

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6580912号
(P6580912)

(45) 発行日 令和1年9月25日(2019.9.25)

(24) 登録日 令和1年9月6日(2019.9.6)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/54 (2006.01)	C 1 2 N 15/54 Z N A
C 1 2 P 7/64 (2006.01)	C 1 2 P 7/64
C 1 2 N 1/13 (2006.01)	C 1 2 N 1/13
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21
C 1 2 N 9/10 (2006.01)	C 1 2 N 9/10

請求項の数 20 (全 24 頁)

(21) 出願番号 特願2015-179167 (P2015-179167)
 (22) 出願日 平成27年9月11日(2015.9.11)
 (65) 公開番号 特開2017-51153 (P2017-51153A)
 (43) 公開日 平成29年3月16日(2017.3.16)
 審査請求日 平成30年6月8日(2018.6.8)

(73) 特許権者 000000918
 花王株式会社
 東京都中央区日本橋茅場町1丁目14番1
 〇号
 (74) 代理人 110002631
 特許業務法人イイダアンドパートナーズ
 (74) 代理人 100076439
 弁理士 飯田 敏三
 (74) 代理人 100141771
 弁理士 星野 宏和
 (72) 発明者 杉原 慎二
 和歌山県和歌山市湊1334 花王株式会
 社研究所内

審査官 福澤 洋光

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 脂質の製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記タンパク質(A)又は(B)をコードする遺伝子の発現を促進させた形質転換体を培養して脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質を生産させる、脂質の製造方法。

(A) 配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

(B) 前記タンパク質(A)のアミノ酸配列と同一性が90%以上のアミノ酸配列からなり、かつアシルトランスフェラーゼ活性を有するタンパク質。

【請求項2】

下記タンパク質(A)又は(B)をコードする遺伝子の発現を促進させ、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る、脂質生産性の向上方法。

(A) 配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

(B) 前記タンパク質(A)のアミノ酸配列と同一性が90%以上のアミノ酸配列からなり、かつアシルトランスフェラーゼ活性を有するタンパク質。

【請求項3】

下記タンパク質(A)又は(B)をコードする遺伝子の発現を促進させ、形質転換体の細胞内で生産される脂肪酸の総量を向上させる、脂質生産性の向上方法。

(A) 配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

(B) 前記タンパク質(A)のアミノ酸配列と同一性が90%以上のアミノ酸配列からなり、かつアシルトランスフェラーゼ活性を有するタンパク質。

【請求項 4】

下記タンパク質 (A) 又は (B) 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。

(A) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

(B) 前記タンパク質 (A) のアミノ酸配列と同一性が 90% 以上のアミノ酸配列からなり、かつアシルトランスフェ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) 又は (B) 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、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 6】

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

(a) 配列番号 2 で表される塩基配列からなる DNA。

(b) 前記 DNA (a) の塩基配列と同一性が 90% 以上の塩基配列からなり、かつアシルトランスフェラーゼ活性を有するタンパク質をコードする DNA。

【請求項 7】

前記形質転換体において、アシル - ACP チオエステラーゼをコードする遺伝子の発現を促進させた、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項記載の方法。

20

【請求項 8】

前記形質転換体が微生物である、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 9】

前記微生物が微細藻類である、請求項 8 記載の方法。

【請求項 10】

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 9 記載の方法。

【請求項 11】

前記微生物が大腸菌である、請求項 8 記載の方法。

【請求項 12】

前記脂質が中鎖脂肪酸又はそのエステルを含む、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項記載の方法。

30

【請求項 13】

下記タンパク質 (A) 又は (B)。

(A) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

(B) 前記タンパク質 (A) のアミノ酸配列と同一性が 90% 以上のアミノ酸配列からなり、かつアシルトランスフェラーゼ活性を有するタンパク質。

【請求項 14】

請求項 13 記載のタンパク質をコードする遺伝子。

【請求項 15】

下記 DNA (a) 又は (b) からなる遺伝子。

(a) 配列番号 2 で表される塩基配列からなる DNA。

(b) 前記 DNA (a) の塩基配列と同一性が 90% 以上の塩基配列からなり、かつアシルトランスフェラーゼ活性を有するタンパク質をコードする DNA。

40

【請求項 16】

請求項 14 又は 15 記載の遺伝子を含有する組換えベクター。

【請求項 17】

請求項 14 又は 15 記載の遺伝子の発現を促進させた形質転換体。

【請求項 18】

前記形質転換体が微生物である、請求項 17 記載の形質転換体。

50

【請求項 19】

前記微生物が微細藻類である、請求項 18 記載の形質転換体。

【請求項 20】

アシル - ACP チオエステラーゼをコードする遺伝子の発現を促進させた、請求項 17 ~ 19 のいずれか 1 項記載の形質転換体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、脂質の製造方法に関する。また、本発明は当該方法に用いるアシル基転移酵素、これをコードする遺伝子、及び当該遺伝子の発現を促進させた形質転換体に関する。

10

【背景技術】

【0002】

脂肪酸は脂質の主要構成成分の 1 つであり、生体内においてグリセリンとのエステル結合により生成するトリアシルグリセロール等の脂質を構成する。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（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利用されている。また、ポリオキシアルキレンアルキルエーテルやアルキルポリグリコシド等は非イオン性界面活性剤として利用されている。そしてこれらの界面活性剤は、いずれも洗浄剤や殺菌剤等に利用されている。同じ高級アルコールの誘導体であるアルキルアミン塩やモノ又はジアルキル 4 級アミン塩等のカチオン性界面活性剤は、繊維処理剤、毛髪リンス剤、殺菌剤等に日常的に利用されている。また、ベンザルコニウム型 4 級アンモニウム塩は殺菌剤や防腐剤等に日常的に利用されている。さらに、植物油脂はバイオディーゼル燃料の原料としても利用されている。

20

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。

【0003】

植物の脂肪酸合成経路は葉緑体に局在する。葉緑体ではアセチル - ACP（アシルキャリアプロテイン、acyl-carrier-protein）を出発物質とし、炭素鎖の伸長反応が繰り返され、最終的に炭素数 16 又は 18 のアシル - ACP（脂肪酸残基であるアシル基と ACP とからなる複合体）が合成される。合成されたアシル - ACP は、アシル - ACP チオエステラーゼ（以下、単に「TE」ともいう）によって遊離脂肪酸となる。遊離脂肪酸は、アシル - CoA シンテターゼにより CoA が結合する。そして、脂肪酸アシル CoA は各種アシル基転移酵素によってグリセロール骨格へと組み込まれ、グリセロール 1 分子に対して脂肪酸 3 分子がエステル結合してなるトリアシルグリセロール（以下、単に「TAG」ともいう）として蓄積される。

30

【0004】

TAG の生合成では、まずグリセロール 3 リン酸（以下、「G3P」ともいう）の sn-1 位において、グリセロール 3 リン酸アシル基転移酵素（以下、「GPAT」ともいう）によるアシル基の結合が起こり、リゾホスファチジン酸（以下、「LPA」ともいう）が生産される。次に、LPA の sn-2 位において、リゾホスファチジン酸アシル基転移酵素（以下、「LPAAT」ともいう）によるアシル基の結合が起こり、ホスファチジン酸（以下、「PA」ともいう）が生産される。続いて、ホスファチジン酸脱リン酸化酵素（以下、「PAP」ともいう）により脱リン酸化が起こり、ジアシルグリセロール（以下、「DAG」ともいう）が生産される。最後に、ジアシルグリセロールアシル基転移酵素（以下、「DGAT」ともいう）により、sn-3 位にアシル基が結合し、TAG が生産される。

