(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 9 日(09.06.2016)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2016/088511 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01) *C12N 9/16* (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01) *C12P 7/64* (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2015/081357

(22) 国際出願日: 2015 年 11 月 6 日(06.11.2015)

(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 2014-246573 2014 年 12 月 5 日(05.12.2014) 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).

(72) 発明者: 尾崎 達郎(OZAKI, Tatsuro); 〒6408580 和歌山県和歌山市湊１３３４ 花王株式会社研究所内 Wakayama (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１０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)）

(54) **Title**: METHOD FOR PRODUCING LIPID USING ACYL-ACP THIOESTERASE

(54) 発明の名称 : アシル－ＡＣＰチオエステラーゼを用いた脂質の製造方法

(57) **Abstract**: [Problem] To provide a method for producing lipids with which the productivity of a medium-chain fatty acid or lipid having the same as a constituent is improved. [Solution] A method for producing lipids in which transformants obtained by introducing a gene that encodes any one of proteins (A)-(C) into a host are cultured, and lipids are collected from the culture. (A) A protein comprising an amino acid sequence of positions 611-772 of SEQ ID NO: 1. (B) A protein comprising an amino acid sequence that has 80% or greater identity with an amino acid sequence of positions 611-772 of SEQ ID NO: 1, and having acyl-ACP thioesterase activity. (C) A protein having the amino acid sequence of protein (A) or (B) and having acyl-ACP thioesterase activity.

(57) 要約: 【課題】中鎖脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質の生産性を向上させる、脂質の製造方法を提供する。【解決手段】宿主に下記タンパク質(A)～(C)のいずれか１つをコードする遺伝子が導入されている形質転換体を培養し、培養物から脂質を採取する、脂質の製造方法。(A)配列番号１の６１１位～７７２位のアミノ酸配列からなるタンパク質。(B)配列番号１の６１１位～７７２位のアミノ酸配列との同一性が８０％以上のアミノ酸配列からなり、かつアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ活性を有するタンパク質。(C)前記タンパク質(A)又は(B)のアミノ酸配列を有し、かつアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ活性を有するタンパク質。

WO 2016/088511 A1

明　細　書

発明の名称 ：

アシル－ＡＣＰチオエステラーゼを用いた脂質の製造方法

技術分野

[0001]　本発明は、アシル－ＡＣＰチオエステラーゼを用いた脂質の製造方法に関する。また、本発明は当該方法に用いるアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ、これをコードする遺伝子、及び該遺伝子を導入した形質転換体に関する。

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

　例えば、炭素数１２～１８前後の高級脂肪酸を還元して得られる高級アルコールの誘導体は、界面活性剤として用いられている。アルキル硫酸エステル塩やアルキルベンゼンスルホン酸塩等は陰イオン性界面活性剤として利用されている。また、ポリオキシアルキレンアルキルエーテルやアルキルポリグリコシド等は非イオン性界面活性剤として利用されている。そしてこれらの界面活性剤は、いずれも洗浄剤又は殺菌剤に利用されている。同じ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級アミン塩は、繊維処理剤や毛髪リンス剤又は殺菌剤等に日常的に利用されている。また、ベンザルコニウム型４級アンモニウム塩は殺菌剤や防腐剤として日常的に利用されている。さらに、炭素数１８前後の高級アルコールは植物の成長促進剤としても有用である。

[0003]　このように脂肪酸や脂質の利用は多岐にわたり、そのため植物等において生体内での脂肪酸や脂質の生産性を向上させる試みが行われている。さらに、脂肪酸の用途や有用性はその炭素数に依存するため、脂肪酸の炭素数、即

ち鎖長を制御する試みも行われている。

例えば、ゲッケイジュ（Umbellularia californica（California bay））由来のアシル－ＡＣＰチオエステラーゼの導入により炭素数１２の脂肪酸を蓄積させる方法（特許文献１、非特許文献１）等が提案されている。

[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。例えば、上述のアシル－ＡＣＰチオエステラーゼについても、現在のところ、藻類由来のものはほとんど報告されておらず、ナンノクロロプシス（Nannochloropsis）属等でわずかに報告例があるのみである（例えば、特許文献２）。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：国際公開第９２／２０２３６号

特許文献2：国際公開第２０１４／１０３９３０号

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Voelker TA, et al., Science, 1992, vol. 257(5066), p. 72-74

発明の概要

[0007] 本発明は、宿主に下記タンパク質(A)～(C)のいずれか１つをコードする遺伝子が導入されている形質転換体を培養し、培養物から脂質を採取する、脂質の製造方法に関する。

(A)配列番号１の６１１位～７７２位のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(B)配列番号１の６１１位～７７２位のアミノ酸配列との同一性が８０％以上

のアミノ酸配列からなり、かつアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ活性を有するタンパク質。

(C)前記タンパク質(A)又は(B)のタンパク質のアミノ酸配列を有し、かつアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ活性を有するタンパク質。

[0008] また、本発明は、前記タンパク質(A)～(C)（以下、本発明のタンパク質又はアシル－ＡＣＰチオエステラーゼともいう。）に関する。

また、本発明は、前記タンパク質(A)～(C)のいずれか１つをコードする遺伝子（以下、本発明の遺伝子ともいう。）に関する。

また、本発明は、前記タンパク質(A)～(C)のいずれか１つをコードする遺伝子を宿主に導入してなる形質転換体に関する。

[0009] 本発明の上記及び他の特徴及び利点は、下記の記載からより明らかになるであろう。

発明を実施するための形態

[0010] 本発明は、中鎖脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質の生産性を向上させる、脂質の製造方法の提供に関する。

また、本発明は、前記方法に好適に用いることができる、藻類由来の新規アシル－ＡＣＰチオエステラーゼ、及びこれをコードする遺伝子の提供に関する。

また、本発明は、前記遺伝子の発現を促進させ、脂質の生産性又は脂肪酸組成が変化した形質転換体の提供に関する。

[0011] 本発明者は、藻類由来の新たなアシル－ＡＣＰチオエステラーゼについて研究を行った。その結果、クリプト藻（cryptophyte）から新規のアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ及びこれをコードするアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ遺伝子を見出した。そして、当該アシル－ＡＣＰチオエステラーゼ遺伝子を用いて形質転換を行った結果、形質転換体において、脂質中の総脂肪酸成分における特定の脂肪酸の含有率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。

[0012] 本発明によれば、新規アシル－ＡＣＰチオエステラーゼ、これをコードす

る遺伝子、及び当該遺伝子が導入されている形質転換体を提供することができる。当該形質転換体を用いた本発明の製造方法は、中鎖脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質の生産性に優れる。特に、本発明の製造方法は炭素数８～１６、好ましくは炭素数８～１４、より好ましくは炭素数１０～１４、より好ましくは炭素数１２～１４、より好ましくは炭素数１２及び１４、より好ましくは炭素数１２の脂肪酸、又はこれらを構成成分とする脂質の生産性に優れる。

本発明のアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ、これをコードする遺伝子、形質転換体、及び製造方法は、脂肪酸又は脂質の工業的生産に好適に用いることができる。

[0013] 本発明において「脂質」には、単純脂質、複合脂質及び誘導脂質が含まれ、具体的には、脂肪酸、脂肪族アルコール類、炭化水素類（アルカン等）、中性脂質（トリアシルグリセロール等）、ろう、セラミド、リン脂質、糖脂質、スルホ脂質等が含まれる。

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

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

また本明細書において「ストリンジェントな条件」としては、例えばMolecular Cloning－A LABORATORY MANUAL THIRD EDITION［Joseph Sambrook, David W. Russell., Cold Spring Harbor Laboratory Press］記載の方法が挙げられる。例えば、６×ＳＳＣ（１×ＳＳＣの組成：０．１５Ｍ塩化ナトリウム、０．０１５Ｍクエン酸ナトリウム、pH７．０）、０．５％ＳＤＳ、５×デンハート及び１００ｍｇ／ｍＬニシン精子ＤＮＡを含む溶液

にプローブとともに６５℃で８～１６時間恒温し、ハイブリダイズさせる条件が挙げられる。

また、本明細書において、「～」を用いて表される数値範囲は、「～」前後に記載される数値を下限値および上限値として含む範囲を意味する。

さらに本明細書において「中鎖」とは、脂肪酸又は脂肪酸残基の炭素数が８以上１６以下であることをいう。

以下、本発明のアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ、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。

[0014] １．アシル－ＡＣＰチオエステラーゼ

本発明のタンパク質は、配列番号１のアミノ酸配列中の少なくとも６１１位～７７２位までのアミノ酸配列を有するタンパク質、及び当該タンパク質と機能的に均等なタンパク質である。

アシル－ＡＣＰ（アシルキャリヤープロテイン）チオエステラーゼは、脂肪酸やその誘導体（トリアシルグリセロール（トリグリセリド）等）の生合成系に関与する酵素である。当該酵素は、植物体や藻類では葉緑体等の色素体内において、細菌・真菌や動物体では細胞質内において、脂肪酸生合成過程の中間体であるアシル－ＡＣＰ（脂肪酸残基であるアシル基とアシルキャリヤープロテインとからなる複合体）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。アシル－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。

アシル－ＡＣＰチオエステラーゼには、基質であるアシル－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－ＡＣＰチオエステラーゼが存在していることが知られている。よってアシル－ＡＣＰチオエステラーゼは、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。

本発明において、「アシル－ＡＣＰチオエステラーゼ活性」とは、アシル－ＡＣＰのチオエステル結合を加水分解する活性をいう。

[0015] 本発明のタンパク質として、具体的には以下のタンパク質(A)～(C)が挙げられる。

(A)配列番号１の６１１位～７７２位のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(B)配列番号１の６１１位～７７２位のアミノ酸配列との同一性が８０％以上のアミノ酸配列からなり、かつアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ活性を有するタンパク質。

(C)前記タンパク質(A)又は(B)のアミノ酸配列を有し、かつアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ活性を有するタンパク質。

[0016] 配列番号１は、クリプト藻の１種であるグィラルディア・セータ（Guillardia theta）由来のアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ（以下、「ＧｔＴＥ」とも略記する）のアミノ酸配列である。

グィラルディア・セータのゲノム配列情報は公開されているが、配列番号１に示すアミノ酸配列の機能はこれまで知られていなかった。本発明者は、配列番号１に示すアミノ酸配列からなるタンパク質が、アシル－ＡＣＰチオエステラーゼであることを同定した。さらに、本発明者が、配列番号１のアミノ酸配列と他の公知のアシル－ＡＣＰチオエステラーゼのアミノ酸配列を比較したところ、配列同一性（相同性）が非常に低かった。

さらに、本発明者は、配列番号１のアミノ酸配列中、６１１位～７７２位の領域がアシル－ＡＣＰチオエステラーゼとして機能するために重要で、アシル－ＡＣＰチオエステラーゼ活性を示すために十分な領域であることを見出した。すなわち、配列番号１の６１１位～７７２位のアミノ酸配列からなるタンパク質、及び当該アミノ酸配列を含むタンパク質は、アシル－ＡＣＰチオエステラーゼ活性を有する。

タンパク質(A)は、このアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ活性にとって十分な領域からなり、アシル－ＡＣＰチオエステラーゼとして機能する。

[0017] タンパク質(B)は、配列番号１の６１１位～７７２位のアミノ酸配列との同一性が８０％以上のアミノ酸配列からなり、かつ、アシル－ＡＣＰチオエステラーゼ活性を有する。

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

タンパク質(B)において、アシル－ＡＣＰチオエステラーゼ活性の点から、配列番号１の６１１位～７７２位のアミノ酸配列との同一性は、８５％以上が好ましく、９０％以上がより好ましく、９５％以上がさらに好ましく、９６％以上がよりさらに好ましく、９７％以上がよりさらに好ましく、９８％以上がよりさらに好ましく、９９％以上がよりさらに好ましい。

[0018] また、タンパク質(B)において、配列番号１の６１１位～７７２位のアミノ酸配列との同一性が８０％以上のアミノ酸配列としては、配列番号１の６１１位～７７２位のアミノ酸配列において１又は数個、好ましくは１個以上２０個以下、より好ましくは１個以上１５個以下、よりさらに好ましくは１個以上１０個以下、よりさらに好ましくは１個以上８個以下、よりさらに好ましくは１個以上５個以下、よりさらに好ましくは１個以上４個以下、よりさらに好ましくは１個以上３個以下、よりさらに好ましくは１又は２個、のアミノ酸が欠失、置換、挿入、又は付加されたアミノ酸配列が挙げられる。

なお、アミノ酸配列に欠失、置換、挿入、付加等の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。塩基配列に変異を導入する方法については、後述する。

[0019] タンパク質(C)は、そのアミノ酸配列の一部として前記タンパク質(A)又は(B)のアミノ酸配列を含み、かつアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ活性を示す。タンパク質(C)は、前記タンパク質(A)又は(B)のアミノ酸配列以外の配列を含んでいてもよい。

