

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】平成28年6月9日 (2016.6.9)

【公表番号】特表2015-521033(P2015-521033A)

【公表日】平成27年7月27日 (2015.7.27)

【年通号数】公開・登録公報2015-047

【出願番号】特願2015-507197(P2015-507197)

【国際特許分類】

|         |        |           |
|---------|--------|-----------|
| C 1 2 N | 1/13   | (2006.01) |
| C 1 2 P | 7/64   | (2006.01) |
| C 1 2 N | 1/15   | (2006.01) |
| C 1 2 N | 1/19   | (2006.01) |
| C 1 2 N | 1/21   | (2006.01) |
| C 1 2 N | 5/10   | (2006.01) |
| C 1 2 N | 15/09  | (2006.01) |
| A 2 3 L | 33/10  | (2016.01) |
| A 2 3 D | 9/00   | (2006.01) |
| A 2 3 D | 7/00   | (2006.01) |
| C 1 1 B | 1/10   | (2006.01) |
| C 1 1 C | 3/00   | (2006.01) |
| C 1 1 B | 11/00  | (2006.01) |
| C 1 0 L | 1/02   | (2006.01) |
| C 1 0 M | 101/04 | (2006.01) |
| C 1 0 M | 177/00 | (2006.01) |
| C 1 2 R | 1/89   | (2006.01) |
| C 1 0 N | 70/00  | (2006.01) |

【 F I 】

|         |        |       |
|---------|--------|-------|
| C 1 2 N | 1/13   | Z N A |
| C 1 2 N | 1/13   |       |
| C 1 2 P | 7/64   |       |
| C 1 2 N | 1/15   |       |
| C 1 2 N | 1/19   |       |
| C 1 2 N | 1/21   |       |
| C 1 2 N | 5/00   | 1 0 1 |
| C 1 2 N | 15/00  | A     |
| A 2 3 L | 1/30   | Z     |
| A 2 3 D | 9/00   | 5 0 2 |
| A 2 3 D | 7/00   | 5 0 0 |
| A 2 3 D | 9/00   | 5 0 0 |
| C 1 1 B | 1/10   |       |
| C 1 1 C | 3/00   |       |
| C 1 1 B | 11/00  |       |
| C 1 0 L | 1/02   |       |
| C 1 0 M | 101/04 |       |
| C 1 0 M | 177/00 |       |
| C 1 2 N | 1/13   |       |
| C 1 2 R | 1:89   |       |
| C 1 0 N | 70:00  |       |

## 【手続補正書】

【提出日】平成28年4月15日(2016.4.15)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

場合により配列番号76と少なくとも65%のヌクレオチド配列同一性を有する23SrRNAを含み、場合により偏性従属栄養性であり、且つ場合により細胞が単一炭素源としてのショ糖上で成長することができるように外来性ショ糖インペルターゼ遺伝子を含む、油産生微細藻類細胞であって、前記細胞が、活性LPAAT酵素をコードする外来遺伝子を含み、前記細胞が、トリグリセリドを含む油を産生し、前記油は、LPAAT活性によって：

(a) 中鎖脂肪酸を含むトリグリセリドが高濃度化され；又は

(b) 飽和 - 不飽和 - 飽和型のトリグリセリドが高濃度化される、細胞。

【請求項2】

前記油のトリグリセリドは、40、50、60、70、又は80%又はそれを超えるC8:0、C10:0、C12:0、C14:0、又はC16:0脂肪酸を含む、請求項1に記載の細胞。

【請求項3】

前記細胞は、

(a) 活性脂肪酸アシル - ACPチオエステラーゼをコードする外来遺伝子であって、場合により、前記油の前記トリグリセリドは、前記外因性LPAAT及びアシル - ACPチオエステラーゼが発現する結果として中鎖脂肪酸が70%より大きい割合だけ高濃度化される、外来遺伝子；

(b) 外因性KAS I又はKAS IV酵素をコードする働き又は内因性KAS I酵素の活性を低下させる働きをする組換え核酸；及び/又は

(c) FAME GC/FIDによるときリノール酸及びリノレン酸が合計5面積パーセント以下である油を生成するため、場合により調節可能なプロモーターによって、デルタ12脂肪酸デサチュラーゼの発現を低下させる働きをする核酸  
をさらに含む、請求項1又は2に記載の細胞。

