

(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
2017年3月9日(09.03.2017)



(10) 国際公開番号

WO 2017/038995 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 1/13 (2006.01) C12P 7/62 (2006.01)
C12N 15/01 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/075879
- (22) 国際出願日: 2016年9月2日(02.09.2016)
- (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 2015-173188 2015年9月2日(02.09.2015) JP
- (71) 出願人: 学校法人中央大学(CHUO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1920393 東京都八王子市中野7-4-2 Tokyo (JP). 株式会社デンソー(DENSO CORPORATION) [JP/JP]; 〒4488661 愛知県刈谷市昭和町1丁目1番地 Aichi (JP).
- (72) 発明者: 原山 重明(HARAYAMA Shigeaki); 〒1128551 東京都文京区春日1-13-27 中央大学後楽園キャンパス内 Tokyo (JP). 早川 准平(HAYAKAWA Jumpei); 〒1128551 東京都文京区

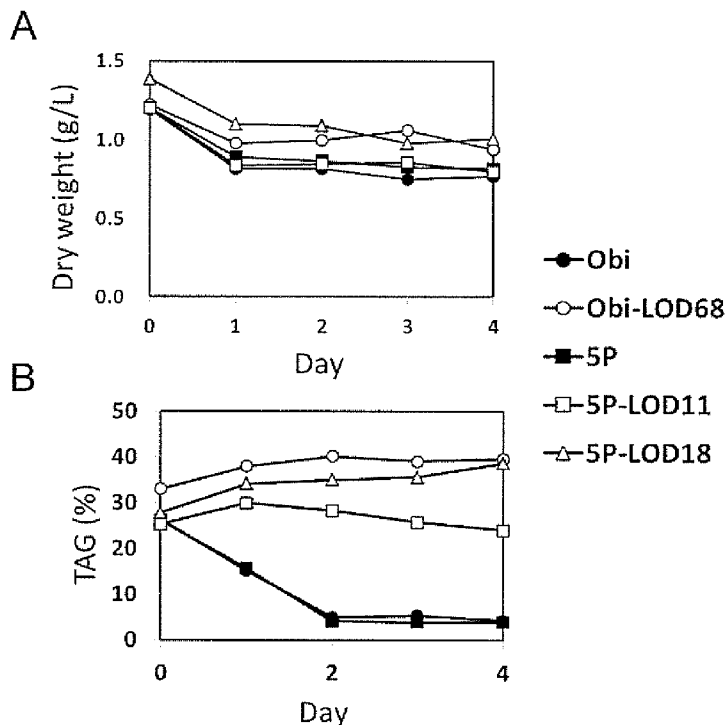
春日1-13-27 中央大学後楽園キャンパス内 Tokyo (JP). 井出 曜子(IDE Yoko); 〒1128551 東京都文京区春日1-13-27 中央大学後楽園キャンパス内 Tokyo (JP). 倉田 稔(KURATA Minoru); 〒4488661 愛知県刈谷市昭和町1丁目1番地 株式会社デンソー内 Aichi (JP).

(74) 代理人: 平木 祐輔, 外(HIRAKI Yusuke et al.); 〒1056232 東京都港区愛宕2丁目5番1号 愛宕グリーンヒルズMORIタワー32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, 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.

[続葉有]

- (54) Title: LIPASE MUTANT OF EUKARYOTIC MICROALGA
- (54) 発明の名称: 真核微細藻類のリパーゼ突然変異体



(57) **Abstract:** The objective of the present invention is to provide a eukaryotic microalga in which triacylglycerol (TAG) accumulation is improved, and which can proliferate even under short photoperiod conditions. Specifically, the present invention relates to a eukaryotic microalga mutant in which the TAG lipase activity of the SDP1 protein has been reduced, wherein intracellular TAG accumulation is increased and/or there is improved proliferation under short photoperiod cultivation conditions compared to the parent strain.

(57) **要約:** 本発明は、トリアシルグリセロール(TAG)蓄積量が向上し、日長が短い条件下でも増殖可能な真核微細藻類を提供することを目的とし、具体的には、SDP1タンパク質のTAGリパーゼ活性を低下させた真核微細藻類変異体であって、親株と比較して、細胞内TAG蓄積量が増加するか、及び/又は短日培養条件下での増殖が向上している、前記真核微細藻類変異体に関する。



- (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))
 - 規則 13 の 2 に基づいて明細書とは別に提出された、寄託された生物材料に関する表示 (規則 13 の 2.4(d)(i) 及び 48.2(a)(viii))
 - 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))

明 細 書

発明の名称：真核微細藻類のリパーゼ突然変異体

技術分野

[0001] 本発明は、トリアシルグリセロール・リパーゼ活性が減少した結果、野生型又は親株に比べてトリアシルグリセロール蓄積量が向上し、日長が短い条件下でも増殖できる真核微細藻類突然変異体及びその利用に関する。

背景技術

[0002] 単細胞性の光合成生物(以下、「微細藻類」と呼ぶ)が生産する脂肪酸、あるいは加水分解により脂肪酸を遊離するトリアシルグリセロール(以下、「TAG」と呼ぶ)等の化合物を原料として、バイオディーゼル燃料をはじめとする工業・食品製品を生産する研究が、世界的に行われている。しかしながら、現状ではTAG生産コストが高く、商業ベースでのバイオディーゼル燃料等の生産は困難である(非特許文献1)。そのため、バイオディーゼル燃料等の生産コスト削減のための更なる技術開発が続けられており、その1つに、微細藻類のTAG生産性の改良研究がある。TAG生産性を向上させるための研究の大多数は、TAGの生合成の強化を目指したものである。一方、合成されたTAGの分解を抑制することにより、TAGの蓄積量を上昇させることができると考えられる。

[0003] 実際、植物においては、リパーゼ活性を低下させることにより、以下に示すように、TAGの蓄積量を上昇させることに成功している。ナタネはパームや大豆と並び重要な植物油の原料である。ナタネの種にはTAGを主成分とする油脂が蓄積されるが、種の成熟時にTAG含量が約10%減少する。この減少は、TAGに特異的なリパーゼによるものであらうと考えられ、このリパーゼ活性を抑制することにより、ナタネの油脂含量を増加させる試みがなされた。Arabidopsis thalianaにおいては、SUGAR-DEPENDENT1(SDP1)と呼ばれる、TAGに特異的なリパーゼが存在することが知られているが、ナタネにもSDP1と相同性の高い遺伝子が複数存在する。これらの遺伝子からの発現を抑圧するため、ナ

