

(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
2015 年 9 月 11 日(11.09.2015)



(10) 国際公開番号
WO 2015/133305 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 15/00 (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)
C12N 1/13 (2006.01) *C12N 9/18* (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01) *C12N 9/88* (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01) *C12P 7/64* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2015/054960

(22) 国際出願日: 2015 年 2 月 23 日(23.02.2015)

(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 2014-040536 2014 年 3 月 3 日(03.03.2014) 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 1 4 番 1 0 号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 杉原 慎二 (SUGIHARA, Shinji); 〒6408580 和歌山県和歌山市湊 1 3 3 4 花王株式会社研究所内 Wakayama (JP). 尾崎 達郎 (OZAKI, Tatsuro); 〒6408580 和歌山県和歌山市湊 1 3 3 4 花王株式会社研究所内 Wakayama (JP). 遠藤 寛子 (ENDO, Hiroko); 〒6408580 和歌山県和歌山市湊 1 3 3 4 花王株式会社研究所内 Wakayama (JP). 斎藤 猛 (SAITO, Takeshi); 〒6408580 和歌山県和歌山市湊 1 3 3 4 花王株式会社研究所内 Wakayama (JP). 東條 卓人 (TOJO, Takuto); 〒6408580 和歌山県和歌山市湊 1 3 3 4 花王株式会社研究所内 Wakayama (JP). 太田 啓之 (OHTA, Hiroyuki); 〒2268501 神奈川県横浜市緑区長津田町 4 2 5 9 国立大学法人東京工業大学内 Kanagawa (JP). 堀 孝一 (HORI, Koichi); 〒

2268501 神奈川県横浜市緑区長津田町 4 2 5 9 国立大学法人東京工業大学内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 飯田 敏三, 外 (IIDA, Toshizo et al.); 〒1050004 東京都港区新橋 3 丁目 1 番 1 0 号 石井ビル 3 階 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), ユーロパ (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))

(54) Title: LIPID PRODUCTION METHOD USING β -KETOACYL-APC SYNTHASE

(54) 発明の名称: β -ケトアシル-ACP シンターゼを用いた脂質の製造方法

(57) Abstract: A lipid production method that includes steps (1) and (2) and a transformant that is obtained by introducing into a host a gene that codes for protein (a) or (b). (1) A step for obtaining the transformant by introducing into the host a gene that codes for protein (a) or (b). (2) A step for collecting lipids from the obtained transformant. (a) A protein that comprises an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1. (b) A protein that has β -ketoacyl-apc synthase activity and that comprises an amino acid sequence that has 60% or more identity with the amino acid sequence of protein (a).

(57) 要約: 下記 (1) 及び (2) の工程を含む脂質の製造方法、及び宿主に下記 (a) 又は (b) のタンパク質をコードする遺伝子を導入して得られる形質転換体。 (1) 宿主に下記 (a) 又は (b) のタンパク質をコードする遺伝子を導入して形質転換体を得る工程。 (2) 得られた形質転換体から脂質を採取する工程。 (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) (a) のタンパク質のアミノ酸配列と 60% 以上の同一性を有する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



WO 2015/133305 A1

明 細 書

発明の名称：

β －ケトアシル－ACPシンターゼを用いた脂質の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、 β －ケトアシル－ACPシンターゼ及びこれを用いた脂質の製造方法に関する。

背景技術

[0002] 脂肪酸は脂質の主要構成成分の1つであり、生体内においてグリセリンとエステル結合をしてトリアシルグリセロール等の脂質を構成し、多くの動植物においてエネルギー源として貯蔵され利用される物質である。動植物内に蓄えられた脂肪酸や脂質（油脂）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、また、ポリオキシアルキレンアルキルエーテルやアルキルポリグリコシド等是非イオン性界面活性剤として、いずれも洗浄剤又は殺菌剤として利用されている。同じく高級アルコールの誘導体としてアルキルアミン塩やモノ又はジアルキル4級アミン塩等のカチオン性界面活性剤は、繊維処理剤や毛髪リンス剤又は殺菌剤として、ベンザルコニウム型4級アンモニウム塩は殺菌剤や防腐剤として日常的に利用されている。また、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。

[0003] 植物の脂肪酸合成経路は葉緑体に局在し、アセチル－ACP（acyl-carrier-protein）からスタートして炭素鎖の伸長反応を繰り返して、最終的に炭素数16又は18のアシル－ACPが合成される。 β －ケトアシル－ACPシンターゼ（ β -Ketoacyl-acyl-carrier-protein synthase：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、植物では、KA

S I、KAS II、KAS III、KAS IV、の4種が存在することが知られている。KAS I～IVはそれぞれ機能が異なり、KAS IIIは鎖長伸長反応の開始段階で働き、炭素数2のアセチル-ACPを炭素数4のアシル-ACP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は主に炭素数16のパルミトイル-ACPまでの伸長反応に関与し、KAS IIは主に炭素数18のステアロイル-ACPまでの伸長反応に関与する。一方、KAS IVは炭素数6～14の中鎖アシル-ACPの伸長反応に関与するといわれている。KAS IVについては、植物でもあまり知見が得られておらず、クフェアなどの中鎖脂肪酸を蓄積する植物に特有のKASとされている（特許文献1、非特許文献1）。

[0004] 近年、バイオ燃料生産に有用であるとして、藻類が注目を集めている。藻類は、バイオディーゼル燃料として利用可能な脂質を光合成によって生産でき、しかも食料と競合しないことから、次世代のバイオマス資源として注目されている。また、藻類は、植物に比べ、高い脂質生産・蓄積能力を有するとの報告もある。藻類の脂質合成メカニズムやそれを応用した生産技術について研究が始まってはいるが、未解明な部分も多い。現在のところ、藻類の β -ケトアシル-ACPシンターゼに関する報告はほとんどなく、特にKAS IVについて藻類由来のものは報告されていない。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：国際公開第98／46776号

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Dehesh K, Edwards P, Fillatti J, Slabaugh M, Byrne J., “KAS IV: A 3-ketoacyl-ACP synthase from *Cuphea* sp. is a medium chain specific condensing enzyme”, *The Plant Journal*. 1998 ; 15(3), p.383-390.

発明の概要

[0007] 本発明は、下記（１）及び（２）の工程を含む脂質の製造方法（以下、「本発明の製造方法」ともいう。）に関する。

（１）宿主に下記（ａ）又は（ｂ）のタンパク質をコードする遺伝子を導入して形質転換体を得る工程

（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）（ａ）のタンパク質のアミノ酸配列と６０％以上の同一性を有する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

（２）得られた形質転換体から脂質を採取する工程

[0008] また、本発明は、宿主に前記（ａ）又は（ｂ）のタンパク質をコードする遺伝子を導入して得られる形質転換体（以下、「本発明の形質転換体」ともいう。）に関する。

[0009] また、本発明は、下記（ａ）又は（ｃ）のタンパク質（以下、「本発明のβ-ケトアシル-ACPシンターゼ」ともいう。）、及び当該タンパク質をコードする遺伝子（以下、「本発明のβ-ケトアシル-ACPシンターゼ遺伝子」ともいう。）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

（ｃ）（ａ）のタンパク質のアミノ酸配列と９１％以上の同一性を有する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

[0010] 本発明の上記及び他の特徴及び利点は、適宜添付の図面を参照して、下記の記載からより明らかになるであろう。

図面の簡単な説明

[0011] [図１]NoKASIV遺伝子導入株における、脂質中の脂肪酸組成を示す図である。

[図２]NoKASIV遺伝子及びCTE遺伝子導入株における、脂質中の脂肪酸組成を示す図である。

[図３]NoKASIV遺伝子及びNoTE遺伝子導入株における、脂質中の脂肪酸組成を

示す図である。

[図4]セルレニン添加培地で培養したNoKASIV遺伝子及びNoTE遺伝子導入株における、脂質中の脂肪酸組成を示す図である。

[図5]NoKASIV遺伝子及びBTE遺伝子導入株における、脂質中の脂肪酸組成を示す図である。

[図6]セルレニン添加培地で培養したNoKASIV遺伝子及びBTE遺伝子導入株における、脂質中の脂肪酸組成を示す図である。

[図7]NgKASIV遺伝子導入株における、脂質中の脂肪酸組成を示す図である。

[図8]NgKASIV遺伝子及びCTE遺伝子導入株における、脂質中の脂肪酸組成を示す図である。

[図9]NgKASIV遺伝子及びNoTE遺伝子導入株における、脂質中の脂肪酸組成を示す図である。

[図10]EKASI遺伝子導入株及びEKASII遺伝子導入株における、脂質中の脂肪酸組成を示す図である。

[図11]EKASI遺伝子及びNoTE遺伝子導入株、EKASII遺伝子及びNoTE遺伝子導入株における、脂質中の脂肪酸組成を示す図である。

[図12]NoKASIORII遺伝子導入株における、脂質中の脂肪酸組成を示す図である。

[図13]NoKASIORII遺伝子及びCTE遺伝子導入株における、脂質中の脂肪酸組成を示す図である。

[図14]NoKASIORII遺伝子及びNoTE遺伝子導入株における、脂質中の脂肪酸組成を示す図である。

[図15]ClKASIV遺伝子及びBTE遺伝子導入株、NoKASIV遺伝子及びBTE遺伝子導入株における、脂質中の脂肪酸組成を示す図である。

[図16]NoKASIV遺伝子及びCTE遺伝子導入株における、脂質中の脂肪酸組成を示す図である。

発明を実施するための形態

[0012] 本発明は、藻類由来の β -ケトアシル-CoAシンターゼを用いた脂質の

製造方法を提供することを課題とする。また、本発明は、藻類由来の新たな β -ケトアシル-ACPシンターゼを提供に関する。

[0013] 本発明者らは、藻類由来の β -ケトアシル-ACPシンターゼについて研究を行い、ナンノクロロプシス (*Nannochloropsis*) 属に属する藻類から、複数の β -ケトアシル-ACPシンターゼを同定した。そして、これらを用いて宿主を形質転換したところ、形質転換体では中鎖脂肪酸の生産性が有意に向上することを見出した。本発明はこれらの知見に基づいて完成するに至ったものである。

[0014] 本発明の形質転換体は、脂質、特に中鎖脂肪酸の生産能に優れる。そのため、当該形質転換体を用いた本発明の製造方法は、中鎖脂肪酸及びこれらを構成成分とする脂質の生産性に優れる。また、本発明の β -ケトアシル-ACPシンターゼ及びこれをコードする遺伝子は、中鎖アシル-ACPを合成することができる。

本発明の β -ケトアシル-ACPシンターゼ、これをコードする遺伝子、形質転換体、及び製造方法は、脂質、特に脂肪酸の工業的生産に好適に用いることができる。

[0015] 以下、 β -ケトアシル-ACPシンターゼ、これを用いた形質転換体、及び脂質の製造方法について順に説明する。

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

[0016] 1. β -ケトアシル-ACPシンターゼ

本発明の製造方法には、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をコードする遺伝子、又は、当該タンパク質と機能的に均等なタンパク質をコードする遺伝子を用いる。具体的には、下記(a)又は(b)のタンパク質をコードする遺伝子を用いる。

(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) (a)のタンパク質のアミノ酸配列と60%以上の同一性を有するア

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

[0017] 配列番号1のアミノ酸配列からなるタンパク質は、ナンノクロロプシス属に属する藻類であるナンノクロロプシス オキュラータ (Nannochloropsis oculata) 由来の新規 β -ケトアシル-ACPシンターゼである。

β -ケトアシル-ACPシンターゼは、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。植物と同様、藻類の脂肪酸合成経路は葉緑体に局在し、アセチル-ACPからスタートして炭素鎖の伸長反応を繰り返し、最終的に炭素数16又は18のアシル-ACP（脂肪酸残基であるアシル基とアシルキャリアプロテインとからなる複合体）が合成される。次いで、アシル-ACPチオエステラーゼ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とマロニルACPとの縮合反応で、アセトアセチルACPが生成する。この反応を β -ケトアシル-ACPシンターゼが触媒する。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。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、最終的に炭素数16又は18のアシル-ACPが合成される。

[0018] 前記(a)又は(b)のタンパク質は、 β -ケトアシル-ACPシンターゼ活性を有する。本発明において、タンパク質が「 β -ケトアシル-ACPシンターゼ活性を有する」とは、アセチル-ACP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有することをいう。

タンパク質が β -ケトアシル-ACPシンターゼ活性を有することは、例

例えば、大腸菌等の宿主細胞内で機能するプロモーターの下流にタンパク質をコードする遺伝子を連結した融合遺伝子を脂肪酸分解系が欠損した宿主細胞へ導入し、導入した遺伝子が発現する条件で培養して、宿主細胞又は培養液中の脂肪酸組成の変化をガスクロマトグラフィー解析等の方法を用いて分析することにより、確認することができる。

また、大腸菌等の宿主細胞内で機能するプロモーターの下流にタンパク質をコードする遺伝子を連結した融合遺伝子を宿主細胞へ導入し、導入した遺伝子が発現する条件で細胞を培養した後、細胞の破碎液に対し、前述の非特許文献1に記載の方法によって調製した各種アシル-ACPを基質とした鎖長伸長反応を行うことにより確認することができる。

[0019] β -ケトアシル-ACPシンターゼ(KAS)は、アシル-ACPとマロニル-ACPとの縮合反応を触媒し、その基質特異性によってKAS I、KAS II、KAS III、KAS IVに分類される。KAS IIIは、炭素数2のアセチル-ACPを基質とし、炭素数2から4の伸長反応を触媒する。KAS Iは、主に炭素数4から16の伸長反応を触媒し、炭素数16のパルミトイル-ACPを合成する。KAS IIは、主に炭素数16から18の伸長反応を触媒し、炭素数18のステアロイル-ACPを合成する。KAS IVは炭素数6から14の伸長反応を触媒し、中鎖アシル-ACPを合成する。

KAS I~IVは、阻害剤であるセルレニンに対する感受性が異なることが知られている。KAS I及びKAS IIはセルレニンに対して感受性であり、KAS III及びKAS IVはセルレニンに対して非感受性である。

[0020] 前記(a)の β -ケトアシル-ACPシンターゼは、後述の実施例で示されているように、中鎖アシル-ACPに対して特異性を示し、KAS IVであると考えられる。

本発明において「中鎖アシル-ACP特異的」とは、 β -ケトアシル-ACPシンターゼが、主に炭素数4~12のアシル-ACPを基質とし、炭素数

14 までの中鎖アシル A C P 合成の伸長反応を触媒することをいう。以下、中鎖アシルー A C P 特異的な β - ケトアシルー A C P シンターゼを、中鎖特異的 β - ケトアシルー A C P シンターゼともいう。

また、本発明において、中鎖脂肪酸や中鎖アシルー A C P における中鎖とは、アシル基の炭素数が 6 以上 14 以下であることをいう。

β - ケトアシルー A C P シンターゼの中鎖アシルー A C P 特異性については、例えば、大腸菌等の宿主細胞内で機能するプロモーターの下流にタンパク質をコードする遺伝子を連結した融合遺伝子を脂肪酸分解系が欠損した宿主細胞へ導入し、導入した遺伝子が発現する条件で培養して、宿主細胞又は培養液中の脂肪酸組成の変化をガスクロマトグラフィー解析等の方法を用いて分析し、中鎖脂肪酸が増加すること、により確認することができる。また、上記の系に後述する中鎖特異的アシルー A C P チオエステラーゼを共発現することで、中鎖特異的アシルー A C P チオエステラーゼ単独発現時と比較して中鎖脂肪酸が増加すること、により確認することができる。また、大腸菌等の宿主細胞内で機能するプロモーターの下流にタンパク質をコードする遺伝子を連結した融合遺伝子を宿主細胞へ導入し、導入した遺伝子が発現する条件で細胞を培養した後、細胞の破碎液に対し、前述の非特許文献 1 に記載の方法によって中鎖アシルー A C P を基質とした鎖長伸長反応が起こること、により確認することができる。

[0021] 前記 (b) において、 β - ケトアシルー A C P シンターゼ活性の点から、アミノ酸配列の同一性は、70%以上であることが好ましく、80%以上であることがより好ましく、90%以上であることがさらに好ましく、91%以上であることがよりさらに好ましく、95%以上であることが特に好ましい。

本発明においてアミノ酸配列及び塩基配列の同一性は Lipman-Pearson 法 (Science, 227, 1435, (1985)) 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 (ソフトウェア開発) のホモロジー解析 (homology search) 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。

