(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2016 年 6 月 30 日(30.06.2016)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2016/104424 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 1/21 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
C12N 9/16 (2006.01) *C12P 7/64* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2015/085669

(22) 国際出願日: 2015 年 12 月 21 日(21.12.2015)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2014-258493 2014 年 12 月 22 日(22.12.2014) JP

(71) 出願人: 花王株式会社 (KAO CORPORATION) [JP/JP]; 〒1038210 東京都中央区日本橋茅場町一丁目１４番１０号 Tokyo (JP). 国立大学法人埼玉大学(SAITAMA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒3388570 埼玉県さいたま市桜区下大久保２５５ Saitama (JP).

(72) 発明者: 川原 彰人 (KAWAHARA, Akihito); 〒6408580 和歌山県和歌山市湊１３３４ 花王株式会社研究所内 Wakayama (JP). 園池 由香子 (SONOIKE, Yukako); 〒3388570 埼玉県さいたま市桜区下大久保２５５ 国立大学法人埼玉大学内 Saitama (JP). 鬼沢 あゆみ (KIZAWA, Ayumi); 〒3388570 埼玉県さいたま市桜区下大久保２５５ 国立大学法人埼玉大学内 Saitama (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人アルガ特許事務所 (THE PATENT CORPORATE BODY ARUGA PATENT OFFICE); 〒1030013 東京都中央区日本橋人形町１丁目３番８号 沢の鶴人形町ビル Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, 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, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則 5.2(a)）

WO 2016/104424 A1

(54) **Title**: MODIFIED CYANOBACTERIA

(54) 発明の名称 : 改変シアノバクテリア

(57) **Abstract**: Provided are cyanobacteria having improved fatty acid productivity. A method for producing modified cyanobacteria, the method including knockout of LexA-type transcription regulator and acyl-ACP synthetase in cyanobacteria.

(57) 要約: 脂肪酸生産性が向上したシアノバクテリアを提供すること。シアノバクテリアにおけるＬｅｘＡ型転写制御因子と、アシル－ＡＣＰシンテターゼとを機能喪失させることを含む、改変シアノバクテリアの製造方法。

明　細　書

発明の名称 ： 改変シアノバクテリア

技術分野

[0001] 本発明は、脂肪酸分泌生産性が向上した改変シアノバクテリアに関する。

背景技術

[0002] 近年、化石燃料の将来的な枯渇が予測されており、エネルギー問題の解決のため、化石燃料に頼らない次世代エネルギー生産技術の確立が急務とされている。その一端として、シアノバクテリアや藻類などの光合成生物を利用したバイオ燃料生産研究が注目されている。上記光合成生物は、光をエネルギー源としてCO_2と水から光合成で固定した炭素を原料に、バイオ燃料を生産することが可能である。さらに、上記光合成生物は、食糧原料と競合しないこと、カーボンニュートラルな燃料生産が可能なことから、次世代エネルギー生産系として期待が持たれている。

[0003] シアノバクテリア（藍色細菌）は、藍藻とも呼ばれる真正細菌の一群であり、光合成によって酸素を産生し、CO_2を固定化する能力を有する。シアノバクテリアは、外膜とペプチドグリカンの細胞壁をもち、グラム陰性菌の範疇に入るが、典型的なグラム陰性菌とは系統的に離れている。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。

[0004] またシアノバクテリアは、生育が速く、高い光合成能力を有すること、さらに形質転換能を有するため、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、バイオ燃料生産用宿主として注目されている。シアノバクテリアを用いたバイオ燃料生産の例としては、水素（非特許文献１）、エタノール（非特許文献２）、イソブタノール（非特許文献３）、及び脂肪酸（非特許文献４）が報告されている。非特許文献４及び特許文献１には、外因性アシル－ＡＣＰチオエステラーゼを産生する組

換えシアノバクテリアを培養することで無機炭素を脂肪酸に変換させる方法が記載されている。

（特許文献１）特表２０１１－５０５８３８号公報

（非特許文献１）Yoshino F. et al. (2007) Mar. Biotechnol. 9：101-112

（非特許文献２）Deng M. D. and Coleman J. R. (1999) Appl. Environ. Microbiol. 65:523-528

（非特許文献３）Atsumi S. et al. (2009) Nat. Biotechnol. 27:1177-1180

（非特許文献４）Liu X. et al. (2011) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 108:6899-6904

発明の概要

[0005] 一態様において本発明は、シアノバクテリアにおけるＬｅｘＡ型転写制御因子と、アシル－ＡＣＰシンテターゼとを機能喪失させることを含む、改変シアノバクテリアの製造方法を提供する。

[0006] 別の一態様において、本発明は、シアノバクテリアにおけるＬｅｘＡ型転写制御因子と、アシル－ＡＣＰシンテターゼとを機能喪失させることを含む、シアノバクテリアの脂肪酸分泌生産性の向上方法を提供する。

[0007] さらに別の一態様において、本発明は、ＬｅｘＡ型転写制御因子と、アシル－ＡＣＰシンテターゼとが機能喪失した改変シアノバクテリアを提供する。

[0008] さらなる態様において、本発明は、上記改変シアノバクテリア、又は上記方法で製造された改変シアノバクテリアを培養することを含む、脂肪酸生産方法を提供する。

図面の簡単な説明

[0009] [図1]野生株（ＷＴ）とＬｅｘＡ転写制御因子破壊株（Δｓｌｌ１６２６）におけるＬｅｘＡタンパク質のウエスタンブロッティング結果。

[図2]Δｓｌｒ１６０９：：ｓｐ株とΔｓｌｌ１６２６Δｓｌｒ１６０９：：

ｓｐ株の培養液中の遊離脂肪酸量。ｎ＝３、エラーバー＝ＳＤ。

[図3]ΔｓｌｒＩ６０９：：ＵｃＴＥ株とΔｓｌｌ１６２６ΔｓｌｒＩ６０９：：ＵｃＴＥ株の培養液中の遊離脂肪酸量。ｎ＝３、エラーバー＝ＳＤ。

発明を実施するための形態

[0010] （１．定義）

本明細書において、ヌクレオチド配列及びアミノ酸配列の同一性は、Ｌｉｐｍａｎ－Ｐｅａｒｓｏｎ法（Ｓｃｉｅｎｃｅ，１９８５，２２７：１４３５－１４４１）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。

[0011] 本明細書において、機能の「喪失」とは、該機能の一部喪失（すなわち、機能の低減、抑制又は一部阻害）及び該機能の完全な喪失を包含する概念である。例えば、本明細書において、「ＬｅｘＡ型転写制御因子の機能喪失」とは、該因子の転写制御機能が低減することであり得る。また本明細書において、「アシル－ＡＣＰシンテターゼの機能喪失」とは、該酵素のアシル－ＡＣＰ合成活性が低減すること、又は該酵素のアシル－ＡＣＰ合成活性が完全に失われることであり得る。例えば、「シアノバクテリアにおけるＬｅｘＡ型転写制御因子又はアシル－ＡＣＰシンテターゼの機能喪失」とは、該因子又は該酵素の発現量を低下させることでシアノバクテリアにおけるＬｅｘＡ型転写制御機能又はアシル－ＡＣＰ合成活性を低減させること、あるいは、該因子又は該酵素をコードする遺伝子を欠失させることであり得る。

[0012] シアノバクテリアは、藍藻とも呼ばれ、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や、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。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）なども挙げられる。

[0013] 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－ＣｏＡへと変換される。脂肪酸合成の最初の段階は、アセチル－ＣｏＡカルボキシラーゼの作用による、アセチル－ＣｏＡとCO_2からのマロニル－ＣｏＡの合成である。次に、マロニル－ＣｏＡがマロニルＣｏＡ：ＡＣＰトランスアシラーゼの作用によってマロニル－ＡＣＰへと変換される。その後、脂肪酸シンテターゼ（又はアシル－ＡＣＰシンテターゼ）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－ＡＣＰが合成され、膜脂肪酸等の合成中間体として利用される。

[0014] ＬｅｘＡ型転写制御因子（ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ　ｆａｃｔｏｒ　ＬｅｘＡ；以下の本明細書中において、単にＬｅｘＡと称する場合がある）は、Ｎ末端側のヘリックスターンヘリックス構造を有するＤＮＡ結合ドメイン（ｐｆａｍ０１７２６）と、Ｃ末端側のＰｅｐｔｉｄａｓｅ＿Ｓ２４－ｌｉｋｅ配列（ｐｆａｍ００７１７）とを有することを特徴とするタンパク質

であり、遺伝子発現の制御に重要な役割を果たす転写因子として知られている。ＬｅｘＡ型転写制御因子は、グラム陽性細菌及びグラム陰性細菌に広く分布している。例えば、大腸菌においては、ＬｅｘＡはＳＯＳ－ｂｏｘ配列（ＴＡＣＴＧＴＡＴＡＴＡＴＡＣＡＧＴＡ；配列番号２３）を認識して結合し、ＳＯＳレギュロンに属するＤＮＡ修復や細胞分裂の制御に関する遺伝子群の転写を抑制している。すなわち、ゲノムＤＮＡが損傷を受けた際にＬｅｘＡ自身が自己プロテアーゼ活性によって分解し、そのＤＮＡ結合能が不活化することで、ＬｅｘＡによる遺伝子群の抑制が解除され、その結果、ＳＯＳレギュロンの遺伝子が発現し、ＤＮＡ修復能の活性化や突然変異の誘発が起こることが報告されている（Ｆｒｉｅｄｂｅｒｇ，Ｅ．Ｃ．ｅｔ ａｌ．，ＤＮＡ Ｒｅｐａｉｒ ａｎｄ Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ，Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｓｏｃｉｅｔｙ ｏｆ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ Ｐｒｅｓｓ，２００５，４６３－５０８）。

[0015] シアノバクテリアの多くの種でも、ＬｅｘＡが保存されている。ＬｅｘＡを有するシアノバクテリア種、又は個々のシアノバクテリア種が有するＬｅｘＡに関する情報は、例えば、ＣｙａｎｏＢａｓｅ（［ｇｅｎｏｍｅ．ｍｉｃｒｏｂｅｄｂ．ｊｐ／ｃｙａｎｏｂａｓｅ／］）、又はＮＣＢＩデータベース（［ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｇｅｎｏｍｅ／］又は［ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｐｒｏｔｅｉｎ／］）から取得することができる。例えば、上述したシネコシスティス属のシネコシスティス・エスピーＰＣＣ６８０３は、ＬｅｘＡをコードする遺伝子として、ｓｌｌ１６２６遺伝子を保有している。また例えば、シネココッカス属の遺伝子ＳＹＮＰＣＣ７００２＿Ａ１８４９及びＳＹＮＷ１５８２、プロクロロコッカス属の遺伝子Ｐ９３０３＿１９１４１及びＰＭＴ０３８０、アカリオクロリス属の遺伝子ＡＭ１＿３９４８、シアノセイス属の遺伝子ｃｃｅ＿１８９９、ｃｃｅ＿５０７４、及びＰＣＣ８８０１＿２１８６、ならびにアナベナ属の遺伝子ａｌｒ４９０８及びａｌｌ３２７２は、いずれもＬｅｘＡをコードする遺伝子である。

