

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2017 年 3 月 9 日(09.03.2017)



(10) 国際公開番号

WO 2017/038993 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 1/13 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
C12N 1/12 (2006.01) *C12R 1/89* (2006.01)
C12P 7/64 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/075875
- (22) 国際出願日: 2016 年 9 月 2 日(02.09.2016)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2015-173161 2015 年 9 月 2 日(02.09.2015) JP
- (71) 出願人: 学校法人中央大学(CHUO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1920393 東京都八王子市東中野 7 4 2-1 Tokyo (JP). 株式会社デンソー(DENSO CORPORATION) [JP/JP]; 〒4488661 愛知県刈谷市昭和町 1 丁目 1 番地 Aichi (JP).
- (72) 発明者: 原山 重明(HARAYAMA Shigeaki); 〒1128551 東京都文京区春日 1-1 3-2 7 中央大学後楽園キャンパス内 Tokyo (JP). 井出 曜子(IDE Yoko); 〒1128551 東京都文京区春日 1-1 3-2 7 中央大学後楽園キャンパス内 Tokyo (JP). 阿部 淳(ABE Jun); 〒1128551 東京都文京区春日 1-1 3-2 7 中央大学後楽園キャンパス内 Tokyo (JP). 笠井 由紀(KASAI Yuki); 〒1128551 東京都文京区春日 1-1 3-2 7 中央大学後楽園キャンパス内 Tokyo (JP). 藏野 憲秀(KURANO Norihide); 〒4488661 愛知県刈谷市昭和町 1 丁目 1 番地 株式会社デンソー内 Aichi (JP).
- (74) 代理人: 平木 祐輔, 外(HIRAKI Yusuke et al.); 〒1056232 東京都港区愛宕 2 丁目 5 番 1 号 愛宕

グリーンヒルズMORIタワー32階 Tokyo (JP).

- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 規則 13 の 2 に基づいて明細書とは別に提出された、寄託された生物材料に関する表示 (規則 13 の 2.4(d)(i) 及び 48.2(a)(viii))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

(54) Title: GENETICALLY MODIFIED STRAIN OF EUKARYOTIC MICROALGA HAVING IMPROVED TRIGLYCERIDE PRODUCTIVITY, AND USE THEREOF

(54) 発明の名称: トリグリセリド生産性が改良された真核微細藻類遺伝子改変株及びその利用

(57) Abstract: The objective of the present invention is to provide a eukaryotic microalga which has been genetically manipulated so that more of the anabolites produced by photosynthesis are directed into triglyceride (triacylglycerol, TAG) synthesis. Specifically, the present invention concerns a genetically modified strain of eukaryotic microalga in which the gene that encodes the AGL1 protein is expressed at high levels, or, in addition to said gene, the gene that encodes the FAT1 protein and/or the gene that encodes the DGAT2 protein are also expressed in high levels, wherein TAG productivity is improved compared to the parent strain.

(57) 要約: 本発明は、光合成によって生産された同化産物がより多くトリグリセリド(=トリアシルグリセロール:TAG)合成に向かうように遺伝子操作された真核微細藻類を提供することを目的とし、具体的には、AGL1 タンパク質をコードする遺伝子を高発現させた、又は当該遺伝子に加えて FAT1 タンパク質をコードする遺伝子及び/若しくは DGAT2 タンパク質をコードする遺伝子をさらに高発現させた真核微細藻類遺伝子改変株であって、親株と比較して TAG 生産性が向上している、前記真核微細藻類遺伝子改変株に関する。



WO 2017/038993 A1

明 細 書

発明の名称：

トリグリセリド生産性が改良された真核微細藻類遺伝子改変株及びその利用

技術分野

[0001] 本発明は、光合成によって生産された同化産物がより多くトリグリセリド(=トリアシルグリセロール(triacylglycerol): 以下、「TAG」と呼ぶ)合成に向かうように遺伝子操作された真核微細藻類及びその利用に関する。

