

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-201905

(P2017-201905A)

(43) 公開日 平成29年11月16日(2017.11.16)

(51) Int. Cl.		F I			テーマコード (参考)	
C 1 2 P	7/64	(2006.01)	C 1 2 P	7/64	Z N A	4 B O 5 O
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	A	4 B O 6 4
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21		4 B O 6 5
C 1 2 N	1/20	(2006.01)	C 1 2 N	1/20	A	
C 1 2 N	9/00	(2006.01)	C 1 2 N	9/00		
審査請求 未請求 請求項の数 14 O L (全 27 頁)						

(21) 出願番号 特願2016-94479 (P2016-94479)
 (22) 出願日 平成28年5月10日 (2016. 5. 10)

(71) 出願人 000000918
 花王株式会社
 東京都中央区日本橋茅場町 1 丁目 1 4 番 1
 O 号
 (74) 代理人 100076439
 弁理士 飯田 敏三
 (74) 代理人 100141771
 弁理士 星野 宏和
 (72) 発明者 寺井 三佳
 和歌山県和歌山市湊 1 3 3 4 花王株式会
 社研究所内
 (72) 発明者 川原 彰人
 和歌山県和歌山市湊 1 3 3 4 花王株式会
 社研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 脂質の製造方法

(57) 【要約】

【課題】長鎖脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質の生産性を向上させる、脂質の製造方法を提供する。

【解決手段】下記タンパク質 (A) ~ (D) の少なくともいずれか 1 つをコードする遺伝子の発現をシアノバクテリアの細胞内で促進させた形質転換体を培養して脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質を生産させる、脂質の製造方法。

(A) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

(B) 前記タンパク質 (A) のアミノ酸配列と同一性が 6 0 % 以上のアミノ酸配列からなり、かつ β -ケトアシル-A C P シンターゼ活性を有するタンパク質。

(C) 配列番号 4 4 で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

(D) 前記タンパク質 (C) のアミノ酸配列と同一性が 6 0 % 以上のアミノ酸配列からなり、かつ β -ケトアシル-A C P シンターゼ活性を有するタンパク質。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記タンパク質（A）～（D）の少なくともいずれか 1 つをコードする遺伝子の発現をシアノバクテリアの細胞内で促進させた形質転換体を培養して脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質を生産させる、脂質の製造方法。

（A）配列番号 1 で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

（B）前記タンパク質（A）のアミノ酸配列と同一性が 60 % 以上のアミノ酸配列からなり、かつ β -ケトアシル-ACP シンターゼ活性を有するタンパク質。

（C）配列番号 44 で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

（D）前記タンパク質（C）のアミノ酸配列と同一性が 60 % 以上のアミノ酸配列からなり、かつ β -ケトアシル-ACP シンターゼ活性を有するタンパク質。

10

【請求項 2】

下記タンパク質（A）～（D）の少なくともいずれか 1 つをコードする遺伝子の発現をシアノバクテリアの細胞内で促進させ、シアノバクテリアの細胞内で生産される長鎖脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質の生産性を向上させる、脂質生産性の向上方法。

（A）配列番号 1 で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

（B）前記タンパク質（A）のアミノ酸配列と同一性が 60 % 以上のアミノ酸配列からなり、かつ β -ケトアシル-ACP シンターゼ活性を有するタンパク質。

（C）配列番号 44 で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

（D）前記タンパク質（C）のアミノ酸配列と同一性が 60 % 以上のアミノ酸配列からなり、かつ β -ケトアシル-ACP シンターゼ活性を有するタンパク質。

20

【請求項 3】

下記タンパク質（A）～（D）の少なくともいずれか 1 つをコードする遺伝子の発現をシアノバクテリアの細胞内で促進させて、シアノバクテリアの細胞内で生産される長鎖脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質の生産性を向上させ、生産される全脂肪酸又は全脂質中の脂肪酸又は脂質の組成を改変する、脂質の組成の改変方法。

（A）配列番号 1 で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

（B）前記タンパク質（A）のアミノ酸配列と同一性が 60 % 以上のアミノ酸配列からなり、かつ β -ケトアシル-ACP シンターゼ活性を有するタンパク質。

（C）配列番号 44 で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

（D）前記タンパク質（C）のアミノ酸配列と同一性が 60 % 以上のアミノ酸配列からなり、かつ β -ケトアシル-ACP シンターゼ活性を有するタンパク質。

30

【請求項 4】

下記タンパク質（A）～（D）の少なくともいずれか 1 つをコードする遺伝子の発現をシアノバクテリアの細胞内で促進させる、長鎖脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質の生産能をシアノバクテリアに付与する方法。

（A）配列番号 1 で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

（B）前記タンパク質（A）のアミノ酸配列と同一性が 60 % 以上のアミノ酸配列からなり、かつ β -ケトアシル-ACP シンターゼ活性を有するタンパク質。

（C）配列番号 44 で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

（D）前記タンパク質（C）のアミノ酸配列と同一性が 60 % 以上のアミノ酸配列からなり、かつ β -ケトアシル-ACP シンターゼ活性を有するタンパク質。

40

【請求項 5】

前記タンパク質（A）～（D）の少なくともいずれか 1 つをコードする遺伝子をシアノバクテリアに導入して前記遺伝子の発現を促進させる、請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

前記タンパク質（A）～（D）が、長鎖 β -ケトアシル-ACP 合成活性を有する β -ケトアシル-ACP シンターゼである、請求項 1～5 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 7】

50

前記タンパク質（Ａ）～（Ｄ）の少なくともいずれか１つをコードする遺伝子が、下記ＤＮＡ（ａ）～（ｄ）のいずれか１つからなる遺伝子である、請求項１～６のいずれか１項記載の方法。

（ａ）配列番号２で表される塩基配列からなるＤＮＡ。

（ｂ）前記ＤＮＡ（ａ）の塩基配列と同一性が６０％以上の塩基配列からなり、かつβ-ケトアシル-ＡＣＰシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするＤＮＡ。

（ｃ）配列番号４５で表される塩基配列からなるＤＮＡ。

（ｄ）前記ＤＮＡ（ｃ）の塩基配列と同一性が６０％以上の塩基配列からなり、かつβ-ケトアシル-ＡＣＰシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするＤＮＡ。

【請求項８】

前記シアノバクテリアが、シネコシスティス（*Synechocystis*）属又はシネココッカス（*Synechococcus*）属のシアノバクテリアである、請求項１～７のいずれか１項記載の方法。

【請求項９】

前記脂質が長鎖脂肪酸又はそのエステル化合物を含む、請求項１～８のいずれか１項記載の方法。

【請求項１０】

下記タンパク質（Ａ）～（Ｄ）の少なくともいずれか１つをコードする遺伝子の発現をシアノバクテリアの細胞内で促進させた形質転換体。

（Ａ）配列番号１で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

（Ｂ）前記タンパク質（Ａ）のアミノ酸配列と同一性が６０％以上のアミノ酸配列からなり、かつβ-ケトアシル-ＡＣＰシンターゼ活性を有するタンパク質。

（Ｃ）配列番号４４で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

（Ｄ）前記タンパク質（Ｃ）のアミノ酸配列と同一性が６０％以上のアミノ酸配列からなり、かつβ-ケトアシル-ＡＣＰシンターゼ活性を有するタンパク質。

【請求項１１】

下記タンパク質（Ａ）～（Ｄ）の少なくともいずれか１つをコードする遺伝子、又は当該遺伝子を含む組換えベクターをシアノバクテリアに導入してなる形質転換体。

（Ａ）配列番号１で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

（Ｂ）前記タンパク質（Ａ）のアミノ酸配列と同一性が６０％以上のアミノ酸配列からなり、かつβ-ケトアシル-ＡＣＰシンターゼ活性を有するタンパク質。

（Ｃ）配列番号４４で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

（Ｄ）前記タンパク質（Ｃ）のアミノ酸配列と同一性が６０％以上のアミノ酸配列からなり、かつβ-ケトアシル-ＡＣＰシンターゼ活性を有するタンパク質。

【請求項１２】

前記タンパク質（Ａ）～（Ｄ）が、長鎖β-ケトアシル-ＡＣＰ合成活性を有するβ-ケトアシル-ＡＣＰシンターゼである、請求項１０又は１１に記載の形質転換体。

【請求項１３】

前記タンパク質（Ａ）～（Ｄ）の少なくともいずれか１つをコードする遺伝子が、下記ＤＮＡ（ａ）～（ｄ）のいずれか１つからなる遺伝子である、請求項１０～１２のいずれか１項に記載の形質転換体。

（ａ）配列番号２で表される塩基配列からなるＤＮＡ。

（ｂ）前記ＤＮＡ（ａ）の塩基配列と同一性が６０％以上の塩基配列からなり、かつβ-ケトアシル-ＡＣＰシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするＤＮＡ。

（ｃ）配列番号４５で表される塩基配列からなるＤＮＡ。

（ｄ）前記ＤＮＡ（ｃ）の塩基配列と同一性が６０％以上の塩基配列からなり、かつβ-ケトアシル-ＡＣＰシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするＤＮＡ。

【請求項１４】

前記シアノバクテリアが、シネコシスティス（*Synechocystis*）属又はシネココッカス（*Synechococcus*）属のシアノバクテリアである、請求項１０～１３のいずれか１項記載

10

20

30

40

50

の形質転換体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、脂質の製造方法に関する。また、本発明は当該方法に用いる形質転換体に関する。

10

【背景技術】

【0002】

脂肪酸は脂質の主要構成成分の1つであり、生体内においてグリセリンとのエステル結合により生成するトリアシルグリセロール等の脂質（油脂）を構成する。また、多くの動植物において脂肪酸はエネルギー源として貯蔵され利用される物質でもある。動植物内に蓄えられた脂肪酸や脂質は、食用又は工業用として広く利用されている。

例えば、炭素原子数12～18前後の高級脂肪酸を還元して得られる高級アルコールの誘導体は、界面活性剤として用いられている。アルキル硫酸エステル塩やアルキルベンゼンスルホン酸塩等は陰イオン性界面活性剤として利用されている。また、ポリオキシアルキレンアルキルエーテルやアルキルポリグリコシド等は非イオン性界面活性剤として利用されている。そしてこれらの界面活性剤は、いずれも洗浄剤や殺菌剤等に利用されている。同じ高級アルコールの誘導体であるアルキルアミン塩やモノ又はジアルキル4級アンモニウム塩等のカチオン性界面活性剤は、繊維処理剤、毛髪リンス剤、殺菌剤等に日常的に利用されている。また、ベンザルコニウム型4級アンモニウム塩は殺菌剤や防腐剤等に日常的に利用されている。さらに、植物油脂はバイオディーゼル燃料の原料としても利用されている。

20

また、炭素原子数が20以上の長鎖脂肪酸は不飽和度によって化学的性質が異なり、様々な用途に用いられている。例えば、EPA（エイコサペンタエン酸）やDHA（ドコサヘキサエン酸）といった長鎖多価不飽和脂肪酸は機能性食品として用いられている。また、アラキジン酸、ベヘン酸、エルカ酸といった長鎖飽和脂肪酸又は長鎖一価不飽和脂肪酸は、分散剤や潤滑油などの工業原料として有用である。

