGCGGGCTGTGAGAACGGTACCAAA
ATCGTGGCAAACTCTGAATACTAGAAATGACGATGTAGTA
GTGAGACTGTGGGGGATAAGCTCCATTGTCAAGAGGGGAAA
CAGCCCCAGACCAACAGCTAAGGCCCCCAAAATGGTAAATGTA
GTGACAAAAGGAGGTGAAAAATGCAAAATACAACCAAGGAGGT
GGCTTAGAAAGCAGCCATCCTTTAAAGAGTGCGTAAATAGCT
CACTG

40

配列番号 10

5'UTR / プロモータークロレラ・ソロキニアナグルタメートデヒドロゲナーゼ

50

C G C C T G C A A C G C A A G G G C A G C C A C A G C C G C T C C C A C C C G C
C G C T G A A C C G A C A C G T G C T T G G G C G C C T G C C G C C T G C C T G
C C G C A T G C T T G T G C T G G T G A G G C T G G G C A G T G C T G C C A T G
C T G A T T G A G G C T T G G T T C A T C G G G T G G A A G C T T A T G T G T G
T G C T G G G C T T G C A T G C C G G G C A A T G C G C A T G G T G G C A A G A
G G G C G G C A G C A C T T G C T G G A G C T G C C G C G G T G C C T C C A G G
T G G T T C A A T C G C G G C A G C C A G A G G G A T T T C A G A T G A T C G C
G C G T A C A G G T T G A G C A G C A G T G T C A G C A A A G G T A G C A G T T
T G C C A G A A T G A T C G G T T C A G C T G T T A A T C A A T G C C A G C A A
G A G A A G G G G T C A A G T G C A A A C A C G G G C A T G C C A C A G C A C G
G G C A C C G G G G A G T G G A A T G G C A C C A C C A A G T G T G T G C G A G
C C A G C A T C G C C G C C T G G C T G T T T C A G C T A C A A C G G C A G G A
G T C A T C C A A C G T A A C C A T G A G C T G A T C A A C A C T G C A A T C A
T C G G G C G G G C G T G A T G C A A G C A T G C C T G G C G A A G A C A C A T
G G T G T G C G G A T G C T G C C G G C T G C T G C C T G C T G C G C A C G C C
G T T G A G T T G G C A G C A G G C T C A G C C A T G C A C T G G A T G G C A G
C T G G G C T G C C A C T G C A A T G T G G T G G A T A G G A T G C A A G T G G
A G C G A A T A C C A A A C C C T C T G G C T G C T T G C T G G G T T G C A T G
G C A T C G C A C C A T C A G C A G G A G C G C A T G C G A A G G G A C T G G C
C C C A T G C A C G C C A T G C C A A A C C G G A G C G C A C C G A G T G T C C
A C A C T G T C A C C A G G C C C G C A A G C T T T G C A G A A C C A T G C T C
A T G G A C G C A T G T A G C G C T G A C G T C C C T T G A C G G C G C T C C T
C T C G G G T G T G G G A A A C G C A A T G C A G C A C A G G C A G C A G A G G
C G G C G G C A G C A G A G C G G C G G C A G C A G C G G C G G G G G C C A C C
C T T C T T G C G G G G T C G C G C C C C A G C C A G C G G T G A T G C G C T G
A T C C C A A A C G A G T T C A C A T T C A T T T G C A T G C C T G G A G A A G
C G A G G C T G G G G C C T T T G G G C T G G T G C A G C C C G C A A T G G A A
T G C G G G A C C G C C A G G C T A G C A G C A A A G G C G C C T C C C C T A C
T C C G C A T C G A T G T T C C A T A G T G C A T T G G A C T G C A T T T G G G
T G G G G C G G C C G G C T G T T T C T T T C G T G T T G C A A A A C G C G C C
A G C T C A G C A A C C T G T C C C G T G G G T C C C C C G T G C C G A T G A A
A T C G T G T G C A C G C C G A T C A G C T G A T T G C C C G G C T C G C G A A
G T A G G C G C C C T C C T T T C T G C T C G C C C T C T C T C C G T C C C G C
C A C T A G T G G C G C G C C

配列番号 1 1

クロレラからのHUPプロモーター (GenBank寄託番号X 5 5 3 4 9の亜配列)

G A T C A G A C G G G C C T G A C C T G C G A G A T A A T C A A G T G C T C G T
A G G C A A C C A A C T C A G C A G C T G C T T G G T G T T G G G T C T G C A G
G A T A G T G T T G C A G G G C C C C A A G G A C A G C A G G G G A A C T T A C
A C C T T G T C C C C G A C C C A G T T T T A T G G A G T G C A T T G C C T C A
A G A G C C T A G C C G G A G C G C T A G G C T A C A T A C T T G C C G C A C C
G G T A T G A G G G G A T A T A G T A C T C G C A C T G C G C T G T C T A G T G
A G A T G G G C A G T G C T G C C C A T A A A C A A C T G G C T G C T C A G C C
A T T T G T T G G C G G A C C A T T C T G G G G G G G C C A G C A A T G C C T G
A C T T T C G G G T A G G G T G A A A A C T G A A C A A A G A C T A C C A A A A
C A G A A T T T C T T C C T C C T T G G A G G T A A G C G C A G G C C G G C C C
G C C T G C G C C C A C A T G G C G C T C C G A A C A C C T C C A T A G C T G T
A A G G G C G C A A A C A T G G C C G G A C T G T T G T C A G C A C T C T T T C

A T G G C C A T A C A A G G T C A T G T C G A G A T T A G T G C T G A G T A A G
A C A C T A T C A C C C C A T G T T C G A T T G A A G C C G T G A C T T C A T G
C C A A C C T G C C C C T G G G C G T A G C A G A C G T A T G C C A T C A T G A
C C A C T A G C C G A C A T G C G C T G T C T T T T G C C A C C A A A A C A A C
T G G T A C A C C G C T C G A A G T C G T G C C G C A C A C C T C C G G G A G T
G A G T C C G G C G A C T C C T C C C C G G C G G G C C G C G G C C C T A C C T
G G G T A G G G T C G C C A T A C G C C C A C G A C C A A A C G A C G C A G G A
G G G G A T T G G G G T A G G G A A T C C C A A C C A G C C T A A C C A A G A C
G G C A C C T A T A A T A A T A G G T G G G G G G A C T A A C A G C C C T A T A
T C G C A A G C T T T T G G G T G C C T A T C T T G A G A A G C A C G A G T T G G
A G T G G C T G T G T A C G G T C G A C C C T A A G G T G G G T G T G C C G C A
G C C T G A A A C A A A G C G T C T A G C A G C T G C T T C T A T A A T G T G T
C A G C C G T T G T G T T T C A G T T A T A T T G T A T G C T A T T G T T T G T
T C G T G C T A G G G T G G C G C A G G C C C A C C T A C T G T G G C G G G C C
A T T G G T T G G T G C T T G A A T T G C C T C A C C A T C T A A G G T C T G A
A C G C T C A C T C A A A C G C C T T T G T A C A A C T G C A G A A C T T T C C
T T G G C G C T G C A A C T A C A G T G T G C A A A C C A G C A C A T A G C A C
T C C C T T A C A T C A C C C A G C A G T A C A A C A

10

20

配列番号 12

A Y 3 0 7 3 8 3 からのクロレラ・エリブソイディア硝酸塩レダクターゼプロモーター

C G C T G C G C A C C A G G G C C G C C A G C T C G C T G A T G T C G C T C C A
A A T G C G G T C C C C C G A T T T T T T G T T C T T C A T C T T C T C C A C C
T T G G T G G C C T T C T T G G C C A G G G C C T T C A G C T G C A T G C G C A
C A G A C C G T T G A G C T C C T G A T C A G C A T C C T C A G G A G G C C C T
T T G A C A A G C A A G C C C C T G T G C A A G C C C A T T C A C G G G G T A C
C A G T G G T G C T G A G G T A G A T G G G T T T G A A A A G G A T T G C T C G
G T C G A T T G C T G C T C A T G G A A T T G G C A T G T G C A T G C A T G T T
C A C A A T A T G C C A C C A G G C T T T G G A G C A A G A G A G C A T G A A T
G C C T T C A G G C A G G T T G A A A G T T C C T G G G G G T G A A G A G G C A
G G G C C G A G G A T T G G A G G A G G A A A G C A T C A A G T C G T C G C T C
A T G C T C A T G T T T T C A G T C A G A G T T T G C C A A G C T C A C A G G A
G C A G A G A C A A G A C T G G C T G C T C A G G T G T T G C A T C G T G T G T
G T G G T G G G G G G G G G G G G G T T A A T A C G G T A C G A A A T G C A C T
T G G A A T T C C C A C C T C A T G C C A G C G G A C C C A C A T G C T T G A A
T T C G A G G C C T G T G G G G T G A G A A A T G C T C A C T C T G C C C T C G
T T G C T G A G G T A C T T C A G G C C G C T G A G C T C A A A G T C G A T G C
C C T G C T C G T C T A T C A G G G C C T G C A C C T C T G G G C T G A C C G G
C T C A G C C T C C T T C G C G G G C A T G G A G T A G G C G C C G G C A G C G
T T C A T G T C C G G G C C C A G G G C A G C G G T G G T G C C A T A A A T G T
C G G T G A T G G T G G G G A G G G G G C C G T C G C C A C A C C A T T G C C
G T T G C T G G C T G A C G C A T G C A C A T G T G G C C T G G C T G G C A C C
G G C A G C A C T G G T C T C C A G C C A G C C A G C A A G T G G C T G T T C A
G G A A A G C G G C C A T G T T G T T G G T C C C T G C G C A T G T A A T T C C
C C A G A T C A A A G G A G G G A A C A G C T T G G A T T T G A T G T A G T G C
C C A A C C G G A C T G A A T G T G C G A T G G C A G G T C C C T T T G A G T C
T C C C G A A T T A C T A G C A G G G C A C T G T G A C C T A A C G C A G C A T
G C C A A C C G C A A A A A A A T G A T T G A C A G A A A A T G A A G C G G T G

30

40

50

T G T C A A T A T T T G C T G T A T T T A T T C G T T T T A A T C A G C A A C C
A A G T T C G A A A C G C A A C T A T C G T G G T G A T C A A G T G A A C C T C
A T C A G A C T T A C C T C G T T C G G C A A G G A A A C G G A G G C A C C A A
A T T C C A A T T T G A T A T T A T C G C T T G C C A A G C T A G A G C T G A T
C T T T G G G A A A C C A A C T G C C A G A C A G T G G A C T G T G A T G G A G
T G C C C C G A G T G G T G G A G C C T C T T C G A T T C G G T T A G T C A T T
A C T A A C G T G A A C C C T C A G T G A A G G G A C C A T C A G A C C A G A A
A G A C C A G A T C T C C T C C T C G A C A C C G A G A G A G T G T T G C G G C
A G T A G G A C G A C A A G

10

配列番号 13

プライマー S Z 0 2 6 1 3

T G T T G A A G A A T G A G C C G G C G A C

配列番号 14

プライマー S Z 0 2 6 1 5

C A G T G A G C T A T T A C G C A C T C

20

配列番号 15

ピロミセス種 X y l A (G e n B a n k 寄託番号 C A B 7 6 5 7 1)

M A K E Y F P Q I Q K I K F E G K D S K N P L A F H Y Y D A E K E V M G K
K M K D W L R F A M A W W H T L C A E G A D Q
F G G G T K S F P W N E G T D A I E I A K Q K V D A G F E I M Q K L G I P
Y Y C F H D V D L V S E G N S I E E Y E S N L
K A V V A Y L K E K Q K E T G I K L L W S T A N V F G H K R Y M N G A S T
N P D F D V V A R A I V Q I K N A I D A G I E
L G A E N Y V F W G G R E G Y M S L L N T D Q K R E K E H M A T M L T M A
R D Y A R S K G F K G T F L I E P K P M E P T
K H Q Y D V D T E T A I G F L K A H N L D K D F K V N I E V N H A T L A G
H T F E H E L A C A V D A G M L G S I D A N R
G D Y Q N G W D T D Q F P I D Q Y E L V Q A W M E I I R G G G F V T G G T
N F D A K T R R N S T D L E D I I I A H V S G
M D A M A R A L E N A A K L L Q E S P Y T K M K K E R Y A S F D S G I G K
D F E D G K L T L E Q V Y E Y G K K N G E P K
Q T S G K Q E L Y E A I V A M Y Q