背景技術

[0002] 単細胞性の光合成生物(以下、「微細藻類」と呼ぶ)が生産する脂肪酸、あるいは加水分解により脂肪酸を遊離するTAG等の化合物(以下、これらを総称して「脂質」と呼ぶ)を原料として、バイオディーゼル燃料をはじめとする工業・食品製品を生産する研究が、世界的に行われている。しかしながら現状では、脂質生産コストが高く、商業ベースでのバイオディーゼル燃料等の生産は困難である(非特許文献1)。そのため、バイオディーゼル燃料等の生産コスト削減のための更なる技術開発が続けられており、その1つに、微細藻類のTAG生産性の改良研究がある。

[0003] 微細藻類の多くは、光合成によって生じる同化産物の一部をデンプンあるいはTAGとして蓄積する。デンプン及びTAGの蓄積量は微細藻類の種類によって異なり、また、同じ生物でも培養条件によって異なっている。光合成同化産物がデンプン及びTAGに変換される速度と、一旦合成された貯蔵物質が分解される速度とは、生物種及び培養条件によって異なっており、それがデンプン及びTAGの蓄積量の差異となって現れると考えられる。

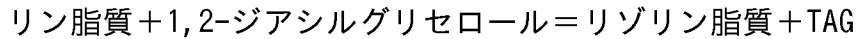
[0004] TAGの原料は、グリセロール-3-リン酸と脂肪酸である。グリセロール-3-リン酸は、グリセロールとATPとを基質として、グリセロール・キナーゼ(glycerol kinase)によって合成される。一方、脂肪酸は、葉緑体内で生合成される。

[0005] 脂肪酸生合成の最初の反応は、アシルCoAカルボキシラーゼ(acyl-CoA carbonylase)によって触媒され、アセチルCoAからマロニルCoAが作られる。マロニルCoAはアシルキャリアー・タンパク質(acyl carrier protein: ACP)と反応し、マロニルACPが作られる。マロニルACPは、アシル基がACPに結合したアシルACP(C = 2: アセチルACP、C = 4: ブチリルACP、等)と反応し、アシルACPの炭素鎖を2つ延長する。この延長反応を繰り返してアシル基の炭素鎖の長さが(最も一般的には)16になると、アシルACPチオエステラーゼ(acyl-ACP thioesterase)によってパルミチン酸(C16:0)とACPとに加水分解される。パルミチン酸はCoAと結合しパルミチルCoAとなって、葉緑体から小胞体に移動する。パルミチルCoAはさらに長鎖脂肪酸伸長酵素(very long chain fatty acid elongase)及びデサチュレース(fatty acid desaturase)の働きで、一価不飽和脂肪酸であるオレイン酸のCoAエステル(オレイルCoA: C18:1)が作られる。パルミチン酸とオレイン酸は、多くの生物で、最も含量が高い脂肪酸である。

[0006] TAGの生合成は小胞体膜上で行われる。まず、グリセロール-3-リン酸アシル転移酵素(glycerol-3-phosphate acyltransferase)によって、グリセロール-3-リン酸のsn-1の位置にアシルCoAのアシル基が付加され、リゾフォスファチジン酸が生成する。次に、リゾフォスファチジン酸アシル転移酵素(acyl glycerophosphate acyltransferase)によって、リゾフォスファチジン酸のsn-2の位置にアシルCoAのアシル基が付加されてホスファチジン酸が生成する。ホスファチジン酸はホスファチジン酸フォスファターゼ(phosphatidate phosphatase)によって脱リン酸化され、ジアシルグリセロールに変換された後、ジアシルグリセロールアシル転移酵素(diacylglycerol acyltransferase: DGAT)によってTAGが合成される。DGATは、進化的起源が異なる2つのファミリーに分類され、それぞれ、DGAT1及びDGAT2と呼ばれている。グリセロール-3-リン酸とアシルCoAからTAGが合成されるこの経路は、TGA合成のためのケネディー経路と称される。