タンパク質(C)を構成するアミノ酸配列中、前記タンパク質(A)又は(B)のアミノ酸配列以外の配列としては、例えば、配列番号１のうちの６１１位～７７２位以外の任意のアミノ酸配列、配列番号１のうちの６１１位～７７２位以外の任意のアミノ酸配列との同一性が８０％以上、好ましくは８５％以上、より好ましくは９０％以上、よりさらに好ましくは９５％以上、よりさらに好ましくは９６％以上、よりさらに好ましくは９７％以上、よりさらに好ましくは９８％以上、よりさらに好ましくは９９％以上、のアミノ酸配列、又はこれらの配列に１若しくは数個、好ましくは１個以上２０個以下、より好ましくは１個以上１５個以下、より好ましくは１個以上１０個以下、より好ましくは１個以上８個以下、より好ましくは１個以上５個以下、より好ましくは１個以上４個以下、より好ましくは１個以上３個以下、より好ましくは１若しくは２個、のアミノ酸が欠失、置換、挿入、若しくは付加されたアミノ酸配列、等が挙げられる。これらの配列は、前記タンパク質(A)又は(B)のアミノ酸配列のＮ末端側に付加されることが好ましい。

また、タンパク質(C)として、前記タンパク質(A)又は(B)のアミノ酸配列にタンパク質の輸送や分泌に関与するシグナルペプチドが付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質も好ましい。シグナルペプチドの付加の例としては、葉緑体移行シグナルペプチドのＮ末端への付加等が挙げられる。

[0020] 前記タンパク質(C)として、配列番号１の１～６１０位の任意の位置でＮ末端側のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列からなるタンパク質であってもよい。

さらに、特定の脂肪酸、例えば中鎖脂肪酸の生産性の点からは、タンパク質(C)としては、下記タンパク質(C1)～(C20)が好ましい。

(C1)配列番号１の１位～７７２位のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(C2)配列番号１の４８７位～７７２位のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(C3)配列番号１の４８８位～７７２位のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(C4)配列番号１の４９７位～７７２位のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(C5)配列番号１の５０７位～７７２位のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(C6)配列番号１の５１７位～７７２位のアミノ酸配列からなるタンパク質。
(C7)配列番号１の５２７位～７７２位のアミノ酸配列からなるタンパク質。
(C8)配列番号１の５３７位～７７２位のアミノ酸配列からなるタンパク質。
(C9)配列番号１の５４７位～７７２位のアミノ酸配列からなるタンパク質。
(C10)配列番号１の５５７位～７７２位のアミノ酸配列からなるタンパク質。
(C11)配列番号１の５６７位～７７２位のアミノ酸配列からなるタンパク質。
(C12)配列番号１の５７７位～７７２位のアミノ酸配列からなるタンパク質。
(C13)配列番号１の５８７位～７７２位のアミノ酸配列からなるタンパク質。
(C14)配列番号１の５９７位～７７２位のアミノ酸配列からなるタンパク質。
(C15)配列番号１の６０７位～７７２位のアミノ酸配列からなるタンパク質。
(C16)配列番号１の６０８位～７７２位のアミノ酸配列からなるタンパク質。
(C17)配列番号１の６０９位～７７２位のアミノ酸配列からなるタンパク質。
(C18)配列番号１の６１０位～７７２位のアミノ酸配列からなるタンパク質。
(C19)前記タンパク質(C1)～(C18)のいずれか１つのアミノ酸配列との同一性が８０％以上、好ましくは８５％以上、より好ましくは９０％以上、よりさらに好ましくは９５％以上、よりさらに好ましくは９６％以上、よりさらに好ましくは９７％以上、よりさらに好ましくは９８％以上、よりさらに好ましくは９９％以上、のアミノ酸配列からなり、かつアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ活性を有するタンパク質。
(C20)前記タンパク質(C1)～(C18)のいずれか１つのアミノ酸配列に１又は数個、好ましくは１個以上２０個以下、より好ましくは１個以上１５個以下、より好ましくは１個以上１０個以下、より好ましくは１個以上８個以下、より好ましくは１個以上５個以下、より好ましくは１個以上４個以下、より好ましくは１個以上３個以下、より好ましくは１又は２個、のアミノ酸が欠失、置換、挿入、又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ活性を有するタンパク質。

なお、前記タンパク質(C1)～(C18)がアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ活性を有することは、本発明者により確認されている。

[0021] 本発明のタンパク質(C)として好ましくは、前記タンパク質(C13)、前記タンパク質(C14)、前記タンパク質(C15)、前記タンパク質(C16)、前記タンパク質(C17)、前記タンパク質(C13)～(C17)のいずれか１つのアミノ酸配列との同一性が８０％以上、好ましくは８５％以上、より好ましくは９０％以上、よりさらに好ましくは９５％以上、よりさらに好ましくは９６％以上、よりさらに好ましくは９７％以上、よりさらに好ましくは９８％以上、よりさらに好ましくは９９％以上、のアミノ酸配列からなり、かつアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ活性を有するタンパク質、又は前記タンパク質(C13)～(C17)のいずれか１つのアミノ酸配列に１若しくは数個、好ましくは１個以上２０個以下、より好ましくは１個以上１５個以下、より好ましくは１個以上１０個以下、より好ましくは１個以上８個以下、より好ましくは１個以上５個以下、より好ましくは１個以上４個以下、より好ましくは１個以上３個以下、より好ましくは１若しくは２個、のアミノ酸が欠失、置換、挿入、若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ活性を有するタンパク質である。

[0022] タンパク質がアシル－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－ＡＣＰチオエステラーゼ遺伝子を連結したＤＮＡを脂肪酸分解系が欠損した宿主細胞へ導入し、導入したアシル－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－ＡＣＰチオエステラーゼ遺伝子を連結したＤＮＡを宿主細胞へ導入し、導入したアシル－ＡＣＰ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、細胞の破砕液に対し、Yuanらの方法（Yuan L, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995, vol. 92(23), p. 10639-10643）によって調製した各種アシル－ＡＣＰを基質とした反応を行うことにより、アシル－ＡＣＰチオ

エステラーゼ活性を測定することができる。

[0023] 本発明の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、グィラルディア・セータから単離、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、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、後述するアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ遺伝子を用いることができる。

また、グィラルディア・セータ等のクリプト藻は、私的又は公的な研究所等の保存機関より入手することもできる。例えば、National Center for Marine Algae and Microbiota (NCMA：旧CCMP)、The culture collection of algae at University of Texas at Austin (UTEX)、独立行政法人国立環境研究所 (NIES)、Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP)、Australian National Algae Culture Collection (CSIRO) 等から入手できる。

[0024] ２．アシル－ＡＣＰチオエステラーゼ遺伝子

本発明のアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ遺伝子は、前記タンパク質(A)～(C)のいずれか１つをコードする遺伝子である。

タンパク質(A)～(C)のいずれか１つをコードする遺伝子の例として、配列番号２や配列番号３に示す塩基配列からなる遺伝子が挙げられる。

配列番号２に示す塩基配列は、グィラルディア・セータ由来の野生型アシル－ＡＣＰチオエステラーゼをコードする遺伝子の塩基配列の一例である。配列番号２の１８３１位～２３１６位の塩基配列は、配列番号１の６１１位～７７２位のアミノ酸配列をコードする。なお、配列番号２の２３１７位～２３１９位の塩基配列は終止コドンであり、アミノ酸には対応していない。

配列番号３に示す塩基配列は、配列番号１のアミノ酸配列情報に基づいて、大腸菌のコドン使用頻度に合わせてコドン最適化を施した塩基配列である。配列番号３の１位～８５８位の塩基配列は、配列番号１の４８７位～７７

２位のアミノ酸配列をコードする。配列番号３の３７３位～８５８位の塩基配列は、配列番号１の６１１位～７７２位のアミノ酸配列をコードする。なお、配列番号３の８５９位～８６１位の塩基配列は終止コドンであり、アミノ酸には対応していない。

[0025] 前記タンパク質(A)～(C)のいずれか１つをコードする遺伝子の具体例として、下記ＤＮＡ(a)～(f)のいずれか１つからなる遺伝子が例示できる。しかし、本発明はこれらに限定されるものではない。

(a)配列番号２の１８３１位～２３１９位の塩基配列からなるＤＮＡ。

(b)配列番号２の１８３１位～２３１９位の塩基配列との同一性が８０％以上の塩基配列からなり、かつアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ活性を有するタンパク質をコードするＤＮＡ。

(c)前記ＤＮＡ(a)又は(b)の塩基配列を有し、かつアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ活性を有するタンパク質をコードするＤＮＡ。

(d)配列番号３の３７３位～８６１位の塩基配列からなるＤＮＡ。

(e)配列番号３の３７３位～８６１位の塩基配列との同一性が８０％以上の塩基配列からなり、かつアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ活性を有するタンパク質をコードするＤＮＡ。

(f)前記ＤＮＡ(d)又は(e)の塩基配列を有し、かつアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ活性を有するタンパク質をコードするＤＮＡ。

[0026] ＤＮＡ(b)において、アシル－ＡＣＰチオエステラーゼ活性の点から、配列番号２の１８３１位～２３１９位の塩基配列との同一性は、８５％以上が好ましく、９０％以上がより好ましく、９５％以上がさらに好ましく、９６％以上がよりさらに好ましく、９７％以上がよりさらに好ましく、９８％以上がよりさらに好ましく、９９％以上がよりさらに好ましい。

　また、ＤＮＡ(b)において、配列番号２の１８３１位～２３１９位の塩基配列との同一性が８０％以上の塩基配列としては、配列番号２の１８３１位～２３１９位の塩基配列において１又は数個、好ましくは１個以上２０個以下、より好ましくは１個以上１５個以下、より好ましくは１個以上１０個以下

、より好ましくは１個以上８個以下、より好ましくは１個以上５個以下、より好ましくは１個以上４個以下、より好ましくは１個以上３個以下、より好ましくは１又は２個、の塩基が欠失、置換、挿入、又は付加された塩基配列が挙げられる。

[0027] ＤＮＡ(e)において、アシル－ＡＣＰチオエステラーゼ活性の点から、配列番号３の３７３位～８６１位の塩基配列との同一性は、８５％以上が好ましく、９０％以上がより好ましく、９５％以上がさらに好ましく、９６％以上がよりさらに好ましく、９７％以上がよりさらに好ましく、９８％以上がよりさらに好ましく、９９％以上がよりさらに好ましい。

また、ＤＮＡ(e)において、配列番号３の３７３位～８６１位の塩基配列との同一性が８０％以上の塩基配列としては、配列番号３の３７３位～８６１位の塩基配列において１又は数個、好ましくは１個以上２０個以下、より好ましくは１個以上１５個以下、より好ましくは１個以上１０個以下、より好ましくは１個以上８個以下、より好ましくは１個以上５個以下、より好ましくは１個以上４個以下、より好ましくは１個以上３個以下、より好ましくは１又は２個、の塩基が欠失、置換、挿入、又は付加された塩基配列が挙げられる。

[0028] 塩基配列に欠失、置換、挿入、付加等の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変異の導入方法としては、Splicing overlap extension (SOE) PCR (Horton et al., Gene, 1989, vol. 77, p. 61-68) を利用した方法、ＯＤＡ法 (Hashimoto-Gotoh et al., Gene, 1995, vol. 152, p. 271-276) 、Kunkel法 (Kunkel, T. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1985, vol. 82, p. 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) 、Transformer TM Site-Directed Mutagenesisキット (Clonetech社) 、KOD-Plus-Mutagenesis Kit (東洋紡社) 等の市販のキットを利用することもできる。また、ランダムな遺伝子変異を与えた後、適当な方法により酵素活性の評価及び遺伝子解析を行うことにより目

的遺伝子を取得することもできる。

[0029] さらにＤＮＡ(b)として、ＤＮＡ(a)と相補的な塩基配列からなるＤＮＡとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ活性を有するタンパク質をコードするＤＮＡも好ましい。

同様に、ＤＮＡ(e)として、ＤＮＡ(d)と相補的な塩基配列からなるＤＮＡとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ活性を有するタンパク質をコードするＤＮＡも好ましい。

[0030] ＤＮＡ(c)は、その塩基配列の一部として前記ＤＮＡ(a)又は(b)の塩基配列を含み、かつアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ活性を有するタンパク質をコードする。ＤＮＡ(c)は、前記ＤＮＡ(a)又は(b)の塩基配列以外の配列を含んでいてもよい。

ＤＮＡ(c)の塩基配列中、前記ＤＮＡ(a)又は(b)の塩基配列以外の配列としては、例えば、配列番号２のうちの１８３１位～２３１９位以外の任意の塩基配列、配列番号２のうちの１８３１位～２３１９位以外の任意の塩基配列との同一性が８０％以上、好ましくは８５％以上、より好ましくは９０％以上、よりさらに好ましくは９５％以上、よりさらに好ましくは９６％以上、よりさらに好ましくは９７％以上、よりさらに好ましくは９８％以上、よりさらに好ましくは９９％以上、の塩基配列、又は配列番号２のうちの１８３１位～２３１９位以外の任意の塩基配列に１若しくは数個、好ましくは１個以上２０個以下、より好ましくは１個以上１５個以下、より好ましくは１個以上１０個以下、より好ましくは１個以上８個以下、より好ましくは１個以上５個以下、より好ましくは１個以上４個以下、より好ましくは１個以上３個以下、より好ましくは１若しくは２個、の塩基が欠失、置換、挿入、若しくは付加された塩基配列、等が挙げられる。

