

(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
2019年4月11日(11.04.2019)



(10) 国際公開番号

WO 2019/069969 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/55 (2006.01) *C12N 9/18* (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01) *C12P 7/64* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2018/036984
- (22) 国際出願日: 2018年10月3日(03.10.2018)
- (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 2017-196237 2017年10月6日(06.10.2017) JP
- (71) 出願人: 花王株式会社 (**KAO CORPORATION**)
[JP/JP]; 〒1038210 東京都中央区日本橋茅場町一丁目14番10号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 川原 彰人 (**KAWAHARA, Akihito**);
〒6408580 和歌山県和歌山県和歌山市湊1334
4 花王株式会社研究所内 Wakayama (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人イイダアンドパートナーズ,
外(**IIDA & PARTNERS et al.**); 〒1050004 東京都港区新橋3丁目1番10号石井ビル3階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY,

(54) **Title:** LIPID MANUFACTURING METHOD

(54) 発明の名称: 脂質の製造方法

(57) **Abstract:** A lipid manufacturing method wherein a transformant into which a gene coding for at least one protein selected from the group consisting of the following proteins (A)-(C) has been introduced is cultured and made to produce a fatty acid or a lipid that has said fatty acid as a constituent component. (A) A protein having acyl-ACP thioesterase activity and comprising an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 that has at least one amino acid substitution selected from the group consisting of the amino acid substitutions (A-1) to (A-11) below. (B) A protein having acyl-ACP thioesterase activity and comprising an amino acid sequence that has 85% or more identity with the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 and has at least one amino acid substitution selected from the group consisting of the amino acid substitutions (B-1) to (B-11) below. (C) A protein having acyl-ACP thioesterase activity and having the amino acid sequence of protein (A) or (B). (A-1) Isoleucine is substituted for leucine in the 257th place of SEQ ID NO: 1. (A-2) Arginine is substituted for threonine in the 251st place of SEQ ID NO: 1. (A-3) Lysine is substituted for threonine in the 251st place of SEQ ID NO: 1. (A-4) Histidine is substituted for threonine in the 251st place of SEQ ID NO: 1. (A-5) Isoleucine is substituted for tryptophan in the 254th place of SEQ ID NO: 1. (A-6) Tyrosine is substituted for tryptophan in the 254th place of SEQ ID NO: 1. (A-7) Methionine is substituted for leucine in the 257th place of SEQ ID NO: 1. (A-8) Valine is substituted for leucine in the 257th place of SEQ ID NO: 1. (A-9) Phenylalanine is substituted for leucine in the 257th place of SEQ ID NO: 1. (A-10) Cysteine is substituted for valine in the 266th place of SEQ ID NO: 1. (A-11) Tyrosine is substituted for tryptophan in the 271st place of SEQ ID NO: 1. (B-1) Isoleucine is substituted for the amino acid in the location corresponding to the 257th place of SEQ ID NO: 1. (B-2) Arginine is substituted for the amino acid in the location corresponding to the 251st place of SEQ ID NO: 1. (B-3) Lysine is substituted for the amino acid in the location corresponding to the 251st place of SEQ ID NO: 1. (B-4) Histidine is substituted for the amino acid in the location corresponding to the 251st place of SEQ ID NO: 1. (B-5) Isoleucine is substituted for the amino acid in the location corresponding to the 254th place of SEQ ID NO: 1. (B-6) Tyrosine is substituted for the amino acid in the location corresponding to the 254th place of SEQ ID NO: 1. (B-7) Methionine is substituted for the amino acid in the location



WO 2019/069969 A1

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.

添付公開書類：

- 一 国際調査報告（条約第21条(3)）
- 一 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)）

- (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).

corresponding to the 257th place of SEQ ID NO: 1. (B-8) Valine is substituted for the amino acid in the location corresponding to the 257th place of SEQ ID NO: 1. (B-9) Phenylalanine is substituted for the amino acid in the location corresponding to the 257th place of SEQ ID NO: 1. (B-10) Cysteine is substituted for the amino acid in the location corresponding to the 266th place of SEQ ID NO: 1. (B-11) Tyrosine is substituted for the amino acid in the location corresponding to the 271st place of SEQ ID NO: 1.

(57) 要約：下記タンパク質（A）～（C）からなる群より選ばれる少なくとも1つのタンパク質をコードする遺伝子を導入した形質転換体を培養し、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で示されるアミノ酸配列において、下記（A-1）～（A-11）からなる群より選ばれる少なくとも1つのアミノ酸置換を有するアミノ酸配列からなり、かつアシル-ACPチオエステラーゼ活性を有するタンパク質。(B) 配列番号1で示されるアミノ酸配列と同一性が85%以上のアミノ酸配列において、下記（B-1）～（B-11）からなる群より選ばれる少なくとも1つのアミノ酸置換を有するアミノ酸配列からなり、かつアシル-ACPチオエステラーゼ活性を有するタンパク質。(C) 前記タンパク質（A）又は（B）のアミノ酸配列を有し、かつアシル-ACPチオエステラーゼ活性を有するタンパク質。(A-1) 配列番号1の257位のロイシンがイソロイシンに置換。(A-2) 配列番号1の251位のスレオニンがアルギニンに置換。(A-3) 配列番号1の251位のスレオニンがリジンに置換。(A-4) 配列番号1の251位のスレオニンがヒスチジンに置換。(A-5) 配列番号1の254位のトリプトファンがイソロイシンに置換。(A-6) 配列番号1の254位のトリプトファンがチロシンに置換。(A-7) 配列番号1の257位のロイシンがメチオニンに置換。(A-8) 配列番号1の257位のロイシンがバリンに置換。(A-9) 配列番号1の257位のロイシンがフェニルアラニンに置換。(A-10) 配列番号1の266位のバリンがシステインに置換。(A-11) 配列番号1の271位のトリプトファンがチロシンに置換。(B-1) 配列番号1の257位に相当する位置のアミノ酸がイソロイシンに置換。(B-2) 配列番号1の251位に相当する位置のアミノ酸がアルギニンに置換。(B-3) 配列番号1の251位に相当する位置のアミノ酸がリジンに置換。(B-4) 配列番号1の251位に相当する位置のアミノ酸がヒスチジンに置換。(B-5) 配列番号1の254位に相当する位置のアミノ酸がイソロイシンに置換。(B-6) 配列番号1の254位に相当する位置のアミノ酸がチロシンに置換。(B-7) 配列番号1の257位に相当する位置のアミノ酸がメチオニンに置換。(B-8) 配列番号1の257位に相当する位置のアミノ酸がバリンに置換。(B-9) 配列番号1の257位に相当する位置のアミノ酸がフェニルアラニンに置換。(B-10) 配列番号1の266位に相当する位置のアミノ酸がシステインに置換。(B-11) 配列番号1の271位に相当する位置のアミノ酸がチロシンに置換。

明 細 書

発明の名称： 脂質の製造方法

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-ACPチオエステラーゼ改変体、これをコードする遺伝子、及び該遺伝子を導入した形質転換体に関する。

背景技術

[0002] 脂肪酸は脂質の主要構成成分の1つであり、生体内においてグリセリンとのエステル結合により生成するトリアシルグリセロール等の脂質（油脂）を構成する。また、多くの動植物において脂肪酸はエネルギー源として貯蔵され利用される物質でもある。動植物内に蓄えられた脂肪酸や脂質は、食用又は工業用として広く利用されている。

例えば、炭素原子数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級アンモニウム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。

また、炭素原子数が8や10の中鎖脂肪酸は、健康食品への利用や、エッチング剤に利用されている。また炭素原子数が8や10の中鎖脂肪酸を還元して得られるアルコール誘導体は、化粧品や、界面活性剤、可塑剤などの工業用原料としても利用されている。

[0003] このように脂肪酸や脂質の利用は多岐にわたる。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原子数に依存するため、脂肪酸の炭素原子数、即ち鎖長を制御する試みも行われている。

例えば、ゲツケイジュ (*Umbellularia californica* (California bay)) 由来のアシル-ACP (アシルキャリアプロテイン) チオエステラーゼ (以下単に、「TE」ともいう) をコードする遺伝子を宿主に導入することにより、炭素原子数 12 の脂肪酸を蓄積させる方法 (特許文献 1、非特許文献 1) 等が提案されている。

また、クフェア・パルストリス (*Cuphea palustris*) やクフェア・フッカーリアナ (*Cuphea hookeriana*) などのクフェア (*Cuphea*) 属に属する植物由来のTEをコードする遺伝子を宿主に導入することにより、得られた形質転換体における炭素原子数が 8 又は 10 の中鎖脂肪酸の生産性が向上することが知られている。そして、特許文献 2 及び 3 には、配列番号 48 で示されるアミノ酸配列からなるクフェア・パルストリス由来の野生型TEからN末側のシグナル配列を削除したアミノ酸配列 (配列番号 1)、若しくは配列番号 1 で示されるアミノ酸配列と同一性の高いアミノ酸配列において、172位~221位若しくはこれらに相当する位置で特定のアミノ酸置換を行ったTE改変体が開示されている。そして、このようなTE改変体をコードする遺伝子を大腸菌やシアノバクテリアなどの宿主に導入することで、炭素原子数が 8 又は 10 の中鎖脂肪酸の生産性が向上することが記載されている。

[0004] 近年、太陽光やバイオマスなどの再生可能エネルギー源を利用し、シアノバクテリアや大腸菌を培養することで脂肪酸を含むバイオケミカルスを生産する方法が注目されている。例えば、シアノバクテリアを用いて生産されるバイオ燃料として、エタノール (非特許文献 2)、イソブタノール (非特許文献 3)、脂肪酸 (非特許文献 4) などが報告されている。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：国際公開第92／20236号

特許文献2：米国特許第5,955,329号明細書

特許文献3：米国特許出願公開第2011／0020883号明細書

非特許文献

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

非特許文献2：Appl. Environ. Microbiol., 1999, 65:523-528

非特許文献3：Nat. Biotechnol., 2009, vol. 27, p. 1177-1180

非特許文献4：Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 2011, vol. 108(17), p. 6899-6904

発明の概要

[0007] 本発明は、下記タンパク質（A）～（C）からなる群より選ばれる少なくとも1つのタンパク質をコードする遺伝子を導入した形質転換体を培養し、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で示されるアミノ酸配列において、下記（A-1）～（A-11）からなる群より選ばれる少なくとも1つのアミノ酸置換を有するアミノ酸配列からなり、かつアシル-ACPチオエステラーゼ活性を有するタンパク質。

（B）配列番号1で示されるアミノ酸配列と同一性が85%以上のアミノ酸配列において、下記（B-1）～（B-11）からなる群より選ばれる少なくとも1つのアミノ酸置換を有するアミノ酸配列からなり、かつアシル-ACPチオエステラーゼ活性を有するタンパク質。

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

（A-1）配列番号1の257位のロイシンがイソロイシンに置換。

（A-2）配列番号1の251位のスレオニンがアルギニンに置換。

- (A-3) 配列番号1の251位のスレオニンがリジンに置換。
- (A-4) 配列番号1の251位のスレオニンがヒスチジンに置換。
- (A-5) 配列番号1の254位のトリプトファンがイソロイシンに置換。
- (A-6) 配列番号1の254位のトリプトファンがチロシンに置換。
- (A-7) 配列番号1の257位のロイシンがメチオニンに置換。
- (A-8) 配列番号1の257位のロイシンがバリンに置換。
- (A-9) 配列番号1の257位のロイシンがフェニルアラニンに置換。
- (A-10) 配列番号1の266位のバリンがシステインに置換。
- (A-11) 配列番号1の271位のトリプトファンがチロシンに置換。
- (B-1) 配列番号1の257位に相当する位置のアミノ酸がイソロイシンに置換。
- (B-2) 配列番号1の251位に相当する位置のアミノ酸がアルギニンに置換。
- (B-3) 配列番号1の251位に相当する位置のアミノ酸がリジンに置換。
- 。
- (B-4) 配列番号1の251位に相当する位置のアミノ酸がヒスチジンに置換。
- (B-5) 配列番号1の254位に相当する位置のアミノ酸がイソロイシンに置換。
- (B-6) 配列番号1の254位に相当する位置のアミノ酸がチロシンに置換。
- (B-7) 配列番号1の257位に相当する位置のアミノ酸がメチオニンに置換。
- (B-8) 配列番号1の257位に相当する位置のアミノ酸がバリンに置換。
- 。
- (B-9) 配列番号1の257位に相当する位置のアミノ酸がフェニルアラニンに置換。
- (B-10) 配列番号1の266位に相当する位置のアミノ酸がシステイン

に置換。

(B-11) 配列番号1の271位に相当する位置のアミノ酸がチロシンに置換。

[0008] また本発明は、前記タンパク質(A)～(C)からなる群より選ばれる少なくとも1つのタンパク質をコードする遺伝子を導入した形質転換体を培養し、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、脂質の製造方法に関する。

また本発明は、前記タンパク質(A)～(C)からなる群より選ばれる少なくとも1つのタンパク質をコードする遺伝子を導入した形質転換体を培養し、形質転換体の細胞内で生産される全脂肪酸に占める中鎖脂肪酸の割合を増加させる、脂肪酸組成を改変する方法に関する。

[0009] また本発明は、前記タンパク質(A)～(C)に関する。

また本発明は、前記タンパク質(A)～(C)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)～(C)をコードする遺伝子を含んでなる、形質転換体に関する。

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

発明の詳細な説明

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

また本発明は、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、前記方法に好適に用いることができる形質転換体の提供に関する。

さらに本発明は、前記方法及び形質転換体の使用に好適な、新規TE改変体及びこれをコードする遺伝子の提供に関する。

[0011] 特許文献2及び3などでも報告されているように、クフェア属に属する植物由来のTEをコードする遺伝子を導入した大腸菌やシアノバクテリアなどの形質転換体を用いた中鎖脂肪酸の生産においても、脂肪酸の生産量の向上が

試みられている。

本発明者はこのような技術に関して、中鎖脂肪酸の生産性を向上させるためにクフェア属に属する植物由来の野生型のTEにアミノ酸置換を導入する部位に着目し、検討を行った。その結果、特許文献2及び3などで開示されている部位とは異なる部位でアミノ酸置換を行ったTE改変体の利用が、中鎖脂肪酸の生産に有効であることを見出した。

本発明はこれらの知見に基づいて完成するに至ったものである。

[0012] 本発明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に優れる。

さらに本発明のアシル-ACPチオエステラーゼ改変体、及びこれをコードする遺伝子は、中鎖脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質の生産に好適に用いることができる。

[0013] 本明細書における「脂質」は、中性脂質（モノアシルグリセロール（MAG）、ジアシルグリセロール（DAG）、トリアシルグリセロール（TAG）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（遊離脂肪酸）、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。

一般に誘導脂質に分類される脂肪酸は、脂肪酸そのものを指し、「遊離脂肪酸」を意味する。本発明では単純脂質及び複合脂質分子中の脂肪酸部分又はアシル基の部分「脂肪酸残基」と表記する。そして、特に断りのない限り、「脂肪酸」は「遊離脂肪酸」と「脂肪酸残基」の総称として用いる。

また本明細書において、「脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質」は、「遊離脂肪酸」と「当該脂肪酸残基を有する脂質」を総称して用いる。更に本明細書において、「脂肪酸組成」とは、前記遊離脂肪酸と脂肪酸残基を脂肪酸と見做して合計した全脂肪酸（総脂肪酸）の重量に対する各脂肪酸の重量割合を意味する。脂肪酸の重量（生産量）や脂肪酸組成は、実施例で用いた

方法により測定できる。

[0014] 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「C_x: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。「C_x」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「ストリンジेंटな条件」としては、例えばMolecular Cloning-A LABORATORY MANUAL THIRD EDITION [Joseph Sambrook, David W. Russell., Cold Spring Harbor Laboratory Press] 記載の方法が挙げられる。例えば、6×SSC (1×SSCの組成: 0.15M塩化ナトリウム、0.015Mクエン酸ナトリウム、pH7.0)、0.5%SDS、5×デンハート及び100mg/mLニシン精子DNAを含む溶液にプローブとともに65℃で8~16時間恒温し、ハイブリダイズさせる条件が挙げられる。

さらに本明細書において、遺伝子の「上流」とは、翻訳開始点からの位置ではなく、対象として捉えている遺伝子又は領域の5'側に続く領域を示す。一方、遺伝子の「下流」とは、対象として捉えている遺伝子又は領域の3'側に続く領域を示す。

[0015] 配列番号1で示されるアミノ酸配列は、配列番号48で示されるアミノ酸配列からなるクフェア・パルストリス由来の野生型のTEのアミノ酸配列の一部である。配列番号1で示されるアミノ酸配列では、野生型のTEのアミノ酸配列の全長から、シグナル配列 (配列番号48の2位~57位のアミノ酸配列) と推定される部位が除かれている。すなわち配列番号1で示されるアミノ酸配列は、配列番号48で示されるアミノ酸配列から1位~57位のアミノ酸が除かれ、58位のアミノ酸のN末端にタンパク質合成開始アミノ酸 (

メチオニン)が付加されている。クフェア属に属する植物由来のTEは、炭素原子数が8又は10の中鎖アシル-ACPに対する基質特異性が高く、形質転換体における炭素原子数が8又は10の中鎖脂肪酸の生産性の向上に好適に用いられる。