[0007] このケネディー経路以外でもTAGは合成され、その一例がリン脂質: ジアシ

ルグリセロールアシル転移酵素(phospholipid:diacylglycerol acyltransferase)による以下の反応である：



遺伝子組換え技術を用いて、このTAG合成に関わる酵素活性を上昇させることにより、微細藻類の単位時間当たり及び単位受光面積当たりのTAG生産量(以降、「TAG生産性」と呼ぶ)を改良し、バイオディーゼル生産コストの削減に貢献しようという研究が既に幾つか行われている。

[0008] 上記のケネディー経路の最後の酵素であるDGATをコードする遺伝子を高発現させることによってTAG生産性が上昇するという報告は数多く出されている。例えば、シアノバクテリア (Cyanobacteria) に属するシネココッカス・エロンガタス (Synechococcus elongatus) PCC 7942株にグラム陰性細菌アシネトバクター(Acinetobacter)由来のDGAT遺伝子を導入することにより、シネココッカスが約2倍のTAGを蓄積するようになった(特許文献1)。

[0009] 特許文献2は、不等毛植物門(Heterokontophyta)・真正眼点藻綱(Eustigmatataceae)に属するナンノクロロプシス(Nannochloropsis)に、DGAT、リン脂質：ジアシルグリセロールアシル転移酵素あるいはフォスファチジン酸フォスファターゼをコードする遺伝子を導入しTAG含量を上昇させることを開示する。しかしながら、当該特許文献では、これらの遺伝子導入の効果の詳細が実施例には示されていない。

[0010] プレクストリン相同(Pleckstrin-homology)ドメインを持つ様々な生物由来のDGAT1遺伝子をナンノクロロプシスに導入したところ、形質転換体の脂質含量は野生株よりも増加した(特許文献3)。

[0011] ナンノクロロプシスにマウス由来のDGATを導入したところ、TAG含量が増加した(特許文献4)。

[0012] 緑色植物亜界・緑藻植物門(Chlorophyta：以下、「緑藻」と呼ぶ)に属するクラミドモナス(Chlamydomonas reinhardtii)には、上記DGAT2の遺伝子が複数存在するが(相同遺伝子)、これら相同遺伝子をクラミドモナス中で高発現させても、脂質含量の増加は認められなかった。一方、クラミドモナスのDGA

T2相同遺伝子の1つを酵母で発現させると、酵母の形質転換体は、野生株酵母よりも高いTAG生産性を示した(非特許文献2)。

[0013] 不等毛植物門・珪藻綱(Bacillariophyceae)のフェオダクチラム(*Phaeodactylum tricornutum*)のDGAT2をクローン化し、同じ株内で高発現させると、この株のTAG生産性が上昇した(非特許文献3及び4)。

[0014] TGA合成のためのケネディー経路の最初の酵素であるグリセロール-3-リン酸アシル転移酵素をコードする遺伝子を、緑藻であるロボスフェラ(*Lobosphaera incisa*)より分離し、クラミドモナスに導入・発現させたところ、TAG生産性は顕著に上昇した(非特許文献5)。

[0015] また、上記のグリセロール-3-リン酸アシル転移酵素の基質であるグリセロール-3-リン酸を合成するグリセロール・キナーゼを、珪藻フィツリフェラ(*Fistulifera solaris*)JPGC DA0580株内で高発現させることにより、TAG生産性がわずかであるが増加した(非特許文献6)。

[0016] 一方、大腸菌において、脂肪酸合成の初発酵素であるアセチルCoAカルボキシラーゼ(Acetyl-CoA carboxylase)遺伝子とアシルACPチオエステラーゼ遺伝子とを高発現させると、遊離脂肪酸含量が増加することが報告されている(非特許文献7)。

[0017] しかし、多くの研究において、アシルACPチオエステラーゼ遺伝子は、一般的な長さの炭素鎖を持つ脂肪酸(C16とC18)ではなく、やや短い脂肪酸(C10、C12とC14)の合成を促進するために使用されている。クスノキ科の植物である*Umbellularia californica*の種子には、C10やC12等の脂肪酸を含む脂質が蓄積され、それは、この植物の持つC12の炭素鎖を持つアシルACPを加水分解するアシルACPチオエステラーゼによることが明らかになっている。この、やや短い脂肪酸を加水分解するという基質特異性を持つ*U. californica*のアシルACPチオエステラーゼ遺伝子のcDNAを大腸菌に導入し、高発現させたところ、C12及びC14の遊離脂肪酸が合成され、細胞外に排出された(非特許文献8)。