[0022] 前記 (b) のタンパク質としては、下記 (a 1) のタンパク質が挙げられ、好ましい。

(a 1) 配列番号 58 で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質

配列番号 58 のアミノ酸配列からなるタンパク質は、ナンノクロロプシス ガディタナ (*Nannochloropsis gaditana*) 由来の β -ケトアシル-ACP シンターゼである。配列番号 58 のアミノ酸配列は、配列番号 1 のアミノ酸配列と約 90% の同一性を有する。後述の実施例で示されているように、(a 1) の β -ケトアシル-ACP シンターゼも、中鎖アシル-ACP に対して特異性を示し、KAS I V であると考えられる。

[0023] また、前記 (b) のタンパク質としては、前記 (a) のタンパク質のアミノ酸配列に、1 又は数個（好ましくは 1 以上 10 個以下、より好ましくは 1 以上 5 個以下、さらに好ましくは 1 以上 3 個以下）の変異を導入したタンパク質も好ましい。

また、前記 (b) のタンパク質として、前記 (a 1) のタンパク質のアミノ酸配列に、1 又は数個（好ましくは 1 以上 10 個以下、より好ましくは 1 以上 5 個以下、さらに好ましくは 1 以上 3 個以下）の変異を導入したタンパク質も好ましい。

上記変異としては、アミノ酸の欠失、置換、挿入又は付加が挙げられる。

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、例えば、部位特異的な変異導入法が挙げられる。具体的な部位特異的な変異の導入方法としては、Splicing overlap extension (SOE) PCR 反応 (Horton et al., Gene 77, 61-68, 1989) を利用した方法、ODA 法 (Hashimoto-Gotoh et al., Gene, 152, 271-276, 1995)、Kunkel 法 (Kunkel, T. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1985, 82, 488) 等が挙げられる。また、Site-Directed Mutagenesis System Mutan-SuperExpress Km キット (タカラバイオ社)、TransformerTM Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) 等が挙げられる。

nesis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（b）のタンパク質は、下記（c）の新規タンパク質を包含する。

（c）（a）のタンパク質のアミノ酸配列と91%以上の同一性を有する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

[0025] 中鎖脂肪酸の生産性向上の観点から、前記（b）又は（c）のタンパク質は、中鎖特異的β-ケトアシル-ACPシンターゼ活性を有するタンパク質であることが好ましい。

[0026] 上述したタンパク質の取得方法については特に制限はなく、通常行われる化学的或いは遺伝子工学的手法等により得ることができる。例えば、ナンノクロロプシス オキュラータから単離、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合成等することもでき、化学合成によりタンパク質合成を行ってもよく、遺伝子組み換え技術により組換えタンパク質を作製してもよい。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 オキュラータ等の藻類は、私的又は公的なバイオ関連の研究所等で保存されているものを購入して使用することができる。例えば、実施例で用いたNannochloropsis oculata NIES-2145株は、国立環境研究所(NIES)で購入することができる。

[0027] 前記（a）又は（b）のタンパク質をコードする遺伝子の一例として、下記（d）又は（e）のDNAからなる遺伝子が挙げられる。

（d）配列番号2で表される塩基配列からなるDNA

（e）（d）のDNAの塩基配列と60%以上の同一性を有する塩基配列からなり、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

[0028] 配列番号1のアミノ酸配列をコードする塩基配列の1つとして、配列番号2の塩基配列が挙げられる。配列番号2の塩基配列からなる遺伝子は、ナンノクロロプシス オキユラータ由来の β -ケトアシル-ACPシンターゼをコードする遺伝子である。

[0029] 前記(e)において、 β -ケトアシル-ACPシンターゼ活性の点から、塩基配列の同一性は65%以上であることが好ましく、70%以上であることがより好ましく、75%以上であることがさらに好ましく、78%以上であることがよりさらに好ましい。より好ましくは、80%以上であり、90%以上がさらに好ましく、95%以上がよりさらに好ましい。なお、塩基配列の同一性の算出方法については、前述した。

[0030] 前記(e)のDNAとして具体的には、下記(d1)のDNAが挙げられ、好ましい。

(d1) 配列番号59で表される塩基配列からなるDNA

配列番号59の塩基配列からなる遺伝子は、ナンノクロロプシス ガディタナ由来の β -ケトアシル-ACPシンターゼ遺伝子である。配列番号59の塩基配列は、配列番号2の塩基配列と約77%の同一性を有する。

[0031] 前記(e)のDNAは、下記(f)の新規DNAを包含する。

(f) (d)のDNAの塩基配列と78%以上の同一性を有する塩基配列からなり、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

[0032] 上述した β -ケトアシル-ACPシンターゼ遺伝子の取得方法としては、特に制限されず、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、 β -ケトアシル-ACPシンターゼ遺伝子を人工合成により取得することができる。遺伝子の人工合成は、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 オキユラータからクローニングによって取得することもでき、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。

[0033] 2. アシルーACPチオエステラーゼ

本発明の形質転換体は、上述の(a)又は(b)のタンパク質をコードする遺伝子と共に、アシルーACPチオエステラーゼをコードする遺伝子を、宿主に導入してなるものであることが好ましい。

アシルーACPチオエステラーゼは、 β -ケトアシルーACPシンターゼ等の脂肪酸合成酵素によって合成されたアシルーACPのチオエステル結合を加水分解し、遊離の脂肪酸を生成する酵素である。アシルーACPチオエステラーゼの作用によって、ACP上での脂肪酸合成が終了し、切り出された脂肪酸はトリアシルグリセロール等の合成に供される。

そのため、宿主に β -ケトアシルーACPシンターゼ遺伝子とアシルーACPチオエステラーゼ遺伝子を共導入することで、形質転換体の脂質生産性、特に脂肪酸の生産性を一層向上させることができる。

[0034] 本発明で用いるアシルーACPチオエステラーゼは、アシルーACPチオエステラーゼ活性を有するタンパク質であればよい。本発明において、「アシルーACPチオエステラーゼ活性を有する」とは、アシルーACPのチオエステル結合を加水分解する活性を有することをいう。

[0035] また、アシルーACPチオエステラーゼは、基質であるアシルーACPを構成するアシル基（脂肪酸残基）の炭素原子数や不飽和結合数によって異なる反応特異性を示す複数のアシルーACPチオエステラーゼが存在していることが知られており、生体内での脂肪酸組成を決める重要なファクターであると考えられている。

上述のように、前記(a)又は(a1)のタンパク質は中鎖特異的 β -ケトアシルーACPシンターゼであるため、共導入するアシルーACPチオエステラーゼも、中鎖アシルーACPに特異的なチオエステラーゼ（以下、「中鎖特異的アシルーACPチオエステラーゼ」ともいう）であることが好ま

しい。中鎖特異的アシルー A C P チオエステラーゼを用いることで、中鎖脂肪酸の生産性を一層向上させることができる。特に、中鎖特異的アシルー A C P チオエステラーゼを元来有していない宿主を形質転換に用いる場合、中鎖特異的アシルー A C P チオエステラーゼの共導入が効果的である。

[0036] 本発明では、アシルー A C P チオエステラーゼとして、公知のアシルー A C P チオエステラーゼや、それらと機能的に均等なタンパク質を用いることができる。用いるアシルー A C P チオエステラーゼは、宿主の種類等に応じて適宜選択することができる。

具体的には、Umbellularia californicaアシルー A C P チオエステラーゼ (GenBank AAA34215.1、配列番号 50、これをコードする遺伝子の塩基配列：配列番号 51)；Cuphea calophylla subsp. mesostemonアシルー A C P チオエステラーゼ (GenBank ABB71581)；Cocos nuciferaアシルー A C P チオエステラーゼ (CnFatB3：Jing et al. BMC Biochemistry 2011, 12:44参照、配列番号 46、これをコードする遺伝子の塩基配列：配列番号 47)；Cinnamomum camphoraアシルー A C P チオエステラーゼ (GenBank AAC49151.1)；Myristica fragransアシルー A C P チオエステラーゼ (GenBank AAB71729)；Myristica fragransアシルー A C P チオエステラーゼ (GenBank AAB71730)；Cuphea lanceolataアシルー A C P チオエステラーゼ (GenBank CAA54060)；Cuphea hookerianaアシルー A C P チオエステラーゼ (GenBank Q39513)；Ulumus americanaアシルー A C P チオエステラーゼ (GenBank AAB71731)；Sorghum bicolorアシルー A C P チオエステラーゼ (GenBank EER87824)；Sorghum bicolorアシルー A C P チオエステラーゼ (GenBank EER88593)；Cocos nuciferaアシルー A C P チオエステラーゼ (CnFatB1：Jing et al. BMC Biochemistry 2011, 12:44参照)；Cocos nuciferaアシルー A C P チオエステラーゼ (CnFatB2：Jing et al. BMC Biochemistry 2011, 12:44参照)；Cuphea viscosissimaアシルー A C P チオエステラーゼ (CvFatB1：Jing et al. BMC Biochemistry 2011, 12:44参照)；Cuphea viscosissimaアシルー A C P チオエステラーゼ (CvFatB2

:Jing et al. BMC Biochemistry 2011, 12:44参照) ; Cuphea viscosissima アシルー A C P チオエステラーゼ (CvFatB3 :Jing et al. BMC Biochemistry 2011, 12:44参照) ; Elaeis guineensis アシルー A C P チオエステラーゼ (GenBank AAD42220) ; Desulfovibrio vulgaris アシルー A C P チオエステラーゼ (GenBank ACL08376) ; Bacteriodes fragilis アシルー A C P チオエステラーゼ (GenBank CAH09236) ; Parabacteriodes distasoni s アシルー A C P チオエステラーゼ (GenBank ABR43801) ; Bacteroides thetaiotaomicron アシルー A C P チオエステラーゼ (GenBank AA077182) ; Clostridium asparagiforme アシルー A C P チオエステラーゼ (GenBank EEG55387) ; Bryanthella formatexigens アシルー A C P チオエステラーゼ (GenBank EET61113) ; Geobacillus sp. アシルー A C P チオエステラーゼ (GenBank EDV77528) ; Streptococcus dysgalactiae アシルー A C P チオエステラーゼ (GenBank BAH81730) ; Lactobacillus brevis アシルー A C P チオエステラーゼ (GenBank ABJ63754) ; Lactobacillus plantarum アシルー A C P チオエステラーゼ (GenBank CAD63310) ; Anaerococcus tetradius アシルー A C P チオエステラーゼ (GenBank EEI82564) ; Bdellovibrio bacteriovorus アシルー A C P チオエステラーゼ (GenBank CAE80300) ; Clostridium thermocellum アシルー A C P チオエステラーゼ (GenBank ABN54268) ; Nannochloropsis oculata アシルー A C P チオエステラーゼ (配列番号 48、これをコードする遺伝子の塩基配列 : 配列番号 49) ; Nannochloropsis gaditana アシルー A C P チオエステラーゼ (配列番号 52、これをコードする遺伝子の塩基配列 : 配列番号 53) ; Nannochloropsis granulata アシルー A C P チオエステラーゼ (配列番号 54、これをコードする遺伝子の塩基配列 : 配列番号 55) ; Symbiodinium microadriaticum アシルー A C P チオエステラーゼ (配列番号 56、これをコードする遺伝子の塩基配列 : 配列番号 57) 、等が挙げられる。

また、これらと機能的に均等なタンパク質として、上述したいずれかのアシルー A C P チオエステラーゼのアミノ酸配列と 50%以上 (好ましくは 7

0%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上)の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつアシルーACPチオエステラーゼ活性を有するタンパク質も用いることができる。

[0037] 上述したアシルーACPチオエステラーゼの中でも、中鎖特異的アシルーACPチオエステラーゼが好ましく、Umbellularia californicaアシルーACPチオエステラーゼ(配列番号50、これをコードする遺伝子の塩基配列:配列番号51)、Cocos nuciferaアシルーACPチオエステラーゼ(配列番号46、これをコードする遺伝子の塩基配列:配列番号47)、Nannochloropsis oculataアシルーACPチオエステラーゼ(配列番号48、これをコードする遺伝子の塩基配列:配列番号49)、Nannochloropsis gaditanaアシルーACPチオエステラーゼ(配列番号52、これをコードする遺伝子の塩基配列:配列番号53)、Nannochloropsis granulataアシルーACPチオエステラーゼ(配列番号54、これをコードする遺伝子の塩基配列:配列番号55)、Symbiodinium microadriaticumアシルーACPチオエステラーゼ(配列番号56、これをコードする遺伝子の塩基配列:配列番号57)、又はこれらのアシルーACPチオエステラーゼのアミノ酸配列と50%以上(好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上)の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ中鎖特異的アシルーACPチオエステラーゼ活性を有するタンパク質が好ましい。

これらのアシルーACPチオエステラーゼ及びそれらをコードする遺伝子の配列情報等は、例えば、国立生物工学情報センター(National Center for Biotechnology Information, NCBI)などから入手することができる。

[0038] タンパク質がアシルーACPチオエステラーゼ活性を有することは、例えば、大腸菌等の宿主細胞内で機能するプロモーターの下流にアシルーACPチオエステラーゼ遺伝子を連結した融合遺伝子を脂肪酸分解系が欠損した宿主細胞へ導入し、導入したアシルーACPチオエステラーゼ遺伝子が発現する条件で培養して、宿主細胞又は培養液中の脂肪酸組成の変化をガスクロマトグラフィー解析等の方法を用いて分析することにより、確認することがで

きる。

また、大腸菌等の宿主細胞内で機能するプロモーターの下流にアシルー A C P チオエステラーゼ遺伝子を連結した融合遺伝子を宿主細胞へ導入し、導入したアシルー A C P チオエステラーゼ遺伝子が発現する条件で細胞を培養した後、細胞の破碎液に対し、Yuanらの方法 (Yuan L, Voelker TA, Hawkins DJ, “Modification of the substrate specificity of an acyl-acyl carrier protein thioesterase by protein engineering”

Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Nov 7;92(23), p.10639-1064

3) によって調製した各種アシルー A C P を基質とした反応を行うことにより、アシルー A C P チオエステラーゼ活性を測定することができる。

[0039] 3. 形質転換体 (組換え体)

本発明の形質転換体は、宿主に前記 (a) 又は (b) のタンパク質をコードする遺伝子を導入して得られる。当該形質転換体では、宿主に比べ、中鎖脂肪酸及びこれを構成成分とする脂質の生産能が有意に向上する。なお、宿主や形質転換体の脂肪酸及び脂質の生産能については、実施例で用いた方法により測定することができる。

[0040] 本発明の形質転換体は、前記 (a) 又は (b) のタンパク質をコードする遺伝子、通常の遺伝子工学的方法によって宿主に導入することで得られる。具体的には、前記 (a) 又は (b) のタンパク質をコードする遺伝子を宿主細胞中で発現させることのできる発現ベクターを調製し、これを宿主細胞に導入して宿主細胞を形質転換させることにより作製できる。

[0041] アシルー A C P チオエステラーゼ、好ましくは中鎖特異的アシルー A C P チオエステラーゼをコードする遺伝子を共導入した形質転換体も、同様にして作製することができる。

[0042] 形質転換体の宿主としては特に限定されず、微生物、植物体、又は動物体を用いることができる。なお、本発明において微生物には藻類や微細藻類が含まれる。製造効率及び得られた脂質の利用性の点から、宿主は微生物又は植物体であることが好ましく、微生物であることがより好ましい。

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

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

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

[0043] 発現ベクターの母体となるベクターとしては、前記 (a) 又は (b) 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可能なベクターであればよい。例えば、導入する宿主の種類に応じたプロモーターやターミネーター等の発現調節領域を有するベクターであって、複製開始点や選択マーカー等を有するベクターを用いることがで

きる。また、プラスミド等の染色体外で自立増殖・複製するベクターであってもよい、染色体内に組み込まれるベクターであってもよい。

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

藻類を宿主とする場合には、例えば、P66 (Chlamydomonas Center)、P-322 (Chlamydomonas Center)、pPha-T1 (Yangmin Gong, Xiaojing Guo, Xia Wan, Zhuo Liang, Mulan Jiang, "Characterization of a novel thioesterase (PtTE) from Phaeodactylum tricornutum", Journal of Basic Microbiology, 2011 December, Volume 51, p.666-672. 参照)、又はpJET1 (コスモ・バイオ社製)が挙げられる。特に、宿主がナンノクロロプシス属に属する藻類の場合は、pPha-T1、又はpJET1が好ましく用いられる。また、宿主がナンノクロロプシス属に属する藻類の場合には、Oliver Kilian, et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Dec 27;108(52), 2011、の文献記載の方法を参考にして、本発明の遺伝子、プロモーター及びターミネーターからなるDNA断片を用いて宿主を形質転換することもできる。このDNA断片としては、例えば、PCR増幅DNA断片や制限酵素切断DNA断片が挙げられる。