【請求項4】

前記油は、SOS、POS、及び/又はPOPが高濃度化され、場合により、前記油は、少なくとも50%のSOS、場合により10%未満のSSSを含むトリグリセリドを含む、請求項1に記載の細胞。

【請求項5】

(a) ステアロイル - ACPデサチュラーゼ遺伝子、脂肪酸アシル - ACPチオエステラーゼ遺伝子、又は両方のノックアウト又はノックダウン；及び/又は

(b) - ケトアシルCoAシンターゼ活性を増加させる働きをする組換え核酸であって、場合により、前記 - ケトシルシンターゼ活性を増加させる働きをする核酸が、 - ケトアシルCoAシンターゼをコードする外来遺伝子を含む、組換え核酸  
をさらに含む、請求項4に記載の細胞。

【請求項6】

(a) 油中のステアリン酸塩とオレイン酸塩との比が3:1±20%である；

(b) 前記油中のPOP、SOS、及びPOSが、合計で少なくとも30%含まれる；

(c) 前記油が少なくとも30%のPOSを含む；

(d) 前記油が、16%±20%のPOP、38%±20%のPOS、及び23%±2

0 % の S O S を含む；及び / 又は

( e ) 前記油の前記脂肪酸プロフィールが 1 ~ 4 % のアラキジン酸を含む、  
請求項 4 又は 5 に記載の細胞。

【請求項 7】

( a ) 前記細胞が、リノール酸及びリノレン酸が合計 5 面積パーセント以下である油を生成するため、場合により調節可能なプロモーターによって、デルタ 12 脂肪酸デサチュラーゼの発現を低下させる働きをする核酸をさらに含む；

( b ) 前記油が、65 % 超の S O S、45 % 未満の不飽和脂肪酸、5 % 未満の多価不飽和脂肪酸、1 % 未満のラウリン酸、及び 2 % 未満のトランス脂肪酸を有する；及び / 又は

( c ) 前記 L P A A T が、配列番号 78 若しくは配列番号 79 のアミノ酸配列又は配列番号 78 若しくは配列番号 79 と少なくとも 95 % の同一性を有する配列を有する、  
請求項 4 ~ 6 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 8】

*Prototheca* 属の細胞であり、場合により *Prototheca moriformis* 種の細胞である、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の細胞を提供又は培養する工程と、前記油を抽出する工程とを含む、油の生成方法であって、前記細胞が場合により従属栄養培養される、方法。

【請求項 10】

請求項 9 により生成されるトリグリセリドを含む油であって、場合により、以下：  
少なくとも 10 % のエルゴステロール；

エルゴステロール及び - シトステロールであって、エルゴステロールと - シトステロールとの比は 25 : 1 より大きい、エルゴステロール及び - シトステロール；

エルゴステロール及びブラシカステロール；

エルゴステロール、ブラシカステロール、及びポリフェラステロール；

の 1 つ以上を含み、

場合により、 - シトステロール、カンペステロール、及びスチグマステロールの 1 つ以上を含まない、油。

【請求項 11】

( a ) 前記油が 多形結晶を形成し、場合により、前記結晶が 2 L ラメラ構造又は 3 L ラメラ構造を有し、あるいは ( b ) 前記油が ' 多形結晶を形成し、場合により、前記結晶が 2 L ラメラ構造又は 3 L ラメラ構造を有する、請求項 10 に記載の油。

【請求項 12】

( a ) 前記トリグリセリドが、ステアリン酸塩とパルミチン酸塩との合計割合が、オレイン酸塩の割合に 2 . 0 を乗じたもの  $\pm 40\%$  に等しいことを特徴とする脂肪酸プロフィールを有する；

( b ) 前記油が、65 % 超の S O S トリグリセリド、45 % 未満の不飽和脂肪酸、5 % 未満の不飽和脂肪酸類、1 % 未満のラウリン酸、及び 2 % 未満のトランス脂肪酸を有する；