[0016] 一方、シアノバクテリアのＬｅｘＡは、大腸菌等のＬｅｘＡとは異なる機能を有する場合もあることが示されている。例えば、シネコシスティス・エスピーＰＣＣ６８０３のＬｅｘＡをコードするｓｌｌ１６２６遺伝子は、生育必須遺伝子であることが知られているが、それがコードするタンパク質は、大腸菌等のＬｅｘＡとは異なり、ＤＮＡ修復等のＳＯＳレギュロンの発現制御には関与していないことが報告されている（Ｍｏｌ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ，２００４，５３（１）：６５－８０）。また、シネコシスティス・エスピーＰＣＣ６８０３のＬｅｘＡは、光照射条件下で水素発生に関与する双方向性ヒドロゲナーゼをコードするｈｏｘオペロン（ｈｏｘＥＦＵＹＨ）の発現を促進することが報告されている（Ｍｏｌ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ，２００５，５８（３）：８１０－８２３）。その他、シネコシスティス・エスピーＰＣＣ６８０３のＬｅｘＡにより発現抑制される遺伝子としては、ＬｅｘＡ自身をコードする遺伝子、及びｒｅｄｏｘ－ｓｅｎｓｉｔｉｖｅ ＲＮＡ ｈｅｌｉｃａｓｅ，ｃｒｈＲ（Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ，２００６，３４（１２）：３４４６－３５４）が報告されている。シネコシスティス・エスピーＰＣＣ６８０３のＬｅｘＡの認識配列としては、例えば、“ＣＴＡ－Ｎ９－ＣＴＡ”の１２塩基を含む配列が報告されている（ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔ，２００８，５８２（１６）：２４２４－３０）。一方、アナベナ・エスピーＰＣＣ７１２０のＬｅｘＡについては、上記ＰＣＣ６８０３株と同様に双方向性ヒドロゲナーゼの発現を促進すること、シュードパリンドローム配列ＲＧＴＡＣＮＮＮＤＧＴＷＣＢ（配列番号２４）を認識することが報告されている（Ｍｏｌ Ｇｅｎｅｔ Ｇｅｎｏｍｉｃｓ，２００４，２７１（１）：４０－９）。さらに、シアノバクテリアのＬｅｘＡの推定認識配列として、おおよそＡＧＴＡＣＷＮＷＴＧＴＡＣＴ（配列番号２５）で示される１４ｂｐのパリンドローム配列が報告されている（ＢＭＣ Ｇｅｎｏｍｉｃｓ，２０１０，１１：５２７）。

[0017] したがって、本明細書において、シアノバクテリアにおける「ＬｅｘＡ型転写制御因子」とは、広義には、Ｎ末端側にはヘリックスターンヘリックス

構造を有するＤＮＡ結合ドメイン（ｐｆａｍ０１７２６）として同定されるアミノ酸配列を、Ｃ末端側にはＰｅｐｔｉｄａｓｅ＿Ｓ２４－ｌｉｋｅ配列（ｐｆａｍ００７１７）として同定されるアミノ酸配列を有し、かつ遺伝子の転写を制御する機能を有するタンパク質をいう。より実際的には、ＬｅｘＡ型転写制御因子は、ＢＬＡＳＴ（ｂｌａｓｔ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／Ｂｌａｓｔ．ｃｇｉ？ＣＭＤ＝Ｗｅｂ＆ＰＡＧＥ＿ＴＹＰＥ＝ＢｌａｓｔＨｏｍｅ）を用いた既知のＬｅｘＡ遺伝子とのホモロジー検索により、同定することができる。本明細書において、ポリペプチドが「ＬｅｘＡ型転写制御因子としての構造及び機能を有する」とは、該ポリペプチドが、上記のＤＮＡ結合ドメインとして働くＮ末端側のヘリックスターンヘリックスと、Ｃ末端側のＰｅｐｔｉｄａｓｅ＿Ｓ２４－ｌｉｋｅ配列とを含む構造を有し、かつ遺伝子の転写を制御する機能を有することをいう。

[0018] シアノバクテリアの遺伝子やタンパク質に関する情報は、例えば上述のＣｙａｎｏＢａｓｅやＮＣＢＩデータベースにおいて公開されている。当業者は、これらのデータベースの情報に基づいて、目的のシアノバクテリアのタンパク質（例えば、ＬｅｘＡ型転写制御因子若しくはアシル－ＡＣＰシンターゼ）のアミノ酸配列、又はそれらをコードする遺伝子のヌクレオチド配列を取得することができる。

[0019] （２．改変シアノバクテリア）

シアノバクテリアの光合成に依存した、大気CO_2の炭素を原料にした様々なバイオ燃料生産技術が開発されているが、その生産性はまだ低いレベルであり、より生産効率の高い技術の開発が望まれている。本発明は、脂肪酸生産性が向上したシアノバクテリアを提供することに関する。

[0020] 本発明者は、シアノバクテリアにおいて、ＬｅｘＡ型転写制御因子と、アシル－ＡＣＰシンターゼとを機能喪失させることによって、又はさらにアシル－ＡＣＰチオエステラーゼをコードする遺伝子を導入することによって得られた改変シアノバクテリアにおいて、該シアノバクテリアの培養液あたり又は細胞あたりの脂肪酸分泌生産量が増大することを見出した。

[0021] 本発明によれば、脂肪酸分泌生産性の向上した改変シアノバクテリアを製造することができる。本発明の改変シアノバクテリアを培養すれば、効率のよい微生物学的脂肪酸生産が可能になる。

[0022] 本発明は、脂肪酸の分泌生産性が向上した改変シアノバクテリアを提供する。本発明の改変シアノバクテリアは、そのＬｅｘＡ型転写制御因子と、アシル－ＡＣＰシンテターゼとを機能喪失させるように改変されたシアノバクテリアである。

[0023] 本発明の改変シアノバクテリアの親微生物となる、ＬｅｘＡ型転写制御因子とアシル－ＡＣＰシンテターゼの機能喪失改変前のシアノバクテリア（以下、親シアノバクテリアということがある）の種類には、特に制限はなく、あらゆる種類のものが挙げられる。好ましくは、親シアノバクテリアの例としては、シネコシスティス属（Ｓｙｎｅｃｈｏｃｙｓｔｉｓ）、シネココッカス属（Ｓｙｎｅｃｈｏｃｏｃｃｕｓ）、プロクロロコッカス属（Ｐｒｏｃｈｌｏｒｏｃｏｃｃｕｓ）、アカリオクロリス属（Ａｃａｒｙｏｃｈｌｏｒｉｓ）、シアノセイス属（Ｃｙａｎｏｔｈｅｃｅ）、及びアナベナ属（Ａｎａｂａｅｎａ）に属するシアノバクテリアを挙げることができ、より好ましくは、シネコシスティス属（Ｓｙｎｅｃｈｏｃｙｓｔｉｓ）、シネココッカス属（Ｓｙｎｅｃｈｏｃｏｃｃｕｓ）、及びアナベナ属（Ａｎａｂａｅｎａ）に属するシアノバクテリアを挙げることができ、さらに好ましくは、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・エスピーＰＣＣ７００２、シネココッカス・エスピーＷＨ８１０２、プロクロロコッカス・エスピーＭＩＴ９３０３、プロクロロコッカス・マリナスＭＩＴ９３１３、アカリオクロリス・マリアナＭＢＩＣ１１０１７、シアノセイス・エスピーＡＴＣＣ５１１４２、シアノセイス・エスピーＰＣＣ８８０１、及びアナベナ・エスピーＰＣＣ７１２０を挙げることができ、さらにより好ましくは、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ＰＣＣ６７１４、及びシネコシスティス・エスピーＰＣＣ

７５０９を挙げることができ、なお好ましくはシネコシスティス・エスピーＰＣＣ６８０３である。

[0024] 上記親シアノバクテリアのＬｅｘＡ型転写制御因子のアミノ酸配列、それをコードする遺伝子、及び当該遺伝子のゲノム又はプラスミド上での位置やそのヌクレオチド配列は、上述のＣｙａｎｏＢａｓｅやＮＣＢＩデータベースで確認することができる。例えば、本発明において親シアノバクテリアから機能喪失されるＬｅｘＡ型転写制御因子の好ましい例としては、以下の遺伝子：シネコシスティス・エスピーＰＣＣ６８０３のｓｌｌ１６２６、シネココッカス・エスピーＰＣＣ７００２のＳＹＮＰＣＣ７００２＿Ａ１８４９、シネココッカス・エスピーＷＨ８１０２のＳＹＮＷ１５８２、プロクロロコッカス・エスピーＭＩＴ９３０３のＰ９３０３＿１９１４１、プロクロロコッカス・マリナスＭＩＴ９３１３のＰＭＴ０３８０、アカリオクロリス・マリアナＭＢＩＣ１１０１７のＡＭ１＿３９４８、シアノセイス・エスピーＡＴＣＣ５１１４２のｃｃｅ＿１８９９若しくはｃｃｅ＿５０７４、シアノセイス・エスピーＰＣＣ８８０１のＰＣＣ８８０１＿２１８６、又はアナベナ・エスピーＰＣＣ７１２０のａｌｒ４９０８若しくはａｌｌ３２７２、にコードされるＬｅｘＡが挙げられる。あるいは、本発明において機能喪失されるＬｅｘＡとしては、上記に例示したＬｅｘＡのいずれかのアミノ酸配列と、４０％以上、好ましくは５０％以上、より好ましくは６０％以上、さらに好ましくは７０％以上、さらにより好ましくは８０％以上、なお好ましくは９０％以上、なお好ましくは９５％以上、なお好ましくは９８％以上、なお好ましくは９９％以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつＬｅｘＡ型転写制御因子としての構造及び機能を有するポリペプチドを挙げることができる。

[0025] シアノバクテリアのアシル－ＡＣＰシンテターゼのアミノ酸配列、それをコードする遺伝子、及び該遺伝子の位置やそのヌクレオチド配列は、上述のＣｙａｎｏＢａｓｅやＮＣＢＩデータベースで確認することができる。本発明において親シアノバクテリアから機能喪失されるアシル－ＡＣＰシンテタ

ーゼの好ましい例としては、シネコシスティス・エスピーＰＣＣ６８０３のＳｌｒ１６０９、シネココッカス・エスピーＰＣＣ７００２のＳＹＮＰＣＣ７００２＿Ａ０６７５、シネココッカス・エスピーＷＨ８１０２のＳＹＮＷ０６６９、プロクロロコッカス・エスピーＭＩＴ９３０３のＰ９３０３＿２１３９１、プロクロロコッカス・マリナスＭＩＴ９３１３のＰＭＴ０２１５、アカリオクロリス・マリアナＭＢＩＣ１１０１７のＡＭ１＿５５６２及びＡＭ１＿２１４７、シアノセイス・エスピーＡＴＣＣ５１１４２のＣＣＥ＿１１３３、シアノセイス・エスピーＰＣＣ８８０１のＰＣＣ８８０１＿０３３２、アナベナ・エスピーＰＣＣ７１２０のＡｌｒ３６０２などを挙げることができる。あるいは、本発明において機能喪失されるアシル－ＡＣＰシンテターゼとしては、上記に例示したアシル－ＡＣＰシンテターゼタンパク質のいずれかのアミノ酸配列と、４０％以上、好ましくは５０％以上、より好ましくは６０％以上、さらに好ましくは７０％以上、さらにより好ましくは８０％以上、なお好ましくは９０％以上、なおより好ましくは９５％以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつアシル－ＡＣＰを合成する機能を有するポリペプチドを挙げることができる。