タネのSDP1で良く保存されている塩基配列をターゲットとしたRNAi配列が設計された。そして、このRNAi配列を種子で特異的に発現するプロモーターの下流にクローン化した後、ナタネに導入したところ、導入株では、種子のTAG含量が有意に上昇した（非特許文献2）。類似の手法で、ヤトロファ(*Jatropha*)の種子のTAG含量を増やすことにも成功している（非特許文献3）。

[0004] 一方、真核微細藻類においては、リパーゼ活性を低下させることによってTAG蓄積量を増加させたという報告が唯一存在する。珪藻の一種である*Thalassiosira pseudonana*は窒素欠乏条件下でTAGを蓄積するが、この培養条件下で転写が減少する遺伝子の中で、リパーゼをコードしている可能性を持つものを捜したところ、Thaps3_264297と名付けられた遺伝子を見出した。そこで、このThaps3_264297の発現を抑制するアンチセンスRNAを発現させたところ、TAG蓄積量が3倍程度増加した（非特許文献4）。Thaps3_264297タンパク質を大腸菌内で発現させ、生化学的解析を行ったところ、Thaps3_264297タンパク質はTAGリパーゼ活性、フォスホリパーゼ活性、リソフォスファチジルアシル転移酵素(lysophosphatidic acid acyltransferase)活性を持つことが分かった。Thaps3_264297タンパク質と前述のSDP1との類似性は限定的である。

[0005] 単細胞性緑藻「シュードコリスチス・エリプソイディア(*Pseudochoricystis ellipsoidea*)0bi株」(以降、「0bi株」と呼ぶ場合がある)は、佐藤ら(非特許文献5;特許文献1)によって分離・解析された。この株の属及び種名は、国際藻類・菌類・植物命名規約に則り命名されたものではなく、仮称である。その後の遺伝子を用いた系統解析により、これらはCoccomyxa属及びPseudococcomyxa属に近縁であることが示されている。この株は、他の微細藻類と同様に、培地中の窒素源が枯渇すると細胞内にTAGを蓄積する(非特許文献6)。0bi株は、培地pHが3.5以下でも増殖できるので(特許文献2)、微細藻類を捕食する原生動物の増殖を最小限にした状態での屋外での大量培養が可能である。本発明者等は、0bi株の育種と大量培養技術の改良に取り組んできた。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：特許第4748154号公報

特許文献2：特開2014-117202号公報

非特許文献

[0007] 非特許文献1：Chisti Y. (2013) Constraints to commercialization of algal fuels. J. Biotechnol. 167:201-214.

非特許文献2：Kelly AA, Shaw E, Powers SJ, Kurup S, Eastmond PJ. (2013) Suppression of the SUGAR-DEPENDENT1 triacylglycerol lipase family during seed development enhances oil yield in oilseed rape (*Brassica napus* L.). Plant Biotechnol J. 11:355-361.

非特許文献3：Kim MJ, Yang SW, Mao HZ, Veena SP, Yin JL, Chua NH. (2014) Gene silencing of Sugar-dependent 1 (JcSDP1), encoding a patatin-domain triacylglycerol lipase, enhances seed oil accumulation in *Jatropha curcas*. Biotechnol Biofuels. 7:36. doi: 10.1186/1754-6834-7-36.

非特許文献4：Trentacoste EM, Shrestha RP, Smith SR, Gle C, Hartmann A C, Hildebrand M, Gerwick WH. (2013) Metabolic engineering of lipid catabolism increases microalgal lipid accumulation without compromising growth. Proc Natl Acad Sci U S A. 110:19748-19753.

非特許文献5：Sato A, Kato M, Yamato T, Ikegami Y, Sekiguchi H, Kurano N, Miyachi S. (2010) Characterization of the lipid accumulation in a new microalgal species, *Pseudochoricystis ellipsoidea* (Trebouxiophyceae). 2010, J. Jap. Inst. Energy 89, 909-913.

非特許文献6：Ito T, Tanaka M, Shinkawa H, Nakada T, Ano Y, Kurano N, Soga T, Tomita M. (2013) Metabolic and morphological changes of an oil accumulating trebouxiophycean alga in nitrogen-deficient conditions. Metabolomics. 9:178-187.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 真核微生物の増殖及びTAG生産性を改良し、TAG生産コストを削減することが望まれている。本発明は、TAGの細胞内蓄積量が増加し、日長が短い条件でも増殖可能な真核微細藻類を分離し、該微細藻類を利用したTAG生産方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0009] 上記課題を解決するため鋭意研究を行った結果、シロイヌナズナのTAGリパーゼであるSugar dependent 1 (AtSDP1) と相同性を持つタンパク質(以下、「SDP1タンパク質」と呼ぶ)をコードする遺伝子に変異した0bi株の突然変異体では、TAGの細胞内蓄積量が増加し、また、日長が短い条件での増殖が可能であることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0010] すなわち、本発明は以下を包含する。

(1) SDP1タンパク質のTAGリパーゼ活性を低下させた真核微細藻類変異体であって、親株と比較して、細胞内TAG蓄積量が増加するか、及び/又は短日培養条件下での増殖が向上しており、前記SDP1タンパク質が配列番号4に示すアミノ酸配列と少なくとも50%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有し、且つTAGリパーゼ活性を有するタンパク質である、前記真核微細藻類変異体。