40

また、ホスホリピッド：ジアシルグリセロールアシル基転移酵素（以下、「PDAT」ともいう）によって、リン脂質のアシル基を DAG に転移して TAG を生産する経路も存在する。

50

グリセロールに結合する脂肪酸の種類は多岐にわたり、結合する脂肪酸の組み合わせによって、様々なTAG化合物が生じる。そして植物では、エネルギー貯蔵物質として主に種子等にTAG化合物が蓄積されている。

【0005】

これまでに、各種アシル基転移酵素を利用して、TAGや脂肪酸を生産する方法が提案されている。

例えば、DGAT2を過剰発現させたコナミドリムシ (*Chlamydomonas reinhardtii*) を用いてTAGを製造する方法が、特許文献1及び2で提案されている。また、特許文献3にはナンノクロロプシス・オキュラータ (*Nannochloropsis oculata*) 由来のDGATが記載され、炭素数が18や22の長鎖多価不飽和脂肪酸などの生産に関わる可能性が示唆されている。さらに、タラシオシラ・シュードナナ (*Thalassiosira pseudonana*) 由来のGPATを利用してパルミチン酸の生産性を向上させる方法(特許文献4参照)、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 由来のPDATを利用してTAGの生産性を向上させる方法(特許文献5参照)、ココヤシ (*Cocos nucifera*) 由来のLPAATを利用して中鎖脂肪酸の生産性を向上させる方法(特許文献6参照)、などが提案されている。

10

【0006】

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・蓄積の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。

20

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】国際公開第2011/156520号

【特許文献2】特開2014-14334号公報

【特許文献3】国際公開第2011/161093号

【特許文献4】国際公開第2009/120366号

【特許文献5】国際公開第00/60095号

【特許文献6】国際公開第95/27791号

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

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及び生産される脂肪酸の総量を向上させる、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、中鎖脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質の生産性及び生産される脂肪酸の総量を向上させた形質転換体を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者らは上記課題に鑑み、鋭意検討を行った。

40

本発明者らはまず、油脂の合成に関与する酵素として、藻類の1種であるナンノクロロプシス属の藻類のアシル基転移酵素(以下、「AT」ともいう)を新たに同定した。そして、このATの微生物内での発現を促進させた結果、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及び生産される脂肪酸の総量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。

【0010】

本発明は、下記タンパク質(A)又は(B)をコードする遺伝子の発現を促進させた形質転換体を培養して脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質を生産させる、脂質の製造方法に関する。

(A) 配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

50

(B) 前記タンパク質(A)のアミノ酸配列と同一性が44%以上のアミノ酸配列からなり、かつアシルトランスフェラーゼ活性を有するタンパク質。

【0011】

また本発明は、前記タンパク質(A)又は(B)に関する。

また本発明は、前記タンパク質(A)又は(B)をコードする遺伝子に関する。

さらに本発明は、前記タンパク質(A)又は(B)をコードする遺伝子の発現を促進させた形質転換体に関する。

【発明の効果】

【0012】

本発明の脂質の製造方法によれば、中鎖脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質の生産性及び生産される脂肪酸の総量を向上させることができる。

また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及び生産される全脂肪酸の生産性に優れる。

【発明を実施するための形態】

【0013】

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

また本明細書において、脂肪酸や、脂肪酸を構成するアシル基の表記において「Cx:y」とあるのは、炭素原子数xで二重結合の数がyであることを表す。「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、6xSSC(1xSSC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、5x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。

【0014】

前記タンパク質(A)及び(B)(以下、「NoAT」、「AT4295」又は「NoAT4295」ともいう)はアシル基転移酵素の1種であり、グリセロール3リン酸などグリセロール化合物のアシル化を触媒するタンパク質である。配列番号1のアミノ酸配列からなるタンパク質は、ナンノクロ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NIES2145株由来のATである。

【0015】

前記タンパク質(A)及び(B)はいずれも、アシルトランスフェラーゼ活性(以下、「AT活性」ともいう)を有する。本明細書において「AT活性」とは、グリセロール3リン酸などグリセロール化合物のアシル化を触媒する活性を意味する。

タンパク質がAT活性を有することは、例えば、トリアシルグリセロール合成遺伝子欠損株を用いた系により確認することができる。あるいは、宿主細胞内で機能するプロモーターの下流に前記タンパク質をコードする遺伝子を連結したDNAを宿主細胞内へ導入し、導入した遺伝子が発現する条件下で細胞を培養した後、細胞の破碎液に対し、G3P、LPA、DAGのいずれかの受容体とともに、供与体としてアシルCoAや各種リン脂質、各種糖脂質などを添加した系において、G3PからLPA、LPAからDAG、DAGからTAGが合成されるか検討を行うことにより確認できる。

【0016】

10

20

30

40

50

アミノ酸配列及び塩基配列のBlastの結果から、前記タンパク質(A)及び(B)は、アシル基転移酵素の1種と考えられる。

後述の実施例で示すように、前記タンパク質(A)をコードする遺伝子の発現を促進した形質転換体では、炭素数12や14等の中鎖脂肪酸の生産性と、生産される脂肪酸の総量が向上する。

なお本明細書において「中鎖」とは、アシル基の炭素数が炭素数が6以上14以下、好ましくは炭素数が8以上14以下、より好ましくは炭素数が10以上14以下、より好ましくは炭素数が12以上14以下、よりさらに好ましくは炭素数が12又は14、であることをいう。

【0017】

前記タンパク質(B)において、AT活性の点から、前記タンパク質(A)のアミノ酸配列との同一性は45%以上が好ましく、50%以上がより好ましく、55%以上がより好ましく、60%以上がより好ましく、65%以上がより好ましく、70%以上がより好ましく、75%以上がより好ましく、80%以上がより好ましく、85%以上がより好ましく、90%以上がより好ましく、93%以上がより好ましく、95%以上がより好ましく、96%以上がより好ましく、97%以上がより好ましく、98%以上がより好ましく、99%以上がさらに好ましい。また、前記タンパク質(B)として、前記タンパク質(A)のアミノ酸配列に、1又は複数個、例えば1個以上238個以下、好ましくは1個以上233個以下、より好ましくは1個以上212個以下、より好ましくは1個以上191個以下、より好ましくは1個以上170個以下、より好ましくは1個以上148個以下、より好ましくは1個以上127個以下、好ましくは1個以上106個以下、より好ましくは1個以上85個以下、より好ましくは1個以上63個以下、より好ましくは1個以上42個以下、より好ましくは1個以上29個以下、より好ましくは1個以上21個以下、より好ましくは1個以上17個以下、より好ましくは1個以上12個以下、より好ましくは1個以上8個以下、さらに好ましくは1個以上4個以下、のアミノ酸を欠失、置換、挿入又は付加したタンパク質が挙げられる。

アミノ酸配列に変異を導入する方法としては、例えば、アミノ酸配列をコードする塩基配列に変異を導入する方法が挙げられる。変異を導入する方法としては、部位特異的な変異導入法が挙げられる。具体的な部位特異的な変異の導入方法としては、SOE-PCRを利用した方法、ODA法、Kunkel法等が挙げられる。また、Site-Directed Mutagenesis System Mutan-SuperExpress Kmキット(タカラバイオ社)、Transformer TM Site-Directed Mutagenesisキット(Clontech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。

【0018】

前記タンパク質(A)及び(B)は、通常の化学的手法、遺伝子工学的手法等により得ることができる。例えば、ナンノクロロプシス・オキユラータから単離、精製等することで天然物由来のタンパク質を取得することができる。また、配列番号1に示すアミノ酸配列情報をもとに人工的に化学合成することで、前記タンパク質(A)及び(B)を得ることができる。あるいは、遺伝子組み換え技術により、組換えタンパク質として前記タンパク質(A)及び(B)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AT遺伝子を用いることができる。