植物細胞を宿主とする場合には、例えば、pRI系ベクター (タカラバイオ社製)、pBI系ベクター (クロンテック社製)、又はIN3系ベクター (インプラントイノベーションズ社製)が挙げられる。特に、宿主がシロイヌナズナの

場合は、pRI系ベクター又はpBI系ベクターが好ましく用いられる。

[0044] プロモーターやターミネーター等の発現調節領域や選択マーカの種類も特に限定されず、通常使用されるプロモーターやマーカ等を導入する宿主の種類に応じて適宜選択して用いることができる。

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

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

[0045] 上記ベクターに前記（a）又は（b）のタンパク質をコードする遺伝子を、制限酵素処理やライゲーション等の通常の手法によって組み込むことにより形質転換に用いる発現ベクターを構築することができる。

形質転換方法としては、宿主に目的遺伝子を導入しうる方法であれば特に限定されるものではない。例えば、カルシウムイオンを用いる方法、一般的なコンピテントセル形質転換方法（J. Bacteriol. 93, 1925 (1967)）、プロトプラスト形質転換法（Mol. Gen. Genet. 168, 111 (1979)）、エレクトロポレーション法（FEMS Microbiol. Lett. 55, 135 (1990)）又はLP形質

転換方法 (T. Akamatsu及びJ. Sekiguchi, Archives of Microbiology, 1987, 146, p.353-357 ; T. Akamatsu及びH. Taguchi, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2001, 65, 4, p.823-829) 等を用いることができる。宿主がナンノクロロプシス属に属する藻類の場合、Randor Radakovits, et al., Nature Communications, DOI:10.1038/ncomms1688, 2012、に記載のエレクトロポレーション法を用いて形質転換を行うこともできる。

[0046] 目的遺伝子断片が導入された形質転換体の選択は、選択マーカー等を利用することで行うことができる。例えば、ベクター由来の薬剤耐性遺伝子が、形質転換時に目的DNA断片とともに宿主細胞中に導入された結果、形質転換体が獲得する薬剤耐性を指標に行うことができる。また、ゲノムを鋳型としたPCR法等によって、目的DNA断片の導入を確認することもできる。

[0047] 4. 脂質の製造方法

次いで、上記で得られた形質転換体を用いて脂質を生産する。

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

[0048] 培養又は生育条件は、形質転換体の宿主に応じて適宜選択することができる、その宿主に対して通常用いられる培養又は生育条件を使用できる。

中鎖脂肪酸の生産性を向上させるため、培地はセルレニン含有することが好ましい。上述のように、炭素数16又は18のアシル-ACP合成を触媒するKAS I及びKAS IIはセルレニンにより阻害される。一方、中鎖アシル-ACP合成を触媒するKAS IVは、セルレニン非感受性である。形質転換体をセルレニン含有培地で培養又は生育することで、炭素数16又は18のアシル-ACP合成を減少させ、中鎖アシル-ACPの合成

を増加させることができる。培地中のセルレニン濃度は、生育に悪影響を与えない濃度であることが好ましい。具体的には、 $1\ \mu\text{M}$ 以上が好ましく、 $10\ \mu\text{M}$ 以上がより好ましく、そして $50\ \mu\text{M}$ 以下が好ましく、 $25\ \mu\text{M}$ 以下がより好ましい。また、 $1\sim50\ \mu\text{M}$ が好ましく、 $10\sim50\ \mu\text{M}$ がより好ましく、 $10\sim25\ \mu\text{M}$ がさらに好ましい。

また、脂質の生産効率の点から、培地中に、例えば脂肪酸生合成系に関与する前駆物質としてグリセロール、酢酸、又はマロン酸等を添加してもよい。

[0049] 一例として、大腸菌を宿主として用いた形質転換体の場合、LB培地又はovernight Express Instant TB Medium (Novagen社)で、 $30\sim37^\circ\text{C}$ 、 $0.5\sim1$ 日間培養を行うことが挙げられる。また、シロイヌナズナを宿主として用いた形質転換体の場合、土壌で温度条件 $20\sim25^\circ\text{C}$ 、白色光を連続照射又は明期16時間・暗期8時間等の光条件下で1～2か月間栽培を行うことが挙げられる。

[0050] 形質転換の宿主が藻類の場合、以下の培地及び培養条件を用いることができる。

培地は天然海水又は人工海水をベースにしたものを使用してもよいし、市販の培養培地を使用してもよい。具体的な培地としては、f/2培地、ESM培地、ダイゴIMK培地、L1培地、MNK培地、等を挙げることができる。なかでも、脂質の生産性向上及び栄養成分濃度の観点から、f/2培地、ESM培地、又はダイゴIMK培地が好ましく、f/2培地、又はダイゴIMK培地がより好ましく、f/2培地がさらに好ましい。藻類の生育促進、中鎖脂肪酸の生産性向上のため、培地に、窒素源、リン源、金属塩、ビタミン類、微量金属等を適宜添加することができる。

培地に接種する藻類の量は特に限定されないが、生育性の点から、培地当り1% (vol/vol) 以上が好ましく、そして50% (vol/vol) 以下が好ましく、10% (vol/vol) 以下がより好ましい。また、 $1\sim50\%$ (vol/vol) が好ましく、 $1\sim10\%$ (vol/vol) がより好ましい。培養温度は、藻類の増

殖に悪影響を与えない範囲であれば特に制限されないが、通常、 $5 \sim 40^{\circ}\text{C}$ の範囲である。藻類の生育促進、中鎖脂肪酸の生産性向上、及び生産コストの低減の観点から、 10°C 以上が好ましく、 15°C 以上がより好ましく、そして 35°C 以下が好ましく、 30°C 以下がより好ましい。また、好ましくは $10 \sim 35^{\circ}\text{C}$ であり、より好ましくは $15 \sim 30^{\circ}\text{C}$ である。

また、藻類の培養は、光合成ができるよう光照射下で行うことが好ましい。光照射は、光合成が可能な条件であればよく、人工光でも太陽光でもよい。光照射時の照度としては、藻類の生育促進、中鎖脂肪酸の生産性向上の観点から、 100 ルクス以上が好ましく、 300 ルクス以上がより好ましく、 1000 ルクス以上がさらに好ましく、そして 50000 ルクス以下が好ましく、 10000 ルクス以下がより好ましく、 6000 ルクス以下がさらに好ましい。また、好ましくは $100 \sim 50000$ ルクスの範囲、より好ましくは $300 \sim 10000$ ルクスの範囲、さらに好ましくは $1000 \sim 6000$ ルクスの範囲である。また、光照射の間隔は、特に制限されないが、前記と同様の観点から、明暗周期で行うことが好ましく、 24 時間のうち明期が 8 時間以上が好ましく、 10 時間以上がより好ましく、そして 24 時間以下が好ましく、 18 時間以下がより好ましい。また、明期が好ましくは $8 \sim 24$ 時間、より好ましくは $10 \sim 18$ 時間、さらに好ましくは 12 時間である。

また、藻類の培養は、光合成ができるように二酸化炭素を含む気体の存在下、又は炭酸水素ナトリウムなどの炭酸塩を含む培地で行うことが好ましい。気体中の二酸化炭素の濃度は特に限定されないが、生育促進、中鎖脂肪酸の生産性向上の観点から 0.03% （大気条件と同程度）以上が好ましく、 0.05% 以上がより好ましく、 0.1% 以上がさらに好ましく、 0.3% 以上がよりさらに好ましく、そして 10% 以下が好ましく、 5% 以下がより好ましく、 3% 以下がさらに好ましく、 1% 以下がよりさらに好ましい。また、 $0.03 \sim 10\%$ が好ましく、より好ましくは $0.05 \sim 5\%$ 、さらに好ましくは $0.1 \sim 3\%$ 、よりさらに好ましくは $0.3 \sim 1\%$ である。炭酸

塩の濃度は特に限定されないが、例えば炭酸水素ナトリウムを用いる場合、生育促進、中鎖脂肪酸の生産性向上の観点から0.01質量%以上が好ましく、0.05質量%以上がより好ましく、0.1質量%以上がさらに好ましく、そして5質量%以下が好ましく、2質量%以下がより好ましく、1質量%以下がさらに好ましい。また、0.01～5質量%が好ましく、より好ましくは0.05～2質量%、さらに好ましくは0.1～1質量%である。

培養時間は特に限定されず、脂質を高濃度に蓄積する藻体が高い濃度で増殖できるように、長期間（例えば150日程度）行なってもよい。藻類の生育促進、中鎖脂肪酸の生産性向上、及び生産コストの低減の観点から、培養期間は、3日以上が好ましく、7日以上がより好ましく、そして90日以下が好ましく、30日以下がより好ましい。また、好ましくは3～90日間、より好ましくは3～30日間、さらに好ましくは7～30日間である。なお、培養は、通気攪拌培養、振とう培養又は静置培養のいずれでもよく、通気性の向上の観点から、振とう培養が好ましい。

[0051] 形質転換体において産生された脂質を採取する方法としては、通常生体内の脂質成分等を単離する際に用いられる方法、例えば、前述の培養物、生育物又は形質転換体から、ろ過、遠心分離、細胞の破碎、ゲルろ過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、クロロホルム／メタノール抽出法、ヘキサン抽出法、又はエタノール抽出法等により脂質成分を単離、回収する方法が挙げられる。より大規模な場合は、培養物、生育物又は形質転換体より油分を圧搾又は抽出により回収後、脱ガム、脱酸、脱色、脱蠟、脱臭等の一般的な精製を行い、脂質を得ることができる。このように脂質成分を単離した後、単離した脂質を加水分解することで脂肪酸を得ることができる。脂質成分から脂肪酸を単離する方法としては、例えば、アルカリ溶液中で70℃程度の高温で処理をする方法、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。

[0052] 本発明の製造方法を用いることで、脂質、特に中鎖脂肪酸及びこれを構成成分とする脂質を効率的に生産することができる。

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

[0053] 本発明の製造方法、形質転換体により得られる脂肪酸や脂質は、食用として用いる他、化粧品等の乳化剤、石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。

[0054] 上述した実施形態に関し、本発明はさらに以下の方法、形質転換体、タンパク質を開示する。

[0055] <１> 下記（１）及び（２）の工程を含む脂質の製造方法。

（１）宿主に下記（ａ）又は（ｂ）のタンパク質をコードする遺伝子を導入して形質転換体を得る工程

（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）（ａ）のタンパク質のアミノ酸配列と６０％以上の同一性を有する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

（２）得られた形質転換体から脂質を採取する工程

[0056] <２> 前記（ｂ）のタンパク質が、（ａ）のタンパク質のアミノ酸配列と７０％以上、好ましくは８０％以上、より好ましくは９０％以上、さらに好ましくは９１％以上、よりさらに好ましくは９５％以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつβ-ケトアシル-ACPシンターゼ活性を有する

タンパク質である、＜１＞項記載の製造方法。

＜３＞ 前記脂質が、中鎖脂肪酸又はそのエステルである、＜１＞又は＜２＞項記載の製造方法。

＜４＞ 前記タンパク質が、中鎖アシル－ＡＣＰ特異的な β －ケトアシル－ＡＣＰシンターゼである、＜１＞～＜３＞のいずれか１項記載の製造方法。

＜５＞ 前記工程（１）において、宿主に中鎖アシル－ＡＣＰ特異的なアシル－ＡＣＰチオエステラーゼをコードする遺伝子を共導入する、＜１＞～＜４＞のいずれか１項記載の製造方法。

＜６＞ 前記工程（２）が、セルレニンを含む培地で形質転換体を培養する工程を含む、＜１＞～＜５＞のいずれか１項記載の製造方法。

＜７＞ 前記宿主が微生物又は植物である、＜１＞～＜６＞のいずれか１項記載の製造方法。

＜８＞ 前記微生物が微細藻類である、＜７＞項記載の製造方法。

＜９＞ 前記微細藻類がナンノクロロプシス（Nannochloropsis）属に属する藻類である、＜８＞項記載の製造方法。

＜１０＞ 前記微生物が大腸菌である、＜７＞項記載の製造方法。

[0057] ＜１１＞ 宿主に前記（ａ）又は（ｂ）のタンパク質をコードする遺伝子を導入して得られる形質転換体。

＜１２＞ 宿主に前記（ａ）又は（ｂ）のタンパク質をコードする遺伝子、及び中鎖アシル－ＡＣＰ特異的なアシル－ＡＣＰチオエステラーゼをコードする遺伝子を共導入して得られる、＜１１＞項記載の形質転換体。

＜１３＞ 前記宿主が微生物又は植物である、＜１１＞又は＜１２＞項記載の形質転換体。

＜１４＞ 前記微生物が微細藻類である、＜１３＞項記載の形質転換体。

＜１５＞ 前記微細藻類がナンノクロロプシス（Nannochloropsis）属に属する藻類である、＜１４＞項記載の形質転換体。

＜１６＞ 前記微生物が大腸菌である、＜１３＞項記載の形質転換体。

[0058] ＜１７＞ 下記（ａ）又は（ｃ）のタンパク質。

(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

(c) (a) のタンパク質のアミノ酸配列と91%以上、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 β -ケトアシル-ACPシンターゼ活性を有するタンパク質

[0059] <18> <17>項記載のタンパク質をコードする遺伝子。

<19> 下記(d)又は(f)のDNAからなる遺伝子。

(d) 配列番号2で表される塩基配列からなるDNA

(f) (d) のDNAの塩基配列と78%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上の同一性を有する塩基配列からなり、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

[0060] <20> 宿主に前記(a)又は(b)のタンパク質をコードする遺伝子を導入する工程を含む、脂質中の脂肪酸組成を改変する方法。

<21> 宿主に前記(a)又は(b)のタンパク質をコードする遺伝子を導入して形質転換体を得る工程を含む、脂質の生産性を向上させる方法。

[0061] <22> 脂質を製造するための、<11>~<16>のいずれか1項に記載の形質転換体の使用。

<23> 前記脂質が中鎖脂肪酸又はそのエステルである、<22>項に記載の形質転換体の使用。

実施例

[0062] 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。

[0063] 実施例1 ナンノクロロプシス オキュラータ (*Nannochloropsis oculata*) NIES-2145株由来 β -ケトアシル-ACPシンターゼ (KAS) 遺伝子 (NoKASIV遺伝子) を大腸菌に導入した形質転換体の作製、及び形質転換体による脂肪酸の生産

1. NoKASIV遺伝子導入株

(1) NoKASIV遺伝子の取得、及びNoKASIV遺伝子発現プラスミドの構築

国立環境研究所(NIES)からNannochloropsis oculata NIES-2145株を購入し、使用した。Nannochloropsis oculata NIES-2145株を f / 2 培地 (7 5 m g N a N O ₃、6 m g N a H ₂ P O ₄ · 2 H ₂ O、0. 5 μ g ビタミン B 1 2、0. 5 μ g ビオチン、1 0 0 μ g チアミン、1 0 m g N a ₂ S i O ₃ · 9 H ₂ O、4. 4 m g N a ₂ E D T A · 2 H ₂ O、3. 1 6 m g F e C l ₃ · 6 H ₂ O、1 2 μ g F e C l ₃ · 6 H ₂ O、2 1 μ g Z n S O ₄ · 7 H ₂ O、1 8 0 μ g M n C l ₂ · 4 H ₂ O、7 μ g C u S O ₄ · 5 H ₂ O、7 μ g N a ₂ M o O ₄ · 2 H ₂ O / 人工海水 1 L) で十分培養し、5 0 m l の f / 2 培地に 1 0 % 植菌し、2 5 ° C、二酸化炭素 0. 3 % で人工気象機にて 6 日間培養した。培養後に回収したサンプルをマルチビーズショッカーにて破碎し、RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen社製)を用いてRNA精製を行った。得られたtotal RNAから、SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (invitrogen社製)を用いてcDNAライブラリーを作製した。このcDNAを鋳型として、表1に示す配列番号3及び配列番号4のプライマー対を用いたPCR反応により、配列番号2に示すNoKASIV遺伝子のDNA断片を取得した。

また、プラスミドベクターpSTV28 (タカラバイオ社製)を鋳型として、表1に示す配列番号5及び6のプライマー対を用いたPCR反応によりpSTV28を増幅し、DpnI (東洋紡株式会社製)処理により鋳型の消化を行った。これら2つの断片を、High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Applied Science社製)を用いて精製した後に、In-Fusion HD Cloning Kit (Clontech社製)を用いて融合し、NoKASIV遺伝子発現プラスミドを構築した。