(2) SDP1タンパク質をコードする遺伝子を破壊した、(1)記載の真核微細藻類変異体。

(3) SDP1タンパク質をコードする遺伝子の発現を低下させた、(1)記載の真核微細藻類変異体。

(4) SDP1タンパク質をコードする遺伝子の翻訳効率を低下させた、(1)記載の真核微細藻類変異体。

(5) 緑藻植物門に属する、(1)～(4)のいずれか1記載の真核微細藻類変異体。

(6) トレボキシア藻綱に属する、(5)記載の真核微細藻類変異体。

(7) コッコミクサ(Coccoomyxa)属又はシュードコッコミクサ(Pseudococcoomyxa)属に属する、(6)記載の真核微細藻類変異体。

(8) (1) ~ (7) のいずれか 1 記載の真核微細藻類変異体を培養する工程を含む、TAG生産方法。

[0011] 本明細書は本願の優先権の基礎となる日本国特許出願番号2015-173188号の開示内容を包含する。

発明の効果

[0012] 本発明により、細胞内のTAG蓄積量が向上し、あるいは日長が短い培養条件での増殖が改良された真核微細藻類変異体を作出することが可能となる。また、本発明に係る真核微細藻類変異体を培養することにより、バイオ燃料等に供するTAGの生産コストを削減することが可能となる。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]0bi株と0bi株由来の突然変異体を暗黒下培養した際の乾燥重量(A)とTAG含有量(B)の変化を示すグラフである。

[図2]0bi株と0bi株由来の突然変異体を光合成条件下培養した際のOD₇₅₀(A)とTAG含有量(B)の変化を示すグラフである。

[図3]0bi株と0bi株由来の突然変異体の増殖を示すグラフである。0bi株と0bi株由来の突然変異体を連続光下(A)又は明期8時間及び暗期16時間の光条件下(B)で培養し、その増殖をOD₇₅₀で測定した。図中の矢印の時間でサンプリングを行った。

発明を実施するための形態

[0014] 本発明は、シロイヌナズナの種子の発芽時に働くTAGリパーゼであるSugar dependent 1(AtSDP1)と相同性を持つSDP1タンパク質の担うTAGリパーゼ活性を低下させることにより、親株(又は野生株)と比較して、細胞内TAG蓄積量が増加し、及び/又は短日培養条件下(すなわち、日長が短い(例えば、明期8時間及び暗期16時間)培養条件下)での増殖が向上した真核微細藻類変異体に関する。

[0015] 微細藻類由来のTAGを原料としたバイオ燃料等の生産コストを削減するための最重要課題の一つは、微細藻類のTAG生産性の大幅向上である。本発明者等は、緑色植物亜界・緑藻植物門(以下、「緑藻」と記す)に属するシュードコ

リシスチス・エリプソイディア(*Pseudochoricystis ellipsoidea*; *P. ellipsoidea*) (仮称)Obi株[受託番号FERM BP-10484; 特許文献1(当該特許では、「シュードコリシスチス エリプソイディア セキグチ エト クラノ ジェン エト エスピー ノブ(*Pseudochoricystis ellipsoidea* Sekiguchi et Kurano gen. et sp. nov.) MBIC11204株」と称される)]由来の配列番号3で示されるアミノ酸配列から成るSDP1タンパク質(DNA塩基配列: 配列番号1、mRNA塩基配列: 配列番号2)を欠損させることにより、この緑藻の細胞内のTAG蓄積量が増加し、また日長が短い条件での増殖が改良されることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0016] SDP1タンパク質は、植物に広く存在するTAGリパーゼであり、特に油糧種子の発芽時に、貯蔵TAGの分解と転流とに関わっていることで知られている。具体的には、TAGリパーゼ活性とは、グリセロールに3分子の脂肪酸がエステル結合しているトリアシルグリセロールの中の1つのエステル結合を加水分解し、ジアシルグリセロールと脂肪酸とを生成する酵素活性を意味する。人工的な遺伝子操作を用いてSDP1の担うTAGリパーゼ活性を低減させることによって真核微細藻類の細胞内TAG含有量を向上させること、及び、TAGリパーゼ活性低減株を培養することにより、バイオ燃料等に供するTAGの生産コストを大幅削減することが可能となる。

[0017] 本発明において、真核微細藻類としては、緑藻、珪藻(diatomあるいはBacillariophyceae)、真正眼点藻綱(Eustigmatophyceae)等に属する真核微細藻類を挙げることができる。

[0018] 緑藻としては、例えばトレボキシア藻綱に属する緑藻が挙げられる。トレボキシア藻綱に属する緑藻としては、例えば、トレボキシア(*Trebouxia*)属、クロレラ(*Chlorella*)属、ボトリオコッカス(*Botryococcus*)属、コリシスチス(*Choricystis*)属、コッコミクサ(*Coccomyxa*)属、シュードコッコミクサ(*Pseudococcomyxa*)属に属する緑藻が挙げられる。トレボキシア藻綱に属する具体的な株としては、*P. ellipsoidea* Obi株(受託番号FERM BP-10484; 特許文献1)及びその変異株*P. ellipsoidea* 5P株(受託番号FERM BP-22179; 特開2013-1

02715号公報；以下、「5P株」と呼ぶ場合がある)が挙げられる。P. ellipsoidea 0bi株は、平成17年(2005年)2月15日付で独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター(〒305-8566日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6)に受託番号FERM P-20401として寄託され、さらに受託番号FERM BP-10484としてブダペスト条約に基づく国際寄託へ移管されている。P. ellipsoidea 5P株は、平成23年(2011年)10月21日付で独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター(〒305-8566日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6)に受託番号FERM P-22179として寄託され、さらに独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許生物寄託センター(NITE-IPOD)(〒292-0818日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 120号室)に受託番号FERM BP-22179としてブダペスト条約に基づく国際寄託へ移管されている。なお、P. ellipsoidea 0bi株とP. ellipsoidea 5P株とは、同一のSDP1タンパク質をコードする遺伝子(ゲノムDNA塩基配列：配列番号1、mRNA塩基配列：配列番号2、アミノ酸配列：配列番号3)を有する。トレボキシア藻綱に属する緑藻以外の緑藻としては、例えばテトラセルミス(Tetraselmis)属、アンキストロデスムス(Ankistrodesmus)属、ドラニエラ(Dunalliella)属、ネオクロリス(Neochloris)属、クラミドモナス属、イカダモ (=セネデスムス：Scenedesmus)属等に属する緑藻が挙げられる。

[0019] 更に珪藻としては、フィストウリフェラ(Fistulifera)属、フェオダクチラム属、タラシオシラ (Thalassiosira) 属、シクロテラ (Cyclotella) 属、シリンドロティカ (Cylindrotheca) 属、スケルトネマ (Skeletonema) 属等に属する真核微細藻類を挙げることができる。さらに、真正眼点藻綱としては、ナンノクロロプシス属が挙げられる。

