

(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
2011 年 12 月 1 日(01.12.2011)

(10) 国際公開番号
WO 2011/149068 A1

- (51) 国際特許分類:
A01G 7/00 (2006.01) *C11B 1/10* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2011/062252
- (22) 国際出願日: 2011 年 5 月 27 日(27.05.2011)
- (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 2010-123162 2010 年 5 月 28 日(28.05.2010) JP
特願 2011-016848 2011 年 1 月 28 日(28.01.2011) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人 東京工業大学(TOKYO INSTITUTE OF TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒1528550 東京都目黒区大岡山 2-1-2 Tokyo (JP). 花王株式会社(KAO CORPORATION) [JP/JP]; 〒1038210 東京都中央区日本橋茅場町一丁目 1-4-1 O Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 太田 啓之(OHTA, Hiroyuki) [JP/JP]; 〒2268501 神奈川県横浜市緑区長津田町 4-2-59 国立大学法人東京工業大学内 Kanagawa (JP). 下嶋 美恵(SHIMOJIMA, Mie) [JP/JP]; 〒2268501 神奈川県横浜市緑区長津田町 4-2-59 国立大学法人東京工業大

学内 Kanagawa (JP). 小泉 遼太(KOIZUMI, Ryota) [JP/JP]; 〒2268501 神奈川県横浜市緑区長津田町 4-2-59 国立大学法人東京工業大学内 Kanagawa (JP). 遠藤 圭二(ENDO, Keiji) [JP/JP]; 〒3213497 栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2-6-06 花王株式会社研究所内 Tochigi (JP).

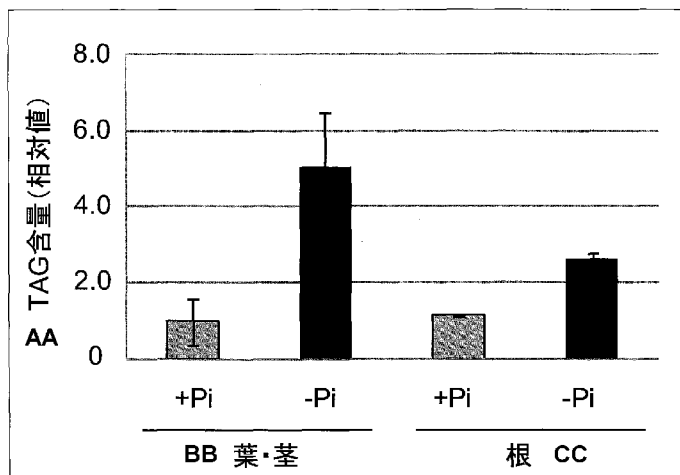
- (74) 代理人: 特許業務法人アルガ特許事務所(THE PATENT CORPORATE BODY ARUGA PATENT OFFICE); 〒1030013 東京都中央区日本橋人形町 1-3-8 沢の鶴人形町ビル Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, 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, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ

[続葉有]

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING VEGETABLE FAT OR OIL

(54) 発明の名称: 植物油脂の製造方法

[図1]



AA TAG CONTENT (RELATIVE VALUE)
BB LEAF/STEM
CC ROOT

(57) Abstract: Provided is a process for efficiently producing a vegetable fat or oil from a structural material of a plant other than the seeds, while allowing the plant to photosynthesize continuously. The process for producing a vegetable fat or oil is characterized by: cultivating a plant constituted of sufficiently grown structural materials, while keeping the plant short of phosphorus, or cultivating a phosphorus-deficient mutant plant; and recovering neutral lipids which have accumulated in a structural material other than the seeds.

(57) 要約: 植物体の光合成を継続させながら、種子以外の植物組織から植物油脂を効率的製造する方法の提供。組織が十分に生育した植物体をリンが欠乏した状態で栽培するか、又はリンが欠乏状態となった変異植物体を栽培し、種子以外の組織に蓄積した中性脂質を回収することを特徴とする植物油脂の製造方法。



(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, 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

発明の名称： 植物油脂の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、植物油脂の製造方法に関する。

背景技術

[0002] 植物油脂は、マーガリン、ショートニング、ドレッシング、食用硬化油等の食用、及び燃料用、潤滑油や界面活性剤原料などの工業用として世界で毎年1億トン以上が用いられており、世界的な人口増加などによりその需要は更に高まりつつある。一方、その生産量もパーム油及び大豆油を中心に、2001年から2008年までの間に約1.5倍に伸長してきているが、これらは例えばマレーシア及びインドネシアなどの主産地での植林量増加や品種改良などによるものや、特にヨーロッパにおけるバイオディーゼル用途の増加による補助金も含めた政策による影響も大きいと考えられる。

しかしながら、例えばパーム油やヤシ油は栽培可能地域が東南アジアなどの一部に限られていること、また生物多様性確保の問題から森林伐採による植林地の拡大化は望めず、単位植物体あたりの油脂生産量の増大などが望まれている。

[0003] こうした背景から、植物の育種や栽培条件の改変による油脂生産量の増大を図る試みが成されている。古くから行われている交配によるもののほか、近年では遺伝子組換え技術を利用した育種例も報告されており、例えば、特許文献1及び非特許文献1には、脂肪酸鎖長伸長反応における伸長ユニットとなるマロニルCoA合成に関わるシロイヌナズナ由来のアセチルCoAカルボキシラーゼ（ACCase）遺伝子をナタネに導入することによりオレイン酸を中心に総脂肪酸量を向上させることが開示されている。また特許文献2及び非特許文献2には、トリアシルグリセロール（TAG）生合成の最終段階であるジアシルグリセロール（DAG）骨格へのアシル基転移反応を行うジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ（DGAT）をシロイ

ヌナズナで過剰発現させることで総脂質量を向上させることが報告されている。更に非特許文献3では特定の制御因子遺伝子の過剰発現させることによるTAGの高生産化、また特許文献3では、シロイヌナズナにおいて特定の色素合成に関与するカルコンシンターゼ遺伝子、カルコンイソメラーゼ遺伝子、またはフラボン-3-ヒドラーゼ遺伝子のいずれかの機能を欠損した組換え植物体を用いるTAGの高生産化方法が開示されている。更に加えて非特許文献4ではシロイヌナズナの脂質輸送タンパクとして知られるTGD1の欠損株において葉へのTAG蓄積が報告されている。

[0004] 一方、遺伝子組換え技術を必要としない栽培条件変更により、種子以外の植物組織への油脂蓄積の試みも検討されており、例えば、非特許文献5ではヒマワリ或いはダイズの芽生えを乾燥条件下で12日間処理することで葉、茎のTAG及びDAG量が増加したことが報告されている。更に特許文献4には遺伝子組換え技術により脂肪酸分解系を欠損したシロイヌナズナを数日間、暗所処理することにより葉に油滴を蓄積させる方法も開示されている。

[0005] しかし、これらの方法のうち遺伝子組換え技術を利用する場合は、植物の栽培において遺伝子組換え体の漏出防止の対策が必要となり、また遺伝子組換え技術を用いない栽培条件を用いる場合においては、暗所や乾燥などの条件が植物の光合成を阻害する条件であるため植物油脂の高生産化効率は満足できるものではなかった。

[0006] 他方、コムギ、オオムギ、トウモロコシ、イネ、ダイズ、サイトウ、アズキ、ビート、バレイショ、トマト、及びハクサイを用いた栽培検討において、培養液のリン酸濃度が、0.01ppm以下ではいずれの植物においても生長量が減少すること、及び0.1ppm以下ではいずれの植物においても地上部及び根部中のリン濃度が低下すること（非特許文献6）が開示されているが、リン濃度が極めて低い状態で栽培した場合に、種子以外の植物組織へ油脂が蓄積されることは全く知られていない。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：米国特許第5925805号明細書

特許文献2：国際公開第2000/036114号パンフレット

特許文献3：特開2009-207421号公報

特許文献4：国際公開第2008/068498号パンフレット

非特許文献

[0008] 非特許文献1：Plant Physiology (1997) 11巻, 75頁

非特許文献2：Plant Physiology (2001) 126巻, 861頁

非特許文献3：Plant J. (2004) 40巻, 575頁

非特許文献4：Plant Cell (2005) 17巻, 3094頁

非特許文献5：Phytochemistry (1990) 29巻, 2119頁

非特許文献6：日本土壌肥科学会雑誌 (1980) 51巻, 399頁

発明の要約

[0009] 本発明は、組織が十分に生育した植物体を、リンが欠乏した状態で栽培し、種子以外の組織に蓄積した中性脂質を回収することを特徴とする以下の（１）～（１５）のいずれかの植物油脂の製造方法に係るものである。

（１）組織が十分に生育した植物体をリンが欠乏した状態で栽培するか、又はリンが欠乏状態となった変異植物体を栽培し、種子以外の組織に蓄積した中性脂質を回収することを特徴とする植物油脂の製造方法。

（２）種子以外の組織が、葉、茎、または根である、（１）に記載の植物油脂の製造方法。

（３）リンが欠乏した状態での栽培が、組織が十分に生育した植物体を、リンが欠乏した媒体に移植するか或いは媒体をリンが欠乏した媒体に置換して栽培する、又は栽培過程の媒体において生じるリンの欠乏状態を維持しながら栽培するものである（１）又は（２）に記載の植物油脂の製造方法。