30

配列番号 6

5' プロトテカ・モリフォルミス K E 8 5 8 相同組換え標的配列

C C G T G A T C A C A C A G G T G C C T T G C G A G C G T G A T C A C A C T A T
T T T G G G G G T C C T A C A G T A C T G A A A T G G T G A G A A G T C G T A C
T G A A A T C A A G G A T G A A C A A T G A A A A T G G T G C T G T G G T G G C
T T C T C A A A G G T C A A G A A T C A G T C G C T C G C G T C A G G A A A T C
G C G G C G T C A A C C A G C G T G G G C G C G G T C A G T G G C C C C G C A C
T G G T C A C C A T A G C C T C T C C T G C C A C A G T A G C G A T C C C C T G
G G C G T T C A C T C T C A G C A G C G G C T G T A C T G C C T C C C A G A T T
T T C T T C T T C T G G A C C T G C G G G C G T G A G A G G A T G A G C A G G G

50

TGGGGGCCAAGGGGCTCAATCCTGAACGGGCCCTCATTCGGTT
TCCAATCCCCACAACACATACCCACAGCAGGTCAAGACCACG
CATTCGCACCATGCGCACCAATAACGTGTCTTACCTGAT
TGGGTGTGGCAGGGCTCCGTGGACAGGAGTGCCTCGTCCCC
CGCCCCAGACCCGCTCCCCCGTCAACGGCGGGCGTCCGGGACC
CGCAGCGGGCTCCACCGCGGGTGTGATCCGCGTTGGCGGGCGC
AGAGCAGCATCCCCAGCCGATTTGACCCCGCGCATGCTCCG
AGGCTTTGAGGTTTGGCCAGCACCCACCCGCGCGGCCGACA
AGGTCTCTCAGGGTCAACGTGCCGGACCAAGGCCACTCACGA
TGGTGCAGAGGGCCCCCTCTCGCCGAGGTTCGATCTGCTC
GACGTACAGACTGCGACATGCGTGGCGAGTGGTCAATCAGA
AGGAAGCAGGTGTGCAGAAAGGGGCACGTGGTTTGGTATTGA
GAGTAGCCAAAGCTTTGTGCCAATCAGAAAGTCAACGCAG
CTGCCCTGCCCTGGGCTCGCGGTAC

10

配列番号 17

3' プロトテカ・モリフォルミスKE858 相同組換え標的配列

GTACCCATCAGCATCCGGGTGAATCTTGGCCTCCAAGATA
TGGCCAATCCTCACATCCAGCTTGGCAAATACTGACTAGAC
TGTCTGCAAGTGGGAATGTGGAGCACAAAGGTTTGCTTGTAG
CGATCGACAGACTGGTGGGGTACATTTGACAGGTGGGCGAGC
GCCGCAATCCATCGTGCCTGACGCGAGCGCCCGCGGTGCT
CGCCCCGTGCTGCGCTCAAAAGAGCGGGCAGAGAAATCGGGGA
ACCGAAACAGTCAACATTTGCCCTGATGTTGTTACATGCTGGA
CTAGACTTTTCTTGGCGTGGGTCTGCTCCTCGCCAGGTGCG
CGACGCCCTCGGGGGCTGGGTGCGAGGGAGCCGTGCGGGCCAC
GCATTTTGACAAGACCCCAAAGCTTCGCATCTCAGACGGTCAA
CCGTTTCGTATTATACATTCACACATATGGGTACATACGCAAA
AAGCATGC

20

30

配列番号 18

出芽酵母suc2インベルターゼカセット

CTTTCTTGCGCTATGACACTTCCAGCAAAAGGTAGGGCGG
GCTGCGAGACGGCTTCCCCGGCGCTGCATGCAACACCGATG
ATGCTTCGACCCCCCGAAGCTCCTTCGGGGGCTGCATGGGC
GCTCCGATGCCGCTCCAGGGCGAGCGCTGTTTAAATAGCC
AGGCCCCCCGATTGCAAAAGACATTTATAGCGAGCTACCAAAG
CCATATTCAAAACACCTAGATCACTACCACTTCTACACAGG
CCACTCGAGCTTTGTGATCGCCTCCGCTAAGGGGGCGCCT
CTTCTCTTCTGTTTCAAGTCAACAACCCGCAAAACGGCGCGCC
ATGCTGCTGCGAGGCCTTCTCTGTTCTCTGCTGGGCCGGCTTCG
CCGCCAAGATCAGCGCCTCCATGACGAACGAGACGTCCGA
CCGCCCCCTGGTGCCTTCAACCCCAACAAAGGGCTGGATG
AACGACCCCAACGGCCCTGTGGGTACGACGAGAAAGGACGCCA
AGTGGCACCTGTACTTCCAGTACAACCCGAACGACACCGGT
CTGGGGGACGCCCTTGTTCCTGGGGGCCACGCCACGTCCGAC
GACCTGACCAAACTGGGAGGACCAAGCCCATCGCCATCGCCC
CGAAGCGCAACGACTCCGGCGCGCCTTCTCCGGCTCCATGGT

40

50

GGTGGACTACAACAACACCTCCGGCTTCTTCAACGACACCA
ATCGACCCGCGCCAGCGCTGCGTGCGCCATCTGGACCTACA
ACACCCCGGAGTCCGAGGAGCAGTACATCTCCTACAGCCT
GGACGGCGGCTACACCTTCAACCGAGTACCAGAAAGAACCC
GTGCTGGCCGCGCAACTTCCACCCAGTTTCCGCGACCCGAAGG
TCTTCTGGTACGAGGCCCTCCAGAAAGTGGATCATGACCGC
GGCCAAGTCCCAGGACTACAAGATCGAGATCTACTCCTCC
GACGACCTGAAGTCCCTGGAAAGCTGGAGTCCGCGTTTCGCCA
ACGAGGGGCTTCCCTCGGCTACCAAGTACGAGTGCCTCCGGCCT
GATCGAGGTCCCCACCGAGCAGGACCCCAAGCAAGTCCCTAC
TGGGTGATGTTTCATCTCCATCAACCCCGGCGGCCCGGGCCG
GCGGCTCCTTCAACCAAGTACTTCTGTCGGCAGCTTCAACGG
CACCCACTTTCGAGGGCCTTTCGACAACCAAGTCCCGCGTGGTG
GACTTTCGGCAAGGACTACTACGCCCTGCGAGACCTTCTTCA
ACACCGACCCCGACCTACGGGAGCGGCCCTGGGCGATCGCGTG
GGCCTCCAACCTGGGAGTACTCCGCGCTTCTGTGCCCAACCAAC
CCCTGGCGGCTCCTCCATGTCCCTCGTGGCGCAAGTTCTCCC
TCAACACCGAGTACCAGGCCCAACCCGGAGACGGAGCTGAT
CAACCTGAAGGCCCGAGGCCGATCCTGAACATCAGCAACGCC
GGCCCTTGGAGCCGGTTTCGCCACCAACCAACCGTTGACGA
AGGCCCAACAGCTACAACGTCGACCTGTCCAACAGCACCGG
CACCCCTGGAGTTTCGAGCTGGTGTACGCCGTC AACACCAACC
CAGACGATCTCCAAGTCCGTGTTTCGCGGACCTCTCCCTCT
GGTTCAAGGGGCTTGGAGGACCCCGAGGAGTACCTCCGCGCAT
GGGCTTTCGAGGTGTCCGCGTCTCTCTTCTTCTGGACCGC
GGGAACAGCAAGGTGAAGTTCTGTGAAGGAGAACCCCTACT
TCACCAACCGCGCATGAGCGTGAACAACCAAGCCCTTCAAGAG
CGAGAACGACCTGTCTACTACAAGGTGTACGGGCTTGTCTG
GACCAGAACATCCTGGAGCTGTACTTCAACGACGGCGGACG
TCGTGTCCAACCAACACCTACTTTCATGACCAACCGGGAACGC
CCTGGGGCTCCGTGAACATGACGACGGGGGTGGACAACCTG
TTCTACATCGACAAGTTCCAGGTGCGCGAGGTCAAGTGAT
TAATTAACCTCGAGGCGAGCAGCAGCTCGGATAGTATCGACA
CACTCTGGACGCTGGTCTGTGTGATGGACTGTTGCCGCCAC
ACTTGCTGCTTGAACCTGTGAATATCCCTGCCCGCTTTTAT
CAAACAGCCTCAGTGTGTTTGTATCTTGTGTGTACGCGCTT
TTGCGAGTTGCTAGCTGCTTGTGCTATTTGCGAATAACCA
CCCCAGCATCCCCCTTCCCTCGTTTTCATATCGCTTGCATCC
CAACCGCAACTTATCTACGCTGTCTCTGCTATCCCTCAGCG
CTGCTCCTGCTCCTGCTCACTGCCCTCGCACAGCCTTGG
TTTGGGGCTCCGCGCTGTATTCTCCTGGTACTGCAACCTGTA
AACCAAGCACTGCAATGCTGATGCACGGGAAGTAGTGGGAT
GGGAACACAATGGA

配列番号 19

クロレラ・プロトコイデスアクチンプロモーター

GAGTTT TAGGTCCAGCGTCCGTGGGGGGGGACGGGGCTGGGA
GCTTGGGGCCGGGAAGGGCAAGACGATGCAGTCCCTCTGGG
GAGTCACAGCCGACTGTGTGTGTGTTGC ACTGTGCGGCCCGC

A G C A C T C A C A C G C A A A A T G C C T G G C C G A C A G G C A G G C C C T
G T C C A G T G C A A C A T C C A C G G T C C C T C T C A T C A G G C T C A C C
T T G C T C A T T G A C A T A A C G G A A T G C G T A C C G C T C T T T C A G A
T C T G T C C A T C C A G A G A G G G G A G C A G G C T C C C C A C C G A C G C
T G T C A A A C T T T G C T T C C T G C C C A A C C G A A A A C A T T A T T G T T
T G A G G G G G G G G G G G G G G G G G C A G A T T G C A T G G C G G G A T A T
C T C G T G A G G A A C A T C A C T G G G A C A C T G T G G A A C A C A G T G A
G T G C A G T A T G C A G A G C A T G T A T G C T A G G G G T C A G C G C A G G
A A G G G G G C C T T T C C C A G T C T C C C A T G C C A C T G C A C C G T A T
C C A C G A C T C A C C A G G A C C A G C T T C T T G A T C G G C T T C C G C T
C C C G T G G A C A C C A G T G T G T A G C C T C T G G A C T C C A G G T A T G
C G T G C A C C G C A A A G G C C A G C C G A T C G T G C C G A T T C C T G G G
G T G G A G G A T A T G A G T C A G C C A A C T T G G G G C T C A G A G T G C A
C A C T G G G G C A C G A T A C G A A A C A A C A T C T A C A C C G T G T C C T
C C A T G C T G A C A C A C C A C A G C T T C G C T C C A C C T G A A T G T G G
G C G C A T G G G C C C G A A T C A C A G C C A A T G T C G C T G C T G C C A T
A A T G T G A T C C A G A C C C T C T C C G C C C A G A T G C C G A G C G G A T
C G T G G G C G C T G A A T A G A T T C C T G T T T C G A T C A C T G T T T G G
G T C C T T T C C T T T T C G T C T C G G A T G C G C G T C T C G A A A C A G G
C T G C G T C G G G C T T T C G G A T C C C T T T T G C T C C C T C C G T C A C
C A T C C T G C G C G C G G G C A A G T T G C T T G A C C C T G G G C T G G T A
C C A G G G T T G G A G G G T A T T A C C G C G T C A G G C C A T T C C C A G C
C C G G A T T C A A T T C A A A G T C T G G G C C A C C A C C C T C C G C C G C
T C T G T C T G A T C A C T C C A C A T T C G T G C A T A C A C T A C G T T C A
A G T C C T G A T C C A G G C G T G T C T C G G G A C A A G G T G T G C T T G A
G T T T G A A T C T C A A G G A C C C A C T C C A G C A C A G C T G C T G G T T
G A C C C C G C C C T C G C A A