本発明では、炭素原子数が8又は10の中鎖アシル-ACPに対する基質特異性を有するクフェア・パルストリス由来の野生型のTEに対して、前記(A-1)~(A-11)並びに(B-1)~(B-11)のいずれかのアミノ酸置換を行う。このようなアミノ酸置換を行った本発明のTE改変体は、野生型のTEと比較して、中鎖アシル-ACPに対する基質特異性がより向上する。そして、本発明のTE改変体をコードする遺伝子を導入した形質転換体は、中鎖脂肪酸の生産性に優れる。

なお、本明細書において、クフェア・パルストリス由来の野生型のTEと、これにアミノ酸変異を施したTE改変体をまとめて、「CpTE」ともいう。

[0016] 特許文献2及び3は、CpTEのアミノ酸配列(配列番号1で示されるアミノ酸配列)において、172位~221位の領域でアミノ酸置換を行うと、TE改変体の、中鎖アシル-ACPに対する基質特異性が向上することを開示している。

これに対して、本発明では前記(A-1)~(A-11)並びに(B-1)~(B-11)で規定しているように、特許文献2及び3に開示の部位とは異なる部位でのアミノ酸置換を行う。

[0017] 本発明の形質転換体は、前記タンパク質(A)~(C)からなる群より選ばれた少なくとも1つのタンパク質(アシル-ACPチオエステラーゼ改変体)をコードする遺伝子が導入され、その発現が促進されている。本発明の形質転換体を培養することで、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が向上する。

前記アシル-ACPチオエステラーゼ改変体(以下、「TE改変体」ともいう)は、配列番号1で示されるアミノ酸配列の一部を改変したアミノ酸配列を有し、かつアシル-ACPチオエステラーゼ活性(以下、「TE活性」ともいう)を

有するタンパク質である。

なお、本明細書において「中鎖」とは、アシル基の炭素原子数が8以上10以下、好ましくは炭素原子数が8又は10であることをいう。また、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。

[0018] 配列番号1で示されるアミノ酸配列は、配列番号48で示されるアミノ酸配列のN末側から2位～57位のアミノ酸配列を除いたものであり、配列番号48で示されるアミノ酸配列の1位、並びに58位～411位のアミノ酸配列に対応する。ここで、配列番号48は、クフェア・パルストリス由来の野生型のTEのアミノ酸配列である。配列番号48のアミノ酸配列中58位～411位の領域が、TEとして機能するために重要で、TE活性を示すために十分な領域であることが知られている。すなわち、配列番号1で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質は、TE活性にとって十分な領域を有するため、TE活性を有し、TEとして機能する。

TEは、脂肪酸やその誘導体（トリアシルグリセロール（トリグリセリド）等）の生合成系に関与する酵素である。当該酵素は、植物体や藻類では葉緑体等の色素体内において、細菌や真菌、動物体では細胞質内において、脂肪酸生合成過程の中間体であるアシル-ACP（脂肪酸残基であるアシル基とアシルキャリアプロテインとからなる複合体）のチオエステル結合を加水分解し、遊離の脂肪酸を生成する。TEの作用によって、ACP上での脂肪酸合成が終了し、切り出された脂肪酸はトリアシルグリセロール等の合成に供される。TEには、基質であるアシル-ACPを構成するアシル基（脂肪酸残基）の炭素原子数や不飽和結合数によって異なる反応特異性を示す複数のTEが存在していることが知られており、生体内での脂肪酸組成を決める重要なファクターであると考えられている。

本明細書において、「TE活性」とは、アシル-ACPのチオエステル結合を加水分解する活性をいう。

[0019] 前記タンパク質（A）のアミノ酸配列は、配列番号1で示されるアミノ酸

配列を基本とし、当該アミノ酸配列中の特定の位置のアミノ酸が、前記（A-1）～（A-11）のいずれかで示すように置換されている。

[0020] タンパク質（A）として規定するTE改変体では、中鎖アシル-ACPに対する特異性が向上する。すなわちタンパク質（A）のTE改変体は、野生型のTEと比較して、基質として中鎖アシル-ACPを選択的に利用し、これを加水分解する活性が向上する。

中鎖アシル-ACPへの特異性を向上させ、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観点から、タンパク質（A）のアミノ酸配列は、前記（A-1）のアミノ酸置換を有することが好ましい。

[0021] 本明細書においては、アミノ酸置換を有するTE改変体を下記に示すように略記することがある。

CpTE(L257I)又はL257I：配列番号1の257位のロイシン（L）がイソロイシン（I）に置換されたTE改変体。

CpTE(T251R)又はT251R：配列番号1の251位のスレオニン（T）がアルギニン（R）に置換されたTE改変体。

CpTE(T251K)又はT251K：配列番号1の251位のスレオニン（T）がリジン（K）に置換されたTE改変体。

CpTE(T251H)又はT251H：配列番号1の251位のスレオニン（T）がヒスチジン（H）に置換されたTE改変体。

CpTE(W254I)又はW254I：配列番号1の254位のトリプトファン（W）がイソロイシン（I）に置換。

CpTE(W254Y)又はW254Y：配列番号1の254位のトリプトファン（W）がチロシン（Y）に置換されたTE改変体。

CpTE(L257M)又はL257M：配列番号1の257位のロイシン（L）がメチオニン（M）に置換されたTE改変体。

CpTE(L257V)又はL257V：配列番号1の257位のロイシン（L）がバリン（V）に置換されたTE改変体。

CpTE(L257F)又はL257F：配列番号1の257位のロイシン(L)がフェニルアラニン(F)に置換されたTE改変体。

CpTE(V266C)又はV266C：配列番号1の266位のバリン(V)がシステイン(C)に置換。

CpTE(W271Y)又はW271Y：配列番号1の271位のトリプトファン(W)がチロシン(Y)に置換されたTE改変体。

[0022] 前記タンパク質(A)は、(A-1)～(A-11)からなる群より選ばれる少なくとも1つのアミノ酸置換に加えて、下記(D-1)～(D-8)からなる群より選ばれる少なくとも1つのアミノ酸置換を有することが好ましい。これらのアミノ酸置換を有する場合、中鎖アシル-ACPへの特異性と、中鎖脂肪酸若しくはこれを構成成分とする脂質の生産性が、一層向上する。

本発明において、前記タンパク質(A)は、(A-1)のアミノ酸置換、並びに下記(D-1)～(D-8)からなる群より選ばれる少なくとも1つのアミノ酸置換を有することがより好ましく、(A-1)のアミノ酸置換、並びに下記(D-1)～(D-8)からなる群より選ばれる1つのアミノ酸置換を有することがより好ましい。

(D-1) 配列番号1の106位のバリンがイソロイシンに置換。

(D-2) 配列番号1の108位のアスパラギンがリジンに置換。

(D-3) 配列番号1の108位のアスパラギンがアルギニンに置換。

(D-4) 配列番号1の110位のバリンがイソロイシンに置換。

(D-5) 配列番号1の110位のバリンがメチオニンに置換。

(D-6) 配列番号1の110位のバリンがロイシンに置換。

(D-7) 配列番号1の110位のバリンがフェニルアラニンに置換。

(D-8) 配列番号1の118位のシステインがイソロイシンに置換。

[0023] 本明細書において、前記(D-1)～(D-8)のアミノ酸置換を、下記のように略記することがある。

V106I : 配列番号1の106位のバリン(V)がイソロイシン(I)に置換。

N108K : 配列番号1の108位のアスパラギン(N)がリジン(K)に置換。

N108R : 配列番号1の108位のアスパラギン(N)がアルギニン(R)に置換。

V110I : 配列番号1の110位のバリン(V)がイソロイシン(I)に置換。

V110M : 配列番号1の110位のバリン(V)がメチオニン(M)に置換。

V110L : 配列番号1の110位のバリン(V)がロイシン(L)に置換。

V110F : 配列番号1の110位のバリン(V)がフェニルアラニン(F)に置換。

C118I : 配列番号1の118位のシステイン(C)がイソロイシン(I)に置換。

[0024] 本発明において前記タンパク質(A)は、下記(A-1__D-1)~(A-1__D-8)からなる群より選ばれるアミノ酸置換を有することがより好ましい。

(A-1__D-1) 配列番号1の257位のロイシンがイソロイシンに、106位のバリンがイソロイシンに、それぞれ置換。

(A-1__D-2) 配列番号1の257位のロイシンがイソロイシンに、108位のアスパラギンがリジンに置換。

(A-1__D-3) 配列番号1の257位のロイシンがイソロイシンに、108位のアスパラギンがアルギニンに、それぞれ置換。

(A-1__D-4) 配列番号1の257位のロイシンがイソロイシンに、110位のバリンがイソロイシンに、それぞれ置換。

(A-1__D-5) 配列番号1の257位のロイシンがイソロイシンに、110位のバリンがメチオニンに、それぞれ置換。

(A-1__D-6) 配列番号1の257位のロイシンがイソロイシンに、110位のバリンがロイシンに、それぞれ置換。

(A-1__D-7) 配列番号1の257位のロイシンがイソロイシンに、1

10位のバリンがフェニルアラニンに、それぞれ置換。

(A-1__D-8) 配列番号1の257位のロイシンがイソロイシンに、118位のシステインがイソロイシンに、それぞれ置換。

[0025] タンパク質(B)は、配列番号1で示されるアミノ酸配列と同一性が85%以上のアミノ酸配列を基本とし、かつ、TE活性を有する。タンパク質(B)もタンパク質(A)と同様、中鎖アシル-ACPへの特異性が向上する。

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

[0026] 前記タンパク質(B)において、TE活性の点から、配列番号1で示されるアミノ酸配列との同一性は85%以上であり、90%以上がより好ましく、92%以上がより好ましく、93%以上がより好ましく、94%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%以上がより好ましい。

また、前記タンパク質(B)として、配列番号1で示されるアミノ酸配列に、1又は複数個(例えば1個以上53個以下、好ましくは1個以上35個以下、より好ましくは1個以上28個以下、より好ましくは1個以上24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14個以下、より好ましくは1個以上10個以下、より好ましくは1個以上7個以下、より好ましくは1個以上3個以下)のアミノ酸を欠失、置換、挿入又は付加し、かつTE活性を有するタンパク質が挙げられる。なお、これらのアミノ酸変異は、前記アミノ酸置換(B-1)～(B-11)とは異なる。

[0027] さらに、タンパク質（B）のアミノ酸配列は、配列番号1で示されるアミノ酸配列と同一性が85%以上のアミノ酸配列中に、タンパク質（A）におけるアミノ酸置換と同様のアミノ酸置換を有している。すなわち、タンパク質（B）のアミノ酸配列は少なくとも、前記（B-1）～（B-11）からなる群より選ばれる少なくとも1つのアミノ酸置換を有する。

ここで、配列番号1の251位に相当する位置のアミノ酸は、好ましくは又は通常、スレオニンである。配列番号1の254位に相当する位置のアミノ酸は、好ましくは又は通常、トリプトファンである。配列番号1の257位に相当する位置のアミノ酸は、好ましくは又は通常、ロイシンである。配列番号1の266位に相当する位置のアミノ酸は、好ましくは又は通常、バリンである。さらに、配列番号1の271位に相当する位置のアミノ酸は、好ましくは又は通常、トリプトファンである。

[0028] 上述したタンパク質（A）と同様、タンパク質（B）のアミノ酸配列も、前記（B-1）のアミノ酸置換を有することが好ましい。

[0029] 前記タンパク質（B）は、（B-1）～（B-11）からなる群より選ばれる少なくとも1つのアミノ酸置換に加えて、下記（E-1）～（E-8）からなる群より選ばれる少なくとも1つのアミノ酸置換を有することが好ましい。これらのアミノ酸置換を有する場合、中鎖アシル-ACPへの特異性と、中鎖脂肪酸若しくはこれを構成成分とする脂質の生産性が、一層向上する。

本発明において、前記タンパク質（B）は、（B-1）のアミノ酸置換、並びに下記（E-1）～（E-8）からなる群より選ばれる少なくとも1つのアミノ酸置換を有することがより好ましく、（B-1）のアミノ酸置換、並びに下記（E-1）～（E-8）からなる群より選ばれる1つのアミノ酸置換を有することがより好ましい。

（E-1）配列番号1の106位に相当する位置のアミノ酸がイソロイシンに置換。

（E-2）配列番号1の108位に相当する位置のアミノ酸がリジンに置換

。

(E-3) 配列番号1の108位に相当する位置のアミノ酸がアルギニンに置換。

(E-4) 配列番号1の110位に相当する位置のアミノ酸がイソロイシンに置換。

(E-5) 配列番号1の110位に相当する位置のアミノ酸がメチオニンに置換。

(E-6) 配列番号1の110位に相当する位置のアミノ酸がロイシンに置換。

(E-7) 配列番号1の110位に相当する位置のアミノ酸がフェニルアラニンに置換。

(E-8) 配列番号1の118位に相当する位置のアミノ酸がイソロイシンに置換。

ここで、配列番号1の106位に相当する位置のアミノ酸は、好ましくは又は通常、バリンである。配列番号1の108位に相当する位置のアミノ酸は、好ましくは又は通常、アスパラギンである。配列番号1の110位に相当する位置のアミノ酸は、好ましくは又は通常、バリンである。さらに、配列番号1の118位に相当する位置のアミノ酸は、好ましくは又は通常、システインである。

[0030] 本発明において前記タンパク質(B)は、下記(B-1__E-1)～(B-1__E-8)からなる群より選ばれるアミノ酸置換を有することがより好ましい。

(B-1__E-1) 配列番号1の257位に相当する位置のアミノ酸(好ましくは又は通常、ロイシン)がイソロイシンに、106位に相当する位置のアミノ酸(好ましくは又は通常、バリン)がイソロイシンに、それぞれ置換

。

(B-1__E-2) 配列番号1の257位に相当する位置のアミノ酸（好ましくは又は通常、ロイシン）がイソロイシンに、108位に相当する位置のアミノ酸（好ましくは又は通常、アスパラギン）がリジンに、それぞれ置換。

(B-1__E-3) 配列番号1の257位に相当する位置のアミノ酸（好ましくは又は通常、ロイシン）がイソロイシンに、108位に相当する位置のアミノ酸（好ましくは又は通常、アスパラギン）がアルギニンに、それぞれ置換。

(B-1__E-4) 配列番号1の257位に相当する位置のアミノ酸（好ましくは又は通常、ロイシン）がイソロイシンに、110位に相当する位置のアミノ酸（好ましくは又は通常、バリン）がイソロイシンに、それぞれ置換。

(B-1__E-5) 配列番号1の257位に相当する位置のアミノ酸（好ましくは又は通常、ロイシン）がイソロイシンに、110位に相当する位置のアミノ酸（好ましくは又は通常、バリン）がメチオニンに、それぞれ置換。

(B-1__E-6) 配列番号1の257位に相当する位置のアミノ酸（好ましくは又は通常、ロイシン）がイソロイシンに、110位に相当する位置のアミノ酸（好ましくは又は通常、バリン）がロイシンに、それぞれ置換。

(B-1__E-7) 配列番号1の257位に相当する位置のアミノ酸（好ましくは又は通常、ロイシン）がイソロイシンに、110位に相当する位置のアミノ酸（好ましくは又は通常、バリン）がフェニルアラニンに、それぞれ置換。

(B-1__E-8) 配列番号1の257位に相当する位置のアミノ酸（好ましくは又は通常、ロイシン）がイソロイシンに、118位に相当する位置のアミノ酸（好ましくは又は通常、システイン）がイソロイシンに、それぞれ置換。

[0031] アミノ酸配列または塩基配列における「相当する位置」または「相当する領域」は、目的アミノ酸配列を参照配列と比較し、各アミノ酸配列中に存在

する保存アミノ酸残基に最大の相同性を与えるように配列を整列（アラインメント）させることにより決定することができる。アラインメントは、公知のアルゴリズムを用いて実行することができ、その手順は当業者に公知である。例えば、アラインメントは、上述のリップマン-パーソン法等に基づいて手作業で行うこともできるが、Clustal Wマルチプルアラインメントプログラム（Nucleic Acids Res., 1994, vol. 22, p. 4673-4680）をデフォルト設定で用いることにより行うことができる。Clustal Wは、例えば、欧州バイオインフォマティクス研究所（European Bioinformatics Institute:EBI, [www.ebi.ac.uk/index.html]）や、国立遺伝学研究所が運営する日本DNAデータバンク（DDBJ, [www.ddbj.nig.ac.jp/Welcome-j.html]）のウェブサイト上で利用することができる。

[0032] 前記タンパク質（C）は、そのアミノ酸配列の一部として前記タンパク質（A）又は（B）のアミノ酸配列を含んでおり、かつTE活性を示す。なお、前記タンパク質（C）のN末端のアミノ酸は、開始コドンでコードされるメチオニン又はロイシンであることが好ましい。

前記タンパク質（C）を構成するアミノ酸配列中、前記タンパク質（A）又は（B）のアミノ酸配列以外の配列としては、本発明の効果を損なわない範囲で適宜選択することができる。例えば、配列番号48の1位～57位の任意の位置範囲からなるアミノ酸配列、又はこのアミノ配列に1個又は数個（好ましくは1個以上20個以下、より好ましくは1個以上15個以下、より好ましくは1個以上10個以下、より好ましくは1個以上5個以下、より好ましくは1個以上3個以下）の変異が導入されたアミノ酸配列、等が挙げられる。変異としては、アミノ酸の欠失、置換、挿入又は付加が挙げられる。これらの配列は、前記タンパク質（A）又は（B）のアミノ酸配列のN末側に付加されることが好ましい。