30

【0003】

一般に、植物の脂肪酸合成経路は葉緑体に局在する。葉緑体ではアセチル-CoA（アシルキャリアプロテイン、acyl-carrier-protein）を出発物質とし、炭素鎖の伸長反応が繰り返され、最終的に炭素原子数16又は18のアシル-CoA（脂肪酸残基であるアシル基とCoAとからなる複合体）が合成される。この脂肪酸合成経路に関与する酵素のうち、 β -ケトアシル-CoAシンターゼ（ β -Ketoacyl-acyl-carrier-protein synthase、以下「KAS」ともいう）はアシル基の鎖長制御に関与する酵素である。植物では、KAS I、KAS II、KAS III、KAS IV、のそれぞれ機能が異なる4種のKASが存在することが知られている。このうち、KAS IIIは鎖長伸長反応の開始段階で働き、炭素原子数2のアセチル-CoA（又はアセチル-CoA）を炭素原子数4の β -ケトアシル-CoAに伸長する。それ以降の伸長反応には、KAS I、KAS II、及びKAS IVが関与する。KAS Iは主に炭素原子数16のパルミトイル-CoAまでの伸長反応に関与し、KAS IIは主に炭素原子数18のステアロイル-CoAまでの伸長反応に関与する。一方、KAS IVは炭素原子数6～14の中鎖アシル-CoAまでの伸長反応に関与するといわれている。

40

【0004】

前述のように、脂肪酸や脂質の利用は多岐にわたる。そのため、植物や細菌等の宿主において生体内での脂肪酸や脂質の生産性を向上させる試みが行われている。さらに、脂肪酸の用途や有用性はその炭素原子数（鎖長）や不飽和結合数（不飽和度）に依存するため、脂肪酸の炭素原子数や不飽和結合数を制御する試みも行われている。

50

シアノバクテリア（藍色細菌）は真正細菌の一群であり、光合成によって酸素を産生し、二酸化炭素を固定化する能力を有する。シアノバクテリアは、それらが10数億年前に真核生物に細胞内共生（1次共生）したことが葉緑体の起源であると考えられている。そのため、葉緑体の祖先生物として光合成研究に広く利用されている。また、シアノバクテリアは他の植物と比べて生育が速く、かつ高い光合成能力を有する。さらにシアノバクテリアは形質転換能も有する。

そのためシアノバクテリアは外来DNAを細胞内に導入することで微生物学的な物質生産に利用可能であることから、バイオ燃料などの物質の生産用宿主として注目されている。

【0005】

シアノバクテリアを用いた物質生産の例として、脂肪酸の生産が報告されている（非特許文献1）。しかし、シアノバクテリアを用いて、炭素原子数が20以上の長鎖脂肪酸を生産する試みについてはほとんど報告がない。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Liu X. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2011, vol. 108, p. 6899-6904

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は、長鎖脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質の生産性を向上させる、シアノバクテリアを用いた脂質の製造方法の提供を課題とする。

また本発明は、長鎖脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質の生産性を向上させたシアノバクテリアの形質転換体の提供を課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは上記課題に鑑み、鋭意検討を行った。

本発明者らはまず、長鎖脂肪酸の合成に関与する酵素として、藻類の1種であるナンノクロロプシス（*Nannochloropsis*）属の藻類のKASを新たに同定した。そして、このナンノクロロプシス属の藻類のKASをコードする遺伝子の発現をシアノバクテリアの細胞内で促進させた結果、元来長鎖脂肪酸の生産能を有さないシアノバクテリアが長鎖脂肪酸の生産能を獲得することを見出した。そして、ナンノクロロプシス属の藻類のKASをコードする遺伝子の発現を促進させない場合と比較して、長鎖脂肪酸の生産性が向上することを見出した。

本発明はこれらの知見に基づいて完成するに至ったものである。

【0009】

本発明は、下記タンパク質（A）～（D）の少なくともいずれか1つをコードする遺伝子の発現をシアノバクテリアの細胞内で促進させた形質転換体を培養して脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質を生産させる、脂質の製造方法に関する。

（A）配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

（B）前記タンパク質（A）のアミノ酸配列と同一性が60%以上のアミノ酸配列からなり、かつβ-ケトアシル-CoAシンターゼ活性（以下、「KAS活性」ともいう）を有するタンパク質。

（C）配列番号44で表されるタンパク質。

（D）前記タンパク質（C）のアミノ酸配列と同一性が60%以上のアミノ酸配列からなり、かつKAS活性を有するタンパク質。

【0010】

また本発明は、前記タンパク質（A）～（D）の少なくともいずれか1つをコードする遺伝子の発現をシアノバクテリアの細胞内で促進させ、シアノバクテリアの細胞内で生産

10

20

30

40

50

される長鎖脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質の生産性を向上させる、脂質生産性の向上方法に関する。

また本発明は、前記タンパク質（A）～（D）の少なくともいずれか1つをコードする遺伝子の発現をシアノバクテリアの細胞内で促進させて、シアノバクテリアの細胞内で生産される長鎖脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質の生産性を向上させ、生産される全脂肪酸又は全脂質中の脂肪酸又は脂質の組成を改変する、脂質の組成の改変方法に関する。

また本発明は、前記タンパク質（A）～（D）の少なくともいずれか1つをコードする遺伝子の発現をシアノバクテリアの細胞内で促進させる、長鎖脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質の生産性をシアノバクテリアに付与する方法に関する。

【0011】

10

さらに本発明は、前記タンパク質（A）～（D）の少なくともいずれか1つをコードする遺伝子の発現をシアノバクテリアの細胞内で促進させた形質転換体に関する。

【発明の効果】

【0012】

本発明の脂質の製造方法によれば、長鎖脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質の生産性を向上させることができる。

また本発明の形質転換体は、長鎖脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質の生産性に優れる。

【発明を実施するための形態】

【0013】

20

本明細書における「脂質」は、中性脂肪（トリアシルグリセロール等）、ろう、セラミド等の単純脂質；リン脂質、糖脂質、スルホ脂質等の複合脂質；及びこれらの脂質から誘導される、脂肪酸、アルコール類、炭化水素類等の誘導脂質を包含するものである。

また本明細書において、脂肪酸や、脂肪酸を構成するアシル基の表記において「C_x：y」とあるのは、炭素原子数xで二重結合の数がyであることを表す。「C_x」は炭素原子数xの脂肪酸やアシル基を表す。

さらに本明細書において、塩基配列及びアミノ酸配列の同一性は、Lipman-Pearson法（Science, 1985, vol. 227, p. 1435-1441）によって計算される。具体的には、遺伝情報処理ソフトウェアGenetyx-Winのホモロジー解析（Search homology）プログラムを用いて、Unit size to compare (ktup) を2として解析を行うことにより算出される。

30

また本明細書において「ストリンジェントな条件」としては、例えばMolecular Cloning-A LABORATORY MANUAL THIRD EDITION [Joseph Sambrook, David W. Russell, Cold Spring Harbor Laboratory Press] 記載の方法が挙げられる。例えば、6×SSC（1×SSCの組成：0.15M塩化ナトリウム、0.015Mクエン酸ナトリウム、pH7.0）、0.5%SDS、5×デンハート及び100mg/mLニシン精子DNAを含む溶液にプローブとともに65℃で8～16時間恒温し、ハイブリダイズさせる条件が挙げられる。

さらに明細書において、遺伝子の「上流」とは、翻訳開始点からの位置ではなく、対象として捉えている遺伝子又は領域の5'側に続く領域を示す。一方、遺伝子の「下流」とは、対象として捉えている遺伝子又は領域の3'側に続く領域を示す。

40

【0014】

前記タンパク質（A）～（D）（以下、「NoKASII」ともいう）はKASの1種であり、長鎖脂肪酸の合成に関与するタンパク質である。配列番号1のアミノ酸配列からなるタンパク質は、ナンノクロプシス属に属する藻類であるナンノクロプシス・オキュラータ（*Nannochloropsis oculata*）NIES2145株由来のKASの1つである。

【0015】

KASは、脂肪酸合成経路においてアシル基の鎖長制御に関与する酵素である。植物の脂肪酸合成経路は一般的に葉緑体に局在する。葉緑体では、アセチル-CoA（又はアセチル-CoA）を出発物質とし、炭素鎖の伸長反応が繰り返され、最終的に炭素原子数16又は18のアシル-CoAが合成される。次いで、アシル-CoAチオエステラーゼ（以

50

下、単に「TE」ともいう)の作用によってアシル-ACPのチオエステル結合が加水分解され、遊離の脂肪酸が生成する。

脂肪酸合成の第一段階では、アセチル-ACP (又はアセチル-CoA) とマロニル-ACPとの縮合反応により、アセトアセチル-ACPが生成する。この反応をKASが触媒する。次いで、 β -ケトアシル-ACPレダクターゼによりアセトアセチル-ACPのケト基が還元されてヒドロキシブチリル-ACPが生成する。続いて、 β -ヒドロキシアシル-ACPデヒドラーゼによりヒドロキシブチリル-ACPが脱水され、クロトニル-ACPが生成する。最後に、エノイル-ACPレダクターゼによりクロトニル-ACPが還元されて、ブチリル-ACPが生成する。これら一連の反応により、アセチル-ACPからアシル基の炭素鎖が2個伸長されたブチリル-ACPが生成する。以下、同様の反応を繰り返すことで、アシル-ACPの炭素鎖が伸長し、最終的に炭素原子数16又は18のアシル-ACPが合成される。

10

【0016】

前記タンパク質(A)～(D)はいずれも、KAS活性を有する。本明細書において「KAS活性」とは、アセチル-ACP (又はアセチル-CoA) やアシル-ACPと、マロニル-ACPとの縮合反応を触媒する活性を意味する。

タンパク質がKAS活性を有することは、例えば、宿主細胞内で機能するプロモーターの下流に前記タンパク質をコードする遺伝子を連結したDNAを、脂肪酸分解系が欠損した宿主細胞へ導入し、導入した遺伝子が発現する条件下で細胞を培養し、宿主細胞内又は培養液中の脂肪酸組成の変化を常法により分析することで確認できる。あるいは、宿主細胞内で機能するプロモーターの下流に前記タンパク質をコードする遺伝子を連結したDNAを宿主細胞へ導入し、導入した遺伝子が発現する条件下で細胞を培養した後、細胞の破碎液に対し、各種アシル-ACPを基質とした鎖長伸長反応を行うことにより確認できる。

20

【0017】

KASはその基質特異性によってKAS I、KAS II、KAS III、又はKAS IVに分類される。KAS IIIは、炭素原子数2のアセチル-ACP (又はアセチル-CoA) を基質とし、炭素原子数2から4の伸長反応を触媒する。KAS Iは、主に炭素原子数4から16の伸長反応を触媒し、炭素原子数16のパルミトイル-ACPを合成する。KAS IIは、主に炭素原子数18以上の長鎖アシル基への伸長反応を触媒し、長鎖アシル-ACPを合成する。KAS IVは主に炭素原子数6から14の伸長反応を触媒し、中鎖アシル-ACPを合成する。