（４）種子以外の組織の中性脂質蓄積量が、リンが欠乏しない状態で栽培した場合の２倍以上である、（１）～（３）のいずれかに記載の植物油脂の製造方法。

（５）植物体が被子植物である、（１）～（４）のいずれかに記載の植物

油脂の製造方法。

(6) 植物体が裸子植物である、(1) ~ (4) のいずれかに記載の植物油脂の製造方法。

(7) 植物体が双子葉植物である、(1) ~ (4) のいずれかに記載の植物油脂の製造方法。

(8) 植物体がシロイヌナズナ、トマト、ナタネ、イヌエビ又はタバコである、(1) ~ (4) のいずれかに記載の植物油脂の製造方法。

(9) リンが欠乏した状態が、媒体のリン濃度が $3.3 \mu\text{M}$ 未満である (1) ~ (8) のいずれかに記載の植物油脂の製造方法。

(10) リンが欠乏した状態が、媒体のリン濃度が $10 \mu\text{M}$ 以下である (1) ~ (8) のいずれかに記載の植物油脂の製造方法。

(11) リンが欠乏した状態が、媒体のリン濃度が $3.3 \mu\text{M}$ 以下である (1) ~ (8) のいずれかに記載の植物油脂の製造方法。

(12) リンが欠乏した状態が、媒体のリン濃度が $1 \mu\text{M}$ 以下である (1) ~ (8) のいずれかに記載の植物油脂の製造方法。

(13) リンが欠乏した状態が、媒体のリン濃度が $0.33 \mu\text{M}$ 以下である (1) ~ (8) のいずれかに記載の植物油脂の製造方法。

(14) リンが欠乏状態となった変異植物体が、リン酸輸送に支障を生じた変異植物体である (1) に記載の植物油脂の製造方法。

(15) 組織が十分に生育した植物体をリンが欠乏した状態で栽培するか、又はリンが欠乏状態となった変異植物体を栽培することによる、種子以外の組織に中性脂質を蓄積させる方法。

図面の簡単な説明

[0010] [図1] リン酸欠乏栽培によるシロイヌナズナ葉・茎への TAG 蓄積を示すグラフ。

[図2] シロイヌナズナ葉・茎蓄積 TAG の脂肪酸組成を示すグラフ。

[図3] リン酸欠乏栽培によるシロイヌナズナ t g d 1 変異株の TAG 蓄積を示すグラフ。

[図4]リン酸欠乏栽培によるシロイヌナズナ地上部（葉・茎）へのTAG蓄積を示すグラフ。

[図5]可溶性リン酸を含まない培地、及び1 mM可溶性リン酸を含む培地を用いた栽培におけるシロイヌナズナ地上部（葉・茎）のTAG蓄積量を示すグラフ。

[図6]可溶性リン酸を含まない培地、及び1 mM可溶性リン酸を含む培地を用いた栽培におけるシロイヌナズナ地上部（葉・茎）のTAG蓄積量を示すグラフ。

[図7]可溶性リン酸を含まない培地、及び1 mM可溶性リン酸を含む培地を用いた栽培におけるシロイヌナズナ地上部（葉・茎）のTAG蓄積量を示すグラフ。

[図8]1 mM可溶性リン酸を含む培地を用いた栽培におけるシロイヌナズナ地上部（葉・茎）へのTAG蓄積量を示すグラフ。

[図9]可溶性リン酸を含まない培地、及び1 mM可溶性リン酸を含む培地を用いた栽培におけるトマト地上部（葉・茎）のTAG蓄積量を示すグラフ。 a) 栽培期間：6日間→28日間、b) 栽培期間：13日間→31日間

[図10]可溶性リン酸を含まない培地、及び1 mM可溶性リン酸を含む培地を用いた栽培におけるナタネ地上部（葉・茎）のTAG蓄積量を示すグラフ。

[図11]可溶性リン酸を含まない培地、及び1 mM可溶性リン酸を含む培地を用いた栽培におけるイヌビエ地上部（葉・茎）のTAG蓄積量を示すグラフ。 a) 栽培期間：6日間→28日間、b) 栽培期間：13日間→31日間

[図12]可溶性リン酸を含まない培地、及び1 mM可溶性リン酸を含む培地を用いた栽培におけるタバコ地上部（葉・茎）のTAG蓄積量を示すグラフ。

発明を実施するための形態

[0011] 本発明は、植物体の光合成を継続させながら、種子以外の植物組織から、植物油脂を効率的に製造する方法を提供することに関する。

[0012] 本発明者らは、通常条件で栽培し、十分に生育した植物体を、リンが欠乏した状態で栽培を継続することで、光合成を継続させながら、中性脂質を含

有する植物油脂を種子以外の植物組織に効率的に蓄積し得ることを見出した。
。

[0013] 本発明の植物油脂の製造方法は、従来の中性脂質蓄積方法の多くが遺伝子組換え技術を用いているのに対し、栽培条件の任意の制御により非遺伝子組換え植物に対しても利用可能である。そして、本発明の方法によれば、植物の光合成能力を停止させることなく、かつ種子の成熟を待つことなく早期に中性脂質を種子以外の植物組織に蓄積し得ることから植物油脂を効率良く生産することができる。また更に、種子以外の植物組織に蓄積した脂質中に脂溶性成分を溶解させることにより、植物ステロール類やポリフェノール類等の機能性成分を効率良く生産すること等も期待される。

[0014] 本発明の植物油脂の製造方法は、組織が十分に生育した植物体を、リンが欠乏した状態で栽培し、種子以外の組織に蓄積した中性脂質を回収するものである。

本発明において、「組織が十分に生育した植物体」とは、通常の場合で、根、茎、及び葉等の植物組織が十分に生育した植物体を意味し、即ち、種子から発芽させた場合は発根及び2枚以上の本葉が観察される程度に生育した植物体を意味し、好適には、リンを適量含む媒体で栽培され、根、茎、及び葉等の植物組織が生育し、十分な植物体量（バイオマス量）を有する植物体、即ち植物体重量が種子重量の10倍以上に生育した植物体が挙げられる。

[0015] 「植物体」としては、陸上植物であればその種類は特に限定されない。好適には生育速度や得られる植物体量（バイオマス量）などから種子植物を用いることが効率的生産に有利である。種子植物のうち被子植物としては、例えばヤシ科やイネ科等の単子葉植物、あるいはマメ科、アブラナ科、キク科、トウダイグサ科、ゴマ科、モクセイ科、ミソハギ科、シソ科、セリ科、アカザ科、アオイ科等の双子葉植物、また裸子植物としては、例えばマツ科、イチョウ科等が挙げられる。

また、当該植物体は、天然に存在する野生型の植物体に限らず、一部の遺伝子に変異した変異体であってもよい。例えば、脂質代謝、糖代謝、デンプ

ン生合成等に支障を生じた変異体であってもよい。

[0016] より具体的な植物種の例としては、ヤシ科のココヤシ (Cocos nucifera)、パームヤシ (Elaeis guineensi, Elaeis oleifera) 等、イネ科のイネ (Oryza sativa, Oryza glaberrima)、トウモロコシ (Zea mays)、ミスカンザス (Miscanthus giganteus)、イヌビエ (Echinochloa crus-galli) 等、マメ科のダイズ (Glycine max) 等、アブラナ科のナタネ (Brassica rapa, Brassica napus)、シロイヌナズナ (Arabidopsis thaliana)、ナガミノアマナズナ (Camelina sativa)、ハクサイ (Brassica rapa var. glabra)、キャベツ (Brassica oleracea var. capitata)、コマツナ (Brassica rapa var. peruviridis)、ミズナ (Brassica rapa var. nipposinica)、クレソン (Nasturtium officinale) 等、キク科のヒマワリ (Helianthus annuus)、ベニバナ (Carthamus tinctorius)、レタス (Lactuca sativa) 等、トウダイグサ科のヒマ (Ricinus communis)、ヤトロファ (Jatropha curcas)、ゴマ科のゴマ (Sesamum indicum) 等、モクセイ科のオリーブ (Olea europea) 等、ミソハギ科のクフエア (Cuphea hyssopifolia) 等、シソ科のアオジソ (Perilla frutescens var. crispa)、アカジソ (Perilla frutescens var. crispa)、バジル (Ocimum basilicum L.) 等、セリ科のミツバ (Cryptotaenia japonica)、コリアンダー (Coriandrum sativum L.)、パセリ (Petroselinum crispum) 等、アカザ科のハウレンソウ (Spinacia oleracea) 等、ナス科のタバコ (Nicotiana tabacum)、トマト (Solanum lycopersicum L.) 等が挙げられる。このうち、被子植物が好ましく、より好適には双子葉植物、更に好適にはアブラナ科植物が挙げられ、このうちシロイヌナズナ、トマト、ナタネ、イヌビエ又はタバコがより好ましい。

[0017] 本発明において、「リンが欠乏した状態で栽培する」とは、例えば、1) 組織が十分に生育した植物体をリンが欠乏した媒体に移植して栽培すること、2) 媒体をリンが欠乏した媒体に置換して当該植物体を栽培すること、3) 栽培過程の媒体において生じるリンの欠乏状態を維持しながら栽培すること等が挙げられる。