10

20

配列番号 20

コドン最適化ピキア・スチピチスXYL3コード領域

30

A T G A C C A C C A C C C C C T T C G A C G C C C C G A C A A G C T G T T C C
T G G G C T T C G A C C T G T C C A C C C A G C A G C T G A A G A T C A T C G T
C A C C G A C G A G A A C C T G G C G G C C C T G A A G A C C T A C A A C G T G
G A G T T C G A C T C G A T C A A C T C C A G C G T G C A G A A G G G C G T C A
T C G C G A T C A A C G A C G A G A T C T C C A A G G G C G C C A T C A T C A G
C C C C G T C T A C A T G T G G C T G G A C G C G C T G G A C C A C G T G T T C
G A G G A C A T G A A G A A G G A C G G C T T C C C C T T C A A C A A G G T C G
T G G G C A T C T C C G G C T C G T G C C A G C A G C A C G G C A G C G T C T A
C T G G T C C C G C A C C G C C G A G A A G G T G C T G T C G G A G C T G G A C
G C C G A G T C G T C C C T G A G C T C C C A G A T G C G C T C G G C C T T C A
C C T T C A A G C A C G C G C C C A A C T G G C A G G A C C A C A G C A C C G G
C A A G G A G C T G G A G G A G T T C G A G C G C G T G A T C G G C G C G G A C
G C C C T G G C G G A C A T C T C G G G C T C C C G C G C C C A C T A C C G C T
T C A C C G G C C T G C A G A T C C G C A A G C T G A G C A C C C G C T T C A A
G C C C G A G A A G T A C A A C C G C A C C G C G C G C A T C T C C C T G G T G
T C G A G C T T C G T G G C C T C G G T G C T G C T G G G C C G C A T C A C C A
G C A T C G A G G A G G C C G A C G C C T G C G G C A T G A A C C T G T A C G A
C A T C G A G A A G C G C G A G T T C A A C G A G G A G C T G C T G G C C A T C
G C C G C C G G C G T G C A C C C C G A G C T G G A C G G C G T G G A G C A G G

40

50

ACGGCGAGATCTACCGCGCCGGGCATCAACGAGCTGAAGCG
CAAGCTGGGCCCCGTGAAGCCCATCACCTACGAGTCTGGAG
GGCGACATCGCCTCCTACTTCTGTGACCCGCTACGGCTTCA
ACCCCGACTGCAAGATCTACTCCTTCAACGGGCGACAACCT
GGCCACCATCATCTCTGCTGCCCTTGGCCCCCAACGACGCC
CTGATCTCTGCTGGGCAACCAGCACCAACCGTCTCTGATCATCA
CCAAGAACTACGCCCTCTCTCTGCAGTACCAACCTGTTCAA
GCACCCCAACCATGCCCCGACCACTACATGGGCAATGATCTGC
TACTGCAACGGGCAAGCCTTGGCCCCGCGAGAAAGGTCCGCGACG
AGGTCAACGAGAAAGTTTCAACGTCGAGGACAAGAAAGTCTTG
GGACAAGTTTCAACGAGATCCTGGACAAGTCTGACCGACTTCT
AACAAACAAGCTGGGCACTCTACTTCTCCCCCTGGGCGAGATCG
TGCCCAACGCCCGCGGGCCCCAGATCAAGCGCGAGCGTCTCTGA
CTCCAAGAAACGAGATCTGTCGACGTGGAGCTGGGCGACAAG
AACTGGGCAAGCCCCGAGGACGACGTCCTCTGTCATCTGTGGAGA
GCCAGACCCCTGAGCTGCGCGCCTGCGCACCCGGCCCCCATGCT
GTCCAAGTCCGGGCGACTCTGTCGGGCGAGCTCTCTCCGCCCTCG
CCCCAGCCCCGAGGGGCGACGGGCAACCGACCTGCAACAAGGTCT
ACCAGGACCTGTGTCAAAGAAAGTTTCTGGGCGACCTGTACACCGA
CGGCAAGAAAGCAGACCTTCTGAGAGCCTGACCGGCCCGCCCC
AACCGCTGCTACTACGTCTGGGCGGGCGCGTCCAACAACGGCT
CGATCATCTCGCAAGATGGGCGAGCATCCTGGCGCCCCGTCAA
CGGCAACTACAAGGTGGACATCCCCAACGCGTGGCGCCCTG
GGCGGGCGCCTACAAGGCCCTCTCTGGTCTCTACGAGTGCAGGG
CCAAGAAAGGAGTGGATCGGGCTACGACCAAGTACATCAACCG
CCTGTTCGAGGTGAGCGACGAGATGAACCTCGTTTCGAGGTCT
AAGGACAAGTGGCTGGAGTACGCCAACGGCGTCTGGCATGCT
TGGCCAAGATGGAGTCTGGAGCTGAAGCACTAG

10

20

配列番号 2 1

30

クロレラ・プロトコイデス EF 1 a 3' UTR

ACGGAGCGTCTGTGCGGGAGGGAGTGTGCCGAGCGGGGAGT
CCCCGGTCTGTGCGAGGCCCGGCAGCTGACGCTGGCGAGCC
GTACGCCCCCGAGGGTCCCCCTCCCCCTGCACCCCTCTTCCCC
TTCCCTCTGACGGGCCGCGCCCTGTTCTTTGCATGTTTCAGCGA

配列番号 2 2

40

クロレラ・プロトコイデス EF 1 a プロモーター

GTTTAGGTCCAGCGTCCGTGGGGGGGGCGTGAGACTCCCC
CCTGACCTTCTGTATGGCAGGGACTCCTACTTTGCCAAGTAA
TCAGTTTGACAATGCCACTTCAATGCTCTGTTGTGGTACACT
GACGCGGGTCTAACATACTGGGAAGCATGAATTGCCGACA
TGGACTCAGTTTGGAGACAGTAACAGCTCTTTGTGTTCTAT
CTTCAGGAACACATTTGGCAGCGCACCCATACAGTGGCGC
ACACGCGAGCTGTACCTGATGTGGCTCTATTCCCACATGTT
TCAACTTTGATCCA AAAAGTCACTCAGACTCTCAGCAGCTAG
ACTTGATCGCATCTTTGGCCAAGAAAGATGCTTTCGCGCAACT
CTAGGAATGGAACGAGAAAGAGAGCCTGCTCTGATCGGATA

50

TTTCCATTCTCTG GATGGGACTGAGATGATTCTGAAGAAA
TGCTGCTCGACTTTATTTGGAAGAACAGCACCTGACGCATG
CTTTGAGGCTGCTGTGGCTGGGATGTGCTGTATTTGT CAG
CATTGAGCATCTACGGGTAGATGGCCATAACCACGCGCTG
CCTATCATGCGGTGGGTGTGTGTAGAAAACGTACAAATGGAC
AGAAAATCAATCCCCATTGCGAGCCCTAGCGGTGCAGCCATGCG
CTCCCTCTGTAGCCCCGCTCCCAAAGACAAAGCCAGCCCAATG
CCAGAACCCACATAGAGAGGGGTATCTTCTCTAATGACCTCG
CCCATCATTTCTCTCCAAATTAACCTATAATGCCCTTGATTGT
GGAGTTTGGCTTTTGGCTTTCAGCTGCTCGCGCTGGGCACTTT
TGTAGGCGAGCACAGGGGTATGCCAGCGCCCGAACTTTGTGCC
CTTGAGCGAGGCCACAAAGGGCACAAAGACTACACCATG CAGC
TGGGTATACTTTGGAACCTGATACCATTCTTACCAAAGCAAAGGC
ACAGCGACAGCCCTGCAACCGACTCACTTTTGCTTGTAGCGGGGC
ACAGCGCGCGCGACTGATCCTGCGAGCTGTGGGGAGTTCCCG
ACTGTTCTGGACCTCGGTCTCTGAAAAGATGTGTACGATGG
GATCAAAGTCAATTCAAAGTATGCTCTTTCACATGAGCAAATCGG
GGGAGACACGGGTGGCCCTAAAGGTGTTTCATCTGATTCAAAG
TGTAGTGGGGGGGGTGTCTGTTTGTCCCGGGGCGCCCCCGCGC
TCCCCCGACCCCGGAGAAAGGGCCCCCAGAGGACTCGGCGCGCC
CACAGAGGAATAACCGGGCGGTGGCTCGGCGCCCTGCGCCCTCC
CTCTTTTCAAATATTTTCACCTGGTGTTCAGTGCACGGACACG
TAAAGAACTAGATACA

10
20

配列番号 23

コドン最適化ピロミセス種 X y 1 A コード領域

ATGGCCAAAGGAGTACTTCCCCCAGATCCAGAAAGATCAAAGT
TCGAGGGGCAAGGACAGCAAAGAACCCGCTGGCGTTTCCACTA
CTACGACGCGGAGAAAGGAGGTTCATGGGCAAGAAAGATGAAG
GACTGGCTGCGCTTTCGCGATGGCCTGGTGGCACACCCTGT
GCGCGGAGGGGCGCGGACCAAGTTTCGGCGGGCGGCACCAAAGTC
GTTTCCCGTGGAAACGAGGGGCACCGACGCCATCGAGATCGGCC
AAGCAGAAAGGTTCGACGCGGGGCTTTCGAGATCATG CAGAAAGC
TGGGCAATCCCCCTACTACTGCTTCCACGACGTGGACCTGGT
GAGCGAGGGGCAACTCCATCGAGGAGTACGAGTCTGAACCTG
AAGGCCGTGGTGGCGGTACCTGAAAGGAGAAAGCAGAAAGGAGA
CCGGCATCAAAGCTGCTGTGTGTCGACCGCGGAACGTCTTTCGG
CCACAAGCGCTACATGAACGGCGGCCAGCACCAAACCCCGAC
TTCGACGTGGTTCGCGCGCGCCATCGTCCAGATCAAAGAACG
CGATCGACGCGCGGCATCGAGCTGGGGCGCCGAGAACTACGT
GTTCTGGGGCGGGCCGCGAGGGGCTACATGTCCCTGCTGAAC
ACGGACCCAGAAAGCGCGAGAAAGGAGCACATGGCGACCATGC
TGACGATGGCCCCGCGACTACGCCCGCTCGAAAGGGCTTCAA
GGGCACCTTCTCTGATCGAGCCCCAAGCCGATGGAGCCCCACC
AAGCACCCAGTACGACGTTCGACACCGAGACCGCGATCGGGCT
TCCTGAAAGGCGCAACAACCTGGACAAGGACTTCAAAGGTGAA
CATCGAGGTGAACCAACGCCACCCCTGGCGGGGCCAACCTTC
GAGCACGAGCTGGCGGTGCGCCGCTGGACGCCCGGCATGCTGG
GCAGCATCGACGCGGAACCGCGGGCGACTACCAAGAAACGGCTG

30
40
50

G G A C A C C G A C C A G T T C C C C A T C G A C C A G T A C G A G C T G G T G
 C A G G C C T G G A T G G A G A T C A T C C G C G G C G G C G G C T T C G T C A
 C C G G C G G C A C G A A C T T C G A C G C C A A G A C C C G C C G C A A C T C
 C A C C G A C C T G G A G G A C A T C A T C A T C G C G C A C G T C T C G G G C
 A T G G A C G C C A T G G C C C G C G C C C T G G A G A A C G C C G C G A A G C
 T G C T G C A G G A G A G C C C C T A C A C C A A G A T G A A G A A G G A G C G
 C T A C G C C T C C T T C G A C T C G G G C A T C G G C A A G G A C T T C G A G
 G A C G G C A A G C T G A C C C T G G A G C A G G T C T A C G A G T A C G G C A
 A G A A G A A C G G C G A G C C C A A G C A G A C C T C C G G C A A G C A G G A
 G C T G T A C G A G G C C A T C G T G G C G A T G T A C C A G T A G

10

配列番号 24

シロイヌナズナホスフェート / ペントースホスフェートトランスロケーター XPT (GenBank 寄託番号 AAG48163.1)

M R V E I W R T G S P Y A V P E G L Y W V E S D L G A A T H R E S E P S R G G T
 L L R G P A L T P R P P A C I R D L R R G R A A V G S S D S N P D E K S D L G E
 A E K K E K K A K T L Q L G I V F G L W Y F Q N I V F N I F N K K A L N V F P Y
 P W L L A S F Q L F A G S I W M L V L W S F K L Y P C P K I S K P F I I A L L G
 P A L F H T I G H I S A C V S F S K V A V S F T H V I K S A E P V F S V I F S S
 L L G D S Y P L A V W L S I L P I V M G C S L A A V T E V S F N L G G L S G A M
 I S N V G F V L R N I Y S K R S L Q S F K E I D G L N L Y G C I S I L S L L Y L
 F P V A I F V E G S H W V P G Y H K A I A S V G T P S T F Y F W V W L S G V F Y
 H L Y N Q S S Y Q A L D E I S P L T F S V G N T M K R V V V I I S T V L V F R N
 P V R P L N A L G S A I A I C G T F L Y S Q A T A K K K K I E V G G D K K N