30

後述の実施例で示すように、前記タンパク質(A)又は(C)をコードする遺伝子の発現を促進した形質転換体では、炭素原子数20、22、又は24の長鎖脂肪酸の生産性が向上する。よって前記タンパク質(A)～(D)は、炭素原子数20以上の長鎖 β -ケトアシル-ACP合成活性を有する、KAS II型のKASであると考えられる。なお本明細書において「長鎖 β -ケトアシル-ACP合成活性」とは、主に炭素原子数16以上のアシル-ACPを基質とし、炭素原子数20以上の長鎖アシル-ACP合成の伸長反応を触媒する活性のことをいう。また本明細書において「長鎖」とは、アシル基の炭素原子数が20以上、好ましくは炭素原子数が20、22又は24であることをいう。

また、ChloroP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>) やtargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) を用いた局在予測より、前記タンパク質(A)は葉緑体局在型のKASであり、N末端側のアミノ酸40残基は葉緑体移行シグナル配列であると考えられる。

40

【0018】

KASの長鎖 β -ケトアシル-ACP合成活性については、例えば、宿主細胞内で機能するプロモーターの下流にタンパク質をコードする遺伝子を連結したDNAを、脂肪酸分解系が欠損した宿主細胞へ導入し、導入した遺伝子が発現する条件下で細胞を培養して、宿主細胞又は培養液中の脂肪酸組成の変化を常法により分析することで確認できる。また、宿主細胞内で機能するプロモーターの下流にタンパク質をコードする遺伝子を連結したDNAを、宿主細胞へ導入し、導入した遺伝子が発現する条件下で細胞を培養した後、細胞

50

の破碎液に対し鎖長伸長反応を行うことにより確認できる。

【0019】

タンパク質（B）は、前記タンパク質（A）のアミノ酸配列との同一性が60%以上のアミノ酸配列からなり、かつKAS活性を有する。タンパク質（D）は、前記タンパク質（C）のアミノ酸配列との同一性が60%以上のアミノ酸配列からなり、かつKAS活性を有する。

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

【0020】

前記タンパク質（B）において、KAS活性の点から、前記タンパク質（A）のアミノ酸配列との同一性は65%以上が好ましく、70%以上がより好ましく、75%以上がより好ましく、80%以上がより好ましく、85%以上がより好ましく、90%以上がより好ましく、92%以上がより好ましく、95%以上がより好ましく、98%以上がより好ましく、99%以上がさらに好ましい。また、前記タンパク質（B）として、前記タンパク質（A）のアミノ酸配列に、1又は複数個（例えば1個以上190個以下、好ましくは1個以上166個以下、より好ましくは1個以上142個以下、より好ましくは1個以上118個以下、より好ましくは1個以上95個以下、より好ましくは1個以上71個以下、より好ましくは1個以上47個以下、より好ましくは1個以上38個以下、より好ましくは1個以上23個以下、より好ましくは1個以上9個以下、さらに好ましくは1個以上4個以下）のアミノ酸を欠失、置換、挿入又は付加したタンパク質が挙げられる。

またタンパク質（B）として、前記タンパク質（A）のアミノ酸配列と同一性が60%以上のアミノ酸配列からなり、KAS活性を有し、かつ葉緑体移行シグナル配列が削除されていることが好ましい。後述の実施例で示すように、配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質においてN末端側の葉緑体移行シグナル配列を削除することで、長鎖脂肪酸の生産性がさらに向上する。このようなタンパク質（B）としては、N末端側のアミノ酸配列として、配列番号1の1位～40位の任意の位置でN末端側のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列と、C末端側のアミノ酸配列として、配列番号1の41位～475位のアミノ酸配列からなるタンパク質であってもよい。

またタンパク質（B）として、前記タンパク質（A）又は（B）のアミノ酸配列にタンパク質の輸送や分泌に関与するシグナルペプチドが付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であってもよい。

【0021】

前記タンパク質（C）は、配列番号1の41位～475位のアミノ酸配列と、そのN末端側に付加したメチオニン残基からなる。なお前記タンパク質（B）は、タンパク質（C）も包含する。タンパク質（C）では、配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質から、N末端側の葉緑体移行シグナル配列（配列番号1の1位～40位のアミノ酸残基）が削除されている。

【0022】

前記タンパク質（D）において、KAS活性の点から、前記タンパク質（C）のアミノ酸配列との同一性は65%以上が好ましく、70%以上がより好ましく、75%以上がより好ましく、80%以上がより好ましく、85%以上がより好ましく、90%以上がより好ましく、92%以上がより好ましく、95%以上がより好ましく、98%以上がより好ましく、99%以上がさらに好ましい。また、前記タンパク質（D）として、前記タンパク質（C）のアミノ酸配列に、1又は複数個（例えば1個以上174個以下、好ましくは1個以上152個以下、より好ましくは1個以上130個以下、より好ましくは1個以上108個以下、より好ましくは1個以上87個以下、より好ましくは1個以上65個以下、

より好ましくは1個以上43個以下、より好ましくは1個以上34個以下、より好ましくは1個以上21個以下、より好ましくは1個以上8個以下、さらに好ましくは1個以上4個以下)のアミノ酸を欠失、置換、挿入又は付加したタンパク質が挙げられる。

またタンパク質(D)として、前記タンパク質(C)又は(D)のアミノ酸配列にタンパク質の輸送や分泌に関与するシグナルペプチドが付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であってもよい。

【0023】

アミノ酸配列に変異を導入する方法としては、例えば、アミノ酸配列をコードする塩基配列に変異を導入する方法が挙げられる。変異を導入する方法としては、部位特異的な変異導入法が挙げられる。具体的な部位特異的変異の導入方法としては、SOE-PCR反応を利用した方法、ODA法、Kunkel法等が挙げられる。また、Site-Directed Mutagenesis System Mutan-SuperExpress Kmキット(タカラバイオ社)、Transformer™ Site-Directed Mutagenesisキット(Clonetech社)、KOD-Plus-Mutagenesis Kit(東洋紡社)等の市販のキットを利用することもできる。また、ランダムな遺伝子変異を与えた後、適当な方法により酵素活性の評価及び遺伝子解析を行うことにより目的遺伝子を取得することもできる。

【0024】

前記タンパク質(A)～(D)は、通常の化学的手法、遺伝子工学的手法等により得ることができる。例えば、ナンノクロロプシス・オキユラータから単離、精製等することで天然物由来のタンパク質を取得することができる。また、配列番号1に示すアミノ酸配列情報をもとに人工的に化学合成することで、前記タンパク質(A)～(D)を得ることができる。あるいは、遺伝子組み換え技術により、組換えタンパク質として前記タンパク質(A)～(D)を作製してもよい。組換えタンパク質を作製する場合には、後述するβ-ケトアシル-ACPシンターゼ遺伝子を用いることができる。

なお、ナンノクロロプシス・オキユラータ等の藻類は、私的又は公的な研究所等の保存機関より入手することができる。例えば、ナンノクロロプシス・オキユラータNIES-2145株は、国立環境研究所(NIES)から入手することができる。

【0025】

前記タンパク質(A)～(D)をコードする遺伝子(以下、「KAS遺伝子」ともいう)の一例として、下記DNA(a)～(d)のいずれか1つからなる遺伝子(以下、「NoKASII遺伝子」ともいう)が挙げられる。

(a) 配列番号2で表される塩基配列からなるDNA。

(b) 前記DNA(a)の塩基配列と同一性が60%以上の塩基配列からなり、かつKAS活性を有するタンパク質をコードするDNA。

(c) 配列番号45で表される塩基配列からなるDNA。

(d) 前記DNA(c)の塩基配列と同一性が60%以上の塩基配列からなり、かつKAS活性を有するタンパク質をコードするDNA。

配列番号2の塩基配列は、配列番号1のアミノ酸配列からなるタンパク質(ナンノクロロプシス・オキユラータNIES2145株由来のKAS)をコードする遺伝子の塩基配列である。

【0026】

前記DNA(b)において、KAS活性の点から、前記DNA(a)の塩基配列との同一性は65%以上が好ましく、70%以上がより好ましく、75%以上がより好ましく、80%以上がより好ましく、85%以上がより好ましく、90%以上がより好ましく、92%以上がより好ましく、95%以上がより好ましく、98%以上がより好ましく、99%以上がさらに好ましい。また前記DNA(b)として、配列番号2で表される塩基配列において1又は複数個(例えば1個以上571個以下、好ましくは1個以上499個以下、より好ましくは1個以上428個以下、好ましくは1個以上357個以下、より好ましくは1個以上285個以下、より好ましくは1個以上214個以下、より好ましくは1個以

上142個以下、より好ましくは1個以上114個以下、より好ましくは1個以上71個以下、より好ましくは1個以上28個以下、さらに好ましくは1個以上14個以下)の塩基が欠失、置換、挿入、又は付加されており、かつKAS活性を有する前記タンパク質(A)又は(B)をコードするDNAも好ましい。さらに前記DNA(b)として、前記DNA(a)と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつKAS活性を有する前記タンパク質(A)又は(B)をコードするDNAも好ましい。

またDNA(b)として、前記DNA(a)の塩基配列との同一性が60%以上の塩基配列からなり、KAS活性を有する前記タンパク質(A)又は(B)をコードし、かつ葉緑体移行シグナル配列をコードする領域の塩基配列が削除されていることが好ましい。後述の実施例で示すように、配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質においてN末端側の葉緑体移行シグナル配列を削除することで、長鎖脂肪酸の生産性がさらに向上する。このようなタンパク質をコードするDNAとしては、5'末端側の塩基配列として、配列番号2の1位~120位の任意の位置で5'末端側の塩基が欠失した塩基配列と、3'末端側の塩基配列として、配列番号2の121位~1428位の塩基配列からなるDNAであってもよい。

また前記DNA(b)として、前記DNA(a)又は(b)の塩基配列に、タンパク質の輸送や分泌に關与するシグナルペプチドをコードする塩基配列が付加された塩基配列からなるDNAであってもよい。

【0027】

前記DNA(c)は、配列番号2の121位~1428位の塩基配列と、その5'末端側に付加した開始コドン(ATG)からなり前記タンパク質(C)(配列番号44で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質)をコードする。なお前記DNA(b)は、DNA(c)も包含する。DNA(c)では、配列番号2で表される塩基配列からなるDNAから、前記葉緑体移行シグナル配列をコードする塩基配列(配列番号2の1位~120位の塩基配列)が削除されている。