あるいは、前記タンパク質（C）として、配列番号48に示すアミノ酸配列において、配列番号48の2位～57位の任意の位置でN末側が欠失したアミノ酸配列からなるタンパク質であってもよい。また、前記タンパク質（

C)として、前記タンパク質(A)又は(B)のアミノ酸配列に、タンパク質の輸送や分泌に関与するシグナルペプチドが付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質も好ましい。

[0033] 前記タンパク質が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前記タンパク質をコードする遺伝子を連結した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。この時、総脂肪酸量に占める中鎖脂肪酸の割合を、野生型TEを発現させた系と比較することで、中鎖アシル-ACPに対する特異性が向上していることを確認できる。

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を宿主細胞へ導入し、導入した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(Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1995, vol. 92(23), p. 10639-10643)によって調製した各種アシル-ACPを基質とした反応を行うことにより、TE活性を測定することができる。

[0034] 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、OD A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™ 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。

[0035] 前記タンパク質(A)～(C)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、クフェア・パルストリスから単離、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)～(C)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)～(C)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TE遺伝子を用いることができる。

なお、クフェア・パルストリス等の植物は、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。

[0036] 前記タンパク質(A)～(C)からなる群より選ばれる少なくとも1つのタンパク質をコードする遺伝子(以下、「TE改変体遺伝子」又は「CpTE改変体遺伝子」ともいう)として、下記DNA(a)～(c)のいずれか1つからなる遺伝子が挙げられる。ここで、下記に示す配列番号2に示す塩基配列からなるDNAは、配列番号2で示される塩基配列は、配列番号1で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質(クフェア・パルストリス由来の野生型TE)をコードする。なお、前述のシグナル配列(配列番号48の1位～57位のアミノ酸配列)をコードする塩基配列は、配列番号49の1～171位に相当する。

(a) 配列番号2で示される塩基配列において、下記(a-1)～(a-11)からなる群より選ばれる少なくとも1つの塩基置換を有する塩基配列からなり、かつTE活性を有するタンパク質をコードするDNA。

(b) 配列番号2で示される塩基配列と同一性が70%以上の塩基配列において、下記(b-1)～(b-11)からなる群より選ばれる少なくとも1つの塩基置換を有する塩基配列からなり、かつTE活性を有するタンパク質をコードするDNA。

(c) 前記DNA(a)又は(b)の塩基配列(好ましくは、開始コドンを除いた前記DNA(a)又は(b)の塩基配列)を有し、かつTE活性を有す

るタンパク質をコードするDNA。

(a-1) 配列番号2の769位~771位の塩基がイソロイシンをコードする塩基に置換。

(a-2) 配列番号2の751位~753位の塩基がアルギニンをコードする塩基に置換。

(a-3) 配列番号2の751位~753位の塩基がリジンをコードする塩基に置換。

(a-4) 配列番号2の751位~753位の塩基がヒスチジンをコードする塩基に置換。

(a-5) 配列番号2の760位~762位の塩基がイソロイシンをコードする塩基に置換。

(a-6) 配列番号2の760位~762位の塩基がチロシンをコードする塩基に置換。

(a-7) 配列番号2の769位~771位の塩基がメチオニンをコードする塩基に置換。

(a-8) 配列番号2の769位~771位の塩基がバリンをコードする塩基に置換。

(a-9) 配列番号2の769位~771位の塩基がフェニルアラニンをコードする塩基に置換。

(a-10) 配列番号2の796位~798位の塩基がシステインをコードする塩基に置換。

(a-11) 配列番号2の811位~813位の塩基がチロシンをコードする塩基に置換。

(b-1) 配列番号2の769位~771位に相当する位置の塩基がイソロイシンをコードする塩基に置換。

(b-2) 配列番号2の751位~753位に相当する位置の塩基がアルギニンをコードする塩基に置換。

(b-3) 配列番号2の751位~753位に相当する位置の塩基がリジンをコードする塩基に置換。

(b-4) 配列番号2の751位~753位に相当する位置の塩基がヒスチジンをコードする塩基に置換。

(b-5) 配列番号2の760位~762位に相当する位置の塩基がイソロイシンをコードする塩基に置換。

(b-6) 配列番号2の760位~762位に相当する位置の塩基がチロシンをコードする塩基に置換。

(b-7) 配列番号2の769位~771位に相当する位置の塩基がメチオニンをコードする塩基に置換。

(b-8) 配列番号2の769位~771位に相当する位置の塩基がバリンをコードする塩基に置換。

(b-9) 配列番号2の769位~771位に相当する位置の塩基酸がフェニルアラニンをコードする塩基に置換。

(b-10) 配列番号2の796位~798位に相当する位置の塩基がシステインをコードする塩基に置換。

(b-11) 配列番号2の811位~813位に相当する位置の塩基がチロシンをコードする塩基に置換。

[0037] DNA (a) の塩基配列は、タンパク質 (A) のアミノ酸配列が有するアミノ酸置換に相当する塩基置換を有する。具体的には、塩基置換 (a-1)、(a-2)、(a-3)、(a-4)、(a-5)、(a-6)、(a-7)、(a-8)、(a-9)、(a-10) 及び (a-11) はそれぞれ、前記アミノ酸置換 (A-1)、(A-2)、(A-3)、(A-4)、(A-5)、(A-6)、(A-7)、(A-8)、(A-9)、(A-10) 及び (A-11) に対応する。

DNA (b) の塩基配列も同様に、タンパク質 (B) のアミノ酸配列が有するアミノ酸置換に相当する塩基置換を有する。具体的には、塩基置換 (b-1)、(b-2)、(b-3)、(b-4)、(b-5)、(b-6)、

(b-7)、(b-8)、(b-9)、(b-10)及び(b-11)はそれぞれ、前記アミノ酸置換(B-1)、(B-2)、(B-3)、(B-4)、(B-5)、(B-6)、(B-7)、(B-8)、(B-9)、(B-10)及び(B-11)に対応する。

[0038] 前記DNA(a)は、(a-1)～(a-11)からなる群より選ばれる少なくとも1つの塩基置換に加えて、下記(d-1)～(d-8)からなる群より選ばれる少なくとも1つの塩基置換を有することが好ましい。本発明において前記DNA(a)は、(a-1)の塩基置換、並びに下記(d-1)～(d-8)からなる群より選ばれる少なくとも1つの塩基置換、を有することがより好ましい。

(d-1) 配列番号2の316位～318位の塩基がイソロイシンをコードする塩基に置換。

(d-2) 配列番号2の322位～324位の塩基がリジンをコードする塩基に置換。

(d-3) 配列番号2の322位～324位の塩基がアルギニンをコードする塩基に置換。

(d-4) 配列番号2の328位～330位の塩基がイソロイシンをコードする塩基に置換。

(d-5) 配列番号2の328位～330位の塩基がメチオニンをコードする塩基に置換。

(d-6) 配列番号2の328位～330位の塩基がロイシンをコードする塩基に置換。

(d-7) 配列番号2の328位～330位の塩基がフェニルアラニンをコードする塩基に置換。

(d-8) 配列番号2の352位～354位の塩基がイソロイシンをコードする塩基に置換。

[0039] 本発明において前記DNA(a)は、下記(a-1__d-1)～(a-1

__d-8) からなる群より選ばれる塩基置換を有することがより好ましい。

(a-1__d-1) 配列番号2の769位~771位の塩基がイソロイシンをコードする塩基に、316位~318位の塩基がイソロイシンをコードする塩基に、それぞれ置換。

(a-1__d-2) 配列番号2の769位~771位の塩基がイソロイシンをコードする塩基に322位~324位の塩基がリジンをコードする塩基に、それぞれ置換。

(a-1__d-3) 配列番号2の769位~771位の塩基がイソロイシンをコードする塩基に322位~324位の塩基がアルギニンをコードする塩基に、それぞれ置換。

(a-1__d-4) 配列番号2の769位~771位の塩基がイソロイシンをコードする塩基に328位~330位の塩基がイソロイシンをコードする塩基に、それぞれ置換。

(a-1__d-5) 配列番号2の769位~771位の塩基がイソロイシンをコードする塩基に328位~330位の塩基がメチオニンをコードする塩基に、それぞれ置換。

(a-1__d-6) 配列番号2の769位~771位の塩基がイソロイシンをコードする塩基に328位~330位の塩基がロイシンをコードする塩基に、それぞれ置換。

(a-1__d-7) 配列番号2の769位~771位の塩基がイソロイシンをコードする塩基に328位~330位の塩基がフェニルアラニンをコードする塩基に、それぞれ置換。

(a-1__d-8) 配列番号2の769位~771位の塩基がイソロイシンをコードする塩基に352位~354位の塩基がイソロイシンをコードする塩基に、それぞれ置換。

[0040] 前記DNA (b) において、TE活性の点から、配列番号2で示される塩基配列との同一性は70%以上であり、75%以上が好ましく、80%以上が

好ましく、85%以上がより好ましく、90%以上がより好ましく、92%以上がより好ましく、93%以上がより好ましく、94%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%以上がより好ましい。

また前記DNA (b) として、配列番号2で示される塩基配列において1又は複数個(例えば1個以上320個以下、好ましくは1個以上267個以下、より好ましくは1個以上213個以下、より好ましくは1個以上160個以下、より好ましくは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74個以下、より好ましくは1個以上64個以下、より好ましくは1個以上53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32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10個以下)の塩基が欠失、置換、挿入、又は付加されており、かつTE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。なお、これらの塩基配列の変異は、前記塩基置換(b-1)~(b-11)とは異なる。

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TE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。

[0041] 前記DNA (b) は、(b-1)~(b-11)からなる群より選ばれる少なくとも1つの塩基置換に加えて、下記(e-1)~(e-8)からなる群より選ばれる少なくとも1つの塩基置換を有することが好ましい。本発明において前記DNA (b) は、(b-1)の塩基置換、並びに下記(e-1)~(e-8)からなる群より選ばれる少なくとも1つの塩基置換、を有することがより好ましい。

(e-1) 配列番号2の316位~318位に相当する位置の塩基がイソロイシンをコードする塩基に置換。

(e-2) 配列番号2の322位~324位に相当する位置の塩基がリジン

をコードする塩基に置換。

(e-3) 配列番号2の322位~324位に相当する位置の塩基がアルギニンをコードする塩基に置換。

(e-4) 配列番号2の328位~330位に相当する位置の塩基がイソロイシンをコードする塩基に置換。

(e-5) 配列番号2の328位~330位に相当する位置の塩基がメチオニンをコードする塩基に置換。

(e-6) 配列番号2の328位~330位に相当する位置の塩基がロイシンをコードする塩基に置換。

(e-7) 配列番号2の328位~330位に相当する位置の塩基がフェニルアラニンをコードする塩基に置換。

(e-8) 配列番号2の352位~354位に相当する位置の塩基がイソロイシンをコードする塩基に置換。

[0042] 本発明において前記DNA (b) は、下記 (b-1__e-1) ~ (b-1__e-8) からなる群より選ばれる塩基置換を有することがより好ましい。

(b-1__e-1) 配列番号2の769位~771位に相当する位置の塩基がイソロイシンをコードする塩基に、316位~318位に相当する位置の塩基がイソロイシンをコードする塩基に、それぞれ置換。

(b-1__e-2) 配列番号2の769位~771位に相当する位置の塩基がイソロイシンをコードする塩基に、322位~324位に相当する位置の塩基がリジンをコードする塩基に、それぞれ置換。

(b-1__e-3) 配列番号2の769位~771位に相当する位置の塩基がイソロイシンをコードする塩基に、322位~324位に相当する位置の塩基がアルギニンをコードする塩基に、それぞれ置換。

(b-1__e-4) 配列番号2の769位~771位に相当する位置の塩基がイソロイシンをコードする塩基に、328位~330位に相当する位置の塩基がイソロイシンをコードする塩基に、それぞれ置換。

(b-1__e-5) 配列番号2の769位~771位に相当する位置の塩基がイソロイシンをコードする塩基に、328位~330位に相当する位置の塩基がメチオニンをコードする塩基に、それぞれ置換。

(b-1__e-6) 配列番号2の769位~771位に相当する位置の塩基がイソロイシンをコードする塩基に、328位~330位に相当する位置の塩基がロイシンをコードする塩基に、それぞれ置換。

(b-1__e-7) 配列番号2の769位~771位に相当する位置の塩基がイソロイシンをコードする塩基に、328位~330位に相当する位置の塩基がフェニルアラニンをコードする塩基に、それぞれ置換。

(b-1__e-8) 配列番号2の769位~771位に相当する位置の塩基がイソロイシンをコードする塩基に、352位~354位に相当する位置の塩基がイソロイシンをコードする塩基に、それぞれ置換。

[0043] 前記DNA(c)は、その塩基配列の一部として前記DNA(a)又は(b)の塩基配列を含んでおり、かつTE活性を示すタンパク質をコードする。なお、前記DNA(c)の5'末端の塩基配列は、メチオニン(ATG)又はロイシン(TTG)をコードする開始コドンであることが好ましい。

前記DNA(c)の塩基配列中、前記DNA(a)又は(b)の塩基配列以外の塩基配列としては、本発明の効果を損なわない範囲で適宜選択することができる。例えば、配列番号49の1位~171位の任意の塩基配列、又はこの塩基配列に1又は数個(好ましくは1個以上60個以下、より好ましくは1個以上45個以下、より好ましくは1個以上30個以下、より好ましくは1個以上15個以下、より好ましくは1個以上9個以下)の変異が導入された塩基配列、等が挙げられる。変異としては、塩基の欠失、置換、挿入又は付加が挙げられる。これらの配列は、前記DNA(a)又は(b)の塩基配列の5'側に付加されることが好ましい。

あるいは、前記DNA(c)として、配列番号49に示す塩基配列において、配列番号49の4位~171位の任意の位置で5'側が欠失した塩基配列からなるDNAであってもよい。また、タンパク質の輸送や分泌に関与する

シグナルペプチドをコードする塩基配列が、前記DNA (a) 又は (b) の塩基配列の5'側に付加されることが好ましい。

- [0044] 塩基配列に欠失、置換、挿入、付加等の変異を導入する方法としては、例えば、部位特異的な変異導入法が挙げられる。具体的な部位特異的な変異の導入方法としては、Splicing overlap extension (SOE) PCR (Gene, 1989, vol. 77, p. 61-68) を利用した方法、OD A法 (Gene, 1995, 152, 271-276)、Kunkel法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1985, vol. 82, p. 488) 等が挙げられる。また、Site-Directed Mutagenesis System Mutan-SuperExpress Kmキット (タカラバイオ社)、Transformer TM Site-Directed Mutagenesis キット (Clonetech社)、KOD-Plus-Mutagenesis Kit (東洋紡社) 等の市販のキットを利用することもできる。また、ランダムな遺伝子変異を与えた後、適当な方法により酵素活性の評価及び遺伝子解析を行うことにより目的遺伝子を取得することもできる。
- [0045] CpTE改変体をコードする遺伝子 (CpTE改変体遺伝子) 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CpTE改変体遺伝子を、人工的に合成できる。CpTE改変体遺伝子の合成は、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、クフェア・パルストリス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。
- [0046] 前記CpTE改変体遺伝子を常法により宿主に導入することで、本発明の形質転換体を作製することができる。具体的には、前記CpTE改変体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。
- [0047] 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。

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、シネコシステイス (Synechocystis) 属の微生物、シネココッカス (Synechococcus) 属のシアノバクテリア等の原核生物、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 (Rhodosporidium toruloides)、モルチエレラ・エスピー (Mortierella sp.)、又はシアノバクテリアが好ましく、大腸菌又はシアノバクテリアがより好ましい。

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 (Cocos nucifera)、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。

[0048] 製造効率及び得られた脂質の利用性の点から、宿主は微生物が好ましく、大腸菌又はシアノバクテリアがより好ましい。

[0049] 本発明で好ましく用いることができるシアノバクテリア (藍色細菌) は真正細菌の一群であり、光合成によって酸素を産生し、CO₂を固定化する能力を有する。シアノバクテリアは、クロロフィルを用いた光合成を行う原核生物の一群である。シアノバクテリアは多様性に富んでおり、細胞の形状のみを見ても、シネコシスティス・エスピー (Synechocystis sp.) PCC6803のような単細胞性のもの、ヘテロシストを形成し窒素固定を行うアナベナ・エスピー (Anabaena sp.) PCC7120のように多細胞がヒモ状に繋がっている糸状性のもの、又はらせん状や分岐状のもの等がある。生育環境についても、別府温泉から単離されたサーモシネココッカス・エロンガタス (Thermosynechococcus elongatus) BP-1のような好熱性のもの、海洋性で沿岸部に生息するシネココッカス・エスピー (Synechococcus sp.) CC9311、又は外洋に生息するシネココッカス・エスピーWH8102など、様々な条件に適応した種が見られる。また、種独自の特徴を持つものとして、ミクロシスティス・エルギノーサ (Microcystis aeruginosa) のように、ガス小胞を持ち毒素を産生することのできるものや、チラコイドを持たず集光アンテナであるフィコビリソームが原形質膜に結合しているグロイオバクター・ビオラセウス (Gloeobacter violaceus) PCC7421、又は一般的な光合成生物のようにクロロフィルaでなくクロロフィルdを主要な (>95%) 光合成色素として持つ海洋性のアクリオクロリス・マリナ (Acaryochloris marina) なども挙げられる。シアノバクテリアでは、光合成により固定された二酸化炭素は多数の酵素反応プロセスを経てアセチル-CoAへと変換される。