20

配列番号 25

UTEX 1435 輸送ペプチド

M R V E I W R T G S P Y A V P E G L Y W V E S D L G A A T H R E S E P S R G G T
 L L R G P A L T P R P P A C I R D L R R

30

配列番号 26

代替的色素体輸送ペプチド

M R V E I W R T G S P H A A Q G G L C W H V S D L G A A T H R E S E P S R G G T
 L F R G P A L T P R P P A C I R D L R R

配列番号 27

5' プロトテカ・モリフォルミス 6S 相同組換え標的配列

40

G C C G C C G C C A C T C C T G C T C G A G C G C G C C C G C G C G T G C G C C
 G C C A G C G C C T T G G C C T T T T C G C C G C G C T C G T G C G C G T C G C
 T G A T G T C C A T C A C C A G G T C C A T G A G G T C T G C C T T G C G C C G
 G C T G A G C C A C T G C T T C G T C C G G G C G G C C A A G A G G A G C A T G
 A G G G A G G A C T C C T G G T C C A G G G T C C T G A C G T G G T C G C G G C
 T C T G G G A G C G G G C C A G C A T C A T C T G G C T C T G C C G C A C C G A
 G G C C G C C T C C A A C T G G T C C T C C A G C A G C C G C A G T C G C C G C
 C G A C C C T G G C A G A G G A A G A C A G G T G A G G G G G G T A T G A A T T
 G T A C A G A A C A A C C A C G A G C C T T G T C T A G G C A G A A T C C C T A

50

CCAGTCATGGCTTTTACCTGGATGACGGGCTTGCGAACAGCT
GTCCAGCGACCCCTCGCTGCCGCCGCTTCTCCCGCACGCTT
CTTTCCAGCACCGGTGATGGCGCGAGCCAGCGCCGCGACGCT
GGCGCTGCGCTTTCGCCGATCTGAGGACAGTCTGGGGGAACCTC
TGATCAGTCTAAACCCCTTGCGCGGTTAGTGTGTGCCATCC
TTTGACAGACCGGTGAGAGCCGACTTGTTGTGCGCCACCC
CCACACCCACCTCCTCCAGACCAATTCTGTCACTTTTGTG
GCGAAGGCATCGGGCCTCGGGCCTGCGAGAGAGGACAGCAGTG
CCCAGCCGCTGGGGGTTGGCGGATGCACGCTCA

10

配列番号 28

3' プロトテカ・モリフォルミス 6 S 相同組換え標的配列

TTGTTTTTCCAGAAAGGAGTTTGCTCCTTGAGGCCCTTTCATTCT
CAGCCTTCGATAAACCTCCAAAGCCGCTCTAATTGTGGAGGG
GGTTTCGAATTTAAAGCTTTGGAATGTTGGTTTCGTGCGTCT
GGAACAAGCCCCAGACTTTGTTGCTCACTGGGAAAAGGACCA
TCAGCTCCAAAAA ACTTTGCCGCTCAAAACCGCGTACCTCTG
CTTTTCGCGCAATCTGCCCCCTGTTGAAATCGCCACCCACATTC
ATATTGTGACGCTTTGAGCAGTCTGTAAATTGCCTCAGAAATG
TGGAAATCATCTGCCCCCCCTGTGCGAGGCCCATGCCAGGCATG
TCGCGGGGCGAGGACACCCGCCACTCGTACAGCAGACCATTT
ATGCTACCTCACAAATAGTTTCATAACAGTGACCATATTTCT
CGAAGCTCCCCCAACGAGCACCTCCATGCTCTGAGTGGCCA
CCCCCCCCGGCCCCCTGGTGCTTTGCGGAGGGGCAGGTCAACCGGC
ATGGGGCTACCGAAATCCCCGACCGGATCCCCACCCACCC
GCGATGGGGAAGAAATCTCTCCCCGGGATGTGGGCCCCACCA
CAGCACAAACCTGCTGGGCCAGGCGAGCGTCAAAACCATACC
ACACAAATATCTTTGGCATCGGCCCTGAATTCTTCTGCTC
GCTCTGCTACCCGGTGCTTCTGTCCGAAGCAGGGGTTGCT
AGGGATCGCTCCGAGTCCGCAAAACCCCTTGTCGCGTGCGCG
GGCTTGTTTCGAGCT

20

30

配列番号 29

ネオマイシンカセット (コナミドリムシ - チュープリンプロモーターおよびクロレラ・ブルガリス硝酸塩レダクターゼ 3' UTR)

CTTTCTTGCGCTATGACACTTCCAGCAAAAGGTAGGGCGGG
GCTGCGAGACGGCTTCCCGCGCGCTGCATGCACACCGATG
ATGCTTTCGACCCCCCGAAGCTCCTTCGGGGCTGCATGGGC
GCTCCGATGCCGCTCCAGGGCGAGCGCTGTTTAAATAGCC
AGGCCCCCCGATTGCAAAAGACATTATAGCGAGCTACCAAAG
CCATATTCAAAACACCTAGATCACTACCACTTCTACACAGG
CCACTCGAGCTTTGTGATCGCACCTCCGCTAAGGGGGCGCCT
CTTCTCTTTCGTTTTCAGTCAACAACCCGCAAACTCTAGAAAT
ATCAATGATCGAGCAGGACGGCCTCCACGCGCGGCTCCCC
GCCGCCCTGGGTGGAGCGCCCTGTTTCGGCTACGACTGGGCC
AGCAGACCATCGGGCTGCTCCGACGCCCGCGTGTTCGCGCT
GTCGCGCCAGGGCGCGCCCCGTGCTGTTCGTGAAGACCGAC
CTGTCCGGCGCCCTGAACGAGCTGCAAGGACGAGGCGCGCC
GCCCTGTCCTGGCTGGCCACCAACCGCGGTGCCCTGCGCGCGC

40

50

C G T G C T G G A C G T G G T G A C C G A G G C C G G C C G C G A C T G G C T G
C T G C T G G G C G A G G T G C C C G G C C A G G A C C T G C T G T C C T C C C
A C C T G G C C C C C G C C G A G A A G G T G T C C A T C A T G G C C G A C G C
C A T G C G C C G C C T G C A C A C C C T G G A C C C C G C C A C C T G C C C C
T T C G A C C A C C A G G C C A A G C A C C G C A T C G A G C G C G C C C G C A
C C C G C A T G G A G G C C G G C C T G G T G G A C C A G G A C G A C C T G G A
C G A G G A G C A C C A G G G C C T G G C C C C C G C C G A G C T G T T C G C C
C G C C T G A A G G C C C G C A T G C C C G A C G G C G A G G A C C T G G T G G
T G A C C C A C G G C G A C G C C T G C C T G C C C A A C A T C A T G G T G G A
G A A C G G C C G C T T C T C C G G C T T C A T C G A C T G C G G C C G C C T G
G G C G T G G C C G A C C G C T A C C A G G A C A T C G C C C T G G C C A C C C
G C G A C A T C G C C G A G G A G C T G G G C G G C G A G T G G G C C G A C C G
C T G A C A A T T G G C A G C A G C A G C T C G G A T A G T A T C G A C A C A C
T C T G G A C G C T G G T C G T G T G A T G G A C T G T T G C C G C C A C A C T
T G C T G C C T T G A C C T G T G A A T A T C C C T G C C G C T T T T A T C A A
A C A G C C T C A G T G T G T T T G A T C T T G T G T G T A C G C G C T T T T G
C G A G T T G C T A G C T G C T T G T G C T A T T T G C G A A T A C C A C C C C
C A G C A T C C C C T T C C C T C G T T T C A T A T C G C T T G C A T C C C A A
C C G C A A C T T A T C T A C G C T G T C C T G C T A T C C C T C A G C G C T G
C T C C T G C T C C T G C T C A C T G C C C C T C G C A C A G C C T T G G T T T
G G G C T C C G C C T G T A T T C T C C T G G T A C T G C A A C C T G T A A A C
C A G C A C T G C A A T G C T G A T G C A C G G G A A G T A G T G G G A T G G G
A A C A C A A A T G G A

10

20

配列番号 30

コドン最適化シロイヌナズナ X P T コード領域

A T G A G G G T G G A G A T C T G G A G A A C T G G G T C G C C T T A T G C C G
T G C C G G A G G G C T T G T A C T G G G T T G A G A G T G A T T T G G G T G C
G G C G A C G C A C C G G G A G A G C G A G C C C A G C C G A G G C G G T A C T
T T G C T C C G C G G G C C C G C C C T C A C G C C C C G C C C A C C C G C A T
G C A T C C G C G A C C T G C G C A G G G G G C G C G C C G C C G T G G G C T C
C T C C G A C T C G A A C C C C G A C G A G A A G T C C G A C C T G G G C G A G
G C C G A G A A G A A G G A G A A G A A G G C C A A G A C C C T G C A G C T G G
G C A T C G T G T T C G G C C T G T G G T A C T T C C A G A A C A T C G T C T T
C A A C A T C T T C A A C A A G A A G G C C C T G A A C G T G T T C C C C T A C
C C C T G G C T C C T G G C C T C C T T C C A G C T G T T C G C C G G C T C C A
T C T G G A T G C T G G T G C T G T G G T C G T T C A A G C T G T A C C C C T G
C C C C A A G A T C T C G A A G C C G T T C A T C A T C G C G C T G C T G G G C
C C C G C C C T G T T C C A C A C C A T C G G C C A C A T C T C C G C C T G C G
T G T C C T T C T C C A A G G T G G C C G T C T C G T T C A C C C A C G T G A T
C A A G T C C G C C G A G C C C G T G T T C T C C G T G A T C T T C T C C T C G
C T G C T G G G C G A C T C C T A C C C C C T G G C C G T G T G G C T G T C C A
T C C T G C C C A T C G T G A T G G G C T G C T C C C T G G C C G C C G T G A C
C G A G G T C T C G T T C A A C C T G G G C G G C C T G T C C G G C G C C A T G
A T C T C C A A C G T G G G C T T C G T G C T G C G C A A C A T C T A C T C C A
A G C G C T C C C T G C A G T C C T T C A A G G A G A T C G A C G G C C T C A A
C C T G T A C G G C T G C A T C T C C A T C C T G T C C C T G C T G T A C C T G
T T C C C C G T G G C C A T C T T C G T G G A G G G C T C C C A C T G G G T G C
C C G G C T A C C A C A A G G C C A T C G C C T C C G T G G G C A C C C C C T C

30

40

50

C A C C T T C T A C T T C T G G G T C T G G C T G T C G G G C G T G T T C T A C
 C A C C T G T A C A A C C A G T C C T C C T A C C A G G C C C T G G A C G A G A
 T C T C C C C C C T G A C C T T C T C G G T C G G C A A C A C C A T G A A G C G
 C G T G G T G G T G A T C A T C T C C A C C G T G C T G G T G T T C C G C A A C
 C C C G T G C G C C C C C T G A A C G C C C T G G G C T C C G C C A T C G C C A
 T C T G C G G C A C C T T C C T G T A C T C C C A G G C C A C C G C C A A G A A
 G A A G A A G A T C G A G G T G G G C G G C G A C A A G A A G A A C T G A

配列番号 3 1

ネオマイシンカセット (クロレラ・ソロキニアナ G d h プロモーターおよびクロレラ・ブルガリス硝酸塩レダクターゼ 3' UTR)

10

G G T A C C C G C C T G C A A C G C A A G G G C A G C C A C A G C C G C T C C C
 A C C C G C C G C T G A A C C G A C A C G T G C T T G G G C G C C T G C C G C C
 T G C C T G C C G C A T G C T T G T G C T G G T G A G G C T G G G C A G T G C T
 G C C A T G C T G A T T G A G G C T T G G T T C A T C G G G T G G A A G C T T A
 T G T G T G T G C T G G G C T T G C A T G C C G G G C A A T G C G C A T G G T G
 G C A A G A G G G C G G C A G C A C T T G C T G G A G C T G C C G C G G T G C C
 T C C A G G T G G T T C A A T C G C G G C A G C C A G A G G G A T T T C A G A T
 G A T C G C G C G T A C A G G T T G A G C A G C A G T G T C A G C A A A G G T A
 G C A G T T T G C C A G A A T G A T C G G T T C A G C T G T T A A T C A A T G C
 C A G C A A G A G A A G G G G T C A A G T G C A A A C A C G G G C A T G C C A C
 A G C A C G G G C A C C G G G G A G T G G A A T G G C A C C A C C A A G T G T G
 T G C G A G C C A G C A T C G C C G C C T G G C T G T T T C A G C T A C A A C G
 G C A G G A G T C A T C C A A C G T A A C C A T G A G C T G A T C A A C A C T G
 C A A T C A T C G G G C G G G C G T G A T G C A A G C A T G C C T G G C G A A G
 A C A C A T G G T G T G C G G A T G C T G C C G G C T G C T G C C T G C T G C G
 C A C G C C G T T G A G T T G G C A G C A G G C T C A G C C A T G C A C T G G A
 T G G C A G C T G G G C T G C C A C T G C A A T G T G G T G G A T A G G A T G C
 A A G T G G A G C G A A T A C C A A A C C C T C T G G C T G C T T G C T G G G T
 T G C A T G G C A T C G C A C C A T C A G C A G G A G C G C A T G C G A A G G G
 A C T G G C C C C A T G C A C G C C A T G C C A A A C C G G A G C G C A C C G A
 G T G T C C A C A C T G T C A C C A G G C C C G C A A G C T T T T G C A G A A C C
 A T G C T C A T G G A C G C A T G T A G C G C T G A C G T C C C T T G A C G G C
 G C T C C T C T C G G G T G T G G G A A A C G C A A T G C A G C A C A G G C A G
 C A G A G G C G G C G G C A G C A G A G C G G C G G C A G C A G C G G C G G G G
 G C C A C C C T T C T T G C G G G G T C G C G C C C A G C C A G C G G T G A T
 G C G C T G A T C C C A A A C G A G T T C A C A T T C A T T T G C A T G C C T G
 G A G A A G C G A G G C T G G G G C C T T T G G G C T G G T G C A G C C C G C A
 A T G G A A T G C G G G A C C G C C A G G C T A G C A G C A A A G G C G C C T C
 C C C T A C T C C G C A T C G A T G T T C C A T A G T G C A T T G G A C T G C A
 T T T G G G T G G G G C G G C C G G C T G T T T C T T T C G T G T T G C A A A A
 C G C G C C A G C T C A G C A A C C T G T C C C G T G G G T C C C C C G T G C C
 G A T G A A A T C G T G T G C A C G C C G A T C A G C T G A T T G C C C G G C T
 C G C G A A G T A G G C G C C C T C C T T T C T G C T C G C C C T C T C T C C G
 T C C C G C C T C T A G A