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

【0019】

前記タンパク質(A)又は(B)をコードする遺伝子(以下、「AT遺伝子」ともいう)の一例として、下記DNA(a)又は(b)からなる遺伝子(以下、「NoAT遺伝子」、「AT4295遺伝子」又は「NoAT4295遺伝子」ともいう)が挙げられる。

- (a) 配列番号 2 で表される塩基配列からなる DNA。
 (b) 前記 DNA (a) の塩基配列と同一性が 5 1 % 以上の塩基配列からなり、かつ AT 活性を有するタンパク質をコードする DNA。

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

【 0 0 2 0 】

前記 DNA (b) において、AT 活性の点から、前記 DNA (a) の塩基配列との同一性は 5 5 % 以上が好ましく、6 0 % 以上がより好ましく、6 5 % 以上がより好ましく、7 0 % 以上がより好ましく、7 5 % 以上がより好ましく、8 0 % 以上がより好ましく、8 5 % 以上がより好ましく、9 0 % 以上がより好ましく、9 3 % 以上がより好ましく、9 5 % 以上がより好ましく、9 6 % 以上がより好ましく、9 7 % 以上がより好ましく、9 8 % 以上がより好ましく、9 9 % 以上がさらに好ましい。また前記 DNA (b) として、配列番号 2 で表される塩基配列において 1 又は複数個、例えば 1 個以上 6 2 4 個以下、好ましくは 1 個以上 5 7 3 個以下、より好ましくは 1 個以上 5 1 0 個以下、より好ましくは 1 個以上 4 4 6 個以下、より好ましくは 1 個以上 3 8 2 個以下、好ましくは 1 個以上 3 1 8 個以下、より好ましくは 1 個以上 2 5 5 個以下、より好ましくは 1 個以上 1 9 1 個以下、より好ましくは 1 個以上 1 2 7 個以下、より好ましくは 1 個以上 8 9 個以下、より好ましくは 1 個以上 6 3 個以下、より好ましくは 1 個以上 5 1 個以下、より好ましくは 1 個以上 3 8 個以下、より好ましくは 1 個以上 2 5 個以下、さらに好ましくは 1 個以上 1 2 個以下、の塩基が欠失、置換、挿入、又は付加されており、かつ AT 活性を有する前記タンパク質 (A) 又は (B) をコードする DNA も好ましい。さらに前記 DNA (b) として、前記 DNA (a) と相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつ AT 活性を有するタンパク質をコードする DNA も好ましい。

【 0 0 2 1 】

前記 AT 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 AT 遺伝子を宿主に導入する方法、前記 AT 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。

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

本発明で用いる形質転換体は、宿主自体に比べ、中鎖脂肪酸及びこれを構成成分とする脂質の生産性 (中鎖脂肪酸及びこれを構成成分とする脂質の生産量、生産される全脂肪酸又は脂質に占める中鎖脂肪酸及びこれを構成成分とする脂質の割合) が有意に向上する。またその結果、当該形質転換体では、脂質中の脂肪酸組成が改変される。そのため、当該形質転換体を用いた本発明は、特定の炭素数脂質、特に中鎖脂肪酸及びこれを構成成分とする脂質、好ましくは炭素数 6 以上 1 4 以下の脂肪酸及びこれを構成成分とする脂質、より好ましくは炭素数 8 以上 1 4 以下の脂肪酸及びこれを構成成分とする脂質、より好ましくは炭素数が 1 0 以上 1 4 以下の脂肪酸及びこれを構成成分とする脂質、より好ましくは炭素数が 1 2 以上 1 4 以下の脂肪酸及び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が 1 2 若しくは 1 4 の脂肪酸及びこれを構成成分とする脂質、の生産に好適に用いることができる。

さらに、本発明の形質転換体は、宿主自体に比べ、中鎖脂肪酸及びこれを構成成分とする脂質の生産性が有意に向上するとともに、生産される脂肪酸の総量も有意に向上する。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、宿主や形質転換体の脂肪酸及び脂質の生産性については、実施例で用いた方法により測定することができる。

【 0 0 2 2 】

前記AT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。

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

【0023】

本発明で好ましく用いることができる形質転換体は、前記AT遺伝子を常法により前記宿主に導入することで得られる。具体的には、前記AT遺伝子を宿主細胞中で発現させることのできる組換えベクターや遺伝子発現カセットを調製し、これを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。

【0024】

形質転換体の宿主としては通常用いられるものより適宜選択することができる。本発明で用いることができる宿主としては、微生物(藻類や微細藻類を含む)、植物体、及び動物体が挙げられる。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く、微細藻類であることがさらに好ましい。

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*)属の微生物やバシラス(*Bacillus*)属の微生物、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、大腸菌(*Escherichia coli*)、枯草菌(*Bacillus subtilis*)、赤色酵母(*Rhodospiridium toruloides*)、又はモルチエレラ・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*)属の藻類、クロレラ(*Chlorella*)属の藻類、ファエオダクティラム(*Phaeodactylum*)属の藻類、又はナンノクロロプシス属の藻類が好ましく、ナンノクロロプシス属の藻類がより好ましい。ナンノクロロプシス属の藻類の具体例としては、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・グラニユラータ(*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*)、西洋アブラナ(*Brassica napus*)、アブラナ(*Brassica rapa*)、ココヤシ、パーム(*Elaeis guineensis*)、クフエア、ダイズ(*Glycine max*)、トウモロコシ(*Zea mays*)、イネ(*Oryza sativa*)、ヒマワリ(*Helianthus annuus*)、クスノキ(*Cinnamomum camphora*)、又はヤトロファ(*Jatropha curcas*)が好ましく、シロイヌナズナがより好ましい。

【0025】

遺伝子発現用プラスミドベクター又は遺伝子発現カセットの母体となるベクター(プラスミド)としては、目的のタンパク質をコードする遺伝子を宿主に導入することができ、宿主細胞内で当該遺伝子を発現させることができるベクターであればよい。例えば、導入する宿主の種類に応じたプロモーターやターミネーター等の発現調節領域を有するベクタ

10

20

30

40

50

ーであって、複製開始点や選択マーカ等をも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よいし、染色体内に組み込まれるベクターであってよい。

本発明で好ましく用いることができる発現用ベクターとしては、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)、及び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。

藻類又は微細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)の記載の方法を参考にして、目的の遺伝子、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断片や制限酵素で切断した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)、及びIN3系ベクター (インプラントイノベーションズ社製) が挙げられる。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。

【0026】

また、前記発現ベクターに組み込んだ目的のタンパク質をコードする遺伝子の発現を調整するプロモーターの種類も、使用する宿主の種類に応じて適宜選択することができる。本発明で好ましく用いることができるプロモーターとしては、lacプロモーター、trpプロモーター、tacプロモーター、trcプロモーター、T7プロモーター、SpoVGプロモーター、イソプロピル -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、ハウスキープ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)、西洋アブラナ又はアブラナ由来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ピオラキサンチン/クロロフィル a 結合タンパク質遺伝子のプロモーター (VCP1プロモーター、VCP2プロモーター) (Oliver Kilian, et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, vol. 108(52))、及び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。本発明で宿主としてナンノクロロプシスを用いる場合、ピオラキサンチン/クロロフィル a 結合タンパク質遺伝子のプロモーターや、ナンノクロロプシス属由来のオレオシン様タンパクLDSP 遺伝子のプロモーターを好ましく用いることができる。