【0028】

前記DNA(d)において、KAS活性の点から、前記DNA(c)の塩基配列との同一性は65%以上が好ましく、70%以上がより好ましく、75%以上がより好ましく、80%以上がより好ましく、85%以上がより好ましく、90%以上がより好ましく、92%以上がより好ましく、95%以上がより好ましく、98%以上がより好ましく、99%以上がさらに好ましい。また前記DNA(d)として、前記DNA(c)の塩基配列において1又は複数個(例えば1個以上523個以下、好ましくは1個以上457個以下、より好ましくは1個以上392個以下、より好ましくは1個以上327個以下、より好ましくは1個以上261個以下、より好ましくは1個以上196個以下、より好ましくは1個以上130個以下、より好ましくは1個以上104個以下、より好ましくは1個以上65個以下、より好ましくは1個以上26個以下、さらに好ましくは1個以上13個以下)の塩基が欠失、置換、挿入、又は付加されており、かつKAS活性を有する前記タンパク質(C)又は(D)をコードするDNAも好ましい。さらに前記DNA(d)として、前記DNA(c)と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつKAS活性を有する前記タンパク質(C)又は(D)をコードするDNAも好ましい。

また前記DNA(d)として、前記DNA(c)又は(d)の塩基配列に、タンパク質の輸送や分泌に關与するシグナルペプチドをコードする塩基配列が付加された塩基配列からなるDNAであってもよい。

【0029】

前記KAS遺伝子の発現を促進させる方法としては、常法より適宜選択することができる。例えば、前記KAS遺伝子をシアノバクテリアに導入する方法、前記KAS遺伝子をゲノム上に有するシアノバクテリアにおいて、当該遺伝子の発現調節領域(プロモーター、ターミネーター等)を改変する方法、などが挙げられる。なかでも、前記KAS遺伝子をシアノバ

クテリアに導入し、KAS遺伝子の発現を促進させる方法が好ましい。

以下本明細書において、目的のタンパク質をコードする遺伝子の発現を促進させたものを「形質転換体」ともいい、目的のタンパク質をコードする遺伝子の発現を促進させていないものを「宿主」又は「野生株」ともいう。

本発明で用いる形質転換体は、宿主自体に比べ、長鎖脂肪酸及びこれを構成成分とする脂質の生産性（長鎖脂肪酸及びこれを構成成分とする脂質の生産量、生産される全脂肪酸又は脂質に占める長鎖脂肪酸及びこれを構成成分とする脂質の割合）が増加傾向にある。そしてその結果、当該形質転換体では、脂質中の脂肪酸組成が改変される。そのため、当該形質転換体を用いた本発明は、特定の炭素原子数の脂質、特に長鎖脂肪酸及びこれを構成成分とする脂質、好ましくは炭素原子数20以上の脂肪酸及びこれを構成成分とする脂質、より好ましくは炭素原子数20～24の脂肪酸及びこれを構成成分とする脂質、より好ましくは炭素原子数20、22若しくは24の脂肪酸及びこれを構成成分とする脂質、より好ましくは炭素原子数20、22若しくは24の飽和脂肪酸、1価の不飽和脂肪酸、若しくは2価の不飽和脂肪酸、及びこれを構成成分とする脂質、より好ましくは20、22若しくは24の飽和脂肪酸若しくは1価の不飽和脂肪酸、及びこれを構成成分とする脂質、の生産に好適に用いることができる。

10

なお、宿主や形質転換体の脂肪酸及び脂質の生産性については、実施例で用いた方法により測定することができる。

【0030】

前記KAS遺伝子をシアノバクテリアに導入して前記遺伝子の発現を促進させる方法について説明する。

20

前記KAS遺伝子は、通常の遺伝子工学的手法により得ることができる。例えば、配列番号1に示すアミノ酸配列又は配列番号2に示す塩基配列に基づいて、KAS遺伝子を人工的に合成できる。KAS遺伝子の合成は、例えば、インビトロジェン社等のサービスを利用することができる。また、ナンノクロロプシス・オキュラータからクローニングによって取得することもできる。例えば、Molecular Cloning—A LABORATORY MANUAL THIRD EDITION [Joseph Sambrook, David W. Russell, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001)] 記載の方法等により行うことができる。また、実施例で用いたナンノクロロプシス・オキュラータNIES-2145は、国立環境研究所(NIES)より入手することができる。

30

【0031】

本発明で好ましく用いることができる形質転換体は、前記KAS遺伝子を常法によりシアノバクテリアに導入することで得られる。具体的には、前記KAS遺伝子をシアノバクテリアの細胞中で発現させることのできる組換えベクターや遺伝子発現カセットを調製し、これをシアノバクテリアの細胞内に導入して宿主細胞を形質転換させることにより作製できる。

【0032】

本発明の形質転換体の宿主として用いるシアノバクテリアは、クロロフィルを用いた光合成を行う原核生物の一群である。

シアノバクテリアは多様性に富んでおり、細胞の形状のみを見ても、シネコシスティス・エスピー (*Synechocystis* sp.) PCC6803のような単細胞性のもの、ヘテロシストを形成し窒素固定を行うアナベナ・エスピー (*Anabaena* sp.) PCC7120のように多細胞がヒモ状に繋がっている糸状性のもの、又はらせん状や分岐状のもの等がある。

40

生育環境についても、別府温泉から単離されたサーモシネココッカス・エロンガタス (*Thermosynechococcus elongatus*) BP-1のような好熱性のもの、海洋性で沿岸部に生息するシネココッカス・エスピー (*Synechococcus* sp.) CC9311、又は外洋に生息するシネココッカス・エスピー-WH8102など、様々な条件に適応した種が見られる。

また、種独自の特徴を持つものとして、ミクロシスティス・エルギノーサ (*Microcystis aeruginosa*) のように、ガス小胞を持ち毒素を産生することのできるものや、チラコイドを持たず集光アンテナであるフィコビリソームが原形質膜に結合しているグロイオバ

50

クター・ビオラセウス (*Gloeobacter violaceus*) PCC7421、又は一般的な光合成生物のようにクロロフィル a でなくクロロフィル d を主要な (> 95%) 光合成色素として持つ海洋性のアカリオクロリス・マリナ (*Acaryochloris marina*) など挙げられる。

【0033】

シアノバクテリアでは、光合成により固定された二酸化炭素は多数の酵素反応プロセスを経てアセチル-C o A へと変換される。脂肪酸合成の最初の段階は、アセチル-C o A カルボキシラーゼの作用による、アセチル-C o A と C O₂ からのマロニル-C o A の合成である。次に、マロニル-C o A がマロニル C o A : A C P トランスアシルラーゼの作用によってマロニル-A C P へと変換される。その後、β-ケトアシル-ACP シンターゼの進行的作用時に、炭素単位 2 個の連続的付加が起こり、炭素が 2 個ずつ増加した、アシル-A C P が合成され、膜脂質等の合成中間体として利用される。

10

【0034】

本発明の形質転換体の宿主としては、あらゆる種類のシアノバクテリアを用いることができる。例えば、シネコシスティス (*Synechocystis*) 属、シネココッカス (*Synechococcus*) 属、サーモシネココッカス (*Thermosynechococcus*) 属、トリコデスミウム (*Trichodesmium*) 属、アカリオクロリス (*Acaryochloris*) 属、クロコスファエラ (*Crocospaera*) 属、及びアナベナ (*Anabaena*) 属のシアノバクテリアが挙げられる。このうち、シネコシスティス属、シネココッカス属、サーモシネココッカス属又はアナベナ属のシアノバクテリアが好ましく、シネコシスティス属又はシネココッカス属のシアノバクテリアがより好ましい。また本発明で用いる宿主としては、シネコシスティス・エスピー PCC6803、シネコシスティス・エスピー PCC7509、シネコシスティス・エスピー PCC6714、シネココッカス・エロンガタスエスピー (*Synechococcus elongatus* sp.) PCC7942、サーモシネココッカス・エロンガタス BP-1、トリコデスミウム・エリスラエウム (*Trichodesmium erythraeum*) IMS101、アカリオクロリス・マリアナ (*Acaryochloris mariana*) MBIC11017、クロコスファエラ・ワトソニー (*Crocospaera watsonii*) WH8501、及びアナベナ・エスピー (*Anabaena* sp.) PCC7120 がより好ましく、シネコシスティス・エスピー PCC6803 及びシネココッカス・エロンガタスエスピー PCC7942 がより好ましい。

20

【0035】

遺伝子発現用プラスミドベクター又は遺伝子発現カセットの母体となるベクター (プラスミド) としては、目的のタンパク質をコードする遺伝子を宿主に導入することができ、宿主細胞内で当該遺伝子を発現させることができるベクターであればよい。例えば、導入する宿主の種類に応じたプロモーターやターミネーター等の発現調節領域を有するベクターであって、複製開始点や選択マーカー等を有するベクターを用いることができる。また、プラスミド等の染色体外で自立増殖・複製するベクターであってもよいし、染色体内に組み込まれるベクターであってもよい。

30

本発明で好ましく用いることができる発現ベクターとしては、pUC系ベクター (タカラバイオ社製)、pBluescript (pBS) II SK(-) (Stratagene社製)、pSTV系ベクター (タカラバイオ社製)、pET系ベクター (タカラバイオ社製)、pGEX系ベクター (GEヘルスケア社製)、pCold系ベクター (タカラバイオ社製)、pHY300PLK (タカラバイオ社製)、pUB110 (Mckenzie, T. et al., (1986), Plasmid 15 (2); p.93-103)、pBR322 (タカラバイオ社製)、pRS403 (ストラタジーン社製)、pMW218/219 (ニッポンジーン社製)、pRI系ベクター (タカラバイオ社製)、pBI系ベクター (クロンテック社製)、及び IN3 系ベクター (インプラントイノベーションズ社製) が挙げられる。このうち、pUC系ベクターがより好ましい。

40

【0036】

また、前記発現ベクターに組み込んだ目的のタンパク質をコードする遺伝子の発現を調整するプロモーターの種類も、使用する宿主の種類に応じて適宜選択することができる。本発明で好ましく用いることができるプロモーターとしては、lacプロモーター、trpプロモーター、tacプロモーター、trcプロモーター、T7プロモーター、SpoVGプロモーター、イソプロピル β-D-1-チオガラクトピラノシド (IPTG) の添加によって誘導可能な誘

50

導体に関するプロモーター、Rubiscoオペロン (rbc)、PSI反応中心タンパク質 (psaAB)、PSIIのD1タンパク質 (psbA)、c-phycocyanin β サブユニット (cpcB)、リボゾームRNAをコードするrrnAオペロン遺伝子のプロモーターが挙げられる。このうち、trcプロモーター及びcpcプロモーターがより好ましい。

また、目的DNA断片が組み込まれたことを確認するための選択マーカーの種類も、使用する宿主の種類に応じて適宜選択することができる。本発明で好ましく用いることができる選択マーカーとしては、クロラムフェニコール耐性遺伝子、エリスロマイシン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、スペクチノマイシン耐性遺伝子、及びゲンタマイシン耐性遺伝子等の薬剤耐性遺伝子が挙げられる。さらに、栄養要求性に関連する遺伝子の欠損等を選択マーカー遺伝子として使用することもできる。

10

【0037】

目的のタンパク質をコードする遺伝子の前記ベクターへの導入は、制限酵素処理やライゲーション等の常法により行うことができる。

またシアノバクテリアに導入する異種遺伝子は、シアノバクテリアにおけるコドン使用頻度にあわせてコドンに至適化されることが好ましい。各種生物が使用するコドンの情報は、Codon Usage Database (www.kazusa.or.jp/codon/) から入手可能である。