また、前記ＤＮＡ(a)又は(b)の塩基配列以外の配列としては、タンパク質の輸送や分泌に関与するシグナルペプチドをコードする塩基配列も好ましい。シグナルペプチドとしては、前記タンパク質(C)で述べたものが挙げられる。

これらの配列は、前記ＤＮＡ(a)又は(b)の塩基配列の5'末端側に付加されることが好ましい。

[0031] 前記ＤＮＡ(c)として、配列番号２の１～１８３０位の任意の位置で5'末端側が欠失した塩基配列からなるＤＮＡであってもよい。

さらに、特定の脂肪酸、例えば中鎖脂肪酸の生産性の点からは、ＤＮＡ(c)としては、下記ＤＮＡ(c1)～(c20)が好ましい。

(c1)配列番号２の１位～２３１９位の塩基配列からなるＤＮＡ。

(c2)配列番号２の１４５９位～２３１９位の塩基配列からなるＤＮＡ。

(c3)配列番号２の１４６２位～２３１９位の塩基配列からなるＤＮＡ。

(c4)配列番号２の１４８９位～２３１９位の塩基配列からなるＤＮＡ。

(c5)配列番号２の１５１９位～２３１９位の塩基配列からなるＤＮＡ。

(c6)配列番号２の１５４９位～２３１９位の塩基配列からなるＤＮＡ。

(c7)配列番号２の１５７９位～２３１９位の塩基配列からなるＤＮＡ。

(c8)配列番号２の１６０９位～２３１９位の塩基配列からなるＤＮＡ。

(c9)配列番号２の１６３９位～２３１９位の塩基配列からなるＤＮＡ。

(c10)配列番号２の１６６９位～２３１９位の塩基配列からなるＤＮＡ。

(c11)配列番号２の１６９９位～２３１９位の塩基配列からなるＤＮＡ。

(c12)配列番号２の１７２９位～２３１９位の塩基配列からなるＤＮＡ。

(c13)配列番号２の１７５９位～２３１９位の塩基配列からなるＤＮＡ。

(c14)配列番号２の１７８９位～２３１９位の塩基配列からなるＤＮＡ。

(c15)配列番号２の１８１９位～２３１９位の塩基配列からなるＤＮＡ。

(c16)配列番号２の１８２２位～２３１９位の塩基配列からなるＤＮＡ。

(c17)配列番号２の１８２５位～２３１９位の塩基配列からなるＤＮＡ。

(c18)配列番号２の１８２８位～２３１９位の塩基配列からなるＤＮＡ。

(c19)前記ＤＮＡ(c1)～(c18)のいずれか１つの塩基配列との同一性が８０％以上、好ましくは８５％以上、より好ましくは９０％以上、よりさらに好ましくは９５％以上、よりさらに好ましくは９６％以上、よりさらに好ましくは９７％以上、よりさらに好ましくは９８％以上、よりさらに好ましくは９

９％以上、の塩基配列からなり、かつアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ活性を有するタンパク質をコードするＤＮＡ。

(c20)前記ＤＮＡ(c1)～(c18)のいずれか１つの塩基配列に１又は数個、好ましくは１個以上２０個以下、より好ましくは１個以上１５個以下、より好ましくは１個以上１０個以下、より好ましくは１個以上８個以下、より好ましくは１個以上５個以下、より好ましくは１個以上４個以下、より好ましくは１個以上３個以下、より好ましくは１又は２個、の塩基が欠失、置換、挿入、又は付加された塩基配列からなり、かつアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ活性を有するタンパク質をコードするＤＮＡ。

なお、前記ＤＮＡ(c1)～(c18)のいずれか１つからなる遺伝子がアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ活性を有するタンパク質をコードしていることは、本発明者により確認されている。

[0032] ＤＮＡ(f)は、その塩基配列の一部として前記ＤＮＡ(d)又は(e)の塩基配列を含み、かつアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ活性を有するタンパク質をコードする。ＤＮＡ(f)は、前記ＤＮＡ(d)又は(e)の塩基配列以外の配列を含んでいてもよい。

ＤＮＡ(f)の塩基配列中、前記ＤＮＡ(d)又は(e)の塩基配列以外の配列としては、例えば、配列番号３のうちの３７３位～８６１位以外の任意の塩基配列、配列番号３のうちの３７３位～８６１位以外の任意の塩基配列と８０％以上、好ましくは８５％以上、より好ましくは９０％以上、よりさらに好ましくは９５％以上、よりさらに好ましくは９６％以上、よりさらに好ましくは９７％以上、よりさらに好ましくは９８％以上、よりさらに好ましくは９９％以上、の塩基配列、又は配列番号３のうちの３７３位～８６１位以外任意の塩基配列に１若しくは数個、好ましくは１個以上２０個以下、より好ましくは１個以上１５個以下、より好ましくは１個以上１０個以下、より好ましくは１個以上８個以下、より好ましくは１個以上５個以下、より好ましくは１個以上４個以下、より好ましくは１個以上３個以下、より好ましくは１若しくは２個、の塩基が欠失、置換、挿入、若しくは付加された塩基配列、

等が挙げられる。

また、前記ＤＮＡ(d)又は(e)の塩基配列以外の配列としては、タンパク質の輸送や分泌に関与するシグナルペプチドをコードする塩基配列も好ましい。シグナルペプチドとしては、前記タンパク質(C)で述べたものが挙げられる。

これらの配列は、前記ＤＮＡ(d)又は(e)の塩基配列の5'末端側に付加されることが好ましい。

[0033] 前記ＤＮＡ(f)として、配列番号３の１～３７２位の任意の位置で5'末端側が欠失した塩基配列からなるＤＮＡであってもよい。

さらに、特定の脂肪酸、例えば中鎖脂肪酸の生産性の点からは、ＤＮＡ(f)としては、下記ＤＮＡ(f1)～(f19)が好ましい。

(f1)配列番号３の１位～８６１位の塩基配列からなるＤＮＡ。

(f2)配列番号３の４位～８６１位の塩基配列からなるＤＮＡ。

(f3)配列番号３の３１位～８６１位の塩基配列からなるＤＮＡ。

(f4)配列番号３の６１位～８６１位の塩基配列からなるＤＮＡ。

(f5)配列番号３の９１位～８６１位の塩基配列からなるＤＮＡ。

(f6)配列番号３の１２１位～８６１位の塩基配列からなるＤＮＡ。

(f7)配列番号３の１５１位～８６１位の塩基配列からなるＤＮＡ。

(f8)配列番号３の１８１位～８６１位の塩基配列からなるＤＮＡ。

(f9)配列番号３の２１１位～８６１位の塩基配列からなるＤＮＡ。

(f10)配列番号３の２４１位～８６１位の塩基配列からなるＤＮＡ。

(f11)配列番号３の２７１位～８６１位の塩基配列からなるＤＮＡ。

(f12)配列番号３の３０１位～８６１位の塩基配列からなるＤＮＡ。

(f13)配列番号３の３３１位～８６１位の塩基配列からなるＤＮＡ。

(f14)配列番号３の３６１位～８６１位の塩基配列からなるＤＮＡ。

(f15)配列番号３の３６４位～８６１位の塩基配列からなるＤＮＡ。

(f16)配列番号３の３６７位～８６１位の塩基配列からなるＤＮＡ。

(f17)配列番号３の３７０位～８６１位の塩基配列からなるＤＮＡ。

(f18)前記ＤＮＡ(f1)～(f17)のいずれか１つの塩基配列との同一性が８０％以上、好ましくは８５％以上、より好ましくは９０％以上、よりさらに好ましくは９５％以上、よりさらに好ましくは９６％以上、よりさらに好ましくは９７％以上、よりさらに好ましくは９８％以上、よりさらに好ましくは９９％以上、の塩基配列からなり、かつアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ活性を有するタンパク質をコードするＤＮＡ。

(f19)前記ＤＮＡ(f1)～(f17)のいずれか１つの塩基配列に１又は数個、好ましくは１個以上２０個以下、より好ましくは１個以上１５個以下、より好ましくは１個以上１０個以下、より好ましくは１個以上８個以下、より好ましくは１個以上５個以下、より好ましくは１個以上４個以下、より好ましくは１個以上３個以下、より好ましくは１又は２個、の塩基が欠失、置換、挿入、又は付加された塩基配列からなり、かつアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ活性を有するタンパク質をコードするＤＮＡ。

なお、前記ＤＮＡ(f1)～(f17)のいずれか１つからなる遺伝子がアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ活性を有するタンパク質をコードしていることは、本発明者により確認されている。

[0034] 本発明のアシル－ＡＣＰチオエステラ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や３に示す塩基配列に基づいて、人工合成により遺伝子を取得することができる。遺伝子の人工合成は、例えば、ユーロフィンジェノミクス社等のサービスを利用することができる。また、グィラルディア・セ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。

[0035] ３．形質転換体

本発明の形質転換体は、前記タンパク質(A)～(C)のいずれか１つをコードする遺伝子の発現を促進させた形質転換体である。

当該形質転換体では、脂質の生産能、特に中鎖脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質の生産能（中鎖脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質の生産量、生産される全脂肪酸に占める中鎖脂肪酸の割合、生産される全脂質に占める中鎖脂肪酸を構成成分とする脂質の割合）が有意に向上する。また、当該形質転換体では、宿主と比べ、脂質中の脂肪酸組成（生産される全脂肪酸に対する特定の脂肪酸の割合、生産される全脂質に占める特定の脂肪酸を構成成分とする脂質の割合）が変化する。そのため、当該形質転換体を用いた本発明は、特定の脂質、特に中鎖脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質、好ましくは炭素数８以上１６以下の脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質、より好ましくは炭素数８以上１４以下の脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質、より好ましくは炭素数１０以上１４以下の脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質、より好ましくは炭素数１２以上１４以下の脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質、よりさらに好ましくは炭素数１２及び１４の脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質、よりさらに好ましくは炭素数１２の脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質、の生産に好適に用いることができる。

さらに、本態様の形質転換体は、宿主自体に比べ、中鎖脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質の生産性が有意に向上する。そのため、当該形質転換体を用いた本発明は、脂質の生産に好適に用いることができる。

なお、アシル－ＡＣＰチオエステラーゼの脂肪酸又は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。また本明細書において、目的のタンパク質をコードする遺伝子の発現を促進させたものを「形質転換体」ともいい、目的のタンパク質をコードする遺伝子の発現を促進させていないものを「宿主」又は「野生株」ともいう。

[0036] アシル－ＡＣＰチオエステラーゼ遺伝子の発現を促進させる方法としては、常法より適宜選択することができる。例えば、前記アシル－ＡＣＰチオエステラーゼ遺伝子を宿主に導入する方法、前記アシル－ＡＣＰチオエステラーゼ遺伝子をゲノム上に有する宿主において、当該遺伝子の発現調節領域（プロモーター、ターミネーター等）を改変する方法、などが挙げられる。

[0037] アシル－ＡＣＰチオエステラーゼ遺伝子を宿主に導入して前記遺伝子の発現を促進させる方法について説明する。

本発明で好ましく用いることができる形質転換体は、アシル－ＡＣＰチオエステラーゼをコードする遺伝子を、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、アシル－ＡＣＰチオエステラーゼ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や遺伝子発現カセットを調製し、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。

[0038] 形質転換体の宿主としては特に限定されず、通常用いられるものより適宜選択することができる。例えば、微生物（藻類や微細藻類を含む）、植物体、又は動物体を用いることができる。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、バシラス（Bacillus）属に属する微生物、シネコシスティス（Synechocystis）属の微生物、シネココッカス（Synechococcus）属の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。

前記藻類や微細藻類としては、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、ナンノクロロプシス・オキュラータ、ナンノクロロプシス・ガ

ディタナ（Nannochloropsis gaditana）、ナンノクロロプシス・サリナ（Nannochloropsis salina）、ナンノクロロプシス・オセアニカ（Nannochloropsis oceanica）、ナンノクロロプシス・アトムス（Nannochloropsis atomus）、ナンノクロロプシス・マキュラタ（Nannochloropsis maculata）、ナンノクロロプシス・グラニュラータ（Nannochloropsis granulata）、ナンノクロロプシス・エスピー（Nannochloropsis sp.）、等が挙げられる。なかでも、脂質生産性の観点から、ナンノクロロプシス・オキュラータ、又はナンノクロロプシス・ガディタナが好ましく、ナンノクロロプシス・オキュラータがより好ましい。