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

10

20

30

40

50

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、プラストサイジンS耐性遺伝子、ピアラフォス耐性遺伝子、ゼオシン耐性遺伝子、パロモマイシン耐性遺伝子、及び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できる。

【0027】

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

また、形質転換方法は、使用する宿主の種類に応じて常法より適宜選択することができる。例えば、カルシウムイオンを用いる形質転換方法、一般的なコンピテントセル形質転換方法、プロトプラスト形質転換法、エレクトロポレーション法、LP形質転換方法、アグロバクテリウムを用いた方法、パーティクルガン法等が挙げられる。宿主としてナンノクロロプシス属の藻類を用いる場合、Randor Radakovits, et al., Nature Communications, DOI:10.1038/ncomms1688, 2012等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。

10

【0028】

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、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。

20

【0029】

前記AT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。ゲノム上に前記AT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AT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。

【0030】

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。ゲノム上に前記AT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、「AT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、前記AT遺伝子の発現を促進させることができる。例えば、ゲノム上に前記AT遺伝子を有する宿主の1つであるナンノクロロプシス・オキュラータNIES-2145株においては、配列番号41に示す塩基配列からなるDNA配列の直下にNoAT遺伝子が存在しており、配列番号41に示す塩基配列からなるDNA配列中にプロモーター領域が存在している。この配列番号41に示す塩基配列からなるDNA配列の一部又は全部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、前記AT遺伝子の発現を促進させることができる。

30

【0031】

AT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、AT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。

40

宿主としてナンノクロロプシスを用いる場合には、チューブリンプロモーター、ヒートショックプロテインプロモーター、上述のピオラキサンチン/クロロフィルa結合タンパク質遺伝子のプロモーター（VCP1プロモーター（配列番号35）、VCP2プロモーター）、及びナンノクロロプシス属由来のオレオシン様タンパクLDS P遺伝子のプロモーター（配列番号18）を好ましく用いることができる。中鎖脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質の生産性向上の観点から、ピオラキサンチン/クロロフィルa結合タンパク質遺伝子のプロモーター及びLDS P遺伝子のプロモーターがより好ましい。

【0032】

50

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、Beshar 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。特に、宿主がナンノクロコプシス属に属する藻類の場合、Oliver Kili an, et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, vol. 108(52)等の文献を参考にして、相同組換え法によりゲノム中の特定の領域を改変することができる。

【0033】

本発明の形質転換体は、前記タンパク質(A)又は(B)をコードする遺伝子に加えて、TEをコードする遺伝子(以下、「TE遺伝子」ともいう)の発現も促進されていることが好ましい。

前述したように、TEは、 β -ケトアシル-A C Pシンターゼ(β -Ketoacyl-acyl-carrier-protein synthase、以下「KAS」ともいう)等の脂肪酸合成酵素によって合成されたアシル-A C P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。TEの作用によってA C P上での脂肪酸合成が終了し、切り出された脂肪酸は多価不飽和脂肪酸の合成やTAG等の合成に供される。そして、TAGの合成などに、前述のATが関与する。

そのため、AT遺伝子に加えてTE遺伝子の発現を促進することで、ATが関与するTAGの合成に用いる基質の生成量が増加し、脂質の製造に用いる形質転換体の脂質の生産性、特に脂肪酸の生産性を一層向上させることができる。さらに、後述の実施例でも示すように、AT遺伝子に加えてTE遺伝子の発現を促進することで、各脂肪酸量の総和(総脂肪酸量)も向上させることができる。

本発明で用いることができるTEは、アシル-A C Pチオエステラーゼ活性(以下、「TE活性」ともいう)を有するタンパク質であればよい。ここで「TE活性」とは、アシル-A C Pのチオエステル結合を加水分解する活性をいう。

【0034】

TEは、基質であるアシル-A C P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TEが存在していることが知られている。よってTEは、生体内での脂肪酸組成を決定する重要なファクターであると考えられている。また、TEをコードする遺伝子を元来有していない宿主を用いる場合、TEをコードする遺伝子の発現を促進させることが好ましい。また、中鎖アシル-A C Pに対する基質特異性を有するTE遺伝子の発現を促進させることにより、中鎖脂肪酸の生産性が向上する。このような遺伝子を導入することで、中鎖脂肪酸の生産性を一層向上させることができる。

【0035】

本発明で用いることができるTEは、通常のTEや、それらと機能的に均等なタンパク質から、宿主の種類等に応じて適宜選択することができる。

例えば、*Cuphea calophylla* subsp. *mesostemon*由来のTE (GenBank ABB71581); *Cinnamomum camphora*由来のTE (GenBank AAC49151.1); *Myristica fragrans*由来のTE (GenBank AAB71729); *Myristica fragrans*由来のTE (GenBank AAB71730); *Cuphea lanceolata*由来のTE (GenBank CAA54060); *Cuphea hookeriana*由来のTE (GenBank Q39513); *Ulumus americana*由来のTE (GenBank AAB71731); *Sorghum bicolor*由来のTE (GenBank EER87824); *Sorghum bicolor*由来のTE (GenBank EER88593); *Cocos nucifera*由来のTE (CnFatB1: Jing et al. BMC Biochemistry 2011, 12:44参照); *Cocos nucifera*由来のTE (CnFatB2: Jing et al., BMC Biochemistry, 2011, 12:44参照); *Cuphea viscosissima*由来のTE (CvFatB1: Jing et al., BMC Biochemistry, 2011, 12:44参照); *Cuphea viscosissima*由来のTE (CvFatB2: Jing et al., BMC Bioch

10

20

30

40

50

emistry 2011, 12:44参照) ; Cuphea viscosissima由来のTE (CvFatB3 : Jing et al. , BMC Biochemistry , 2011 , 12:44参照) ; Elaeis guineensis由来のTE (GenBank AAD42220) ; Desulfovibrio vulgaris由来のTE (GenBank ACL08376) ; Bacteriodes fragilis由来のTE (GenBank CAH09236) ; Parabacteriodes distasonis由来のTE (GenBank ABR43801) ; Bacteroides thetaiotaomicron由来のTE (GenBank AA077182) ; Clostridium asparagiforme由来のTE (GenBank EEG55387) ; Bryanthella formatexigens由来のTE (GenBank EET61113) ; Geobacillus sp . 由来のTE (GenBank EDV77528) ; Streptococcus dysgalactiae由来のTE (GenBank BAH81730) ; Lactobacillus brevis由来のTE (GenBank ABJ63754) ; Lactobacillus plantarum由来のTE (GenBank CAD63310) ; Anaerococcus tetradius由来のTE (GenBank EEI82564) ; Bdellovibrio bacteriovorus由来のTE (GenBank CAE80300) ; Clostridium thermocellum由来のTE (GenBank ABN54268) ; ナンノクロロプシス・オキュラータ由来のTE (以下、「NoTE」ともいう) (配列番号28、これをコードする遺伝子の塩基配列：配列番号29) ; ゲッケイジュ由来のTE (GenBank AAA34215.1、配列番号42、これをコードする遺伝子の塩基配列：配列番号43) ; ココヤシ由来のTE (配列番号44、これをコードする遺伝子の塩基配列：配列番号45) ; ナンノクロロプシス・ガディタナ由来のTE (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) ; ナンノクロロプシス・グラニユラータ由来のTE (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) ; シンビオディニウム・ミクロアドリアチカム (Symbiodinium microadriaticum) 由来のTE (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) 、等が挙げられる。

10

20

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TEのアミノ酸配列との同一性が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、さらにより好ましくは95%以上、のアミノ酸配列からなり、かつTE活性を有するタンパク質も用いることができる。