[0026] シアノバクテリアにおけるＬｅｘＡ型転写制御因子又はアシル－ＡＣＰシンテターゼを機能喪失させる手段としては、タンパク質の機能喪失に通常使用される手段であれば特に限定されないが、例えば、ＬｅｘＡ又はアシル－ＡＣＰシンテターゼをコードする遺伝子を欠失又は不活性化させること、該遺伝子に対し、発現したタンパク質が活性低減又は不活性化する変異を導入すること、該遺伝子の転写を阻害する変異を導入すること、該遺伝子の転写産物の翻訳を阻害すること、又は発現した目的のタンパク質を特異的に阻害する阻害剤を投与することなどが挙げられる。このうち、シアノバクテリアにおけるＬｅｘＡ型転写制御因子をコードする遺伝子と、アシル－ＡＣＰシンテターゼをコードする遺伝子とを欠失又は不活性化させることが好ましい。

[0027] 本発明において、ＬｅｘＡ型転写制御因子を機能喪失させるために欠失又

は不活性化させるべき、ＬｅｘＡ型転写制御因子をコードする遺伝子の例としては、上述したシネコシスティス・エスピーＰＣＣ６８０３のｓｌｌ１６２６、シネコシスティス・エスピーＰＣＣ７００２のＳＹＮＰＣＣ７００２＿Ａ１８４９、シネココッカス・エスピーＷＨ８１０２のＳＹＮＷ１５８２、プロクロロコッカス・エスピーＭＩＴ９３０３のＰ９３０３＿１９１４１、プロクロロコッカス・マリナスＭＩＴ９３１３のＰＭＴ０３８０、アカリオクロリス・マリアナＭＢＩＣ１１０１７のＡＭ１＿３９４８、シアノセイス・エスピーＡＴＣＣ５１１４２のｃｃｅ＿１８９９及びｃｃｅ＿５０７４、シアノセイス・エスピーＰＣＣ８８０１のＰＣＣ８８０１＿２１８６、アナベナ・エスピーＰＣＣ７１２０のａｌｒ４９０８及びａｌｌ３２７２などが挙げられる。これらの遺伝子及びそのヌクレオチド配列は、上述したＣｙａｎｏＢａｓｅ又はＮＣＢＩデータベース上で確認することができる。例えば、シネコシスティス・エスピーＰＣＣ６８０３のＳｌｌ１６２６をコードするポリヌクレオチドは、ｓｌｌ１６２６遺伝子（ＮＣＢＩ　Ｇｅｎｅ　ＩＤ：９５４４０４）として、またシネコシスティス・エスピーＰＣＣ７００２のＳＹＮＰＣＣ７００２＿Ａ１８４９をコードするポリヌクレオチドは、ＳＹＮＰＣＣ７００２＿Ａ１８４９遺伝子（ＮＣＢＩ　Ｇｅｎｅ　ＩＤ：６０５７７９０）として同定することができる。さらに、これらの遺伝子のいずれかのヌクレオチド配列と、４０％以上、好ましくは５０％以上、より好ましくは６０％以上、さらに好ましくは７０％以上、さらにより好ましくは８０％以上、なお好ましくは９０％以上、なお好ましくは９５％以上、なお好ましくは９８％以上、なお好ましくは９９％以上の同一性を有するヌクレオチド配列からなり、かつＬｅｘＡ型転写制御因子としての構造及び機能を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドもまた、本発明で欠失又は不活性化させるべきＬｅｘＡ転写制御因子をコードする遺伝子の例として挙げることができる。

[0028] 本発明において欠失又は不活性化させるべきＬｅｘＡ型転写制御因子をコードする遺伝子の好ましい例としては、ｓｌｌ１６２６遺伝子、及びｓｌｌ

１６２６遺伝子のヌクレオチド配列と８０％以上、好ましくは９０％以上、より好ましくは９５％以上、さらに好ましくは９８％以上、なお好ましくは９９％以上の同一性を有するヌクレオチド配列からなり、かつＬｅｘＡ型転写制御因子としての構造及び機能を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが挙げられる。

[0029] また、本発明で機能喪失させるために、欠失又は不活性化させるべきアシル－ＡＣＰシンテターゼをコードする遺伝子の例としては、以下のタンパク質：シネコシスティス・エスピーＰＣＣ６８０３のＳｌｒ１６０９、シネココッカス・エスピーＰＣＣ７００２のＳＹＮＰＣＣ７００２＿Ａ０６７５、シネココッカス・エスピーＷＨ８１０２のＳＹＮＷ０６６９、プロクロロコッカス・エスピーＭＩＴ９３０３のＰ９３０３＿２１３９１、プロクロロコッカス・マリナスＭＩＴ９３１３のＰＭＴ０２１５、アカリオクロリス・マリアナＭＢＩＣ１１０１７のＡＭ１＿５５６２若しくはＡＭ１＿２１４７、シアノセイス・エスピーＡＴＣＣ５１１４２のＣＣＥ＿１１３３、シアノセイス・エスピーＰＣＣ８８０１のＰＣＣ８８０１＿０３３２、又はアナベナ・エスピーＰＣＣ７１２０のＡｌｒ３６０２、をコードするポリヌクレオチドが挙げられる。これらの遺伝子及びそのヌクレオチド配列は、上述したＣｙａｎｏＢａｓｅ又はＮＣＢＩデータベース上で確認することができる。例えば、シネコシスティス・エスピーＰＣＣ６８０３のＳｌｒ１６０９をコードするポリヌクレオチドは、ｓｌｒ１６０９遺伝子（ＮＣＢＩ　Ｇｅｎｅ　ＩＤ：９５３６４３）として、シネココッカス・エスピーＰＣＣ７００２のＳＹＮＰＣＣ７００２＿Ａ０６７５をコードするポリヌクレオチドは、ＳＹＮＰＣＣ７００２＿Ａ０６７５遺伝子（ＮＣＢＩ　Ｇｅｎｅ　ＩＤ：６０５７０２９）として、シネココッカス・エスピーＷＨ８１０２のＳＹＮＷ０６６９をコードするポリヌクレオチドは、ＳＹＮＷ０６６９遺伝子（ＮＣＢＩ－Ｇｅｎｅ　ＩＤ：１７３０６８２）として、及びアナベナ・エスピーＰＣＣ７１２０のＡｌｒ３６０２をコードするポリヌクレオチドはａｌｒ３６０２遺伝子として、同定することができる。さらに、これらの遺伝子のいずれ

かのヌクレオチド配列と、４０％以上、好ましくは５０％以上、より好ましくは６０％以上、さらに好ましくは７０％以上、さらにより好ましくは８０％以上、なお好ましくは９０％以上、なお好ましくは９５％以上、なお好ましくは９８％以上、なお好ましくは９９％以上の同一性を有するヌクレオチド配列からなり、かつアシル－ＡＣＰを合成する機能を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドもまた、本発明で欠失又は不活性化させるべきアシル－ＡＣＰシンテターゼをコードする遺伝子の例として挙げることができる。

[0030] 本発明で欠失又は不活性化させるべきアシル－ＡＣＰシンテターゼをコードする遺伝子の好ましい例としては、ｓｌｒ１６０９遺伝子、ＳＹＮＰＣＣ７００２＿Ａ０６７５遺伝子、及びｓｌｒ１６０９遺伝子又はＳＹＮＰＣＣ７００２＿Ａ０６７５遺伝子のヌクレオチド配列と８０％以上、好ましくは９０％以上、より好ましくは９５％以上、さらに好ましくは９８％以上、なお好ましくは９９％以上の同一性を有するヌクレオチド配列からなり、かつアシル－ＡＣＰを合成する機能を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが挙げられ、より好ましい例は、ｓｌｒ１６０９遺伝子である。

[0031] 上記遺伝子を欠失又は不活性化させる手段としては、該遺伝子のヌクレオチド配列上の１つ以上のヌクレオチドに対する突然変異導入、又は該ヌクレオチド配列に対する別のヌクレオチド配列の置換若しくは挿入、あるいは該遺伝子の配列の一部若しくは全部の削除などが挙げられる。発現したタンパク質が活性低減又は不活性化する変異を遺伝子に導入する手段としては、該遺伝子がコードするタンパク質の活性に関与する部位に変異が生じるように、該遺伝子に突然変異を導入することが挙げられる。上記遺伝子の転写を阻害する変異を導入する手段としては、該遺伝子のプロモーター領域に対する突然変異導入や、別のヌクレオチド配列での置換若しくは挿入による、当該プロモーターの不活性化が挙げられる。上記突然変異導や、ヌクレオチド配列の置換若しくは挿入のための具体的な手法としては、紫外線照射や部位特異的変異導入、相同組換え法、ＳＯＥ（ｓｐｌｉｃｉｎｇ　ｂｙ　ｏｖｅｒ

ｌａｐ　ｅｘｔｅｎｓｉｏｎ）－ＰＣＲ法（Ｇｅｎｅ，１９８９，７７：６１－６８）などを挙げることができる。上記転写産物の翻訳を阻害する手段としては、マイクロＲＮＡによるＲＮＡ干渉を挙げることができる。タンパク質の特異的阻害剤としては、当該タンパク質や、その受容体又はリガンドに特異的な抗体が挙げられる。

[0032] 好ましい実施形態において、本発明の改変シアノバクテリアは、上述の改変に加えて、さらにアシル－ＡＣＰチオエステラーゼをコードする異種遺伝子が導入されていてもよい。言い換えると、本発明の好ましい実施形態における改変シアノバクテリアは、ＬｅｘＡ転写制御因子とアシル－ＡＣＰシンテターゼが機能喪失されており、かつさらにアシル－ＡＣＰチオエステラーゼをコードする異種遺伝子を保有するシアノバクテリアであり得る。アシル－ＡＣＰチオエステラーゼは、脂肪酸合成経路において、アシル－ＡＣＰから脂肪酸鎖を遊離させる酵素である。シアノバクテリアへのアシル－ＡＣＰチオエステラーゼの導入により、脂肪酸合成で生成したアシル－ＡＣＰから脂肪酸が切り出されて、遊離脂肪酸が生成されることが報告されている（非特許文献４）。一方で、シアノバクテリアでアシル－ＡＣＰチオエステラーゼの働きにより生成された遊離脂肪酸を効率的に分泌させるために、内生のアシル－ＡＣＰシンテターゼ遺伝子を機能喪失させることが有効であることが報告されている（Ｐｌａｎｔ　Ｐｈｙｓｉｏｌ，２０１０，１５２：１５９８－１６１０）。したがって、本発明の改変シアノバクテリアに対して、アシル－ＡＣＰチオエステラーゼをコードする遺伝子を外部から導入することにより、その細胞内における脂肪酸の生成を促進し、改変シアノバクテリアの脂肪酸の分泌生産性を一層向上させることができる。

[0033] 本発明の改変シアノバクテリアに導入するアシル－ＡＣＰチオエステラーゼをコードする遺伝子としては、種子油に大量の中鎖脂肪酸を含有する植物、又は脂肪酸生産性藻類等から単離されたものを挙げることができる。例えば、以下の植物又は藻類：シロイヌナズナ（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ　ｔｈａｌｉａｎａ）；ブラディリゾビウム・ジャポニクム（Ｂｒａｄｙｒｈｉｚ