本発明では、あらゆる種類のシアノバクテリアを用いることができる。例えば、シネコシスティス (Synechocystis) 属、シネココッカス (Synechococ

cus) 属、サーモシネココッカス (Thermosynechococcus) 属、トリコデスミウム (Trichodesmium) 属、アカリオクロリス (Acaryochloris) 属、クロコスファエラ (Crocospaera) 属、及びアナベナ (Anabaena) 属のシアノバクテリアが挙げられる。このうち、シネコシスティス属、シネココッカス属、サーモシネココッカス属又はアナベナ属のシアノバクテリアが好ましく、シネコシスティス属又はシネココッカス属のシアノバクテリアがより好ましい。また本発明で用いる宿主としては、シネコシスティス・エスピー-PCC6803、シネコシスティス・エスピー-PCC7509、シネコシスティス・エスピー-PCC6714、シネココッカス・エロンガタスエスピー (Synechococcus elongatus sp.) PCC7942、サーモシネココッカス・エロンガタスBP-1、トリコデスミウム・エリスラエウム (Trichodesmium erythraeum) IMS101、アカリオクロリス・マリアナ (Acaryochloris mariana) MBIC11017、クロコスファエラ・ワトソニー (Crocospaera watsonii) WH8501、及びアナベナ・エスピー (Anabaena sp.) PCC7120がより好ましく、シネコシスティス・エスピー-PCC6803及びシネココッカス・エロンガタスエスピー-PCC7942がより好ましく、シネココッカス・エロンガタスエスピー-PCC7942がさらに好ましい。

また、シアノバクテリアは、アシル-ACPシンテターゼ（以下、「aas」ともいう）の機能を喪失していることが好ましい。aasの機能を喪失させたシアノバクテリアを用いた場合、形質転換体が生産した脂質の分泌能を向上させることができる。ここで「aas」とは脂肪酸合成に関わる酵素の1種であって、遊離脂肪酸とACPタンパク質を基質として、ATP依存的にチオエステル結合を形成し、アシル-ACPを産生する機能を有する。シアノバクテリアにおいてaasの機能を喪失させることで脂肪酸の蓄積及び分泌が促進されることが知られている (Plant Physiology, 2010, vol. 152(3), p. 1598-1610参照)。

[0050] 遺伝子発現用プラスミド又は遺伝子発現用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、宿主細胞内で目的の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、使用する宿主の種類に応じたプロモーターや

ターミネーター等の発現調節領域を有するベクターであって、複製開始点や選択マーカー等を有するベクターを用いることができる。また、プラスミド等の染色体外で自立増殖・複製するベクターであってもよいし、染色体内に組み込まれるベクターであってもよい。

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 (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)、pMW218/219 (ニッポンジーン社製)、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、宿主が大腸菌の場合は、pBluescript II SK(-)、又はpMW218/219が好ましく用いられる。また、宿主がシアノバクテリアの場合は、pUC系ベクター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 (Journal of Basic Microbiology, 2011, vol. 51, p. 666-672参照)、及び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、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。

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

ンタイノベーションズ社製)が挙げられる。特に、宿主がシロイヌナズナの場合は、pRI系ベクター又はpBI系ベクターが好ましく用いられる。

このDNA断片としては、例えば、PCR法により増幅したDNA断片や制限酵素で切断したDNA断片が挙げられる。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。

[0051] 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β-D-1-チオガラクトピラノシド (IPTG) の添加によって誘導可能な誘導体に関するプロモーター、Rubiscoオペロン (rbc)、PSI反応中心タンパク質 (psaAB)、PSIIのD1タンパク質 (psbA)、カリフラワーモザイクウイルス35SRNAプロモーター、ハウスキーピング遺伝子プロモーター (例えば、チューブリンプロモーター、アクチンプロモーター、ユビキチンプロモーター等)、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) (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, vol. 108(52))、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 (PLOS Genetics, 2012;8(11):e1003064. doi: 10.1371)、及びリボゾームRNAをコードするrrnAオペロン遺伝子のプロモーターが挙げられる。

また、目的のタンパク質をコードする遺伝子が組み込まれたことを確認するための選択マーカーの種類も、使用する宿主の種類に応じて適宜選択することができる。本発明で好ましく用いることができる選択マーカーとしては、アンピシリン耐性遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子、エリスロマ

イシン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、スペクチノマイシン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、ブラストサイジンS耐性遺伝子、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。

[0052] 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。

[0053] 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。

[0054] 各種宿主に導入するCpTE改変体遺伝子は、使用する宿主におけるコドン使用頻度にあわせてコドンを至適化されることが好ましい。各種生物が使用するコドンの情報は、Codon Usage Database (www.kazusa.or.jp/codon/) などから入手可能である。

[0055] 本発明の形質転換体は、野生株自体に比べ、中鎖脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質の生産性、特に、生産される全脂肪酸中又は全脂質中に占める中鎖脂肪酸又は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、本発明の形質転換体では、生産される脂質中の脂肪酸組成が改変される。そのため、本発明の形質転換体は、特定の炭素原子数の脂肪酸又は脂質、特に中鎖脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質、好ましくは炭素原子数8以上10以下の脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質、より好ましくは炭素原子数8若しくは10の脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質、より好ま

しくは炭素原子数8若しくは10の飽和脂肪酸（カプリル酸、カプリン酸）又はこれを構成成分とする脂質、の生産に好適に用いることができる。

以下、本明細書において、前記タンパク質（A）～（C）からなる群より選ばれる少なくとも1つのタンパク質をコードする遺伝子が導入させたものを「形質転換体」ともいう。これに対して、前記タンパク質（A）～（C）からなる群より選ばれる少なくとも1つのタンパク質をコードする遺伝子が導入させていないものを「宿主」又は「野生株」ともいう。

[0056] 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）～（C）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。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。

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与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。

[0057] 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。

宿主としてシアノバクテリアを用いる場合、BG-11培地 (J. Gen. Microbiol., 1979, vol. 111, p. 1-61)、A培地 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1980, vol. 77, p. 6052-6056)、AA培地 (Plant Physiol., 1955, vol. 30, p. 366-372) など、シアノバクテリアの培養に通常用いられる培地を用いて、液体培養又はその変法により実施することができる。脂質生産のための培養期間としては、十分に菌体が増殖した条件で脂肪酸が高濃度に蓄積するように行えばよく、例えば、7～45日間、好ましくは10～30日間、よ

り好ましくは14～21日間、通気攪拌培養又は振とう培養がすることが好適である。

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。

[0058] 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、微量元素等を適宜添加することができる。

培地に接種する藻類の量は適宜選択することができ、生育性の点から、培地当たり1% (vol/vol) 以上が好ましい。また、その上限値は50% (vol/vol) 以下が好ましく、10% (vol/vol) 以下がより好ましい。接種する藻類の量の数値範囲は、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、10℃以上が好ましく、15℃以上がより好ましい。またその上限値は35℃以下が好ましく、30℃以下がより好ましい。培養温度の数値範囲は、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、100ルクス以上が好ましく、300ルクス以上がより好ましく、100

0ルクス以上がさらに好ましい。またその上限値は、50000ルクス以下が好ましく、10000ルクス以下がより好ましく、6000ルクス以下がさらに好ましい。光照射時の照度の数値範囲は、好ましくは100~50000ルクスの範囲、より好ましくは300~10000ルクスの範囲、さらに好ましくは1000~6000ルクスの範囲である。また、光照射の間隔は、特に制限されないが、前記と同様の観点から、明暗周期で行うことが好ましく、24時間のうち明期は8時間以上が好ましく、10時間以上がより好ましい。またその上限値は、24時間以下が好ましく、18時間以下がより好ましい。明期の数値範囲は、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）以上が好ましく、0.05%以上がより好ましく、0.1%以上がさらに好ましく、0.3%以上がよりさらに好ましい。またその上限値は、10%以下が好ましく、5%以下がより好ましく、3%以下がさらに好ましく、1%以下がよりさらに好ましい。二酸化炭素の濃度の数値範囲は、0.03~10%が好ましく、0.05~5%がより好ましく、0.1~3%がさらに好ましく、0.3~1%がよりさらに好ましい。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質量%以上が好ましく、0.05質量%以上がより好ましく、0.1質量%以上がさらに好ましい。またその上限値は、5質量%以下が好ましく、2質量%以下がより好ましく、1質量%以下がさらに好ましい。炭酸水素ナトリウムの濃度の数値範囲は、0.01~5質量%が好ましく、0.05~2質量%がより好ましく、0.1~1質量%がさらに好ましい。

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。3日以上

が好ましく、7日以上がより好ましい。またその上限値は、90日以下が好ましく、30日以下がより好ましい。培養期間の数値範囲は、好ましくは3～90日間、より好ましくは3～30日間、さらに好ましくは7～30日間である。なお、培養は、通気攪拌培養、振とう培養又は静置培養のいずれでもよく、通気性の向上の観点から、通気攪拌培養又は振とう培養が好ましく、通気攪拌培養がより好ましい。

[0059] 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。

また、脂肪酸分解経路である β -酸化経路の機能を喪失させた大腸菌、若しくはaasの機能を喪失させたシアノバクテリアを宿主として作製した形質転換体を用いた場合、生産された脂質は細胞外に分泌される。よって、脂質を回収するために菌体を破壊する必要がなく、脂質回収後に残った細胞を繰り返し脂質生産に使用することができる。

[0060] 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。前記脂肪酸エステル化合物は、MAG、DAG及びTAGからなる群より選ばれる少なくとも1種が好ましく、TAGがより好ましい。

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

利用性や栄養学的観点から、中鎖脂肪酸又はその脂肪酸エステル化合物が好ましい。具体的には、炭素原子数8以上10以下の脂肪酸又はその脂肪酸エステル化合物が好ましく、炭素原子数8若しくは10の脂肪酸又はその脂肪酸エステル化合物がより好ましく、炭素原子数8若しくは10の飽和脂肪酸（カプリル酸、カプリン酸）又はその脂肪酸エステル化合物がより好ましい。

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

[0061] 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。

[0062] 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、生産される脂質の脂肪酸組成を改変する方法、タンパク質、遺伝子、組換えベクター若しくはDNAカセット、並びに形質転換体及びその作製方法を開示する。

[0063] <1>下記タンパク質（A）～（C）からなる群より選ばれる少なくとも1つのタンパク質をコードする遺伝子を導入した形質転換体を培養し、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で示されるアミノ酸配列において、下記（A-1）～（A-11）からなる群より選ばれる少なくとも1つのアミノ酸置換、好ましくは（A-1）のアミノ酸置換、を有するアミノ酸配列からなり、かつTE活性を有するタンパク質。

（B）配列番号1で示されるアミノ酸配列と同一性が85%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは92%以上、好ましくは93%以上、より好ましくは94%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、のアミノ酸配列において、下記(B-1)~(B-11)からなる群より選ばれる少なくとも1つのアミノ酸置換、好ましくは(B-1)のアミノ酸置換、を有するアミノ酸配列からなり、かつTE活性を有するタンパク質。

(C) 前記タンパク質(A)又は(B)のアミノ酸配列(好ましくは、合成開始アミノ酸を除いた前記タンパク質(A)又は(B)のアミノ酸配列)を有し、かつTE活性を有するタンパク質。

(A-1) 配列番号1の257位のロイシンがイソロイシンに置換。

(A-2) 配列番号1の251位のスレオニンがアルギニンに置換。

(A-3) 配列番号1の251位のスレオニンがリジンに置換。

(A-4) 配列番号1の251位のスレオニンがヒスチジンに置換。

(A-5) 配列番号1の254位のトリプトファンがイソロイシンに置換。

(A-6) 配列番号1の254位のトリプトファンがチロシンに置換。

(A-7) 配列番号1の257位のロイシンがメチオニンに置換。

(A-8) 配列番号1の257位のロイシンがバリンに置換。

(A-9) 配列番号1の257位のロイシンがフェニルアラニンに置換。

(A-10) 配列番号1の266位のバリンがシステインに置換。

(A-11) 配列番号1の271位のトリプトファンがチロシンに置換。

(B-1) 配列番号1の257位に相当する位置のアミノ酸(好ましくは又は通常、ロイシン)がイソロイシンに置換。

(B-2) 配列番号1の251位に相当する位置のアミノ酸(好ましくは又は通常、スレオニン)がアルギニンに置換。

(B-3) 配列番号1の251位に相当する位置のアミノ酸(好ましくは又は通常、スレオニン)がリジンに置換。

(B-4) 配列番号1の251位に相当する位置のアミノ酸(好ましくは又は通常、スレオニン)がヒスチジンに置換。

(B-5) 配列番号1の254位に相当する位置のアミノ酸(好ましくは又

は通常、トリプトファン) がイソロイシンに置換。

(B-6) 配列番号1の254位に相当する位置のアミノ酸(好ましくは又は通常、トリプトファン) がチロシンに置換。

(B-7) 配列番号1の257位に相当する位置のアミノ酸(好ましくは又は通常、ロイシン) がメチオニンに置換。

(B-8) 配列番号1の257位に相当する位置のアミノ酸(好ましくは又は通常、ロイシン) がバリンに置換。

(B-9) 配列番号1の257位に相当する位置のアミノ酸(好ましくは又は通常、ロイシン) がフェニルアラニンに置換。

(B-10) 配列番号1の266位に相当する位置のアミノ酸(好ましくは又は通常、バリン) がシステインに置換。

(B-11) 配列番号1の271位に相当する位置のアミノ酸(好ましくは又は通常、トリプトファン) がチロシンに置換。

[0064] <2>前記タンパク質(A)~(C)からなる群より選ばれる少なくとも1つのタンパク質をコードする遺伝子を導入した形質転換体を培養し、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、脂質の製造方法。

<3>前記タンパク質(A)~(C)からなる群より選ばれる少なくとも1つのタンパク質をコードする遺伝子を導入した形質転換体を培養し、形質転換体の細胞内で生産される全脂肪酸に占める中鎖脂肪酸の割合を増加させる、脂肪酸組成を改変する方法。

[0065] <4>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53個以下、より好ましくは1個以上35個以下、より好ましくは1個以上28個以下、より好ましくは1個以上24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14個以下、より好ましくは1個以上10個以下、より好ましくは1個以上7個以下、より好ましくは1個以上3個以下、のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加され、前記(B-1)~(B

− 1 1) からなる群より選ばれる少なくとも1つのアミノ酸置換、好ましくは (B − 1) のアミノ酸置換、を有するタンパク質である、前記< 1 > ~ < 3 > のいずれか1項記載の方法。

[0066] < 5 > 前記タンパク質 (A) が、下記 (D − 1) ~ (D − 8) からなる群より選ばれる少なくとも1つのアミノ酸置換 (好ましくは前記 (A − 1) のアミノ酸置換、並びに下記 (D − 1) ~ (D − 8) からなる群より選ばれる少なくとも1つのアミノ酸置換) を有し、前記タンパク質 (B) が、下記 (E − 1) ~ (E − 8) からなる群より選ばれる少なくとも1つのアミノ酸置換 (好ましくは前記 (B − 1) のアミノ酸置換、並びに下記 (E − 1) ~ (E − 8) からなる群より選ばれる少なくとも1つのアミノ酸置換) を有する、前記< 1 > ~ < 4 > のいずれか1項記載の方法。

(D − 1) 配列番号1の106位のバリンがイソロイシンに置換。

(D − 2) 配列番号1の108位のアスパラギンがリジンに置換。

(D − 3) 配列番号1の108位のアスパラギンがアルギニンに置換。

(D − 4) 配列番号1の110位のバリンがイソロイシンに置換。

(D − 5) 配列番号1の110位のバリンがメチオニンに置換。

(D − 6) 配列番号1の110位のバリンがロイシンに置換。

(D − 7) 配列番号1の110位のバリンがフェニルアラニンに置換。

(D − 8) 配列番号1の118位のシステインがイソロイシンに置換。

(E − 1) 配列番号1の106位に相当する位置のアミノ酸 (好ましくは又は通常、バリン) がイソロイシンに置換。

(E − 2) 配列番号1の108位に相当する位置のアミノ酸 (好ましくは又は通常、アスパラギン) がリジンに置換。

(E − 3) 配列番号1の108位に相当する位置のアミノ酸 (好ましくは又は通常、アスパラギン) がアルギニンに置換。

(E − 4) 配列番号1の110位に相当する位置のアミノ酸 (好ましくは又は通常、バリン) がイソロイシンに置換。

(E-5) 配列番号1の110位に相当する位置のアミノ酸（好ましくは又は通常、バリン）がメチオニンに置換。

(E-6) 配列番号1の110位に相当する位置のアミノ酸（好ましくは又は通常、バリン）がロイシンに置換。

(E-7) 配列番号1の110位に相当する位置のアミノ酸（好ましくは又は通常、バリン）がフェニルアラニンに置換。

(E-8) 配列番号1の118位に相当する位置のアミノ酸（好ましくは又は通常、システイン）がイソロイシンに置換。

[0067] <6>前記タンパク質（A）が、下記（A-1__D-1）～（A-1__D-8）からなる群より選ばれるアミノ酸置換を有し、前記タンパク質（B）が、下記（B-1__E-1）～（B-1__E-8）からなる群より選ばれるアミノ酸置換を有する、前記<1>～<5>のいずれか1項記載の方法。