( c ) 前記脂肪酸プロフィールにおけるステアリン酸塩とパルミチン酸塩との合計割合がオレイン酸塩の割合の 2 倍  $\pm 20\%$  であり、場合により、前記 sn - 2 プロフィールが少なくとも 40 % のオレイン酸塩を有する；

( d ) 前記油が、少なくとも 40、50、60、70、80、又は 90 % の S O S である；ならびに / あるいは

( e ) 前記油が、30 ~ 40 の融解温度を有するロールイン用ショートニングであり、場合により、

( i ) ' 多形結晶を含む；

( i i ) 35 で 15 % 未満の固形脂肪含有量を有する；及び / 又は

( i i i ) 15 ~ 20 % の C8 ~ C14 脂肪酸、45 ~ 50 % の C16 以上の脂肪酸、

及び / 又は 30 ~ 25 % の不飽和脂肪酸を含む、  
請求項 10 又は 11 に記載の油。

【請求項 13】

請求項 10 ~ 12 のいずれか一項に記載の油を使用して製造される食品、燃料又は化学製品。

【請求項 14】

配列番号 77 ~ 79 と少なくとも 90 % の同一性を有し、場合により、配列番号 77 ~ 79 と少なくとも 95 % の同一性又は少なくとも 98 % の同一性を有するタンパク質をコードする核酸を含む構築物、ベクター、染色体又は宿主細胞。

【請求項 15】

配列番号 80 ~ 85 又は遺伝子コードの縮重の理由で等価な配列と少なくとも 80、90、95、96、97、98、又は 99 % の配列同一性を有する核酸を含む、請求項 14 に記載の構築物、ベクター、染色体、又は宿主細胞。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0048

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0048】

別の態様において、本発明は、配列番号 77 ~ 79 と少なくとも 90 % の同一性を有するタンパク質をコードする核酸を含む構築物、ベクター、染色体又は宿主細胞を提供する。ある場合には、核酸は、配列番号 77 ~ 79 と少なくとも 95 % の同一性を有するタンパク質をコードする。ある場合には、核酸は、配列番号 77 ~ 79 と少なくとも 98 % の同一性を有するタンパク質をコードする。ある場合には、核酸は、配列番号 80 ~ 85 又は遺伝子コードの縮重の理由で等価な配列と少なくとも 80、90、95、96、97、98、又は 99 % の配列同一性を有する。

本発明は、例えば、以下の項目も提供する。

(項目 1)

場合により配列番号 76 と少なくとも 65 % のヌクレオチド配列同一性を有する 23S rRNA を含み、場合により偏性従属栄養性であり、且つ場合により細胞が単一炭素源としてのショ糖上で成長することができるように外来性ショ糖インペルターゼ遺伝子を含む、油産生微細藻類細胞であって、前記細胞が、活性 LPAAT 酵素をコードする外来遺伝子を含み、前記細胞が、トリグリセリドを含む油を産生し、前記油は、LPAAT 活性によって：

(a) 中鎖脂肪酸を含むトリグリセリドが高濃度化され；又は

(b) 飽和 - 不飽和 - 飽和型のトリグリセリドが高濃度化される、  
細胞。

(項目 2)

前記油のトリグリセリドは、40、50、60、70、又は 80 % 又はそれを超える C8 : 0、C10 : 0、C12 : 0、C14 : 0、又は C16 : 0 脂肪酸を含む、項目 1 に記載の細胞。

(項目 3)

前記細胞は、活性 FATB アシル - ACP チオエステラーゼをコードする外来遺伝子をさらに含む、項目 1 又は 2 に記載の細胞。

(項目 4)

前記油の前記トリグリセリドは、前記外因性 LPAAT 及びアシル - ACP チオエステラーゼが発現する結果として中鎖脂肪酸が 70 % より大きい割合だけ高濃度化される、項目 3 に記載の細胞。

(項目 5)

前記細胞は、外因性 K A S I 又は K A S I V 酵素をコードする働き又は内因性 K A S I 酵素の活性を低下させる働きをする組換え核酸をさらに含む、項目 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の細胞。

(項目 6)

前記細胞は、F A M E G C / F I D によるときリノール酸及びリノレン酸が合計 5 面積パーセント以下である油を生成するため、場合により調節可能なプロモーターによって、デルタ 1 2 脂肪酸デサチュラーゼの発現を低下させる働きをする核酸をさらに含む、項目 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の細胞。