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。

[0039] 遺伝子発現用プラスミドベクター又は遺伝子発現カセットの母体となるベクター（プラスミド）としては、アシル－ＡＣＰチオエステラーゼをコードする遺伝子を宿主に導入することができ、宿主細胞内で当該遺伝子を発現させることができるベクターであればよい。例えば、導入する宿主の種類に応じたプロモーターやターミネーター等の発現調節領域を有するベクターであって、複製開始点や選択マーカー等を有するベクターを用いることができる。また、プラスミド等の染色体外で自立増殖・複製するベクターであってもよいし、染色体内に組み込まれるベクターであってもよい。

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、pBluescript（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、pUC19（タカラバイオ社製）、P66（Chlamydomonas Center）、P-322（Chlamydomonas Center）、pPha-T1（Yangmin Gong, et al., Journal of Basic Microbiology, 2011, vol. 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、pUC19、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, 2011, vol. 108(52)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（遺伝子発現カセット）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により増幅した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（インプランタ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。

[0040] また、前記に組み込んだ目的のタンパク質をコードする遺伝子の発現を調整するプロモーターやターミネーターの種類も、使用する宿主の種類に応じて適宜選択することができる。本発明で好ましく用いることができるプロモーターとしては、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、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、Rubiscoオペロン（rbc）、PSI反応中心タンパク質（psaAB）、PSIIのD1タンパク質（psbA）、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、

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ＶＣＰ１遺伝子のプロモーター（VCP1プロモーター、VCP2プロモーター）（国際公開第２０１４／１０３９３０号）、又はナンノクロロプシス属由来のオレオシン様タンパクＬＤＳＰ（lipid droplet surface protein）遺伝子のプロモーター（Astrid Vieler, et al., PLOS Genetics, 2012; 8(11):e1003064. Doi：10.1371）が挙げられる。

また、目的のタンパク質をコードする遺伝子が組み込まれたことを確認するための選択マーカーの種類も、使用する宿主の種類に応じて適宜選択することができる。本発明で好ましく用いることができる選択マーカーとしては、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ー遺伝子として使用することも可能である。

[0041] 目的のタンパク質をコードする遺伝子の前記ベクターへの導入は、制限酵素処理やライゲーション等の通常の手法によって行うことができる。また、発現ベクターを構築する際には、アシル－ＡＣＰチオエステラーゼをコードする遺伝子に加え、当該遺伝子の翻訳に有用な配列、例えば開始コドンや終止コドンに相当する配列等を適宜補うことができる。

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. Bacterial. 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, et al., Archives of Microbiology, 1987, 146, p.353-357；T. Akamatsu, et al., Bioscience, Biotechnology, and Bi

ochemistry, 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。

[0042] 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。

[0043] アシル－ＡＣＰチオエステラーゼ遺伝子をゲノム上に有する宿主において、当該遺伝子の発現調節領域を改変して、前記遺伝子の発現を促進させる方法について説明する。

「発現調節領域」とは、プロモーターやターミネーターを示し、これらの配列は一般に隣接する遺伝子の発現量（転写量、翻訳量）の調節に関与している。ゲノム上に前述のアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ遺伝子を有する宿主においては、当該遺伝子の発現調節領域を改変して前記アシル－ＡＣＰチオエステラーゼ遺伝子の発現を促進させることで、中鎖脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質の生産性を向上させることができる。

[0044] 発現調節領域の改変方法としては、例えばプロモーターの入れ替えが挙げられる。ゲノム上に前述のアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ遺伝子を有する宿主において、当該遺伝子のプロモーター（以下、「アシル－ＡＣＰチオエステラーゼプロモーター」ともいう）を、より転写活性の高いプロモーターに入れ替えることで、アシル－ＡＣＰチオエステラーゼ遺伝子の発現を促進させることができる。

[0045] アシル－ＡＣＰチオエステラーゼプロモーターの入れ替えに用いるプロモーターとしては特に限定されず、アシル－ＡＣＰチオエステラーゼプロモーターよりも転写活性が高く、中鎖脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質の生産に適したものから適宜選択することができる。

[0046] 前述のプロモーターの改変は、相同組換えなどの常法に従い行うことができる。具体的には、標的とするプロモーターの上流、下流領域を含み、標的プロモーターに代えて別のプロモーターを含む直鎖状のDNA断片を構築し、これを宿主細胞に取り込ませ、宿主ゲノムの標的プロモーターの上流側と下流側とで２回交差の相同組換えを起こす。その結果、ゲノム上の標的プロモーターが別のプロモーター断片と置換され、プロモーターを改変することができる。

このような相同組換えによる標的プロモーターの改変方法は、例えば、Besher et al., Methods in molecular biology, 1995, vol. 47, p. 291-302等の文献を参考に行うことができる。

[0047] ４．脂質の製造方法

本発明の形質転換体は、中鎖脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質の生産性が、宿主と比較して向上している。したがって、本発明の形質転換体を適切な条件で培養し、次いで得られた培養物から中鎖脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質を回収すれば、中鎖脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質を効率よく製造することができる。

本発明の脂質の製造方法は、脂質の生産性向上の観点から、アシル－ＡＣＰチオエステラーゼ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して培養物を得る工程、及び得られた培養物から脂質を採取する工程を含むことが好ましい。

なお、本発明において形質転換体を培養するとは、微生物、藻類、植物体、動物体、及びそれらの細胞や組織を培養、生育することをいい、植物体を土壌等で栽培することも含まれる。ここで「培養物」とは、培養液の他に、培養等した後の形質転換体そのものも含まれる。

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

また、脂質の生産効率の点から、培地中に、例えばアシル－ＡＣＰチオエステラーゼの基質或いは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、３０～３７℃、０．５～１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２０～２５℃、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、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、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１～５０％（vol/vol）が好ましく、１～１０％（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、５～４０℃の範囲である。藻類の生育促進、脂肪酸の生産性向上、及び生産コストの低減の観点から、好ましくは１０～３５℃であり、より好ましくは１５～３０℃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、脂肪酸の生産性向上の観点から、好ましくは１００～５００００ルクスの範囲、より好ましくは３００～１００００ルクスの範囲、さらに好ましくは１０００～６０００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時間のうち明期が好ましくは８

～２４時間、より好ましくは１０～１８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、脂肪酸の生産性向上の観点から０．０３（大気条件と同程度）～１０％が好ましく、より好ましくは０．０５～５％、さらに好ましくは０．１～３％、よりさらに好ましくは０．３～１％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、脂肪酸の生産性向上の観点から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、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、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、通気攪拌培養が好ましい。

[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、前述の培養物や形質転換体から、ろ過、遠心分離、細胞の破砕、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、培養物や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、脱蝋、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] 本発明のアシル－ＡＣＰチオエステラーゼは、中鎖アシル－ＡＣＰ、Ｃ１２～Ｃ１６アシル－ＡＣＰ、特にＣ１２アシル－ＡＣＰとＣ１４アシル－ＡＣＰに対する特異性が高い。本発明の形質転換体では、総脂肪酸成分における中鎖脂肪酸、例えば炭素数８～１６の脂肪酸、好ましくは炭素数８～１４の脂肪酸、より好ましくは炭素数１０～１４の脂肪酸、より好ましく炭素数１２～１４の脂肪酸、より好ましくは炭素数１２と１４の脂肪酸、より好ましくは炭素数１２の脂肪酸、の含有率が増加する。そのため、当該形質転換体を用いた本発明の製造方法は、脂質生産、特に中鎖脂肪酸、好ましくは炭素数８～１６の脂肪酸、より好ましくは炭素数８～１４の脂肪酸、より好ましくは炭素数１０～１４の脂肪酸、より好ましく炭素数１２～１４の脂肪酸、より好ましくは炭素数１２及び１４の脂肪酸、より好ましくは炭素数１２の脂肪酸、又はこれを構成成分とする脂質の生産に好適に用いることができる。

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、脂肪酸又は脂肪酸化合物を含んでいることが好ましく、脂肪酸又はその脂肪酸エステル化合物を含んでいることがさらに好ましい。具体的には本発明の製造方法において製造される脂質は、好ましくは炭素数が８以上１６以下の脂肪酸又はその脂肪酸エステル化合物、より好ましくは炭素数が８以上１４以下の脂肪酸又はその脂肪酸エステル化合物、より好ましくは炭素数が１０以上１４以下の脂肪酸又はその脂肪酸エステル化合物、より好ましくは１２以上１４以下の脂肪酸又はその脂肪酸エステル化合物、より好ましくは炭素数が１２及び１４の脂肪酸又はその脂肪酸エステル化合物、より好ましくは炭素数が１２の脂肪酸又はその脂肪酸エステル化合物を含む。脂質中に含まれる脂肪酸又はその脂肪酸エステル化合物は、界面活性剤等への利用性から、炭素数８～１６の脂肪酸又はその脂肪酸エステル化合物が好ましく、炭素数８～１４の脂肪酸又はその脂肪酸エステル化合物がより好ましく、炭素数１０

～１４の脂肪酸又はその脂肪酸エステル化合物がより好ましく、炭素数１２～１４の脂肪酸又はその脂肪酸エステル化合物がより好ましく、炭素数１２及び１４の脂肪酸又はその脂肪酸エステル化合物がより好ましく、炭素数１２の脂肪酸又はその脂肪酸エステル化合物がより好ましい。

脂肪酸エステル化合物は、生産性の点から、単純脂質又は複合脂質が好ましく、単純脂質がさらに好ましく、トリアシルグリセロールがさらにより好ましい。

[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、遺伝子を開示する。

[0055] ＜１＞ 宿主に前記タンパク質(A)～(C)のいずれか１つをコードする遺伝子が導入されている形質転換体を培養し、培養物から脂質を採取する、脂質の製造方法。

(A)配列番号１の６１１位～７７２位のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(B)配列番号１の６１１位～７７２位のアミノ酸配列との同一性が８０％以上のアミノ酸配列からなり、かつアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ活性を有するタンパク質。

(C)前記タンパク質(A)又は(B)のアミノ酸配列を有し、かつアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ活性を有するタンパク質。

[0056] ＜２＞ 宿主に前記タンパク質(A)～(C)のいずれか１つをコードする遺伝子を導入する工程を含む、形質転換体の細胞内で生産される脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質の生産性を向上させる方法。

＜３＞ 前記脂質が中鎖脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質である、前記＜２＞記載の方法。

＜４＞ 宿主に前記タンパク質(A)～(C)のいずれか１つ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、形質転換体の細胞内で生産される

中鎖脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質の生産性を向上させ、生産される全脂肪酸又は全脂質中の脂肪酸又は脂質の組成を改変する、脂質の組成の改変方法。

[0057] ＜５＞　前記タンパク質(A)～(C)のいずれか１つをコードする遺伝子の発現が促進されている形質転換体を培養し、培養物から脂質を採取する、脂質の製造方法。

＜６＞　前記タンパク質(A)～(C)のいずれか１つをコードする遺伝子の発現を促進させる工程を含む、形質転換体の細胞内で生産される脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質の生産性を向上させる方法。

＜７＞　前記脂質が中鎖脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質である、前記＜６＞記載の方法。

＜８＞　前記タンパク質(A)～(C)のいずれか１つをコードする遺伝子の発現を促進させて、形質転換体の細胞内で生産される中鎖脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質の生産性を向上させ、生産される全脂肪酸又は全脂質中の脂肪酸又は脂質の組成を改変する、脂質の組成の改変方法。

＜９＞　前記タンパク質(A)～(C)のいずれか１つをコードする遺伝子を宿主に導入して前記遺伝子の発現を促進させる、前記＜５＞～＜９＞のいずれか１項記載の方法。

[0058] ＜１０＞　前記タンパク質(B)において、配列番号１の６１１位～７７２位のアミノ酸配列との同一性が８５％以上、好ましくは９０％以上、より好ましくは９５％以上、より好ましくは９６％以上、より好ましくは９７％以上、より好ましくは９８％以上、より好ましくは９９％以上である、前記＜１＞～＜９＞のいずれか１項記載の方法。

＜１１＞　前記タンパク質(B)が、配列番号１の６１１位～７７２位のアミノ酸配列に１又は数個、好ましくは１個以上２０個以下、より好ましくは１個以上１５個以下、より好ましくは１個以上１０個以下、より好ましくは１個以上８個以下、より好ましくは１個以上５個以下、より好ましくは１個以上４個以下、より好ましくは１個以上３個以下、よりさらに好ましくは１又は

２個、のアミノ酸が欠失、置換、挿入、又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ活性を有するタンパク質である、前記＜１＞～＜１０＞のいずれか１項記載の方法。

[0059] ＜１２＞　前記タンパク質(C)が、配列番号１の１～６１０位の任意の位置でＮ末端側のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列からなる、前記＜１＞～＜９＞のいずれか１項記載の方法。