[0064]

[表1]

表 1

配列番号	プライマー塩基配列
配列番号 3	ATTCGAGCTCGGTACATGCGGGTCTCCAGTAGCGCC
配列番号 4	CAAGCTTGCAATGCCTTTACTTGAACGGTTTGAAG
配列番号 5	GTACCGAGCTCGAATTCG
配列番号 6	AGGCATGCAAGCTTGGCACT
配列番号 7	GGAGAAAAAACTATAATGTCAGGAACATTCAATGA
配列番号 8	TTATAATACAGTTTTTTACCCAACTATCTTCAATT
配列番号 9	CGAGCTCGGTACCCGGGCGGTCTTTTGTCTTTCTC
配列番号 10	AATCTGCTCGGAGGGGAGGATC
配列番号 11	CCCTCCGAGCAGATTATGAAGACCGCGCTCTCCTC
配列番号 12	GCGCGCAACACCGCGGGTGCGGGAGAAC
配列番号 13	GCTTCTGTGGAAGAGCCAGTG
配列番号 14	ACTCTAGAGGATCCCTGATCTTGTCCATCTCGTG
配列番号 15	GGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGC
配列番号 16	CGGGTACCGAGCTCGAATTC
配列番号 17	TCCGAGCAGATTATGATGGCCAAGCTGACCAGCGC
配列番号 18	CTCTTCCACAGAAGCTTAGTCCTGCTCCTCGGCCA
配列番号 19	AAATCATAACAGCAGGATGCGGGTCTCCAGTAGCGC
配列番号 20	CTCTTCCACAGAAGCTTACTTGAACGGTTTGAAG
配列番号 21	CGAGCTCGGTACCCGGCTGCTGCCCCGACCGTATC
配列番号 22	CCTGCTGTATGATTTTGGCAC
配列番号 23	AAGAAGCTGTCTTTTATGGTCGAGATTCTGAAGCAT
配列番号 24	CTCTTCCACAGAAGCTCAGAAGAACTCGTCCAACA
配列番号 25	CGAGCTCGGTACCCGACTGCGCATGGATTGACCGA
配列番号 26	ATATCAAGAAGCTGTCTTTT
配列番号 27	GGCGGTCTTTTGTCTTTCTCTATAG
配列番号 28	CTGATCTTGTCCATCTCGTGTGCCAC
配列番号 29	GCTGCTGCCCCGACCGTATC
配列番号 30	ACTGCGCATGGATTGACCGAC
配列番号 31	ACACAGGAAACAGCTATGGAGAAGCTATCCCTCGC
配列番号 32	ACAAAATATTAACGCTTAAGGAACGTAATCTTGA
配列番号 33	ATTCGAGCTCGGTACATGAAACGTGCAGTGATTAC
配列番号 34	CAAGCTTGCAATGCCTTTAATCTTTCAGCTTGCGCA
配列番号 35	ATTCGAGCTCGGTACATGTCTAAGCGTCGTGTAGTTG
配列番号 36	CAAGCTTGCAATGCCTTTAGATCTTTTAAAGATCA
配列番号 37	ACACAGGAAACAGCTATGGCGGACTTGCCCCCGCTT
配列番号 38	ACAAAATATTAACGCCTAGGCAACATACTTCTTGA

[0065] (2) NoKASIV遺伝子発現プラスミドの大腸菌への導入

構築したNoKASIV遺伝子発現プラスミドを用いて、大腸菌突然変異株である K27株 (fadD88) (Overath et al, Eur. J. Biochem. 7, 559-574, 1969) をコンピテントセル形質転換法により形質転換した。形質転換処理をしたK

27株を37℃で一晩静置して得られたコロニーをLB Cm液体培地 (Bacto Tryptone 1%, Yeast Extract 0.5%, NaCl 1%, クロラムフェニコール30 µg/mL) 1 mLに接種し、30℃で一晩培養した。前記培養液20 µLを、2 mLのOvernight Express Instant TB Medium (Novagen社) に接種し、30℃で振とう培養した。培養24時間後、培養液に含まれる脂質成分を、下記の方法にて解析した。なお、陰性対照として、プラスミドベクターpSTV28で形質転換した大腸菌K27株についても同様に実験を行った。

[0066] (3) 脂質の抽出及び構成脂肪酸の分析

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

[0067] 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。

ガスクロマトグラフィー解析は下記の条件で行った。

キャピラリーカラム：DB-1 MS 30 m×200 µm×0.25 µm (J&W Scientific)、移動層：高純度ヘリウム、カラム内流量：1.0 mL/min、昇温プログラム：100℃（1分間）→10℃/min→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14.49 psi, 104 mL/min, 注入量1 µL、洗浄バイアル：メタノール・クロロホルム、検出器温度：300℃

[0068] また、脂肪酸メチルエステルの同定は、前記ガスクロマトグラフィーに用

いたものと同じ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、各脂肪酸のメチルエステル量を定量した。各ピーク面積を、内部標準である7-ペンタデカノンのピーク面積と比較することで試料間の補正を行い、培養液1リットルあたりの各脂肪酸量を算出した。さらに、各脂肪酸量の総和を総脂肪酸量とし、総脂肪酸量に占める各脂肪酸量の割合を算出した。

NoKASIV遺伝子導入株及びプラスミドベクターpSTV28導入株（陰性対照）の総脂肪酸量（脂質量）に占める各脂肪酸量の割合を、図1に示す。なお、以下の図中の脂肪酸組成において、C $\times$ とあるのは炭素原子数 $\times$ の脂肪酸を、C $\times$: y とあるのは炭素原子数 $\times$ で二重結合数が y の脂肪酸を表す。また、図中、C18 : n の「 n 」は0～5の整数を表し、C18 : 0, C18 : 1, C18 : 2, C18 : 3, C18 : 4, 及びC18 : 5の脂肪酸の総和を表す。また、C16 : n は、C16 : 0及びC16 : 1の脂肪酸の総和を表す。

[0069] 図1から明らかなように、NoKASIV遺伝子導入株（図1 : NoKASIV）では、プラスミドベクターpSTV28導入株（図1 : WT）に比べて、C14 : 0脂肪酸の含有率が高かった。

[0070] 2. NoKASIV遺伝子及びCTE遺伝子導入株

NoKASIV遺伝子及びココヤシ (*Cocos nucifera*) 由来アシルー ACP チオエステラーゼ (CTE) 遺伝子は大腸菌K27株 (fadD88) に導入した多重形質転換体を作製した。

前記1. で構築したNoKASIV遺伝子発現プラスミドを用いて、CTE遺伝子導入K27株をコンピテントセル形質転換法により形質転換した。CTE遺伝子導入K27株は、特開2011-250781号公報記載の方法により作製した。CTE遺伝子はプラスミドベクターpMW219（ニッポンジーン製）にクローニングされたものを使用した。CTEのアミノ酸配列を配列番号46に、CTE遺伝子の配列を配列番号47にそれぞれ示す。

形質転換処理をしたK27株を37℃で一晩静置して得られたコロニーをLBCmKm液体培地 (Bacto Trypton 1%, Yeast Extract 0.5%, NaCl 1%, クロラムフェニコール30 µg/mL、カナマイシン硫酸塩50 µg/mL) 1 mLに接種し、30℃で一晩培養した。前記培養液20 µLを、2 mLのOvernight Express Instant TB Mediumに接種し、30℃で振とう培養した。培養24時間後、培養液に含まれる脂質成分を、前記1.と同様の方法にて解析した。なお、陰性対照として、プラスミドベクターpSTV28で形質転換したCTE遺伝子導入K27株についても同様に実験を行った。

結果を図2に示す。

[0071] 図2から明らかなように、NoKASIV遺伝子及びCTE遺伝子導入株 (図2: CTE + NoKASIV) では、CTE遺伝子導入K27株 (図2: CTE) に比べて、C12:0及びC14:0脂肪酸の含有率が高かった。

[0072] 3. NoKASIV遺伝子及びNoTE遺伝子導入株

NoKASIV遺伝子及びナンノクロロプシス オキュラータ (*Nannochloropsis oculata*) NIES-2145株由来アシルー ACPチオエステラーゼ (NoTE) 遺伝子を大腸菌K27株 (fadD88) に導入した多重形質転換体を作製した。

(1) NoTE遺伝子の取得、及びNoTE遺伝子発現用プラスミドの構築

Nannochloropsis oculata NIES2145株の全RNAを抽出し、SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR (invitrogen社製) を用いて逆転写を行ってcDNAを得た。このcDNAを鋳型として、下記表2に示す配列番号66及び配列番号67のプライマー対を用いたPCR反応により、配列番号49に示す塩基配列からなる遺伝子断片を取得した。また、プラスミドベクターpBluescriptII SK(-) (Stratagene社製) を鋳型として、下記表2に示す配列番号68及び69のプライマー対を用いたPCR反応によりpBluescriptII SK(-)を増幅し、制限酵素DpnI (東洋紡株式会社製) 処理により鋳型の消化を行った。これら2つの断片を、High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Applied Science社製) を用いて精製した後に、In-Fusion HD Cloning Kit (Clontech社製) を用いて融

合し、NoTE遺伝子発現用プラスミドNoTE_1を構築した。なお、この発現プラスミドは、NoTE遺伝子がコードするアミノ酸配列（配列番号48）の1位のN末端側に、プラスミド由来のLacZタンパク質のN末端側1位～29位のアミノ酸配列と融合させた形で構築した。

[0073] [表2]

表 2

配列番号	プライマー塩基配列
配列番号 6 6	GCGGCCGCTCTAGAGATGACGCCTTTGGCCTTCAC
配列番号 6 7	TGCTTCTTTCATTAGCTAGCTAATATCAATTTTCTTTGG
配列番号 6 8	CTCTAGAGCGGCCGCCACCG
配列番号 6 9	GCGTTAATATTTTGTAAAATTCG

[0074] (2) NoTE遺伝子発現プラスミドの大腸菌への導入

構築したNoTE遺伝子発現用プラスミドNoTE_1を用いて、大腸菌K27株をコンピテントセル形質転換法により形質転換した。形質転換処理をしたK27株を37℃で一晩静置し、得られたコロニーをLBamp液体培地（Bacto Trypton 1%, Yeast Extract 0.5%, NaCl 1%, アンピシリンナトリウム50 µg/mL）1 mLに接種し、37℃で一晩培養した。前記培養液20 µLを、2 mLのOvernight Express Instant TB Medium（Novagen社）に接種し、30℃で振とう培養し、NoTE遺伝子導入K27株を得た。

[0075] (3) NoKASIV遺伝子のNoTE遺伝子導入K27株への導入

前記1. で構築したNoKASIV遺伝子発現プラスミドを用いて、NoTE遺伝子導入K27株をコンピテントセル形質転換法により形質転換した。

形質転換処理をしたK27株を37℃で一晩静置して得られたコロニーをLBCmamp液体培地（Bacto Trypton 1%, Yeast Extract 0.5%, NaCl 1%, クロラムフェニコール30 µg/mL、アンピシリンナトリウム50 µg/mL）1 mLに接種し、30℃で一晩培養した。前記培養液20 µLを、2 mLのOvernight Express Instant TB Mediumに接種し、30℃で振とう培養した。培養24時間後、培養液に含まれる脂質成分を、前記1. と同様の方法にて解析した。なお、陰性対照として、プラスミドベクターpSTV28で形質転換したNoTE遺伝子導入K27株についても同様に実験を行った。

結果を図3に示す。

[0076] 図3から明らかなように、NoKASIV遺伝子及びNoTE遺伝子導入株（図3：NTE+NoKASIV）では、NoTE遺伝子導入K27株（図3：NTE）に比べて、C12：1、C12：0、C14：0及びC14：1脂肪酸の含有率が高かった。

[0077] 4. NoKASIV遺伝子及びNoTE遺伝子導入株のセルレニン添加培地での脂質生産性

前記3. で構築したNoKASIV遺伝子及びNoTE遺伝子導入株を、LBCmAmp液体培地（Bacto Trypton 1%, Yeast Extract 0.5%, NaCl 1%, クロラムフェニコール30 µg/mL、アンピシリンナトリウム50 µg/mL）1 mLに接種し、30℃で一晩培養した。前記培養液20 µLを、2 mLのOvernight Express Instant TB Mediumに接種し、30℃で振とう培養した。このとき、Overnight Express Instant TB Mediumにセルレニン（和光純薬工業）を終濃度10 µMとなるように添加した。培養24時間後、培養液に含まれる脂質成分を、前記1. と同様の方法にて解析した。なお、陰性対照として、セルレニンを添加しない培地でもNoKASIV遺伝子及びNoTE遺伝子導入株を同様に培養した。

結果を図4に示す。

[0078] 図4から明らかなように、セルレニン添加培地で培養したNoKASIV遺伝子及びNoTE遺伝子導入株（図4：NTE+NoKASIV+Cer）は、C12：0及びC14：0脂肪酸の含有率が増加する一方、C16及びC18脂肪酸の含有率が低下した。

[0079] 実施例2. NoKASIV遺伝子及びカリフォルニアベイ（*Umbellularia californica*）由来アシルーACPチオエステラーゼ（BTE）遺伝子をナンノクロロプシス オキユラータに導入した形質転換体の作製、及び形質転換体による脂肪酸の生産

[0080] 1. NoKASIV遺伝子及びBTE遺伝子導入株

（1）BTE遺伝子ナンノクロロプシス発現用プラスミドの構築

特表平7-501924号公報に記載のBTEをコードする遺伝子配列（配列

番号 51) を人工合成した。合成した DNA 断片を鋳型として、表 1 に示す配列番号 7 及び 8 のプライマー対を用いて PCR 反応を行い、BTE 遺伝子断片を取得した。なお、この DNA 断片では、BTE (配列番号 50) の葉緑体移行シグナル (N 末端の 85 アミノ酸) に相当する部分を欠損させた。

GenBank に登録されているナンノクロロプシス エスピー (Nannochloropsis sp.) W2J3B 株の VCP1 (ビオラキサンチン/クロロフィル a 結合タンパク質) 遺伝子の complete cds 配列 (Accession number: JF957601.1) より、VCP1 プロモーター配列 (配列番号 39)、VCP1 葉緑体移行シグナル配列 (配列番号 40)、及び VCP1 ターミネーター配列 (配列番号 41) を人工合成した。合成した DNA 断片を鋳型として、表 1 に示す配列番号 9 及び 10 のプライマー対、配列番号 11 及び 12 のプライマー対、配列番号 13 及び 14 のプライマー対を用いて PCR 反応を行い、VCP1 プロモーター配列、VCP1 葉緑体移行シグナル配列、VCP1 ターミネーター配列をそれぞれ取得した。また、プラスミドベクター pUC19 (タカラバイオ社製) を鋳型として、表 1 に示す配列番号 15 及び 16 プライマー対を用いた PCR 反応を行い、プラスミドベクター pUC19 を増幅した。

上記により得られた BTE 遺伝子断片、VCP1 プロモーター配列、VCP1 葉緑体移行シグナル配列、及び VCP1 ターミネーター配列を、実施例 1 の 1. と同様の方法でプラスミドベクター pUC19 に融合し、BTE 遺伝子のナンノクロロプシス発現用プラスミド pUC-vcplc-BTE を構築した。なお、本プラスミドは、VCP1 プロモーター配列、VCP1 葉緑体移行シグナル配列、BTE 遺伝子断片、及び VCP1 ターミネーター配列の順に連結したインサート配列と、pUC19 ベクター配列からなる。

[0081] ゼオシン耐性遺伝子 (配列番号 42) を人工合成した。合成した DNA 断片を鋳型として、表 1 に示す配列番号 17 及び 18 プライマー対を用いて PCR 反応を行い、ゼオシン耐性遺伝子断片を取得した。ゼオシン耐性遺伝子断片、VCP1 プロモーター配列、VCP1 ターミネーター配列を、上記と同様に融合してゼオシン耐性遺伝子のナンノクロロプシス発現用プラスミド pUC-vcplc

-bleを構築した。

[0082] 2. NoKASIV遺伝子のナンノクロロプシス発現用プラスミドの構築

NoKASIV遺伝子を鋳型として、表1に示す配列番号19及び20のプライマー対を用いてPCR反応を行うことでNoKASIV遺伝子断片を取得した。次に、Randor Radakovits, et al., Nature Communications, DOI:10.1038/ncomms1688, 2012、に記載のNannochloropsis gaditana CCMP526株由来ユビキチンプロモーター配列（配列番号45）を人工合成した。合成したDNA断片を鋳型として、表1に示す配列番号21及び22のプライマー対を用いてPCR反応を行い、ユビキチンプロモーターのDNA断片を取得した。これらの増幅断片と、前記で取得したVCP1ターミネーター配列、及びプラスミドベクターpUC19の増幅断片とを前記と同様の方法で融合し、NoKASIV遺伝子のナンノクロロプシス発現用プラスミドpUC-UEPp-NoKASIVを構築した。