形質転換方法は、使用する宿主の種類に応じて常法より適宜選択することができる。形質転換方法としては、自然形質転換法、エレクトロポレーション法、及び接合法が挙げられる。

【0038】

シアノバクテリアに導入した前記KAS遺伝子は、相同組換え等によりシアノバクテリアのゲノム上に組み込まれていることが好ましい。前記KAS遺伝子がゲノム上に組み込まれる位置は適宜設定することができる。例えば前記KAS遺伝子は、シアノバクテリアのゲノム上のslr0168領域中又はNS1領域などのニュートラルサイト中に組み込まれていることが好ましい。

20

【0039】

本発明の形質転換体は、シアノバクテリアが元来有していない長鎖脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質の生産能を有する。そしてその生産性は、前記タンパク質(A)～(D)の少なくともいずれか1つをコードする遺伝子の発現が促進されていない宿主と比較して向上している。したがって、本発明の形質転換体を適切な条件で培養し、次いで得られた培養物又は生育物から長鎖脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質を回収すれば、長鎖脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質を効率よく製造することができる。ここで「培養物」とは培養した後の培養液及び形質転換体をいい、「生育物」とは生育した後の形質転換体をいう。

30

【0040】

本発明の形質転換体の培養は、BG-11培地(J. Gen. Microbiol., 1979, vol. 111, p. 1-61)、A培地(Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1980, vol. 77, p. 6052-6056)、AA培地(Plant Physiol., 1955, vol. 30, p. 366-372)など、シアノバクテリアの培養に通常用いられる培地を用いて、液体培養又はその変法により実施することができる。

40

脂質生産のための培養期間としては、十分に菌体が増殖した条件で脂肪酸が高濃度に蓄積するように行えばよく、例えば、7～45日間、好ましくは7～30日間、より好ましくは10～14日間、通気攪拌培養又は振とう培養がすることが好適である。

【0041】

培養物又は生育物から脂質を採取する方法としては、常法から適宜選択することができる。例えば、前述の培養物又は生育物から、ろ過、遠心分離、細胞の破碎、ゲルろ過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、クロロホルム/メタノール抽出法、ヘキサン抽出法、又はエタノール抽出法等により脂質成分を単離、回収することができる。より大規模な培養を行った場合は、培養物又は生育物より油分を圧搾又は抽出により回収後、脱ガム、脱酸、脱色、脱蠟、脱臭等の一般的な精製を行い、脂質を得ることができる。

50

。このように脂質成分を単離した後、単離した脂質を加水分解することで脂肪酸を得ることができる。脂質成分から脂肪酸を単離する方法としては、例えば、アルカリ溶液中で70℃程度の高温で処理をする方法、リパーゼ処理をする方法、又は高圧熱水を用いて分解する方法等が挙げられる。

【0042】

本発明の製造方法において製造される脂質は、脂肪酸のグリセリンエステル的一种である極性脂質を含んでなる。極性脂質としては、例えばモノガラクトシルジアシルグリセロール(MGDG)、ジガラクトシルジアシルグリセロール(DGDG)、スルホキノボシルジアシルグリセロール(SQDG)、ホスファチジルグリセロール(PG)などが挙げられる。

10

脂質中に含まれる脂肪酸又は脂肪酸エステル化合物は、分散剤等の工業原料への利用の観点から、長鎖脂肪酸又はその脂肪酸エステル化合物が好ましく、炭素原子数20以上の脂肪酸又はその脂肪酸エステル化合物がより好ましく、炭素原子数20～24の脂肪酸又はその脂肪酸エステル化合物がより好ましく、炭素原子数20、22若しくは24の脂肪酸又はその脂肪酸エステル化合物がより好ましく、炭素原子数20、22若しくは24の飽和脂肪酸、1価の不飽和脂肪酸、若しくは2価の不飽和脂肪酸、又はその脂肪酸エステル化合物がより好ましく、炭素原子数20、22若しくは24の飽和脂肪酸若しくは1価の不飽和脂肪酸又はその脂肪酸エステル化合物がより好ましい。

【0043】

本発明により得られる脂質は、食用として用いる他、可塑剤、化粧品等の乳化剤、石鹼や洗剤等の洗浄剤、繊維処理剤、毛髪リンス剤、又は殺菌剤や防腐剤として利用することができる。

20

【0044】

上述した実施形態に関し、本発明はさらに以下の脂質の製造方法、脂質生産性の向上方法、生産される脂肪酸の組成を改変する方法、形質転換体、及び形質転換体の作製方法を開示する。

【0045】

<1>下記タンパク質(A)～(D)の少なくともいずれか1つをコードする遺伝子の発現をシアノバクテリアの細胞内で促進させた形質転換体を培養して脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質を生産させる、脂質の製造方法。

30

(A) 配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

(B) 前記タンパク質(A)のアミノ酸配列と同一性が60%以上、好ましくは65%以上、より好ましくは70%以上、より好ましくは75%以上、より好ましくは80%以上、より好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、より好ましくは92%以上、より好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上、さらに好ましくは99%以上、のアミノ酸配列からなり、かつKAS活性を有するタンパク質。

(C) 配列番号44で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

(D) 前記タンパク質(C)のアミノ酸配列と同一性が60%以上、好ましくは65%以上、より好ましくは70%以上、より好ましくは75%以上、より好ましくは80%以上、より好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、より好ましくは92%以上、より好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上、さらに好ましくは99%以上、のアミノ酸配列からなり、かつKAS活性を有するタンパク質。

40

【0046】

<2>前記タンパク質(A)～(D)の少なくともいずれか1つをコードする遺伝子の発現をシアノバクテリアの細胞内で促進させ、シアノバクテリアの細胞内で生産される長鎖脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質の生産性を向上させる、脂質生産性の向上方法。

<3>前記タンパク質(A)～(D)の少なくともいずれか1つをコードする遺伝子の発現をシアノバクテリアの細胞内で促進させて、シアノバクテリアの細胞内で生産される長鎖脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質の生産性を向上させ、生産される全脂肪酸又は全脂質中の脂肪酸又は脂質の組成を改変する、脂質の組成の改変方法。

50

<4>前記タンパク質(A)～(D)の少なくともいずれか1つをコードする遺伝子の発現をシアノバクテリアの細胞内で促進させる、長鎖脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質の生産能をシアノバクテリアに付与する方法。

【0047】

<5>前記タンパク質(A)～(D)の少なくともいずれか1つをコードする遺伝子をシアノバクテリア、好ましくはシアノバクテリアのゲノム上のニュートラルサイトに導入して前記遺伝子の発現を促進させる、前記<1>～<4>のいずれか1項記載の方法。

<6>前記タンパク質(B)が、前記タンパク質(A)のアミノ酸配列に、1又は複数個、好ましくは1個以上190個以下、より好ましくは1個以上166個以下、より好ましくは1個以上142個以下、より好ましくは1個以上118個以下、より好ましくは1個以上95個以下、より好ましくは1個以上71個以下、より好ましくは1個以上47個以下、より好ましくは1個以上38個以下、より好ましくは1個以上23個以下、より好ましくは1個以上9個以下、さらに好ましくは1個以上4個以下、のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたタンパク質である、前記<1>～<5>のいずれか1項記載の方法。

10

<7>前記タンパク質(D)が、前記タンパク質(C)のアミノ酸配列に、1又は複数個、好ましくは1個以上174個以下、好ましくは1個以上152個以下、好ましくは1個以上130個以下、好ましくは1個以上108個以下、より好ましくは1個以上87個以下、より好ましくは1個以上65個以下、より好ましくは1個以上43個以下、より好ましくは1個以上34個以下、より好ましくは1個以上21個以下、より好ましくは1個以上8個以下、さらに好ましくは1個以上4個以下、のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたタンパク質である、前記<1>～<5>のいずれか1項記載の方法。

20

<8>前記タンパク質(A)～(D)が、長鎖 β -ケトアシル-ACP合成活性を有するKASである、前記<1>～<7>のいずれか1項記載の方法。

<9>前記タンパク質(A)～(D)の少なくともいずれか1つをコードする遺伝子が、下記DNA(a)～(d)のいずれか1つからなる遺伝子である、前記<1>～<8>のいずれか1項に記載の方法。

(a) 配列番号2で表される塩基配列からなるDNA。

(b) 前記DNA(a)の塩基配列と同一性が60%以上、好ましくは65%以上、より好ましくは70%以上、より好ましくは75%以上、より好ましくは80%以上、より好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、より好ましくは92%以上、より好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上、さらに好ましくは99%以上、の塩基配列からなり、かつKAS活性を有するタンパク質をコードするDNA。

30

(c) 配列番号45で表される塩基配列からなるDNA。

(d) 前記DNA(c)の塩基配列と同一性が60%以上、好ましくは65%以上、より好ましくは70%以上、より好ましくは75%以上、より好ましくは80%以上、より好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、より好ましくは92%以上、より好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上、さらに好ましくは99%以上、の塩基配列からなり、かつKAS活性を有するタンパク質をコードするDNA。

<10>前記DNA(b)が、前記DNA(a)の塩基配列に、1又は複数個、好ましくは1個以上571個以下、好ましくは1個以上499個以下、より好ましくは1個以上428個以下、より好ましくは1個以上357個以下、より好ましくは1個以上285個以下、より好ましくは1個以上214個以下、より好ましくは1個以上142個以下、より好ましくは1個以上114個以下、より好ましくは1個以上71個以下、より好ましくは1個以上28個以下、より好ましくは1個以上14個以下、の塩基が欠失、置換、挿入、又は付加された塩基配列からなり、かつKAS活性を有する前記タンパク質(A)又は(B)をコードするDNA、又は前記DNA(a)と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつKAS活性を有する前記タンパク質(A)又は(B)をコードするDNAである、前記<9>項記載の方法。

40

<11>前記DNA(d)が、前記DNA(c)の塩基配列に、1又は複数個、好ましく

50

は1個以上523個以下、好ましくは1個以上457個以下、より好ましくは1個以上392個以下、より好ましくは1個以上327個以下、より好ましくは1個以上261個以下、より好ましくは1個以上196個以下、より好ましくは1個以上130個以下、より好ましくは1個以上104個以下、より好ましくは1個以上65個以下、より好ましくは1個以上26個以下、より好ましくは1個以上13個以下、の塩基が欠失、置換、挿入、又は付加された塩基配列からなり、かつKAS活性を有する前記タンパク質(C)又は(D)をコードするDNA、又は前記DNA(c)と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつKAS活性を有する前記タンパク質(C)又は(D)をコードするDNAである、前記<9>項記載の方法。

<12>前記シアノバクテリアが、シネコシスティス属、シネココッカス属、サーモシネココッカス属、トリコデスミウム属、アカリオクロリス属、クロコスファエラ属、及びアナベナ属からなる群より選ばれるシアノバクテリア、好ましくはシネコシスティス属又はシネココッカス属のシアノバクテリア、である、前記<1>～<11>のいずれか1項記載の方法。