＜１３＞　前記タンパク質(C)が下記タンパク質(C1)～(C20)のいずれか１つである、前記＜１＞～＜９＞のいずれか１項記載の方法。

(C1)配列番号１の１位～７７２位のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(C2)配列番号１の４８７位～７７２位のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(C3)配列番号１の４８８位～７７２位のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(C4)配列番号１の４９７位～７７２位のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(C5)配列番号１の５０７位～７７２位のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(C6)配列番号１の５１７位～７７２位のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(C7)配列番号１の５２７位～７７２位のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(C8)配列番号１の５３７位～７７２位のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(C9)配列番号１の５４７位～７７２位のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(C10)配列番号１の５５７位～７７２位のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(C11)配列番号１の５６７位～７７２位のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(C12)配列番号１の５７７位～７７２位のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(C13)配列番号１の５８７位～７７２位のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(C14)配列番号１の５９７位～７７２位のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(C15)配列番号１の６０７位～７７２位のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(C16)配列番号１の６０８位～７７２位のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(C17)配列番号１の６０９位～７７２位のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(C18)配列番号１の６１０位～７７２位のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(C19)前記タンパク質(C1)～(C18)のいずれか１つのアミノ酸配列との同一性が８０％以上、好ましくは８５％以上、より好ましくは９０％以上、より好

ましくは９５％以上、より好ましくは９６％以上、より好ましくは９７％以上、より好ましくは９８％以上、よりさらに好ましくは９９％以上、のアミノ酸配列からなり、かつアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ活性を有するタンパク質。

(C20)前記タンパク質(C1)～(C18)のいずれか１つのアミノ酸配列に１又は数個、好ましくは１個以上２０個以下、より好ましくは１個以上１５個以下、より好ましくは１個以上１０個以下、より好ましくは１個以上８個以下、より好ましくは１個以上５個以下、より好ましくは１個以上４個以下、より好ましくは１個以上３個以下、より好ましくは１又は２個、のアミノ酸が欠失、置換、挿入、又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ活性を有するタンパク質。

[0060] ＜１４＞　前記タンパク質(A)～(C)のいずれか１つをコードする遺伝子が、下記ＤＮＡ(a)～(f)のいずれか１つからなる遺伝子である、前記＜１＞～＜１３＞のいずれか１項記載の方法。

(a)配列番号２の１８３１位～２３１９位の塩基配列からなるＤＮＡ。

(b)配列番号２の１８３１位～２３１９位の塩基配列との同一性が８０％以上、好ましくは８５％以上、より好ましくは９０％以上、より好ましくは９５％以上、より好ましくは９６％以上、より好ましくは９７％以上、より好ましくは９８％以上、よりさらに好ましくは９９％以上、の塩基配列からなり、かつアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ活性を有するタンパク質をコードするＤＮＡ。

(c)前記ＤＮＡ(a)又は(b)の塩基配列を有し、かつアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ活性を有するタンパク質をコードするＤＮＡ。

(d)配列番号３の３７３位～８６１位の塩基配列からなるＤＮＡ。

(e)配列番号３の３７３位～８６１位の塩基配列との同一性が８０％以上、好ましくは８５％以上、より好ましくは９０％以上、より好ましくは９５％以上、より好ましくは９６％以上、より好ましくは９７％以上、より好ましくは９８％以上、よりさらに好ましくは９９％以上、の塩基配列からなり、か

つアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ活性を有するタンパク質をコードするＤＮＡ。

(f)前記ＤＮＡ(d)又は(e)の塩基配列を有し、かつアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ活性を有するタンパク質をコードするＤＮＡ。

<１５>　前記ＤＮＡ(b)が、前記ＤＮＡ(a)の塩基配列に、１若しくは複数個、好ましくは１個以上２０個以下、より好ましくは１個以上１５個以下、より好ましくは１個以上１０個以下、より好ましくは１個以上８個以下、より好ましくは１個以上５個以下、より好ましくは１個以上４個以下、より好ましくは１個以上３個以下、より好ましくは１若しくは２個、の塩基が欠失、置換、挿入、若しくは付加された塩基配列からなり、かつアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ活性を有するタンパク質をコードするＤＮＡ、又は前記ＤＮＡ(a)と相補的な塩基配列からなるＤＮＡとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ活性を有するタンパク質をコードするＤＮＡ、である、前記<１４>項記載の方法。

<１６>　前記ＤＮＡ(c)が、配列番号２の１～１８３０位の任意の位置で5’末端側が欠失した塩基配列からなる、前記<１４>項記載の方法。

<１７>　前記ＤＮＡ(c)が、下記ＤＮＡ(c1)～(c20)のいずれか１つである、前記<１４>項記載の方法。

(c1)配列番号２の１位～２３１９位の塩基配列からなるＤＮＡ。

(c2)配列番号２の１４５９位～２３１９位の塩基配列からなるＤＮＡ。

(c3)配列番号２の１４６２位～２３１９位の塩基配列からなるＤＮＡ。

(c4)配列番号２の１４８９位～２３１９位の塩基配列からなるＤＮＡ。

(c5)配列番号２の１５１９位～２３１９位の塩基配列からなるＤＮＡ。

(c6)配列番号２の１５４９位～２３１９位の塩基配列からなるＤＮＡ。

(c7)配列番号２の１５７９位～２３１９位の塩基配列からなるＤＮＡ。

(c8)配列番号２の１６０９位～２３１９位の塩基配列からなるＤＮＡ。

(c9)配列番号２の１６３９位～２３１９位の塩基配列からなるＤＮＡ。

(c10)配列番号２の１６６９位～２３１９位の塩基配列からなるＤＮＡ。

(c11)配列番号２の１６９９位〜２３１９位の塩基配列からなるＤＮＡ。
(c12)配列番号２の１７２９位〜２３１９位の塩基配列からなるＤＮＡ。
(c13)配列番号２の１７５９位〜２３１９位の塩基配列からなるＤＮＡ。
(c14)配列番号２の１７８９位〜２３１９位の塩基配列からなるＤＮＡ。
(c15)配列番号２の１８１９位〜２３１９位の塩基配列からなるＤＮＡ。
(c16)配列番号２の１８２２位〜２３１９位の塩基配列からなるＤＮＡ。
(c17)配列番号２の１８２５位〜２３１９位の塩基配列からなるＤＮＡ。
(c18)配列番号２の１８２８位〜２３１９位の塩基配列からなるＤＮＡ。
(c19)前記ＤＮＡ(c1)〜(c18)のいずれか１つの塩基配列との同一性が８０％以上、好ましくは８５％以上、より好ましくは９０％以上、よりさらに好ましくは９５％以上、よりさらに好ましくは９６％以上、よりさらに好ましくは９７％以上、よりさらに好ましくは９８％以上、よりさらに好ましくは９９％以上、の塩基配列からなり、かつアシル−ＡＣＰチオエステラーゼ活性を有するタンパク質をコードするＤＮＡ。
(c20)前記ＤＮＡ(c1)〜(c18)のいずれか１つの塩基配列に１又は数個、好ましくは１個以上２０個以下、より好ましくは１個以上１５個以下、より好ましくは１個以上１０個以下、より好ましくは１個以上８個以下、より好ましくは１個以上５個以下、より好ましくは１個以上４個以下、より好ましくは１個以上３個以下、より好ましくは１又は２個、の塩基が欠失、置換、挿入、又は付加された塩基配列からなり、かつアシル−ＡＣＰチオエステラーゼ活性を有するタンパク質をコードするＤＮＡ。
＜１８＞　前記ＤＮＡ(e)が、前記ＤＮＡ(d)の塩基配列に、１若しくは複数個、好ましくは１個以上２０個以下、より好ましくは１個以上１５個以下、より好ましくは１個以上１０個以下、より好ましくは１個以上８個以下、より好ましくは１個以上５個以下、より好ましくは１個以上４個以下、より好ましくは１個以上３個以下、より好ましくは１若しくは２個、の塩基が欠失、置換、挿入、若しくは付加された塩基配列からなり、かつアシル−ＡＣＰチオエステラーゼ活性を有するタンパク質をコードするＤＮＡ、又は前記Ｄ

ＮＡ(d)と相補的な塩基配列からなるＤＮＡとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ活性を有するタンパク質をコードするＤＮＡ、である、前記<１４>項記載の方法。

<１９>　前記ＤＮＡ(f)が、配列番号３の１～３７２位の任意の位置で5'末端側が欠失した塩基配列からなる、前記<１４>項記載の方法。

<２０>　前記ＤＮＡ(f)が、下記ＤＮＡ(f1)～(f19)のいずれか１つである、前記<１４>項記載の方法。

(f1)配列番号３の１位～８６１位の塩基配列からなるＤＮＡ。

(f2)配列番号３の４位～８６１位の塩基配列からなるＤＮＡ。

(f3)配列番号３の３１位～８６１位の塩基配列からなるＤＮＡ。

(f4)配列番号３の６１位～８６１位の塩基配列からなるＤＮＡ。

(f5)配列番号３の９１位～８６１位の塩基配列からなるＤＮＡ。

(f6)配列番号３の１２１位～８６１位の塩基配列からなるＤＮＡ。

(f7)配列番号３の１５１位～８６１位の塩基配列からなるＤＮＡ。

(f8)配列番号３の１８１位～８６１位の塩基配列からなるＤＮＡ。

(f9)配列番号３の２１１位～８６１位の塩基配列からなるＤＮＡ。

(f10)配列番号３の２４１位～８６１位の塩基配列からなるＤＮＡ。

(f11)配列番号３の２７１位～８６１位の塩基配列からなるＤＮＡ。

(f12)配列番号３の３０１位～８６１位の塩基配列からなるＤＮＡ。

(f13)配列番号３の３３１位～８６１位の塩基配列からなるＤＮＡ。

(f14)配列番号３の３６１位～８６１位の塩基配列からなるＤＮＡ。

(f15)配列番号３の３６４位～８６１位の塩基配列からなるＤＮＡ。

(f16)配列番号３の３６７位～８６１位の塩基配列からなるＤＮＡ。

(f17)配列番号３の３７０位～８６１位の塩基配列からなるＤＮＡ。

(f18)前記ＤＮＡ(c1)～(f17)のいずれか１つの塩基配列との同一性が８０％以上、好ましくは８５％以上、より好ましくは９０％以上、よりさらに好ましくは９５％以上、よりさらに好ましくは９６％以上、よりさらに好ましくは９７％以上、よりさらに好ましくは９８％以上、よりさらに好ましくは９

９％以上、の塩基配列からなり、かつアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ活性を有するタンパク質をコードするＤＮＡ。

(f19)前記ＤＮＡ(f1)～(f17)のいずれか１つの塩基配列に１又は数個、好ましくは１個以上２０個以下、より好ましくは１個以上１５個以下、より好ましくは１個以上１０個以下、より好ましくは１個以上８個以下、より好ましくは１個以上５個以下、より好ましくは１個以上４個以下、より好ましくは１個以上３個以下、より好ましくは１又は２個、の塩基が欠失、置換、挿入、又は付加された塩基配列からなり、かつアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ活性を有するタンパク質をコードするＤＮＡ。

[0061] ＜２１＞　前記形質転換体の宿主が微生物である、前記＜１＞～＜２０＞のいずれか１項記載の方法。

＜２２＞　前記微生物が大腸菌である、前記＜２１＞項記載の方法。

＜２３＞　前記微生物が微細藻類である、前記＜２１＞項記載の方法。

＜２４＞　前記微細藻類がナンノクロロプシス属に属する藻類、好ましくはナンノクロロプシス・オキュラータ、である、前記＜２３＞項記載の方法。

＜２５＞　前記脂質が、中鎖脂肪酸又はその脂肪酸エステル化合物、好ましくは炭素数８以上１６以下の脂肪酸又はその脂肪酸エステル化合物、より好ましくは炭素数８以上１４以下の脂肪酸又はその脂肪酸エステル化合物、より好ましくは炭素数１０以上１４以下の脂肪酸又はその脂肪酸エステル化合物、より好ましくは炭素数１２以上１４以下の脂肪酸又はその脂肪酸エステル化合物、より好ましくは炭素数１２及び１４の脂肪酸又はその脂肪酸エステル化合物、より好ましくは炭素数１２の脂肪酸又はその脂肪酸エステル化合物を含む、前記＜１＞～＜２４＞のいずれか１項記載の製造方法。

[0062] ＜２６＞　前記＜１＞～＜２５＞のいずれか１項で規定した、タンパク質(A)～(C)。

＜２７＞　前記＜２６＞項記載のタンパク質をコードする遺伝子。

＜２８＞　前記＜１＞～＜２５＞のいずれか１項で規定した、ＤＮＡ(a)～(f)のいずれか１つからなる遺伝子。

＜２９＞　前記＜２７＞又は＜２８＞項記載の遺伝子を含有する組換えベクター。

[0063] ＜３０＞　前記＜２７＞若しくは＜２８＞項記載の遺伝子、又は前記＜２９＞項記載の組換えベクターを、宿主に導入してなる形質転換体。

＜３１＞　前記＜２７＞若しくは＜２８＞項記載の遺伝子、又は前記＜２９＞項記載の組換えベクターを宿主に導入する、形質転換体の作製方法。

＜３２＞　前記＜２７＞又は＜２８＞項記載の遺伝子の発現を促進させた形質転換体。

＜３３＞　前記形質転換体の宿主が微生物である、前記＜３０＞～＜３２＞のいずれか１項記載の形質転換体又はその作製方法。

＜３４＞　前記微生物が大腸菌である、前記＜３３＞項記載の形質転換体又はその作製方法。

＜３５＞　前記微生物が微細藻類である、前記＜３３＞項記載の形質転換体又はその作製方法。

＜３６＞　前記微細藻類がナンノクロロプシス属に属する藻類、好ましくはナンノクロロプシス・オキュラータ、である、前記＜３５＞項記載の形質転換体又はその作製方法。

[0064] ＜３７＞　脂質を製造するための、前記＜２６＞～＜３６＞のいずれか１項記載のタンパク質、遺伝子、組換えベクター、形質転換体、又は形質転換体の作製方法により得られた形質転換体の使用。