ここで、栽培に用いる媒体は、植物体の生育段階、及び油脂蓄積段階のいずれにおいても限定されず、土壌、水耕液（培養液）、或いは固体培地等を用いることができる。また屋外での日照、及び屋内における人工照明等のいずれも利用可能であり、光量や照射時間も特に制限されないが、植物体に固有な最適条件を用いることが望ましい。

- [0018] 「リンが欠乏した状態」とは、媒体中にリンを含まないか又は媒体中のリン濃度が極めて低い状態を意味する。具体的には、中性脂質の蓄積促進の点から、媒体中のリン濃度がゼロに近いことが望ましいが、ゼロでなくても通常の栽培で用いるリン酸濃度の $1/30$ 未満、好適には $1/100$ 以下、より好適には $1/300$ 以下、更に好ましくは $1/1000$ 以下である。

例えば、表 1 に示した培地を用いて水耕栽培や寒天培地での栽培を行う場合、極めて低い濃度のリンを含む媒体のリン濃度は、 $33\text{ }\mu\text{M}$ 未満であり、好ましくは $10\text{ }\mu\text{M}$ 以下、更に好適には $3.3\text{ }\mu\text{M}$ 以下が望ましく、最適には $1\text{ }\mu\text{M}$ 以下、或いは $0.33\text{ }\mu\text{M}$ 以下とすることができる。

- [0019] 「リンが欠乏状態となった変異植物体」とは、例えばリン酸輸送に支障が生じる等して、植物体中のリン濃度が低値となった変異植物体を意味する。ここで、リン酸輸送に支障を生じるとは、例えばリン酸輸送に関わる遺伝子に支障が生じることが挙げられ、斯かる変異体として、例えばシロイヌナズナでは *pho1* 及び *pho2* が挙げられる（参考文献: Journal of Plant Physiology (1991) 97巻, 1087頁）。このような変異植物体は、リンが欠乏した状態で栽培しなくても、すなわちリンを含む媒体においても中性脂質の蓄積促進が行われる。

- [0020] リンが欠乏した状態での栽培は、通常の温度、湿度、pH、光照射条件で栽培を行えばよい。このリン欠乏条件における栽培期間は特に限定されないが、中性脂質蓄積の点から、好適には数日～数週間、特には3日間～3週間、最適には1～2週間である。

例えば、植物体としてシロイヌナズナを用いる場合、 $18\sim 25^{\circ}\text{C}$ 、光強度 $30\sim 70\text{ }\mu\text{E}/\text{cm}^2$ 、照射時間 $6\sim 24$ 時間/日の範囲であれば良い

。

[0021] リンが欠乏した状態での栽培において、媒体の調製方法は特に限定されないが、一般にリン欠乏土壌と言われる土壌、例えば可溶性リン酸が $100\text{ mg} / 100\text{ g}$ 以下、更には $50\text{ mg} / 100\text{ g}$ 以下の土壌、或いはこのような土壌にNK化成肥料等のリンを含まない肥料の施肥を行うか、或いはこのような土壌にNK化成肥料等のリンを含まない肥料に少量のリン酸等のリン肥料を加えた肥料の施肥を行うことにより調製することができる。また水耕液や固体培地を用いる場合は、リン以外の必要栄養素を適当に配合した培養液、或いは培地を用いることができる。リン以外の必要栄養素は特に限定されないが、硝酸カリウム、硝酸アンモニウム、硫酸アンモニウム、硝酸カルシウム、硝酸ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、硫酸マグネシウム、硫酸ナトリウム、硫酸鉄（III）、塩化鉄（III）、硫酸鉄（III）、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム、エチレンジアミン四酢酸鉄ナトリウム、硫酸マンガン、硫酸亜鉛、ホウ酸、硫酸銅、モリブデン酸ナトリウム、三酸化モリブデン、ヨウ化カリウム、塩化コバルト、塩化アルミニウム、塩化ニッケル、ミオイノシトール、チアミン塩酸塩、ピリドキシン塩酸塩、ニコチン酸、葉酸、ビオチン、グリシン等を含むことができる。また固体培地のゲル化剤としては、特に限定されないが、寒天、ゼラチン、ゲルライト（和光純薬社製）等を用いることができる。

[0022] 「リンが欠乏した状態」での栽培の一態様としては、例えば、MS培地（*Physiologia Plantarum*（1962）15巻，473頁）で、組織が十分に生育した植物体を表1に示した組成をもつ培地に移すか又はMS培地を表1に示した培地に置換して、リンを含まないか又はリン濃度が極めて低い状態、例えば $33\text{ }\mu\text{M}$ 未満、好ましくは $10\text{ }\mu\text{M}$ 以下、更に好適には $3\text{ }\mu\text{M}$ 以下、最適には $1\text{ }\mu\text{M}$ 以下、或いは $0.33\text{ }\mu\text{M}$ 以下で更に数日間～数週間の栽培をすることが挙げられる。

[0023] また別の一態様として、栽培過程において生じるリンの欠乏状態を維持しながら栽培することが挙げられ、この場合には、植物体を適当な期間栽培し

てリン濃度が極めて低くなってから、更に数日～数週間の栽培を継続すればよい。この場合に用いる媒体中のリン濃度は、植物体が十分に生育した後に媒体中のリン濃度が上記に示した極めて低い濃度またはゼロとなる様に、初期濃度を調整することにより行えばよい。

[0024] [表1]

リン酸非含有培地の組成

組成物	濃度
KNO_3	5 mM
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2 mM
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2 mM
H_3BO_3	70 μM
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	14 μM
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.5 μM
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 μM
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.2 μM
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.01 μM
NaCl	10 μM
Fe-EDTA	50 μM
KH_2PO_4	0-0.033 mM
MES 緩衝液	20 mM
シュークロース	1 %
寒天	0.8 %
pH	6.0

[0025] かくして植物体の根、葉、或いは茎等に蓄積した中性脂質を植物体から回収する方法は、特に限定されず、例えば、植物体の根、葉、或いは茎等を粉碎、圧搾すること、或いは適当な溶剤により抽出する方法等で植物油脂を得ることができる。より具体的には例えば、植物体の根、葉、或いは茎等を粉碎後、ノルマルヘキサンにより抽出する方法、或いはBligh and Dyer法 (Can. J. Biochem. Physiol. (1959) 37巻, 911頁) などの方法を用いることで効率的に植物油脂を抽出することができ、植物油脂に含まれる形で中性脂質を回収することが可能である。斯かる植物油脂は、そのまま中性脂質として用いることもできるが、一般的な脱ガム、脱酸、脱色、脱臭等の精製の後用い

ることもでき、その方法は特に限定されない。更に植物油脂から中性脂質を分離・回収することもでき、その方法についても特に限定されない。より具体的に例えば、薄層クロマトグラフィーによる分離およびシリカゲルプレートからの回収、高速液体クロマトグラフィーを用いた分離・回収などが挙げられる。

- [0026] 斯くして得られる中性脂質はその大半がTAGであるが、少量のDAG等が含まれることもある。また中性脂質中の脂肪酸鎖長は植物体に固有な脂質生合成能力にほぼ依存することが多い。例えば、MS培地において23℃、連続光照射の条件下、10日間栽培したシロイヌナズナを、リン酸(KH_2PO_4)を含まない表1の培地に移植し、上記同様の条件の下、更に10日間の栽培を行うと茎、葉のTAG蓄積量はリン酸1mMを含む同培地で栽培した場合の約5倍、根においても約2倍となる(図1)。またこの際の脂肪酸組成(鎖長:不飽和度)は、リン酸の有無に関わらずほぼ同等(18:3 約40%、18:2 約20~25%、16:0 約20~30%)である(図2)。

実施例

- [0027] 以下、実施例により本発明を詳細に説明する。なお、植物組織中の油脂成分の分析は、下記に記載の方法により行った。

(1) 抽出及び前処理

総脂質の抽出は、Bligh and Dyer法(Can. J. Biochem. Physiol. (1959) 37巻, 911頁)に基づき行った。総脂質からTAGの分離は、薄層クロマトグラフィー(TLC Silica gel 60, 20x20cm, メルク, 製品コード1.05721.0009、展開溶媒組成は、ヘキサン:ジエチルエーテル:酢酸=160:40:4 (vol/vol))により行い、プレートからTAGのスポットをかきとって含量の測定を行った。

- [0028] (2) 中性脂質量の測定

15:0脂肪酸を内部標準試料として、TAGをメタノリシス処理した。具体的には、ネジ栓付きガラス試験管内で、TAGを含むシリカゲル粉末に1

0.0 μ l の 1 mM 15:0 ヘキサン溶液 (pentadecanoic acid, シグマアルドリッチ, P-6125) および 350 μ l の 5% 塩化水素メタノール溶液 (和光純薬, 089-03971) を添加して 85°C で 1 時間処理した。メタノリシス処理後、ヘキサンで脂肪酸メチルエステルを回収し、窒素ガスで乾固後、60 μ l のヘキサンで回収し、そのうち 3 μ l をガスクロマトグラフィーで解析した。ガスクロマトグラフィー (島津製作所、GC-2014, カラム、信和化工 ULBON HR-S S-10 (25m, 0.25mm ID)、カラム温度 180°C、気化室および検出器 250°C、入口圧 (kPa) 68.2、カラム流量 (ml/min) 0.53、スプリット比 68.8、計測時間 15 分) を用いて分離・定量を行った。