ｏｂｉｕｍ ｊａｐｏｎｉｃｕｍ）；セイヨウアブラナ（Ｂｒａｓｓｉｃａ ｎａｐｕｓ）；クスノキ（Ｃｉｎｎａｍｏｎｕｍ ｃａｍｐｈｏｒｕｍ）；カプシカム・シネンセ（Ｃａｐｓｉｃｕｍ ｃｈｉｎｅｎｓｅ）；クフェア・フッケリアナ（Ｃｕｐｈｅａ ｈｏｏｋｅｒｉａｎａ）；クフェア・ランセオラータ（Ｃｕｐｈｅａ ｌａｎｃｅｏｌａｔａ）；クフェア・パルストリス（Ｃｕｐｈｅａ ｐａｌｕｓｔｒｉｓ）；コリアンダー（Ｃｏｒｉａｎｄｒｕｍ ｓａｔｉｖｕｍ Ｌ．）；ベニバナ（Ｃａｒｔｈａｍｕｓ ｔｉｎｃｔｏｒｉｕｓ）；クフェア・ライチイ（Ｃｕｐｈｅａ ｗｒｉｇｈｔｉｉ）；ギニアアブラヤシ（Ｅｌａｅｉｓ ｇｕｉｎｅｅｎｓｉｓ）；ワタ（Ｇｏｓｓｙｐｉｕｍ ｈｉｒｓｕｔｕｍ）；マンゴスチン（Ｇａｒｃｉｎｉａ ｍａｎｇｏｓｔａｎａ）；ヒマワリ（Ｈｅｌｉａｎｔｈｕｓ ａｎｎｕｕｓ）；ジャーマン・アイリス（Ｉｒｉｓ ｇｅｒｍａｎｉｃａ）；イチハツ（Ｉｒｉｓ ｔｅｃｔｏｒｕｍ）；ナツメグ（Ｍｙｒｉｓｔｉｃａ ｆｒａｇｒａｎｓ）；コムギ（Ｔｒｉｔｉｃｕｍ ａｅｓｔｉｖｕｍ）；アメリカニレ（Ｕｌｍｕｓ Ａｍｅｒｉｃａｎａ）；シナモン（Ｃｉｎｎａｍｏｍｕｍ ｃａｍｐｈｏｒｕｍ）；ココヤシ（Ｃｏｃｏｓ ｎｕｃｉｆｅｒａ）；又は、ウンベルラリア・カリフォルニカ（Ｕｍｂｅｌｌｕｌａｒｉａ ｃａｌｉｆｏｒｎｉｃａ）、に由来するアシル－ＡＣＰチオエステラーゼをコードする遺伝子が挙げられる。あるいは、大腸菌（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ）のアシル－ＡＣＰチオエステラーゼをコードする遺伝子を、本発明の改変シアノバクテリアに導入することもできる。本発明の上記アシル－ＡＣＰチオエステラーゼをコードする異種遺伝子は、好ましくは、ウンベルラリア・カリフォルニカ由来のアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ（ＮＣＢＩデータベース ＧＩ：５９５９５５）をコードする遺伝子、シナモンのアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ（ＧＩ：ＡＡＣ４９１５１．１）をコードする遺伝子、ココヤシのアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ（ＧＩ：ＡＥＭ７２５２１．１）をコードする遺伝子、又は大腸菌のアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ（ＧＩ：ＡＡＣ７３５９６．１）をコードする遺伝子である。上記

植物や藻類、又は大腸菌由来のアシル－ＡＣＰチオエステラーゼをコードする遺伝子は、ＮＣＢＩデータベース上で同定することができる。例えば、ウンベルラリア・カリフォルニカ由来のアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ（ＵｃＴＥ）の遺伝子は、ＮＣＢＩデータベースにてＧｅｎＢａｎｋ　ＩＤ：Ｕ１７０９７として登録されている。また例えば、シナモン及びココヤシのアシル－ＡＣＰチオエステラーゼをコードする遺伝子は、それぞれＧｅｎＢａｎｋ　ＩＤ：Ｕ３１８１３、及びＧｅｎＢａｎｋ　ＩＤ：ＪＦ３３８９０５として登録されている。また例えば、Ｅ．ｃｏｌｉ　Ｋ－１２株のアシル－ＡＣＰチオエステラーゼをコードする遺伝子は、ＮＣＢＩ　Ｇｅｎｅ　ＩＤ：９４５１２７として登録されている。

[0034] 本発明でシアノバクテリアに導入するアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ遺伝子の好ましい例としては、配列番号１で示されるアミノ酸配列からなるウンベルラリア・カリフォルニカ由来のアシル－ＡＣＰチオエステラーゼＵｃＴＥをコードする遺伝子、及び配列番号１で示されるＵｃＴＥのアミノ酸配列と８０％以上、好ましくは９０％以上、より好ましくは９５％以上、さらに好ましくは９８％以上、なお好ましくは９９％以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつアシル－ＡＣＰから脂肪酸鎖を遊離させる機能を有するポリペプチドをコードする遺伝子が挙げられる。

[0035] アシル－ＡＣＰチオエステラーゼは、基質となるアシル－ＡＣＰの脂肪酸鎖長及び不飽和度に対して特異性を有する（米国特許第５２９８４２１号、Ｐｌａｎｔａ，１９９３，１８９：４２５－４３２）。したがって、導入するアシルＡＣＰチオエステラーゼの種類を変えることによって、シアノバクテリアに所望の鎖長や不飽和度の遊離脂肪酸を生産させることが可能である。例えば、上述のウンベリラリア・カリフォルニカ由来アシル－ＡＣＰチオエステラーゼ（ＵｃＴＥ）は、Ｃ１２鎖長のアシル基に基質特異性を有し、生成する遊離脂肪酸は主にラウリン酸（Ｃ１２：０）などのＣ１２鎖長の遊離脂肪酸である。また例えば、上述のシナモン及びココヤシのアシル－ＡＣＰチオエステラーゼは、Ｃ１４鎖長のアシル基に基質特異性を有し、生成す

る遊離脂肪酸は主にミリスチン酸（Ｃ１４：０）などのＣ１４鎖長の遊離脂肪酸である。また例えば、上述のＥ．ｃｏｌｉ　Ｋ－１２株のアシル－ＡＣＰチオエステラーゼは、Ｃ１６又はＣ１８鎖長のアシル基に基質特異性を有し、生成する遊離脂肪酸は主にパルミチン酸（Ｃ１６：０）、パルミトレイン酸（Ｃ１６：１）、ステアリン酸（Ｃ１８：０）、オレイン酸（Ｃ１８：１）、リノール酸（Ｃ１８：２）、リノレン酸（Ｃ１８：３）などのＣ１６又はＣ１８鎖長の遊離脂肪酸である。

[0036] 本発明の改変シアノバクテリアに導入される異種アシル－ＡＣＰチオエステラーゼ遺伝子は、シアノバクテリアにおけるコドン使用頻度にあわせて、コドンを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。シアノバクテリア用にコドン至適化されたアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ遺伝子の例としては、配列番号２で示されるヌクレオチド配列からなるＵｃＴＥ（配列番号１）をコードするポリヌクレオチド、又は配列番号２で示されるヌクレオチド配列と８０％以上、好ましくは９０％以上、より好ましくは９５％以上、さらに好ましくは９８％以上、なお好ましくは９９％以上の同一性を有するヌクレオチド配列からなり、かつアシル－ＡＣＰから脂肪酸鎖を遊離させる機能を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが挙げられる。

[0037] シアノバクテリアへの異種アシル－ＡＣＰチオエステラーゼ遺伝子の導入には、例えば、プラスミドベクターなどのベクターを用いることができる。ベクターは、発現ベクターが好ましい。例えば、異種アシル－ＡＣＰチオエステラーゼ遺伝子のＤＮＡ断片及びそれを発現させるためのプロモーターを含む発現ベクターを構築する。プロモーターとしては、ｌａｃ、ｔａｃ若しくはｔｒｃ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導体に関するプロモーター、又は、Ｒｕｂｉｓｃｏオペロン（ｒｂｃ）、ＰＳＩ反応中心タンパク質をコードする遺伝子（ｐｓａＡＢ）若しくはＰＳＩＩ反応中心Ｄ１タンパク質をコ

ードする遺伝子（ｐｓｂＡ）などの発現に関わるシアノバクテリアから単離されたプロモーターを利用できるが、これらに限定されるわけではなく、シアノバクテリアにおいて機能する多様なプロモーターを利用することができる。また上記発現ベクターには、当該ベクターが適切に導入された宿主を選択するためのマーカー遺伝子（例えば、カナマイシン、クロラムフェニコール、スペクチノマイシン、エリスロマイシンなどの薬剤の耐性遺伝子）がさらに組み込まれていてもよい。上記発現ベクターを、公知の手段で親シアノバクテリア又は本発明の改変シアノバクテリアに導入し、形質転換する。シアノバクテリアへのベクターの導入法としては、自然形質転換法、エレクトロポレーション法、接合法などの一般的な方法を用いることができる。形質転換処理後のシアノバクテリアを選択培地、例えば、抗生物質含有培地で培養すれば、所望の形質を有する形質転換体を選択することができる。

[0038] 好ましい実施形態において、異種アシル－ＡＣＰチオエステラーゼ遺伝子は、シアノバクテリアのゲノム上の内因性アシル－ＡＣＰシンテターゼ遺伝子の領域に導入され、該シアノバクテリアにおいてアシル－ＡＣＰシンテターゼを機能喪失させるとともに、異種アシル－ＡＣＰチオエステラーゼの発現能を付与する。例えば、ＳＯＥ－ＰＣＲ法（Gene, 1989, 77:61-68）によって、両端にアシル－ＡＣＰシンテターゼ遺伝子領域のＤＮＡ断片が付加された異種アシル－ＡＣＰチオエステラーゼ遺伝子のＤＮＡ断片を構築し、これをベクターに挿入し、該ベクターをシアノバクテリアに導入してゲノム上アシル－ＡＣＰシンテターゼ遺伝子領域との相同組換えを起こさせることによって、ゲノム上のアシル－ＡＣＰシンテターゼ遺伝子の領域に異種アシル－ＡＣＰチオエステラーゼ遺伝子が導入された改変シアノバクテリアを得ることができる。別の実施形態において、異種アシル－ＡＣＰチオエステラーゼ遺伝子は、シアノバクテリアのゲノム上における、遺伝子導入をしてもシアノバクテリアに害を与えない領域（ニュートラルサイト）に導入されてもよい。

[0039] （３．脂肪酸生産方法）

以上の手順で、本発明の改変シアノバクテリアを製造することができる。本発明の改変シアノバクテリアは、脂肪酸分泌生産性が向上している。したがって、本発明の改変シアノバクテリアを適切な条件で培養し、次いで分泌された脂肪酸を回収すれば、効率のよい微生物学的脂肪酸生産を実施することができる。本発明の脂肪酸生産方法でシアノバクテリアにより分泌生産される脂肪酸としては、各種遊離脂肪酸が挙げられ、好ましくはラウリン酸（Ｃ１２：０）を豊富に含有する遊離脂肪酸であり得る。

[0040] シアノバクテリアの培養は、一般に、ＢＧ－１１培地（Ｊ Ｇｅｎ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ，１９７９，１１１：１－６１）を用いた液体培養又はその変法に基づいて実施することができる。脂肪酸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１０～３０日間、より好ましくは１４～２１日間通気攪拌培養又は振とう培養することが好適である。