＜３８＞　前記脂質が、中鎖脂肪酸又はその脂肪酸エステル化合物、好ましくは炭素数８以上１６以下の脂肪酸又はその脂肪酸エステル化合物、より好ましくは炭素数８以上１４以下の脂肪酸又はその脂肪酸エステル化合物、より好ましくは１０以上１４以下の脂肪酸又はその脂肪酸エステル化合物、より好ましくは炭素数１２以上１４以下の脂肪酸又はその脂肪酸エステル化合物、より好ましくは炭素数１２及び１４の脂肪酸又はその脂肪酸エステル化合物、より好ましくは炭素数１２の脂肪酸又はその脂肪酸エステル化合物を含む、前記＜３７＞項記載の使用。

実施例

[0065] 以下、本発明を実施例に基づきさらに詳細に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。ここで、本実施例で用いるプライマーの塩基配列を表１及び２に示す。

[0066] [表1]

表1

プライマー番号	塩基配列(5'→3')	配列番号
4	gcggccgctctagagccgctgtggtacttttgtcc	配列番号4
5	acaaaatattaacgcttattcttttttccgcggaa	配列番号5
6	ctctagagcggccgccaccg	配列番号6
7	gcgttaatattttgttaaaattcg	配列番号7
8	gcggccgctctagagcgtccgcaaggcactgcctc	配列番号8
9	gcggccgctctagagagcccaaccaaaatgcgcgg	配列番号9
10	gcggccgctctagagatgtttgccaaacaagcaac	配列番号10
11	gcggccgctctagagattggcggtgcagcattggc	配列番号11
12	gcggccgctctagaggttgcctgggcggaaggcta	配列番号12
13	gcggccgctctagagcactcagtggcaggcgaatg	配列番号13
14	gcggccgctctagagcgtccccactatgaggttct	配列番号14
15	gcggccgctctagagtgtttcacggccatttgcct	配列番号15
16	gcggccgctctagagctgtatctctatgtcccgaa	配列番号16
17	gcggccgctctagagccgaaaatcggcaccatcat	配列番号17
18	gcggccgctctagagttctttccgcccaccctgaa	配列番号18
19	gcggccgctctagagtgggaggaggaaattgcgtc	配列番号19
20	gcggccgctctagaggaggaggaaattgcgtctcg	配列番号20
21	gcggccgctctagaggaggaaattgcgtctcgtcc	配列番号21
22	gcggccgctctagaggaaattgcgtctcgtcctgg	配列番号22
23	gcggccgctctagagattgcgtctcgtcctggactg	配列番号23

[0067]

[表2]

表2

プライマー番号	塩基配列(5'→3')	配列番号
26	ctttttgtgaagcaatggccaagttgaccagtgccg	配列番号26
27	tttcccccatcccgattagtcctgctcctcggccac	配列番号27
28	cgagctcggtacccgactgcgcatggattgaccga	配列番号28
29	tgcttcacaaaaaagacagcttcttgat	配列番号29
30	tcgggatgggggaaaaaaacctctg	配列番号30
31	actctagaggatccccttcgtaaataaatcagctc	配列番号31
33	gggatcctctagagtcgacc	配列番号33
34	cgggtaccgagctcgaattc	配列番号34
35	cgcggtgttgcgcgcccgctgtggtacttttgtcc	配列番号35
36	cgcggtgttgcgcgcattggcggtgcagcattggc	配列番号36
37	cgcggtgttgcgcgcccgaaaatcggcaccatcat	配列番号37
38	cgcggtgttgcgcgcttctttccgcccaccctgaa	配列番号38
39	cgcggtgttgcgcgctgggaggaggaaattgcgtc	配列番号39
40	ctcttccacagaagcttattctttttccgcggaa	配列番号40
41	cgagctcggtacccgttcttccgcttgttgctgcc	配列番号41
42	tgttgatgcgggctgagattggtgg	配列番号42
43	cagcccgcatcaacaatgaagaccgccgctctcctc	配列番号43
44	gcgcgcaacaccgcgggtgcgggagaac	配列番号44
45	gcttctgtggaagagccagtg	配列番号45
46	ggcaagaaaagctgggggaaaagacagg	配列番号46
50	ccagcttttcttgccactgcgcatggattgaccga	配列番号50

[0068] 実施例１　アシル－ＡＣＰチオエステラーゼ遺伝子の取得、大腸菌への形質転換、及び形質転換体による脂質の製造

（１）グィラルディア・セータ由来アシル－ＡＣＰチオエステラーゼ遺伝子の取得

National Center for Biotechnology Information (NCBI) のタンパクデータベースに、Accession No. XP_005824882として登録されているグィラルディア・セータ由来の機能未知タンパク質のアミノ酸配列（配列番号１）及びこれをコードする遺伝子配列（配列番号２）を取得した。以下、このタンパク質を「GtTE」ともいい、当該タンパク質をコードする遺伝子を「GtTE遺伝子」ともいう。

次いで、配列番号２の１４５９～２３１９位の塩基配列（配列番号１の４８７～７７２位に相当）を、大腸菌のコドン使用頻度に合わせてコドン最適化を施した塩基配列として、配列番号３の塩基配列を取得した。なお、配列

番号３の塩基配列からなる遺伝子は、オペロンバイオテクノロジー社の提供する人工遺伝子受託合成サービスを利用して取得した。

[0069] （２）GtTE遺伝子発現プラスミドの構築

配列番号３の塩基配列からなる、人工合成遺伝子を鋳型として、表１に示すプライマー番号４及びプライマー番号５のプライマー対を用いたＰＣＲにより、配列番号３の塩基配列からなるGtTE遺伝子を取得した。

また、プラスミドベクターpBluescriptII SK(-)（Stratagene社製）を鋳型として、表１に示すプライマー番号６及びプライマー番号７のプライマー対を用いたＰＣＲによりpBluescriptII SK(-)を増幅し、制限酵素DpnI（東洋紡社製）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、常法に従い大腸菌ＤＨ５α株のコンピテントセル（タカラバイオ社製）への形質転換、プラスミド抽出、及びクローニング断片の塩基配列確認を行い、GtTE遺伝子発現プラスミドGtTE_487を構築した。

[0070] 同様に、配列番号１のＮ末端領域を種々の長さで削除した複数のGtTE遺伝子発現プラスミドを構築した。

前記プラスミドGtTE_487を鋳型とし、表１に示すプライマー番号８～２３のいずれか１つと、プライマー番号６のプライマーとのプライマー対を用いてＰＣＲを行い、得られた遺伝子断片を前記の方法と同様にして精製・融合し、GtTE遺伝子発現プラスミドGtTE_497、GtTE_507、GtTE_517、GtTE_527、GtTE_537、GtTE_547、GtTE_557、GtTE_567、GtTE_577、GtTE_587、GtTE_597、GtTE_607、GtTE_608、GtTE_609、GtTE_610、及びGtTE_611をそれぞれ構築した。

なお、プラスミドGtTE_487は、配列番号１に示すアミノ酸配列のＮ末端側１～４８６位のアミノ酸配列を除去するよう構築され、GtTE遺伝子として、配列番号１の４８７位～７７２位のアミノ酸配列をコードする塩基配列及び

終止コドンに対応する配列番号３の１位～８６１位の塩基配列を有する。同様に、プラスミドGtTE_497、プラスミドGtTE_507、プラスミドGtTE_517、プラスミドGtTE_527、プラスミドGtTE_537、プラスミドGtTE_547、プラスミドGtTE_557、プラスミドGtTE_567、プラスミドGtTE_577、プラスミドGtTE_587、プラスミドGtTE_597、プラスミドGtTE_607、プラスミドGtTE_608、プラスミドGtTE_609、プラスミドGtTE_610、及びプラスミドGtTE_611は、配列番号１に示すアミノ酸配列のＮ末端側１～４９６位、１～５０６位、１～５１６位、１～５２６位、１～５３６位、１～５４６位、１～５５６位、１～５６６位、１～５７６位、１～５８６位、１～５９６位、１～６０６位、１～６０７位、１～６０８位、１～６０９位、又は１～６１０位のアミノ酸配列をそれぞれ除去するように構築した。さらに、これらのプラスミドは、配列番号１に示すアミノ酸配列のＮ末端側を除去した部位の上流に、プラスミドベクターpBluescriptII SK(-)由来のLacZタンパク質のＮ末端側１位～２９位のアミノ酸配列が融合したタンパク質を発現させるように構築した。

[0071] （３）GtTE遺伝子発現プラスミドの大腸菌への導入

前記の各種GtTE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K27株を50μg/mLアンピシリンナトリウム含有ＬＢ寒天培地（Bacto Trypton 1%、Yeast Extract 0.5%、NaCl 1%、Agar 1.5%）に播種して30℃で一晩静置し、得られたコロニーを、2mL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pBluescriptII SK(-)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。

[0072] （４）培養液中の脂質の抽出及び構成脂肪酸の分析

培養液1mLに、内部標準として1mg/mLの7-ペンタデカノン（メタノール溶液）50μLを添加後、クロロホルム0.5mL、メタノール1mL及び2N塩酸10μLを培

養液に添加して激しく撹拌し、10分間以上放置した。その後さらに、クロロホルム0.5mL及び1.5%KCl　0.5mLを添加して撹拌し、3,000rpmにて5分間遠心分離を行い、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、0.5N水酸化カリウム／メタノール溶液0.7mLを添加し、80℃で30分間恒温した。続いて14%三フッ化ホウ素のメタノール溶液（SIGMA社製）1mLを添加し、80℃にて10分間恒温した。その後、ヘキサン、飽和食塩水を各1mL添加し激しく撹拌し、室温にて10分間以上放置後、上層であるヘキサン層を回収して脂肪酸メチルエステルを得た。

[0073]　下記に示す測定条件下で、得られた脂肪酸メチルエステルをガスクロマトグラフィー解析に供した。

＜ガスクロマトグラフィー条件＞

キャピラリーカラム：DB-1　MS（30m×200μm×0.25μm、J&W　Scientific社製）

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℃

[0074]　また、脂肪酸メチルエステルの同定は、同サンプルを同条件でガスクロマトグラフ質量分析解析に供することにより行った。

ガスクロマトグラフィー解析により得られた波形データのピーク面積より、各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1L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。

結果を表３に示す。なお下記の表において、「ＴＦＡ」は総脂肪酸量を、「脂肪酸組成（％ＴＦＡ）」は総脂肪酸の重量に対する各脂肪酸の重量の割合（重量パーセント）を示す。また「Ｃｘ：ｙ」とあるのは、炭素原子数ｘで二重結合数がｙの脂肪酸を表し、「Ｃ１７：０Δ」及び「Ｃ１９：０Δ」はそれぞれcis-9,10-メチレンヘキサデカン酸（cis-9,10-Methylen-hexadecanoic acid）及びcis-11,12-メチレンオクタデカン酸（cis-11,12-Methylen-octadecanoic acid）を表す。

[0075]

[表3]

表3

導入したプラスミド	TFA (mg/L)	脂肪酸組成 (%TFA)									
		C10:0	C12:1	C12:0	C14:1	C14:0	C16:1	C16:0	C17:0Δ	C18:1	C19:0Δ
pBS	171.0	0.0	0.0	0.0	0.0	5.1	1.7	48.6	28.2	3.4	12.9
GtTE_487	310.6	2.0	1.5	6.0	2.3	15.1	3.6	36.0	20.0	3.3	10.1
GtTE_497	308.9	2.0	1.5	6.0	2.4	13.7	4.0	35.4	20.4	4.1	10.5
GtTE_507	298.7	2.3	1.6	6.2	2.5	13.2	4.0	35.0	20.3	3.9	11.1
GtTE_517	321.5	2.7	2.0	6.9	3.0	14.6	4.9	32.9	18.6	4.4	9.9
GtTE_527	274.1	1.9	1.5	5.1	2.4	12.3	5.8	35.6	19.4	6.5	9.5
GtTE_537	253.2	0.0	1.7	4.9	2.6	10.3	8.7	36.3	17.8	10.5	7.2
GtTE_547	307.2	2.2	1.5	6.0	2.4	13.7	4.2	35.1	20.0	4.5	10.3
GtTE_557	249.7	0.0	0.7	3.8	1.5	11.4	2.9	40.6	23.8	3.6	11.6
GtTE_567	287.4	0.0	1.9	6.9	2.8	16.6	4.7	35.0	18.7	4.1	9.2
GtTE_577	301.7	2.3	1.6	6.0	2.5	15.0	4.1	35.4	18.8	4.4	9.9
GtTE_587	460.9	4.0	4.5	8.9	5.7	17.7	11.1	25.0	10.8	8.9	3.3
GtTE_597	694.5	4.7	7.8	10.3	8.9	19.2	17.5	17.4	5.9	7.5	0.8
GtTE_607	672.0	4.5	7.2	10.3	8.4	19.5	16.0	18.5	6.5	7.4	1.7
GtTE_608	305.1	4.1	3.5	8.7	4.2	17.0	6.9	29.0	14.8	5.1	6.7
GtTE_609	419.4	4.4	4.7	10.5	5.5	18.3	9.2	25.0	10.6	7.0	4.7
GtTE_610	262.4	2.6	2.3	5.7	3.1	12.1	9.0	33.6	15.7	10.1	5.8
GtTE_611	212.2	0.0	1.1	4.4	1.9	9.8	3.9	39.4	24.1	5.6	9.8