[0083] パラモマイシン耐性遺伝子（配列番号43）及びRandor Radakovits, et al., Nature Communications, DOI:10.1038/ncomms1688, 2012、に記載のナンノクロロプシス ガディタナ (Nannochloropsis gaditana) CCMP526株由来チューブリンプロモーター配列（配列番号44）を人工合成した。合成したDNA断片を鋳型として、表1に示す配列番号23及び24のプライマー対、配列番号25及び26のプライマー対を用いてPCR反応を行い、パラモマイシン耐性遺伝子及びチューブリンプロモーター配列をそれぞれ取得した。これらの増幅断片と、前記で取得したVCP1ターミネーター配列、及びプラスミドベクターpUC19の増幅断片を前記と同様の方法で融合し、パラモマイシン耐性遺伝子のナンノクロロプシス発現用プラスミドpUC-TUBp-aphVII Iを構築した。

[0084] 3. BTE遺伝子発現用断片のナンノクロロプシスへの導入

BTE遺伝子発現用プラスミドpUC-vcplc-BTEを鋳型として、表1に示す配列番号27及び28のプライマー対を用いてPCR反応を行い、当該プラスミド中のVCP1プロモーター配列、VCP1葉緑体移行シグナル配列、BTE遺伝子断片、及びVCP1ターミネーター配列からなるBTE遺伝子発現用断片を増幅した。ま

た、ゼオシン耐性遺伝子発現用プラスミドpUC-vcplc-bleを鋳型として、表1に示す配列番号27及び28のプライマー対を用いてPCR反応を行い、ゼオシン耐性遺伝子発現用断片を増幅した。増幅した両断片を、High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Applied Science社製)を用いて精製した。なお、精製の際の溶出には、キットに含まれる溶出バッファーではなく、滅菌水を用いた。

約 10^9 細胞のナンノクロロプシス オキュラータ (*Nannochloropsis oculata*) NIES-2145株を、384 mMのソルビトール溶液で洗浄して塩を完全に除去し、形質転換の宿主細胞として用いた。上記で増幅したBTE遺伝子発現用断片及びゼオシン耐性遺伝子発現用断片を、約500 ngずつ宿主細胞に混和し、50 μ F、500 Ω 、2,200 V/2 mmの条件でエレクトロポレーションを行った。f/2液体培地 (75 mg NaNO₃、6 mg NaH₂PO₄ · 2H₂O、0.5 μ g ビタミンB12、0.5 μ g ビオチン、100 μ g チアミン、10 mg Na₂SiO₃ · 9H₂O、4.4 mg Na₂EDTA · 2H₂O、3.16 mg FeCl₃ · 6H₂O、12 μ g FeCl₃ · 6H₂O、21 μ g ZnSO₄ · 7H₂O、180 μ g MnCl₂ · 4H₂O、7 μ g CuSO₄ · 5H₂O、7 μ g Na₂MoO₄ · 2H₂O/人工海水1 L) にて24時間回復培養を行った後に、2 μ g/mLのゼオシン含有f/2寒天培地 (f/2液体培地に0.8%寒天を添加) に塗布し、25℃、0.3%CO₂雰囲気下、12 h/12 h明暗条件にて2~3週間培養した。得られたコロニーの中から、BTE遺伝子発現用断片を含むものをPCR法により選抜した。

[0085] 4. NoKASIV遺伝子発現用断片のナンノクロロプシスへの導入

NoKASIV遺伝子発現用プラスミドpUC-UEPp-NoKASIVを鋳型として、表1に示す配列番号29及び28のプライマー対を用いてPCR反応を行い、当該プラスミド中のプロモーター配列、NoKASIV遺伝子及びVCP1ターミネーター配列からなるNoKASIV遺伝子発現用断片を増幅した。また、pUC-TUBp-aphVIIIを鋳型として、表1に示す配列番号30及び28のプライマー対を用いてPCR反応を行い、パラモイシン耐性遺伝子発現用断片を増幅した。増幅した両

断片を、上述の方法で 3. で作成した BTE 導入株に導入、培養し、得られたコロニーの中から、NoKASIV 遺伝子発現用断片を含むものを PCR 法により選抜した。

[0086] 5. BTE 遺伝子及び NoKASIV 遺伝子発現株の脂質生産性

4. で選抜した株を、f / 2 培地の窒素濃度を 15 倍、リン濃度を 5 倍に増強した培地（以下、N15P5 培地）50 mL に播種し、25℃、0.3% CO₂ 雰囲気下、12 h / 12 h 明暗条件にて 4 週間振盪培養し、前培養液とした。前培養液 10 mL を、40 mL の N15P5 培地に植継ぎ、25℃、0.3% CO₂ 雰囲気下、12 h / 12 h 明暗条件にて振盪培養した。培養 3 週間後、培養液に含まれる脂質成分を、実施例 1 と同様の方法にて解析した。なお、陰性対照として、3. で得られた BTE 遺伝子のみを導入したナンノクロロプシス株についても同様に実験を行った。

結果を図 5 に示す。

[0087] 図 5 から明らかなように、NoKASIV 遺伝子及び BTE 遺伝子導入株（図 5 : BTE + NoKASIV）では、BTE 遺伝子導入株（図 5 : BTE）に比べて、C12 : 0 及び C14 : 0 脂肪酸の含有率が高かった。

[0088] 6. BTE 遺伝子及び NoKASIV 遺伝子発現株のセルレニン添加培地での脂質生産性

4. で選抜した株を 5. と同様の方法で前培養し、10 µM のセルレニンを含む N15P5 培地に植継ぎ、25℃、0.3% CO₂ 雰囲気下、12 h / 12 h 明暗条件にて振盪培養した。培養 3 週間後、培養液に含まれる脂質成分を、実施例 1 と同様の方法にて解析した。なお、陰性対照として、セルレニンを添加しない系についても同様に実験を行った。

結果を図 6 に示す。

[0089] 図 6 から明らかなように、セルレニン添加培地で培養した NoKASIV 遺伝子及び BTE 遺伝子導入株（図 6 : BTE + NoKASIV + Cer）は、C12 : 0 及び C14 : 0 の含有率が増加する一方、C16 及び C18 脂肪酸の含有率が低下した。

[0090] 実施例3 ナンノクロロプシス・ガディタナ (Nannochloropsis gaditana)
CCMP526株由来 β -ケトアシル-CoAシンターゼ (NgKASIV) 遺伝子が大腸菌に導入した形質転換体の作製及び形質転換体による脂肪酸の生産

[0091] 1. NgKASIV遺伝子導入株

(1) NgKASIV遺伝子の取得、及びNgKASIV遺伝子発現プラスミドの構築

Nannochloropsis gaditana CCMP526株の全9052遺伝子の配列情報を、Colorado School of Mines 及びGenome Project Solutions が提供するナンノクロロプシス・ゲノムプロジェクト (Nannochloropsis Genome Project (<http://nannochloropsis.genomeprojectsolutions-databases.com/>)) から取得した。そのうちの1つであるNga04201遺伝子 (配列番号59に示す塩基配列からなる遺伝子、以下NgKASIV) について人工遺伝子の受託合成サービスを利用して取得した。取得した人工遺伝子を鋳型として、表1に示す配列番号31及び32のプライマー対を用いたPCR反応により、配列番号59に示すNgKASIV遺伝子のDNA断片を取得した。なお、配列番号59に示すNgKASIV遺伝子は、配列番号2の遺伝子配列と77%の同一性を示し、配列番号58に示すNgKASIVのアミノ酸配列は、配列番号1のアミノ酸配列と90%の同一性を示す。

また、プラスミドベクターpSTV28 (タカラバイオ社製) を鋳型として、表1に示す配列番号5及び6のプライマー対を用いたPCR反応によりpSTV28を増幅し、DpnI (東洋紡株式会社製) 処理により鋳型の消化を行った。これら2つの断片を、High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Applied Science社製) を用いて精製した後に、In-Fusion HD Cloning Kit (Clontech社製) を用いて融合し、NgKASIV遺伝子発現プラスミドを構築した。

[0092] (2) NgKASIV遺伝子発現プラスミドの大腸菌への導入

構築したNgKASIV遺伝子発現プラスミドを用いて、実施例1の1.と同様の方法で、大腸菌K27株を形質転換し、30℃で振とう培養した。培養24時間後、培養液に含まれる脂質成分を、実施例1と同様の方法にて解析した。なお、陰性対照として、プラスミドベクターpSTV28で形質転換した大腸菌K27株

についても同様に実験を行った。

結果を図 7 に示す。

[0093] 図 7 から明らかなように、NgKASIV遺伝子導入株（図 7 : NgKASIV）では、プラスミドベクターpSTV28導入株（図 7 : WT）に比べて、C 1 4 : 0 脂肪酸の含有率が高かった。

[0094] 2. NgKASIV遺伝子及びCTE遺伝子導入株

NgKASIV遺伝子及びココヤシ (*Cocos nucifera*) 由来アシルー A C P チオエステラーゼ (CTE) 遺伝子は大腸菌K27株 (fadD88) に導入した多重形質転換体を作製した。

前記 1. で構築したNgKASIV遺伝子発現プラスミドを用いて、実施例 1 の 2. と同様の方法にて大腸菌K27株を形質転換し、30℃で振とう培養した。培養 24 時間後、培養液に含まれる脂質成分を、実施例 1 と同様の方法にて解析した。なお、陰性対照として、プラスミドベクターpSTV28で形質転換したCTE遺伝子導入K27株についても同様に実験を行った。

結果を図 8 に示す。

[0095] 図 8 から明らかなように、NgKASIV遺伝子及びCTE遺伝子導入株（図 8 : CTE + NgKASIV）では、CTE遺伝子導入株（図 8 : CTE）に比べて、C 1 2 : 0、C 1 4 : 1 及びC 1 4 : 0 脂肪酸の含有率が高かった。

[0096] 3. NgKASIV遺伝子及びNoTE遺伝子導入株

NgKASIV遺伝子及び*Nannochloropsis oculata* NIES-2145株由来アシルー A C P チオエステラーゼ (NoTE) 遺伝子は大腸菌K27株 (fadD88) に導入した多重形質転換体を作製した。

前記 1. で構築したNgKASIV遺伝子発現プラスミドを用いて、実施例 1 の 3. と同様の方法にて大腸菌K27株を形質転換し、30℃で振とう培養した。培養 24 時間後、培養液に含まれる脂質成分を、実施例 1 と同様の方法にて解析した。なお、陰性対照として、プラスミドベクターpSTV28で形質転換したNoTE遺伝子導入K27株についても同様に実験を行った。

結果を図 9 に示す。

[0097] 図9から明らかなように、NgKASIV遺伝子及びNoTE遺伝子導入株（図9：NTE+NgKASIV）では、NoTE遺伝子導入株（図9：NTE）に比べて、C12：1、C12：0、C14：1及びC14：0脂肪酸の含有率が高かった。

[0098] 比較例1 大腸菌 (*Escherichia coli*) K27株由来KAS I (EKASI) 遺伝子又はKAS II (EKASII) 遺伝子は大腸菌に導入した形質転換体の作製及び形質転換体による脂肪酸の生産

[0099] 1. EKASI遺伝子又はEKASII遺伝子導入株

(1) EKASI遺伝子又はEKASII遺伝子発現プラスミドの構築

大腸菌のEKASI遺伝子及びEKASII遺伝子の配列情報を、データベースPEC (Profiling of *E. coli* Chromosome, www.shigen.nig.ac.jp/ecoli/pec/) より入手した。大腸菌K27株を、LB培地にて30℃で振とう培養した後、培養液1mlから菌体を回収し、QIAamp DNA Mini Kit(キアゲン社製)を使用し、DNAを取得した。得られたDNAを鋳型として、表1に示す配列番号33及び34のプライマー対、配列番号35及び36のプライマー対を用いたPCR反応により、配列番号63に示すEKASI遺伝子、配列番号65に示すEKASII遺伝子のDNA断片を取得した。なお、配列番号63に示すEKASI遺伝子は、配列番号2の遺伝子配列と49%の同一性を示し、配列番号65に示すEKASII遺伝子は、配列番号2の遺伝子配列と53%の同一性を示し、配列番号62に示すEKASIのアミノ酸配列は、配列番号1のアミノ酸配列と約34%の同一性を示し、配列番号64に示すEKASIIのアミノ酸配列は、配列番号1のアミノ酸配列と約45%の同一性を示す。

また、プラスミドベクターpSTV28 (タカラバイオ社製)を鋳型として、表1に示す配列番号5及び6のプライマー対を用いたPCR反応によりpSTV28を増幅し、DpnI (東洋紡株式会社製)処理により鋳型の消化を行った。これら2つの断片を、High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Applied Science社製)を用いて精製した後に、In-Fusion HD Cloning Kit (Clontech社製)を用いて融合し、EKASI遺伝子発現プラスミド及びEKASII遺伝子発現プラスミドを構築した。

[0100] (2) EKASI遺伝子発現プラスミド、EKASII遺伝子発現プラスミドの大腸菌への導入

構築したEKASI遺伝子発現プラスミド、EKASII遺伝子発現プラスミドを用いて、実施例1の1.と同様の方法で、大腸菌K27株を形質転換し、30℃で振とう培養した。培養24時間後、培養液に含まれる脂質成分を、実施例1と同様の方法にて解析した。なお、陰性対照として、プラスミドベクターpSTV28で形質転換した大腸菌K27株についても同様に実験を行った。

結果を図10に示す。

[0101] 図10から明らかなように、EKASI遺伝子導入株(図10:EKASI)、EKASII遺伝子導入株(図10:EKASII)、プラスミドベクターpSTV28導入株(図10:WT)よりも、C14脂肪酸の含有率が低下していた。

[0102] 2. EKASI遺伝子又はEKASII遺伝子及びNoTE遺伝子導入株

EKASI遺伝子又はEKASII遺伝子と、*Nannochloropsis oculata* NIES-2145株由来アシルーACPチオエステラーゼ(NoTE)遺伝子は大腸菌K27株(fadD88)に導入した多重形質転換体を作製した。

前記1.で構築したEKASI遺伝子又はEKASII遺伝子発現プラスミドを用いて、実施例1の3.と同様の方法にて大腸菌K27株を形質転換し、30℃で振とう培養した。培養24時間後、培養液に含まれる脂質成分を、実施例1と同様の方法にて解析した。なお、陰性対照として、プラスミドベクターpSTV28で形質転換したNoTE遺伝子導入K27株についても同様に実験を行った。

結果を図11に示す。

[0103] 図11から明らかなように、EKASI遺伝子及びNoTE遺伝子導入株(図11:NTE+EKASI)、EKASII遺伝子及びNoTE遺伝子導入株(図11:NTE+EKASII)では、NoTE遺伝子導入株(図11:NTE)よりも、C12:1、C12:0、C14:1及びC14:0脂肪酸の含有率が低かった。

[0104] 比較例2 ナンノクロロプシス オキュラータ(*Nannochloropsis oculata*) NIES-2145株由来KAS(NoKASIorII)遺伝子は大腸菌に導入した形質転換体の作製及び形質転換体による脂肪酸の生産

[0105] (1) NoKASIORII遺伝子の取得、及びNoKASIORII遺伝子発現プラスミドの構築

実施例1の1.と同様の方法で、Nannochloropsis oculata NIES-2145株のcDNAライブラリーを作製した。このcDNAを鋳型として、表1に示す配列番号37及び38のプライマー対を用いたPCR反応により、配列番号61に示すNoKASIORII遺伝子のDNA断片を取得した。なお、配列番号61に示すNoKASIORII遺伝子は、配列番号2の遺伝子配列と59%の同一性を示し、配列番号60に示すNgKASIVのアミノ酸配列は、配列番号1のアミノ酸配列と52%の同一性を示す。

また、プラスミドベクターpSTV28（タカラバイオ社製）を鋳型として、表1に示す配列番号5及び6のプライマー対を用いたPCR反応によりpSTV28を増幅し、DpnI（東洋紡株式会社製）処理により鋳型の消化を行った。これら2つの断片を、High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Applied Science社製)を用いて精製した後に、In-Fusion HD Cloning Kit (Clontech社製)を用いて融合し、NoKASIORII遺伝子発現プラスミドを構築した。