[0020] 本発明に係る真核微細藻類変異体は、上述の真核微細藻類を親株として、TAGリパーゼ活性を低下させる方法に供することで得られた真核微細藻類変異体である。

[0021] 本発明において、SDP1タンパク質としては、配列番号4に示すアミノ酸配列(すなわち、配列番号3における172番目～625番目のアミノ酸配列に相当す

る保存性の高いアミノ酸配列)と少なくとも50%、好ましくは、少なくとも65%、特に好ましくは、少なくとも80%、最も好ましくは、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有し、且つTAGリパーゼ活性を有するタンパク質が挙げられる。

[0022] また、SDP1タンパク質としては、配列番号3に示すアミノ酸配列と少なくとも50%、好ましくは、少なくとも65%、特に好ましくは、少なくとも80%、最も好ましくは、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、100%の配列同一性を有するアミノ酸配列から成り、且つTAGリパーゼ活性を有するタンパク質が挙げられる。

[0023] SDP1遺伝子としては、配列番号2における131番目～2419番目の塩基配列で示されたmRNAのコーディング領域と少なくとも50%、好ましくは、少なくとも58%、特に好ましくは、少なくとも65%、少なくとも80%、最も好ましくは、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、100%の配列同一性を有するmRNAをコードし、且つTAGリパーゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子、又は上記mRNA塩基配列に対して1～数か所(例えば10か所以下、好ましくは5か所以下、より好ましくは3か所以下、さらに好ましくは2か所以下)の部分塩基配列が欠失、置換、付加又は挿入された塩基配列から成るmRNA塩基配列をコードし、且つTAGリパーゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子が挙げられる。

[0024] また、SDP1遺伝子としては、例えば配列番号3に示すアミノ酸配列と少なくとも50%、好ましくは、少なくとも65%、特に好ましくは、少なくとも80%、最も好ましくは、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、100%の配列同一性を有するアミノ酸配列から成り、且つTAGリパーゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子、又は上記タンパク質のアミノ酸配列に対して1～数か所(例えば10か所以下、好ましくは5か所以下、より好ましくは3か所以下、さらに好ましくは2か所以下)のアミノ酸部分配列が欠失、置換、付加又は挿入されたアミノ酸配列から成り、且つTAGリパーゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子が挙げられる。

- [0025] 多くの真核微細藻類においては、複数のSDP1遺伝子、例えば対立遺伝子、同義遺伝子等が存在する場合があるが、本発明においては、これらのうち少なくとも1つ又は複数のSDP1遺伝子を意味する。
- [0026] 本発明においては、以上に説明したSDP1遺伝子を有する真核微細藻類に対して、SDP1遺伝子によりコードされるSDP1タンパク質が担うTAGリパーゼ活性を低下させる方法に供することで、本発明に係る真核微細藻類変異体を得ることができる。
- [0027] 具体的に、本発明に係るSDP1タンパク質の担うTAGリパーゼ活性を低減した真核微細藻類変異体は、実施例に示した手順に従って作出できる。すなわち、親株の真核微細藻類に突然変異誘起物質を作用させた後、TAG含量が上昇した変異体をスクリーニングし、得られた変異体においてSDP1遺伝子に変異が起こっていることを確認することによって作出できる。これによって、SDP1遺伝子領域のDNAに塩基の置換、欠失、挿入及び/又は付加を伴う変異を導入することができる。
- [0028] SDP1タンパク質の担うTAGリパーゼ活性を低下させるそれ以外の方法としては、例えば(1) SDP1遺伝子をターゲットとして変異を導入し、当該遺伝子を破壊する；
- (2) SDP1遺伝子の転写を抑制し、該遺伝子の発現を低下させる；
- (3) SDP1遺伝子の翻訳を抑制し、該遺伝子の翻訳効率を低下させる；
- 方法が挙げられる。
- [0029] (1) SDP1遺伝子をターゲットとして変異を導入する方法
- SDP1遺伝子をターゲットとして変異を導入する方法としては、該遺伝子の塩基配列が知られている場合、ZFN、TALENあるいはCRISPR/Casと呼ばれる遺伝子ノックアウト法(Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF 3rd. (2013) ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. Trends Biotechnol. 31:397-405.)を用いることにより、その遺伝子が欠損した変異体を作成できる。
- [0030] 該遺伝子の塩基配列が知られていない場合、以下に示す方法で、該遺伝子

の塩基配列を決定できる。真核微細藻類及び植物に存在するSDP1タンパク質には非常に良く保存されたアミノ酸配列が存在するので、そのアミノ酸配列を元に設計されたPCRプライマーを用いて、対象とする真核微細藻類のゲノムDNAを鋳型としたPCR増幅反応を行い、増幅されたDNA断片を大腸菌にクローン化した後、そのDNA断片の塩基配列を決定する。この方法によって、該遺伝子の部分塩基配列を知ることができ、上記遺伝子ノックアウト法を適用できるようになる。

[0031] 一つの生物に複数のSDP1遺伝子が含まれている場合があり、PCR増幅されたDNA断片を直接シーケンシング反応に供することは避けるべきである。このようにして得られたSDP1遺伝子部分配列をさらに拡張したい場合は、インバーサPCR法(Huang SH. (1994) Inverse polymerase chain reaction. An efficient approach to cloning cDNA ends. Mol Biotechnol. 12:15-22.)等を用いれば良い。

[0032] また、近年、所謂次世代シーケンシング技術が発達し、ゲノム全塩基配列の決定が非常に容易になった。そこで、対象真核微細藻類のゲノム全塩基配列を先ず決定し、その中から、SDP1タンパク質をコードする遺伝子配列を抽出すれば良い。

[0033] (2) SDP1遺伝子の転写を抑制し、該遺伝子の発現を低下させる方法

SDP1遺伝子の転写を抑制する方法としては、対象となる真核微細藻類における該遺伝子のプロモーター領域に変異を導入する方法が挙げられる。

[0034] また、該遺伝子の正の発現制御に関わる遺伝子に変異を導入し、それらの機能を低下させる方法が挙げられる。

[0035] あるいは、該遺伝子の負の発現制御に関わる遺伝子に変異を導入し、負の発現制御が常時働くようにする方法が挙げられる。

[0036] (3) SDP1遺伝子の翻訳を抑制し、該遺伝子の翻訳効率を低下させる方法

SDP1遺伝子の翻訳を抑制する方法としては、いわゆるRNA干渉法(Cerutti H et al., 2011, Eukaryot Cell, 10, 1164)が挙げられる。