[0041] 上記培養により、シアノバクテリアは脂肪酸を生産し、当該脂肪酸を培養物中に分泌する。分泌された脂肪酸を回収する場合、培養物からろ過、遠心分離等により細胞等の固形分を除去し、残った液体成分を回収した後、クロロホルム／メタノール抽出法、ヘキサン抽出法、エタノール抽出法等により脂肪酸を回収又は精製すればよい。また、大規模な生産の場合は、細胞を除去した後の培養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、脱蝋、脱臭等の一般的な精製を行い、脂肪酸を得ることができる。本発明による脂肪酸生産方法では、脂肪酸がシアノバクテリアの細胞外に分泌されるので、脂肪酸回収のために細胞を破壊する必要がない。脂肪酸回収後に残った細胞は、繰り返し脂肪酸生産に使用することができる。

[0042] 本発明の改変シアノバクテリアを用いた脂肪酸生産方法により得られる脂肪酸は、食用として用いられ得る他、化粧品等に配合する乳化剤や、石鹸や洗剤等の洗浄剤、繊維処理剤、毛髪リンス剤、又は殺菌剤や防腐剤などの原料として利用することができる。

[0043] （４．例示的実施形態）

上述した本発明の別の例示的実施形態として、さらに以下の組成物、製造方法、用途あるいは方法を本明細書に開示する。ただし、本発明はこれらの実施形態に限定されない。

[0044] ＜１＞シアノバクテリアにおけるＬｅｘＡ型転写制御因子と、アシル－ＡＣＰシンテターゼとを機能喪失させることを含む、改変シアノバクテリアの製造方法。

[0045] ＜２＞シアノバクテリアにおけるＬｅｘＡ型転写制御因子と、アシル－ＡＣＰシンテターゼとを機能喪失させることを含む、シアノバクテリアの脂肪酸分泌生産性の向上方法。

[0046] ＜３＞ＬｅｘＡ型転写制御因子と、アシル－ＡＣＰシンテターゼとが機能喪失した改変シアノバクテリア。

[0047] ＜４＞好ましくは、シアノバクテリアにおけるＬｅｘＡ型転写制御因子をコードする遺伝子と、アシル－ＡＣＰシンテターゼをコードする遺伝子とを欠失又は不活性化することを含む、＜１＞記載の方法。

[0048] ＜５＞好ましくは、シアノバクテリアにおけるＬｅｘＡ型転写制御因子をコードする遺伝子と、アシル－ＡＣＰシンテターゼをコードする遺伝子とを欠失又は不活性化することを含む、＜２＞記載の方法。

[0049] ＜６＞好ましくは、ＬｅｘＡ型転写制御因子をコードする遺伝子と、アシル－ＡＣＰシンテターゼをコードする遺伝子とが欠失又は不活性化されている、＜３＞記載の改変シアノバクテリア。

[0050] ＜７＞好ましくは、さらにアシル－ＡＣＰチオエステラーゼをコードする異種遺伝子を導入することを含む、＜１＞又は＜４＞記載の方法。

[0051] ＜８＞好ましくは、さらにアシル－ＡＣＰチオエステラーゼをコードする異種遺伝子を導入することを含む、＜２＞又は＜５＞記載の方法。

[0052] ＜９＞好ましくは、アシル－ＡＣＰチオエステラーゼをコードする異種遺伝子を含む、＜３＞又は＜６＞記載の改変シアノバクテリア。

[0053] ＜１０＞上記＜４＞～＜９＞のいずれか１において、好ましくは、上記ＬｅｘＡ型転写制御因子をコードする遺伝子は以下より選択される：

（１）ｓｌｌ１６２６、ＳＹＮＰＣＣ７００２＿Ａ１８４９、ＳＹＮＷ１５８２、Ｐ９３０３＿１９１４１、ＰＭＴ０３８０、ＡＭ１＿３９４８、ｃｃｅ＿１８９９、ｃｃｅ＿５０７４、ＰＣＣ８８０１＿２１８６、ａｌｒ４９０８、及びａｌｌ３２７２からなる群より選択される遺伝子；ならびに

（２）上記（１）に示される遺伝子のいずれかのヌクレオチド配列と、４０％以上、好ましくは５０％以上、より好ましくは６０％以上、さらに好ましくは７０％以上、さらにより好ましくは８０％以上、なお好ましくは９０％以上、なお好ましくは９５％以上、なお好ましくは９８％以上、なお好ましくは９９％以上の同一性を有するヌクレオチド配列からなり、かつＬｅｘＡ型転写制御因子としての構造及び機能を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

[0054] ＜１１＞上記＜４＞～＜１０＞のいずれか１において、好ましくは、上記アシル－ＡＣＰシンテターゼをコードする遺伝子は以下より選択される：

（１）ＳＩｒ１６０９、ＳＹＮＰＣＣ７００２＿Ａ０６７５、ＳＹＮＷ０６６９、Ｐ９３０３＿２１３９１、ＰＭＴ０２１５、ＡＭ１＿５５６２、ＡＭ１＿２１４７、ＣＣＥ＿１１３３、ＰＣＣ８８０１＿０３３２、及びＡｌｒ３６０２からなる群より選択されるタンパク質をコードするポリヌクレオチド；ならびに

（２）上記（１）に示されるポリヌクレオチドのいずれかのヌクレオチド配列と、４０％以上、好ましくは５０％以上、より好ましくは６０％以上、さらに好ましくは７０％以上、さらにより好ましくは８０％以上、なお好ましくは９０％以上、なお好ましくは９５％以上、なお好ましくは９８％以上、なお好ましくは９９％以上の同一性を有するヌクレオチド配列からなり、かつアシル－ＡＣＰを合成する機能を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

[0055] ＜１２＞上記＜７＞～＜１１＞のいずれか１において、好ましくは、上記アシル－ＡＣＰチオエステラーゼをコードする異種遺伝子は以下より選択される：

（１）配列番号１で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする遺伝子；ならびに

（２）配列番号１で示されるアミノ酸配列と８０％以上、好ましくは９０％以上、より好ましくは９５％以上、さらに好ましくは９８％以上、なお好ましくは９９％以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつアシル－ＡＣＰから脂肪酸鎖を遊離させる機能を有するポリペプチドをコードする遺伝子；

（３）配列番号２で示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド；及び

（４）配列番号２で示されるヌクレオチド配列と８０％以上、好ましくは９０％以上、より好ましくは９５％以上、さらに好ましくは９８％以上、なお好ましくは９９％以上の同一性を有するヌクレオチド配列からなり、かつアシル－ＡＣＰから脂肪酸鎖を遊離させる機能を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

[0056] ＜１３＞上記＜７＞～＜１１＞のいずれか１において、好ましくは、上記アシル－ＡＣＰチオエステラーゼをコードする異種遺伝子は、シナモン（Ｃｉｎｎａｍｏｍｕｍ　ｃａｍｐｈｏｒｕｍ）又はココヤシ（Ｃｏｃｏｓ　ｎｕｃｉｆｅｒａ）のアシル－ＡＣＰチオエステラーゼをコードする遺伝子である。

[0057] ＜１４＞上記＜７＞～＜１１＞のいずれか１において、好ましくは、上記アシル－ＡＣＰチオエステラーゼをコードする異種遺伝子は、大腸菌（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ）Ｋ－１２のアシル－ＡＣＰチオエステラーゼをコードする遺伝子である。

[0058] ＜１５＞上記＜７＞～＜１４＞のいずれか１において、好ましくは、上記アシル－ＡＣＰチオエステラーゼをコードする異種遺伝子は、上記シアノバクテリアのゲノム配列中における、上記アシル－ＡＣＰシンテターゼをコードする遺伝子の領域に導入されるか、又はニュートラルサイトに導入される。

[0059] ＜１６＞上記＜１＞～＜１５＞のいずれか１において、上記シアノバクテリ

アは、

好ましくは、シネコシスティス属（Ｓｙｎｅｃｈｏｃｙｓｔｉｓ）、シネココッカス属（Ｓｙｎｅｃｈｏｃｏｃｃｕｓ）、プロクロロコッカス属（Ｐｒｏｃｈｌｏｒｏｃｏｃｃｕｓ）、アカリオクロリス属（Ａｃａｒｙｏｃｈｌｏｒｉｓ）、シアノセイス属（Ｃｙａｎｏｔｈｅｃｅ）、又はアナベナ属（Ａｎａｂａｅｎａ）のシアノバクテリアであり、

より好ましくは、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・エスピーＰＣＣ７００２、シネココッカス・エスピーＷＨ８１０２、プロクロロコッカス・エスピーＭＩＴ９３０３、プロクロロコッカス・マリナスＭＩＴ９３１３、アカリオクロリス・マリアナＭＢＩＣ１１０１７、シアノセイス・エスピーＡＴＣＣ５１１４２、シアノセイス・エスピーＰＣＣ８８０１、又はアナベナ・エスピーＰＣＣ７１２０である。

[0060] ＜１７＞上記＜１＞、＜４＞、＜７＞、＜１０＞～＜１６＞のいずれか１に記載の方法で製造された改変シアノバクテリア、又は＜３＞、＜６＞、＜９＞、＜１０＞～＜１６＞のいずれか１に記載の改変シアノバクテリアを培養することを含む、脂肪酸生産方法。

[0061] ＜１８＞好ましくは、上記改変シアノバクテリアに、ウンベリラリア・カリフォルニカ由来アシル－ＡＣＰチオエステラーゼをコードする遺伝子が導入されており、かつＣ１２鎖長の遊離脂肪酸が主に生産される、＜１７＞記載の方法。

[0062] ＜１９＞好ましくは、上記改変シアノバクテリアに、シナモン（Ｃｉｎｎａｍｏｍｕｍ　ｃａｍｐｈｏｒｕｍ）又はココヤシ（Ｃｏｃｏｓ　ｎｕｃｉｆｅｒａ）のアシル－ＡＣＰチオエステラーゼをコードする遺伝子が導入されており、かつＣ１４鎖長の遊離脂肪酸が主に生産される、＜１７＞記載の方法。

[0063] ＜２０＞好ましくは、上記改変シアノバクテリアに、大腸菌（Ｅｓｃｈｅｒ

ｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ）Ｋ－１２のアシル－ＡＣＰチオエステラーゼをコードする遺伝子が導入されており、かつＣ１６又はＣ１８鎖長の遊離脂肪酸が主に生産される、＜１７＞記載の方法。

実施例

[0064] 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。

[0065] 実施例１　ＬｅｘＡ型転写制御因子／アシル－ＡＣＰシンテターゼ二重欠損シアノバクテリア改変株の構築

（１）ＬｅｘＡ転写制御因子破壊株の構築

単細胞光ヘテロ栄養性シアノバクテリウムであるシネコシスティス・エスピーＰＣＣ６８０３において、ＬｅｘＡ型転写制御因子の遺伝子ｓｌｌ１６２６を削除した。シネコシスティス・エスピーＰＣＣ６８０３野生株のゲノムＤＮＡを鋳型として、表１記載のプライマーセットを用いて、ｓｌｌ１６２６ｕｐ断片（配列番号１９）及びｓｌｌ１６２６ｄｏｗｎ断片（配列番号２０）を増幅した。これらのＰＣＲ産物とカナマイシン耐性マーカー遺伝子（ｐＲＬ１６１プラスミドからＨｉｎｃＩＩ処理により切り出したもの）の３断片を混合したＤＮＡ溶液を鋳型として、ｆｕｓｉｏｎ　ＰＣＲを実施し、ｌｅｘＡ破壊コンストラクトΔｓｌｌ１６２６：：Ｋｍ断片を取得した。このΔｓｌｌ１６２６：：Ｋｍ断片でシネコシスティス・エスピーＰＣＣ６８０３株を形質転換し、カナマイシン耐性選抜でＬｅｘＡ転写制御因子破壊株（Δｓｌｌ１６２６株）を取得した。