[0106] (2) NoKASIORII遺伝子発現プラスミドの大腸菌への導入

構築したNoKASIORII遺伝子発現プラスミドを用いて、実施例1の1.と同様の方法で、大腸菌K27株を形質転換し、30℃で振とう培養した。培養24時間後、培養液に含まれる脂質成分を、実施例1と同様の方法にて解析した。なお、陰性対照として、プラスミドベクターpSTV28で形質転換した大腸菌K27株についても同様に実験を行った。

結果を図12に示す。

[0107] 図12から明らかなように、NoKASIORII遺伝子導入株（図12：NoKASIORI I）では、プラスミドベクターpSTV28導入株（図12：WT）よりもC14：0脂肪酸の含有率が低下していた。

[0108] 2. NoKASIORII遺伝子及びCTE遺伝子導入株

NoKASIORII遺伝子と、ココヤシ (Cocos nucifera) 由来アシルーACPチ

オエステラーゼ (CTE) 遺伝子とを大腸菌K27株 (fadD88) に導入した多重形質転換体を作製した。

前記 1. で構築したNoKASIORII遺伝子発現プラスミドを用いて、実施例 1 の 2. と同様の方法にて大腸菌K27株を形質転換し、30℃で振とう培養した。培養 24 時間後、培養液に含まれる脂質成分を、実施例 1 と同様の方法にて解析した。なお、陰性対照として、プラスミドベクターpSTV28で形質転換したCTE遺伝子導入K27株についても同様に実験を行った。

結果を図 13 に示す。

[0109] 図 13 から明らかなように、NoKASIORII遺伝子及びCTE遺伝子導入株 (図 13 : CTE+NoKASIORII) では、CTE遺伝子導入株 (図 13 : CTE) よりも、C12 : 0、C14 : 1 及び C14 : 0 脂肪酸の含有率が低かった。

[0110] 3. NoKASIORII遺伝子及びNoTE遺伝子導入株

NoKASIORII遺伝子と、*Nannochloropsis oculata* NIES-2145株由来アシル-ACPチオエステラーゼ (NoTE) 遺伝子とを大腸菌K27株 (fadD88) に導入した多重形質転換体を作製した。

前記 1. で構築したNoKASIORII遺伝子発現プラスミドを用いて、実施例 1 の 3. と同様の方法にて大腸菌K27株を形質転換し、30℃で振とう培養した。培養 24 時間後、培養液に含まれる脂質成分を、実施例 1 と同様の方法にて解析した。なお、陰性対照として、プラスミドベクターpSTV28で形質転換したNoTE遺伝子導入K27株についても同様に実験を行った。

結果を図 14 に示す。

[0111] 図 14 から明らかなように、NoKASIORII遺伝子及びNoTE遺伝子導入株 (図 14 : NTE+NoKASIORII) では、NoTE遺伝子導入株 (図 14 : NTE) よりも、C12 : 1、C12 : 0、及び C14 : 1 脂肪酸の含有率が低かった。

[0112] 比較例 3. クフエア (*Cuphea lanceolata*) 由来KASIV (ClKASIV) 遺伝子及びBTE遺伝子をナンノクロロプシス オキュラータに導入した形質転換体の作製、及び形質転換体による脂肪酸の生産

1. ClKASIV遺伝子及びBTE遺伝子導入株

CLKASIVをコードする遺伝子配列(配列番号 7 1 ; Accession number: AJ3 44250.1 ; Shutt BS et al., " Beta- ketoacyl-acyl carrier protein synthase IV: a key enzyme for regulation of medium-chain fatty acid synthesis in *Cuphea lanceolata* seeds" *Planta*, 2 002 Sep;215 (5) p.847-54)を人工合成した。なお、配列番号 7 1 に示す CLKASIV遺伝子は、配列番号 2 の遺伝子配列と 4 9 %の同一性を示し、配列番号 7 0 に示すNgKASIVのアミノ酸配列は、配列番号 1 のアミノ酸配列と 3 8 . 5 %の同一性を示す。

合成したDNA断片を鋳型として、配列番号 7 2 及び 7 3 のプライマー対を用いて P C R 反応を行い、CLKASIV遺伝子断片を取得した。

得られたCLKASIV遺伝子断片と、実施例 2 で用いたユビキチンプロモーター配列と、VCP1ターミネーター配列とを、実施例 1 の 1 . と同様の方法でプラスミドベクターpUC19に融合し、CLKASIV遺伝子のナンノクロロプシス発現用プラスミドpUC-UEPp-CLKASIVを構築した。

[0113] [表3]

表 3

配列番号	プライマー塩基配列
配列番号 72	aaatcatacagcaggatggcgggcgccctcttccat
配列番号 73	ctcttccacagaagcctaattgtaagggcggaaga

[0114] 2. CLKASIV遺伝子発現用断片のナンノクロロプシスへの導入

CLKASIV遺伝子発現用プラスミドpUC-UEPp-CLKASIVを鋳型として、表 1 に示す配列番号 2 9 及び 2 8 のプライマー対を用いて P C R 反応を行い、当該プラスミド中のプロモーター配列、CLKASIV遺伝子及びVCP1ターミネーター配列からなるCLKASIV遺伝子発現用断片を増幅した。また、実施例 2 の 2 . に記載のプラスミドpUC-TUBp-aphVIIIを鋳型として、表 1 に示す配列番号 3 0 及び 2 8 のプライマー対を用いて P C R 反応を行い、パラモイシン耐性遺伝子発現用断片を増幅した。増幅した両断片を、実施例 2 の 3 . と同様の方法で、実施例 2 の 3 . で作成したBTE導入株に導入し、培養した。得られたコロニーの中から、CLKASIV遺伝子発現用断片を含むものを P C R 法により選抜した

。

[0115] 3. BTE遺伝子及びNoKASIV遺伝子発現株の脂質生産性

2. で選抜した株を、f / 2 培地の窒素濃度を 15 倍、リン濃度を 5 倍に増強した培地（以下、N 15 P 5 培地）50 mL に播種し、25℃、0.3% CO₂ 雰囲気下、12 h / 12 h 明暗条件にて4週間振盪培養し、前培養液とした。前培養液 10 mL を、40 mL の N 15 P 5 培地に植継ぎ、25℃、0.3% CO₂ 雰囲気下、12 h / 12 h 明暗条件にて振盪培養した。培養3週間後、培養液に含まれる脂質成分を、実施例 1 と同様の方法にて解析した。なお、対照として、実施例 2 の 3. で得られた BTE 遺伝子のみを導入したナンクロロプシス株と、実施例 2 の 4. で得られた BTE 及び NoKASIV 導入ナンクロロプシス株についても同様に実験を行った。

結果を図 15 に示す。

[0116] 図 15 から明らかなように、C1KASIV 遺伝子及び BTE 遺伝子導入株（図 15 : BTE + C1KASIV）では、NoKASIV 遺伝子及び BTE 遺伝子導入株（図 15 : BTE + NoKASIV）に比べて、C 12 : 0 及び C 14 : 0 脂肪酸の含有率が低かった。

[0117] 実施例 4. NoKASIV 遺伝子及び CTE 遺伝子をシロイヌナズナに導入した形質転換体の作製、及び形質転換体による脂肪酸の生産

1. CTE 遺伝子導入用プラスミドの作製

特開 2011-250781 号公報の実施例 1 の手法に従い、植物導入用プラスミド p909CTE を構築した。当該プラスミドは、CTE 遺伝子が Brassica rapa 由来の Napin 遺伝子プロモーターにより発現制御され、BTE 遺伝子由来の葉緑体移行シグナルペプチドによって葉緑体へと移行するよう設計されたものである。

当該プラスミドが有する、Brassica rapa 由来の Napin 遺伝子プロモーター配列を配列番号 74 に、Brassica rapa 由来の Napin 遺伝子ターミネーター配列を配列番号 75 に、BTE 遺伝子由来の葉緑体移行シグナルペプチドを結合した CTE 遺伝子の配列を配列番号 76 にそれぞれ示す。

[0118] 2. NoKASIV 遺伝子導入用プラスミドの作製

下記の手順により、植物導入用ベクターpRI909（タカラバイオ製）が本来保持するカナマイシン耐性遺伝子を、Streptomyces hygroscopicus由来のピアラフォス耐性遺伝子（Bar遺伝子）に置換した。Bar遺伝子は、ホスフィノトリシンアセチル転移酵素をコードする。Streptomyces hygroscopicus由来のピアラフォス耐性遺伝子は、NCBIのGene Bankで開示された形質転換用ベクターpYW310（ACCESSION NO. DQ469641）の配列を参考に、Gene Script社の提供する受託合成サービスを利用して取得した（配列番号77）。人工合成遺伝子をテンプレートとし、PrimeSTAR、配列番号79と80のプライマー対を用いたPCR反応により、Bar遺伝子を増幅した。一方、pRI909をテンプレートとし、PrimeSTAR、配列番号81と82のプライマー対を用いたPCR反応により、pRI909ベクターからカナマイシン耐性遺伝子を除いた領域を増幅した。両増幅断片をNde IとSpe Iで処理し、ライゲーション反応で連結して、プラスミドpRI909 Barを構築した。

[0119] 西洋アブラナ (Brassica napus) の種子で発現するBrassica napus Napinプロモーターの配列を、NCBIのGene Bankに開示されたBrassica napus napin Promoter（ACCESSION NO. EU416279）の配列を参考に、Gene Script社の提供する受託合成サービスを利用して取得した（配列番号78）。人工合成したプロモーター配列をテンプレートとし、配列番号83と84のプライマー対を用いて、Brassica napus Napinプロモーター配列を増幅した。また、プラスミドpRI909 Barをテンプレートとし、配列番号85と86のプライマー対のプライマーを用いて、pRI909 Barの直鎖状断片を増幅した。さらに、プラスミドp909CTEをテンプレートとし、配列番号87と88のプライマー対を用いて、CTE-Tnapin配列を増幅した。これらの増幅産物を、前記と同様にIn-fusion反応により連結し、プラスミドp909Pnapus-CTE-Tnapinを構築した。

[0120] プラスミドp909Pnapus-CTE-Tnapinをテンプレートとし、配列番号89と90のプライマー対を用いて、CTE遺伝子領域を含まないp909Pnapus-Tnapinの直鎖状断片を増幅した。さらに、ココヤシ胚乳由来cDNAをテンプレートとし

、配列番号 91 及び 92 のプライマー対を用いて、NoKASIV 遺伝子を増幅した。得られた増幅産物を、前記と同様に In-fusion 反応により連結し、プラスミド p909Pnapus-NoKASIV-Tnapin を構築した。

[0121] [表4]

表 4

配列番号	プライマー塩基配列
配列番号 79	atatatatatactagtaigagccagacgacg
配列番号 80	atatatatatcatatgatcagatctcggtgacgggca
配列番号 81	tgacgagttccatatggcggaactctggggttcgaa
配列番号 82	catcttggttactagtgcgaaacgatccagatccggt
配列番号 83	taccgaggggaatttatggaacgtcagtgag
配列番号 84	actagtggatcctcgtgtatgtttttaatct
配列番号 85	actctgagattaacctatggctcccctaaa
配列番号 86	gaattcgtaatcatggtcatagctgttctct
配列番号 87	cgaggatccactagtatggccaccacctctttagcttccgct
配列番号 88	catgattacgaattcaagctttatcggtaaaacaacgagc
配列番号 89	actagtggatcctcgtgtatgtttttaatc
配列番号 90	ggcatatgggtgtgtataccacgggtgatatg
配列番号 91	cgaggatccactagtatgcgggtctccagtagcgccgt
配列番号 92	tacacaccatatgccttacttgaacggtttgaagatta

[0122] 3. シロイヌナズナの形質転換

CTE 遺伝子導入用プラスミド p909CTE を、インプラントイノベーションズ（株）によるシロイヌナズナ形質転換受託サービスに供し、CTE 遺伝子を導入したシロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*, Colombia 株）の形質転換体を得た。シロイヌナズナは、野生型及び形質転換体を、室温 22℃、蛍光灯照明を用いて明期 24 時間（約 4000ルクス）の条件で育成した。約 2 ヶ月の栽培の後、種子を収穫した。

[0123] 次に、p909CTE を導入したシロイヌナズナ形質転換体を親株として、以下の形質転換体を作成した。

プラスミド p909Pnapus-NoKASIV-Tnapin を *Agrobacterium tumefaciens* GV 3101 株に導入し、これを用いて p909CTE を導入したシロイヌナズナを形質転換した。播種後 1.5 ヶ月程度育成したシロイヌナズナの花序を切除し、さらに 6 ～ 7 日間育成したものに、プラスミドを導入したアグロバクテリウムを感染させた。得られた種子を、MS 寒天培地（100 µg/ml クラフォラン、7 µg/ml ピア

ラフォスを含む)に播種し、形質転換体を選抜した。得られた形質転換体を室温22℃、蛍光灯照明を用いて明期24時間の条件で育成し、約2ヶ月の栽培の後、種子を収穫した。

[0124] 4. 脂質の抽出とメチルエステル化

シロイヌナズナ種子を、マルチビーズショッカー（安井器械製）を用いて粉碎し、そこに20 μ lの7-ペンタデカノン（0.5mg/ml メタノール）（内部標準）と20 μ lの酢酸を添加したクロロホルム0.25ml、メタノール0.5mlを加え、十分に攪拌した後、15分間静置した。さらに、1.5%KCl 0.25mlとクロロホルム0.25mlを添加し、十分に攪拌した後、15分間静置した。室温、1500rpmで5分間遠心分離を行った後、下層部分を採取し、窒素ガスで乾燥した。乾燥したサンプルに、0.5N水酸化カリウム-メタノール溶液を100 μ l加え、70℃で30分間恒温することによりトリアシルグリセロールを加水分解した。3-フッ化ホウ素メタノール錯体溶液を0.3ml添加して乾燥物を溶解し、80℃で10分間恒温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、飽和食塩水0.2mlとヘキサン0.3mlを添加し、十分に攪拌した後、30分間静置した。脂肪酸のメチルエステルが含まれるヘキサン層（上層部分）を採取し、ガスクロマトグラフィ（GC）分析に供した。

[0125] 5. GC分析

GC解析は下記の条件で行った。

キャピラリーカラム：DB-1 MS 30m×200 μ m×0.25 μ m
(J&W Scientific)、移動層：高純度ヘリウム、カラム内流量：1.0 mL/min、昇温プログラム：150℃（0.5分間）→320℃（2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：75：1）、圧力14.49 psi、104 mL/min、注入量5 μ L、洗浄バイアル：メタノール・クロロホルム、検出器温度：300℃

得られたデータを実施例1と同様の方法で解析した。結果を図16に示す。

[0126] 図16から明らかなように、NoKASIV遺伝子及びCTE遺伝子導入株では、CTE

遺伝子導入株（親株）に比べて、C 1 2 : 0 及び C 1 4 : 0 脂肪酸の含有率が高かった。

[0127] 本発明をその実施態様とともに説明したが、我々は特に指定しない限り我々の発明を説明のどの細部においても限定しようとするものではなく、添付の請求の範囲に示した発明の精神と範囲に反することなく幅広く解釈されるべきであるとする。

[0128] 本願は、2014年3月3日に日本国で特許出願された特願2014-040536に基づく優先権を主張するものであり、これはここに参照してその内容を本明細書の記載の一部として取り込む。

請求の範囲

- [請求項1] 下記（１）及び（２）の工程を含む脂質の製造方法。
- （１）宿主に下記（ａ）又は（ｂ）のタンパク質をコードする遺伝子を導入して形質転換体を得る工程
- （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）（ａ）のタンパク質のアミノ酸配列と６０％以上の同一性を有する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
- （２）得られた形質転換体から脂質を採取する工程
- [請求項2] 前記脂質が、中鎖脂肪酸又はそのエステルである、請求項１記載の製造方法。
- [請求項3] 前記（ａ）又は（ｂ）のタンパク質が、中鎖アシル-ACP特異的なβ-ケトアシル-ACPシンターゼである、請求項１又は２記載の製造方法。
- [請求項4] 前記工程（１）において、宿主に中鎖アシル-ACP特異的なアシル-ACPチオエステラーゼをコードする遺伝子を共導入する、請求項１～３のいずれか１項記載の製造方法。
- [請求項5] 前記工程（２）が、セルレニンを含有する培地で形質転換体を培養する工程を含む、請求項１～４のいずれか１項記載の製造方法。
- [請求項6] 前記宿主が微生物又は植物である、請求項１～５のいずれか１項記載の製造方法。
- [請求項7] 前記微生物が微細藻類である、請求項６記載の製造方法。
- [請求項8] 前記微生物が大腸菌である、請求項６記載の製造方法。
- [請求項9] 宿主に下記（ａ）又は（ｂ）のタンパク質をコードする遺伝子を導入して得られる形質転換体。
- （ａ）配列番号１で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質
- （ｂ）（ａ）のタンパク質のアミノ酸配列と６０％以上の同一性を有する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10] 宿主に前記 (a) 又は (b) のタンパク質をコードする遺伝子、及び中鎖アシル-ACP 特異的なアシル-ACP チオエステラーゼをコードする遺伝子を共導入して得られる、請求項9記載の形質転換体。