(項目 7)

前記油は、飽和 - 不飽和 - 飽和型のトリグリセリドが高濃度化される、項目 1 に記載の細胞。

(項目 8)

前記油は、S O S、P O S、及び / 又は P O P が高濃度化される、項目 7 に記載の細胞。

(項目 9)

前記油は、少なくとも 5 0 % の S O S、場合により 1 0 % 未満の S S S を含むトリグリセリドを含む、項目 8 に記載の細胞。

(項目 1 0)

ステアロイル - A C P デサチュラーゼ遺伝子、F a t A 遺伝子、又は両方のノックアウト又はノックダウンをさらに含む、項目 8 又は 9 に記載の細胞。

(項目 1 1)

- ケトアシル C o A シンターゼ活性を増加させる働きをする組換え核酸をさらに含む、項目 7 ~ 9 のいずれか一項に記載の細胞。

(項目 1 2)

前記 - ケトシルシンターゼ活性を増加させる働きをする核酸が、- ケトアシル C o A シンターゼをコードする外来遺伝子を含む、項目 1 1 に記載の細胞。

(項目 1 3)

油中のステアリン酸塩とオレイン酸塩との比が 3 : 1 ± 2 0 % である、項目 7 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の細胞。

(項目 1 4)

前記油中の P O P、S O S、及び P O S が、合計で少なくとも 3 0 % 含まれる、項目 7 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の細胞。

(項目 1 5)

前記油が少なくとも 3 0 % の P O S を含む、項目 7 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の細胞。

(項目 1 6)

前記油が、1 6 % ± 2 0 % の P O P、3 8 % ± 2 0 % の P O S、及び 2 3 % ± 2 0 % の S O S を含む、項目 7 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の細胞。

(項目 1 7)

前記油の前記脂肪酸プロフィールが 1 ~ 4 % のアラキジン酸を含む、項目 7 ~ 1 6 のいずれか一項に記載の細胞。

(項目 1 8)

前記細胞が、リノール酸及びリノレン酸が合計 5 面積パーセント以下である油を生成するため、場合により調節可能なプロモーターによって、デルタ 1 2 脂肪酸デサチュラーゼの発現を低下させる働きをする核酸をさらに含む、項目 7 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の細胞。

(項目 1 9)

前記油が、6 5 % 超の S O S、4 5 % 未満の不飽和脂肪酸、5 % 未満の多価不飽和脂肪酸、1 % 未満のラウリン酸、及び 2 % 未満のトランス脂肪酸を有する、項目 7 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の細胞。

( 項目 2 0 )

前記 L P A A T が、配列番号 7 8 若しくは配列番号 7 9 のアミノ酸配列又は配列番号 7 8 若しくは配列番号 7 9 と少なくとも 9 5 % の同一性を有する配列を有する、項目 1 ~ 1 9 のいずれか一項に記載の細胞。

( 項目 2 1 )

項目 1 ~ 2 0 のいずれか一項に記載の細胞を提供又は培養する工程と、前記油を抽出する工程とを含む、油の生成方法であって、前記細胞が場合により従属栄養培養される、方法。

( 項目 2 2 )

項目 2 1 により生成されるトリグリセリドを含む油。

( 項目 2 3 )

少なくとも 1 0 % のエルゴステロール；

エルゴステロール及び - シトステロールであって、エルゴステロールと - シトステロールとの比は 2 5 : 1 より大きい、エルゴステロール及び - シトステロール；

エルゴステロール及びブラシカステロール；

エルゴステロール、ブラシカステロール、及びポリフェラステロール；

の 1 つ以上を含み、

場合により、 - シトステロール、カンペステロール、及びスチグマステロールの 1 つ以上を含まない、項目 2 2 に記載の油。

( 項目 2 4 )

前記油が 多形結晶を形成する、項目 2 2 に記載の油。

( 項目 2 5 )

前記結晶が 2 L ラメラ構造を有する、項目 2 4 に記載の油。

( 項目 2 6 )

前記結晶が 3 L ラメラ構造を有する、項目 2 4 に記載の油。

( 項目 2 7 )