[0029] (3) 植物組織乾燥重量の測定

凍結乾燥処理を 20 時間行った後、重量を測定し、乾燥重量とした。

[0030] 実施例 1

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 野生株の種子 70 個体を MS 寒天培地 (Physiologia Plantarum (1962) 15 巻, 473 頁) に播種し、22°C、光強度 40 ~ 70 μ E / cm^2 、照射時間 24 時間 / 日の条件で 10 日間栽培した。生育した植物体を MS 寒天培地から注意深く引き抜き、可溶性リン酸 (KH_2PO_4) を含まない (0 mM) 表 1 の培地に 35 個体を移植した。また対称として 35 個体を 1 mM 可溶性リン酸を含む表 1 の培地に移植し、これらを上記と同条件で更に 10 日間栽培した。栽培後の植物体を寒天培地から引き抜き、地上部 (葉、莖) および根に切り分け、それぞれ重量測定を行った後、液体窒素下すり鉢で粉砕し、Bligh and Dyer 法で脂肪抽出を行った。この後、薄層クロマトグラフィーにより TAG を分離・精製後、塩酸メタノールでメタノリシス処理をしてガスクロマトグラフィーを用いて脂質分析を行った。この結果、図 1 に示した様に、可溶性リン酸 0 mM の培地で栽培したシロイヌナズナ葉及び莖では、対照の 1 mM 可溶性リン酸を含む培地で栽培した場合の約 5 倍、根においても約 2 倍の TAG 蓄積向上効果であった。

また、得られた各条件で蓄積した TAG の脂肪酸組成分析を行ったところ、図 2 に示す様にリン酸の有無によって脂肪酸組成の大きな変化は認められ

なかった。

[0031] 実施例 2

シロイヌナズナ脂質合成系の脂質トランスポーターとして知られる *tgd1* 遺伝子に変異を持つ *tgd1* 変異株（非特許文献 4）を、実施例 1 と同様の条件で栽培した後、脂質分析を行った。この結果、*tgd1* 変異株においてもリン酸を含まない培地において、葉および茎で約 8 倍、根でも約 2 倍の TAG 蓄積向上効果が認められた（図 3）。

[0032] 実施例 3

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 野生株の種子 120 個体を MS 寒天培地 (Physiologia Plantarum (1962) 15 巻, 473 頁) に播種し、 22°C 、光強度 $40 \sim 70 \mu\text{E}/\text{cm}^2$ 、照射時間 24 時間/日の条件で 10 日間栽培した。生育した植物体を MS 寒天培地から注意深く引き抜き、可溶性リン酸 (KH_2PO_4) の濃度が 0 mM、0.01 mM、0.033 mM、0.1 mM、0.33 mM である表 1 の培地にそれぞれ 20 個体を移植した。また対称として 20 個体を 1 mM 可溶性リン酸を含む表 1 の培地に移植し、これらを上記と同条件で更に 10 日間栽培した。栽培後の植物体を寒天培地から引き抜き、地上部（葉、茎）および根に切り分け、地上部の重量測定を行った後、液体窒素下すり鉢で粉碎し、Bligh and Dyer 法で脂肪抽出を行った。この後、薄層クロマトグラフィーにより TAG を分離・精製後、塩酸メタノールでメタノリシス処理をしてガスクロマトグラフィーを用いて脂質分析を行った。この結果、図 4 に示した様に、可溶性リン酸 0 mM、0.01 mM ($10 \mu\text{M}$)、及び 0.033 mM ($33 \mu\text{M}$) の培地で栽培したシロイヌナズナ地上部では、対照の 1 mM 可溶性リン酸を含む培地で栽培した場合の 3~5 倍の TAG 蓄積向上効果が認められた。尚、可溶性リン酸 0.1 mM ($100 \mu\text{M}$) 及び 0.33 mM ($330 \mu\text{M}$) の培地での栽培における TAG 蓄積は対照条件と同程度であった。

[0033] 実施例 4

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) *pho1* 変異株は AGI コード AT3G2343

0の遺伝子に変異により機能損傷しており、リン酸輸送に支障を生じた変異株である（参考文献：Journal of Plant Physiology (1991) 97巻, 1087頁）。pho1変異株を実施例1と同様の条件で栽培した後、地上部（葉、茎）について脂質分析を行った。この結果、リン酸を含まない培地において、約3倍のT A G蓄積向上が認められた（図5）。

[0034] 実施例5

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) pah1pah2変異株はAGIコードAT3G09560 (pah1) 及びAT5G42870 (pah2) の遺伝子に変異により機能損傷しており、膜脂質代謝に支障を生じた変異株である（参考文献：Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (2009) 106巻, 20978頁）。pah1pah2変異株を実施例1と同様の条件で栽培した後、地上部（葉、茎）について脂質分析を行った。この結果、リン酸を含まない培地において、約6倍のT A G蓄積向上が認められた（図6）。

[0035] 実施例6

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) pgm-1変異株はAGIコードAT5G51820の遺伝子に変異により機能損傷しており、糖代謝及びデンプン生合成に支障を生じた変異株である（参考文献：Plant Physiology (1985) 79巻, 11頁、Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (1989) 86巻, 5830頁, Plant Physiology (2000) 122巻, 1193頁）。pgm-1変異株を実施例1と同様の条件で栽培した後、地上部（葉、茎）について脂質分析を行った。この結果、リン酸を含まない培地において、約3倍のT A G蓄積向上が認められた（図7）。

[0036] 実施例7

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) pho1変異株はリン酸輸送に支障を生じた変異株であり、2.5 mMの無機リン酸を含むミネラル溶液の灌水による土壌栽培において、植物体中の無機リン酸含量は野生株の5%程度、また総リン酸量についても24-44%にまで低下した変異株である（参考文献：Journal of Plant Physiology (1991) 97巻, 1087頁）。pho1変異株及

び野生株を実施例 1 と同様の条件にて 1 mM 可溶性リン酸を含む表 1 の培地を用いて栽培した後、地上部（葉、莖）について脂質分析を行った。この結果、pho1変異株においては、野生株の約 3 倍の TAG 蓄積向上が認められた（図 8）。これはリン酸の取り込みが抑制されたことにより、pho1変異株において実質的にリン酸が欠乏した条件と同様の状態がもたらされたことに起因するものと考えられた。

[0037] 実施例 8

トマト (Solanum lycopersicum L.) は文部科学省 National Bio-Resource Project (NBRP) を通じて筑波大学遺伝子実験センターから提供された Micro-Tom (TOMJPF00001) を用いた。Micro-Tom の種子 30 個体を MS 寒天培地 (Physiologia Plantarum (1962) 15 巻, 473 頁) に播種し、22°C、照射時間 16 時間 (光強度 40 ~ 70 $\mu\text{E}/\text{cm}^2$) 照/日の条件で 6 日間、或いは 13 日間栽培した。生育した植物体を MS 寒天培地から注意深く引き抜き、可溶性リン酸 (KH_2PO_4) を含まない (0 mM) 表 1 の培地に 10 個体を移植した。また対称として 10 個体を 1 mM 可溶性リン酸を含む表 1 の培地に移植し、これらを上記と同条件で更に 28 日間、或いは 31 日間栽培した。栽培後の植物体を寒天培地から引き抜き、地上部（葉、莖）および根に切り分け、地上部の重量測定を行った後、液体窒素下すり鉢で粉碎し、Bligh and Dyer 法で脂肪抽出を行った。この後、薄層クロマトグラフィーにより TAG を分離・精製後、塩酸メタノールでメタノリシス処理をしてガスクロマトグラフィーを用いて脂質分析を行った。この結果、図 9 に示した様に、可溶性リン酸 0 mM の培地で栽培した Micro-Tom では、対照の 1 mM 可溶性リン酸を含む培地で栽培した場合の 3 ~ 5 倍の TAG 蓄積向上が認められた。

[0038] 実施例 9

ナタネ (Brassica napus) は宮内菜 (カネコ種苗 (株)) を使用した。ナタネを実施例 6 と同様の条件で栽培した後 (表 1 の培地に移植してからの栽培期間は 55 日間)、地上部（葉、莖）について脂質分析を行った。この結果、リン酸を含まない培地において、2 倍以上の TAG 蓄積向上が認められた。

(図 10)。

[0039] 実施例 10

イヌビエ (Echinochloa crus-galli) は和歌山県和歌山市内で採取したものを使用した。イヌビエを実施例 6 と同様の条件で栽培した後 (表 1 の培地に移植してからの栽培期間は 28 日間、或いは 31 日間)、地上部 (葉、茎) について脂質分析を行った。この結果、リン酸を含まない培地において、約 3.5 倍の TAG 蓄積向上が認められた (図 11)。

[0040] 実施例 11

タバコ (Nicotiana tabacum cv SR1、Lehle Seeds, Tex., USA (<http://www.arabidopsis.com/> <http://www.arabidopsis.com/>) より購入可能) を 25 °C、照射時間 24 時間 (光強度 40 ~ 70 $\mu\text{E}/\text{cm}^2$) 照/日の条件で 10 日間栽培後、表 1 の培地および 1 mM 可溶性リン酸を含む表 1 の培地に移植した。これらを上記と同条件で更に 21 日間栽培後、地上部 (葉、茎) について脂質分析を行った。この結果、リン酸を含まない培地において、20 倍以上の TAG 蓄積向上が認められた (図 12)。