[0066] [表1]

プライマー	配列	配列番号
lexAup-F	5′-ACATTTTTCGGGGTAGTC-3′	3
lexAup/km-R	5′-GAGGGGATCCTCTAGAGTCTGGAGAATTCTCAGGGTG-3′	4
Km/lexAdown-F	5′-CTGGAGTTCTTCGCCTCAGGGTCATGAGCAAT-3′	5
lexAdown-R	5′-CGGTGACCACCCTAGATA-3′	6

[0067] （２）ＬｅｘＡ転写制御因子破壊株におけるＬｅｘＡ発現量の検証

上記（１）で構築したΔｓｌｌ１６２６株におけるＬｅｘＡ発現量を調べた。シアノバクテリアの培養は、５０ｍＬ大型試験管に加えた５０ｍＬのＢＧ－１１培地中で、一定の照明下（５０μＥ・m^{-2}・sec^{-1}）、３０℃で無菌空気を吹き込みながら行った。野生株及びΔｓｌｌ１６２６株を培養後、遠心分離によって培養液上清を除き得られた菌体を破砕バッファー（５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．５）、５０ｍＭ　ＮａＣｌ）で懸濁した。懸濁液にジルコニアビーズを加えて菌体を破砕し、菌体由来のタンパク質溶液を取得した。各サンプルにつき、１．０ｘ10^{7}細胞分に相当するタンパク質溶液を分取し、ＳＤＳ－ＰＡＧＥに供し、ＬｅｘＡタンパク質をウエスタンブロット解析により検出した。

[0068] ウエスタンブロット解析では、まず、得られたタンパク質溶液に１×サンプルバッファー（６２．５ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ６．８），５％２－メルカプトエタノール，２％ＳＤＳ，５％スクロース，０．００２％Ｂｒｏｍｏｐｈｅｎｏｌ　ｂｌｕｅ）になるよう可溶化し、１５％ＳＤＳ－ＰＡＧＥを行った後、ＰＶＤＦ（ｐｏｌｙｖｉｎｙｌ　ｄｉｆｌｕｏｒｉｄｉｎｅ　ｍｅｍｂｒａｎｅ：Ｉｍｍｏｂｉｌｏｎ；０．４５μｍ　ｐｏｒｅ　ｓｉｚｅ；Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）にブロッティングした。一次抗体として抗Ｈｉｓ－ｌｅｘＡポリクローナル抗体を用いた。二次抗体としてＨＲＰ標識抗ウサギＩｇＧ抗体（Ｂｉｏｒａｄ）を使用した。その後、ＥｚＷｅｓｔＬｕｍｉ　ｐｌｕｓ（ＡＴＴＯ）を用いて発光させ、Ｘ線フィルムに感光させることでＬｅｘＡ由来のバンドを検出した。

[0069] その結果、図１に示したように、野生株ではＬｅｘＡバンドが確認できたが、ｌｅｘＡ欠損株（Δｓｌｌ１６２６株）ではＬｅｘＡに由来するバンドがほぼ確認されず、ＬｅｘＡタンパク質量が顕著に低減していることが示された。この結果から、ｌｅｘＡ欠損Δｓｌｌ１６２６株では、ＬｅｘＡ型転写制御因子の機能が低減されていることが確認された。

[0070] （３）ＬｅｘＡ型転写制御因子／アシル－ＡＣＰシンテターゼ二重欠損株の

構築

シネコシスティス・エスピーＰＣＣ６８０３での脂肪酸の培養液中への分泌生産は、内生のアシル－ＡＣＰシンテターゼ（Ｓｌｒ１６０９）の機能喪失によって達成できる（Ｐｌａｎｔ　Ｐｈｙｓｉｏｌ，２０１０，１５２：１５９８－１６１０）。また、ＰＣＣ６８０３株にアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ酵素をコードする遺伝子を導入することで、脂肪酸生産量が促進されることが報告されている（非特許文献４）。本実施例では、Δｓｌｌ１６２６株のゲノム上のアシル－ＡＣＰシンテターゼをコードする遺伝子であるｓｌｒ１６０９のコード領域間に、スペクチノマイシン耐性遺伝子を挿入してｓｌｒ１６０９遺伝子を不活性化させることで、アシル－ＡＣＰシンテターゼが機能喪失し、脂肪酸生産性が向上した改変株を作製した。さらに、該ｓｌｒ１６０９コード領域にシネコシスティス・エスピーＰＣＣ６８０３にあわせてコドンを最適化したウンベリラリア・カリフォルニカ（Ｕｍｂｅｌｌｕｌａｒｉａ　ｃａｌｉｆｏｒｎｉｃａ）由来のアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ（ＵｃＴＥ）遺伝子を挿入することで、脂肪酸生産性がさらに向上した改変株を作製した。以下に改変株の作製手順を詳細に説明する。

[0071] 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２記載のプライマーｓｌｒ１６０９ｆ－Ｆ及びｓｌｒ１６０９ｒ－Ｒを用いてｓｌｒ１６０９遺伝子の部分断片（２０４９ｂｐ）を増幅し、ｐＵＣ１１８プラスミド（タカラバイオ株式会社）のＨｉｎｃＩＩサイト間にクローニングし、ｐＵＣ１１８－ｓｌｒ１６０９プラスミドを取得した。

[0072] ｐＤＧ１７２６プラスミド（Ｇｕｅｒｏｕｔ－Ｆｌｅｕｒｙ　ｅｔ　ａｌ．，Ｇｅｎｅ，１９９５，１６７：３３５－３３６）を鋳型として、表２記載のプライマーｓｌｒ１６０９／ｓｐ－Ｆ及びｓｌｒ１６０９／ｓｐ－Ｒを用いたＰＣＲにより、スペクチノマイシン耐性マーカー遺伝子断片（ｓｐ断片：配列番号２１）を取得した。次に、上記ｐＵＣ１１８－ｓｌｒ１６０９プラスミドを鋳型として、表２記載のプライマーｓｌｒ１６０９ｆ－Ｒ及びｓｌｒ１６０９ｒ－Ｆを用いたＰＣＲにより、ｓｌｒ１６０９遺伝子コード

領域間の２４２ｂｐ領域が削除された直鎖ＤＮＡ断片を取得し、該断片とｓｐ断片をＩｎ－Ｆｕｓｉｏｎ（登録商標）ＰＣＲクローニング法（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）を用いて結合し、間にｓｐ断片が挿入されたｓｌｒ１６０９遺伝子コード領域のＤＮＡ配列を含むｐＵＣ１１８－ｓｌｒ１６０９：：ｓｐプラスミドを得た。

[0073] 上記ｐＵＣ１１８－ｓｌｒ１６０９：：ｓｐプラスミドを鋳型とし、表２記載のプライマーｓｌｒ１６０９ｆ－Ｒ及びＳｐ－Ｆを用いたＰＣＲにより、該プラスミドを線状化した。表２記載のプライマーｓｌｒ１６０９／ｐｓｂＡ２－Ｆ及びｐｓｂＡ２／ＵｃＴＥ－Ｒを用いてシネコシスティス・エスピーＰＣＣ６８０３由来ｐｓｂＡ２遺伝子のプロモーター領域断片（配列番号２２）をＰＣＲ増幅した。ウンベリラリア・カリフォルニカ由来のアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ（ＵｃＴＥ）遺伝子断片（ＵｃＴＥ断片：配列番号２）は、非特許文献４に記載されているシネコシスティス・エスピーＰＣＣ６８０３にあわせてコドンを最適化した配列を人工合成により作製し、これを表２記載のプライマーＵｃＴＥ－Ｆ及びＵｃＴＥ／ｓｐ－Ｒを用いてＰＣＲ増幅することで作製した。次いで、上記線状化したプラスミドに、上記ｐｓｂＡ２のプロモーター領域断片、及びＵｃＴＥ断片を加えてＩｎ－Ｆｕｓｉｏｎ（登録商標）ＰＣＲクローニング法（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）によりクローニングし、ｓｌｒ１６０９遺伝子コード領域間にｐｓｂＡ２プロモーター領域断片、ＵｃＴＥ断片、及びｓｐ断片の順序に並んで挿入されたｐＵＣ１１８－ｓｌｒ１６０９：：ｐｓｂＡ２－ＵｃＴＥ－ｓｐプラスミドを得た。

[0074] 上記で得たｐＵＣ１１８－ｓｌｒ１６０９：：ｓｐプラスミドでシネコシスティス・エスピーＰＣＣ６８０３野生株を形質転換し、スペクチノマイシン耐性により選抜することで、ゲノム上のアシル－ＡＣＰシンテターゼ遺伝子ｓｌｒ１６０９を不活性化させたΔｓｌｒ１６０９：：ｓｐ株を取得した。

[0075] 上記で得たｐＵＣ１１８－ｓｌｒ１６０９：：ｐｓｂＡ２－ＵｃＴＥ－ｓ

ｐプラスミドで別のシネコシスティス・エスピーＰＣＣ６８０３野生株を形質転換し、スペクチノマイシン耐性により選抜することで、ゲノム上のアシル－ＡＣＰシンテターゼｓｌｒ１６０９遺伝子コード領域間にコドンを最適化したアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ（ＵｃＴＥ）遺伝子を導入することにより、アシル－ＡＣＰシンテターゼ遺伝子ｓｌｒ１６０９が不活性化するとともにアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ発現能が付与されたΔｓｌｒ１６０９：：ＵｃＴＥ株を取得した。

[0076] さらに、ｐＵＣ１１８－ｓｌｒ１６０９：：ｓｐプラスミドで、上記（１）で作製したΔｓｌｌ１６２６株を形質転換し、スペクチノマイシン耐性により選抜することで、ゲノム上のＬｅｘＡの遺伝子ｓｌｌ１６２６及びアシル－ＡＣＰシンテターゼ遺伝子ｓｌｒ１６０９を不活性化させたΔｓｌｌ１６２６Δｓｌｒ１６０９：：ｓｐ株を取得した。

[0077] さらに、ｐＵＣ１１８－ｓｌｒ１６０９：：ｐｓｂＡ２－ＵｃＴＥ－ｓｐプラスミドで別の上記（１）で作製したΔｓｌｌ１６２６株を形質転換し、スペクチノマイシン耐性により選抜することで、ゲノム上のＬｅｘＡの遺伝子ｓｌｌ１６２６が不活性化し、さらにアシル－ＡＣＰシンテターゼｓｌｒ１６０９遺伝子コード領域間にコドンを最適化したアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ（ＵｃＴＥ）遺伝子を導入することにより、アシル－ＡＣＰシンテターゼ遺伝子ｓｌｒ１６０９が不活性化するとともにアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ発現能が付与されたΔｓｌｌ１６２６Δｓｌｒ１６０９：：ＵｃＴＥ株を取得した。

[0078]

[表2]