前記油が ' 多形結晶を形成する、項目 2 2 に記載の油。

( 項目 2 8 )

前記結晶が 2 L ラメラ構造を有する、項目 2 4 に記載の油。

( 項目 2 9 )

前記結晶が 3 L ラメラ構造を有する、項目 2 4 に記載の油。

( 項目 3 0 )

前記トリグリセリドが、ステアリン酸塩とパルミチン酸塩との合計割合が、オレイン酸塩の割合に 2 . 0 を乗じたもの  $\pm$  4 0 % に等しいことを特徴とする脂肪酸プロフィールを有する、項目 2 2 ~ 2 9 のいずれか一項に記載の油。

( 項目 3 1 )

前記油が、6 5 % 超の S O S トリグリセリド、4 5 % 未満の不飽和脂肪酸、5 % 未満の不飽和脂肪酸類、1 % 未満のラウリン酸、及び 2 % 未満のトランス脂肪酸を有する、項目 2 2 ~ 3 0 のいずれか一項に記載の油。

( 項目 3 2 )

前記脂肪酸プロフィールにおけるステアリン酸塩とパルミチン酸塩との合計割合がオレイン酸塩の割合の 2 倍  $\pm$  2 0 % である、項目 2 2 ~ 3 1 のいずれか一項に記載の油。

( 項目 3 3 )

前記 s n - 2 プロフィールが少なくとも 4 0 % のオレイン酸塩を有する、項目 3 2 に記載の油。

( 項目 3 4 )

前記油が、少なくとも 4 0 、5 0 、6 0 、7 0 、8 0 、又は 9 0 % の S O S である、項目 2 2 ~ 3 3 のいずれか一項に記載の油。

( 項目 3 5 )

前記油が、3 0 ~ 4 0 の融解温度を有するロールイン用ショートニングである、項

目 2 2 ~ 3 3 のいずれか一項に記載の油。

( 項 目 3 6 )

’ 多形結晶を含む、項目 3 5 に記載の油。

( 項 目 3 7 )

3 5 で 1 5 % 未満の固形脂肪含有量を有する、項目 3 5 又は 3 6 に記載の油。

( 項 目 3 8 )

1 5 ~ 2 0 % の C 8 ~ C 1 4 脂肪酸、4 5 ~ 5 0 % の C 1 6 以上の脂肪酸、及び / 又は 3 0 ~ 2 5 % の不飽和脂肪酸を含む、項目 3 5 ~ 3 7 のいずれか一項に記載の油。

( 項 目 3 9 )

項目 2 2 ~ 3 8 のいずれか一項に記載の油を使用して製造される食品、燃料又は化学製品。

( 項 目 4 0 )

天然油又は天然油から生成される R B D 油であって、3 . 5 % 以下の飽和脂肪酸を含み、場合により 5 0 % 超のオレイン酸及び / 又は 1 % 超のバルミトレイン酸を含む油。

( 項 目 4 1 )

0 . 1 ~ 3 . 5 % の飽和脂肪酸を有する、項目 4 0 に記載の油。

( 項 目 4 2 )

少なくとも 9 0 % のオレイン酸を含む、項目 4 0 又は 4 1 に記載の油。

( 項 目 4 3 )

少なくとも 3 % の多価不飽和脂肪酸を含む、項目 4 2 に記載の油。

( 項 目 4 4 )

場合により配列番号 7 6 と少なくとも 6 5 % のヌクレオチド配列同一性を有する 2 3 S r R N A を含み、且つ場合により偏性従属栄養性である油産生細胞であって、3 . 5 % 以下の飽和脂肪酸を含む油を産生する細胞。

( 項 目 4 5 )

前記細胞が P r o t o t h e c a 属の細胞である、項目 4 4 に記載の細胞。

( 項 目 4 6 )

F A T A ノックアウト又はノックダウンをさらに含む、項目 4 4 に記載の細胞。

( 項 目 4 7 )

バルミトイル - C o A からプラミトイル - C o A に不飽和化する活性を有する酵素をコードする外来遺伝子を含む、項目 4 4 ~ 4 6 のいずれか一項に記載の細胞。