(A-1__D-1) 配列番号1の257位のロイシンがイソロイシンに、106位のバリンがイソロイシンに、それぞれ置換。

(A-1__D-2) 配列番号1の257位のロイシンがイソロイシンに、108位のアスパラギンがリジンに置換。

(A-1__D-3) 配列番号1の257位のロイシンがイソロイシンに、108位のアスパラギンがアルギニンに、それぞれ置換。

(A-1__D-4) 配列番号1の257位のロイシンがイソロイシンに、110位のバリンがイソロイシンに、それぞれ置換。

(A-1__D-5) 配列番号1の257位のロイシンがイソロイシンに、110位のバリンがメチオニンに、それぞれ置換。

(A-1__D-6) 配列番号1の257位のロイシンがイソロイシンに、110位のバリンがロイシンに、それぞれ置換。

(A-1__D-7) 配列番号1の257位のロイシンがイソロイシンに、110位のバリンがフェニルアラニンに、それぞれ置換。

(A-1__D-8) 配列番号1の257位のロイシンがイソロイシンに、1

18位のシステインがイソロイシンに、それぞれ置換。

(B-1__E-1) 配列番号1の257位に相当する位置のアミノ酸（好ましくは又は通常、ロイシン）がイソロイシンに、106位に相当する位置のアミノ酸（好ましくは又は通常、バリン）がイソロイシンに、それぞれ置換。

(B-1__E-2) 配列番号1の257位に相当する位置のアミノ酸（好ましくは又は通常、ロイシン）がイソロイシンに、108位に相当する位置のアミノ酸（好ましくは又は通常、アスパラギン）がリジンに、それぞれ置換。

(B-1__E-3) 配列番号1の257位に相当する位置のアミノ酸（好ましくは又は通常、ロイシン）がイソロイシンに、108位に相当する位置のアミノ酸（好ましくは又は通常、アスパラギン）がアルギニンに、それぞれ置換。

(B-1__E-4) 配列番号1の257位に相当する位置のアミノ酸（好ましくは又は通常、ロイシン）がイソロイシンに、110位に相当する位置のアミノ酸（好ましくは又は通常、バリン）がイソロイシンに、それぞれ置換。

(B-1__E-5) 配列番号1の257位に相当する位置のアミノ酸（好ましくは又は通常、ロイシン）がイソロイシンに、110位に相当する位置のアミノ酸（好ましくは又は通常、バリン）がメチオニンに、それぞれ置換。

(B-1__E-6) 配列番号1の257位に相当する位置のアミノ酸（好ましくは又は通常、ロイシン）がイソロイシンに、110位に相当する位置のアミノ酸（好ましくは又は通常、バリン）がロイシンに、それぞれ置換。

(B-1__E-7) 配列番号1の257位に相当する位置のアミノ酸（好ましくは又は通常、ロイシン）がイソロイシンに、110位に相当する位置のアミノ酸（好ましくは又は通常、バリン）がフェニルアラニンに、それぞれ置換。

(B-1__E-8) 配列番号1の257位に相当する位置のアミノ酸（好ま

しくは又は通常、ロイシン) がイソロイシンに、118位に相当する位置のアミノ酸(好ましくは又は通常、システイン) がイソロイシンに、それぞれ置換。

[0068] <7>前記タンパク質(A)~(C)からなる群より選ばれる少なくとも1つのタンパク質をコードする遺伝子が、下記DNA(a)~(c)のいずれか1つからなる遺伝子である、前記<1>~<6>のいずれか1項記載の方法。

(a) 配列番号2で示される塩基配列において、下記(a-1)~(a-11)からなる群より選ばれる少なくとも1つの塩基置換、好ましくは(a-1)の塩基置換、を有する塩基配列からなり、かつTE活性を有するタンパク質をコードするDNA。

(b) 配列番号2で示される塩基配列と同一性が70%以上、好ましくは75%以上、より好ましくは80%以上、より好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、より好ましくは92%以上、好ましくは93%以上、より好ましくは94%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、の塩基配列において、下記(b-1)~(b-11)からなる群より選ばれる少なくとも1つの塩基置換、好ましくは(b-1)の塩基置換、を有する塩基配列からなり、かつTE活性を有するタンパク質をコードするDNA。

(c) 前記DNA(a)又は(b)の塩基配列(好ましくは、開始コドンを除いた前記DNA(a)又は(b)の塩基配列)を有し、かつTE活性を有するタンパク質をコードするDNA。

(a-1) 配列番号2の769位~771位の塩基がイソロイシンをコードする塩基に置換。

(a-2) 配列番号2の751位~753位の塩基がアルギニンをコードす

る塩基に置換。

(a-3) 配列番号2の751位~753位の塩基がリジンをコードする塩基に置換。

(a-4) 配列番号2の751位~753位の塩基がヒスチジンをコードする塩基に置換。

(a-5) 配列番号2の760位~762位の塩基がイソロイシンをコードする塩基に置換。

(a-6) 配列番号2の760位~762位の塩基がチロシンをコードする塩基に置換。

(a-7) 配列番号2の769位~771位の塩基がメチオニンをコードする塩基に置換。

(a-8) 配列番号2の769位~771位の塩基がバリンをコードする塩基に置換。

(a-9) 配列番号2の769位~771位の塩基がフェニルアラニンをコードする塩基に置換。

(a-10) 配列番号2の796位~798位の塩基がシステインをコードする塩基に置換。

(a-11) 配列番号2の811位~813位の塩基がチロシンをコードする塩基に置換。

(b-1) 配列番号2の769位~771位に相当する位置の塩基がイソロイシンをコードする塩基に置換。

(b-2) 配列番号2の751位~753位に相当する位置の塩基がアルギニンをコードする塩基に置換。

(b-3) 配列番号2の751位~753位に相当する位置の塩基がリジンをコードする塩基に置換。

(b-4) 配列番号2の751位~753位に相当する位置の塩基がヒスチジンをコードする塩基に置換。

(b-5) 配列番号2の760位~762位に相当する位置の塩基がイソロ

イシンをコードする塩基に置換。

(b-6) 配列番号2の760位~762位に相当する位置の塩基がチロシンをコードする塩基に置換。

(b-7) 配列番号2の769位~771位に相当する位置の塩基がメチオニンをコードする塩基に置換。

(b-8) 配列番号2の769位~771位に相当する位置の塩基がバリンをコードする塩基に置換。

(b-9) 配列番号2の769位~771位に相当する位置の塩基酸がフェニルアラニンに置換。

(b-10) 配列番号2の796位~798位に相当する位置の塩基がシステインをコードする塩基に置換。

(b-11) 配列番号2の811位~813位に相当する位置の塩基がチロシンをコードする塩基に置換。

[0069] <8>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320個以下、より好ましくは1個以上267個以下、より好ましくは1個以上213個以下、より好ましくは1個以上160個以下、より好ましくは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74個以下、より好ましくは1個以上64個以下、より好ましくは1個以上53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32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10個以下、の塩基が欠失、置換、挿入、若しくは付加され、前記(b-1)~(b-11)からなる群より選ばれる少なくとも1つの塩基置換、好ましくは(b-1)の塩基置換、を有する塩基配列からなり、かつTE活性を有する前記タンパク質(A)若しくは(B)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とストリンジントな条件下でハイブリダイズし、前記(b-1)~(b-11)からなる群より選ばれる少なくとも1つの塩基置換、好ましくは(b-1)の塩基置換、を有し、かつTE活性を有する前記タンパク質

(A) 若しくは (B) をコードする DNA、である、前記<7>項記載の方法。

[0070] <9>前記 DNA (a) が、下記 (d-1) ~ (d-8) からなる群より選ばれる少なくとも1つの塩基置換（好ましくは前記 (a-1) の塩基置換、並びに下記 (d-1) ~ (d-8) からなる群より選ばれる少なくとも1つの塩基置換）を有し、前記 DNA (b) が、下記 (e-1) ~ (e-8) からなる群より選ばれる少なくとも1つの塩基置換（好ましくは前記 (b-1) の塩基置換、並びに下記 (e-1) ~ (e-8) からなる群より選ばれる少なくとも1つの塩基置換）を有する、前記<7>又は<8>項記載の方法。

(d-1) 配列番号2の316位~318位の塩基がイソロイシンをコードする塩基に置換。

(d-2) 配列番号2の322位~324位の塩基がリジンをコードする塩基に置換。

(d-3) 配列番号2の322位~324位の塩基がアルギニンをコードする塩基に置換。

(d-4) 配列番号2の328位~330位の塩基がイソロイシンをコードする塩基に置換。

(d-5) 配列番号2の328位~330位の塩基がメチオニンをコードする塩基に置換。

(d-6) 配列番号2の328位~330位の塩基がロイシンをコードする塩基に置換。

(d-7) 配列番号2の328位~330位の塩基がフェニルアラニンをコードする塩基に置換。

(d-8) 配列番号2の352位~354位の塩基がイソロイシンをコードする塩基に置換。

(e-1) 配列番号2の316位~318位に相当する位置の塩基がイソロ

イシンをコードする塩基に置換。

(e-2) 配列番号2の322位~324位に相当する位置の塩基がリジンをコードする塩基に置換。

(e-3) 配列番号2の322位~324位に相当する位置の塩基がアルギニンをコードする塩基に置換。

(e-4) 配列番号2の328位~330位に相当する位置の塩基がイソロイシンをコードする塩基に置換。

(e-5) 配列番号2の328位~330位に相当する位置の塩基がメチオニンをコードする塩基に置換。

(e-6) 配列番号2の328位~330位に相当する位置の塩基がロイシンをコードする塩基に置換。

(e-7) 配列番号2の328位~330位に相当する位置の塩基がフェニルアラニンをコードする塩基に置換。

(e-8) 配列番号2の352位~354位に相当する位置の塩基がイソロイシンをコードする塩基に置換。

[0071] <10>前記DNA (a) が、下記 (a-1__d-1) ~ (a-1__d-8) からなる群より選ばれる塩基置換を有し、前記DNA (b) が、下記 (b-1__e-1) ~ (b-1__e-8) からなる群より選ばれる塩基置換を有する、前記<7>~<9>のいずれか1項記載の方法。

(a-1__d-1) 配列番号2の769位~771位の塩基がイソロイシンをコードする塩基に、316位~318位の塩基がイソロイシンをコードする塩基に、それぞれ置換。

(a-1__d-2) 配列番号2の769位~771位の塩基がイソロイシンをコードする塩基に322位~324位の塩基がリジンをコードする塩基に、それぞれ置換。

(a-1__d-3) 配列番号2の769位~771位の塩基がイソロイシンをコードする塩基に322位~324位の塩基がアルギニンをコードする塩

基に、それぞれ置換。

(a-1__d-4) 配列番号2の769位~771位の塩基がイソロイシンをコードする塩基に328位~330位の塩基がイソロイシンをコードする塩基に、それぞれ置換。

(a-1__d-5) 配列番号2の769位~771位の塩基がイソロイシンをコードする塩基に328位~330位の塩基がメチオニンをコードする塩基に、それぞれ置換。

(a-1__d-6) 配列番号2の769位~771位の塩基がイソロイシンをコードする塩基に328位~330位の塩基がロイシンをコードする塩基に、それぞれ置換。

(a-1__d-7) 配列番号2の769位~771位の塩基がイソロイシンをコードする塩基に328位~330位の塩基がフェニルアラニンをコードする塩基に、それぞれ置換。

(a-1__d-8) 配列番号2の769位~771位の塩基がイソロイシンをコードする塩基に352位~354位の塩基がイソロイシンをコードする塩基に、それぞれ置換。

(b-1__e-1) 配列番号2の769位~771位に相当する位置の塩基がイソロイシンをコードする塩基に、316位~318位に相当する位置の塩基がイソロイシンをコードする塩基に、それぞれ置換。

(b-1__e-2) 配列番号2の769位~771位に相当する位置の塩基がイソロイシンをコードする塩基に、322位~324位に相当する位置の塩基がリジンをコードする塩基に、それぞれ置換。

(b-1__e-3) 配列番号2の769位~771位に相当する位置の塩基がイソロイシンをコードする塩基に、322位~324位に相当する位置の塩基がアルギニンをコードする塩基に、それぞれ置換。

(b-1__e-4) 配列番号2の769位~771位に相当する位置の塩基がイソロイシンをコードする塩基に、328位~330位に相当する位置の塩基がイソロイシンをコードする塩基に、それぞれ置換。

(b-1__e-5) 配列番号2の769位~771位に相当する位置の塩基がイソロイシンをコードする塩基に、328位~330位に相当する位置の塩基がメチオニンをコードする塩基に、それぞれ置換。

(b-1__e-6) 配列番号2の769位~771位に相当する位置の塩基がイソロイシンをコードする塩基に、328位~330位に相当する位置の塩基がロイシンをコードする塩基に、それぞれ置換。

(b-1__e-7) 配列番号2の769位~771位に相当する位置の塩基がイソロイシンをコードする塩基に、328位~330位に相当する位置の塩基がフェニルアラニンをコードする塩基に、それぞれ置換。

(b-1__e-8) 配列番号2の769位~771位に相当する位置の塩基がイソロイシンをコードする塩基に、352位~354位に相当する位置の塩基がイソロイシンをコードする塩基に、それぞれ置換。

[0072] <11>前記形質転換体が、微生物の形質転換体である、前記<1>~<10>のいずれか1項記載の方法。

<12>前記微生物が大腸菌である、前記<11>項記載の方法。

<13>前記微生物がシアノバクテリアである、前記<11>項記載の方法。

<14>前記脂肪酸又は脂質が、中鎖脂肪酸又はその脂肪酸エステル化合物、好ましくは炭素原子数8以上10以下の脂肪酸又はその脂肪酸エステル化合物、より好ましくは炭素原子数8若しくは10の脂肪酸又はその脂肪酸エステル化合物、より好ましくは炭素原子数8若しくは10の飽和脂肪酸(カプリル酸、カプリン酸)又はその脂肪酸エステル化合物、を含む、前記<1>~<13>のいずれか1項記載の方法。

[0073] <15>前記タンパク質(A)~(C)。

<16>前記タンパク質(A)が、前記(D-1)~(D-8)からなる群より選ばれる少なくとも1つのアミノ酸置換(好ましくは前記(A-1)のアミノ酸置換、並びに前記(D-1)~(D-8)からなる群より選ばれる少なくとも1つのアミノ酸置換)を有し、前記タンパク質(B)が、前記(

E-1) ~ (E-8) からなる群より選ばれる少なくとも1つのアミノ酸置換（好ましくは前記(B-1)のアミノ酸置換、並びに前記(E-1) ~ (E-8) からなる群より選ばれる少なくとも1つのアミノ酸置換)を有する、前記<15>項記載のタンパク質。

<17>前記タンパク質(A)が、前記(A-1__D-1) ~ (A-1__D-8) からなる群より選ばれるアミノ酸置換を有し、前記タンパク質(B)が、前記(B-1__E-1) ~ (B-1__E-8) からなる群より選ばれるアミノ酸置換を有する、前記<15>又は<16>項記載のタンパク質。

<18>前記<15>~<17>のいずれか1項記載のタンパク質をコードする遺伝子。

<19>前記DNA(a) ~ (c)のいずれか1つからなる遺伝子。

<20>前記DNA(a)が、前記(d-1) ~ (d-8) からなる群より選ばれる少なくとも1つの塩基置換（好ましくは前記(a-1)の塩基置換、並びに前記(d-1) ~ (d-8) からなる群より選ばれる少なくとも1つの塩基置換)を有し、前記DNA(b)が、前記(e-1) ~ (e-8) からなる群より選ばれる少なくとも1つの塩基置換（好ましくは前記(b-1)の塩基置換、並びに前記(e-1) ~ (e-8) からなる群より選ばれる少なくとも1つの塩基置換)を有する、前記<19>項記載の遺伝子。

<21>前記DNA(a)が、前記(a-1__d-1) ~ (a-1__d-8) からなる群より選ばれる塩基置換を有し、前記DNA(b)が、前記(b-1__e-1) ~ (b-1__e-8) からなる群より選ばれる塩基置換を有する、前記<19>又は<20>項記載の遺伝子。

<22>前記<18>~<21>のいずれか1項記載の遺伝子を含有する、組換えベクター又はDNAカセット。

[0074] <23>前記<18>~<22>のいずれか1項記載の遺伝子、組換えベクター又はDNAカセットを含んでなる、形質転換体。

<24>前記<18>~<22>のいずれか1項記載の遺伝子、組換えベクター又はDNAカセットを宿主に導入する、形質転換体の作製方法。

<25>前記形質転換体が、微生物の形質転換体である、前記<23>又は<24>項記載の形質転換体、又はその作製方法。

<26>前記微生物が大腸菌である、前記<25>項記載の形質転換体、又はその作製方法。

<27>前記微生物がシアノバクテリアである、前記<25>項記載の形質転換体、又はその作製方法。

[0075] <28>脂質を製造するための、前記<15>~<27>のいずれか1項記載のタンパク質、遺伝子、組換えベクター若しくはDNAカセット、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。