<13>前記脂質が、長鎖脂肪酸又はその脂肪酸エステル化合物、好ましくは炭素原子数20以上の脂肪酸又はその脂肪酸エステル化合物、より好ましくは炭素原子数20～24の脂肪酸又はその脂肪酸エステル化合物、より好ましくは炭素原子数20、22若しくは24の脂肪酸又はその脂肪酸エステル化合物、より好ましくは炭素原子数20、22若しくは24の飽和脂肪酸、1価の不飽和脂肪酸、若しくは2価の不飽和脂肪酸、又はその脂肪酸エステル化合物、より好ましくは炭素原子数20、22若しくは24の飽和脂肪酸若しくは1価の不飽和脂肪酸又はその脂肪酸エステル化合物、を含む、前記<1>～<12>のいずれか1項記載の方法。

<14>BG-11培地を用いて前記シアノバクテリアを培養する、前記<1>～<13>のいずれか1項記載の方法。

【0048】

<15>前記タンパク質(A)～(D)の少なくともいずれか1つをコードする遺伝子の発現をシアノバクテリアの細胞内で促進させた形質転換体。

<16>前記タンパク質(A)～(D)の少なくともいずれか1つをコードする遺伝子、又は当該遺伝子を含有する組換えベクターをシアノバクテリアに導入してなる、形質転換体。

<17>前記タンパク質(A)～(D)の少なくともいずれか1つをコードする遺伝子、又は当該遺伝子を含有する組換えベクターをシアノバクテリアに導入する、形質転換体の作製方法。

<18>前記タンパク質(A)～(D)がそれぞれ、前記<6>又は<7>項で規定するタンパク質である、前記<15>～<17>のいずれか1項記載の形質転換体又はその作製方法。

<19>前記タンパク質(A)～(D)の少なくともいずれか1つをコードする遺伝子が、前記DNA(a)～(d)のいずれか1つからなる遺伝子である、前記<15>～<18>のいずれか1項記載の形質転換体又はその作製方法。

<20>前記DNA(b)及び(d)がそれぞれ、前記<10>又は<11>項で規定するDNAである、前記<19>項に記載の形質転換体又はその作製方法。

<21>前記シアノバクテリアが、シネコシスティス属、シネココッカス属、サーモシネココッカス属、トリコデスミウム属、アカリオクロリス属、クロコスファエラ属、及びアナベナ属からなる群より選ばれるシアノバクテリア、好ましくはシネコシスティス属又はシネココッカス属のシアノバクテリア、である、前記<15>～<20>のいずれか1項記載の形質転換体又はその作製方法。

【0049】

<22>脂質を製造するための、前記<15>～<21>のいずれか1項記載の形質転換体、又は形質転換体の作製方法により得られた形質転換体の使用。

<23>前記脂質が、長鎖脂肪酸又はその脂肪酸エステル化合物、好ましくは炭素原子数

10

20

30

40

50

20以上の脂肪酸又はその脂肪酸エステル化合物、より好ましくは炭素原子数20～24の脂肪酸又はその脂肪酸エステル化合物、より好ましくは炭素原子数20、22若しくは24の脂肪酸又はその脂肪酸エステル化合物、より好ましくは炭素原子数20、22若しくは24の飽和脂肪酸、1価の不飽和脂肪酸、若しくは2価の不飽和脂肪酸、又はその脂肪酸エステル化合物、より好ましくは炭素原子数20、22若しくは24の飽和脂肪酸若しくは1価の不飽和脂肪酸又はその脂肪酸エステル化合物、を含む、前記<22>項記載の使用。

【実施例】

【0050】

以下、本発明を実施例に基づきさらに詳細に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。ここで、本実施例で用いるプライマーの塩基配列を表1及び2に示す。

【0051】

【表1】

表1

プライマー	塩基配列	配列番号
pUC118/slr0168up-F	5'-GGATCCTCTAGAGTCATCGCCTGTTGGCCTACC-3'	3
Kmr/slr0168up-R	5'-TTCGCTGGGTTTATCTACCGTTCAAATTCTGTGGG-3'	4
Kmr/slr0168down-F	5'-GGAATTTGTATCGATAGCGGAAGATATTACGGGAC-3'	6
pUC118/slr0168down-R	5'-GCATGCCTGCAGGTCAATCACGTTGGGTCCCAAG-3'	7
Kmr-F	5'-GATAAACCCAGCGAACCA-3'	9
Kmr-R	5'-ATCGATACAAATTCCTCG-3'	10
slr0168up-R	5'-TACCGTTCAAATTCTGTGGG-3'	12
slr0168up/Pcpc560-F	5'-AGAATTTGAACGGTAACCTGTAGAGAAGAGTCCCTG-3'	13
Pcpc560-R	5'-TGAATTAATCTCCTACTTGAC-3'	14
Trbc-F	5'-GTTACAGTTTTTGCAATTAC-3'	16
Km/Trbc-R	5'-TTCGCTGGGTTTATCTTCCCCACTTAGATAAAAAATCC-3'	17
Pcpc560/NoKASII-F	5'-TAGGAGATTAATTCAATGATGGAGAAGCTGACCCTC-3'	19
Trbc/NoKASII-R	5'-TGCCAAAACGTGTAACCTAGGCAACATACTTCTTGAAGACC-3'	20
Pcpc560/NoKASII(-40)-F	5'-TAGGAGATTAATTCAATGACTGTGCGTCGTGCATCAG-3'	21
Pcpc560/AtKASII-F	5'-TAGGAGATTAATTCAATGGTGGGTGCGTCTTCCTC-3'	22
Trbc/AtKASII-R	5'-TGCCAAAACGTGTAACCTCACTTGTAAGGAGCAAAAATGATGC-3'	23

【0052】

【表2】

表2

プライマー	塩基配列	配列番号
pUC118/NS1up-F	5'-GGATCCTCTAGAGTCAATGCCTTCTCCAAGGGCGGC-3'	25
Kmr/NS1up-R	5'-TTCGCTGGGTTTATCCTTCTGGAGCAGGAAGATGTCTG-3'	26
Kmr/NS1down-F	5'-GGAATTTGTATCGATTTCGAGTCCCTGCTCGTCACGC-3'	28
pUC118/NS1down-R	5'-GCATGCCTGCAGGTCCGGCATGGCAATGTCTCTCTG-3'	29
NS1down-F	5'-TCGAGTCCCTGCTCGTCACGC-3'-3'	31
Kmr/Ptrc-F	5'-GGAATTTGTATCGATTTGACAATTAATCATCCGGCTCG-3'	32
Ptrc-R	5'-GGTCTGTTTCTGTGTGAAATTG-3'	33
NS1down/Trbc-R	5'-CGAGCAGGGACTCGATTCCCCACTTAGATAAAAAATCC-3'	35
Ptrc/NoKASII-F	5'-CACAGGAAACAGACCATGATGGAGAAGCTGACCCTC-3'	36
Ptrc/NoKASII(-40)-F	5'-CACAGGAAACAGACCATGACTGTGCGTCGTGCATCAG-3'	37
Ptrc/AtKASII-F	5'-CACAGGAAACAGACCATGGTGGGTGCGTCTTCCTC-3'	38
Ptrc/EcKASII-F	5'-CACAGGAAACAGACCATGTCTAAGCGTCGTGTAGTTGTG-3'	39
Trbc/EcKASII-R	5'-TGCCAAAACGTGTAACCTTAGATCTTTTAAAGATCAAAGAACC-3'	40

【0053】

作製例 1 NoKASII遺伝子をシアノバクテリアに導入してなる形質転換体の作製

(1) カナマイシン耐性遺伝子発現用プラスミドの構築

シネコシスティス・エスピーPCC6803株の野生株のゲノムDNAを鋳型として、表1記載のプライマーpUC118/slr0168up-F（配列番号3）及びプライマーKmr/slr0168up-R（配列番号4）を用い、ニュートラルサイトslr0168領域の上流断片（slr0168up断片：配列番号5）を増幅した。また、前記ゲノムDNAを鋳型として、表1記載のプライマーKmr/slr0168down-F（配列番号6）とプライマーpUC118/slr0168down-R（配列番号7）のプライマーセットを用いて、ニュートラルサイトslr0168領域の下流断片（slr0168down断片：配列番号8）を増幅した。

さらに、pJH1プラスミド（Trieu-Cuot P et al., Gene, 1983, vol. 23, p. 331-341）を鋳型として、表1記載のプライマーKmr-F（配列番号9）及びKmr-R（配列番号10）を用いてPCRを行い、カナマイシン耐性マーカー遺伝子断片（Kmr断片：配列番号11）を増幅した。

【0054】

前述の、slr0168up断片、slr0168down断片、及びKmr断片をpUC118プラスミド（タカラバイオ社製）のHincIIサイトにIn-Fusion（登録商標）PCRクローニング法（Clontech）を用いて挿入し、pUC118-slr0168::Kmプラスミドを取得した。

【0055】

(2) NoKASII遺伝子発現用プラスミドの構築

前記pUC118-slr0168::Kmプラスミドを鋳型とし、表1記載のプライマーKmr-F（配列番号9）及びプライマーslr0168up-R（配列番号12）を用いてPCRを行い、pUC118-slr0168::Kmプラスミドを線状化した。

次に、シネコシスティス・エスピーPCC6803株の野生株のゲノムDNAより、表1記載のプライマーslr0168up/Pcpc560-F（配列番号13）及びプライマーPcpc560-R（配列番号14）を用い、高発現cpc560プロモーター断片（Jie Z et al., Scientific Reports, 2014, vol. 4, p. 4500、Pcpc560断片：配列番号15）を増幅した。

また、シネコシスティス・エスピーPCC6803株の野生型ゲノムDNAより、表1記載のプライマーTrbc-F（配列番号16）及びKm/Trbc-R（配列番号17）を用いてPCRを行い、rbc遺伝子のターミネーター領域（Trbc断片：配列番号18）を増幅した。

さらに、ナンノクロロプシス・オキュラータNIES-2145株より作製したcDNAライブラリーを鋳型として、表1記載のプライマーPcpc560/NoKASII-F（配列番号19）及びプライマーTrbc/NoKASII-R（配列番号20）を用いてPCRを行い、NoKASII断片（配列番号2）を増幅した。

【0056】

前述の線状化したpUC118-slr0168::Kmプラスミド、Pcpc560断片、Trbc断片、及びNoKASII断片を混合し、In-Fusion（登録商標）PCRクローニング法（Clontech）を用いることで、シネコシスティス・エスピーPCC6803株由来のニュートラルサイトslr0168領域中にcpc560プロモーター、NoKASII遺伝子、rbcターミネーター、及びカナマイシン耐性遺伝子カセットがこの順で挿入された、pUC118-slr0168::Pcpc560-NoKASII-Trbc-Kmプラスミドを得た。