( 項 目 4 8 )

前記外来遺伝子が P A D 遺伝子である、項目 4 7 に記載の細胞。

( 項 目 4 9 )

前記外来遺伝子が、バルミトイル - A C P に対するデサチュラーゼ活性を有する S A D 遺伝子である、項目 4 7 に記載の細胞。

( 項 目 5 0 )

過剰発現した K A S I I 酵素をさらに含む、項目 4 4 ~ 4 9 のいずれか一項に記載の細胞。

( 項 目 5 1 )

リノール酸及びリノレン酸が合計 5 面積パーセント以下である油を生成するため、場合により調節可能なプロモーターによって、デルタ 1 2 脂肪酸デサチュラーゼの発現を低下させる働きをする核酸をさらに含む、項目 4 4 ~ 5 0 のいずれか一項に記載の細胞。

( 項 目 5 2 )

場合により精製、漂白、及び脱臭された、項目 4 4 ~ 5 1 のいずれか一項に記載の細胞によって産生される油であって、

少なくとも 1 0 % のエルゴステロール；

エルゴステロール及び b - シトステロールであって、エルゴステロールと b - シトステロールとの比は 2 5 : 1 より大きい、エルゴステロール及び b - シトステロール；

エルゴステロール及びブラシカステロール；及び

エルゴステロール、ブラシカステロール、及びポリフェラステロール；  
の１つ以上を含み、

場合により、 $\beta$ -シトステロール、カンペステロール、及びスチグマステロールの１つ以上を含まない油。

(項目５３)

３．５％以下の飽和脂肪酸を有する油の生成方法であって、項目５～１２のいずれか一項に記載の細胞を提供又は培養する工程と、前記細胞から前記油を抽出する工程とを含む方法。

(項目５４)

項目５３に記載の方法により生成された油を食品に添合する工程を含む、食品の製造方法であって、最終食品製品が３．５％以下の飽和脂肪を有する、方法。

(項目５５)

場合により配列番号７６と少なくとも６５％のヌクレオチド配列同一性を有する２３Ｓ rRNAを含み、且つ場合により偏性従属栄養性である組換え油産生細胞であって、活性ケトアシル-CoAシンターゼ酵素をコードする外来遺伝子を含む細胞。

(項目５６)

２０％超のエルカ酸を含む油を産生する、項目５５に記載の細胞。

(項目５７)

６０％超のエルカ酸を含む油を産生する、項目５６に記載の細胞。

(項目５８)

少なくとも４０％の油を含む、項目５５～５７のいずれか一項に記載の細胞。

(項目５９)

Prototheca属の細胞であり、場合によりPrototheca moriformis種の細胞である、項目５５～５８のいずれか一項に記載の細胞。

(項目６０)

少なくとも１０％のエルゴステロール；

エルゴステロール及び $\beta$ -シトステロールであって、エルゴステロールと $\beta$ -シトステロールとの比は２５：１より大きい、エルゴステロール及び $\beta$ -シトステロール；

エルゴステロール及びブラシカステロール；及び

エルゴステロール、ブラシカステロール、及びポリフェラステロール

の１つ以上を含む、項目５５～５９のいずれか一項に記載の細胞によって産生される油であって、

場合により、 $\beta$ -シトステロール、カンペステロール、及びスチグマステロールの１つ以上を含まない油。

(項目６１)

項目６０に記載の油から製造される化学品。

(項目６２)

項目５５～５９のいずれか一項に記載の細胞を提供又は培養する工程と、前記細胞から油を抽出する工程とを含む、油の生成方法。

(項目６３)

５％未満のリノール酸を有するトリアシルグリセロールプロフィールの油を産生するように、デルタ１２脂肪酸デサチュラーゼ遺伝子産物の活性を抑制する働きをする組換え核酸を含む組換え油産生細胞。

(項目６４)

３％未満のリノール酸を有するトリアシルグリセロールプロフィールの油を産生する、項目６３に記載の細胞。

(項目６５)

２％未満のリノール酸を有するトリアシルグリセロールプロフィールの油を産生する、項目６４に記載の細胞。

(項目６６)