<29>前記脂質が、中鎖脂肪酸又はその脂肪酸エステル化合物、好ましくは炭素原子数8以上10以下の脂肪酸又はその脂肪酸エステル化合物、より好ましくは炭素原子数8若しくは10の脂肪酸又はその脂肪酸エステル化合物、より好ましくは炭素原子数8若しくは10の飽和脂肪酸（カプリル酸、カプリン酸）又はその脂肪酸エステル化合物、を含む、前記<28>項記載の使用。

実施例

[0076] 以下、本発明を実施例に基づきさらに詳細に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。ここで、本実施例で用いるプライマーの塩基配列を表1及び2に示す。

[0077]

表1

プライマー名	塩基配列 (5' → 3')	配列番号
pBS-F	GCGTTAATATTTTGTAAAATTCGC	3
pBS-R	AGCTGTTTCCTGTGTGAAATTG	4
pBS/CpTE-F	ACACAGGAAACAGCTATGGCTAACGGTTCTGCAGTAAC	5
CpTE/pBS-R	ACAAAATATTAACGCTCAAGTCTTTCCTGTTGATATCGCC	6
CpTE_T251-R	TAGACCCTTGCGAATGGAATCACC	7
CpTE_T251R-F	ATTCGCAAGGGTCTACGTCCGGGGTGGTATGACTT	8
CpTE_T251K-F	ATTCGCAAGGGTCTAAAACCGGGGTGGTATGACTT	9
CpTE_T251H-F	ATTCGCAAGGGTCTACATCCGGGGTGGTATGACTT	10
CpTE_W254-R	CCCCGGAGTTAGACCCTTGCG	11
CpTE_W254I-F	GGTCTAACTCCGGGGATTTATGACTTGGATGTCAA	12
CpTE_W254Y-F	GGTCTAACTCCGGGGTATTATGACTTGGATGTCAA	13
CpTE_L257-R	GTCATACCACCCCGGAGTTAGAC	14
CpTE_L257I-F	CCGGGGTGGTATGACATTGATGTCAATCAGCACGT	15
CpTE_L257M-F	CCGGGGTGGTATGACATGGATGTCAATCAGCACGT	16
CpTE_L257V-F	CCGGGGTGGTATGACGTTGATGTCAATCAGCACGT	17
CpTE_L257F-F	CCGGGGTGGTATGACTTTGATGTCAATCAGCACGT	18
CpTE_V266-R	GTTGCTTACGTGCTGATTGACATCC	19
CpTE_V266C-F	CAGCACGTAAGCAACTGTAAGTACATTGGGTGGAT	20
CpTE_W271-R	CCCAATGTACTTCACGTTGCTTACG	21
CpTE_W271Y-F	GTGAAGTACATTGGGTATATTCTCGAGAGTATGCC	22
CpTE_V106-R	CGTCTCTATAGAGGCTGTTTCGATC	23
CpTE_V106I-F	GCCTCTATAGAGACGATTATGAACCACGTCCAGGA	24
CpTE_N108-R	CATCACCGTCTCTATAGAGGCTG	25
CpTE_N108R-F	ATAGAGACGGTGTATGCGTACGTCCAGGAAACATC	26
CpTE_N108K-F	ATAGAGACGGTGTATGAAACACGTCCAGGAAACATC	27
CpTE_V110-R	GTGGTTCATCACCGTCTCTATAGAG	28
CpTE_V110I-F	ACGGTGATGAACCACATTCAGGAAACATCACTCAA	29
CpTE_V110M-F	ACGGTGATGAACCACATGCAGGAAACATCACTCAA	30
CpTE_V110L-F	ACGGTGATGAACCACTTACAGGAAACATCACTCAA	31
CpTE_V110F-F	ACGGTGATGAACCACTTTACAGGAAACATCACTCAA	32
CpTE_C118-R	TTGATTGAGTGATGTTTCCTGGACG	33
CpTE_C118I-F	ACATCACTCAATCAAATTAAGAGTATAGGTCTTCT	34
CpTE_M174-R	ACCGATTTTCCCCGATTGAGAGAGCC	35
CpTE_M174I-F	TCGGGGAAAATCGGTATTGGTCGCGATTGGCTAAT	36

[0078]

表2

プライマー名	塩基配列(5'→3')	配列番号
pUC118/0918up-F	GGATCCTCTAGAGTCAGCTCCGTTGTGCGCAGTGTGTCAG	37
0918down/pUC118-R	GCATGCCCTGCAGGTCAGACATCACTCAAGTCATCAGTC	38
0918up/spr-F	TCGGGCACCACAGGCATCGATTTTCGTTTCGTG	39
spr/0918down-R	AATCGGCTGGGGTTCATATGCAAGGGTTTATTG	40
0918up-R	GCCTGTGGTGCCCGAGGTATAG	41
0918down-F	GAACCCAGCCGATTGAAGATG	42
Sp-F	ATCGATTTTCGTTTCGTG	43
0918up/Ptrc-F	TCGGGCACCACAGGCTTGACAATTAATCATCCGGGCTCG	44
Ptrc-R	GGTCTGTTTCCTGTGTGAAATTG	45
Ptrc/CpTE-F	CACAGGAAACAGACCATGGCTAACGGTTCTGCAGTAAC	46
CpTE/spr-R	CGAACGAAAATCGATTCAAGTCTTTCCTGTTGATATCGCC	47

[0079] 実施例1 CpTE改変体を導入した大腸菌による脂質の製造

(1) CpTE遺伝子発現用プラスミドの構築

pBS-SK(-)プラスミド(アジレント・テクノロジー社製)を鋳型とし、表1記載のプライマーpBS-F及びプライマーpBS-Rを用いてPCRを行い、pBS-SK(-)線状DNA配列を増幅した。

さらに、クフェア・パルストリス由来のTE遺伝子(GenBank: U38188.1、配列番号49)を人工的に合成した。合成したDNA配列を鋳型とし、表1記載のプライマーpBS/CpTE-F及びプライマーCpTE/pBS-Rを用いてPCRを行い、葉緑体移行シグナルと推定される配列を除去したクフェア・パルストリス由来のTE遺伝子(配列番号2、以下、「CpTE遺伝子」ともいう)の断片を増幅した。

次いで、前記pBS-SK(-)線状DNA配列、及びCpTE遺伝子の断片を混合し、In-Fusion(登録商標)PCRクローニング法(Clontech)によりクローニングし、pBS-SK(-)プラスミドのlacOプロモーターの下流にCpTE遺伝子の塩基配列が挿入されたプラスミドpBS-CpTEを得た。

[0080] (2) CpTE改変体遺伝子発現用プラスミドの構築

前記プラスミドpBS-CpTEを鋳型として、表1に示すプライマーCpTE_T251R-F、プライマーCpTE_T251K-F及びプライマーCpTE_T251H-Fのいずれか1つと、プライマーCpTE_T251-Rのプライマー対を用いてPCRを行い、配列番号2に示す塩基配列(CpTE遺伝子の塩基配列)の751~753位の塩基配列を改変

した遺伝子断片をそれぞれ取得した。

また、前記プラスミドpBS-CpTEを鋳型として、表1に示すプライマーCpTE_W254I-F及びプライマーCpTE_W254Y-Fのいずれか1つと、プライマーCpTE_W254-Rのプライマー対を用いてPCRを行い、配列番号2に示す塩基配列の760～762位の塩基配列を改変した遺伝子断片をそれぞれ取得した。

また、前記プラスミドpBS-CpTEを鋳型として、表1に示すプライマーCpTE_L257I-F、プライマーCpTE_L257M-F、プライマーCpTE_L257V-F及びプライマーCpTE_L257F-Fのいずれか1つと、プライマーCpTE_L257-Rのプライマー対を用いてPCRを行い、配列番号2に示す塩基配列の769～771位の塩基配列を改変した遺伝子断片をそれぞれ取得した。

また、前記プラスミドpBS-CpTEを鋳型として、表1に示すプライマーCpTE_V266C-Fと、プライマーCpTE_V266-Rのプライマー対を用いてPCRを行い、配列番号2に示す塩基配列の796～798位の塩基配列を改変した遺伝子断片を取得した。

また、前記プラスミドpBS-CpTEを鋳型として、表1に示すプライマーCpTE_W271Y-Fと、プライマーCpTE_W271-Rのプライマー対を用いてPCRを行い、配列番号2に示す塩基配列の811～813位の塩基配列を改変した遺伝子断片を取得した。

さらに、前記プラスミドpBS-CpTEを鋳型として、表1に示すプライマーCpTE_M174I-Fと、プライマーCpTE_M174-Rのプライマー対を用いてPCRを行い、配列番号2に示す塩基配列の520～522位の塩基配列を改変した遺伝子断片をそれぞれ取得した。

[0081] これらの遺伝子断片を用いて、In-Fusion（登録商標）PCRクローニング法（Clontech）によりクローニングし、CpTE改変体遺伝子発現用プラスミドpBS-CpTE_T251R、pBS-CpTE_T251K、pBS-CpTE_T251H、pBS-CpTE_W254I、pBS-CpTE_W254Y、pBS-CpTE_L257I、pBS-CpTE_L257M、pBS-CpTE_L257V、pBS-CpTE_L257F、pBS-CpTE_V266C、pBS-CpTE_W271Y、pBS-CpTE_M174Iをそれぞれ構築した。

これらのプラスミドにおいて、配列番号2に示す塩基配列のうち、下記の塩基を置換した。

[0082] pBS-CpTE_T251R : 配列番号1の251位のスレオニン (T) をコードする塩基を、アルギニン (R) をコードする塩基CGTに置換した。

pBS-CpTE_T251K : 配列番号1の251位のスレオニン (T) をコードする塩基を、リジン (K) をコードする塩基AAAに置換した。

pBS-CpTE_T251H : 配列番号1の251位のスレオニン (T) をコードする塩基を、ヒスチジン (H) をコードする塩基CATに置換した。

pBS-CpTE_W254I : 配列番号1の254位のトリプトファン (W) をコードする塩基を、イソロイシン (I) をコードする塩基ATTに置換した。

pBS-CpTE_W254Y : 配列番号1の254位のトリプトファン (W) をコードする塩基を、チロシン (Y) をコードする塩基TATに置換した。

pBS-CpTE_L257I : 配列番号1の257位のロイシン (L) をコードする塩基を、イソロイシン (I) をコードする塩基ATTに置換した。

pBS-CpTE_L257M : 配列番号1の257位のロイシン (L) をコードする塩基を、メチオニン (M) をコードする塩基ATGに置換した。

pBS-CpTE_L257V : 配列番号1の257位のロイシン (L) をコードする塩基を、バリン (V) をコードする塩基GTTに置換した。

pBS-CpTE_L257F : 配列番号1の257位のロイシン (L) をコードする塩基を、フェニルアラニン (F) をコードする塩基TTTに置換した。

pBS-CpTE_V266C : 配列番号1の266位のバリン (V) をコードする塩基を、システイン (C) をコードする塩基TGTに置換した。

pBS-CpTE_W271Y : 配列番号1の271位のトリプトファン (W) をコードする塩基を、チロシン (Y) をコードする塩基TATに置換した。

pBS-CpTE_M174I : 配列番号 1 の 1 7 4 位のメチオニン (M) をコードする塩基を、イソロイシン (I) をコードする塩基 A T T に置換した。

[0083] 前記プラスミド pBS-CpTE_L257I を鋳型として、表 1 に示すプライマー CpTE_V106I-F 及びプライマー CpTE_V106-R のプライマー対を用いて PCR を行い、配列番号 2 に示す塩基配列の 7 6 9 ~ 7 7 1 位に加えて、3 1 6 ~ 3 1 8 位の塩基配列も改変した遺伝子断片を取得した。

また、前記プラスミド pBS-CpTE_L257I を鋳型として、表 1 に示すプライマー CpTE_N108R- 及びプライマー CpTE_N108K-F のいずれか 1 つと、プライマー CpTE_N108-R のプライマー対を用いて PCR を行い、配列番号 2 に示す塩基配列の 7 6 9 ~ 7 7 1 位に加えて、3 2 2 ~ 3 2 4 位の塩基配列も改変した遺伝子断片をそれぞれ取得した。

また、前記プラスミド pBS-CpTE_L257I を鋳型として、表 1 に示すプライマー CpTE_V110I-F、プライマー CpTE_V110M-F、プライマー CpTE_V110L-F 及びプライマー CpTE_V110F-F のいずれか 1 つと、プライマー CpTE_V110-R のプライマー対を用いて PCR を行い、配列番号 2 に示す塩基配列の 7 6 9 ~ 7 7 1 位に加えて、3 2 8 ~ 3 3 0 位の塩基配列も改変した遺伝子断片をそれぞれ取得した。

さらに、前記プラスミド pBS-CpTE_L257I を鋳型として、表 1 に示すプライマー CpTE_C118I-F 及びプライマー CpTE_C118-R のプライマー対を用いて PCR を行い、配列番号 2 に示す塩基配列の 7 6 9 ~ 7 7 1 位に加えて、3 5 2 ~ 3 5 4 位の塩基配列も改変した遺伝子断片を取得した。

[0084] これらの遺伝子断片を用いて、In-Fusion (登録商標) PCR クローニング法 (Clontech) によりクローニングし、CpTE 改変体遺伝子発現用プラスミド pBS-CpTEL257IV106I、pBS-CpTEL257IN108K、pBS-CpTEL257IN108R、pBS-CpTEL257IV110I、pBS-CpTEL257IV110M、pBS-CpTEL257IV110L、pBS-CpTEL257IV110F、pBS-CpTEL257IC118I をそれぞれ構築した。

これらのプラスミドにおいて、配列番号 2 に示す塩基配列のうち、下記の

塩基を置換した。

[0085] pBS-CpTEL257IV106I : 配列番号 1 の 2 5 7 位のロイシン (L) をコードする塩基を、イソロイシン (I) をコードする塩基 A T T に置換し、1 0 6 位のバリン (V) をコードする塩基を、イソロイシン (I) をコードする塩基 A T T に置換した。

pBS-CpTEL257IN108K : 配列番号 1 の 2 5 7 位のロイシン (L) をコードする塩基を、イソロイシン (I) をコードする塩基 A T T に置換し、1 0 8 位のアスパラギン (N) をコードする塩基を、リジン (K) をコードする塩基 A A に置換した。

pBS-CpTEL257IN108R : 配列番号 1 の 2 5 7 位のロイシン (L) をコードする塩基を、イソロイシン (I) をコードする塩基 A T T に置換し、1 0 8 位のアスパラギン (N) をコードする塩基を、アルギニン (R) をコードする塩基 C G T に置換した。

pBS-CpTEL257IV110I : 配列番号 1 の 2 5 7 位のロイシン (L) をコードする塩基を、イソロイシン (I) をコードする塩基 A T T に置換し、1 1 0 位のバリン (V) をコードする塩基を、イソロイシン (I) をコードする塩基 A T T に置換した。

pBS-CpTEL257IV110M : 配列番号 1 の 2 5 7 位のロイシン (L) をコードする塩基を、イソロイシン (I) をコードする塩基 A T T に置換し、1 1 0 位のバリン (V) をコードする塩基を、メチオニン (M) をコードする塩基 A T G に置換した。

pBS-CpTEL257IV110L : 配列番号 1 の 2 5 7 位のロイシン (L) をコードする塩基を、イソロイシン (I) をコードする塩基 A T T に置換し、1 1 0 位のバリン (V) をコードする塩基を、ロイシン (L) をコードする塩基 T T A に置換した。

pBS-CpTEL257IV110F : 配列番号 1 の 2 5 7 位のロイシン (L) をコードする

塩基を、イソロイシン（I）をコードする塩基 A T T に置換し、110位のバリン（V）をコードする塩基を、フェニルアラニン（F）をコードする塩基 T T T に置換した。

pBS-CpTEL257IC118I：配列番号1の257位のロイシン（L）をコードする塩基を、イソロイシン（I）をコードする塩基 A T T に置換し、118位のシステイン（C）をコードする塩基を、イソロイシン（I）をコードする塩基 A T T に置換した。

[0086] （3）遺伝子発現用プラスミドの大腸菌への導入、及び得られた形質転換体を用いた脂質の製造

前述のCpTE遺伝子発現用プラスミド、並びに各種CpTE改変体遺伝子発現用プラスミドを用いて、大腸菌突然変異株であるK27株（fadD88）（*Eur. J. Biochem.*, 1969, vol. 7, p. 559-574）をコンピテントセル形質転換法により形質転換した。形質転換処理をしたK27株を30℃で一晩静置し、得られたコロニーをLB Amp液体培地（Bacto Trypton 1%, Yeast Extract 0.5%, NaCl 1%, アンピシリンナトリウム50 μg/mL）1 mLに接種し、30℃で一晩培養した。この培養液2 μLを、2 mLのOvernight Express Instant TB Medium（Novagen社）に接種し、30℃で振とう培養した。培養24時間後、培養液に含まれる脂質成分を、下記の方法にて解析した。