[0037] 以上のようにして得られた真核微細藻類変異体のTAG蓄積量と日長が短い培

養条件での増殖とを、実施例1に説明する方法等によって測定し、TAGの細胞内蓄積量の増加あるいは日長が短い培養条件での増殖改善が確認できれば、本発明に係るSDP1タンパク質の担うTAGリパーゼ活性を減少させた真核微細藻類変異体の作出が完成する。

[0038] なお、本発明に係る真核微細藻類変異体の例として、実施例に示す0bi株に由来するTAGリパーゼ突然変異体0bi-L0D68株が、平成27年(2015年)8月27日付で独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許生物寄託センター(NITE-IP0D)(〒292-0818日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 120号室)に受託番号FERM P-22293として寄託され、さらに受託番号FERM BP-22293としてブダペスト条約に基づく国際寄託へ移管されている。

[0039] さらに、本発明は、以上に説明した本発明に係る真核微細藻類変異体を大量培養し、TAGを生産する方法を含む。大量培養法としては、既に確立されている非特許文献6に記載の培養法等を用いることができる。具体的には、尿素を窒素源とし、pHが4以下である培地を用いて、微細藻類を培養する方法である(特許文献2)。この培養方法によれば、窒素源を尿素とすることで、窒素分消費によるpHの変動は最小限となる。また、pH4以下の培養液中にCO₂を導入しても重炭酸イオンがほとんど生じないので、培養液のpHが変動しにくい特徴もある。このように培養液のpHを安定的に4以下に保つことが出来るので、他の微細藻類や原生生物の増殖を抑制することができる。

[0040] 培養後、例えば培養物からヘキサン抽出等によって、TAGを含む脂質を得ることができる。

実施例

[0041] 以下、実施例を用いて本発明をより詳細に説明するが、本発明の技術的範囲はこれら実施例に限定されるものではない。

[0042] [実施例1] TAGリパーゼ突然変異体の分離

0bi株あるいは0bi株由来の低クロロフィル突然変異体である5P株(特開2013-102715号公報)を、突然変異誘起剤であるNTG(1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine)で処理した後、1/3 DENS0培地 [0.29 mM (NH₄)₂SO₄, 0.79 mM Urea

, 130 μM MgSO_4 , 90 μM KH_2PO_4 , 90 μM K_2HPO_4 , 20 μM CaCl_2 , 1.2 μM CuSO_4 , 0.38 μM H_3BO_3 , 0.35 μM ZnSO_4 , 0.2 μM MnSO_4 , 0.1 μM CoCl_2 , 4 nM Na_2MoO_4 , 0.1% (v/v) Fe solution (3 g/L citric acid, 4.9 g/L ammonium ferric citrate, 0.5 g/L EDTA-2Na)] で1週間培養した。この時点で培養液には窒素分が枯渇し、細胞内にTAGが蓄積された。その後、この細胞をMA5培地 (Imamura et al., 2012, J Gen Appl Microbiol, 58, 1)に移した後、暗黒中に4日間置いた。細胞をこの状態、すなわち窒素分があるが光合成できない状態に置くと、蓄積したTAGは(野生株においては)次第に分解された(図1 B参照)。4日後に、細胞内のTAGをBODIPY 501/515で蛍光染色し、蛍光の強い(TAG蓄積量が多い)細胞をFACS(fluorescence activated cell sorting)を用いて濃縮した。FACS濃縮を受けた細胞を再度1/3 DENS0培地で培養しTAGを蓄積させた後、MA5培地に移し、暗黒中で4日間培養した。その後、再度FACS濃縮を行った。このFACS濃縮を計3回行ったところ、暗黒中で4日間置いた後でも、TAGをほとんど分解しない細胞集団が得られた。この集団を適当に希釈し、MA5寒天培地にまいてコロニーを作らせた。

[0043] 前述のように、0bi株を窒素欠乏条件下で培養するとTAGが細胞内に蓄積されるが、それと同時に細胞のクロロフィル含有量が減少した。高いTAG且つ低クロロフィルとなった細胞を新鮮なMA5培地に移し、暗黒中に数日置くと、細胞のTAG含有量が減少し、クロロフィル含有量が増加する事を見出した。これは、TAGの分解で得られたエネルギーと炭素分とを用いて、クロロフィルが新規に合成されるためと考えられた。

[0044] そこで、FACS濃縮後に得られた0bi株のコロニーを、窒素分を抜いたMA5培地(MA5-N)で作った寒天培地の上に置いたニトロセルロース膜上に広げるように塗布し、蛍光灯下で一週間培養した。すると、ニトロセルロース膜上で黄色の細胞が増殖した。この細胞では、TAG含有量が高く、クロロフィル含有量は低いと考えられる。次に、この黄色細胞をニトロセルロース膜ごと、MA5寒天培地上に移し、暗所で培養した。野生株である0bi株では、暗所に移されてから4日間以内に、細胞の色が緑色に変わった。一方、FACS濃縮後に分離され

たコロニー由来のクローンの多くでは、MA5寒天培地に移された後でも、細胞の色は黄色のままであった。後述のように、これらのクローンでは、暗黒中でのTAG分解能力が欠損していた。

[0045] 〔実施例2〕TAGリパーゼ突然変異体のTAG分解

実施例1に示した方法を用いて、TAG分解が欠損していると思われる突然変異体をObi株より2株(Obi-L0D68及びObi-L0D69)、5P株より2株(5P-L0D11、5P-L0D18)分離した。

[0046] これらの突然変異体とそれらの親株であるObi株及び5P株を、1/3 DENS0培地で1週間培養した。そして、TAGを蓄積した細胞を回収し、MA5培地に再懸濁した後、4日間暗黒下で培養した。