【0036】

上述したTEの中でも、中鎖アシル - ACPに対する基質特異性の観点から、NoTE (配列番号28、これをコードする遺伝子の塩基配列：配列番号29)、ゲッケイジュ由来のTE (配列番号42、これをコードする遺伝子の塩基配列：配列番号43)、ココヤシ由来のTE (配列番号44、これをコードする遺伝子の塩基配列：配列番号45)、ナンノクロロプシス・ガディタナ由来のTE (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)、ナンノクロロプシス・グラニユラータ由来のTE (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)、シンビオディニウム・ミクロアドリアチカム由来のTE (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)、又はこれらのTEのアミノ酸配列との同一性が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、さらにより好ましくは95%以上、のアミノ酸配列からなり、かつ中鎖アシル - ACPに対するTE活性を有するタンパク質 (例えば、配列番号34に示す塩基配列からなるDNAがコードするタンパク質) が好ましい。

30

これらのTE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。

40

【0037】

タンパク質がTE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TE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TE遺伝子を連結したDNAを宿主細胞へ導入し、導入したTE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

50

うことにより、TE活性を測定することができる。

【0038】

TE遺伝子の発現を促進させた形質転換体は、常法により作製できる。例えば、前述のAT遺伝子の発現を促進させる方法と同様、TE遺伝子を宿主に導入する方法、TE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する方法、などにより形質転換体を作製することができる。

【0039】

さらに本発明の形質転換体は、前記タンパク質(A)又は(B)をコードする遺伝子に加えて、KASをコードする遺伝子などの発現も促進されていることが好ましい。

KASの1種であるKAS IVは主に炭素数6から14の伸長反応を触媒し、中鎖アシル-ACPを合成する。そのため、AT遺伝子に加えKAS IVをコードする遺伝子の発現を促進することで、中鎖脂肪酸の生産性を一層向上させることができる。

本発明で用いることができるKASは、通常のKASや、それらと機能的に均等なタンパク質から、宿主の種類等に応じて適宜選択することができる。

また、これら遺伝子の発現を促進させた形質転換体は、常法により作製できる。例えば、前述のAT遺伝子の発現を促進させる方法と同様、KASをコードする遺伝子を宿主に導入する方法、KASをコードする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する方法、などにより形質転換体を作製することができる。

【0040】

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、前記タンパク質(A)又は(B)をコードする遺伝子の発現が促進されていない宿主と比較して向上している。したがって、本発明の形質転換体を適切な条件で培養し、次いで得られた培養物又は生育物から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。

さらに当該形質転換体は、宿主自体に比べ、生産される脂肪酸の総量も有意に向上する。よって、本発明の形質転換体を適切な条件で培養し、次いで得られた培養物又は生育物から脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質を回収すれば、脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質を効率よく製造することができる。

ここで「培養物」とは培養した後の培養液及び形質転換体をいい、「生育物」とは生育した後の形質転換体をいう。

【0041】

本発明の形質転換体の培養条件は、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。また脂肪酸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連する前駆物質としてグリセロール、酢酸、又はグルコース等を添加してもよい。

【0042】

宿主として大腸菌を用いる場合、大腸菌の培養は、例えば、LB培地又はOvernight Express Instant TB Medium (Novagen社)で、30~37℃、0.5~1日間培養することができる。

また、宿主としてシロイヌナズナを用いる場合、シロイヌナズナの培養は、例えば、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か月間栽培することができる。

【0043】

宿主として藻類を用いる場合、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。

培地に接種する形質転換体の量は適宜選択することができ、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100～5000ルクスの範囲、より好ましくは300～1000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、振とう培養が好ましい。

【0044】

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

【0045】

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。

脂質中に含まれる脂肪酸又は脂肪酸エステル化合物は、界面活性剤等への利用性の観点から、中鎖脂肪酸又はそのエステル化合物が好ましく、炭素数が6以上14以下の脂肪酸又はそのエステル化合物がより好ましく、炭素数が8以上14以下の脂肪酸又はそのエステル化合物がさらに好ましく、炭素数が10以上14以下の脂肪酸又はそのエステル化合物がさらに好ましく、炭素数が12以上14以下の脂肪酸又はそのエステル化合物がさらに好ましく、炭素数が12若しくは14の脂肪酸又はそのエステル化合物がさらに好ましい。

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好ましい。

【 0 0 4 6 】

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

【 0 0 4 7 】

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

【 0 0 4 8 】

< 1 > 下記タンパク質 (A) 又は (B) をコードする遺伝子の発現を促進させた形質転換体を培養して脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質を生産させる、脂質の製造方法。

(A) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

(B) 前記タンパク質 (A) のアミノ酸配列と同一性が 4 4 % 以上、好ましくは 4 5 % 以上、より好ましくは 5 0 % 以上、より好ましくは 5 5 % 以上、より好ましくは 6 0 % 以上、より好ましくは 6 5 % 以上、より好ましくは 7 0 % 以上、より好ましくは 7 5 % 以上、より好ましくは 8 0 % 以上、より好ましくは 8 5 % 以上、より好ましくは 9 0 % 以上、より好ましくは 9 3 % 以上、より好ましくは 9 5 % 以上、より好ましくは 9 6 % 以上、より好ましくは 9 7 % 以上、より好ましくは 9 8 % 以上、さらに好ましくは 9 9 % 以上、のアミノ酸配列からなり、かつ AT 活性を有するタンパク質。

【 0 0 4 9 】

< 2 > 前記タンパク質 (A) 又は (B) をコードする遺伝子の発現を促進させ、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る、脂質生産性の向上方法。

< 3 > 前記タンパク質 (A) 又は (B) をコードする遺伝子の発現を促進させ、形質転換体の細胞内で生産される脂肪酸の総量を向上させる、脂質生産性の向上方法。

< 4 > 前記タンパク質 (A) 又は (B) 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。

< 5 > 前記タンパク質 (A) 又は (B) をコードする遺伝子を導入した形質転換体を培養して脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質を生産させる、脂質の製造方法。

【 0 0 5 0 】

< 6 > 前記タンパク質 (A) 又は (B) 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 < 1 > ~ < 5 > のいずれか 1 項記載の方法。

< 7 > 前記タンパク質 (B) が、前記タンパク質 (A) のアミノ酸配列に、 1 又は複数個、好ましくは 1 個以上 2 3 8 個以下、好ましくは 1 個以上 2 3 3 個以下、より好ましくは 1 個以上 2 1 2 個以下、より好ましくは 1 個以上 1 9 1 個以下、より好ましくは 1 個以上 1 7 0 個以下、より好ましくは 1 個以上 1 4 8 個以下、より好ましくは 1 個以上 1 2 7 個以下、より好ましくは 1 個以上 1 0 6 個以下、より好ましくは 1 個以上 8 5 個以下、より好ましくは 1 個以上 6 3 個以下、より好ましくは 1 個以上 4 2 個以下、より好ましくは 1 個以上 2 9 個以下、より好ましくは 1 個以上 2 1 個以下、より好ましくは 1 個以上 1 7 個以下、より好ましくは 1 個以上 1 2 個以下、より好ましくは 1 個以上 8 個以下、さらに好ましくは 1 個以上 4 個以下、のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたタンパク質である、前記 < 1 > ~ < 6 > のいずれか 1 項記載の方法。

< 8 > 前記タンパク質 (A) 又は (B) をコードする遺伝子が、下記 DNA (a) 又は (b) からなる遺伝子である、前記 < 1 > ~ < 7 > のいずれか 1 項記載の方法。