産業上の利用可能性

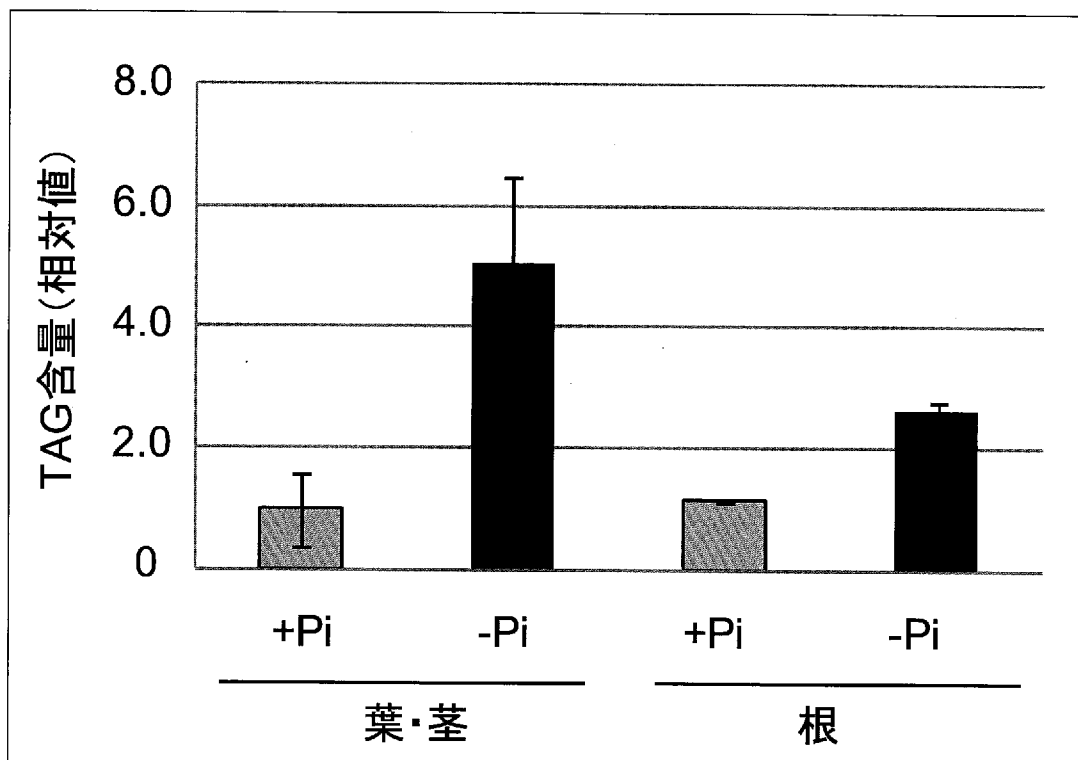
[0041] 本発明の植物油脂の製造方法によれば、植物油脂を効率的かつ簡便に得ることができる。得られた植物油脂は食品用或いは工業用として有用である。

請求の範囲

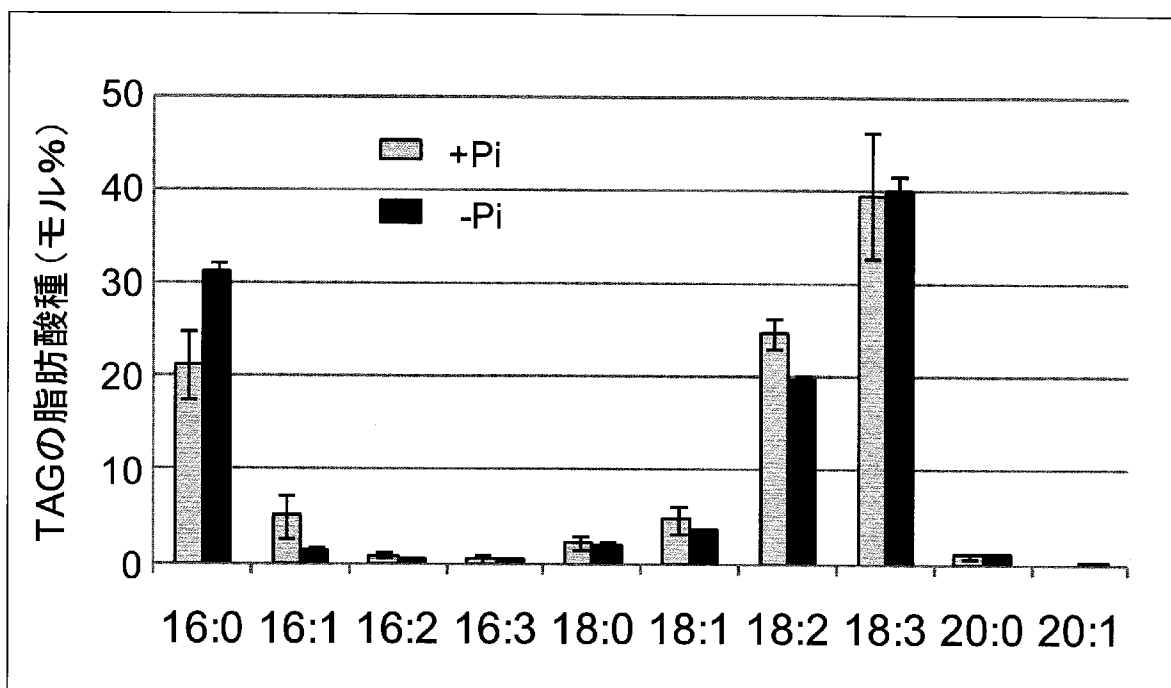
- [請求項1] 組織が十分に生育した植物体をリンが欠乏した状態で栽培するか、又はリンが欠乏状態となった変異植物体を栽培し、種子以外の組織に蓄積した中性脂質を回収することを特徴とする植物油脂の製造方法。
- [請求項2] 種子以外の組織が、葉、茎、または根である、請求項1に記載の植物油脂の製造方法。
- [請求項3] リンが欠乏した状態での栽培が、組織が十分に生育した植物体を、リンが欠乏した媒体に移植するか或いは媒体をリンが欠乏した媒体に置換して栽培する、又は栽培過程の媒体において生じるリンの欠乏状態を維持しながら栽培するものである請求項1又は2に記載の植物油脂の製造方法。
- [請求項4] 種子以外の組織の中性脂質蓄積量が、リンが欠乏しない状態で栽培した場合の2倍以上である、請求項1～3のいずれかに記載の植物油脂の製造方法。
- [請求項5] 植物体が被子植物である、請求項1～4のいずれかに記載の植物油脂の製造方法。
- [請求項6] 植物体が裸子植物である、請求項1～4のいずれかに記載の植物油脂の製造方法。
- [請求項7] 植物体が双子葉植物である、請求項1～4のいずれかに記載の植物油脂の製造方法。
- [請求項8] 植物体がシロイヌナズナ、トマト、ナタネ、イヌエビ又はタバコである、請求項1～4のいずれかに記載の植物油脂の製造方法。
- [請求項9] リンが欠乏した状態が、媒体のリン濃度が $3.3\ \mu\text{M}$ 未満である請求項1～8のいずれかに記載の植物油脂の製造方法。
- [請求項10] リンが欠乏した状態が、媒体のリン濃度が $10\ \mu\text{M}$ 以下である請求項1～8のいずれかに記載の植物油脂の製造方法。
- [請求項11] リンが欠乏した状態が、媒体のリン濃度が $3.3\ \mu\text{M}$ 以下である請求項1～8のいずれかに記載の植物油脂の製造方法。

- [請求項12] リンが欠乏した状態が、媒体のリン濃度が $1\ \mu\text{M}$ 以下である請求項1～8のいずれかに記載の植物油脂の製造方法。
- [請求項13] リンが欠乏した状態が、媒体のリン濃度が $0.33\ \mu\text{M}$ 以下である請求項1～8のいずれかに記載の植物油脂の製造方法。
- [請求項14] リンが欠乏状態となった変異植物体が、リン酸輸送に支障を生じた変異植物体である請求項1記載の植物油脂の製造方法。
- [請求項15] 組織が十分に生育した植物体をリンが欠乏した状態で栽培するか、又はリンが欠乏状態となった変異植物体を栽培することによる、種子以外の組織に中性脂質を蓄積させる方法。