[0018] 緑藻クラミドモナスに、アシルACPチオエステラーゼをコードする遺伝子と、ジアシルグリセロールアシル転移酵素(DGAT2)をコードする遺伝子を導入す

ることにより、C12脂肪酸の割合を増加させる研究が開示されている(特許文献5)。しかし、この組換え体における乾燥重量当たりのTAGの蓄積は最大で2%程度、遊離脂肪酸を含めても7%以下であった。

[0019] ところで、緑藻・トレボキシア藻(Trebouxiphyceae)綱に属するシュードココミクサ(Pseudococcomyxa) sp. KJ株(以下、「KJ株」と呼ぶ)は、温泉水より分離されたTAG生産性が非常に高い単細胞性緑藻であり(特許文献6)、特許文献7に示された開放系培養システムで培養できる。

先行技術文献

特許文献

- [0020] 特許文献1 : US 8,394,614 B2
特許文献2 : US 8,722,359 B2
特許文献3 : US 8,835,149 B2
特許文献4 : US 2014/0106417 A1
特許文献5 : 特開2014-14334号公報
特許文献6 : 特開2015-015918号公報
特許文献7 : 特開2014-117202号公報

非特許文献

- [0021] 非特許文献1 : Quinn JC, Davis R. (2015) The potentials and challenges of algae based biofuels: a review of the techno-economic, life cycle, and resource assessment modeling. *Bioresour Technol.* 184: 444-452.
非特許文献2 : Hung C-H, Ho M-Y, Kanehara K, Nakamura Y. (2013) Functional study of diacylglycerol acyltransferase type 2 family in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Lett.* 587: 2364-2370.
非特許文献3 : Niu Y-F, Zhang M-H, Li D-W, Yang W-D, Liu J-S, Bai W-B, Li H-Y. (2013) Improvement of neutral lipid and polyunsaturated fatty acid biosynthesis by overexpressing a type 2 diacylglycerol acyltransferase in marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Mar. Drugs* 11: 4558-4569.

非特許文献4: Xue J, Niu YF, Huang T, Yang WD, Liu JS, Li HY. (2015) Genetic improvement of the microalga *Phaeodactylum tricornutum* for boosting neutral lipid accumulation. *Metab Eng.* 27: 1-9.

非特許文献5: Iskandarov U, Sitnik S, Shtaida N, Didi-Cohen S, Leu S, Khozin-Goldberg I, Cohen Z, Boussiba S. (2015) Cloning and characterization of a GPAT-like gene from the microalga *Lobosphaera incisa* (Trebouxiophyceae): overexpression in *Chlamydomonas reinhardtii* enhances TAG production. *J Appl Phycol* DOI 10.1007/s10811-015-0634-1.

非特許文献6: Muto M, Tanaka M, Liang Y, Yoshino T, Matsumoto M, Tanaka T. (2015) Enhancement of glycerol metabolism in the oleaginous marine diatom *Fistulifera solaris* JPCC DA0580 to improve triacylglycerol productivity. *Biotechnol Biofuels*.8(1):4. doi: 10.1186/s13068-014-0184-9.

非特許文献7: Davis MS, Solbiati J, Cronan JE Jr. (2000) Overproduction of acetyl-CoA carboxylase activity increases the rate of fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 275:28593-28598.