(a) 配列番号 2 で表される塩基配列からなる DNA。

(b) 前記 DNA (a) の塩基配列と同一性が 5 1 % 以上、好ましくは 5 5 % 以上、より好ましくは 6 0 % 以上、より好ましくは 6 5 % 以上、より好ましくは 7 0 % 以上、より好ましくは 7 5 % 以上、より好ましくは 8 0 % 以上、より好ましくは 8 5 % 以上、より好ま

10

20

30

40

50

しくは90%以上、より好ましくは93%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、さらに好ましくは99%以上、の塩基配列からなり、かつAT活性を有するタンパク質をコードするDNA。

< 9 > 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624個以下、好ましくは1個以上573個以下、より好ましくは1個以上510個以下、より好ましくは1個以上446個以下、より好ましくは1個以上382個以下、より好ましくは1個以上318個以下、より好ましくは1個以上255個以下、より好ましくは1個以上191個以下、より好ましくは1個以上127個以下、より好ましくは1個以上89個以下、より好ましくは1個以上63個以下、より好ましくは1個以上51個以下、より好ましくは1個以上38個以下、より好ましくは1個以上25個以下、さらに好ましくは1個以上12個以下、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AT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AT活性を有するタンパク質をコードするDNA、である、前記< 8 > 項記載の方法。

10

< 10 > 前記形質転換体において、TEをコードする遺伝子の発現を促進させた、前記< 1 > ~ < 9 > のいずれか1項記載の方法。

< 11 > 前記TEが、中鎖アシル - ACP に対する基質特異性を有するTEである、前記< 10 > 項記載の方法。

20

< 12 > 前記TEが、配列番号28、配列番号42、配列番号44、配列番号46、配列番号48若しくは配列番号50に示すアミノ酸配列からなるタンパク質、又は当該タンパク質のアミノ酸配列との同一性が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、さらにより好ましくは95%以上、のアミノ酸配列からなり、かつ中鎖アシル - ACP に対するTE活性を有するタンパク質、である、前記< 10 > 又は< 11 > 項記載の方法。

< 13 > 前記形質転換体が微生物又は植物である、前記< 1 > ~ < 12 > のいずれか1項記載の方法。

< 14 > 前記微生物が微細藻類である、前記< 13 > 項記載の方法。

< 15 > 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< 14 > 項記載の方法。

30

< 16 > 前記微生物が大腸菌である、前記< 13 > 項記載の方法。

< 17 > 前記植物がシロイヌナズナである、前記< 13 > 項記載の方法。

< 18 > 前記脂質が、中鎖脂肪酸又はそのエステル化合物、好ましくは炭素数が6以上14以下の脂肪酸又はそのエステル化合物、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エステル化合物、よりさらに好ましくは炭素数が12以上14以下の脂肪酸又はそのエステル化合物、よりさらに好ましくは炭素数が12若しくは14の脂肪酸又はそのエステル化合物、を含む、前記< 1 > ~ < 17 > のいずれか1項記載の方法。

【 0051 】

40

< 19 > 前記< 1 > ~ < 18 > のいずれか1項で規定した、前記タンパク質 (A) 又は (B) 。

< 20 > 前記< 19 > 項記載のタンパク質をコードする遺伝子。

< 21 > 前記< 1 > ~ < 18 > のいずれか1項で規定した、前記DNA (a) 又は (b) からなる遺伝子。

< 22 > 前記< 20 > 又は< 21 > 項記載の遺伝子を含有する、組換えベクター。

【 0052 】

< 23 > 前記< 20 > 又は< 21 > 項記載の遺伝子の発現を促進させた形質転換体。

< 24 > 前記< 20 > 若しくは< 21 > 項記載の遺伝子、又は前記< 22 > 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。

50

< 2 5 > 前記 < 2 0 > 若しくは < 2 1 > 項記載の遺伝子、又は前記 < 2 2 > 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。

< 2 6 > TEをコードする遺伝子の発現を促進させた、前記 < 2 3 > ~ < 2 5 > のいずれか1項記載の形質転換体又はその作製方法。

< 2 7 > 前記TEが、中鎖アシル - A C P に対する基質特異性を有するTEである、前記 < 2 6 > 項記載の形質転換体又はその作製方法。

< 2 8 > 前記TEが、配列番号 2 8、配列番号 4 2、配列番号 4 4、配列番号 4 6、配列番号 4 8 若しくは配列番号 5 0 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質、又は当該タンパク質のアミノ酸配列との同一性が 5 0 % 以上、好ましくは 7 0 % 以上、より好ましくは 8 0 % 以上、さらに好ましくは 9 0 % 以上、さらにより好ましくは 9 5 % 以上、のアミノ酸配列からなり、かつ中鎖アシル - A C P に対するTE活性を有するタンパク質、である、前記 < 2 6 > 又は < 2 7 > 項記載の形質転換体又はその作製方法。

10

< 2 9 > 前記形質転換体又は宿主が微生物又は植物である、前記 < 2 3 > ~ < 2 8 > のいずれか1項記載の形質転換体又はその作製方法。

< 3 0 > 前記微生物が微細藻類である、前記 < 2 9 > 項記載の形質転換体又はその作製方法。

< 3 1 > 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 < 3 0 > 項記載の形質転換体又はその作製方法。

< 3 2 > 前記微生物が大腸菌である、前記 < 2 9 > 項記載の形質転換体又はその作製方法。

20

< 3 3 > 前記植物がシロイヌナズナである、前記 < 2 9 > 項記載の形質転換体又はその作製方法。

【 0 0 5 3 】

< 3 4 > 脂質を製造するための、前記 < 1 9 > ~ < 3 3 > のいずれか1項記載のタンパク質、遺伝子、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。

< 3 5 > 前記脂質が、中鎖脂肪酸又はそのエステル化合物、好ましくは炭素数が 6 以上 1 4 以下の脂肪酸又はそのエステル化合物、より好ましくは炭素数が 8 以上 1 4 以下の脂肪酸又はそのエステル化合物、より好ましくは炭素数が 1 0 以上 1 4 以下の脂肪酸又はそのエステル化合物、よりさらに好ましくは炭素数が 1 2 以上 1 4 以下の脂肪酸又はそのエステル化合物、よりさらに好ましくは炭素数が 1 2 若しくは 1 4 の脂肪酸又はそのエステル化合物、を含む、前記 < 3 4 > 項記載の使用。

30

【 実施例 】

【 0 0 5 4 】

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 に示す。

【 0 0 5 5 】

【表 1】

表 1

プライマー番号	塩基配列 (5' → 3')	配列番号
5	tcttttttgaagcatgattgaacaagatggatt	配列番号 5
6	tttccccatcccgatcagaagaactcgtcaagaa	配列番号 6
7	cgagctcggtagccgactgcgcatggattgaccga	配列番号 7
8	atatcaagaagctgtctttt	配列番号 8
9	tcgggatgggggaaaaaacctctg	配列番号 9
10	actctagaggatcccctttcgtaaataaatcagctc	配列番号 10
12	gggactccttagagtcgacctgcaggcatgcaagc	配列番号 12
13	cgggtaccgagctcgaattc	配列番号 13
14	cagcccgcacacaatgagcaagtccctctcat	配列番号 14
15	ctctccacagaagcttaattggtactgcacagaca	配列番号 15
16	cgagctcggtagccgcttctccgcttgttctgccc	配列番号 16
17	tgttgatcgggctgagattgtgtg	配列番号 17
20	gcttctgtggaagagccagtg	配列番号 20
21	caatccatgcgcagctctgatcttgcacatctctg	配列番号 21
22	actgcgcattgattgaccga	配列番号 22
24	tccgagcagattatggccaagctgaccagcgc	配列番号 24
25	tttccccatcccgattagctcctcctcggccac	配列番号 25
26	gcgccgctcctagagtcgagacggcccacgcccggac	配列番号 26
27	acaaaatattaacgcctagctaataatcaatctcttgg	配列番号 27
30	cttagagcggccgcccaccg	配列番号 30
31	gcgttaataatttgttaaaattcg	配列番号 31
32	ctggacaataccatgggatggccttttgcgcccaag	配列番号 32
33	catggtattgtccagcaaag	配列番号 33
37	cgagctcggtagccggcggtctttgtcctttcctc	配列番号 37
38	aatctgctcggaggggaggatc	配列番号 38
39	ccctccgagcagattatgaagaccgctctcctc	配列番号 39
40	gcgcgcaacaccgcgggtgcgggagaac	配列番号 40