[0076] 表３から明らかなように、各種GtTE遺伝子発現プラスミドのいずれか１つを導入した株では、陰性対照であるプラスミドベクターpBluescriptII SK(-

)導入株（表中「pBS」）と比べ、総脂肪酸に占めるＣ１２：１脂肪酸、Ｃ１２：０脂肪酸、Ｃ１４：１脂肪酸、Ｃ１４：０脂肪酸、Ｃ１６：１脂肪酸の割合が大きく増加した。特に、Ｃ１４脂肪酸（Ｃ１４：１脂肪酸、Ｃ１４：０脂肪酸）の割合が顕著に増加した。さらに、これらGtTE遺伝子発現プラスミドの導入株では、総脂肪酸量（ＴＦＡ）も増加していた。特に、プラスミドGtTE_587、GtTE_597、GtTE_607、GtTE_608、又はGtTE_609導入株で、Ｃ１２：１脂肪酸、Ｃ１２：０脂肪酸、Ｃ１４：１脂肪酸、Ｃ１４：０脂肪酸、Ｃ１６：１脂肪酸の増加、及び総脂肪酸量の増加が顕著であった。

これらの結果から、各種GtTE遺伝子発現プラスミドに導入した遺伝子がコードするタンパク質は、アシル－ＡＣＰチオエステラーゼ活性を有することが確認された。また、これらのタンパク質はＣ１２脂肪酸及びＣ１４脂肪酸の割合及び生産量を顕著に増加させたことから、Ｃ１２脂肪酸やＣ１４脂肪酸、特にＣ１４脂肪酸に高い特異性を持つアシル－ＡＣＰチオエステラーゼであると考えられる。

以上の結果から、配列番号１で示されるアミノ酸配列中、少なくとも６１１位～７７２位の領域を有するタンパク質は、アシル－ＡＣＰチオエステラーゼ活性を示すと認められる。

[0077] 実施例２　GtTE遺伝子によるナンノクロロプシス・オキュラータの形質転換、及び形質転換体による脂質の製造

（１）ゼオシン耐性遺伝子発現用プラスミドの構築

ゼオシン耐性遺伝子（配列番号２４）、及び文献（Randor Radakovits, et al., Nature Communications, DOI:10.1038/ncomms1688, 2012）記載のナンノクロロプシス・ガディタナCCMP526株由来チューブリンプロモーター配列（配列番号２５）を人工合成した。合成したＤＮＡ断片を鋳型として、表２に示すプライマー番号２６及びプライマー番号２７のプライマー対、並びにプライマー番号２８及びプライマー番号２９のプライマー対を用いてＰＣＲを行い、ゼオ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増幅した。

また、ナンノクロロプシス・オキュラータNIES2145株のゲノムを鋳型として、表２に示すプライマー番号３０及びプライマー番号３１のプライマー対を用いてＰＣＲを行い、ヒートショックプロテインターミネーター配列（配列番号３２）を増幅した。

さらに、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２に示すプライマー番号３３及びプライマー番号３４のプライマー対を用いたＰＣＲを行い、プラスミドベクターpUC19を増幅した。

[0078] これら４つの増幅断片をそれぞれ制限酵素DpnI（東洋紡社製）にて処理し、High Pure PCR Product Purification Kit（Roche Applied Science社製）を用いて精製した。その後、得られた４つの断片をIn-Fusion HD Cloning Kit（Clontech社製）を用いて融合し、ゼオシン耐性遺伝子発現用プラスミドを構築した。

なお、本プラスミドは、チューブリンプロモーター配列、ゼオシン耐性遺伝子、ヒートショックプロテイン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。

[0079] （２）GtTE遺伝子発現用プラスミドの構築

実施例１で人工合成したGtTE遺伝子を鋳型として、表２に示すプライマー番号３５～３９のいずれか１つと、プライマー番号４０のプライマー対を用いたＰＣＲを行い、配列番号３の5'側の塩基配列を種々の長さで削除したGtTE遺伝子断片を取得した。

また、ナンノクロロプシス・オキュラータNIES2145株のゲノムを鋳型として、表２に示すプライマー番号４１及びプライマー番号４２のプライマー対、プライマー番号４３及びプライマー番号４４のプライマー対、並びにプライマー番号４５及びプライマー番号４６のプライマー対をそれぞれ用いたＰＣＲを行い、LDSPプロモーター配列（配列番号４７）、VCP1葉緑体移行シグナル配列（配列番号４８）及びVCP1ターミネーター配列（配列番号４９）を取得した。

さらに、前述のゼオシン耐性遺伝子発現プラスミドを鋳型として、表２に

示すプライマー番号５０及びプライマー番号３４のプライマー対を用いたＰＣＲを行い、ゼオシン耐性遺伝子発現カセット（チューブリンプロモーター配列、ゼオシン耐性遺伝子、ヒートショックプロテインターミネーター配列）及びpUC19配列からなる断片を増幅した。

[0080] 配列番号３の5'側の塩基配列を種々の長さで削除したGtTE遺伝子断片それぞれと、LDSPプロモーター、VCP1葉緑体移行シグナル、VCP1ターミネーターの増幅断片、及びゼオシン耐性遺伝子発現カセットとpUC19配列からなる増幅断片を、前述の方法と同様の方法にて融合し、GtTE遺伝子発現用プラスミドGtTE_488-Nanno、GtTE_527-Nanno、GtTE_587-Nanno、GtTE_597-Nanno、GtTE_607-Nanno、をそれぞれ構築した。

なお、これらのプラスミドは、LDSPプロモーター配列、VCP1葉緑体移行シグナルを配列番号１に示すアミノ酸配列の４８８～７７２位、５２７～７７２位、５８７～７７２位、５９７～７７２位、若しくは６０７～７７２位のアミノ酸配列をコードする塩基配列の５’末端側に連結させたGtTE遺伝子、VCP1ターミネーター配列、チューブリンプロモーター配列、ゼオシン耐性遺伝子、ヒートショックプロテインターミネーター配列の順で連結したインサート配列と、pUC19ベクター配列からなる。

[0081] （３）GtTE遺伝子発現カセットのナンノクロロプシス・オキュラータへの導入

前述のGtTE遺伝子発現用プラスミド（GtTE_488-Nanno、GtTE_527-Nanno、GtTE_587-Nanno、GtTE_597-Nanno、GtTE_607-Nanno）をそれぞれ鋳型として、表２に示すプライマー番号４１及びプライマー番号３１のプライマー対を用いたＰＣＲを行い、GtTE遺伝子発現カセット（LDSPプロモーター配列、VCP1葉緑体移行シグナル、配列番号１に示すアミノ酸配列のＮ末端側１～４８７位、１～５２６位、１～５８６位、１～５９６位、若しくは１～６０６位のアミノ酸配列をコードする塩基配列を除去したGtTE遺伝子、VCP1ターミネーター配列、チューブリンプロモーター配列、ゼオシン耐性遺伝子、ヒートショックプロテインターミネーター配列からなるＤＮＡ断片）をそれぞれ増幅

した。

増幅した断片をそれぞれ、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。

[0082] 約1×10^9細胞のナンノクロロプシス・オキュラータNIES2145株を、384mM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GtTE遺伝子発現カセット約500ngを宿主細胞に混和し、50μF、500Ω、2,200v/2mm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（$NaNO_3$ 75mg、NaH_2PO_4・$2H_2O$ 6mg、ビタミンB12 0.5μg、ビオチン 0.5μg、チアミン 100μg、Na_2SiO_3・$9H_2O$ 10mg、Na_2EDTA・$2H_2O$ 4.4mg、$FeCl_3$・$6H_2O$ 3.16mg、$FeCl_3$・$6H_2O$ 12μg、$ZnSO_4$・$7H_2O$ 21μg、$MnCl_2$・$4H_2O$ 180μg、$CuSO_4$・$5H_2O$ 7μg、Na_2MoO_4・$2H_2O$ 7μg／人工海水1L)にて２４時間回復培養を行った。その後に、2μg/mLのゼオシン含有ｆ／２寒天培地に塗布し、25℃、0.3%CO_2雰囲気下、12h/12h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、GtTE遺伝子発現カセットを含むものをＰＣＲ法により選抜した。

[0083] （４）培養液中の脂質の抽出及び構成脂肪酸の分析

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」という）20mLに播種し、25℃、0.3%CO_2雰囲気下、12h/12h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2mLを、Ｎ１５Ｐ５培地18mLに植継ぎ、25℃、0.3%CO_2雰囲気下、12h/12h明暗条件にて３週間振盪培養した。

なお、陰性対照として、野生株であるナンノクロロプシス・オキュラータNIES2145株についても同様に実験を行った。

[0084] 培養液1mLに、内部標準として1mg/mLの7-ペンタデカノン（メタノール溶液）を50μL添加後、クロロホルム0.5mL及びメタノール1mLを培養液に添加して激しく攪拌し、10分間放置した。その後さらに、クロロホルム0.5mL及び1.5% KCl 0.5mLを添加して攪拌し、3,000rpmにて5分間間遠心分離を行い、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、0.5N水酸化カリウム／メタノール溶液0.7mLを添加し、80℃で30分間恒温した。続いて14%三フッ化ホウ素メタノール溶液（SIGMA社製）1mLを添加し、80℃にて10分間恒温した。その後、ヘキサン0.5mL、及び飽和食塩水1mLを添加し激しく撹拌し、室温にて10分間放置し、上層であるヘキサン層を回収して脂肪酸メチルエステルを得た。

[0085] 下記に示す測定条件下で、得られた脂肪酸メチルエステルをガスクロマトグラフィー解析に供した。

＜ガスクロマトグラフィー条件＞

分析装置：7890A（Agilent technology社製）

キャピラリーカラム：DB-WAX（10m×100μm×0.10μm、J&W Scientific社製）

移動相：高純度ヘリウム

オーブン温度：100℃ 保持0.5分→100～250℃（20℃/min昇温）→250℃ 保持3分（ポストラン：1分）

注入口温度：300℃

注入方法：スプリット注入（スプリット比：50：1）

注入量：5μＬ

洗浄バイアル：メタノール

検出方法：ＦＩＤ

検出器温度：350℃

[0086] 脂肪酸メチルエステルの同定及び定量は、実施例１と同様の方法で行った。その結果を表４に示す。

[0087]

[表4]

表4

導入した DNA	脂肪酸組成 (%TFA)														C8～C14 脂肪酸 生産量 (mg/L)
	C8:0	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0	C20:3	C20:4	C20:5	
WT	0.0	0.0	0.2	4.0	34.1	30.4	1.4	16.1	1.5	0.5	0.1	0.2	2.1	9.4	58.9
GtTE_488-Nanno	0.0	0.4	1.6	5.0	25.2	36.2	1.3	11.7	1.6	0.5	0.2	0.3	2.6	13.3	79.6
GtTE_527-Nanno	0.0	0.2	0.8	4.7	30.6	34.3	1.2	12.7	1.6	0.4	0.2	0.2	2.3	10.7	85.0
GtTE_587-Nanno	0.2	2.4	4.2	6.4	20.0	37.2	0.9	10.9	1.5	0.7	0.2	0.3	3.4	11.8	199.2
GtTE_597-Nanno	0.3	2.7	3.9	5.8	16.3	37.0	0.7	10.8	1.8	0.8	0.1	0.4	3.5	15.9	165.7

[0088] 表４から明らかなように、GtTE遺伝子発現カセットを導入したナンノクロロプシス形質転換体（表４中の「GtTE_488-Nanno」、「GtTE_527-Nanno」、「GtTE_587-Nanno」、「GtTE_597-Nanno」、「GtTE_607-Nanno」）のいずれにおいても、野生株（表４中の「WT」）と比べ、Ｃ１０：０脂肪酸、Ｃ１２：０脂肪酸、Ｃ１４：０脂肪酸の割合が増加していた。さらに、これらのうち２種類の形質転換体（「GtTE_587-Nanno」及び「GtTE_597-Nanno」）においては、野生株では全く検出されないＣ８：０脂肪酸も検出された。さらに、これらすべての形質転換体において、中鎖脂肪酸（Ｃ８～Ｃ１４脂肪酸）の生産量が野生株と比べて増加していた。