[請求項11] 前記宿主が微生物又は植物である、請求項9又は10記載の形質転換体。

[請求項12] 前記微生物が微細藻類である、請求項11記載の形質転換体。

[請求項13] 前記微生物が大腸菌である、請求項11記載の形質転換体。

[請求項14] 下記 (a) 又は (c) のタンパク質。

(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

(c) (a) のタンパク質のアミノ酸配列と91%以上の同一性を有する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

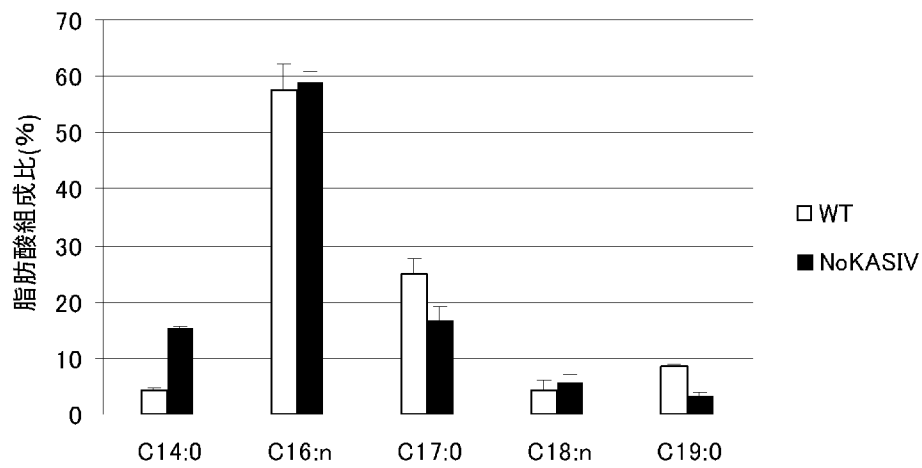
[請求項15] 請求項14記載のタンパク質をコードする遺伝子。

[請求項16] 下記 (d) 又は (f) のDNAからなる遺伝子。

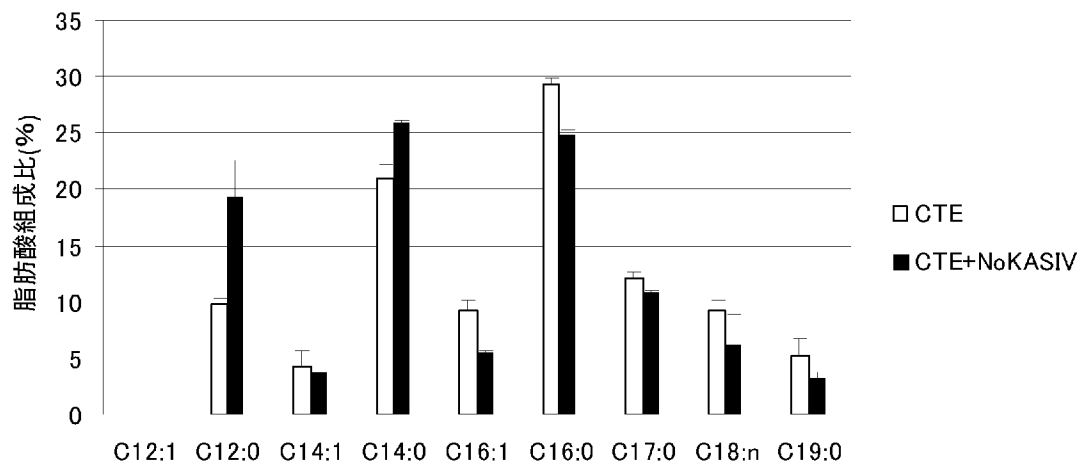
(d) 配列番号2で表される塩基配列からなるDNA

(f) (d) のDNAの塩基配列と78%以上の同一性を有する塩基配列からなり、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

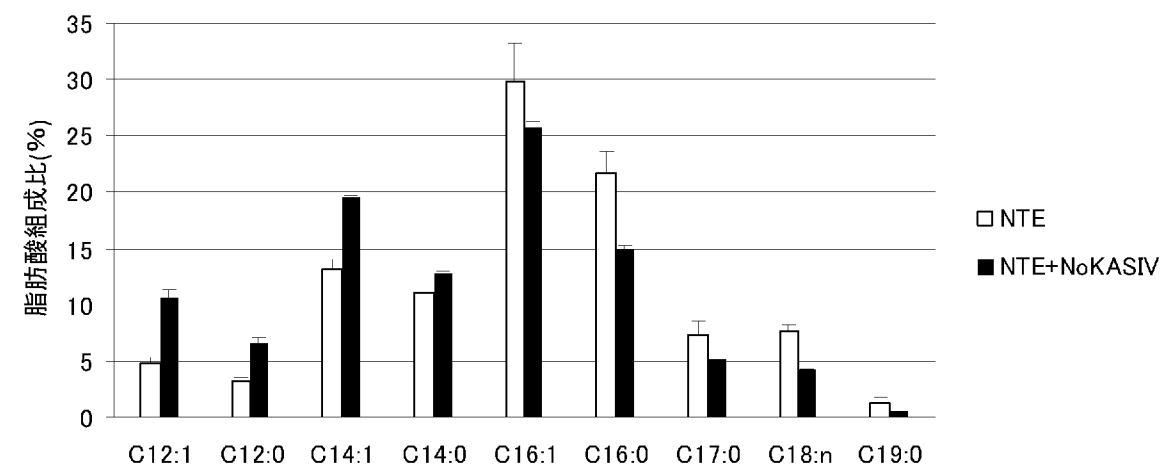
[図1]



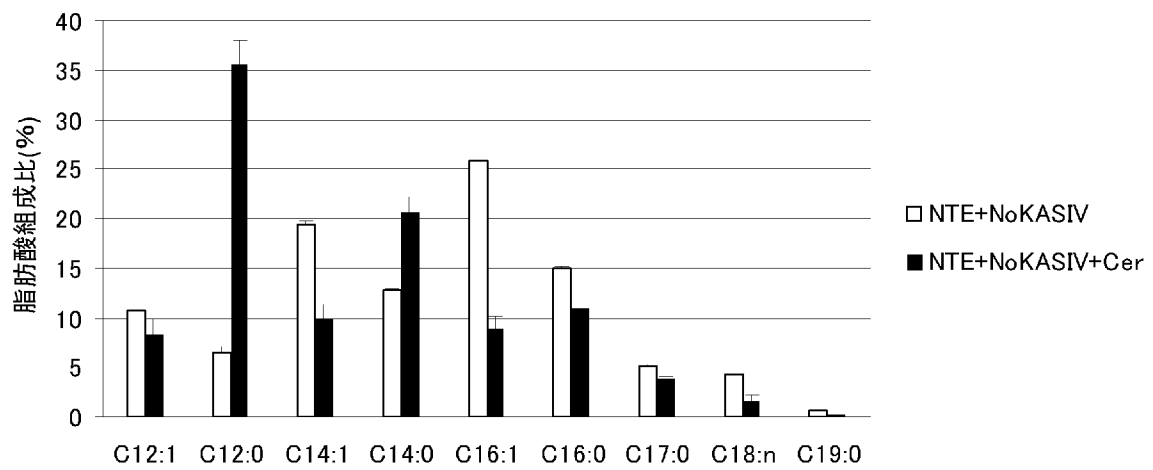
[図2]



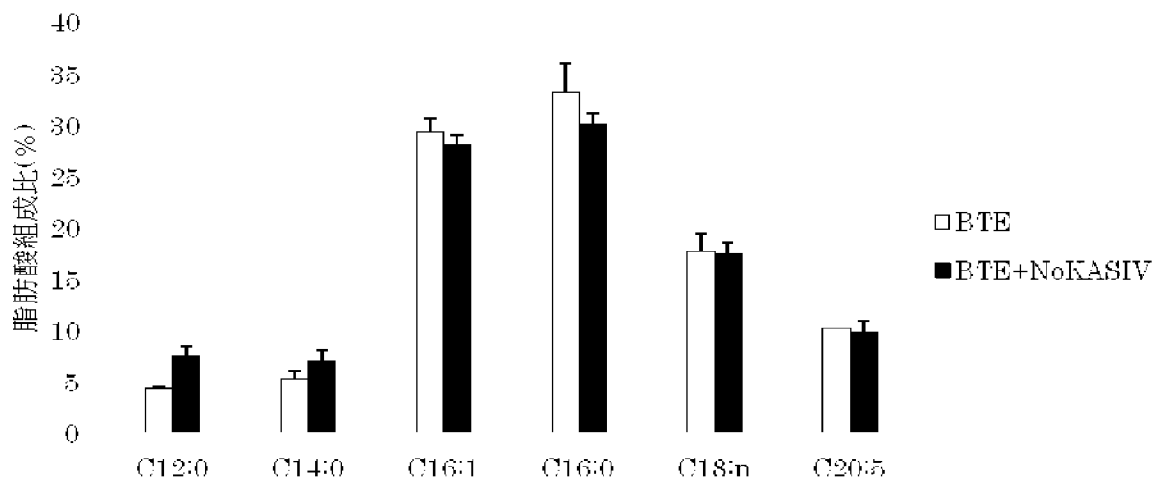
[図3]



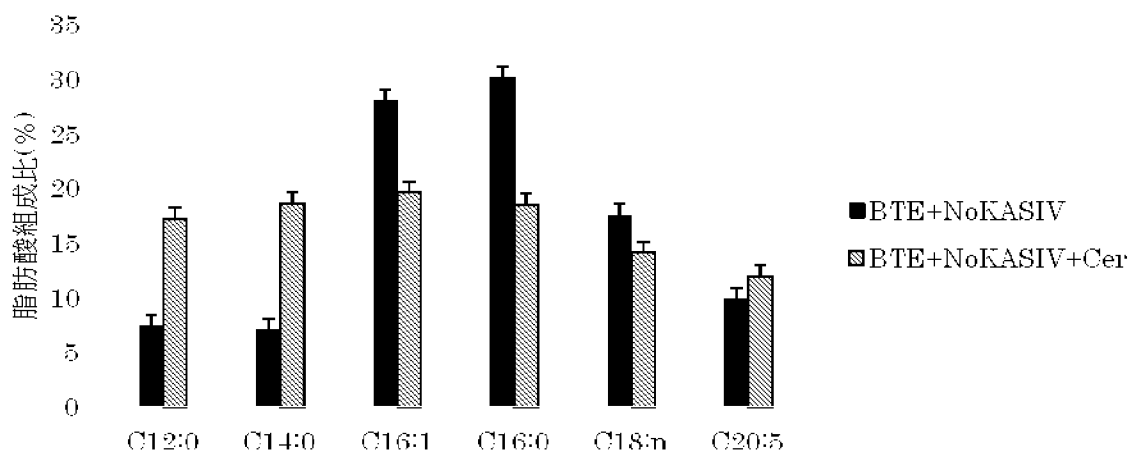
[図4]



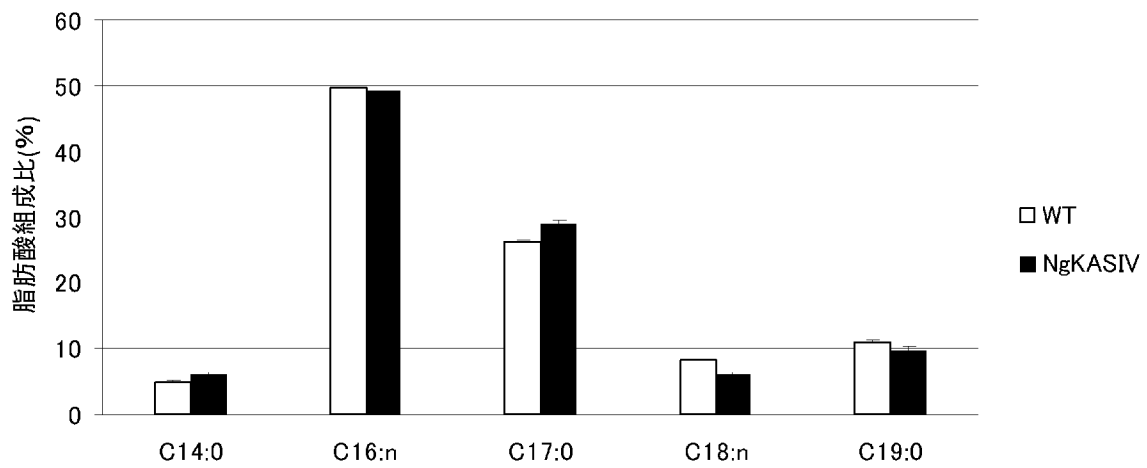
[図5]



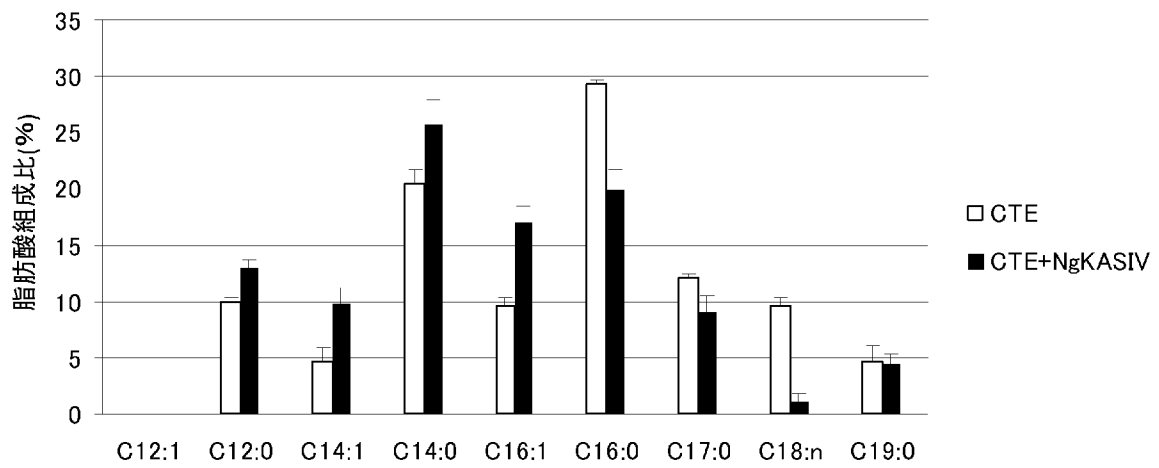
[図6]



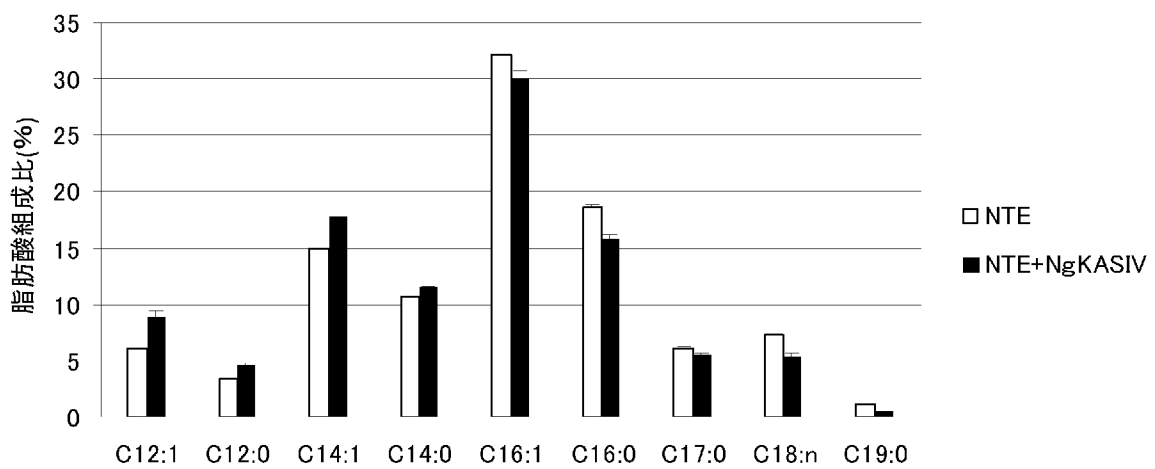
[図7]