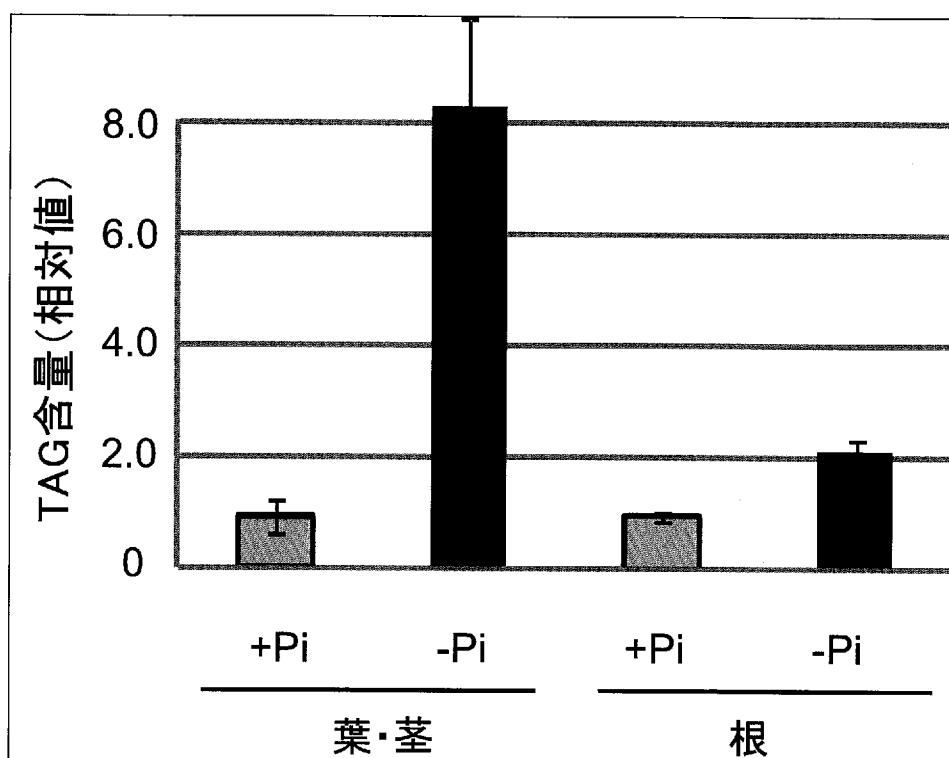
[図1]



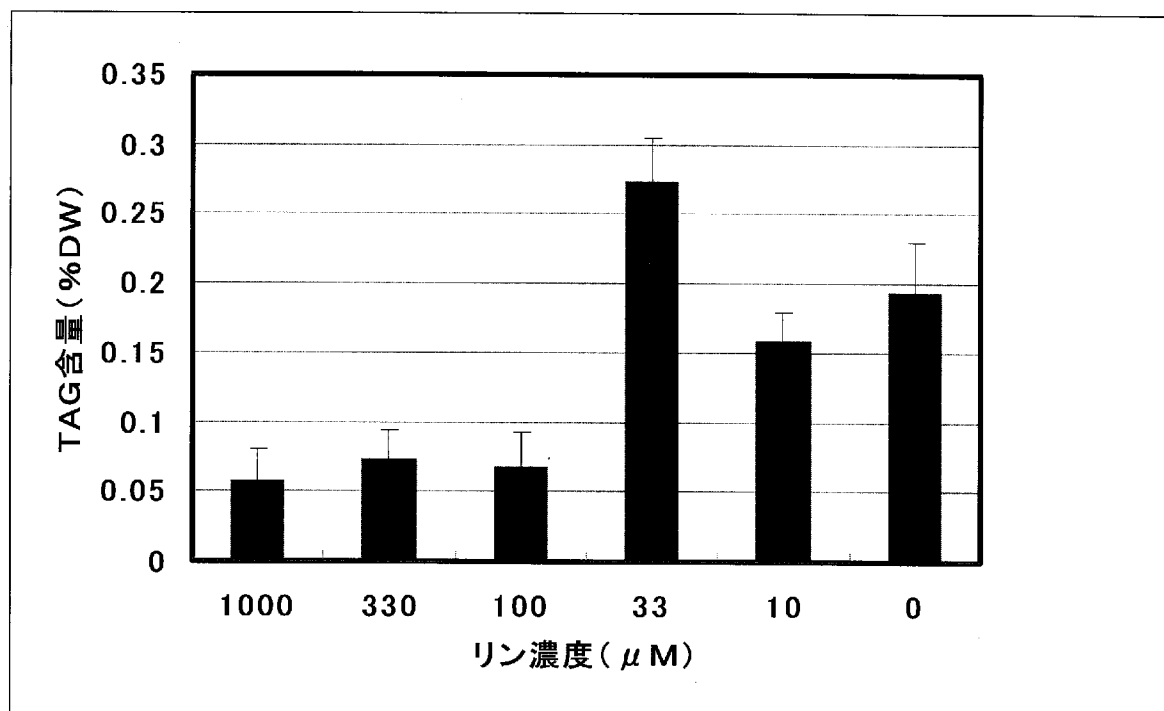
[図2]



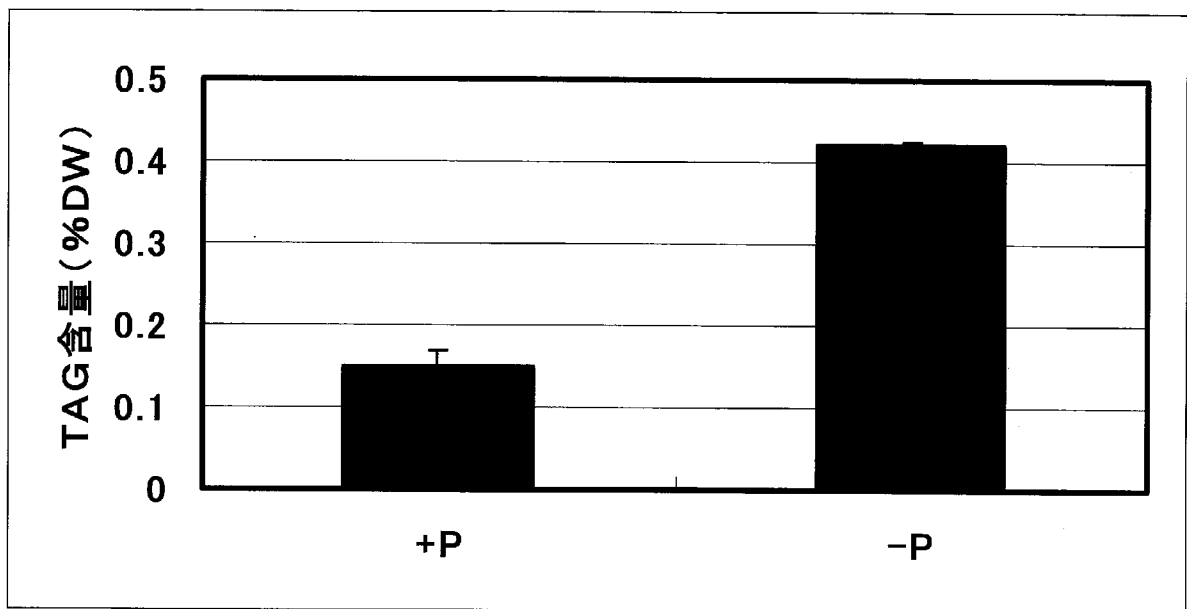
[図3]



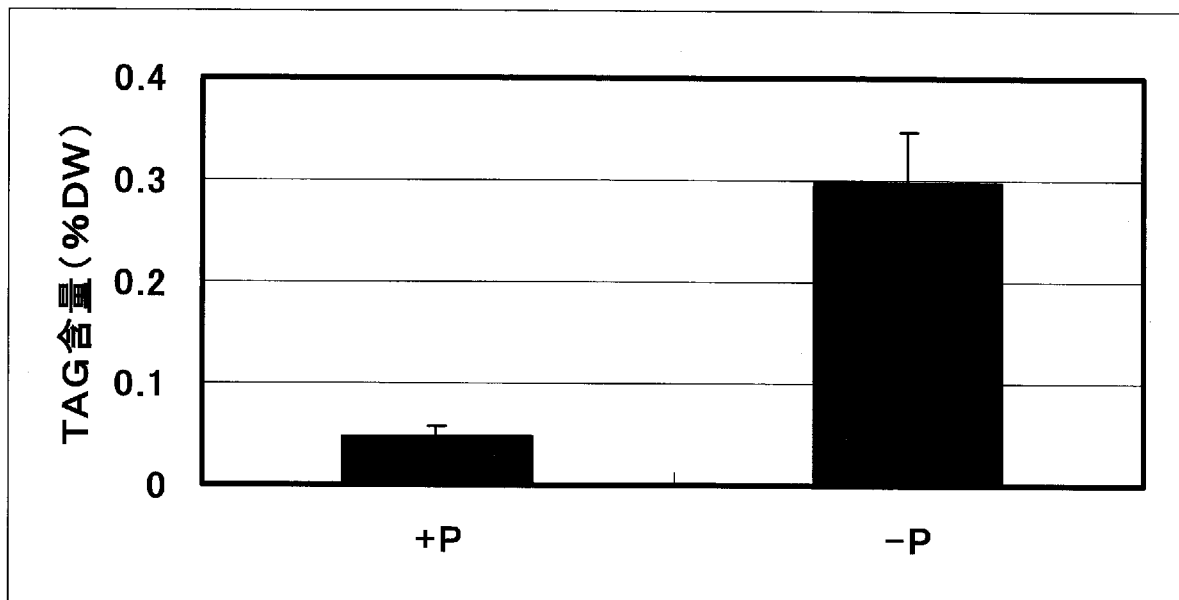
[図4]