前記油を産生するため、リノール酸要求株であるか、又は環境条件によってデルタ 1 2 脂肪酸デサチュラーゼの活性が抑制され得る、項目 6 3 に記載の細胞。

( 項目 6 7 )

調節可能なプロモーターが前記デルタ 1 2 脂肪酸デサチュラーゼ遺伝子に作動可能に連結していることにより、前記デルタ 1 2 脂肪酸デサチュラーゼを環境条件によって調節可能である、項目 6 6 に記載の細胞。

( 項目 6 8 )

前記調節可能なプロモーターが、培地 pH 又は窒素濃度の変化により調節可能である、項目 6 7 に記載の細胞。

( 項目 6 9 )

外因性 K A S I I、L P A A T、又は F A T B 酵素を発現する働きをする組換え核酸をさらに含む、項目 6 4 ~ 6 8 のいずれか一項に記載の細胞。

( 項目 7 0 )

ステアロイル A C P デサチュラーゼ酵素の発現をノックアウト又はノックダウンする働きをする組換え核酸をさらに含む、項目 6 4 ~ 6 9 のいずれか一項に記載の細胞。

( 項目 7 1 )

内在性 F a t A によりコードされるアシル - A C P チオエステラーゼの発現をノックアウト又はノックダウンする働きをする組換え核酸をさらに含む、項目 6 4 ~ 7 0 のいずれか一項に記載の細胞。

( 項目 7 2 )

前記油が、1 1 0 で、A O C S C d 1 2 b - 9 2 ランシマット試験条件下 2 0 時間までに未だ電気伝導度の変曲点に達しない安定性を有する、項目 6 4 ~ 7 1 のいずれか一項に記載の細胞。

( 項目 7 3 )

前記油が、1 0 5 0 p p m のトコフェロール及び 5 0 0 p m のパルミチン酸アスコルビルを前記油に加えたとき、1 1 0 で、A O C S C d 1 2 b - 9 2 ランシマット試験条件下 5 日間までに未だ電気伝導度の変曲点に達しない安定性を有する、項目 6 4 ~ 7 1 のいずれか一項に記載の細胞。

( 項目 7 4 )

( a ) 場合により配列番号 7 6 と少なくとも 6 5 % のヌクレオチド配列同一性を有する 2 3 S r R N A を含み、場合により偏性従属栄養性である組換え油産生細胞を提供する工程であって、前記細胞が、前記細胞によって作られる脂肪酸の量を環境条件の変化に応じて変える働きをする組換え核酸を含む、工程と；

( b ) 細胞分裂させて細胞数を増加させるための、前記脂肪酸の合成に許容的な第 1 の環境条件下で前記細胞を培養する工程と；

( c ) 前記組換え核酸のため、前記脂肪酸の合成が低下し、従って前記細胞により産生される前記油中の当該の脂肪酸の量が低下する第 2 の環境条件下で前記細胞を培養する工程と；

( d ) 前記細胞から前記油を抽出する工程とを含む方法。

( 項目 7 5 )

前記細胞が、前記油中のリノール酸の量を低下させるため、デルタ 1 2 脂肪酸デサチュラーゼの活性を低下させる働きをする外来核酸を含む、項目 7 4 に記載の方法。

( 項目 7 6 )

前記リノール酸が、前記油中で少なくとも 5 0、6 0、7 0、8 0、又は 9 0 % 欠乏している、項目 7 4 又は 7 5 に記載の方法。

( 項目 7 7 )

前記細胞が従属栄養培養される、項目 7 4 ~ 7 6 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 7 8 )

前記細胞が微細藻類細胞である、項目 7 4 ~ 7 7 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 7 9 )

前記細胞が、乾燥細胞重量基準で少なくとも 4 0、5 0、6 0、7 0、8 0、又は 9 0 %の油を産生する、項目 7 4 ~ 7 8 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 8 0 )

前記第 1 の環境条件が培養培地の第 1 の p H であり、前記第 2 の環境条件が第 2 の p H である、項目 7 4 ~ 7 9 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 8 1 )

前記細胞からの抽出時、前記油が、1 1 0 で、A O C S C d 1 2 b - 9 2 ランシマット試験条件下 2 0 時間までに未だ電気伝導度の変曲点に達しない安定性を有する、項目 7 4 ~ 8 0 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 8 2 )