【0057】

(3) NoKASII遺伝子発現用プラスミドを用いたシアノバクテリアの形質転換

得られたpUC118-slr0168::Pcpc560-NoKASII-Trbc-Kmプラスミドを用いて、自然形質転換法によりシネコシスティス・エスピーPCC6803株を形質転換し、カナマイシン耐性により選抜した。このようにして、シネコシスティス・エスピーPCC6803株のゲノム上のslr0168領域中に、NoKASII遺伝子発現コンストラクトを導入したΔslr0168::NoKASII株を取得した。

【0058】

作製例 2 葉緑体移行シグナルを削除したNoKASII遺伝子をシアノバクテリアに導入してなる形質転換体の作製

10

20

30

40

50

ナンノクロロプシス・オキュラータNIES-2145株より作製したcDNAライブラリーを鋳型として、表1記載のプライマーPcpc560/NoKASII(-40)-F(配列番号21)及びプライマーTrbc/NoKASII-R(配列番号20)を用いてPCRを行い、葉緑体移行シグナルを削除したNoKASII遺伝子断片(NoKASII(-40)断片、配列番号2の121位~1428位の塩基配列の5'末端側に開始コドン(ATG)を付加した塩基配列(配列番号45で表される塩基配列))を増幅した。

NoKASII断片に代えてNoKASII(-40)断片を用いた以外は作製例1と同様にして、シネコシスティス・エスピーPCC6803株由来のニュートラルサイトslr0168領域中にcpc560プロモーター、NoKASII(-40)断片、rbcターミネーター、及びカナマイシン耐性遺伝子カセットがこの順で挿入された、pUC118-slr0168::Pcpc560-NoKASII(-40)-Trbc-Kmプラスミドを得た。 10

そして、pUC118-slr0168::Pcpc560-NoKASII-Trbc-Kmプラスミドに代えてpUC118-slr0168::Pcpc560-NoKASII(-40)-Trbc-Kmプラスミドを用いた以外は作製例1と同様にして、シネコシスティス・エスピーPCC6803株を形質転換し、 Δ slr0168::NoKASII(-40)株を取得した。

【0059】

作製例3 シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)由来のKASII遺伝子をシアノバクテリアに導入してなる形質転換体の作製

シロイヌナズナより作製したcDNAライブラリーを鋳型として、表1記載のプライマーPcpc560/AtKASII-F(配列番号22)及びプライマーTrbc/AtKASII-R(配列番号23)を用いてPCRを行い、シロイヌナズナ由来のKASII(配列番号42)をコードするKASII遺伝子断片(AtKASII断片、NCBI Gene ID 843835、配列番号24)を増幅した。 20

NoKASII断片に代えてAtKASII断片を用いた以外は作製例1と同様にして、シネコシスティス・エスピーPCC6803株由来のニュートラルサイトslr0168領域中にcpc560プロモーター、AtKASII遺伝子、rbcターミネーター、及びカナマイシン耐性遺伝子カセットがこの順で挿入された、pUC118-slr0168::Pcpc560-AtKASII-Trbc-Kmプラスミドを得た。

そして、pUC118-slr0168::Pcpc560-NoKASII-Trbc-Kmプラスミドに代えてpUC118-slr0168::Pcpc560-AtKASII-Trbc-Kmプラスミドを用いた以外は作製例1と同様にして、シネコシスティス・エスピーPCC6803株を形質転換し、 Δ slr0168::AtKASII株を取得した。

【0060】

試験例1 脂質の製造

下記表3に示す組成のBG-11培地10mLを加えた20mL三角フラスコ中で、作製例1~3で作製した形質転換体、並びにシネコシスティス・エスピーPCC6803株(野生株)を10日間培養した。培養は一定の照明下($60 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$)、30℃にてロータリーシェーカー(120rpm)を用いて行い、初発菌体濃度を $\text{OD}_{730}=0.4$ に設定した。なお形質転換体を培養するBG-11培地には、カナマイシンを25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度となるよう添加した。

【0061】

【表 3】

表3 BG-11液体培地の組成

ストック液

A液	2 mL
B液	50 mL
C液	2 mL
D液	1 mL
E液	1 mL
1.0 M TES-KOH (pH7.5)	20 mL
Total	1000 mL

ストック液組成

A液	
Citric acid・H ₂ O	0.33 g
Ferric ammonium citrate	0.3 g
Na ₂ EDTA	0.05 g
total	100 mL

B液	
NaNO ₃	30 g
K ₂ HPO ₄	0.78 g
MgSO ₄ ・7H ₂ O	1.5 g
total	100 mL

C液

CaCl₂・2H₂O 1.9 g/100 mL

D液

Na₂CO₃ 2 g/100 mL

E液

[H₃BO₃ 2.86 g、MnCl₂・4H₂O 1.81 g、ZnSO₄・7H₂O 0.22 g、CuSO₄・5H₂O 0.08 g、
Na₂MoO₄ 0.021 g、Co(NO₃)・6H₂O 0.0494 g、H₂SO₄ 一滴]/1000 mL

【0062】

培養終了後、培養液5mLをガラス試験管に分取し、3000rpmで遠心することにより集菌した。上清を除去した沈殿を蒸留水0.5mLに懸濁し、内部標準として内部標準としてメタノールに溶解した7-ペンタデカノン（1mg/mL）50 μLを添加した。これに、クロロホルム0.5 mL、メタノール1mLを加えて攪拌し、さらに30分静置した。その後、クロロホルム0.5mL、1.5%KCl溶液0.5mLを加えて攪拌した。3000rpm、室温で15分遠心した後、有機層（下層）をパスツールピペットでふた付き試験管に回収し、窒素ガスで乾固した。

乾固した脂質画分に0.5N KOHメタノール溶液0.7mLを加えて攪拌し、80℃で30分間恒温した。さらに、3フッ化ホウ素メタノール溶液1mLを加え、80℃で10分間メチルエステル化反応を行った。この反応液に、ヘキサン0.5mL及び飽和食塩水1mLを加えて攪拌し、室温にて10分間静置した後、上層のヘキサン層を回収して脂肪酸メチルエステルを得た。

【0063】

下記に示す測定条件下で、得られた脂肪酸メチルエステルをガスクロマトグラフィー解析に供した。

（解析条件）

分析装置：7890A GC system (Agilent)

キャピラリーカラム：DB-WAX 20m×100 μm×0.10 μm (J&W Scientific)

移動相：高純度ヘリウム

カラム内流量：0.3mL/分

昇温プログラム：100℃（1分）→12.5℃/分（200℃まで）→5℃/分（250℃まで）→250℃（9分）

平衡化時間：0.5分

注入口：スプリット注入（スプリット比：50:1）

圧力：57.308psi

注入量：5 μL

洗浄バイアル：メタノール・クロロホルム

検出器温度：350℃

【0064】

脂肪酸メチルエステルの同定は、同サンプルを同条件でガスクロマトグラフ質量分析解析に供することにより行った。

ガスクロマトグラフィー解析により得られた波形データのピーク面積より、各形質転換体の総脂肪酸量に占める、各種脂肪酸量の割合(%)を算出した。その結果を表4に示す。表4の結果は、同条件で行った3連の培養実験の平均値と標準偏差を示している。

【0065】

【表 4】

表 4

Genotype	各種脂肪酸量の割合 (% of total fatty acid)												
	C16:0	C16:1	C17:0	C17:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0	C20:1	C20:2	C20:3	C22:0
Wild type	53.95 ± 0.42	7.11 ± 0.19	1.20 ± 0.05	0.97 ± 0.04	0.83 ± 0.06	6.46 ± 0.41	13.54 ± 0.17	15.94 ± 0.17	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Δslr0168::NoKASII</i>	45.68 ± 0.34	5.62 ± 0.04	0.48 ± 0.05	0.48 ± 0.01	0.99 ± 0.07	8.79 ± 0.40	19.74 ± 0.25	15.50 ± 0.21	1.40 ± 0.59	0.27 ± 0.02	0.28 ± 0.01	0.49 ± 0.05	0.28 ± 0.02
<i>Δslr0168::NoKASII(-40)</i>	46.17 ± 0.15	5.61 ± 0.13	0.49 ± 0.05	0.54 ± 0.00	1.38 ± 0.05	13.61 ± 0.81	15.42 ± 0.58	12.06 ± 0.29	2.62 ± 0.06	0.45 ± 0.06	0.37 ± 0.03	0.78 ± 0.11	0.52 ± 0.04
<i>Δslr0168::AtKASII</i>	54.13 ± 0.09	7.10 ± 0.07	1.39 ± 0.06	0.97 ± 0.02	0.73 ± 0.01	7.27 ± 0.07	14.03 ± 0.08	14.38 ± 0.11	ND	ND	ND	ND	ND

ND: not detected

10

20

30

40

【 0 0 6 6 】

表 4 に示すように、シネコシスティス・エスピーPCC6803株は炭素原子数 1 8 以下の脂肪酸の生産能は有するが、炭素原子数 2 0 以上の長鎖脂肪酸の生産能は有さない。

50

これに対し、表 4 に示すように、ナンノクロロプシス・オキュラータ由来のNoKASII 遺伝子を導入することで、シネコシスティス・エスピーPCC6803株は炭素原子数 20 以上の長鎖脂肪酸の生産能を獲得する。特に、葉緑体移行シグナルを削除したNoKASII 遺伝子をシアノバクテリアに導入してなる形質転換体では、炭素原子数 20 以上の長鎖脂肪酸の生産量がより増加した。

一方、シネコシスティス・エスピーPCC6803株にシロイヌナズナ由来のAtKASII 遺伝子を導入しても、炭素原子数 20 以上の長鎖脂肪酸の産生を検知することができなかった。

【0067】

作製例 4 NoKASII 遺伝子をシアノバクテリアに導入してなる形質転換体の作製

(1) カナマイシン耐性遺伝子発現用プラスミドの構築

シネココッカス・エロンガタスエスピーPCC7942の野生株のゲノムDNAを鋳型として、表 2 記載のプライマーpUC118/NS1up-F (配列番号 25) とプライマーKmr/NS1up-R (配列番号 26) のプライマーセットを用いて、ニュートラルサイトNS1領域の上流断片 (NS1up断片: 配列番号 27) を増幅した。また、前記ゲノムDNAを鋳型として、表 2 記載のプライマーKmr/NS1down-F (配列番号 28) とプライマーpUC118/NS1down-R (配列番号 29) のプライマーセットを用いて、ニュートラルサイトNS1領域の下流断片 (NS1down断片: 配列番号 30) を増幅した。

【0068】

前述のNS1up断片及びNS1down断片、並びに作製例 1 と同様に作製したKmr断片をpUC118 プラスミド (タカラバイオ社製) のHincIIサイト間にIn-Fusion (登録商標) PCRクローニング法 (Clontech) を用いて挿入し、pUC118-NS1::Kmプラスミドを取得した。

【0069】

(2) NoKASII 遺伝子発現用プラスミドの構築

前記pUC118-NS1::Kmプラスミドを鋳型とし、表 1 記載のプライマーKmr-R (配列番号 10) 及び表 2 記載のプライマーNS1down-F (配列番号 31) を用いてPCRを行い、pUC118-NS1::Kmプラスミドを線状化した。