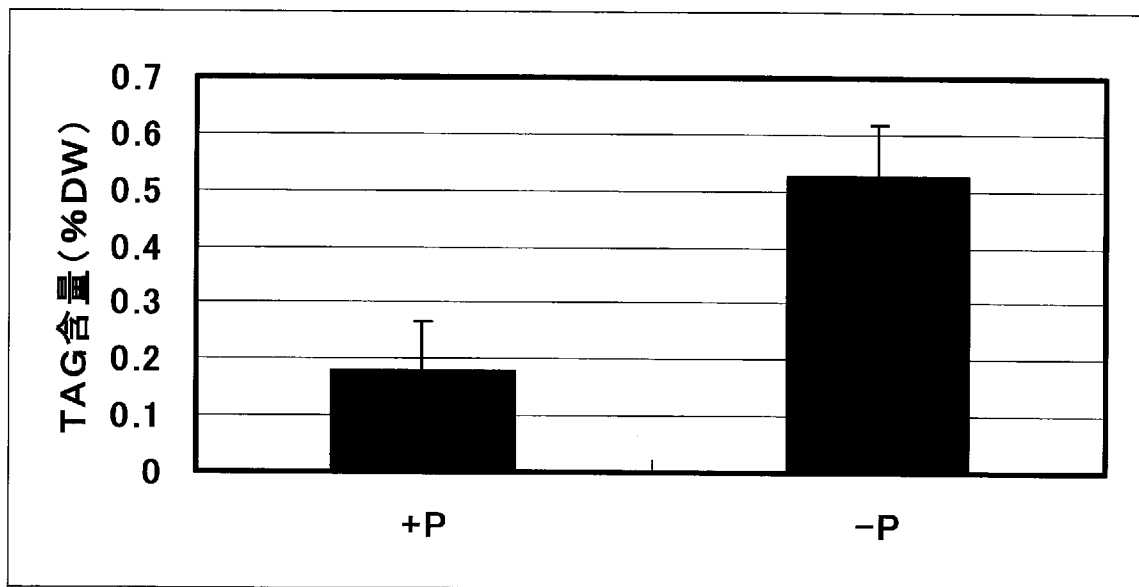
[図5]



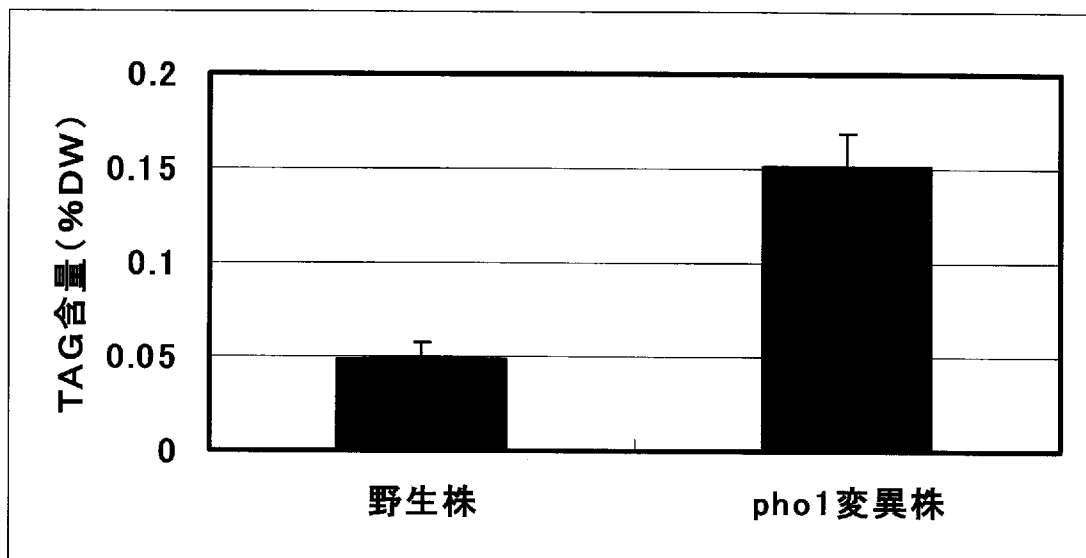
[図6]



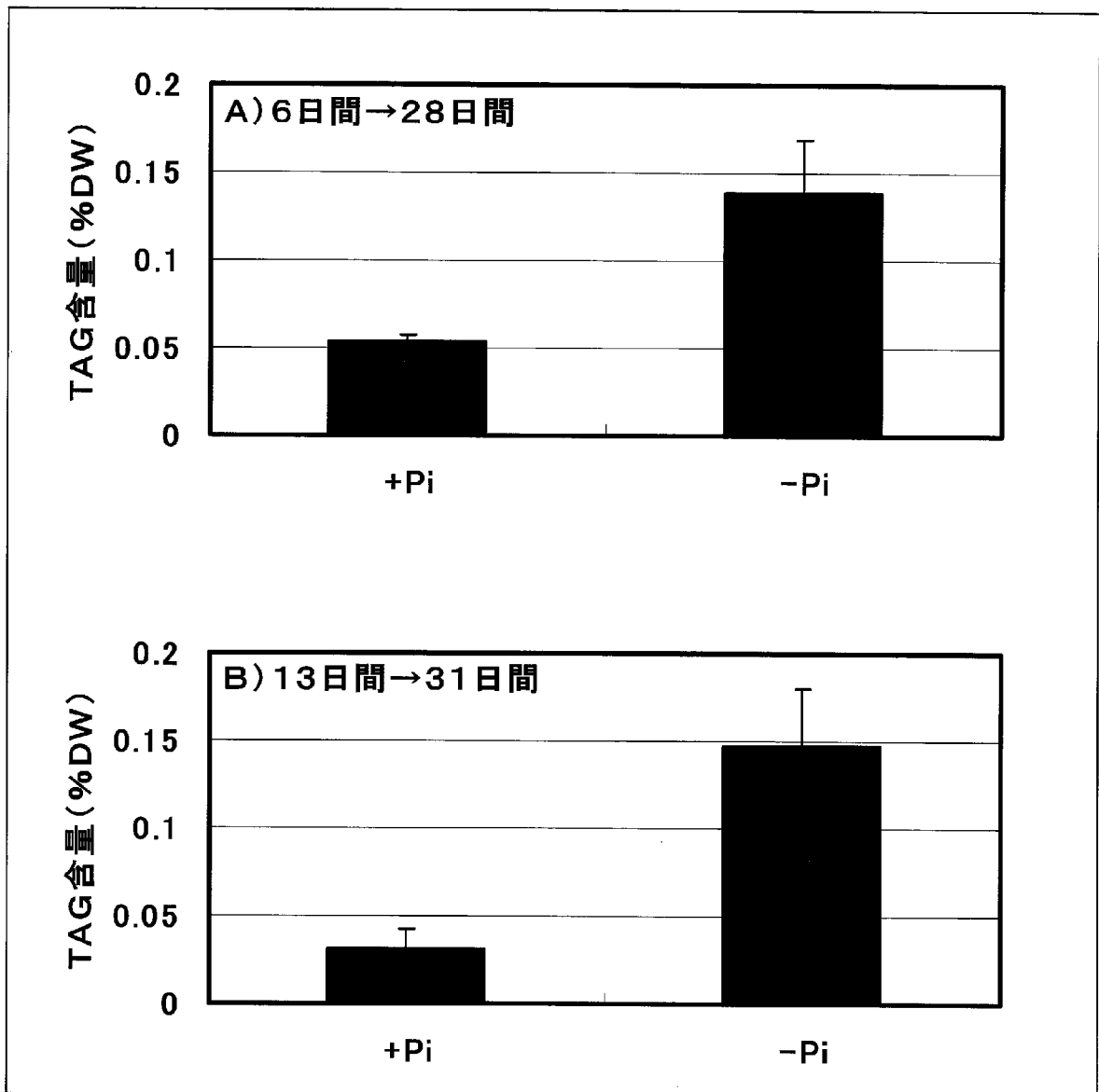
[図7]



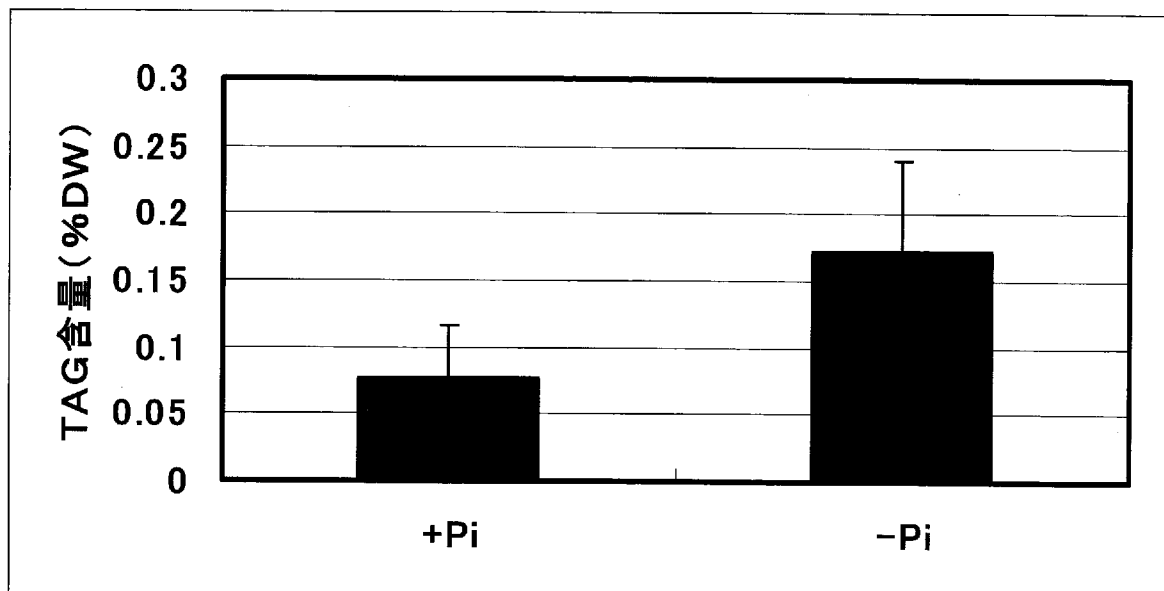
[図8]