[0047] 図1には、Obi株、5P株、Obi-L0D68株、5P-L0D11株及び5P-L0D18株を暗黒下培養した際の乾燥重量とTAG含有量の変化結果を示す。暗所に置かれたそれぞれの株の乾燥重量は、最初の1日にわずかに減少したものの、2日目以降ではほとんど変化はなかった(図1A)。一方、TAG含有量については、Obi株及び5P株において、最初の2日間で大きく減少した。これに対して、突然変異体はいずれも、TAG含有量の減少は少ない(5P-L0D11株)か、減少しなかった(図1B)。図には示していないが、Obi-L0D69株においても同条件下でTAG含有量は減少しなかった。

[0048] Obi株、5P株及び2つの突然変異体(Obi-L0D68、5P-L0D18)を、1/3 DENS0培地で1週間培養し、細胞内にTAGを蓄積させた後、これらの細胞をMA5培地に移し、その後7日間蛍光灯下で培養した。蛍光灯下で育てられたこれらの株は、いずれも同じように増殖した(図2A)。増殖開始に伴って、野生株(Obi株と5P株)のTAGは速やかに減少した。一方、突然変異体においては、TAGは、野生株よりもやや遅く減少した(図2B)。この結果から、少なくとも2つのTAGリパーゼがObi株に存在することが予想された。1つは、光合成条件下でのみ活性が誘導されるTAGリパーゼであり、もう1つは、暗黒下でも活性を持つTAGリパーゼである。今回分離された突然変異体では、この暗黒下でも活性を持つTAGリパーゼが欠損していると思われた。

[0049] 〔実施例3〕 TAGリパーゼ突然変異体の増殖とTAG蓄積

2つのTAGリパーゼ突然変異体であるObi-L0D68株及び5P-L0D18株とそれらの親株であるObi株及び5P株を、1/3 DENS0培地中、2つの光条件下で培養した。一つは連続光下での培養であり、もう一つは、8時間明期、16時間暗期の光条件下での培養である。

[0050] 連続光培養では、親株とリパーゼ突然変異体との間で、顕著な増殖速度及び増殖収量の差は認められなかった(図3A)。しかしながら、17日後のTAG蓄積量を調べると、リパーゼ突然変異体のTAG蓄積量が野生株のそれを大きく上回っていた(表1)。

[0051] 同じ株を、1/3 DENS0培地を用いて8時間明期、16時間暗期の光条件下で培養した場合、Obi株と5P株では、 OD_{750} が3付近で増殖が停止した。これに対して、TAGリパーゼ変異体では、 OD_{750} が3を越えて増殖が続いていた(図3B)。

[0052] 培養液の細胞密度が高くなると、各細胞が利用できる光の量が減少してくる。恐らく OD_{750} が3であるObi株及び5P株においては、8時間の明期に得るエネルギー量と明期及び暗期を通して細胞を維持するのに必要なエネルギー量とがほぼ等しいのであろうと考えられた。

[0053] 一方、同じ光条件下で育てられたTAGリパーゼ突然変異体の増殖収率は、野生株よりも高かった。このことから、暗期にTAGをエネルギーとして利用できないこれらの突然変異体では、光合成で獲得するエネルギー効率が上昇しているか、細胞を維持するエネルギーが減少しているか、その両者であるかのいずれかであらうと考えられた。これらの変化がTAGリパーゼの変異と直接関係しているとは考えにくく、TAGリパーゼの欠損によって引き起こされた代謝物プロファイルの変化がシグナルとなって、様々な代謝酵素の発現が変化した結果起こったものであらうと考えられた。このように、TAGリパーゼ突然変異体は、乏しい条件での増殖に有利であるという、予想しなかった結果が得られた。

[0054] TAGリパーゼ変異体、特に、Obi-L0D68株においては、この光条件においても、TAG含有量は44%を維持していた(表1)。

[0055] 以上、本研究によって、TAGリパーゼ変異体は、乏しい光条件においての増殖とTAG蓄積能力が野生株よりも優れていることが示された。よって、朝、夕あるいは日長が短い条件において、TAGリパーゼ変異体は野生株より優れたTAG生産性を示し、年間でのTAG生産量を増加させることが期待できる。

[0056] [表1]

Obi 株と Obi 株由来の突然変異体の油脂蓄積			
Strain	L24:D0	L8:D16	
	Day 17	Day 14	Day 24
Obi	42	26	12
Obi-L0D68	52	28	44
5P	43	22	11
5P-L0D18	50	19	29

[0057] [Obi株、低クロロフィル変異体である5P株、Obi株由来のTAGリパーゼ欠損体であるObi-L0D68株、5P株由来のTAGリパーゼ変異体である5P-L0D18株のそれぞれを、連続光下(L24:D0)又は明期8時間及び暗期16時間の光条件下(L8:D16)で培養し、連続光培養の場合は培養開始後17日、明暗培養の場合は、培養開始後14及び24日目でサンプリングし、細胞内の油脂含有量を測定した]

[0058] [実施例4] TAGリパーゼ突然変異体のゲノム解析

Obi-L0D68、5P-L0D11、5P-L0D18の3株のゲノム塩基配列をIllumina HiSeq 2000で決定し、変異解析を行った。Obi-L0D68株ゲノムには23個の遺伝子にアミノ酸配列の変化を伴う突然変異が検出された。5P-L0D11及び5P-L0D18株のゲノムには、それぞれ、10個及び19個のアミノ酸配列の変化を伴う遺伝子変異が検出された。これら独立した3つ突然変異体に共通して変異があった遺伝子は、pev02gs0318601と命名されていた遺伝子(遺伝子塩基配列：配列番号1、mRNAの塩基配列：配列番号2、アミノ酸配列：配列番号3)のみであり、シロイヌナズナの種子の発芽時に働くTAGリパーゼであるSugar dependent 1(AtSDP1)と相同性が高かった。よって、pev02gs0318601遺伝子をSDP1と名付けた。

[0059] Obi-L0D68株は、Splice acceptor部位に1塩基置換があり、スプライス部位

変異が起こっていた。5P-L0D11株は、エキソンとイントロンを含む139 bpの欠失が、5P-L0D18株は塩基置換によるナンセンス変異が確認された。そこで、同じ表現型を持つ0bi-L0D69株のDNAからpev02gs0318601 (= SDP1) 遺伝子をPCRにより増幅し、ABI BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit及びABI 3730xl sequencerにて塩基配列を決定した。その結果、0bi-L0D69株のSDP1遺伝子に、1塩基置換によるミスセンス変異があることが確認された。