20

30

40

配列番号 3 2

コドン最適化ピキア・スチピチス X Y L 2 コード領域

50

A T G A C C G C C A A C C C C T C C C T G G T G C T G A A C A A G A T C G A C G
A C A T C T C G T T C G A G A C C T A C G A C G C G C C G G A G A T C A G C G A
G C C C A C C G A C G T C C T G G T G C A G G T C A A G A A G A C C G G C A T C
T G C G G C T C C G A C A T C C A C T T C T A C G C C C A C G G C C G C A T C G
G C A A C T T C G T C C T G A C C A A G C C G A T G G T G C T G G G C C A C G A
G T C G G C G G G C A C C G T G G T C C A G G T C G G C A A G G G C G T G A C C
A G C C T G A A G G T C G G C G A C A A C G T C G C C A T C G A G C C C G G C A
T C C C C T C C C G C T T C T C G G A C G A G T A C A A G A G C G G C C A C T A
C A A C C T G T G C C C G C A C A T G G C G T T C G C C G C G A C C C C C A A C
T C C A A G G A G G G C G A G C C C A A C C C G C C C G G C A C C C T G T G C A
A G T A C T T C A A G T C G C C C G A G G A C T T C C T G G T C A A G C T G C C
C G A C C A C G T G A G C C T G G A G C T G G G C G C C C T G G T C G A G C C G
C T G T C C G T C G G C G T C C A C G C G T C G A A G C T G G G C T C C G T C G
C G T T C G G C G A C T A C G T G G C G G T G T T C G G C G C G G G C C C C G T
G G G C C T G C T G G C G G C C G C G G T G G C C A A G A C C T T C G G C G C G
A A G G G C G T C A T C G T C G T G G A C A T C T T C G A C A A C A A G C T G A
A G A T G G C C A A G G A C A T C G G C G C G G C C A C C C A C A C C T T C A A
C T C G A A G A C C G G C G G C T C G G A G G A G C T G A T C A A G G C C T T C
G G C G G C A A C G T C C C G A A C G T G G T G C T G G A G T G C A C C G G C G
C C G A G C C C T G C A T C A A G C T G G G C G T C G A C G C G A T C G C C C C
C G G C G G C C G C T T C G T G C A G G T G G G C A A C G C G G C C G G C C C C
G T C A G C T T C C C C A T C A C C G T G T T C G C C A T G A A G G A G C T G A
C C C T G T T C G G C T C C T T C C G C T A C G G C T T C A A C G A C T A C A A
G A C C G C C G T C G G C A T C T T C G A C A C C A A C T A C C A G A A C G G C
C G C G A G A A C G C C C C C A T C G A C T T C G A G C A G C T G A T C A C C C
A C C G C T A C A A G T T C A A G G A C G C C A T C G A G G C C T A C G A C C T
G G T C C G C G C C G G C A A G G G C G C C G T G A A G T G C C T G A T C G A C
G G C C C C G A G T A G

10

20

30

配列番号 3 3

コナミドリムシ - チュープリンプロモーター

C T T T C T T G C G C T A T G A C A C T T C C A G C A A A A G G T A G G G C G G
G C T G C G A G A C G G C T T C C C G G C G C T G C A T G C A A C A C C G A T G
A T G C T T C G A C C C C C C G A A G C T C C T T C G G G G C T G C A T G G G C
G C T C C G A T G C C G C T C C A G G G C G A G C G C T G T T T A A A T A G C C
A G G C C C C G A T T G C A A A G A C A T T A T A G C G A G C T A C C A A A G
C C A T A T T C A A A C A C C T A G A T C A C T A C C A C T T C T A C A C A G G
C C A C T C G A G C T T G T G A T C G C A C T C C G C T A A G G G G G C G C C T
C T T C C T C T T C G T T T C A G T C A C A A C C C G C A A A C

40

配列番号 3 4

コドン最適化ピキア・スチピチス X Y L 1 コード領域

A T G C C C T C C A T C A A G C T G A A C T C G G G C T A C G A C A T G C C G G
C C G T C G G C T T
C G G C T G C T G G A A G G T G G A C G T C G A C A C C T G C A G C G A G C A G
A T C T A C C G C G
C G A T C A A G A C C G G C T A C C G C C T G T T C G A C G G C G C C G A G G A

50

C T A C G C G A A C
 G A G A A G C T G G T C G G C G C C G G C G T G A A G A A G G C C A T C G A C G
 A G G G C A T C G T
 G A A G C G C G A G G A C C T G T T C C T G A C C T C C A A G C T G T G G A A C
 A A C T A C C A C C
 A C C C C G A C A A C G T G G A G A A G G C G C T G A A C C G C A C C C T G T C
 G G A C C T C C A G
 G T C G A C T A C G T G G A C C T C T T C C T G A T C C A C T T C C C G G T G A
 C C T T C A A G T T
 C G T G C C C C T G G A G G A G A A G T A C C C G C C C G G C T T C T A C T G C 10
 G G C A A G G G C G
 A C A A C T T C G A C T A C G A G G A C G T C C C G A T C C T G G A G A C C T G
 G A A G G C C C T G
 G A G A A G C T G G T C A A G G C G G G C A A G A T C C G C T C C A T C G G C G
 T G A G C A A C T T
 C C C C G G C G C C C T G C T G C T G G A C C T G C T G C G C G G C G C G A C C
 A T C A A G C C G T
 C C G T C C T G C A G G T C G A G C A C C A C C C C T A C C T G C A G C A G C C
 C C G C C T G A T C
 G A G T T C G C C C A G T C C C G C G G C A T C G C C G T G A C C G C G T A C A 20
 G C T C C T T C G G
 C C C C C A G T C C T T C G T G G A G C T G A A C C A G G G C C G C G C C C T G
 A A C A C C T C G C
 C C C T G T T C G A G A A C G A G A C G A T C A A G G C C A T C G C C G C C A A
 G C A C G G C A A G
 A G C C C C G C C C A G G T C C T G C T G C G C T G G T C C T C G C A G C G C G
 G C A T C G C G A T
 C A T C C C C A A G A G C A A C A C C G T G C C G C G C C T G C T G G A G A A C
 A A G G A C G T G A
 A C T C C T T C G A C C T G G A C G A G C A G G A C T T C G C C G A C A T C G C 30
 C A A G C T G G A C
 A T C A A C C T G C G C T T C A A C G A C C C C T G G G A C T G G G A C A A G A
 T C C C C A T C T T
 C G T G T A G

配列番号 3 5

ピキア・スチピチス X Y L 1

M P S I K L N S G Y D M P A V G F G C W K V D V D T C S E Q I Y R A I K T G Y R
 L F D G A E D Y A N E K L V G A G V K K A I D E G I V K R E D L F L T S K L W N 40
 N Y H H P D N V E K A L N R T L S D L Q V D Y V D L F L I H F P V T F K F V P L
 E E K Y P P G F Y C G K G D N F D Y E D V P I L E T W K A L E K L V K A G K I R
 S I G V S N F P G A L L L D L L R G A T I K P S V L Q V E H H P Y L Q Q P R L I
 E F A Q S R G I A V T A Y S S F G P Q S F V E L N Q G R A L N T S P L F E N E T
 I K A I A A K H G K S P A Q V L L R W S S Q R G I A I I P K S N T V P R L L E N
 K D V N S F D L D E Q D F A D I A K L D I N L R F N D P W D W D K I P I F V

配列番号 3 6

コドン最適化ピキア・スチピチス S U T 1 コード領域

A T G T C C T C C C A G G A C A T C C C C T C C G G C G T G C A G A C C C C C T
C C A A
C G C C T C G T T C C T G G A G A A G G A C G A G G A C A A G A T C G A G G A G
G T G C C C C A G A
A C C A C G A C G C G A C C C T G G T C G C C C T G G A G T C C A A G G G C A T
C T C C G A G T A C
C T G C T G A T C T G C T T C T T C T G C C T G C T C G T C G C C T T C G G C G
G C T T C G T C T T
C G G C T T C G A C A C C G G C A C C A T C T C C G G C T T C G T G A A C A T G
T C C G A C T T C C
T G G A G C G C T T C G G C C A G A C C C G C G C C G A C G G C A C C C A C T A
C C T G T C C A A C
G T G C G C G T G G G C C T G C T G G T G T C C A T C T T C A A C A T C G G C T
G C G C C A T C G G
C G G C A T C T T C C T G T C C A A G A T C G G C G A C G T G T A C G G C C G C
C G C G T C G G C A
T C A T G G C C T C C A T G G T G A T C T A C G T G G T C G G C A T C A T C G T
G C A G A T C G C C
T C C C A G C A C G C G T G G T A C C A G G T C A T G A T C G G C C G C G C C A
T C A C C G G C C T
G G C G G T C G G C A C C G T G T C C G T C C T G T C G C C G C T G T T C A T C
G G C G A G T C C T
C C C C C A A G C A C C T G C G C G G C A C C C T G G T G T A C T G C T T C C A
G C T G T G C A T C
A C C C T G G G C A T C T T C A T C G G C T A C T G C G T G A C G T A C G G C A
C G A A G C G C C T
G T C C G A C T C C C G C C A G T G G C G C G T G C C C C T G G G C C T G T G C
T T C C T G T G G G
C G A T C T T C C T G G T G G T G G G C A T G C T G G C C A T G C C C G A G T C
C C C C C G C T A C
C T G G T G G A G A A G A A G C G C A T C G A G G A C G C C A A G A A G T C C G
T G G C C C G C T C
C A A C A A G C T G T C C C C C G A G G A C C C C T C G G T C T A C A C G G A G
A T C C A G C T G A
T C C A G G C C G G C A T C G A C C G C G A G G C G A T C G C C G G C T C C G C
C T C C T G G A C C
G A G C T G A T C A C C G G C A A G C C C G C C A T C T T C C G C C G C G T G G
T G A T G G G C A T
C A T C A T G C A G T C C C T G C A G C A G C T G A C C G G C G T G A A C T A C
T T C T T C T A C T
A C G G C A C C A C C A T C T T C C A G G C C G T C G G C C T G A A G G A C T C
C T T C C A G A C C
T C C A T C A T C C T G G G C G T G G T G A A C T T C G C C G C C A C G T T T A
T C G G C A T C T G
G G C C A T C G A G C G C T T T G G C C G C C G C T C C T G C C T C C T G G T G
G G C T C C G C C G
G C A T G T T C G T G T G C T T C A T C A T C T A C T C C A C C A T C G G C T C
C T T C C A C C T G
T A C A A G G A C G G C G A G T A C A A C A A C G A C A A C A C C T A C A A G C
C C T C C G G C A A