[0087] （4）大腸菌培養液中の脂質の抽出及び構成脂肪酸の分析

培養液1 mLに、内部標準として1mg/mLの7-ペンタデカノンを25 μL添加後、2 N塩酸10 μL及びヘキサン2 mLを添加して激しく攪拌し、3,000 rpmにて10分間遠心分離を行った。パスツールピペットにてヘキサン層（上層）を新しい蓋付きねじ口試験管に回収した。得られたヘキサン層に窒素ガスを吹き付けて乾固し、14%三フッ化ホウ素溶液（SIGMA社製）1 mLを添加し、80℃にて30分間恒温した。その後、ヘキサン及び飽和食塩水を各1 mL添加して激しく攪拌し、室温にて30分間放置後、上層であるヘキサン層を回収して脂肪酸エステルを得た。

[0088] 得られた脂肪酸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は、7890A (Agilent Technologies) を用いて、下記の条件下で解析を実施した。

(解析条件)

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

移動相：高純度ヘリウム

カラム内流量：1.0mL/分

昇温プログラム：70 $^{\circ}$ C保持1分間→70~200 $^{\circ}$ C (20 $^{\circ}$ C/分昇温) →200~320 $^{\circ}$ C (50 $^{\circ}$ C/分昇温) →320 $^{\circ}$ C保持5分間

平衡化時間：1分間

注入口：スプリット注入 (スプリット比：100：1)

圧力14.49psi、104mL/分

注入量：1 μ L

洗浄バイアル：メタノール・クロロホルム

検出器温度：300 $^{\circ}$ C

[0089] また、脂肪酸エステルの同定は、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1Lあたりに含まれる各脂肪酸の量及びこれらの合計量を算出した。

さらに、野生型のCpTE遺伝子若しくはL257I遺伝子を導入した形質転換体のC8脂肪酸量及びC10脂肪酸量をそれぞれ1とし、CpTE改変体遺伝子を導入した形質転換体のC8脂肪酸量及びC10脂肪酸量をそれぞれ相対値で示した。

その結果を表3及び4に示す。なお表3及び4の結果は、独立した3回の培養とクロマトグラフィー解析の結果の平均値である。

[0090]

表3

	野生型	T251R	T251K	T251H	W254I	W254Y
C8 脂肪酸	1.00	1.96	1.36	1.81	2.32	1.46
C10 脂肪酸	1.00	2.41	1.58	2.23	3.17	1.68
	L257I	L257M	L257V	L257F	V266C	W271Y
C8 脂肪酸	6.80	2.10	3.58	1.55	1.37	3.09
C10 脂肪酸	10.06	2.33	3.10	1.53	1.57	4.04

[0091]

表4

	L257I	L257I +V106I	L257I +N108K	L257I +N108R	L257I +V110I	L257I +V110M	L257I +V110L	L257I +V110F	L257I +C118I
C8 脂肪酸	1.00	1.40	1.32	1.20	1.18	1.52	1.76	1.75	1.21
C10 脂肪酸	1.00	1.17	1.24	1.37	0.94	1.45	1.74	2.15	0.42

[0092] 表3から明らかなように、野生型のCpTE遺伝子を導入し野生型のCpTEを発現させた形質転換体でのC8脂肪酸及びC10脂肪酸の生産量と比較して、本発明のCpTE改変体遺伝子を導入した形質転換体ではC8脂肪酸及びC10脂肪酸の生産量がいずれも大きく増加した。

具体的には、野生型のCpTE遺伝子を導入した場合と比べて、T251R遺伝子を導入した場合は1.96倍、T251K遺伝子を導入した場合は1.36倍、T251H遺伝子を導入した場合は1.81倍、W254I遺伝子を導入した場合は2.32倍、W254Y遺伝子を導入した場合は1.46倍、L257I遺伝子を導入した場合は6.80倍、L257M遺伝子を導入した場合は2.10倍、L257V遺伝子を導入した場合は3.58倍、L257F遺伝子を導入した場合は1.55倍、V266C遺伝子を導入した場合は1.37倍、W271Y遺伝子を導入した場合は3.09倍、C8脂肪酸の生産量が増加した。

またC10脂肪酸の生産量についても、野生型CpTE遺伝子を導入した場合と比べて、T251R遺伝子を導入した場合は2.41倍、T251K遺伝子を導入した場合は1.58倍、T251H遺伝子を導入した場合は2.23倍、W254I遺伝子を導入した場合は3.17倍、W254Y遺伝子を導入した場合は1.68倍、L257I遺伝子を導入した場合は10.06倍、L257M遺伝子を導入した場合は2.23倍、L257V遺伝子を導入した場合は3.10倍、L257F遺伝子を導入した場合は1.53倍、V266C遺伝子を導入した場合は1.57倍、W271Y遺伝子を導入した場合は4.04倍、それぞれ増加した。

[0093] さらに表4から明らかなように、C8脂肪酸及びC10脂肪酸の生産量の

増加が顕著であったCpTE(L257I)に対して、前記(D-1)～(D-8)からなる群より選ばれる少なくとも1つのアミノ酸置換を行うことで、C8脂肪酸及びC10脂肪酸の生産量がいずれも一層増加した。

具体的には、L257I遺伝子を導入した場合と比べて、L257IV106I遺伝子を導入した場合は1.40倍、L257IN108K遺伝子を導入した場合は1.32倍、L257IN108R遺伝子を導入した場合は1.20倍、L257IV110I遺伝子を導入した場合は1.18倍、L257IV110M遺伝子を導入した場合は1.52倍、L257IV110L遺伝子を導入した場合は1.76倍、L257IV110F遺伝子を導入した場合は1.75倍、L257IC118I遺伝子を導入した場合は1.21倍、C8脂肪酸の生産量がさらに増加した。

またC10脂肪酸の生産量についても、L257I遺伝子を導入した場合と比べて、L257IV106I遺伝子を導入した場合は1.17倍、L257IN108K遺伝子を導入した場合は1.24倍、L257IN108R遺伝子を導入した場合は1.37倍、L257IV110M遺伝子を導入した場合は1.45倍、L257IV110L遺伝子を導入した場合は1.74倍、L257IV110F遺伝子を導入した場合は2.15倍、それぞれさらに増加した。

[0094] 以上のように、形質転換体の宿主として大腸菌を用いた場合、本発明で規定するアミノ酸変異を導入したCpTE改変体を利用することで、中鎖脂肪酸の生産性を飛躍的に向上させた形質転換体を作製することができる。そしてこの形質転換体を培養することで、中鎖脂肪酸の生産性を向上させることができる。

[0095] さらに、特許文献3（米国特許出願公開第2011/0020883号明細書）で開示されているCpTE_M174I（配列番号1で示されるアミノ酸配列において、174位のメチオニン（M）がイソロイシン（I）に置換されたCpTE改変体）をコードする遺伝子を導入した形質転換体のC8脂肪酸量及びC10脂肪酸量をそれぞれ1とし、L257I遺伝子を導入した形質転換体のC8脂肪酸量及びC10脂肪酸量をそれぞれ相対値で算出した。その結果を表5に示す。

[0096] 表5

	M174I (参考例、特許文献3参照)	L257I
C8 脂肪酸	1.00	1.78
C10 脂肪酸	1.00	2.25

[0097] CpTE_M174I遺伝子を導入した形質転換体ではC 8 脂肪酸の生産量が向上することが、特許文献3に記載されている。このような形質転換体と比較しても、表5から明らかのように、CpTE_L257I遺伝子を導入した場合C 8 脂肪酸の生産量が1.78倍向上した。さらに、C 1 0 脂肪酸の生産量についても、2.25倍も増加した。

この結果から、CpTE_L257I遺伝子を導入した形質転換体は、C 8 脂肪酸及びC 1 0 脂肪酸の生産には特に有効である。

[0098] 実施例2 CpTE改変体を導入したシアノバクテリアによる脂質の製造

(1) aas遺伝子の不活性化及びCpTE改変体遺伝子発現用プラスミドの構築

シネココッカス・エロンガタスエスピーPCC7942株の野生株のゲノムDNAより、表2記載のプライマーpUC118/0918up-F及びプライマー0918down/pUC118-Rを用いてPCRを行い、Synpcc7942_0918遺伝子(aas遺伝子)を含む断片(2864bp、配列番号50)を増幅した。増幅した断片をpUC118プラスミド(タカラバイオ社製)のHincIIサイト間にIn-Fusion(登録商標)PCRクローニング法(Clontech)を用いて挿入し、Synpcc7942_0918遺伝子(aas遺伝子)を組み込んだpUC118-Synpcc7942_0918プラスミドを取得した。

pDG1726プラスミド(Gene, 1995, vol. 167, p. 335-336)を鋳型として、表2記載のプライマー0918up/spr-F(配列番号)及びspr/0918down-R(配列番号)を用いてPCRを行い、スペクチノマイシン耐性マーカー遺伝子(配列番号51)断片(以下、「sp断片」ともいう)を取得した。

次に、前記pUC118-Synpcc7942_0918プラスミドを鋳型として、表2記載のプライマー0918up-R及びプライマー0918down-Fを用いてPCRを行い、Synpcc7942_0918遺伝子(aas遺伝子)のコード領域間の927bp領域が削除された直鎖状のDNA断片を取得した。

[0099] 前記の直鎖状DNA断片と前記sp断片とをIn-Fusion(登録商標)PCRクローニング法(Clontech)を用いて結合し、sp断片が挿入されたSynpcc7942_0918遺伝子コード領域のDNA配列を含むpUC118-Synpcc7942_0918::spプラスミドを得た。

[0100] 前記pUC118-Synpcc7942_0918::spプラスミドを鋳型とし、表2記載のプライマー0918up-R及びプライマーSp-Fを用いてPCRを行い、pUC118-Synpcc7942_0918::spプラスミドを線状化した。

次に、pTrc99Aクローニングプラスミド (NCBI Accession number : M22744) の配列より人工合成したtrcプロモーター配列を鋳型とし、表2記載のプライマー0918up/Ptrc-F及びプライマーPtrc-Rを用いてPCRを行い、trcプロモーター断片 (Ptrc断片、配列番号52) を増幅した。

[0101] 実施例1で人工的に合成したクフェア・パルストリス由来のTE遺伝子 (Gen Bank: U38188.1) のDNA配列を鋳型とし、表2記載のプライマーPtrc/CpTE-F及びプライマーCpTE/spr-Rのプライマー対を用いてPCRを行い、葉緑体移行シグナルと推定される配列を除去したクフェア・パルストリス由来のTE遺伝子 (CpTE遺伝子) の断片を増幅した。

次いで、前述の、線状化したpUC118-Synpcc7942_0918::spプラスミド、Ptrc断片、及びCpTE遺伝子の断片を混合し、In-Fusion (登録商標) PCRクローニング法 (Clontech) によりクローニングし、Synpcc7942_0918遺伝子のコード領域間に、Ptrc断片、CpTE遺伝子の断片及びsp断片をこの順で挿入した、プラスミドpUC118-Synpcc7942_0918::Ptrc-CpTE-spを得た。

[0102] (2) CpTE改変体遺伝子発現用プラスミドの構築

実施例1で作製したプラスミドpBS-CpTEを鋳型として、表1に示すプライマーCpTE_L257I-F及びプライマーCpTE_L257-Rのプライマー対を用いてPCRを行い、配列番号2に示す塩基配列の769~771位の塩基配列を改変した遺伝子断片pBS-CpTE_L257Iを取得した。

得られた遺伝子断片と、前記プラスミドpUC118-Synpcc7942_0918::Ptrc-CpTE-spとを用いて、In-Fusion (登録商標) PCRクローニング法 (Clontech) によりクローニングし、CpTE改変体遺伝子発現プラスミドpUC118-Synpcc7942_0918::Ptrc-CpTE_L257I-spを得た。

なお前記遺伝子断片pBS-CpTE_L257Iにおいて、配列番号2に示す塩基配列のうち、下記の塩基を置換した。

pBS-CpTE_L257I：配列番号1の257位のロイシン（L）をコードする塩基をイソロイシン（I）をコードする塩基ATTに置換した。

[0103] （3）遺伝子発現用プラスミドのシアノバクテリアへの導入、及び得られた形質転換体を用いた脂質の製造

前述のCpTE遺伝子発現用プラスミド及びCpTE改変体遺伝子発現用プラスミドを用いて、自然形質転換法によりシネココッカス・エロンガタスエスピーPCC7942株を形質転換し、スペクチノマイシン耐性により目的の遺伝子が導入された株を選抜した。

このようにしてシネココッカス・エロンガタスエスピーPCC7942株のゲノム上のaas領域中に、CpTE遺伝子又はCpTE改変体遺伝子発現用コンストラクトを導入した、 $\Delta 0918::\text{CpTE}$ 株及び $\Delta 0918::\text{CpTE_L257I}$ 株をそれぞれ取得した。

[0104] 下記表6に示す組成のBG-11培地25mLを加えた50mL三角フラスコ中で、一定の照明下（ $60\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$ ）、 30°C にてロータリーシェーカー（120rpm）を用いて、初発菌体濃度を $\text{OD}_{730}=0.2$ に設定し、前記形質転換体の培養を2週間行った。なおBG-11培地には、スペクチノマイシンを $25\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度となるよう添加した。

[0105]

表6 BG-11液体培地の組成

ストック液	
A液	2mL
B液	50mL
C液	2mL
D液	1mL
1.0 M TES-KOH (pH 8.2)	5mL
Total	1000mL

ストック液組成

A液	
Citric acid·H ₂ O	0.33 g
Ferric ammonium citrate	0.3 g
Na ₂ EDTA	0.05 g
Total	100 mL

B液	
NaNO ₃	30 g
K ₂ HPO ₄	0.78 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.5 g
total	100 mL

C液

CaCl₂·2H₂O 1.9g/100mL

D液

[H₃BO₃ 2.86 g、MnCl₂·4H₂O 1.81 g、ZnSO₄·7H₂O 0.22 g、CuSO₄·5H₂O 0.08 g、Na₂MoO₄ 0.021 g、Co(NO₃)₂·6H₂O 0.0494 g、H₂SO₄ 一滴]/1000 mL

[0106] 培養終了後、培養液 25 mL に NaH₂PO₄ 1 g、及び内部標準として 7-ペンタデカノン (1mg/mL) 25 µL を添加した。この液にヘキサン 10 mL を添加し、十分に攪拌し、10 分間静置した。室温、2500 rpm で 10 分間遠心分離を行った後、上層部分をナス型フラスコに採取した。遠心分離した下層にさらにヘキサン 5 mL を添加して攪拌し、遠心分離を 2 回行い、減圧濃縮を行うことで乾燥サンプルを得た。

乾燥サンプルに 14% 三フッ化ホウ素溶液 (SIGMA 社製) 1 mL を添加し、80 °C にて 30 分恒温した。その後、ヘキサン及び飽和食塩水を各 1 mL 添加し激しく攪拌し、室温にて 30 分放置した。そして、上層のヘキサン層を回収し、脂肪酸メチルエステルを得た。

[0107] 得られた脂肪酸メチルエステルを、実施例 1 と同様の方法に従いガスクロマトグラフィー解析に供した。その結果を表 7 に示す。なお表 7 の結果は、独立した 3 回の培養とクロマトグラフィー解析の結果の平均値である。

[0108]

表7

	野生型	L2571
C8 脂肪酸	1.00	2.97
C10 脂肪酸	1.00	5.10

[0109] 表7に示すように、野生型のCpTE遺伝子を導入した形質転換体でのC8脂肪酸及びC10脂肪酸の生産量と比較して、本発明のCpTE改変体遺伝子を導入した形質転換体ではC8脂肪酸の生産量は2.97倍、C10脂肪酸の生産量は5.10倍も、いずれも大きく増加した。

このように、形質転換体の宿主としてシアノバクテリアを用いた場合であっても、本発明で規定するアミノ酸変異を導入したCpTE改変体を利用することで、中鎖脂肪酸の生産性を飛躍的に向上させた形質転換体を作製することができる。そしてこの形質転換体を培養することで、中鎖脂肪酸の生産性を向上させることができる。

[0110] 以上のように、本発明で規定するTE改変体をコードする遺伝子を宿主に導入することで、中鎖脂肪酸の生産性を向上させた形質転換体を作製することができる。そしてこの形質転換体を培養することで、中鎖脂肪酸の生産性を向上させることができる。

[0111] 本発明をその実施態様とともに説明したが、我々は特に指定しない限り我々の発明を説明のどの細部においても限定しようとするものではなく、添付の請求の範囲に示した発明の精神と範囲に反することなく幅広く解釈されるべきであると考える。

[0112] 本願は、2017年10月6日に日本国で特許出願された特願2017-196237に基づく優先権を主張するものであり、これはここに参照してその内容を本明細書の記載の一部として取り込む。

請求の範囲

[請求項1] 下記タンパク質 (A) ~ (C) からなる群より選ばれる少なくとも1つのタンパク質をコードする遺伝子を導入した形質転換体を培養し、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で示されるアミノ酸配列において、下記 (A-1) ~ (A-11) からなる群より選ばれる少なくとも1つのアミノ酸置換を有するアミノ酸配列からなり、かつアシル-ACPチオエステラーゼ活性を有するタンパク質。

(B) 配列番号1で示されるアミノ酸配列と同一性が85%以上のアミノ酸配列において、下記 (B-1) ~ (B-11) からなる群より選ばれる少なくとも1つのアミノ酸置換を有するアミノ酸配列からなり、かつアシル-ACPチオエステラーゼ活性を有するタンパク質。