10

20

30

【 0 0 5 6 】

実施例 1 NoAT4295 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) ネオマイシン耐性遺伝子発現用プラスミドの構築

ネオマイシン耐性遺伝子 (配列番号 3)、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 4) を人工合成した。合成した DNA 断片を鋳型として、表 1 に示すプライマー番号 5 及びプライマー番号 6 のプライマー対、並びにプライマー番号 7 及びプライマー番号 8 のプライマー対を用いて PCR を行い、ネオ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増幅した。

40

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 1 に示すプライマー番号 9 及びプライマー番号 10 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 11) 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 1 に示すプライマー番号 12 及びプライマー番号 13 のプライマー対を用いて PCR を行い、プラスミドベクター pUC19 を増幅した。

【 0 0 5 7 】

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

50

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、ネオマイ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、ネオマイシン耐性遺伝子、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。

【0058】

(2) NoAT4295遺伝子発現用プラスミドの構築

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1に示すプライマー番号14及びプライマー番号15のプライマー対を用いてPCRを行い、NoAT4295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1に示すプライマー番号16及びプライマー番号17のプライマー対を用いてPCRを行い、LDSPプロモーター配列(配列番号18)を増幅した。

また、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(ピオラキサンチン/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ターミネーター配列(配列番号19)を人工合成した。合成したDNA断片を鋳型として、表1に示すプライマー番号20及びプライマー番号21のプライマー対を用いたPCRを行い、VCP1ターミネーター配列を取得した。

さらに、前述のネオマイシン耐性遺伝子発現プラスミドを鋳型として、表1に示すプライマー番号22及びプライマー番号13のプライマー対を用いたPCRを行い、ネオマイ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、ネオマイシン耐性遺伝子、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。

【0059】

これら4つの増幅断片を、前述の方法と同様の方法にて融合し、NoAT4295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LDSPプロモーター配列、NoAT4295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、ネオマイシン耐性遺伝子、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。

【0060】

(3) 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23)を人工合成した。合成したDNA断片を鋳型として、表1に示すプライマー番号24及びプライマー番号25のプライマー対を用いてPCRを行い、ゼオシン耐性遺伝子配列を増幅した。

また、前記ネオマイシン耐性遺伝子発現用プラスミドを鋳型として、表1に示すプライマー番号9及びプライマー番号8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、pUC19ベクター配列、チューブリンプロモーター配列からなる遺伝子断片を増幅した。

【0061】

得られた2つの遺伝子断片を、前述の方法と同様の方法にて融合し、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。

【0062】

(4) NoTE遺伝子の取得、及びNoTE遺伝子発現用プラスミドの構築

国立環境研究所(NIES)からナンノクロロプシス・オキュラータNIES-2145株を購入し、使用した。ナンノクロロプシス・オキュラータNIES-2145株を f / 2 液体培地 (NaNO₃ 75

10

20

30

40

50

mg、 $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 6mg、ビタミンB12 0.5 μg 、ビオチン 0.5 μg 、チアミン 100 μg 、 $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 10mg、 $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 4.4mg、 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 3.16mg、 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 12 μg 、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 21 μg 、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 180 μg 、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 7 μg 、 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 7 μg / 人工海水1L) で十分培養し、50mLの f / 2 培地に10% 植菌し、25℃、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ピースシヨッカーにて破砕し、RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen社製) を用いてRNAの精製を行った。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。

【0063】

得られたcDNAを鋳型として、表1に示すプライマー番号26及びプライマー番号27のプライマー対を用いたPCRにより、配列番号29の262位～864位の塩基配列からなる遺伝子断片を取得した。

10

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30及びプライマー番号31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、NoTE遺伝子発現プラスミドNoTE_262を構築した。このプラスミドNoTE_262は、配列番号28に示すアミノ酸配列のN末端側1位～87位のアミノ酸残基を除去し、そ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位のアミノ酸残基が融合したタンパク質を発現させるように構築した。

20

なお、以下のプラスミド表記において、「NoTE_262」は、配列番号28の88位～287位のアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする塩基配列として、配列番号29の262位～864位の塩基配列をプラスミドが有することを意味する。

【0064】

(5) NoTE改変体遺伝子発現用プラスミドの構築

前記プラスミドNoTE_262を鋳型として、表1に示すプライマー番号32及びプライマー番号33のプライマー対を用いたPCRにより、配列番号29に示す塩基配列の262位～864位の塩基の一部を変異させた遺伝子断片(配列番号34)を取得した。この遺伝子断片を用いて、前記手法と同様の手法により、NoTE改変体発現プラスミドNoTE_262(V204W)を構築した。ここで、配列番号34に示す塩基配列は、配列番号28に示すアミノ酸配列の204位のバリンをコードするコドンがトリプトファンをコードするコドン(TGG)に置換されている。

30

前記プラスミドNoTE_262(V204W)を鋳型として、表1に示すプライマー番号31及びプライマー番号32のプライマー対を用いてPCRを行い、配列番号34に示す塩基配列からなる、NoTE改変体遺伝子断片を取得した。

【0065】

また、GenBankに登録されているナンノクロロプシス・エスピー-W2J3B株のVCP1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35)、VCP1葉緑体移行シグナル配列 (配列番号36)、及びVCP1ターミネーター配列 (配列番号19) を人工合成した。合成したDNA断片を鋳型として、表1に示すプライマー番号37及びプライマー番号38のプライマー対、プライマー番号39及びプライマー番号40のプライマー対、並びにプライマー番号20及びプライマー番号21のプライマー対をそれぞれ用いたPCRを行い、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それぞれ取得した。

40

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1に示すプライマー番号12及びプライマー番号13のプライマー対を用いてPCRを行い、プラスミドベクターpUC19を増幅した。

【0066】

50

上述の方法により得られたNoTE改変体遺伝子断片、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、前述の手法と同様の方法でプラスミドベクターpUC19に融合し、NoTE改変体遺伝子発現用プラスミドNoTE_262(V204W)_Nannoを構築した。なおこのプラスミドは、VCP1プロモーター配列、VCP1葉緑体移行シグナル配列、NoTE改変体遺伝子断片、及びVCP1ターミネーター配列の順に連結したNoTE遺伝子発現用配列と、pUC19ベクター配列からなる。

【 0 0 6 7 】

前記プラスミドNoTE_262(V204W)_Nannoを鋳型に、表 1 に示すプライマー番号 3 7 及びプライマー番号 2 1 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、NoTE遺伝子、VCP1ターミネーター配列からなる遺伝子断片を取得した。

10

また、前記ゼオシン耐性遺伝子発現用プラスミドを鋳型に、表 1 に示すプライマー番号 2 2 及びプライマー番号 1 3 のプライマー対を用いてPCRを行い、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ベクター配列からなる遺伝子断片を増幅した。