非特許文献8: Voelker TA, Davies HM. Alteration of the specificity and regulation of fatty acid synthesis of *Escherichia coli* by expression of a plant medium-chain acylacyl Carrier protein thioesterase. *J Bacteriol* 1994;176:7320-737.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0022] 上述のように、KJ株は屋外での大量培養に適した株であり、脂質の商業生産の原料として最も有望な株の1つであると言える。しかしながら、そのTAG生産性を更に改良し、TAG生産コストを削減することが望まれていた。

[0023] そこで、本発明は、TAG生産性が改良された、KJ株を含む真核微細藻類を遺伝子操作によって作製し、当該真核微細藻類遺伝子改変株を利用したTAG生産方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0024] 上記課題を解決するため鋭意研究を行った結果、KJ株において、3つの遺伝子、すなわち、(i)デンプンの分解に関与しているアルファ・グリコシダーゼ (alpha-glucosidase: AGL1) をコードする遺伝子、(ii)葉緑体内でアシルACPとして合成される脂肪酸を加水分解し、小胞体上でのTAG合成経路に脂肪酸を供給するアシルACPチオエステラーゼ (acyl-ACP thioesterase: FAT1) をコードする遺伝子、及び(iii)TAG合成経路の最終段階の酵素であるDGAT2をコードする相同遺伝子の1つ (DGAT2d)、の発現が、TAG合成時に最も強く誘導されることを明らかにした。更に、これらの3つの遺伝子を適当なプロモーターの下流にクローン化し、KJ株に導入したところ、形質転換体のTAG生産性が有意に改良され、本発明を完成するに至った。これらの3つの遺伝子は微細藻類の光合成同化産物の代謝に広く関わる酵素であり、KJ株で得られたこの結果は、他の多くの真核微細藻類でも同様に再現できると考えられる。

[0025] すなわち、本発明は以下を包含する。

(1) AGL1タンパク質をコードする遺伝子を高発現させた真核微細藻類遺伝子改変株であって、親株と比較してTAG生産性が向上しており、前記AGL1タンパク質が配列番号4に示すアミノ酸配列と少なくとも50%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有し、且つアルファ・グリコシダーゼ活性を有するタンパク質である、前記真核微細藻類遺伝子改変株。

(2) さらに、FAT1タンパク質をコードする遺伝子及び/又はDGAT2タンパク質をコードする遺伝子を高発現させた、(1)記載の真核微細藻類遺伝子改変株であって、前記FAT1タンパク質が配列番号8に示すアミノ酸配列と少なくとも50%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有し、且つアシルACPチオエステラーゼ活性を有するタンパク質であり、前記DGAT2タンパク質が配列番号12に示すアミノ酸配列と少なくとも50%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有し、且つジアシルグリセロールアシル転移酵素活性を有するタンパク質である、前記真核微細藻類遺伝子改変株。

(3) 前記遺伝子が、遺伝子高発現を担保するプロモーターに機能的に連結

されている、（１）又は（２）記載の真核微細藻類遺伝子改変株。

（４）トレボキシア藻綱に属する、（１）～（３）のいずれか１記載の真核微細藻類遺伝子改変株。

（５）コッコミクサ(*Coccomyxa*)属又はシュードコッコミクサ(*Pseudococcomyxa*)属に属する、（４）記載の真核微細藻類遺伝子改変株。

（６）前記遺伝子が、緑藻に属する株に由来する、（１）～（５）のいずれか１記載の真核微細藻類遺伝子改変株。

（７）前記遺伝子が、トレボキシア藻綱に属する株に由来する、（６）記載の真核微細藻類遺伝子改変株。

（８）前記遺伝子が、コッコミクサ属又はシュードコッコミクサ属に属する株に由来する、（７）記載の真核微細藻類遺伝子改変株。

（９）（１）～（８）のいずれか１記載の真核微細藻類遺伝子改変株を培養する工程を含む、TAG生産方法。

[0026] 本明細書は本願の優先権の基礎となる日本国特許出願番号2015-173161号の開示内容を包含する。

発明の効果

[0027] 本発明により、TAG生産性が向上した真核微細藻類遺伝子改変株を作出することが可能となる。また、本発明に係る真核微細藻類遺伝子改変株を培養することにより、バイオ燃料等に供する脂質の生産コストを大幅に削減することが可能となる。