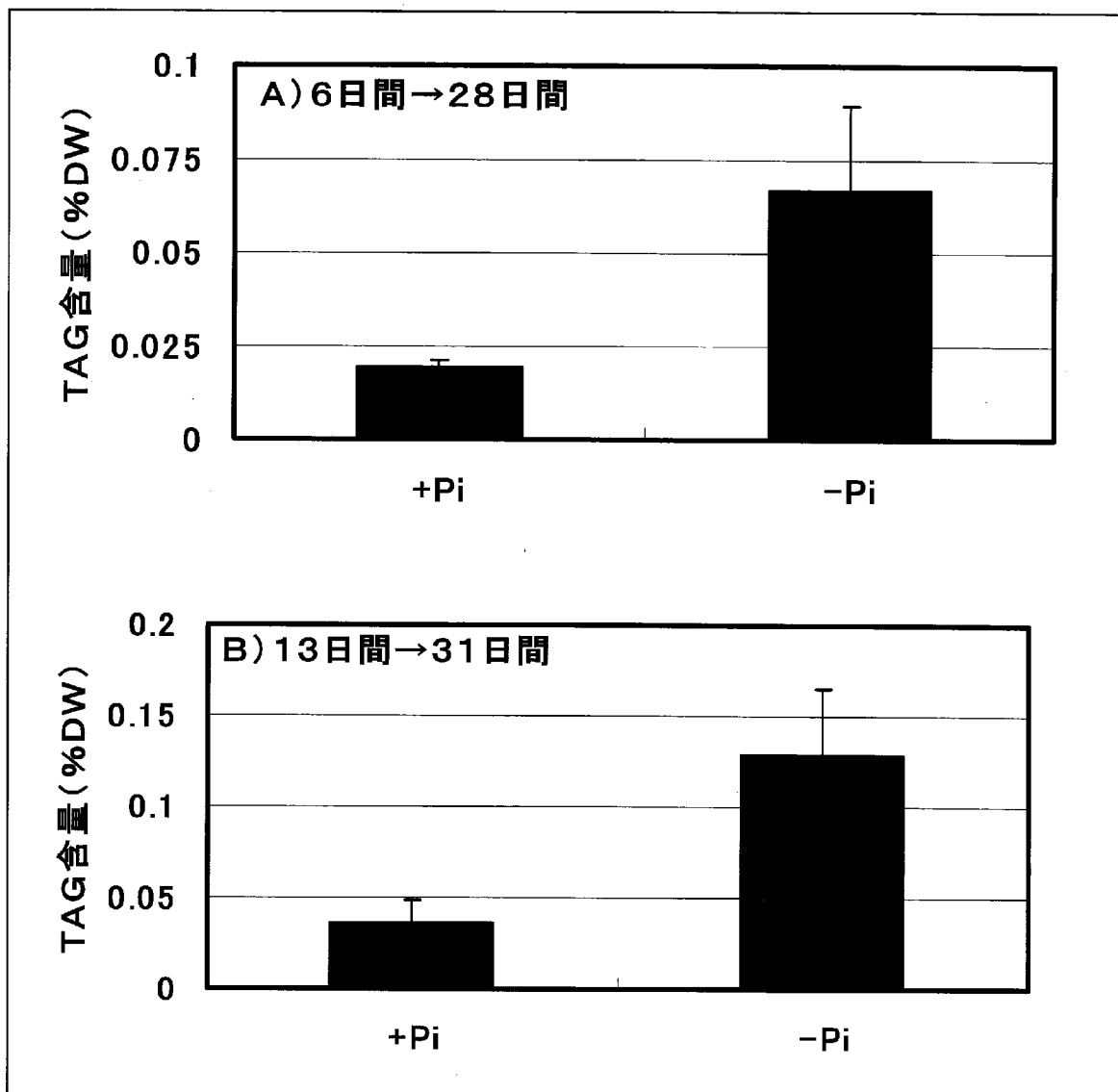
[図9]



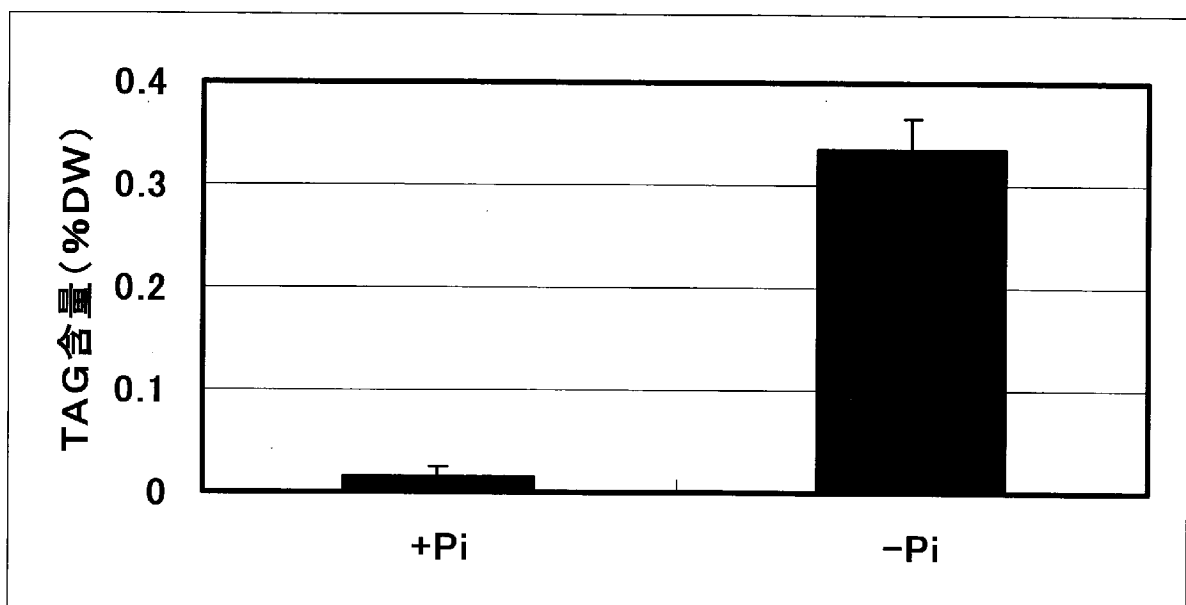
[図10]



[図11]



[図12]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/062252

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A01G7/00(2006.01) i, C11B1/10(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)

A01G7/00, C11B1/10

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 1996-2011

Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2011 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2011

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

PubMed, CiNii, BIOSIS (STN), JSTplus (JDreamII), JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	Hartel H, Benning C., Can digalactosyldiacylglycerol substitute for phosphatidylcholine upon phosphate deprivation in leaves and roots of Arabidopsis?, Biochemical Society Transactions, 2000, Vol.28, No.6, pp.729-732	15 1-14
A	Koichi KOBAYASHI, Hiroyuki OTA, "Metabolic changes of membrane lipid biosynthesis under phosphate starvation and its regulation by phytohormones", Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan, vol.78, no.10, Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry, 01 October 2004 (01.10.2004), pages 977 to 980	1-15

☒ 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

22 August, 2011 (22.08.11)

Date of mailing of the international search report

30 August, 2011 (30.08.11)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/062252

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Mie SHIMOJIMA, Koichi KOBAYASHI, Hiroyuki OTA, "Chloroplast Glycolipids : The Biosynthesis and Roles in Plants", Kagaku to Seibutsu, 01 May 2008 (01.05.2008), vol.46, no.5, pages 330 to 338	1-15

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A01G7/00(2006.01)i, C11B1/10(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A01G7/00, C11B1/10

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	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 1 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 1 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 1 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)

PubMed, CiNii, BIOSIS (STN), JSTPlus (JDreamII), JST7580 (JDreamII)

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	Hartel H, Benning C., Can digalactosyldiacylglycerol substitute for phosphatidylcholine upon phosphate deprivation in leaves and roots of Arabidopsis?, Biochemical Society Transactions, 2000, Vol.28, No.6, pp.729-732	1 5 1 - 1 4
A	小林 康一、太田 啓之, リン酸欠乏時における膜脂質合成系の代謝変動と植物ホルモンによる制御, 日本農芸化学会誌, Vol.78, No.10, 社団法人日本農芸化学会, 2004.10.01, pp.977-980	1 - 1 5

☒ 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

2 2 . 0 8 . 2 0 1 1

国際調査報告の発送日

3 0 . 0 8 . 2 0 1 1

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

村田 泰利

2 B

4 0 1 2

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 2 3 7

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	下嶋 美恵、小林 康一、太田 啓之、葉緑体チラコイド膜を構成する グリセロ糖脂質の生合成と機能，化学と生物，2008.05.01，Vol.46， No.5，pp.330-338	1－15