[0060] 以上を総合して、0bi-L0D68株、0bi-L0D69株、5P-L0D11株、5P-L0D18株における、(1)暗期でのTAG分解欠損、(2)連続光下又は明暗培養条件下での細胞内TAG蓄積量の増加、及び(3)光が乏しい条件下での増殖の改良は、SDP1遺伝子の変異によって起こされたと結論した。

受託番号

[0061] FERM BP-10484

FERM BP-22179

FERM BP-22293

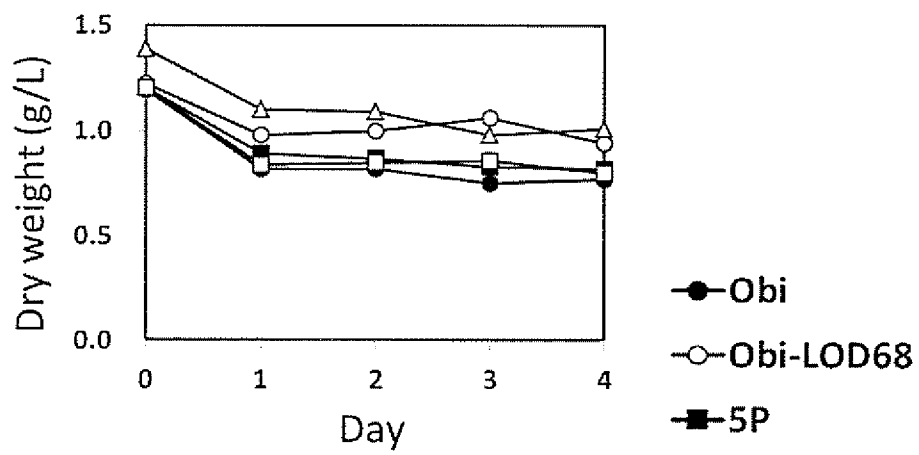
本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願はそのまま引用により本明細書に組み入れられるものとする。

請求の範囲

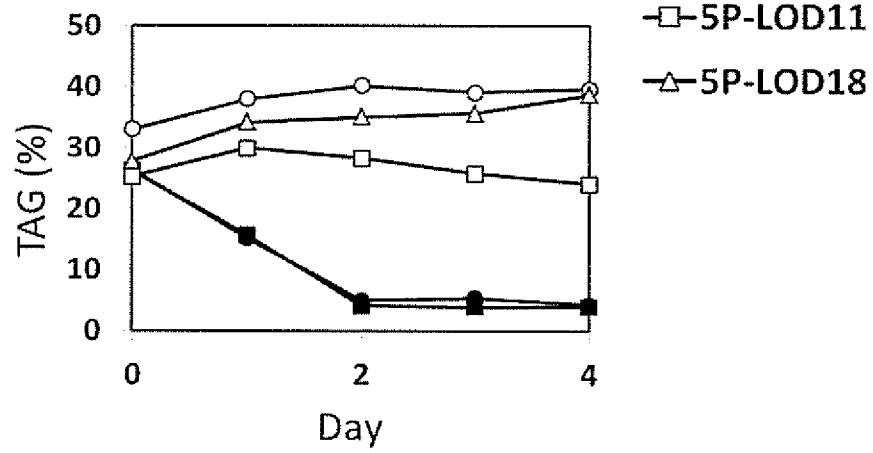
- [請求項1] SDP1タンパク質のトリアシルグリセロール(TAG)リパーゼ活性を低下させた真核微細藻類変異体であって、親株と比較して、細胞内TAG蓄積量が増加するか、及び/又は短日培養条件下での増殖が向上しており、前記SDP1タンパク質が配列番号4に示すアミノ酸配列と少なくとも50%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有し、且つTAGリパーゼ活性を有するタンパク質である、前記真核微細藻類変異体。
- [請求項2] SDP1タンパク質をコードする遺伝子を破壊した、請求項1記載の真核微細藻類変異体。
- [請求項3] SDP1タンパク質をコードする遺伝子の発現を低下させた、請求項1記載の真核微細藻類変異体。
- [請求項4] SDP1タンパク質をコードする遺伝子の翻訳効率を低下させた、請求項1記載の真核微細藻類変異体。
- [請求項5] 緑藻植物門に属する、請求項1～4のいずれか1項記載の真核微細藻類変異体。
- [請求項6] トレボキシア藻綱に属する、請求項5記載の真核微細藻類変異体。
- [請求項7] コッコミクサ(Coccomyxa)属又はシュードコッコミクサ(Pseudococcomyxa)属に属する、請求項6記載の真核微細藻類変異体。
- [請求項8] 請求項1～7のいずれか1項記載の真核微細藻類変異体を培養する工程を含む、TAG生産方法。

[図1]

A

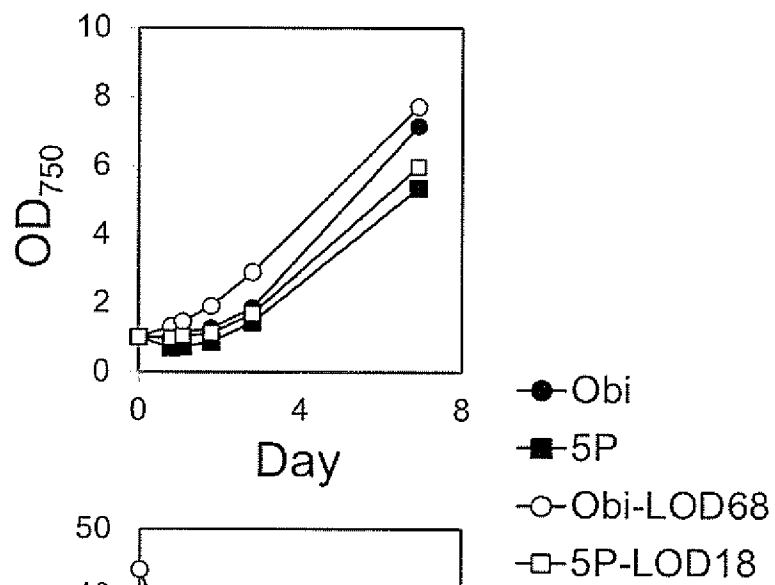


B

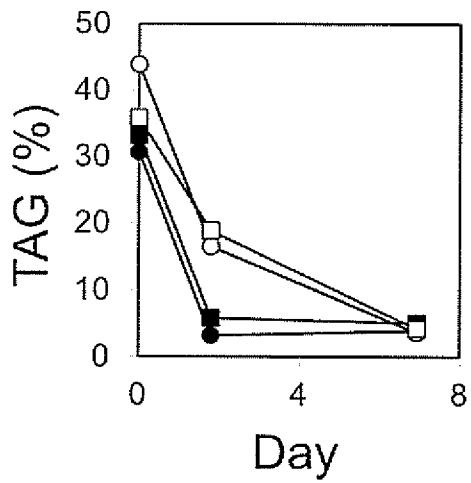


[図2]