図面の簡単な説明

[0028] [図1]100 mM NaCl添加後のKJ株培養での増殖、TAG及びデンプン含有量の変化を示すグラフである。

[図2]KJ株のAGL1遺伝子、FAT1遺伝子、DGAT2d遺伝子の発現に対するNaClの影響を示すグラフである。

[図3]KJ株のAGL1遺伝子、FAT1遺伝子、DGAT2d遺伝子の発現に対する窒素欠乏条件の影響を示すグラフである。

[図4]pAGL1、pFAT1、pDGAT2d及びpble-PeEGFP-T1Aプラスミドの構造を示す模

式図である。

[図5]KJ株とpAGL1プラスミド形質転換体3株(KJoxAGL1-6013, 6060, 6133)の、細胞乾燥重量(DW)当たりのTAG含有率(%DW)、細胞乾燥重量(DW)当たりのデンプン含有率(%DW)、培養液当たりの細胞乾燥重量(g/L)、TAG生産量(g/L)とTAG生産性(%)を示すグラフである。

[図6-1]KJ株とpFAT1プラスミド形質転換体6株(KJoxFAT1-313, 325, 428, 520, 585, 643)の、細胞乾燥重量当たりのTAG含有率(%DW)、細胞乾燥重量当たりのデンプン含有率(%DW)、培養液当たりの細胞乾燥重量(g/L)、TAG生産量(g/L)とTAG生産性(%)を示すグラフである。

[図6-2]図6-1の続きである。

[図6-3]図6-2の続きである。

[図7-1]KJ株とpDGAT2dプラスミド形質転換体4株(KJoxDGAT2d-567, 5617, 5650, 5822)の培養7日目(7d)、14日目(14d)の細胞乾燥重量当たりのTAG含有率(%DW)、細胞乾燥重量当たりのデンプン含有率(%DW)、培養液当たりの細胞乾燥重量(g/L)、TAG生産量(g/L)とTAG生産性(%)を示すグラフである。

[図7-2]図7-1の続きである。

[図7-3]図7-2の続きである。

[図8]KJ株とKJ株にKJDGAT2d cDNA発現カセットを導入したKJoxDGAT2d-5822株、KJ株にKJFAT1 cDNA発現カセットを導入したKJoxFAT1-325株、KJoxFAT1-325株にKJDGAT2d cDNA発現カセットを導入したKJoxFD-2643株の細胞乾燥重量当たりのTAG含有率(%DW)の平均値と標準誤差($n = 3$)を示すグラフである。

[図9-1]KJ株、KJoxFD-2643株(KJFAT1 cDNA及びKJDGAT2d高発現株)、KJoxAGL1-6060株(KJAGL1 cDNA高発現株)、及びKJoxAFD-41417株(KJAGL1 cDNA、KJFAT1 cDNA及びKJDGAT2d高発現株)の細胞乾燥重量当たりのTAG含有率(%DW)、細胞乾燥重量当たりのデンプン含有率(%DW)、培養液当たりの細胞乾燥重量(g/L)、TAG生産量(g/L)、1日当たりのTAG生産性(g/L/d)の平均値と標準誤差($n = 3$)を示すグラフである。

[図9-2]図9-1の続きである。

[図9-3]図9-2の続きである。

発明を実施するための形態

[0029] 本発明は、AGL1遺伝子、又はAGL1遺伝子に加えてさらにFAT1遺伝子及び/若しくはDGAT2遺伝子を、真核微細藻類野生株又は当該野生株に由来する変異株に導入(以下、遺伝子導入される株を「親株」と呼ぶ)した結果、TAG生産性が親株よりも有意に(例えば15%以上、好ましくは30%以上、特に好ましくは45%以上)向上した真核微細藻類遺伝子改変株に関する。

[0030] 真核微細藻類由来のTAGを原料としたバイオ燃料等の生産コストを削減するための最重要課題の一つは、真核微細藻類のTAG生産性の大幅向上である。本発明者等は、KJ株由来のAGL1タンパク質、FAT1タンパク質及び/又はDGAT2タンパク質をコードする遺伝子をKJ株で高発現させることにより、この緑藻のTAG生産性を大幅に改善できることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0031] 上記知見から、遺伝子操作によって、AGL1遺伝子、又はAGL1遺伝子に加えてさらにFAT1遺伝子及び/若しくはDGAT2遺伝子(以下、これらの遺伝子を合わせて「本発明に係る遺伝子」と呼ぶ場合がある)を高発現させることによって真核微細藻類のTAG生産性を向上させること、及び、TAG生産性向上株を培養することにより、バイオ燃料等に供するTAGの生産コストを大幅に削減することが可能となる。