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

(A-1) 配列番号1の257位のロイシンがイソロイシンに置換。

(A-2) 配列番号1の251位のスレオニンがアルギニンに置換。

(A-3) 配列番号1の251位のスレオニンがリジンに置換。

(A-4) 配列番号1の251位のスレオニンがヒスチジンに置換。

(A-5) 配列番号1の254位のトリプトファンがイソロイシンに置換。

(A-6) 配列番号1の254位のトリプトファンがチロシンに置換。

(A-7) 配列番号1の257位のロイシンがメチオニンに置換。

(A-8) 配列番号1の257位のロイシンがバリンに置換。

(A-9) 配列番号1の257位のロイシンがフェニルアラニンに置

換。

(A-10) 配列番号1の266位のバリンがシステインに置換。

(A-11) 配列番号1の271位のトリプトファンがチロシンに置換。

(B-1) 配列番号1の257位に相当する位置のアミノ酸がイソロイシンに置換。

(B-2) 配列番号1の251位に相当する位置のアミノ酸がアルギニンに置換。

(B-3) 配列番号1の251位に相当する位置のアミノ酸がリジンに置換。

(B-4) 配列番号1の251位に相当する位置のアミノ酸がヒスチジンに置換。

(B-5) 配列番号1の254位に相当する位置のアミノ酸がイソロイシンに置換。

(B-6) 配列番号1の254位に相当する位置のアミノ酸がチロシンに置換。

(B-7) 配列番号1の257位に相当する位置のアミノ酸がメチオニンに置換。

(B-8) 配列番号1の257位に相当する位置のアミノ酸がバリンに置換。

(B-9) 配列番号1の257位に相当する位置のアミノ酸がフェニルアラニンに置換。

(B-10) 配列番号1の266位に相当する位置のアミノ酸がシステインに置換。

(B-11) 配列番号1の271位に相当する位置のアミノ酸がチロシンに置換。

[請求項2]

下記タンパク質(A)～(C)からなる群より選ばれる少なくとも1つのタンパク質をコードする遺伝子を導入した形質転換体を培養し

、形質転換体の細胞内で生産される炭素原子数が8又は10の中鎖脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質の生産性を向上させる、脂質の製造方法。

(A) 配列番号1で示されるアミノ酸配列において、下記(A-1)～(A-11)からなる群より選ばれる少なくとも1つのアミノ酸置換を有するアミノ酸配列からなり、かつアシル-ACPチオエステラーゼ活性を有するタンパク質。

(B) 配列番号1で示されるアミノ酸配列と同一性が85%以上のアミノ酸配列において、下記(B-1)～(B-11)からなる群より選ばれる少なくとも1つのアミノ酸置換を有するアミノ酸配列からなり、かつアシル-ACPチオエステラーゼ活性を有するタンパク質。

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

(A-1) 配列番号1の257位のロイシンがイソロイシンに置換。

(A-2) 配列番号1の251位のスレオニンがアルギニンに置換。

(A-3) 配列番号1の251位のスレオニンがリジンに置換。

(A-4) 配列番号1の251位のスレオニンがヒスチジンに置換。

(A-5) 配列番号1の254位のトリプトファンがイソロイシンに置換。

(A-6) 配列番号1の254位のトリプトファンがチロシンに置換。

(A-7) 配列番号1の257位のロイシンがメチオニンに置換。

(A-8) 配列番号1の257位のロイシンがバリンに置換。

(A-9) 配列番号1の257位のロイシンがフェニルアラニンに置換。

(A-10) 配列番号1の266位のバリンがシステインに置換。

(A-11) 配列番号1の271位のトリプトファンがチロシンに置換。

(B-1) 配列番号1の257位に相当する位置のアミノ酸がイソロイシンに置換。

(B-2) 配列番号1の251位に相当する位置のアミノ酸がアルギニンに置換。

(B-3) 配列番号1の251位に相当する位置のアミノ酸がリジンに置換。

(B-4) 配列番号1の251位に相当する位置のアミノ酸がヒスチジンに置換。

(B-5) 配列番号1の254位に相当する位置のアミノ酸がイソロイシンに置換。

(B-6) 配列番号1の254位に相当する位置のアミノ酸がチロシンに置換。

(B-7) 配列番号1の257位に相当する位置のアミノ酸がメチオニンに置換。

(B-8) 配列番号1の257位に相当する位置のアミノ酸がバリンに置換。

(B-9) 配列番号1の257位に相当する位置のアミノ酸がフェニルアラニンに置換。

(B-10) 配列番号1の266位に相当する位置のアミノ酸がシステインに置換。

(B-11) 配列番号1の271位に相当する位置のアミノ酸がチロシンに置換。

[請求項3]

下記タンパク質(A)～(C)からなる群より選ばれる少なくとも1つのタンパク質をコードする遺伝子を導入した形質転換体を培養し、形質転換体の細胞内で生産される全脂肪酸に占める炭素原子数が8又は10の中鎖脂肪酸の割合を増加させる、脂肪酸組成を改変する方

法。

(A) 配列番号1で示されるアミノ酸配列において、下記(A-1)～(A-11)からなる群より選ばれる少なくとも1つのアミノ酸置換を有するアミノ酸配列からなり、かつアシル-ACPチオエステラーゼ活性を有するタンパク質。

(B) 配列番号1で示されるアミノ酸配列と同一性が85%以上のアミノ酸配列において、下記(B-1)～(B-11)からなる群より選ばれる少なくとも1つのアミノ酸置換を有するアミノ酸配列からなり、かつアシル-ACPチオエステラーゼ活性を有するタンパク質。

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

(A-1) 配列番号1の257位のロイシンがイソロイシンに置換。

(A-2) 配列番号1の251位のスレオニンがアルギニンに置換。

(A-3) 配列番号1の251位のスレオニンがリジンに置換。

(A-4) 配列番号1の251位のスレオニンがヒスチジンに置換。

(A-5) 配列番号1の254位のトリプトファンがイソロイシンに置換。

(A-6) 配列番号1の254位のトリプトファンがチロシンに置換。

(A-7) 配列番号1の257位のロイシンがメチオニンに置換。

(A-8) 配列番号1の257位のロイシンがバリンに置換。

(A-9) 配列番号1の257位のロイシンがフェニルアラニンに置換。

(A-10) 配列番号1の266位のバリンがシステインに置換。

(A-11) 配列番号1の271位のトリプトファンがチロシンに置換。

(B-1) 配列番号1の257位に相当する位置のアミノ酸がイソロイシンに置換。

(B-2) 配列番号1の251位に相当する位置のアミノ酸がアルギニンに置換。

(B-3) 配列番号1の251位に相当する位置のアミノ酸がリジンに置換。

(B-4) 配列番号1の251位に相当する位置のアミノ酸がヒスチジンに置換。

(B-5) 配列番号1の254位に相当する位置のアミノ酸がイソロイシンに置換。

(B-6) 配列番号1の254位に相当する位置のアミノ酸がチロシンに置換。

(B-7) 配列番号1の257位に相当する位置のアミノ酸がメチオニンに置換。

(B-8) 配列番号1の257位に相当する位置のアミノ酸がバリンに置換。

(B-9) 配列番号1の257位に相当する位置のアミノ酸がフェニルアラニンに置換。

(B-10) 配列番号1の266位に相当する位置のアミノ酸がシステインに置換。

(B-11) 配列番号1の271位に相当する位置のアミノ酸がチロシンに置換。

[請求項4]

前記タンパク質(A)が、下記(D-1)～(D-8)からなる群より選ばれる少なくとも1つのアミノ酸置換を有し、前記タンパク質(B)が、下記(E-1)～(E-8)からなる群より選ばれる少なくとも1つのアミノ酸置換を有する、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

(D-1) 配列番号1の106位のバリンがイソロイシンに置換。

(D-2) 配列番号1の108位のアスパラギンがリジンに置換。

(D-3) 配列番号1の108位のアスパラギンがアルギニンに置換

。

(D-4) 配列番号1の110位のバリンがイソロイシンに置換。

(D-5) 配列番号1の110位のバリンがメチオニンに置換。

(D-6) 配列番号1の110位のバリンがロイシンに置換。

(D-7) 配列番号1の110位のバリンがフェニルアラニンに置換

。

(D-8) 配列番号1の118位のシステインがイソロイシンに置換

。

(E-1) 配列番号1の106位に相当する位置のアミノ酸がイソロイシンに置換。

(E-2) 配列番号1の108位に相当する位置のアミノ酸がリジンに置換。

(E-3) 配列番号1の108位に相当する位置のアミノ酸がアルギニンに置換。

(E-4) 配列番号1の110位に相当する位置のアミノ酸がイソロイシンに置換。

(E-5) 配列番号1の110位に相当する位置のアミノ酸がメチオニンに置換。

(E-6) 配列番号1の110位に相当する位置のアミノ酸がロイシンに置換。

(E-7) 配列番号1の110位に相当する位置のアミノ酸がフェニルアラニンに置換。

(E-8) 配列番号1の118位に相当する位置のアミノ酸がイソロイシンに置換。

[請求項5]

前記タンパク質(A)が、前記(A-1)のアミノ酸置換、並びに

前記 (D-1) ~ (D-8) からなる群より選ばれる少なくとも1つのアミノ酸置換を有し、前記タンパク質 (B) が、前記 (B-1) のアミノ酸置換、並びに下記 (E-1) ~ (E-8) からなる群より選ばれる少なくとも1つのアミノ酸置換、を有する、請求項4記載の方法。

[請求項6] 前記形質転換体が、微生物の形質転換体である、請求項1~5のいずれか1項記載の方法。

[請求項7] 前記微生物が大腸菌である、請求項6記載の製造方法。

[請求項8] 前記微生物がシアノバクテリアである、請求項6記載の製造方法。

[請求項9] 前記脂肪酸又は脂質が、炭素原子数が8又は10の中鎖脂肪酸又はその脂肪酸エステル化合物を含む、請求項1~8のいずれか1項記載の方法。

[請求項10] 下記タンパク質 (A) ~ (C)。

(A) 配列番号1で示されるアミノ酸配列において、下記 (A-1) ~ (A-11) からなる群より選ばれる少なくとも1つのアミノ酸置換を有するアミノ酸配列からなり、かつアシル-ACPチオエステラーゼ活性を有するタンパク質。

(B) 配列番号1で示されるアミノ酸配列と同一性が85%以上のアミノ酸配列において、下記 (B-1) ~ (B-11) からなる群より選ばれる少なくとも1つのアミノ酸置換を有するアミノ酸配列からなり、かつアシル-ACPチオエステラーゼ活性を有するタンパク質。

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

(A-1) 配列番号1の257位のロイシンがイソロイシンに置換。

(A-2) 配列番号1の251位のスレオニンがアルギニンに置換。

(A-3) 配列番号1の251位のスレオニンがリジンに置換。

- (A-4) 配列番号1の251位のスレオニンがヒスチジンに置換。
- (A-5) 配列番号1の254位のトリプトファンがイソロイシンに置換。
- (A-6) 配列番号1の254位のトリプトファンがチロシンに置換。
- (A-7) 配列番号1の257位のロイシンがメチオニンに置換。
- (A-8) 配列番号1の257位のロイシンがバリンに置換。
- (A-9) 配列番号1の257位のロイシンがフェニルアラニンに置換。
- (A-10) 配列番号1の266位のバリンがシステインに置換。
- (A-11) 配列番号1の271位のトリプトファンがチロシンに置換。
- (B-1) 配列番号1の257位に相当する位置のアミノ酸がイソロイシンに置換。
- (B-2) 配列番号1の251位に相当する位置のアミノ酸がアルギニンに置換。
- (B-3) 配列番号1の251位に相当する位置のアミノ酸がリジンに置換。
- (B-4) 配列番号1の251位に相当する位置のアミノ酸がヒスチジンに置換。
- (B-5) 配列番号1の254位に相当する位置のアミノ酸がイソロイシンに置換。
- (B-6) 配列番号1の254位に相当する位置のアミノ酸がチロシンに置換。
- (B-7) 配列番号1の257位に相当する位置のアミノ酸がメチオニンに置換。
- (B-8) 配列番号1の257位に相当する位置のアミノ酸がバリンに置換。

(B-9) 配列番号1の257位に相当する位置のアミノ酸がフェニルアラニンに置換。

(B-10) 配列番号1の266位に相当する位置のアミノ酸がシステインに置換。

(B-11) 配列番号1の271位に相当する位置のアミノ酸がチロシンに置換。

[請求項11]

前記タンパク質(A)が、下記(D-1)～(D-8)からなる群より選ばれる少なくとも1つのアミノ酸置換を有し、前記タンパク質(B)が、下記(E-1)～(E-8)からなる群より選ばれる少なくとも1つのアミノ酸置換を有する、請求項10に記載のタンパク質。

(D-1) 配列番号1の106位のバリンがイソロイシンに置換。

(D-2) 配列番号1の108位のアスパラギンがリジンに置換。

(D-3) 配列番号1の108位のアスパラギンがアルギニンに置換。

(D-4) 配列番号1の110位のバリンがイソロイシンに置換。

(D-5) 配列番号1の110位のバリンがメチオニンに置換。

(D-6) 配列番号1の110位のバリンがロイシンに置換。

(D-7) 配列番号1の110位のバリンがフェニルアラニンに置換。

(D-8) 配列番号1の118位のシステインがイソロイシンに置換。

(E-1) 配列番号1の106位に相当する位置のアミノ酸がイソロイシンに置換。

(E-2) 配列番号1の108位に相当する位置のアミノ酸がリジンに置換。

(E-3) 配列番号1の108位に相当する位置のアミノ酸がアルギ

ニンに置換。

(E-4) 配列番号1の110位に相当する位置のアミノ酸がイソロイシンに置換。

(E-5) 配列番号1の110位に相当する位置のアミノ酸がメチオニンに置換。

(E-6) 配列番号1の110位に相当する位置のアミノ酸がロイシンに置換。

(E-7) 配列番号1の110位に相当する位置のアミノ酸がフェニルアラニンに置換。

(E-8) 配列番号1の118位に相当する位置のアミノ酸がイソロイシンに置換。

[請求項12] 前記タンパク質(A)が、前記(A-1)のアミノ酸置換、並びに前記(D-1)～(D-8)からなる群より選ばれる少なくとも1つのアミノ酸置換を有し、前記タンパク質(B)が、前記(B-1)のアミノ酸置換、並びに下記(E-1)～(E-8)からなる群より選ばれる少なくとも1つのアミノ酸置換、を有する、請求項11記載のタンパク質。

[請求項13] 請求項10～12のいずれか1項記載のタンパク質をコードする遺伝子。

[請求項14] 請求項13記載の遺伝子を含む、組換えベクター又はDNAカセット。

[請求項15] 請求項13又は14記載の遺伝子、組換えベクター又はDNAカセットを含んでなる、形質転換体。

[請求項16] 前記形質転換体が、微生物の形質転換体である、請求項15に記載の形質転換体。

[請求項17] 前記微生物が大腸菌である、請求項16に記載の形質転換体。

[請求項18] 前記微生物がシアノバクテリアである、請求項16に記載の形質転換体。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/036984

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. C12N15/55 (2006.01) i, C12N1/21 (2006.01) i, C12N9/18 (2006.01) i,
C12P7/64 (2006.01) i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl. C12N15/55, C12N1/21, C12N9/18, C12P7/64

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

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2018
Registered utility model specifications of Japan	1996-2018
Published registered utility model applications of Japan	1994-2018

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), UniProt/GeneSeq, WPIDS/WPIX (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2016/014968 A1 (SOLAZYME, INC.) 28 January 2016, example 3 & US 2016/0032332 A1 & US 2018/0148747 A1 & EP 3172320 A1	1-18
Y	US 2016/0355793 A1 (IOWA STATE UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION, INC.) 08 December 2016, fig. 16, 17, paragraphs [0054], [0138], example 12 & US 2014/0186920 A1 & US 2013/0029387 A1 & US 2015/0322466 A1	1-18
Y	WO 2011/008565 A1 (SYNTHETIC GENOMICS, INC.) 20 January 2011, paragraph [0075], examples & US 2011/0020883 A1 & US 2015/0147790 A1 & EP 2448955 A1	1-18

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
20 December 2018 (20.12.2018)

Date of mailing of the international search report
08 January 2019 (08.01.2019)

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

Authorized officer

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N15/55(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N9/18(2006.01)i, C12P7/64(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N15/55, C12N1/21, C12N9/18, C12P7/64

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2018年
日本国実用新案登録公報	1996-2018年
日本国登録実用新案公報	1994-2018年

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Cplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), UniProt/GeneSeq, WPIDS/WPIX (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	WO 2016/014968 A1 (SOLAZYME, INC.) 2016.01.28, Example 3 & US 2016/0032332 A1 & US 2018/0148747 A1 & EP 3172320 A1	1-18
Y	US 2016/0355793 A1 (IOWA STATE UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION, INC.) 2016.12.08, FIG. 16, 17, [0054], [0138], Example 12 & US 2014/0186920 A1 & US 2013/0029387 A1 & US 2015/0322466 A1	1-18

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

20.12.2018

国際調査報告の発送日

08.01.2019

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)

小倉 梢

4N

4504

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	WO 2011/008565 A1 (SYNTHETIC GENOMICS, INC.) 2011.01.20, [0075], Examples & US 2011/0020883 A1 & US 2015/0147790 A1 & EP 2448955 A1	1-18