前記細胞からの抽出時、前記油が、1 0 5 0 p p m のトコフェロール及び 5 0 0 p m のパルミチン酸アスコルビルを前記油に加えたとき、1 1 0 で、A O C S C d 1 2 b - 9 2 ランシマット試験条件下 5 日間までに未だ電気伝導度の変曲点に達しない安定性を有する、項目 7 4 ~ 8 1 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 8 3 )

前記細胞が、K A S I I 酵素をコードする外来遺伝子と、場合により F a t A 遺伝子のノックアウト又はノックダウンとを含む、項目 7 4 ~ 8 2 のいずれか一項に記載の方法。

。

( 項目 8 4 )

前記細胞によって作られる脂肪酸の量を変える働きをする前記組換え核酸が、F A D 遺伝子を標的化する阻害性 R N A を含み、前記阻害性 R N A の産生が調節可能なプロモーターの制御下にある、項目 7 4 ~ 8 3 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 8 5 )

前記油が、6 0 % 超のオレイン酸と 3 % 未満の多価不飽和物とを含む脂肪酸プロフィールによって特徴付けられる、項目 8 3 又は 8 4 に記載の方法。

( 項目 8 6 )

前記油が、7 0 % 超のオレイン酸と 2 % 未満の多価不飽和物とを含む脂肪酸プロフィールによって特徴付けられる、項目 8 5 に記載の方法。

( 項目 8 7 )

前記油が、8 0 % 超のオレイン酸と 1 % 未満の多価不飽和物とを含む脂肪酸プロフィールによって特徴付けられる、項目 8 6 に記載の方法。

( 項目 8 8 )

項目 7 4 ~ 8 7 のいずれか一項に記載の方法によって生成される油。

( 項目 8 9 )

0 . 0 1 ~ 2 % のリノール酸と、( i ) 8 0 ~ 9 5 % のオレイン酸又は ( i i ) 4 0 % 超の C 8、C 1 0、C 1 2、C 1 4 又は C 1 6 脂肪酸とを含む、項目 8 8 に記載の油。

( 項目 9 0 )

少なくとも 1 0 % のエルゴステロール；  
エルゴステロール及び b - シトステロールであって、エルゴステロールと b - シトステロールとの比は 2 5 : 1 より大きい、エルゴステロール及び b - シトステロール；  
エルゴステロール及びブラシカステロール；及び  
エルゴステロール、ブラシカステロール、及びポリフェラステロール  
の 1 つ以上をさらに含む、項目 8 8 又は 8 9 に記載の油。

( 項目 9 1 )

項目 8 8 ~ 9 0 のいずれか一項に記載の油から生成される製品。

( 項目 9 2 )

食品、燃料又は化学品である、項目 9 1 に記載の製品。

( 項目 9 3 )

フライ油、潤滑油、洗浄溶剤、界面活性剤、発泡剤又は潤滑剤である、項目 9 1 に記載

の製品。

(項目 9 4 )

オレイン酸ダイマーである、項目 9 1 に記載の製品。

(項目 9 5 )

配列番号 7 7 ~ 7 9 と少なくとも 9 0 % の同一性を有するタンパク質をコードする核酸を含む構築物、ベクター、染色体又は宿主細胞。

(項目 9 6 )

配列番号 7 7 ~ 7 9 と少なくとも 9 5 % の同一性を有するタンパク質をコードする、項目 9 5 に記載の構築物、ベクター、染色体又は宿主細胞。

(項目 9 7 )

配列番号 7 7 ~ 7 9 と少なくとも 9 8 % の同一性を有するタンパク質をコードする、項目 9 5 に記載の構築物、ベクター、染色体又は宿主細胞。

(項目 9 8 )

配列番号 8 0 ~ 8 5 又は遺伝子コードの縮重の理由で等価な配列と少なくとも 8 0 、 9 0 、 9 5 、 9 6 、 9 7 、 9 8 、 又は 9 9 % の配列同一性を有する核酸を含む、項目 9 5 ~ 9 7 のいずれか一項に記載の構築物、ベクター、染色体、又は宿主細胞。