プライマー	配列	配列番号
slr1609f-F	5′-ATGGCGCTCAATCCAGGATAAAG-3′	7
slr1609r-R	5′-AAGTTTGGGTTACCACTGGTCG-3′	8
slr1609f-R	5′-TTTCTAGGGAGTGCCAACAGG-3′	9
slr1609r-F	5′-AACCTGAGCTTGAACCATCTCC-3′	10
slr1609/sp-F	5′-GGCACTCCCTAGAAAATCGATTTTCGTTCGTG-3′	11
slr1609/sp-R	5′-GTTCAAGCTCAGGTTCATATGCAAGGGTTTATTG-3′	12
slr1609-R	5′-AACCTGAGCTTGAACCATCTCC-3′	13
Sp-F	5′-ATCGATTTTCGTTCGTG-3′	14
slr1609/psbA2-F	5′-GGCACTCCCTAGAAAATTATTTCATCTCCATTGTCCC-3′	15
psbA2/UcTE-R	5′-TAGGAATTATAACCATAGGTTATAATTCCTTATGTATTTG-3′	16
UcTE-F	5′-ATGGCTACCACCTCTTTAGCTTC-3′	17
UcTE/sp-R	5′-GAACGAAAATCGATTTACACGCGCGGTTCGGCGG-3′	18

[0079] 実施例２　シアノバクテリア改変株における脂肪酸分泌生産性向上

（１）改変株の培養

実施例１で製造したシアノバクテリア改変株を培養し、脂肪酸分泌生産性を調べた。シアノバクテリアの培養は、ＯＤ７３０＝０．２を初発菌体濃度として、５０ｍＬ三角フラスコに加えた２５ｍＬのＢＧ－１１培地中で、一定の照明下（６０μＥ・m^{-2}・sec^{-1}）、３０℃で、ロータリーシェーカー（１２０ｒｐｍ）を用いて行った。この条件で、Δｓｌｒ１６０９：：ｓｐ株、Δｓｌｌ１６２６Δｓｌｒ１６０９：：ｓｐ株、Δｓｌｒ１６０９：：ＵｃＴＥ株、及びΔｓｌｌ１６２６Δｓｌｒ１６０９：：ＵｃＴＥ株をそれぞれ２週間培養した。

[0080] （２）脂肪酸組成分析

培養終了後、培養液５０ｍＬに１ｇ　$NaHPO_4$、及び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）を５０μＬ添加した。この液に対してヘキサン１０ｍＬを添加し、十分に攪拌した後に１０分

間静置した。室温、２５００ｒｐｍで１０分間遠心分離を行った後、上層部分をナス型フラスコに採取し、減圧濃縮を行った。遠心分離した下層にさらにヘキサン５ｍＬを添加して攪拌し、遠心分離する操作を２回繰り返し、乾燥サンプルを得た。乾燥したサンプルに５％塩酸メタノール溶液を３ｍＬ添加し、８０℃で３時間恒温処理することにより、脂肪酸のメチルエステル化処理を行った。その後、ヘキサン３ｍＬを添加し、十分に攪拌した後に５分間静置した。上層部分を採取し、適宜濃縮を実施し、ガスクロマトグラフィー解析に供した。測定条件を以下に示す。［キャピラリーカラム：ＤＢ－１　ＭＳ　３０ｍ×２００μｍ×０．２５μｍ（Ｊ＆Ｗ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、移動相：高純度ヘリウム、カラム内流量：１．０ｍＬ／分、昇温プログラム：１００℃（１分間）→１０℃／分→３００℃（５分間）、平衡化時間：１分間、注入口：スプリット注入（スプリット比：１００：１），圧力１４．４９ｐｓｉ，１０４ｍＬ／分、注入量１μＬ、洗浄バイアル：メタノール・クロロホルム、検出器温度：３００℃］

[0081] ガスクロマトグラフィー解析により得られた波形データのピーク面積より、各脂肪酸のメチルエステル量を定量した。なお、測定した各ピーク面積を内部標準である７－ペンタデカノンのピーク面積と比較することで試料間の補正を行った。培養液１リットルあたりに含まれる各脂肪酸の量及びその合計量を算出した。

[0082] 結果を図２、３、及び表３に示す。なお、図２、３及び表３の値は、独立した３回の培養とクロマトグラフィー解析の結果の平均値である。図２から明らかなように、ＬｅｘＡの遺伝子ｓｌｌ１６２６とアシルＡＣＰシンテターゼの遺伝子ｓｌｒ１６０９を破壊したΔｓｌｌ１６２６Δｓｌｌ１６０９：：ｓｐ株では、ＬｅｘＡの遺伝子を破壊していないΔｓｌｒ１６０９：：ｓｐ株と比べて、各遊離脂肪酸生産量が増加し、総遊離脂肪酸量も大幅に増加した。また図３から明らかなように、ＬｅｘＡの遺伝子ｓｌｌ１６２６とアシルＡＣＰシンテターゼの遺伝子ｓｌｒ１６０９を破壊し、チオエステラーゼＵｃＴＥの遺伝子を導入したΔｓｌｌ１６２６Δｓｌｌ１６０９：：Ｕ

ｃＴＥ株では、ＬｅｘＡの遺伝子を破壊していないΔｓｌｒ１６０９：：ＵｃＴＥ株と比べて、各遊離脂肪酸及び総遊離脂肪酸生産量が大幅に増加した。具体的には、表３に示すとおり、培養２週間で、Δｓｌｌ１６２６Δｓｌｌ１６０９：：ｓｐ株は、Δｓｌｒ１６０９：：ｓｐ株に比べて２．９２倍の総脂肪酸生産量を示し、Δｓｌｌ１６２６Δｓｌｌ１６０９：：ＵｃＴＥ株は、Δｓｌｒ１６０９：：ＵｃＴＥ株に比べて１．４１倍の総脂肪酸生産量を示した。さらに、チオエステラーゼＵｃＴＥを導入したΔｓｌｌ１６２６Δｓｌｌ１６０９：：ＵｃＴＥ株では、アシル－ＡＣＰチオエステラーゼ遺伝子を導入していないΔｓｌｌ１６２６Δｓｌｌ１６０９：：ｓｐ株に比べて、脂肪酸生産量が１．８４倍に増加した。また、ＵｃＴＥ遺伝子導入株では、ＵｃＴＥ遺伝子非導入株と比べて、Ｃ１２脂肪酸の生産量が大きく増加した。

[0083] [表3]

改変株	遊離脂肪酸生産量 [mg/L; Mean±SD]				
	C12	C14	C16	C18	Total
Δslr1609::sp	0.00 ±0.00	0.04 ±0.08	2.90 ±0.82	6.09 ±1.23	9.03 ±1.96
Δsll1626Δsll1609::sp (vs. Δslr1609::sp)	0.00 ±0.00	0.47 ±0.22	7.18 ±2.99	18.70 ±3.69	26.35 ±6.28 (291.8%)
Δslr1609::UcTE	11.34 ±0.96	2.00 ±0.22	6.97 ±0.89	14.20 ±2.00	34.52 ±3.89
Δsll1626Δsll1609::UcTE (vs. Δslr1609::UcTE) (vs. Δsll1626Δsll1609::sp)	14.91 ±0.52	1.93 ±0.36	11.14 ±1.13	20.54 ±2.87	48.53 ±3.24 (140.6%) (184.1%)

請求の範囲

[請求項1] シアノバクテリアにおけるＬｅｘＡ型転写制御因子と、アシル－ＡＣＰシンテターゼとを機能喪失させることを含む、改変シアノバクテリアの製造方法。

[請求項2] シアノバクテリアにおけるＬｅｘＡ型転写制御因子をコードする遺伝子と、アシル－ＡＣＰシンテターゼをコードする遺伝子とを欠失又は不活性化することを含む、請求項１記載の方法。

[請求項3] 前記ＬｅｘＡ型転写制御因子をコードする遺伝子がｓｌｌ１６２６、ＳＹＮＰＣＣ７００２＿Ａ１８４９、ＳＹＮＷ１５８２、ａｌｒ４９０８及びａｌｌ３２７２からなる群より選択される遺伝子である、請求項２記載の方法。

[請求項4] 前記アシル－ＡＣＰシンテターゼをコードする遺伝子がｓｌｒ１６０９、ＳＹＮＰＣＣ７００２＿Ａ０６７５、ＳＹＮＷ０６６９及びａｌｒ３６０２からなる群より選択される遺伝子である、請求項２又は３記載の方法。

[請求項5] さらにアシル－ＡＣＰチオエステラーゼをコードする異種遺伝子を導入することを含む、請求項１～４のいずれか１項記載の方法。

[請求項6] 前記アシル－ＡＣＰチオエステラーゼをコードする遺伝子が、配列番号１で示されるアミノ酸配列又はこれと９０％以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする遺伝子である、請求項５記載の方法。

[請求項7] 前記アシル－ＡＣＰチオエステラーゼをコードする遺伝子が、前記アシル－ＡＣＰシンテターゼをコードする遺伝子の領域に導入される、請求項５又は６記載の方法。

[請求項8] 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、又はアナベナ属に属する、請求項１～７のいずれか１項記載の方法。

[請求項9] シアノバクテリアにおけるＬｅｘＡ型転写制御因子と、アシル－Ａ

ＣＰシンテターゼとを機能喪失させることを含む、シアノバクテリアの脂肪酸分泌生産性の向上方法。

[請求項10] シアノバクテリアにおけるＬｅｘＡ型転写制御因子をコードする遺伝子と、アシル－ＡＣＰシンテターゼをコードする遺伝子とを欠失又は不活性化することを含む、請求項９記載の方法。

[請求項11] 前記ＬｅｘＡ型転写制御因子をコードする遺伝子がｓｌｌ１６２６、ＳＹＮＰＣＣ７００２＿Ａ１８４９、ＳＹＮＷ１５８２、ａｌｒ４９０８及びａｌｌ３２７２からなる群より選択される遺伝子である、請求項１０記載の方法。

[請求項12] 前記アシル－ＡＣＰシンテターゼをコードする遺伝子がｓｌｒ１６０９、ＳＹＮＰＣＣ７００２＿Ａ０６７５、ＳＹＮＷ０６６９及びａｌｒ３６０２からなる群より選択される遺伝子である、請求項１０又は１１記載の方法。

[請求項13] さらにアシル－ＡＣＰチオエステラーゼをコードする異種遺伝子を導入することを含む、請求項９～１２のいずれか１項記載の方法。

[請求項14] 前記アシル－ＡＣＰチオエステラーゼをコードする遺伝子が、配列番号１で示されるアミノ酸配列又はこれと９０％以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする遺伝子である、請求項１３記載の方法。

[請求項15] 前記アシル－ＡＣＰチオエステラーゼをコードする遺伝子が、前記アシル－ＡＣＰシンテターゼをコードする遺伝子の領域に導入される、請求項１３又は１４記載の方法。

[請求項16] 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、又はアナベナ属に属する、請求項９～１５のいずれか１項記載の方法。

[請求項17] ＬｅｘＡ型転写制御因子と、アシル－ＡＣＰシンテターゼとが機能喪失した改変シアノバクテリア。

[請求項18] ＬｅｘＡ型転写制御因子をコードする遺伝子と、アシル－ＡＣＰシ

ンテターゼをコードする遺伝子とが欠失又は不活性化されている、請求項１７記載の改変シアノバクテリア。

[請求項19] 前記ＬｅｘＡ型転写制御因子をコードする遺伝子がｓｌｌ１６２６、ＳＹＮＰＣＣ７００２＿Ａ１８４９、ＳＹＮＷ１５８２、ａｌｒ４９０８及びａｌｌ３２７２からなる群より選択される遺伝子である、請求項１８記載の改変シアノバクテリア。