A

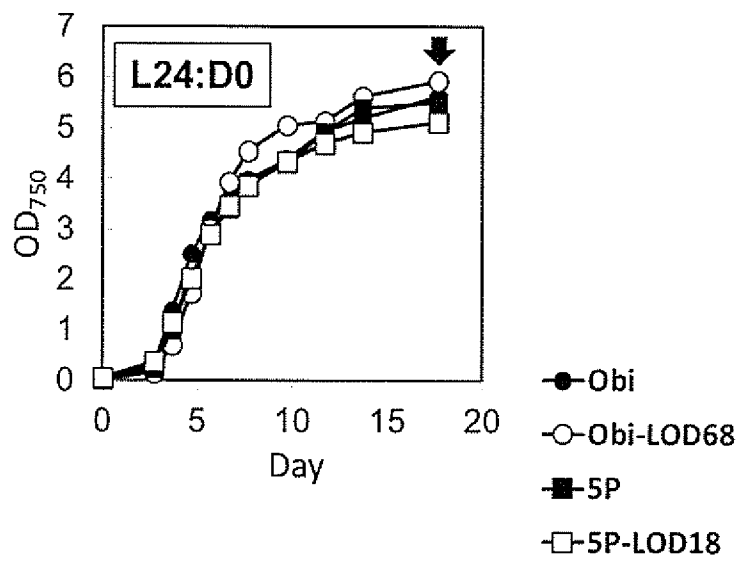


B

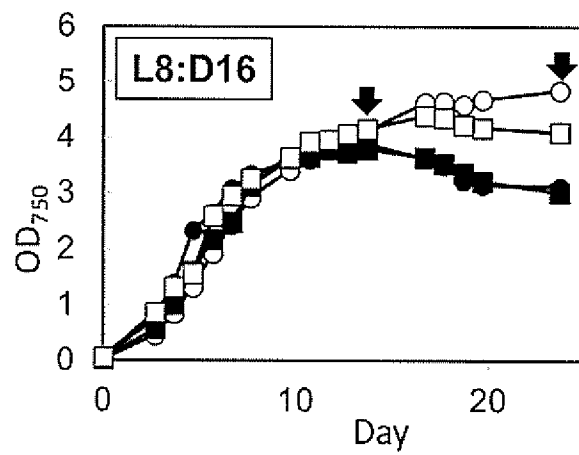


[図3]

A



B



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/075879

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N1/13(2006.01)i, C12N15/01(2006.01)i, C12P7/62(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N1/13, C12N15/01, C12P7/62

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2016	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2016

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII),
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/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.
Y	JP 2014-527803 A (Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt Am Main), 23 October 2014 (23.10.2014), paragraphs [0016] to [0019]; fig. 1 to 2 & US 2014/0256927 A1 paragraphs [0014] to [0017]; fig. 1 to 2 & WO 2013/034648 A1 & EP 2753685 A1	1-8
Y	UniProtKB - I0YJD5, [online], URL: http://www.uniprot.org/uniprot/I0YJD5 Last modified: June 13, 2012, [retrieved on 2016.11.15]	1-8
Y	UniProtKB - A0A061QXU0, [online], URL: http://www.uniprot.org/uniprot/A0A061QXU0 Last modified: September 3, 2014, [retrieved on 2016.11.15]	1-8

☒ 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
15 November 2016 (15.11.16)

Date of mailing of the international search report
29 November 2016 (29.11.16)

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

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/075879

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2015/075881 A1 (Denso Corp.), 28 May 2015 (28.05.2015), claims & US 2016/0273061 A claims & JP 2015-97504 A	6-8
Y	MSANNE J. et al., Metabolic and gene expression changes triggered by nitrogen deprivation in the photoautotrophically grown microalgae Chlamydomonas reinhardtii and Coccomyxa sp. C- 169, Phytochemistry, 2012, vol.75, p.50-59, Abstract	6-8

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. C12N1/13(2006.01)i, C12N15/01(2006.01)i, C12P7/62(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. C12N1/13, C12N15/01, C12P7/62

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

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

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

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
 GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, UniProt/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
Y	JP 2014-527803 A（ヨハン ウォルフガング ゲーテ・ユニベルジ テート フランクフルト アム マイン）2014.10.23, 【0016】 - 【0019】、図1-2 & US 2014/0256927 A1 [0014]-[0017], Figs. 1-2 & WO 2013/034648 A1 & EP 2753685 A1	1-8
Y	UniProtKB - I0YJD5, [online], URL:http://www.uniprot.org/uniprot/I0YJD5 Last modified:June 13, 2012, [retrieved on 2016.11.15]	1-8

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

15.11.2016

国際調査報告の発送日

29.11.2016

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（ISA/J P）
 郵便番号100-8915
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

福岡 信子

4N

3539

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	UniProtKB - A0A061QXU0, [online], URL: http://www.uniprot.org/uniprot/A0A061QXU0 Last modified: September 3, 2014, [retrieved on 2016.11.15]	1-8
Y	WO 2015/075881 A1 (株式会社デンソー) 2015.05.28, 特許請求の範囲 & US 2016/0273061 A claims & JP 2015-97504 A	6-8
Y	MSANNE J. et al., Metabolic and gene expression changes triggered by nitrogen deprivation in the photoautotrophically grown microalgae Chlamydomonas reinhardtii and Coccomyxa sp. C-169, Phytochemistry, 2012, vol.75, p.50-59, Abstract	6-8