【 0 0 6 8 】

得られた遺伝子断片を、前述の方法と同様の方法で融合し、NoTE改変体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、VCP1プロモーター配列、VCP1葉緑体移行シグナル配列、NoTE改変体遺伝子断片、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に連結したインサート配列と、pUC19ベクター配列からなる。

20

【 0 0 6 9 】

(6) NoTE改変体遺伝子及びNoAT4295遺伝子のナンノクロロプシス・オキユラータへの導入

前記NoTE改変体遺伝子発現用プラスミドを鋳型として、表 1 に示すプライマー番号 3 7 及びプライマー番号 1 0 のプライマー対を用いてPCR反応を行い、NoTE改変体遺伝子発現用断片 (VCP1プロモーター配列、VCP1葉緑体移行シグナル配列、NoTE改変体遺伝子、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) を増幅した。

30

増幅した遺伝子断片を、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。

【 0 0 7 0 】

約 1×10^9 個の細胞のナンノクロロプシス・オキユラータNIES-2145株 (独立行政法人国立環境研究所 (NIES) より入手) 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NoAT4295遺伝子発現用断片約500ngを、宿主細胞に混和し、50 μ F、500 、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 (NaNO₃ 75mg、NaH₂PO₄ · 2H₂O 6mg、ビタミンB12 0.5 μ g、ピオチン 0.5 μ g、チアミン 100 μ g、Na₂SiO₃ · 9H₂O 10mg、Na₂EDTA · 2H₂O 4.4mg、FeCl₃ · 6H₂O 3.16mg、FeCl₃ · 6H₂O 12 μ g、ZnSO₄ · 7H₂O 21 μ g、MnCl₂ · 4H₂O 180 μ g、CuSO₄ · 5H₂O 7 μ g、Na₂MoO₄ · 2H₂O 7 μ g / 人工海水1L) にて1日間回復培養を行った。その後、2 μ g/mLのゼオシン含有 f / 2 寒天培地に塗布し、25 、0.3%CO₂雰囲気下、12h/12h明暗条件にて2 ~ 3週間培養した。得られたコロニーをNoTE改変体遺伝子導入株 (NoTE) として選抜した。

40

【 0 0 7 1 】

前記NoAT4295遺伝子発現用プラスミドを鋳型として、表 1 に示すプライマー番号 1 6 及びプライマー番号 1 0 のプライマー対を用いてPCR反応を行い、NoAT4295遺伝子発現用断片 (LDSPプロモーター配列、NoAT4295遺伝子、VCP1ターミネーター配列、チューブリン

50

ロモーター配列、ネオマイシン耐性遺伝子、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)を増幅した。

この遺伝子断片を上記と同様の方法にて、前記NoTE改変体遺伝子導入株(NoTE)を宿主として導入し、ネオマイシン含有培地にて得られたコロニーをNoTE遺伝子及びNoAT4295遺伝子導入株(NoTE+NoAT4295)として選抜した。

【0072】

(7) 形質転換体による脂肪酸の生産

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)50mLに播種し、25℃、0.3%CO₂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10mLを、N15P5培地40mLに植継ぎ、25℃、0.3%CO₂雰囲気下、12h/12h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、以下の方法にて解析した。

【0073】

(8) 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攪拌し、30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15分間遠心分離を行い、パスト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、ヘキサン及び飽和食塩水を各1mL添加して激しく攪拌し、室温にて30分放置し、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。

【0074】

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)

移動層：高純度ヘリウム

カラム内流量：1.0mL/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14.49psi，104mL/min

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

【0075】

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(FA)とし、総脂肪酸量に占める各脂肪酸量の割合を算出した。

その結果を表2に示す。なお、以下の表において、以下の表において、「脂肪酸組成(%TFA)」は総脂肪酸の重量に対する各脂肪酸量の割合(重量パーセント)を示す。また「n」は0~5の整数を表し、例えば「C18:n」と記載した場合には、C18:0、C18:1、C18:2、C18:3、C18:4及びC18:5の脂肪酸の総和を表す。

【 0 0 7 6 】

【 表 2 】

表2

(n=3)

	脂肪酸組成 (%TFA)							FA (mg/L)
	C10:0	C12:0	C14:0	C16:1	C16:0	C18:n	C20:n	
NoTE	2.5±0.0	9.2±0.2	13.7±2.5	28.5±1.0	15.4±0.8	15.6±0.5	15.0±1.2	3037.9±156.7
NoTE+ AT4295	3.9±0.0	11.6±0.1	17.8±0.1	22.1±0.1	15.1±0.4	14.3±0.1	15.1±0.5	4536.1±320.9

【 0 0 7 7 】

10

表 2 に示すように、NoTE改変体遺伝子を導入した菌株にNoAT4295遺伝子をさらに導入することで、中鎖脂肪酸（C 1 0 : 0 脂肪酸、C 1 2 : 0 脂肪酸及びC 1 4 : 0 脂肪酸）の含有率と総脂肪酸量が有意に増加した。

【 0 0 7 8 】

(9) TAGの分画、及びTAG中の構成脂肪酸の分析

前述した、回収したクロロホルム層を薄層クロマトグラフィー（TLC）に供して、TAGを分離回収した。内部標準として1mg/mLのトリヘプタデカン50 µLを使用した。TLCプレートはTLCガラスプレート60（メルク社製）を使用し、展開溶媒として、ヘキサン：ジエチルエーテル：ギ酸 = 42 : 28 : 0.3（体積比）を用いて展開した。展開後、自然乾燥させたプレートに0.0001%プリムリン溶液を噴霧し、UV照射下でTAGスポットを検出し、TAG画分

20

回収したTAG画分について、前述の方法と同様の方法にて、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。その結果を表 3 に示す。

【 0 0 7 9 】

【 表 3 】

表3

(n=3)

	脂肪酸組成 (%TFA)							TAG (mg/L)
	C10:0	C12:0	C14:0	C16:1	C16:0	C18:n	C20:n	
NoTE	2.1±0.1	7.1±3.0	15.2±0.5	30.8±1.0	17.1±0.4	18.2±0.9	9.4±0.5	2822.9±112.8
NoTE+ AT4295	3.5±0.2	11.9±0.4	18.2±0.1	23.6±0.0	16.6±0.6	16.3±0.3	9.8±0.2	4286.6± 98.3

30

【 0 0 8 0 】

表 3 から明らかのように、NoTE改変体遺伝子を導入した菌株にNoAT4295遺伝子をさらに導入することで、TAG中の中鎖脂肪酸（C 1 0 : 0 脂肪酸、C 1 2 : 0 脂肪酸及びC 1 4 : 0 脂肪酸）の含有率と、TAGの総量が有意に増加した。

【 0 0 8 1 】

以上のように、本発明で規定するAT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及び生産される脂肪酸の総量を向上させることができる。

40

【 配列表 】

0006580912000001.app

フロントページの続き

- (56)参考文献 特表2015-521033(JP,A)
米国特許出願公開第2014/0162329(US,A1)
特開2014-014334(JP,A)
特表2015-500009(JP,A)
HORN, M., et al., , Putative glycerol-3-phosphate acyltransferase, Database DDBJ/EMBL/GenBank [online], 2006年10月31日, Accession No. Q6MBK7, URL, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/Q6MBK7>
COLLINGRO, A., et al., , glycerol-3-phosphate acyltransferase, chloroplastic [Waddlia chondrophila 2032/99], Database DDBJ/EMBL/GenBank [online], 2011年 6月22日, Accession No. CCB91825, URL, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/337293838?sat=2&satkey=32065502>

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 1/00-15/90
C12P 1/00-41/00
CA/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
Genbank/EMBL/DDBJ/GenSeq
UniProt/GenSeq
PubMed