10

20

30

40

50

C G C C C T G A T C T T C A T C A C C T G C C T C T T C A T C G T C T T C T T C
G C C T C C A C C T
G G G C C G G C G G C G T G T A C A C C A T C A T C T C G G A G T C C T A C C C
C C T G C G C A T C
C G C T C C A A G G C G A T G G C G A T C G C G A C C G C C G C C A A C T G G G
T C T T T G G C T T
C C T G A T C T C C T T T C T T C A C C C C C T T C A T C G T G A G C G C C A T C
C A C T T C A A G T
T C G G C T A C G T G T T C T C C G G C T G C C T G C T G T T C T C G T T C T T
C T A C G T G T A C
T T C T T C G T G G T G G A G A C C A A G G G C C T G T C C C T G G A G G A C G
T G G A C G A G C T
G T A C G C C T C C A A C G T G G T G C C C T G G A A G T C C T C C A A G T G G
G T C C C C C C C T
C G A C G G C G G C G A T G G C C A C C G A G G C C G G C T A C G C C G C C G A
C G A G A A G C C C
G T C G A C G A G C A C G T G T G A T A C G T A C

10

配列番号 37

ピキア・スチピチス SUT1

20

M S S Q D I P S G V Q T P S N A S F L E K D E D K I E E V P Q N H D A T L V A L
E S K G I S E Y L L I C F F C L L V A F
G G F V F G F D T G T I S G F V N M S D F L E R F G Q T R A D G T H Y L S N V R
V G L L V S I F N I G C A I G G I F L S
K I G D V Y G R R V G I M A S M V I Y V V G I I V Q I A S Q H A W Y Q V M I G R
A I T G L A V G T V S V L S P L F I G E
S S P K H L R G T L V Y C F Q L C I T L G I F I G Y C V T Y G T K R L S D S R Q
W R V P L G L C F L W A I F L V V G M L
A M P E S P R Y L V E K K R I E D A K K S V A R S N K L S P E D P S V Y T E I Q
L I Q A G I D R E A I A G S A S W T E L
I T G K P A I F R R V V M G I I M Q S L Q Q L T G V N Y F F Y Y G T T I F Q A V
G L K D S F Q T S I I L G V V N F A A T
F I G I W A I E R F G R R S C L L V G S A G M F V C F I I Y S T I G S F H L Y K
D G E Y N N D N T Y K P S G N A L I F I
T C L F I V F F A S T W A G G V Y T I I S E S Y P L R I R S K A M A I A T A A N
W V F G F L I S F F T P F I V S A I H F
K F G Y V F S G C L L F S F F Y V Y F F V V E T K G L S L E D V D E L Y A S N V
V P W K S S K W V P P S T A A M A T E A
G Y A A D E K P V D E H V

30

40

配列番号 38

コドン最適化カンジダ・インターメディア GXS1 コード領域

A T G G G C C T G G A G G A C A A C C G C A T G G T C A A G C G C T T C G T C A
A C G T
C G G C G A G A A G A A G G C C G G C T C G A C G G C C A T G G C C A T C A T C
G T G G G C C T G T
T C G C C G C C T C C G G C G G C G T G C T G T T C G G C T A C G A C A C C G G
C A C C A T C T C G

50

GGCGTGATGACCATGGACTACGTGCTGGCCCCGCTACCCCT
CCAACAAGCA
CTCGTTTACCGCCGACGAGTCCTCGCTGATCGTGTCCATC
CTGTCCCGTGG
GCACCTTCTTTCGGCGGCCCTGTGCGCCCCCTTCTCTGAACGA
CACCCCTGGGC
CGCCGCTGGTGCCCTGATCCTGTGCGGCCCTGATCGTCTTCA
ACATCGGCGC
GATCCTGCAAGGTGATCTCCACCGCCATCCCGCTGCTGTGC
GCCGGGCCGCG
TGATCGCCGGCTTTCGGCGTCTGGCCCTGATCTCCGCGACGAT
CCCCCTGTAC
CAGTCCGAGACCGCCCCCAAGTGGATCCGCGGGCGCCATCG
TGTCCTGCTA
CCAGTGGGGCCATCACCATCGGGCCTGTTCTCTGGCCCTCCTGC
GTGAACAAGG
GCACCGAGCACATGACCAACTCCGGCTCCTACCGCATCCC
CCTGGCGATC
CAGTGCCTGTGGGGCCTCATCCTGGGCGATCGGCGATGATCT
TCCTGCCCGA
GACCCCCCGCTTCTGGATCTCGAAGGGCAACCAGGAGAAAG
GCCGCCGAGT
CCCTGGGCCCGCCTGCGCAAGCTGCCCATCGACCAACCCCGA
CTCCCTGGAG
GAGCTGCGCGACATCACCGCCCGCCTACGAGTTTCGAGACCG
TGTAACGGCAA
GTCGTCGTGGTCCCCAGGTGTTCTCCCCACAAGAACCAACAG
CTGAAGCGCC
TGTTTACCGGCGTCTCGCGATCCAGGCGTTTCCAGCAGCTGAC
CGGCGTGAAAC
TTCATCTTCTACTACGGCACGACGTTTCTTCAAGCGCGCGG
GCGTCAACGG
CTTCAACCATCTCCCTGGGCCAACCAACATCGTGAAACGTGGGC
TCCAACCATCC
CCGGCATCCTGCTGATGGAGGTGCTCGGGCCGCCGCAACAT
GCTGATGGGC
GGCGCCACCGGGCATGTCCCTGTCCCAAGCTGATCGTGGCGA
TCGTCTGGCGT
GGCCACCTCCGAGAAACAACAAGTCCCTCCCAAGTCCGTGCTG
GTCGCGTTCT
CCTGCATCTTTCATCGCCTTCTTTCGCCGCCACCTGGGGCCC
CTGCGCCTGG
GTGGTGGTGGGGCGAGCTGTTCCCCCTGCGCACCCGCGCCA
AGTCCGTGTC
CCTGTGCACC G C C T C C A A C T G G C T G T G G A A C T G G G G C A T C
G C C T A C G C C A
C C C C C T A C A T G G T G G A C G A G G A C A A G G G C A A C C T G G G C T C
C A A C G T C T T C
T T C A T C T G G G G C G G C T T C A A C C T G G C C T G C G T G T T C T T C G
C C T G G T A C T T

10

20

30

40

50

C A T C T A C G A G A C C A A G G G C C T G T C C C T G G A G C A G G T C G A C
G A G C T G T A C G
A G C A C G T G T C C A A G G C C T G G A A G T C C A A G G G C T T C G T G C C
C T C C A A G C A C
T C C T T C C G C G A G C A G G T G G A C C A G C A G A T G G A C T C C A A G A
C C G A G G C C A T
C A T G T C C G A G G A G G C G T C G G T G T G A T A C G T A C

配列番号 39

カンジダ・インターメディア GXS1

10

M G L E D N R M V K R F V N V G E K K A G S T A M A I I V G L F A A S G G V L F
G Y D T G T I S G V M T M D Y V L A R Y
P S N K H S F T A D E S S L I V S I L S V G T F F G A L C A P F L N D T L G R R
W C L I L S A L I V F N I G A I L Q V I
S T A I P L L C A G R V I A G F G V G L I S A T I P L Y Q S E T A P K W I R G A
I V S C Y Q W A I T I G L F L A S C V N
K G T E H M T N S G S Y R I P L A I Q C L W G L I L G I G M I F L P E T P R F W
I S K G N Q E K A A E S L A R L R K L P
I D H P D S L E E L R D I T A A Y E F E T V Y G K S S W S Q V F S H K N H Q L K
R L F T G V A I Q A F Q Q L T G V N F I
F Y Y G T T F F K R A G V N G F T I S L A T N I V N V G S T I P G I L L M E V L
G R R N M L M G G A T G M S L S Q L I V
A I V G V A T S E N N K S S Q S V L V A F S C I F I A F F A A T W G P C A W V V
V G E L F P L R T R A K S V S L C T A S
N W L W N W G I A Y A T P Y M V D E D K G N L G S N V F F I W G G F N L A C V F
F A W Y F I Y E T K G L S L E Q V D E L
Y E H V S K A W K S K G F V P S K H S F R E Q V D Q Q M D S K T E A I M S E E A
S V

20

30

配列番号 40

コドン最適化シロイヌナズナ At __ 共輸送体コード領域

A T G G C C T T C G C G G T C T C G G T G C A G T C C C A C T T C G C C A T C C
G C G C C C T G A A
G C G C G A C C A C T T C A A G A A C C C C T C C C C C C G C A C C T T C T G C
T C C T G C T T C A
A G T C C C G C C C C G A C T C C T C C T A C C T G T C G C T C A A G G A G C G
C A C C T G C T T C
G T G T C C A A G C C C G G C C T G G T G A C C A C C C G C T A C C G C C A C A
T C T T C C A G G T
C G G C G C G G A G A C C G G C G G C G A C T T C G C C G A C T C C G G C G A G
G T C G C G G A C T
C G C T G G C G T C C G A C G C C C C C G A G T C C T T C T C C T G G T C C T C
C G T G A T C C T G
C C C T T C A T C T T C C C C G C G C T G G G C G G C C T G C T G T T C G G C T
A C G A C A T C G G
C G C C A C C T C G G G C G C G A C C C T G T C C C T G C A G T C C C C C G C G
C T G T C G G G C A
C C A C C T G G T T C A A C T T C T C G C C C G T G C A G C T G G G C C T G G T

40

50

C G T G T C C G G C
T C C C T G T A C G G C G C G C T G C T G G G C T C G A T C T C C G T G T A C G
G C G T G G C C G A
C T T C C T C G G C C G C C G C C G C G A G C T G A T C A T C G C C G C G G T C
C T G T A C C T C C
T G G G C T C C C T C A T C A C C G G C T G C G C C C C G A C C T G A A C A T
C C T G C T G G T G
G G C C G C C T G C T C T A C G G C T T C G G C A T C G G C C T G G C C A T G C
A C G G C G C C C C
C C T G T A C A T C G C C G A G A C C T G C C C C T C C C A G A T C C G C G G C 10
A C C C T G A T C T
C G C T C A A G G A G C T G T T C A T C G T G C T G G G C A T C C T C C T G G G
C T T C T C G G T G
G G C T C C T T C C A G A T C G A C G T G G T G G G C G G C T G G C G C T A C A
T G T A C G G C T T
C G G C A C C C C C G T G G C G C T C C T G A T G G G C C T G G G C A T G T G G
T C C C T G C C C G
C G T C G C C C C G C T G G C T G C T G C T G C G C G C G G T G C A G G G C A A
G G G C C A G C T G
C A G G A G T A C A A G G A G A A G G C G A T G C T G G C C C T G T C C A A G C 20
T G C G C G G C C G
C C C C C C G G C G A C A A G A T C T C C G A G A A G C T G G T C G A C G A C
G C C T A C C T G T
C C G T G A A G A C C G C C T A C G A G G A C G A G A A G T C C G G C G G C A A
C T T C C T G G A G
G T G T T C C A G G G C C C C A A C C T G A A G G C C C T G A C C A T C G G C G
G G G G C C T G G T
C C T G T T C C A G C A G A T C A C C G G C C A G C C C T C C G T G C T G T A C
T A C G C C G G C T
C C A T C C T G C A G A C C G C C G G C T T C T C G G C G G C C G C C G A C G C 30
C A C C C G C G T G
T C C G T G A T C A T C G G C G T G T T C A A G C T G C T G A T G A C C T G G G
T C G C G G T C G C
C A A G G T G G A C G A C C T G G G C C G C C G C C C C C T G C T G A T C G G C
G G C G T G T C C G
G C A T C G C G C T G T C G C T G T T C C T G C T G T C C G C C T A C T A C A A
G T T C C T C G G C
G G C T T C C C C C T G G T G G C C G T G G G C G C C C T G C T G C T G T A C G
T G G G C T G C T A
C C A G A T C T C C T T C G G C C C C A T C T C C T G G C T G A T G G T G T C C 40
G A G A T C T T C C
C C C T C C G C A C C C G C G G C C G C G G C A T C T C C C T G G C C G T G C T
G A C C A A C T T C
G G C T C C A A C G C C A T C G T G A C C T T C G C C T T C T C C C C C C T G A
A G G A G T T C C T
G G G C G C C G A G A A C C T G T T C C T C C T G T T C G G C G G C A T C G C C
C T G G T G T C G C
T C C T G T T C G T C A T C C T G G T G G T G C C C G A G A C C A A G G G C C T
C T C G C T G G A G
G A G A T C G A G T C C A A G A T C C T G A A G T G A 50