次に、pTrc99Aクローニングベクター (NCBI Accession number M22744) の配列より人工合成したtrcプロモーター配列を鋳型に、表 2 記載のプライマーKmr/Ptrc-F (配列番号 32) 及びプライマーPtrc-R (配列番号 33) を用いてPCRを行い、Ptrc断片 (配列番号 34) を増幅した。

また、シネコシスティス・エスピーPCC6803株の野生型ゲノムDNAより、表 1 記載のプライマーTrbc-F (配列番号 16) 及びNS1down/Trbc-R (配列番号 35) を用いてPCRを行い、Trbc断片 (配列番号 18) を増幅した。

さらに、ナンノクロロプシス・オキュラータNIES-2145株より作製したcDNAライブラリーを鋳型として、表 2 記載のプライマーPtrc/NoKASII-F (配列番号 36) 及びプライマーTrbc/NoKASII-R (配列番号 20) を用いてPCRを行い、NoKASII断片 (配列番号 2) を増幅した。

【0070】

前述の線状化したpUC118-NS1::Kmプラスミド、Ptrc断片、Trbc断片、及びNoKASII断片を混合し、In-Fusion (登録商標) PCRクローニング法 (Clontech) を用いることでシネココッカス・エロンガタスエスピーPCC7942由来のニュートラルサイトNS1領域中にカナマイシン耐性遺伝子カセット、trcプロモーター領域、NoKASII 遺伝子、及びrbcターミネーターがこの順で挿入された、pUC118-NS1::Km-Ptrc-NoKASII-Trbcプラスミドを得た。

【0071】

(3) NoKASII 遺伝子発現用プラスミドを用いたシアノバクテリアの形質転換

得られたpUC118-NS1::Km-Ptrc-NoKASII-Trbcプラスミドを用いて、自然形質転換法によりシネココッカス・エロンガタスエスピーPCC7942株を形質転換し、カナマイシン耐性により選抜した。このようにして、シネココッカス・エロンガタスエスピーPCC7942株のゲノム上のNS1領域中に、NoKASII 遺伝子発現コンストラクトを導入したΔNS1::NoKASII株を取得した。

【0072】

作製例5 葉緑体移行シグナルを削除したNoKASII遺伝子をシアノバクテリアに導入してなる形質転換体の作製

ナンノクロロプシス・オキュラータNIES-2145株より作製したcDNAライブラリーを鋳型として、表2記載のプライマーPtrc/NoKASII(-40)-F(配列番号37)及びプライマーTrbc/NoKASII-R(配列番号20)を用いてPCRを行い、葉緑体移行シグナルを削除したNoKASII遺伝子断片(NoKASII(-40)断片、配列番号2の121位~1428位の塩基配列の5'末端側に開始コドン(ATG)を付加した塩基配列(配列番号45で表される塩基配列))を増幅した。

NoKASII断片に代えてNoKASII(-40)断片を用いた以外は作製例4と同様にして、シネコ

10

コッカス・エロンガタスエスピーPCC7942由来のニュートラルサイトNS1領域中にカナマイシン耐性遺伝子カセット、trcプロモーター領域、NoKASII(-40)断片、及びrbcターミネーターがこの順で挿入された、pUC118-NS1::Km-Ptrc-NoKASII(-40)-Trbcプラスミドを得た。

【0073】

作製例6 シロイヌナズナ由来のKASII遺伝子をシアノバクテリアに導入してなる形質転換体の作製

20

シロイヌナズナより作製したcDNAライブラリーを鋳型として、表2記載のプライマーPtrc/AtKASII-F(配列番号38)及び表1に記載のプライマーTrbc/AtKASII-R(配列番号23)を用いてPCRを行い、シロイヌナズナ由来のKASII(配列番号42)をコードするKASII遺伝子断片(AtKASII断片、NCBI Gene ID 843835、配列番号24)を増幅した。

NoKASII断片に代えてAtKASII断片を用いた以外は作製例5と同様にして、シネココッカス・エロンガタスエスピーPCC7942由来のニュートラルサイトNS1領域中にカナマイシン耐性遺伝子カセット、trcプロモーター領域、AtKASII遺伝子、及びrbcターミネーターがこの順で挿入された、pUC118-NS1::Km-Ptrc-AtKASII-Trbcプラスミドを得た。

そして、pUC118-NS1::Km-Ptrc-NoKASII-Trbcプラスミドに代えてpUC118-NS1::Km-Ptrc-AtKASII-Trbcプラスミドを用いた以外は作製例4と同様にして、シネココッカス・エロン

30

【0074】

作製例7 大腸菌由来のKASII遺伝子をシアノバクテリアに導入してなる形質転換体の作製

大腸菌K12株より抽出したゲノムDNAを鋳型として、表2記載のプライマーPtrc/EcKASII-F(配列番号39)及びプライマーTrbc/EcKASII-R(配列番号40)を用いてPCRを行い、大腸菌由来のKASII(配列番号43)をコードするKASII遺伝子断片(EcKASII断片、Eco Gene Accession Number EG12606:配列番号41)を増幅した。

NoKASII断片に代えてEcKASII断片を用いた以外は作製例5と同様にして、シネココッカス・エロンガタスエスピーPCC7942由来のニュートラルサイトNS1領域中にカナマイシン耐性遺伝子カセット、trcプロモーター領域、EcKASII遺伝子、及びrbcターミネーターがこの順で挿入された、pUC118-NS1::Km-Ptrc-EcKASII-Trbcプラスミドを得た。

40

そして、pUC118-NS1::Km-Ptrc-NoKASII-Trbcプラスミドに代えてpUC118-NS1::Km-Ptrc-EcKASII-Trbcプラスミドを用いた以外は作製例4と同様にして、シネココッカス・エロンガタスエスピーPCC7942株を形質転換し、 Δ NS1::EcKASII株を取得した。

【0075】

試験例2 脂質の製造

作製例4~7で作製した形質転換体、並びにシネココッカス・エロンガタスエスピーPCC7942株(野生株)について、試験例1と同様の条件下で培養し、脂質の製造を行った。

培養終了後、試験例1と同様に、総脂肪酸量に占める各種脂肪酸量の割合(%)の算出を

50

行った。その結果を表 5 に示す。

【 0 0 7 6 】

【表 5】

Genotype	各種脂肪酸量の割合 (% of total fatty acid)												
	C14:0	C14:1	C16:0	C16:1	C17:0	C17:1	C18:0	C18:1	C20:0	C20:1	C22:0	C22:1	C24:0
Wild type	1.37±0.07	1.32±0.01	48.50±3.49	37.06±4.07	0.14±0.01	1.29±0.05	0.74±0.06	9.58±0.45	ND	ND	ND	ND	ND
$\Delta NS1::NoKASII$	0.73±0.01	0.27±0.04	45.77±0.19	33.19±1.51	0.11±0.00	0.76±0.01	1.04±0.13	16.74±1.26	0.32±0.07	0.79±0.16	0.16±0.14	0.10±0.04	ND
$\Delta NS1::NoKASII(-40)$	0.57±0.05	ND	44.78±0.39	32.20±1.12	0.12±0.01	0.74±0.01	1.72±0.18	17.05±0.34	1.30±0.22	0.69±0.02	0.53±0.10	0.17±0.02	0.12±0.01
$\Delta NS1::AtKASII$	1.40±0.03	1.20±0.08	44.94±0.25	40.09±0.82	0.10±0.01	0.81±0.02	0.58±0.04	10.87±0.63	ND	ND	ND	ND	ND
$\Delta NS1::EcFabF$	1.67±0.09	0.99±0.07	46.16±0.08	37.96±0.63	0.17±0.01	0.76±0.00	1.28±0.13	11.01±0.58	ND	ND	ND	ND	ND
ND: not detected													

【 0 0 7 7 】

表 5 に示すように、シネココッカス・エロンガタスエスピー PCC7942 株は炭素原子数 1

10

20

30

40

50

8以下の脂肪酸の生産能は有するが、炭素原子数20以上の長鎖脂肪酸の生産能は有さない。

これに対し、表5に示すように、ナンノクロロプシス・オキュラータ由来のNoKASII遺伝子を導入することで、シネココッカス・エロンガタスエスピーPCC7942株は炭素原子数20の長鎖脂肪酸の生産能を獲得する。特に、葉緑体移行シグナルを欠失して削除したNoKASII遺伝子をシアノバクテリアに導入してなる形質転換体では、炭素原子数20の長鎖脂肪酸の生産量がより増加し、炭素原子数22以上の長鎖脂肪酸の生産能も獲得した。

一方、シネココッカス・エロンガタスエスピーPCC7942株にシロイヌナズナ由来のAtKASII遺伝子や大腸菌由来のEcKASII遺伝子を導入しても、炭素原子数20以上の長鎖脂肪酸の産生を検知することができなかった。

10

【0078】

上記のように、前記タンパク質(A)～(D)の少なくともいずれか1つをコードする遺伝子の発現をシアノバクテリアの細胞内で促進させることで、シアノバクテリアは、炭素原子数20以上の長鎖脂肪酸の生産能を獲得する。そして、前記遺伝子の発現が促進されていない宿主と比較して、長鎖脂肪酸及びこれを構成成分とする脂質の生産量が増加傾向にある。

よって、前記タンパク質(A)～(D)の少なくともいずれか1つをコードする遺伝子の発現を促進させることで、長鎖脂肪酸の生産性を獲得又は向上させた形質転換体を作製することができる。そしてこの形質転換体を培養することで、長鎖脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質の生産性を向上させることができる。

20

【0079】

試験例

遺伝情報処理ソフトウェアGenetyx-Winのホモロジー解析(Search homology)プログラムを用いて、NoKASIIのアミノ酸配列に対する、シロイヌナズナ由来のKASII(AtKASII)及び大腸菌由来のKASII(EcKASII)のアミノ酸配列の同一性を算出した。その結果、NoKASIIのアミノ酸配列(配列番号1)に対する、AtKASIIのアミノ酸配列(配列番号42)の同一性は39%であった。また、NoKASIIのアミノ酸配列(配列番号1)に対する、EcKASIIのアミノ酸配列(配列番号43)の同一性は44%であった。

さらに、NoKASII遺伝子の塩基配列に対する、AtKASII遺伝子及びEcKASII遺伝子の塩基配列の同一性を算出した。その結果、NoKASII遺伝子の塩基配列(配列番号2)に対する、AtKASII遺伝子の塩基配列(配列番号24)の同一性は49%であった。また、NoKASII遺伝子の塩基配列(配列番号2)に対する、EcKASII遺伝子の塩基配列(配列番号41)の同一性は52%であった。

30

【配列表】

2017201905000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 尾崎 達郎

和歌山県和歌山市湊1 3 3 4 花王株式会社研究所内

Fターム(参考) 4B050 CC07 DD02 DD13 LL02 LL04 LL05

4B064 AD87 CA02 CA19 CB24 CC24 CE10 DA10 DA16

4B065 AA01X AA01Y AA88Y AB01 AC14 CA41 CA54 CA57