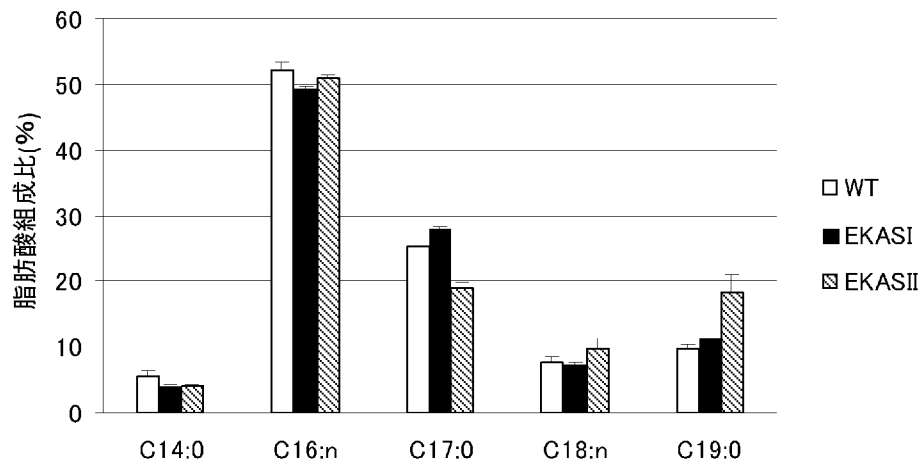
[図8]



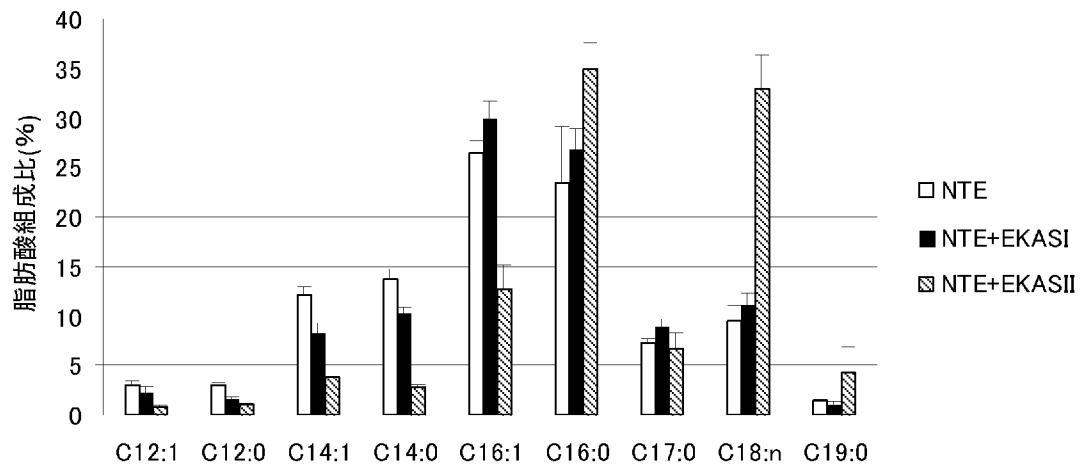
[図9]



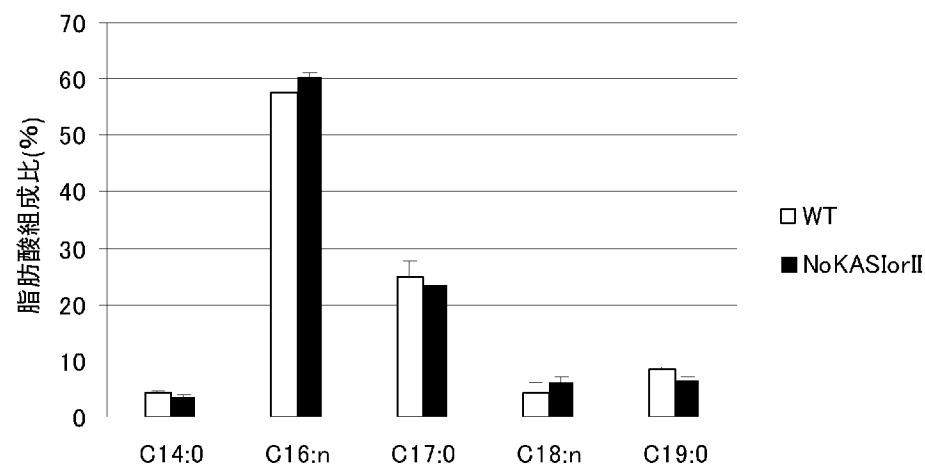
[図10]



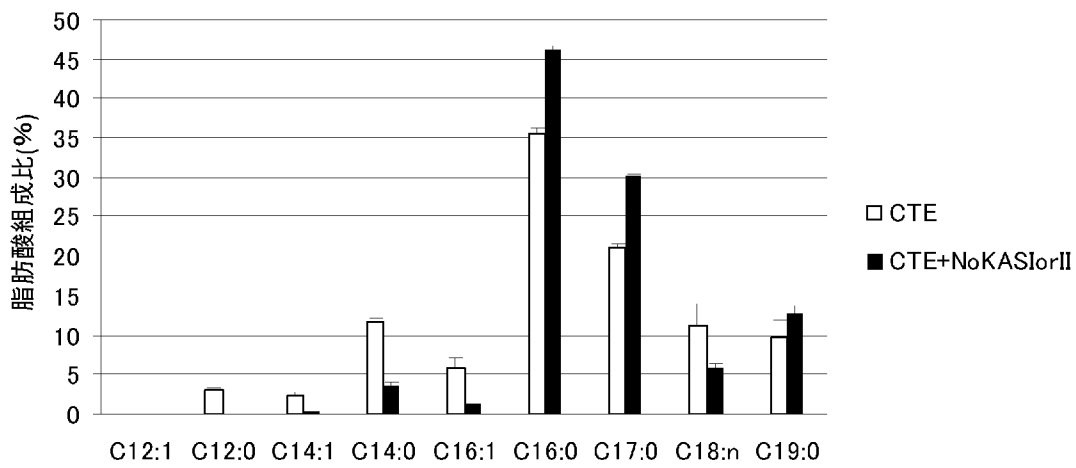
[図11]



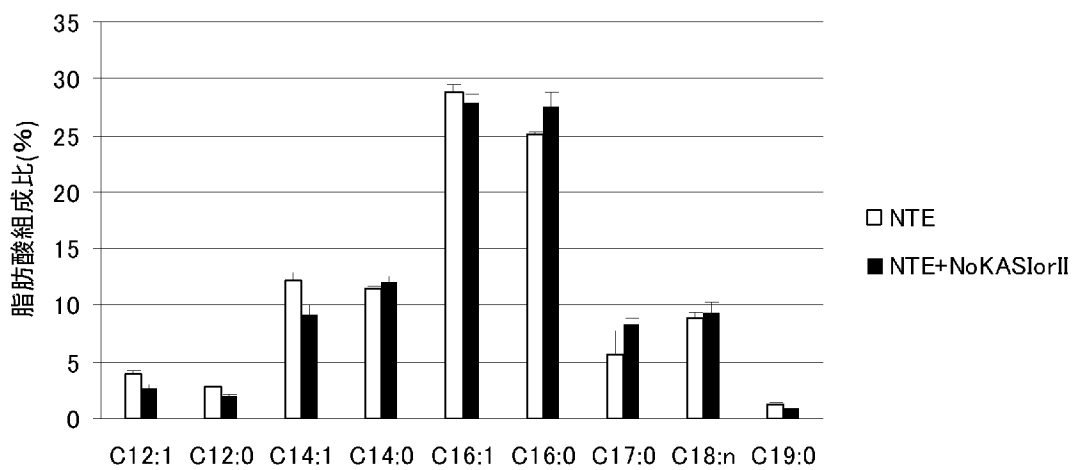
[図12]



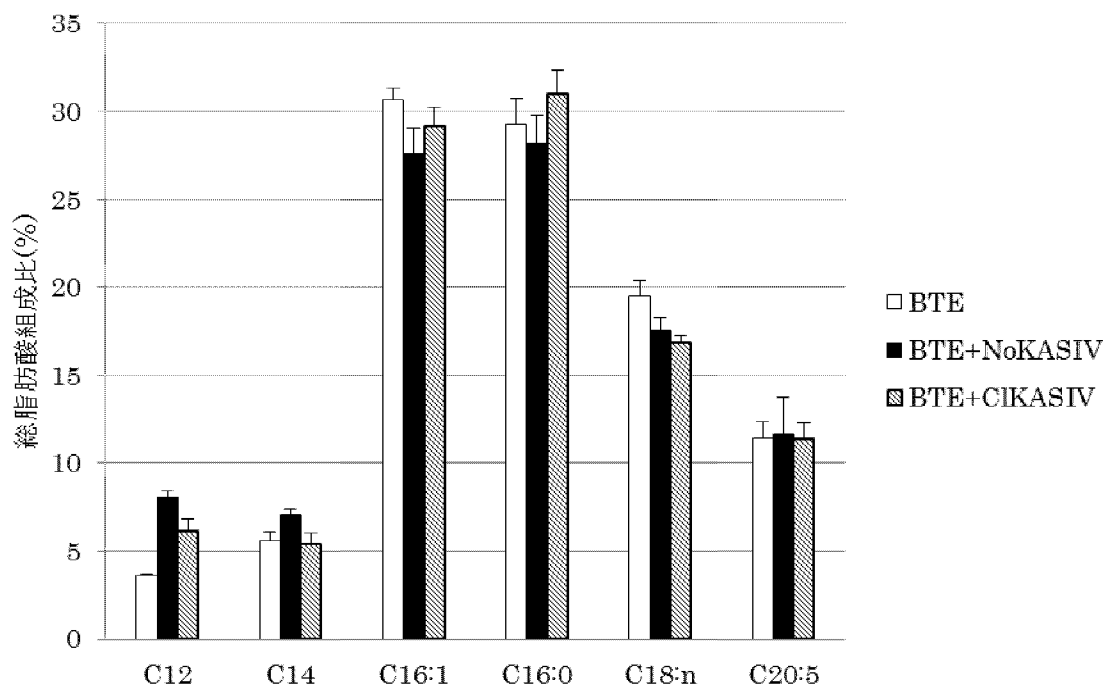
[図13]



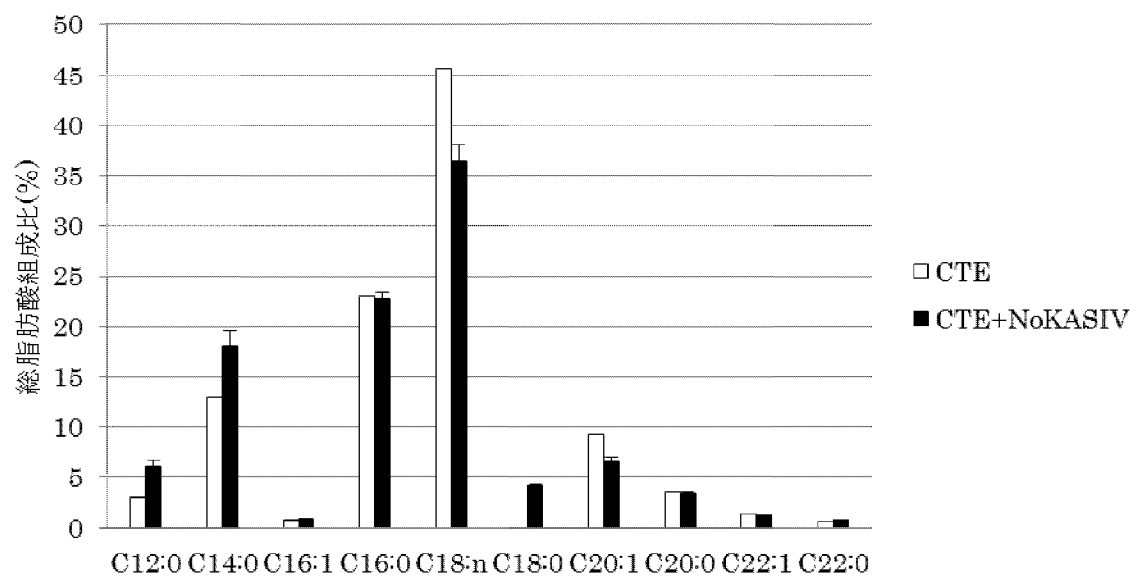
[図14]



[図15]



[図16]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/054960

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/00(2006.01)i, C12N1/13(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N9/18(2006.01)i, C12N9/88(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)

C12N15/00, C12N1/13, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N9/18, C12N9/88, C12N15/09, C12P7/64

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)

CAPLUS/MEDLINE/WPIDS/BIOSIS(STN), JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580(JDREAMIII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> A	US 2013/0102040 A1 (COLORADO SCHOOL OF MINES), 25 April 2013 (25.04.2013), (Family: none)	1-3, 5-9, <u>11-13</u> 4, 10, 14-16
<u>X</u> A	RADAKOVITS R. et al., Draft genome sequence and genetic transformation of the oleaginous alga Nannochloropsis gaditana, Nat. Commun., 2012, vol.3:686, doi: 10.1038/ncomms1688	<u>9, 11-13</u> 1-8, 10, 14-16
<u>X</u> A	CORTEGGIANI C. E. et al., Chromosome scale genome assembly and transcriptome profiling of Nannochloropsis gaditana in nitrogen depletion, Mol. Plant., 2014.02, vol.7, no.2, p.323-35	<u>9, 11-13</u> 1-8, 10, 14-16

☒ 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
13 May 2015 (13.05.15)

Date of mailing of the international search report
26 May 2015 (26.05.15)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/054960

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2001-309797 A (Director General of National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 06 November 2001 (06.11.2001), (Family: none)	5-8
A	JP 2010-511377 A (Ocean Nutrition Canada Ltd.), 15 April 2010 (15.04.2010), & US 2010/0285105 A1 & WO 2008/129358 A2 & EP 2082053 A	5-8
A	JP 2002-542829 A (Calgene L.L.C.), 17 December 2002 (17.12.2002), & WO 2000/066750 A2 & EP 1173584 A	1-16
A	WO 2012/106560 A1 (Solazyme, Inc.), 09 August 2012 (09.08.2012), & US 2012/0203018 A1 & WO 2012/106560 A1 & EP 2670855 A	1-16

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12N15/00(2006.01)i, C12N1/13(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i,
C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N9/18(2006.01)i, C12N9/88(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（I P C））

Int.Cl. C12N15/00, C12N1/13, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N9/18, C12N9/88, 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

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/WPIDS/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq,
SwissProt/GeneSeq

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
<u>X</u> A	US 2013/0102040 A1 (COLORADO SCHOOL OF MINES) 2013.04.25, (ファミリーなし)	1-3, 5-9, <u>11-13</u> 4, 10, 14-16
<u>X</u> A	RADAKOVITS R. et al., Draft genome sequence and genetic transformation of the oleaginous alga Nannochloropsis gaditana, Nat. Commun., 2012, vol.3:686, doi: 10.1038/ncomms1688	<u>9, 11-13</u> 1-8, 10, 14-16

☒ 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

1 3 . 0 5 . 2 0 1 5

国際調査報告の発送日

2 6 . 0 5 . 2 0 1 5

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

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）

松田 芳子

4 B

3 1 2 6

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

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
<u>X</u> A	CORTEGGIANI C. E. et al., Chromosome scale genome assembly and transcriptome profiling of <i>Nannochloropsis gaditana</i> in nitrogen depletion, Mol. Plant., 2014.02, vol.7, no.2, p.323-35	<u>9, 11-13</u> 1-8, 10, 14-16
A	JP 2001-309797 A (経済産業省産業技術総合研究所長) 2001.11.06, (ファミリーなし)	5-8
A	JP 2010-511377 A (オーシャン・ニュートリション・カナダ・リミ テッド) 2010.04.15, & US 2010/0285105 A1 & WO 2008/129358 A2 & EP 2082053 A	5-8
A	JP 2002-542829 A (カルジーン エルエルシー) 2002.12.17, & WO 2000/066750 A2 & EP 1173584 A	1-16
A	WO 2012/106560 A1 (ソラザイム、インク) 2012.08.09, & US 2012/0203018 A1 & WO 2012/106560 A1 & EP 2670855 A	1-16