配列番号 4 1

シロイヌナズナ A t __ 共輸送体

M A F A V S V Q S H F A I R A L K R D H F K N P S P R T F C S C F K S R P D S S
 Y L S L K E R T C F V S K P G L V T T R
 Y R H I F Q V G A E T G G D F A D S G E V A D S L A S D A P E S F S W S S V I L
 P F I F P A L G G L L F G Y D I G A T S
 G A T L S L Q S P A L S G T T W F N F S P V Q L G L V V S G S L Y G A L L G S I
 S V Y G V A D F L G R R R E L I I A A V
 L Y L L G S L I T G C A P D L N I L L V G R L L Y G F G I G L A M H G A P L Y I
 A E T C P S Q I R G T L I S L K E L F I
 V L G I L L G F S V G S F Q I D V V G G W R Y M Y G F G T P V A L L M G L G M W
 S L P A S P R W L L L R A V Q G K G Q L
 Q E Y K E K A M L A L S K L R G R P P G D K I S E K L V D D A Y L S V K T A Y E
 D E K S G G N F L E V F Q G P N L K A L
 T I G G G L V L F Q Q I T G Q P S V L Y Y A G S I L Q T A G F S A A A D A T R V
 S V I I G V F K L L M T W V A V A K V D
 D L G R R P L L I G G V S G I A L S L F L L S A Y Y K F L G G F P L V A V G A L
 L L Y V G C Y Q I S F G P I S W L M V S
 E I F P L R T R G R G I S L A V L T N F G S N A I V T F A F S P L K E F L G A E
 N L F L L F G G I A L V S L L F V I L V
 V P E T K G L S L E E I E S K I L K

10

20

配列番号 4 2

コドン最適化トリコデルマ・リーセイ X L T 1 コード領域

A T G T A C C G C A T C T G G A A C A T C T A C G T C C T G G C G G C G T T C G
 G C A C C A T C G G
 C G G C A T G A T C T T T G G C T T C G A G A T C T C G T C G A T G T C G G C G
 T G G A T C G G C T
 C C G A G C A G T A C C T G G A G T A C T T C A A C C A C C C C G A C T C C A C
 C G A G C A G G G C
 G G C A T C A C C G C C G C C A T G T C C G C C G G C T C C C T G G T G G G C T
 C C C T G C T G G C
 C G G C T G G C T G G C G G A C C G C C T G G G C C G C C G C C T G G C C A T C
 C A G A T C G C C T
 C C G T G G A C T G G A T C G T G G G C G C G G T C C T G C A G T G C T C G T C
 G C A G A A C G T G
 G C C C A C C T G G T G G T G G G C C G C A T C G T G T C C G G C C T G G C G A
 T C G G C A T C A C
 G T C C T C C C A G T G C A T C G T G T A C C T G T C C G A G C T G G C C C C C
 T C C C G C A T C C
 G C G G C C G C G T G G T G G G C A T C C A G C A G T G G T C C A T C G A C T G
 G G G C A T C C T G
 A T C A T G T A C C T G A T C T C C T A C G G C T G C T C C G T G T C C A T C C
 A C C G C C C C G C
 C G C C T T C C G C A T C G C C T G G G G C C T C C A G G C G G T G C C C G G C
 G C C G T C C T G T
 T C T T C T C C C T C T T T T T C T T C C C C G A G T C C C C G C G C T G G C T

30

40

50

GGCCACCAAG
GACCGCTGGGAGGAGTGCCACGAGGTCTTGCGAACCTGC
ACGCGAAGGG
CGACCGCAACAACATCGAGGTGCTGGCCGAGCTGGAGGAG
GTGCGCGAGG
CCGCGCGCATCGCGGCCGAGTCCAAGGAGATCGGGCTACCT
GGGCCCTGTTCT
GCCCCCAAGATGTGGAAGCGCACCCCTGGTTCGGCGTCTCCG
CGCAGATCTG
GCAGCAGCTCTCTGGGCGGGCAACGTGATGCTGTACTACCTG 10
GTGTACATCT
TCAACATGGCCCGGCATGTCCGGCAACACCGCCCTGACCTC
GTCGATCATC
CAGTACGTGATCTTCTCTGGTGACCAACCGGCGGGCGTGCTGT
TCGTGGTGGA
CCGCATCGGCCCGCCGCTGGCTGCTGATCGTTCGGCGCGCATC
ATCTGCGGGCG
TGATCCACTTTCATCGTGGGCGGCCGTGATGGCCGTCTACGG
CCACCACGTG
GACTCGGTCGACGGGCAACGACATCCTGCGCTGGCAGATCG 20
GCGGCCCCCC
CGCCAAGGCCATCATCGCCCTGTGCTACATCTTCTGTGGGC
GTGTACGGCG
TGACCTGGGGCCCCACGGCGCCCTGGATCTACTGCGGGCGAGGT
GTTCCCCCTG
AAGTACC GCGGCCAAGGGCGTGGGCCTGGCGGGCGGCCGGA
ACTGGGGCCTT
CAACCTGGGCCCTTCTTCTGTGCCCCCCCGCCCTTCAACC
AACATCCAGT
GGAAGGCCCTACATGATCTTCTGGGCAACGTTCTGCATCGCCAT 30
GGTGTTTTCAC
ATCTACTTTCATGTACCCCGAGACCGTGAAAGAAAGTCCCTGG
AGGAGATCGA
CGTCTCTGTTCTGAGGGCGACATCCCCCGCCTGGCGCTCCGCC
TCCGCCCGTGT
CCACCTTTCGACGAGAAAGGTGGCCCCGCGCGAAGGAGGCCGG
CGGCCCTGGAG
GAGTTCTCCAAGCGAGGCCGACATCAAGCGACGAGGAGAAAGG
TGTGATACGT
AC 40

配列番号 43

トリコデルマ・リーセイXLT1

MYRIWNIYVLA AFGTIGGMIFGF EISSMSAWIGSEQYLEY
FNHPDSTEQGGITAA MSAGS
LVGSLLAGWLADRLGRRLAIQIASVDWIVGAVLQCSSQNV
AHLVVGRIVSGLAIGITSSQ
CIVYLSELAPSRIRGRVVG IQQWSIDWGI LIMYLISYGCS
VSIHRPAAFR IAWGLQAVPG 50

A V L F F S L F F F P E S P R W L A T K D R W E E C H E V L A N L H A K G D R N
 N I E V L A E L E E V R E A A R I A A E
 S K E I G Y L G L F A P K M W K R T L V G V S A Q I W Q Q L L G G N V M L Y Y L
 V Y I F N M A G M S G N T A L T S S I I
 Q Y V I F L V T T G G V L F V V D R I G R R W L L I V G A I I C G V I H F I V G
 A V M A V Y G H H V D S V D G N D I L R
 W Q I G G P P A K A I I A L C Y I F V G V Y G V T W A H G A W I Y C G E V F P L
 K Y R A K G V G L A A A G N W A F N L A
 L A F F V P P A F T N I Q W K A Y M I F G T F C I A M V F H I Y F M Y P E T V K
 K S L E E I D V L F E G D I P A W R S A
 S A V S T F D E K V A R A K E A G G L E E F S K Q A D I K H E E K V

10

配列番号 4 4

キメラ G P T __ A __ A t X P T キシローストランスロケーター

A T G A G G G T G G A G A T C T G G A G A A C T G G G T C G C C T C A T G C C G
 C G C A G G G G G G A T T G T G C T G G C A T G T G A G T G A T T T G G G T G C
 G G C G A C G C A C C G G G A G A G C G A G C C C A G C C G A G G C G G T A C T
 T T G T T C C G C G G G C C C G C C C T C A C G C C C C G C C C A C C C G C A T
 G C A T C C G C G A C C T G C G C A G G G G C C G T G G G C T C C T C C G A C T
 C G A A C C C C G A C G A G A A G T C C G A C C T G G G C G A G G C C G A G A A
 G A A G G A G A A G A A G G C C A A G A C C C T G C A G C T G G G C A T C G T G
 T T C G G C C T G T G G T A C T T C C A G A A C A T C G T C T T C A A C A T C T
 T C A A C A A G A A A G G C C C T G A A C G T G T T C C C C T A C C C C T G G C T
 C C T G G C C T C C T T C C A G C T G T T C G C C G G C T C C A T C T G G A T G
 C T G G T G C T G T G G T C G T T C A A G C T G T A C C C C T G C C C C A A G A
 T C T C G A A G C C G T T C A T C A T C G C G C T G C T G G G C C C C G C C C T
 G T T C C A C A C C A T C G G C C A C A T C T C C G C C T G C G T G T C C T T C
 T C C A A G G T G G C C G T C T C G T T C A C C C A C G T G A T C A A G T C C G
 C C G A G C C C G T G T T C T C C G T G A T C T T C T C C T C G C T G C T G G G
 C G A C T C C T A C C C C C T G G C C G T G T G G C T G T C C A T C C T G C C C
 A T C G T G A T G G G C T G C T C C C T G G C C G C C G T G A C C G A G G T C T
 C G T T C A A C C T G G G C G G C C T G T C C G G C G C C A T G A T C T C C A A
 C G T G G G C T T C G T G C T G C G C A A C A T C T A C T C C A A G C G C T C C
 C T G C A G T C C T T C A A G G A G A T C G A C G G C C T C A A C C T G T A C G
 G C T G C A T C T C C A T C C T G T C C C T G C T G T A C C T G T T C C C C G T
 G G C C A T C T T C G T G G A G G G C T C C C A C T G G G T G C C C G G C T A C
 C A C A A G G C C A T C G C C T C C G T G G G C A C C C C C T C C A C C T T C T
 A C T T C T G G G T C T G G C T G T C G G G C G T G T T C T A C C A C C T G T A
 C A A C C A G T C C T C C T A C C A G G C C C T G G A C G A G A T C T C C C C C
 C T G A C C T T C T C G G T C G G C A A C A C C A T G A A G C G C G T G G T G G
 T G A T C A T C T C C A C C G T G C T G G T G T T C C G C A A C C C C G T G C G
 C C C C C T G A A C G C C C T G G G C T C C G C C A T C G C C A T C T G C G G C
 A C C T T C C T G T A C T C C C A G G C C A C C G C C A A G A A G A A G A A G A
 T C G A G G T G G G C G G C G A C A A G A A G A A C T G A

20

30

40

配列番号 4 5

G P T __ A __ A t X P T

M R V E I W R T G S P H A A Q G G L C W H V S D L G A A T H R E S E P S R G G T

50

L F R G P A L T P R P P A C I R D L R R
 G R G L L R L E P R R E V R P G R G R E E G E E G Q D P A A G H R V R P V V L P
 E H R L Q H L Q Q E G P E R V P L P L A
 P G L L P A V R R L H L D A G A V V V Q A V P L P Q D L E A V H H R A A G P R P
 V P H H R P H L R L R V L L Q G G R L V
 H P R D Q V R R A R V L R D L L L A A G R L L P P G R V A V H P A H R D G L L P
 G R R D R G L V Q P G R P V R R H D L Q
 R G L R A A Q H L L Q A L P A V L Q G D R R P Q P V R L H L H P V P A V P V P R
 G H L R G G L P L G A R L P Q G H R L R
 G H P L H L L L L G L A V G R V L P P V Q P V L L P G P G R D L P P D L L G R Q
 H H E A R G G D H L H R A G V P Q P R A
 P P E R P G L R H R H L R H L P V L P G H R Q E E E D R G G R R Q E E L

10

配列番号 4 6

キメラ G P T _ _ F _ _ A t X P T キシローストランスロケーター

A T G A G G G T G G A G A T C T G G A G A A C T G G G T C G C C T T A T G C C G
 T G C C G G A G G G C T T G T A C T G G G T T G A G A G T G A T T T G G G T G C
 G G C G A C G C A C C G G G A G A G C G A G C C C A G C C G A G G C G G T A C T
 T T G C T C C G C G G G C C C G C C C T C A C G C C C C G C C C A C C C G C A T
 G C A T C C G C G A C C T G C G C A G G G G C C G T G G G C T C C T C C G A C T
 C G A A C C C C G A C G A G A A G T C C G A C C T G G G C G A G G C C G A G A A
 G A A G G A G A A G A A G G C C A A G A C C C T G C A G C T G G G C A T C G T G
 T T C G G C C T G T G G T A C T T C C A G A A C A T C G T C T T C A A C A T C T
 T C A A C A A G A A A G G C C C T G A A C G T G T T C C C C T A C C C C T G G C T
 C C T G G C C T C C T T C C A G C T G T T C G C C G G C T C C A T C T G G A T G
 C T G G T G C T G T G G T C G T T C A A G C T G T A C C C C T G C C C C A A G A
 T C T C G A A G C C G T T C A T C A T C G C G C T G C T G G G C C C C G C C C T
 G T T C C A C A C C A T C G G C C A C A T C T C C G C C T G C G T G T C C T T C
 T C C A A G G T G G C C G T C T C G T T C A C C C A C G T G A T C A A G T C C G
 C C G A G C C C G T G T T C T C C G T G A T C T T C T C C T C G C T G C T G G G
 C G A C T C C T A C C C C C T G G C C G T G T G G C T G T C C A T C C T G C C C
 A T C G T G A T G G G C T G C T C C C T G G C C G C C G T G A C C G A G G T C T
 C G T T C A A C C T G G G C G G C C T G T C C G G C G C C A T G A T C T C C A A
 C G T G G G C T T C G T G C T G C G C A A C A T C T A C T C C A A G C G C T C C
 C T G C A G T C C T T C A A G G A G A T C G A C G G C C T C A A C C T G T A C G
 G C T G C A T C T C C A T C C T G T C C C T G C T G T A C C T G T T C C C C G T
 G G C C A T C T T C G T G G A G G G C T C C C A C T G G G T G C C C G G C T A C
 C A C A A G G C C A T C G C C T C C G T G G G C A C C C C C T C C A C C T T C T
 A C T T C T G G G T C T G G C T G T C G G G C G T G T T C T A C C A C C T G T A
 C A A C C A G T C C T C C T A C C A G G C C C T G G A C G A G A T C T C C C C C
 C T G A C C T T C T C G G T C G G C A A C A C C A T G A A G C G C G T G G T G G
 T G A T C A T C T C C A C C G T G C T G G T G T T C C G C A A C C C C G T G C G
 C C C C C T G A A C G C C C T G G G C T C C G C C A T C G C C A T C T G C G G C
 A C C T T C C T G T A C T C C C A G G C C A C C G C C A A G A A G A A G A A G A
 T C G A G G T G G G C G G C G A C A A G A A G A A A C T G A