[0089] 以上のように、本発明で規定するアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ遺伝子の発現を促進させることで、中鎖脂肪酸の生産性及び生産される全脂肪酸の生産性を向上させた形質転換体を作製することができる。そしてこの形質転換体を培養することで、中鎖脂肪酸の生産性を向上させることができる。

[0090] 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考える。

[0091] 本願は、2014年12月5日に日本国で特許出願された特願2014-246573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] 宿主に下記タンパク質(A)～(C)のいずれか１つをコードする遺伝子が導入されている形質転換体を培養し、培養物から脂質を採取する、脂質の製造方法。
(A)配列番号１の６１１位～７７２位のアミノ酸配列からなるタンパク質。
(B)配列番号１の６１１位～７７２位のアミノ酸配列との同一性が８０％以上のアミノ酸配列からなり、かつアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ活性を有するタンパク質。
(C)前記タンパク質(A)又は(B)のアミノ酸配列を有し、かつアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ活性を有するタンパク質。

[請求項2] 宿主に下記タンパク質(A)～(C)のいずれか１つをコードする遺伝子を導入する工程を含む、形質転換体の細胞内で生産される脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質の生産性を向上させる方法。
(A)配列番号１の６１１位～７７２位のアミノ酸配列からなるタンパク質。
(B)配列番号１の６１１位～７７２位のアミノ酸配列との同一性が８０％以上のアミノ酸配列からなり、かつアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ活性を有するタンパク質。
(C)前記タンパク質(A)又は(B)のアミノ酸配列を有し、かつアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ活性を有するタンパク質。

[請求項3] 宿主に下記タンパク質(A)～(C)のいずれか１つ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、形質転換体の細胞内で生産される中鎖脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質の生産性を向上させ、生産される全脂肪酸又は全脂質中の脂肪酸又は脂質の組成を改変する、脂質の組成の改変方法。
(A)配列番号１の６１１位～７７２位のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(B)配列番号１の６１１位～７７２位のアミノ酸配列との同一性が８０％以上のアミノ酸配列からなり、かつアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ活性を有するタンパク質。
(C)前記タンパク質(A)又は(B)のアミノ酸配列を有し、かつアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ活性を有するタンパク質。

[請求項4] 前記タンパク質(C)が下記タンパク質(C1)～(C20)のいずれか１つである、請求項１～３のいずれか１項記載の方法。
(C1)配列番号１の１位～７７２位のアミノ酸配列からなるタンパク質。
(C2)配列番号１の４８７位～７７２位のアミノ酸配列からなるタンパク質。
(C3)配列番号１の４８８位～７７２位のアミノ酸配列からなるタンパク質。
(C4)配列番号１の４９７位～７７２位のアミノ酸配列からなるタンパク質。
(C5)配列番号１の５０７位～７７２位のアミノ酸配列からなるタンパク質。
(C6)配列番号１の５１７位～７７２位のアミノ酸配列からなるタンパク質。
(C7)配列番号１の５２７位～７７２位のアミノ酸配列からなるタンパク質。
(C8)配列番号１の５３７位～７７２位のアミノ酸配列からなるタンパク質。
(C9)配列番号１の５４７位～７７２位のアミノ酸配列からなるタンパク質。
(C10)配列番号１の５５７位～７７２位のアミノ酸配列からなるタンパク質。
(C11)配列番号１の５６７位～７７２位のアミノ酸配列からなるタン

パク質。

(C12)配列番号１の５７７位～７７２位のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(C13)配列番号１の５８７位～７７２位のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(C14)配列番号１の５９７位～７７２位のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(C15)配列番号１の６０７位～７７２位のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(C16)配列番号１の６０８位～７７２位のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(C17)配列番号１の６０９位～７７２位のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(C18)配列番号１の６１０位～７７２位のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(C19)前記タンパク質(C1)～(C18)のいずれか１つのアミノ酸配列との同一性が８０％以上のアミノ酸配列からなり、かつアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ活性を有するタンパク質。

(C20)前記タンパク質(C1)～(C18)のいずれか１つのアミノ酸配列に１又は数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入、又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ活性を有するタンパク質。

[請求項5] 前記タンパク質(A)～(C)のいずれか１つをコードする遺伝子が、下記ＤＮＡ(a)～(f)のいずれか１つからなる遺伝子である、請求項１～４のいずれか１項記載の方法。

(a)配列番号２の１８３１位～２３１９位の塩基配列からなるＤＮＡ。

(b)配列番号２の１８３１位～２３１９位の塩基配列との同一性が８

０％以上の塩基配列からなり、かつアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ活性を有するタンパク質をコードするＤＮＡ。

(c)前記ＤＮＡ(a)又は(b)の塩基配列を有し、かつアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ活性を有するタンパク質をコードするＤＮＡ。

(d)配列番号３の３７３位～８６１位の塩基配列からなるＤＮＡ。

(e)配列番号３の３７３位～８６１位の塩基配列との同一性が８０％以上の塩基配列からなり、かつアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ活性を有するタンパク質をコードするＤＮＡ。

(f)前記ＤＮＡ(d)又は(e)の塩基配列を有し、かつアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ活性を有するタンパク質をコードするＤＮＡ。

[請求項6] 前記宿主が微生物である、請求項１～５のいずれか１項記載の方法。

[請求項7] 前記微生物が大腸菌である、請求項６記載の方法。

[請求項8] 前記微生物が微細藻類である、請求項６記載の方法。

[請求項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、請求項８記載の方法。

[請求項10] 前記脂質が炭素数１２の脂肪酸又はその脂肪酸エステル化合物を含む、請求項１～９のいずれか１項記載の方法。

[請求項11] 下記タンパク質(A)～(C)。

(A)配列番号１の６１１位～７７２位のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(B)配列番号１の６１１位～７７２位のアミノ酸配列との同一性が８０％以上のアミノ酸配列からなり、かつアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ活性を有するタンパク質。

(C)前記タンパク質(A)又は(B)のアミノ酸配列を有し、かつアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ活性を有するタンパク質。

[請求項12] 前記タンパク質(C)が下記タンパク質(C1)～(C20)のいずれか１つである、請求項１１記載のタンパク質。

(C1)配列番号１の１位～７７２位のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(C2)配列番号１の４８７位～７７２位のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(C3)配列番号１の４８８位～７７２位のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(C4)配列番号１の４９７位～７７２位のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(C5)配列番号１の５０７位～７７２位のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(C6)配列番号１の５１７位～７７２位のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(C7)配列番号１の５２７位～７７２位のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(C8)配列番号１の５３７位～７７２位のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(C9)配列番号１の５４７位～７７２位のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(C10)配列番号１の５５７位～７７２位のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(C11)配列番号１の５６７位～７７２位のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(C12)配列番号１の５７７位～７７２位のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(C13)配列番号１の５８７位～７７２位のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(C14)配列番号１の５９７位～７７２位のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(C15)配列番号１の６０７位～７７２位のアミノ酸配列からなるタンパク質。
(C16)配列番号１の６０８位～７７２位のアミノ酸配列からなるタンパク質。
(C17)配列番号１の６０９位～７７２位のアミノ酸配列からなるタンパク質。
(C18)配列番号１の６１０位～７７２位のアミノ酸配列からなるタンパク質。
(C19)前記タンパク質(C1)～(C18)のいずれか１つのアミノ酸配列との同一性が８０％以上のアミノ酸配列からなり、かつアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ活性を有するタンパク質。
(C20)前記タンパク質(C1)～(C18)のいずれか１つのアミノ酸配列に１又は数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入、又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ活性を有するタンパク質。

[請求項13] 請求項１１又は１２記載のタンパク質をコードする遺伝子。

[請求項14] 下記ＤＮＡ(a)～(f)のいずれか１つからなる遺伝子。
(a)配列番号２の１８３１位～２３１９位の塩基配列からなるＤＮＡ。
(b)配列番号２の１８３１位～２３１９位の塩基配列との同一性が８０％以上の塩基配列からなり、かつアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ活性を有するタンパク質をコードするＤＮＡ。
(c)前記ＤＮＡ(a)又は(b)の塩基配列を有し、かつアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ活性を有するタンパク質をコードするＤＮＡ。
(d)配列番号３の３７３位～８６１位の塩基配列からなるＤＮＡ。
(e)配列番号３の３７３位～８６１位の塩基配列との同一性が８０％以上の塩基配列からなり、かつアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ活性を有するタンパク質をコードするＤＮＡ。

(f)前記ＤＮＡ(d)又は(e)の塩基配列を有し、かつアシル－ＡＣＰチオエステラーゼ活性を有するタンパク質をコードするＤＮＡ。

[請求項15] 請求項１３又は１４記載の遺伝子を含有する組換えベクター。

[請求項16] 請求項１３若しくは１４記載の遺伝子、又は請求項１５記載の組換えベクターを、宿主に導入してなる形質転換体。

[請求項17] 前記宿主が微生物である、請求項１６記載の形質転換体。

[請求項18] 前記微生物が大腸菌である、請求項１７記載の形質転換体。

[請求項19] 前記微生物が微細藻類である、請求項１７記載の形質転換体。

[請求項20] 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、請求項１９記載の形質転換体。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/JP2015/081357

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, *C12N1/15*(2006.01)i, *C12N1/19*(2006.01)i, *C12N1/21*(2006.01)i, *C12N5/10*(2006.01)i, *C12N9/16*(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)
C12N15/09, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N9/16, 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)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	CURTIS, B.A. et al., hypothetical protein GUITHDRAFT_165334 [Guillardia theta CCMP2712], [online], NCBI Reference Sequence: XP_005824882.1, 2013.10.24, [retrieval date 04.02.2016], Internet<URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/XP_005824882> entire text	11-17,19/ 1-10,18,20
A	WO 2014/103930 A1 (Kao Corp.), 03 July 2014 (03.07.2014), paragraphs [0007], [0008], [0012], [0060] to [0094] & US 2015/0307860 A1 paragraphs [0012], [0013], [0025], [0177] to [0210] & AU 2013367325 A	1-20

☒ 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
05 February 2016 (05.02.16)	16 February 2016 (16.02.16)

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
Japan Patent Office 3-4-3,Kasumigaseki,Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915,Japan	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2015/081357

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GONG, Y. et al., Characterization of a novel thioesterase(PtTE) from *Phaeodactylum tricornutum*., J. Basic Microbiol., 2011.12, Vol.51 No.6, p.666-672, ISSN 1521-4028, page 669, left column, line 1 to page 671, left column, line 5, table 1	1-20
A	HOOVER, S.W. et al., Bacterial production of free fatty acids from freshwater macroalgal cellulose., Appl. Microbiol. Biotechnol., 2011.07, Vol.91 No.2, p.436-446, ISSN 0175-7598, summary, tables 1, 2	1-20
P,A	WO 2015/005139 A1 (Kao Corp.), 15 January 2015 (15.01.2015), examples (Family: none)	1-20
P,A	JP 2015-177771 A (Kao Corp.), 08 October 2015 (08.10.2015), examples (Family: none)	1-20
E,A	JP 2016-007154 A (Kao Corp.), 18 January 2016 (18.01.2016), examples (Family: none)	1-20

国際調査報告	国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１５／０８１３５７

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N15/09(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N9/16(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.　C12N15/09, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N9/16, 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）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

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
X /A	CURTIS, B.A. et al., hypothetical protein GUITHDRAFT_165334 [Guillardia theta CCMP2712], [online], NCBI Reference Sequence: XP_005824882.1, 2013.10.24, [検索日 04.02.2016], インターネット＜URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/XP_005824882＞ 全文	11-17,19 /1-10,18,20

☑　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
０５．０２．２０１６	１６．０２．２０１６

国際調査機関の名称及びあて先	特許庁審査官（権限のある職員）	４Ｂ	４６７０
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	鶴　剛史 電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８		

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	WO 2014/103930 A1（花王株式会社） 2014.07.03, [0007]、[0008]、[0012]、[0060]－[0094] & US 2015/0307860 A1, [0012], [0013], [0025], [0177]-[0210] & AU 2013367325 A	1-20
A	GONG, Y. et al., Characterization of a novel thioesterase(PtTE) from *Phaeodactylum tricornutum*., J. Basic Microbiol., 2011.12, Vol.51 No.6, p.666-672, ISSN 1521-4028, 第669頁左欄第１行－第671頁左欄第５行、表１	1-20
A	HOOVER, S.W. et al., Bacterial production of free fatty acids from freshwater macroalgal cellulose., Appl. Microbiol. Biotechnol., 2011.07, Vol.91 No.2, p.436-446, ISSN 0175-7598, 要旨、表１及び表２	1-20
P,A	WO 2015/005139 A1（花王株式会社） 2015.01.15, 実施例 （ファミリーなし）	1-20
P,A	JP 2015-177771 A（花王株式会社） 2015.10.08, 実施例 （ファミリーなし）	1-20
E,A	JP 2016-007154 A（花王株式会社） 2016.01.18, 実施例 （ファミリーなし）	1-20