[請求項20] 前記アシル－ＡＣＰシンテターゼをコードする遺伝子がｓｌｒ１６０９、ＳＹＮＰＣＣ７００２＿Ａ０６７５、ＳＹＮＷ０６６９及びａｌｒ３６０２からなる群より選択される遺伝子である、請求項１８又は１９記載の改変シアノバクテリア。

[請求項21] さらにアシル－ＡＣＰチオエステラーゼをコードする異種遺伝子を含む、請求項１７～２０のいずれか１項記載の改変シアノバクテリア。

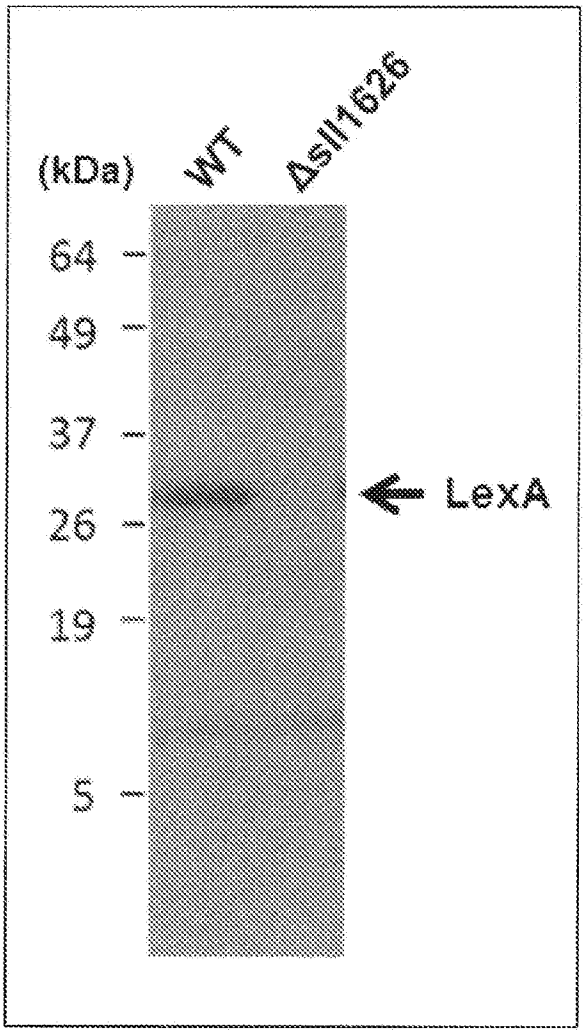
[請求項22] 前記アシル－ＡＣＰチオエステラーゼをコードする遺伝子が、配列番号１で示されるアミノ酸配列又はこれと９０％以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする遺伝子である、請求項２１記載の改変シアノバクテリア。

[請求項23] 前記アシル－ＡＣＰチオエステラーゼをコードする遺伝子が、前記アシル－ＡＣＰシンテターゼをコードする遺伝子の領域に導入されている、請求項２１又は２２記載の改変シアノバクテリア。

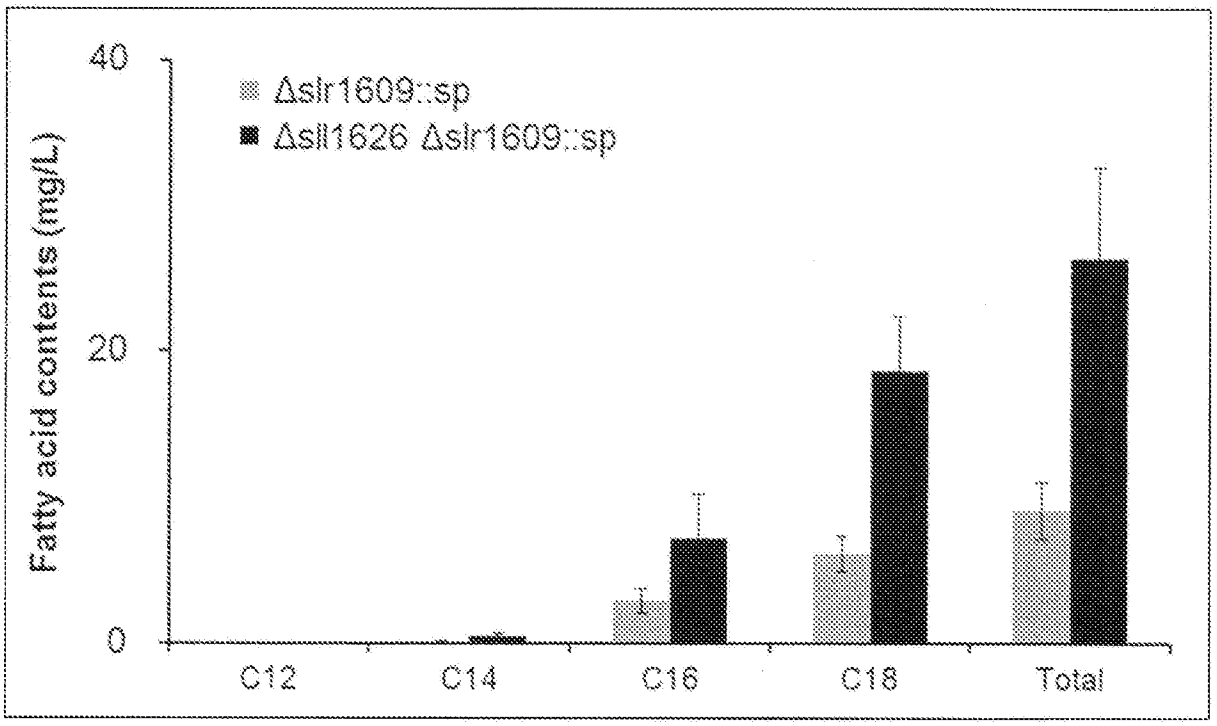
[請求項24] シネコシスティス属、シネココッカス属、又はアナベナ属に属する、請求項１７～２３のいずれか１項記載の改変シアノバクテリア。

[請求項25] 請求項１～８のいずれか１項記載の方法で製造された改変シアノバクテリア、又は請求項１７～２４のいずれか１項記載の改変シアノバクテリアを培養することを含む、脂肪酸生産方法。

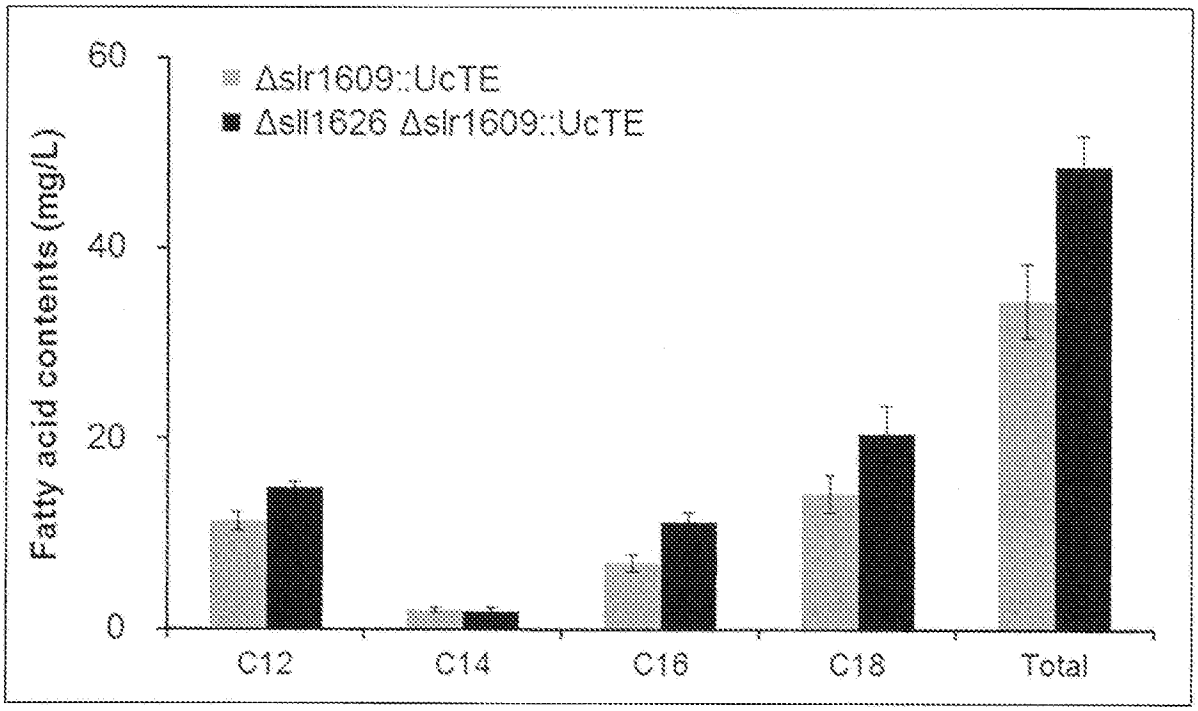
[図1]


(kDa)
WT
Δsll1626
64
49
37
26
19
5
LexA

[図2]


Δslr1609::sp
Δsll1626 Δslr1609::sp
Fatty acid contents (mg/L)
40
20
0
C12
C14
C16
C18
Total

[図3]


60
40
20
0
Fatty acid contents (mg/L)
Δslr1609::UcTE
Δsll1626 Δslr1609::UcTE
C12
C14
C16
C18
Total

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2015/085669

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N1/21(2006.01)i, *C12N9/16*(2006.01)i, *C12N15/09*(2006.01)i, *C12P7/64*(2006.01)i

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)
C12N1/21, C12N9/16, C12N15/09, C12P7/64

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2016 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2016

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq, SwissProt/GeneSeq, JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2011-505838 A (Synthetic Genomics, Inc.), 03 March 2011 (03.03.2011), claim 8 & US 2009/0298143 A1 claim 8 & WO 2009/076559 A1 & EP 2231864 A1	1-25
Y	KAMEI A. et al., Functional analysis of LexA-like gene sll1626 in Synechocystis sp. PCC 6803 using DNA microarray, Plant and Cell Physiology, 2001, Vol. 42, No. Supplement, p. s95, entire text	1-25
A	JP 2011-229482 A (Saitama University), 17 November 2011 (17.11.2011), (Family: none)	1-25

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* 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	Date of mailing of the international search report
15 March 2016 (15.03.16)	29 March 2016 (29.03.16)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3,Kasumigaseki,Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915,Japan	Authorized officer Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１５／０８５６６９

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N1/21(2006.01)i, C12N9/16(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12P7/64(2006.01)i

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N1/21, C12N9/16, C12N15/09, C12P7/64

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報　１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報　１９７１－２０１６年
日本国実用新案登録公報　１９９６－２０１６年
日本国登録実用新案公報　１９９４－２０１６年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq, SwissProt/GeneSeq
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
Y	JP 2011-505838 A (シンセティック　ジェノミクス　インコーポレーテッド) 2011.03.03, 請求項８ & US 2009/0298143 A1 claim 8 & WO 2009/076559 A1 & EP 2231864 A1	1-25
Y	KAMEI A. et al., Functional analysis of LexA-like gene sll1626 in Synechocystis sp. PCC 6803 using DNA microarray, Plant and Cell Physiology, 2001, Vol. 42, No. Supplement, p. s95, 全文	1-25

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。　　☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
１５．０３．２０１６	２９．０３．２０１６

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
郵便番号１００－８９１５
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｎ　３５３９
福間　信子
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４８８

C（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
A	JP 2011-229482 A (国立大学法人埼玉大学) 2011.11.17, (ファミリーなし)	1-25