20

30

40

配列番号 4 7

G P T _ _ F _ _ A t X P T

50

M R V E I W R T G S P Y A V P E G L Y W V E S D L G A A T H R E S E P S R G G T
 L L R G P A L T P R P P A C I R D L R R
 G R G L L R L E P R R E V R P G R G R E E G E E G Q D P A A G H R V R P V V L P
 E H R L Q H L Q Q E G P E R V P L P L A
 P G L L P A V R R L H L D A G A V V V Q A V P L P Q D L E A V H H R A A G P R P
 V P H H R P H L R L R V L L Q G G R L V
 H P R D Q V R R A R V L R D L L L A A G R L L P P G R V A V H P A H R D G L L P
 G R R D R G L V Q P G R P V R R H D L Q
 R G L R A A Q H L L Q A L P A V L Q G D R R P Q P V R L H L H P V P A V P V P R
 G H L R G G L P L G A R L P Q G H R L R
 G H P L H L L L L G L A V G R V L P P V Q P V L L P G P G R D L P P D L L G R Q
 H H E A R G G D H L H R A G V P Q P R A
 P P E R P G L R H R H L R H L P V L P G H R Q E E E D R G G R R Q E E L

10

配列番号 48

キメラ S106SAD__AtXPTキシローストランスロケーター

A T G G C C A C C G C A T C C A C T T T C T C G G C G T T C A A T G C C C G C T
 G C G G C G A C C T G C G T C G C T C G G C G G G C T C C G G G C C C C G G C G
 C C C A G C G A G G C C C C T C C C C G T G C G C G G C C G T G G G C T C C T C
 C G A C T C G A A C C C C G A C G A G A A G T C C G A C C T G G G C G A G G C C
 G A G A A G A A G G A G A A G A A G G C C A A G A C C C T G C A G C T G G G C A
 T C G T G T T C G G C C T G T G G T A C T T C C A G A A C A T C G T C T T C A A
 C A T C T T C A A C A A G A A G G C C C T G A A C G T G T T C C C C T A C C C C
 T G G C T C C T G G C C T C C T T C C A G C T G T T C G C C G G C T C C A T C T
 G G A T G C T G G T G C T G T G G T C G T T C A A G C T G T A C C C C T G C C C
 C A A G A T C T C G A A G C C G T T C A T C A T C G C G C T G C T G G G C C C C
 G C C C T G T T C C A C A C C A T C G G C C A C A T C T C C G C C T G C G T G T
 C C T T C T C C A A G G T G G C C G T C T C G T T C A C C C A C G T G A T C A A
 G T C C G C C G A G C C C G T G T T C T C C G T G A T C T T C T C C T C G C T G
 C T G G G C G A C T C C T A C C C C C T G G C C G T G T G G C T G T C C A T C C
 T G C C C A T C G T G A T G G G C T G C T C C C T G G C C G C C G T G A C C G A
 G G T C T C G T T C A A C C T G G G C G G C C T G T C C G G C G C C A T G A T C
 T C C A A C G T G G G C T T C G T G C T G C G C A A C A T C T A C T C C A A G C
 G C T C C C T G C A G T C C T T C A A G G A G A T C G A C G G C C T C A A C C T
 G T A C G G C T G C A T C T C C A T C C T G T C C C T G C T G T A C C T G T T C
 C C C G T G G C C A T C T T C G T G G A G G G C T C C C A C T G G G T G C C C G
 G C T A C C A C A A G G C C A T C G C C T C C G T G G G C A C C C C C T C C A C
 C T T C T A C T T C T G G G T C T G G C T G T C G G G C G T G T T C T A C C A C
 C T G T A C A A C C A G T C C T C C T A C C A G G C C C T G G A C G A G A T C T
 C C C C C C T G A C C T T C T C G G T C G G C A A C A C C A T G A A G C G C G T
 G G T G G T G A T C A T C T C C A C C G T G C T G G T G T T C C G C A A C C C C
 G T G C G C C C C C T G A A C G C C C T G G G C T C C G C C A T C G C C A T C T
 G C G G C A C C T T C C T G T A C T C C C A G G C C A C C G C C A A G A A G A A
 G A A G A T C G A G G T G G G C G G C G A C A A G A A G A A C T G A

20

30

40

配列番号 49

S106SAD__AtXPT

M A T A S T F S A F N A R C G D L R R S A G S G P R R P A R P L P V R G R G L L

50

R L E P R R E V R P G R G R E E G E E G
 Q D P A A G H R V R P V V L P E H R L Q H L Q Q E G P E R V P L P L A P G L L P
 A V R R L H L D A G A V V V Q A V P L P
 Q D L E A V H H R A A G P R P V P H H R P H L R L R V L L Q G G R L V H P R D Q
 V R R A R V L R D L L L A A G R L L P P
 G R V A V H P A H R D G L L P G R R D R G L V Q P G R P V R R H D L Q R G L R A
 A Q H L L Q A L P A V L Q G D R R P Q P
 V R L H L H P V P A V P V P R G H L R G G L P L G A R L P Q G H R L R G H P L H
 L L L L G L A V G R V L P P V Q P V L L
 P G P G R D L P P D L L G R Q H H E A R G G D H L H R A G V P Q P R A P P E R P
 G L R H R H L R H L P V L P G H R Q E E
 E D R G G R R Q E E L

10

配列番号 5 0

ピキア・スチピチス X Y L 2

M T A N P S L V L N K I D D I S F E T Y D A P E I S E P T D V L V Q V K K T G I
 C G S D I H F Y A H G R I G N F V L T K
 P M V L G H E S A G T V V Q V G K G V T S L K V G D N V A I E P G I P S R F S D
 E Y K S G H Y N L C P H M A F A A T P N
 S K E G E P N P P G T L C K Y F K S P E D F L V K L P D H V S L E L G A L V E P
 L S V G V H A S K L G S V A F G D Y V A
 V F G A G P V G L L A A V A K T F G A K G V I V V D I F D N K L K M A K D I G
 A A T H T F N S K T G G S E E L I K A F
 G G N V P N V V L E C T G A E P C I K L G V D A I A P G G R F V Q V G N A A G P
 V S F P I T V F A M K E L T L F G S F R
 Y G F N D Y K T A V G I F D T N Y Q N G R E N A P I D F E Q L I T H R Y K F K D
 A I E A Y D L V R A G K G A V K C L I D
 G P E

20

30

配列番号 5 1

ピキア・スチピチス X Y L 3

M T T T P F D A P D K L F L G F D L S T Q Q L K I I V T D E N L A A L K T Y N V
 E F D S I N S S V Q K G V I A I N D E I
 S K G A I I S P V Y M W L D A L D H V F E D M K K D G F P F N K V V G I S G S C
 Q Q H G S V Y W S R T A E K V L S E L D
 A E S S L S S Q M R S A F T F K H A P N W Q D H S T G K E L E E F E R V I G A D
 A L A D I S G S R A H Y R F T G L Q I R
 K L S T R F K P E K Y N R T A R I S L V S S F V A S V L L G R I T S I E E A D A
 C G M N L Y D I E K R E F N E E L L A I
 A A G V H P E L D G V E Q D G E I Y R A G I N E L K R K L G P V K P I T Y E S E
 G D I A S Y F V T R Y G F N P D C K I Y
 S F T G D N L A T I I S L P L A P N D A L I S L G T S T T V L I I T K N Y A P S
 S Q Y H L F K H P T M P D H Y M G M I C
 Y C N G S L A R E K V R D E V N E K F N V E D K K S W D K F N E I L D K S T D F
 N N K L G I Y F P L G E I V P N A A A Q
 I K R S V L N S K N E I V D V E L G D K N W Q P E D D V S S I V E S Q T L S C R
 L R T G P M L S K S G D S S A S S S A S
 P Q P E G D G T D L H K V Y Q D L V K K F G D L Y T D G K K Q T F E S L T A R P

40

50

N R C Y Y V G G A S N N G S I I R K M G
S I L A P V N G N Y K V D I P N A C A L G G A Y K A S W S Y E C E A K K E W I G
Y D Q Y I N R L F E V S D E M N S F E V
K D K W L E Y A N G V

【配列表】

2014513964000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 12/36690

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C12N 1/13, C12P 7/00 (2012.01) USPC - 435/257.3, 435/132 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) USPC -- 435/257., 435/132, 435/257.1, 435/243, 435/41 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST -- PGPB,USPT,USOC,EPAB,JPAB; Dialog Classic Files -- 654, 652, 349, 348, 340, 35, 65, 155; USPTO Web Page; Google Scholar; Search terms -- microalgae, recombinant, xylose metabolism, exogenous nucleic acid, xylose transporter, xylose isomerase, xylose reductase, oleaginous, triglyceride production, Prototheca morformis, plastid gene replace		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X -- Y -- A	US 2011/0015417 A1 (TRIMBUR et al.) 20 January 2011 (20.01.2011) para [0003], [0010], [0016]-[0018], [0040], [0048], [0049], [0053], [0144], [0238], [0239], [0247], [0438], [0439], [0445], [0636], abstract	1-3 ----- 26-31, 34-39 ----- 32, 57-66
Y -- A	US 2010/0035320 A1 (BLANCHARD et al.) 11 February 2010 (11.02.2010) para [0015], [0081], [0119]	26-31, 34-39 ----- 32
A	US 2006/0048240 A1 (ALEXANDROV et al.) 02 March 2006 (02.03.2006) SEQ ID NO: 20631	57-66
A	US 2006/0075622 A1 (CLEVELAND et al.) 06 April 2006 (06.04.2006) para [0170], SEQ ID NO: 16884	57-66
A	US 2008/0014620 A1 (OP DEN CAMP et al.) 17 January 2008 (17.01.2008) claims 21-24, SEQ ID NO: 1	57-66
A	US 2010/0093031 A1 (KOBAYASHI et al.) 15 April 2010 (15.04.2010) para [0073], [0100], SEQ ID NO: 24	57-66
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 10 August 2012 (10.08.2012)		Date of mailing of the international search report 30 AUG 2012
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 12/36690

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 4-25, 33, 40-56 and 67-90
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I		テーマコード (参考)
A 6 1 K 8/99 (2006.01)	A 6 1 K	8/99	
A 6 1 K 8/37 (2006.01)	A 6 1 K	8/37	
A 6 1 Q 19/00 (2006.01)	A 6 1 Q	19/00	
A 6 1 Q 5/00 (2006.01)	A 6 1 Q	5/00	
A 6 1 Q 1/00 (2006.01)	A 6 1 Q	1/00	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA

(72) 発明者 チュア , ペネロペ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0 , サウス サンフランシスコ , ゲートウェイ
ブルバード 2 2 5

(72) 発明者 ソマンチ , アラピンド
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0 , サウス サンフランシスコ , ゲートウェイ
ブルバード 2 2 5

F ターム(参考) 4B064 AD85 CA05 CA06 CA08 CA19 CC24 CD09 DA01 DA10 DA16
DA20
4B065 AA01X AA57X AA72X AA77X AA83X AB01 AC14 BA01 BB15 BB26
CA13 CA41 CA54
4C083 AA031 AC421 CC01 FF01