[0032] 本発明において、真核微細藻類としては、緑藻、珪藻(diatom又はBacillariophyceae)、真正眼点藻綱(Eustigmatophyceae)等に属する真核微細藻類を挙げることができる。

[0033] 緑藻としては、例えばトレボキシア藻綱に属する緑藻が挙げられる。トレボキシア藻綱に属する緑藻としては、例えば、トレボキシア(*Trebouxia*)属、クロレラ(*Chlorella*)属、ボトリオコッカス(*Botryococcus*)属、コリシスチス(*Choricystis*)属、コッコミクサ(*Coccomyxa*)属、シュードコッコミクサ(*Pseudococcomyxa*)属に属する緑藻が挙げられる。トレボキシア藻綱に属する具体的な菌株としては、KJ株が挙げられる。KJ株は、平成25年(2013年)6月4日付で独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許生物寄託センター(NITE-IP0D)(〒

292-0818日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 120号室) に受託番号FERM P-22254として寄託され、さらに受託番号FERM BP-22254としてブダペスト条約に基づく国際寄託へ移管されている。

[0034] トレボキシア藻綱に属する緑藻以外の緑藻としては、例えばテトラセルミス(*Tetraselmis*)属、アンキストロデスムス(*Ankistrodesmus*)属、ドラニエラ(*Dunalliella*)属、ネオクロリス(*Neochloris*)属、クラミドモナス属、イカダモ(=セネデスムス : *Scenedesmus*)属等に属する緑藻が挙げられる。

[0035] 更に珪藻としては、フィストウリフェラ(*Fistulifera*)属、フェオダクチラム属、タラシオシラ(*Thalassiosira*)属、シクロテラ(*Cyclotella*)属、シリンドロティカ(*Cylindrotheca*)属、スケルトネマ(*Skeletonema*)属等に属する真核微細藻類を挙げることができる。さらに、真正眼点藻綱としては、ナンノクロロプシス属が挙げられる。

[0036] 本発明においては、上述の真核微細藻類を親株として、本発明に係る遺伝子を高発現させることで、本発明に係る真核微細藻類遺伝子改変株を得ることができる。

[0037] 本発明において、AGL1遺伝子としては、例えばKJ株由来のAGL1遺伝子(遺伝子塩基配列 : 配列番号 1、mRNA塩基配列 : 配列番号 2、アミノ酸配列 : 配列番号 3)又はその相同体が挙げられる。具体的には、AGL1遺伝子としては、配列番号 4 に示すアミノ酸配列(すなわち、配列番号 3 における215番目~783番目のアミノ酸配列に相当する保存性の高いアミノ酸配列)と少なくとも50%、好ましくは、少なくとも65%、特に好ましくは、少なくとも80%、最も好ましくは、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有し、且つアルファ・グリコシダーゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子が挙げられる。また、AGL1遺伝子としては、配列番号 3 に示すアミノ酸配列と少なくとも50%、好ましくは、少なくとも65%、特に好ましくは、少なくとも80%、最も好ましくは、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有し、且つアルファ・グリコシダーゼ活性を有するタンパク質をコ

ードする遺伝子が挙げられる。ここで、アルファ・グリコシダーゼ活性とは、デンプンを非還元末端から加水分解し、D-グルコースを切り出す酵素活性を意味する。

[0038] FAT1遺伝子としては、例えばKJ株由来のFAT1遺伝子(遺伝子塩基配列：配列番号5、mRNA塩基配列：配列番号6、アミノ酸配列：配列番号7)又はその相同体が挙げられる。具体的には、FAT1遺伝子としては、配列番号8に示すアミノ酸配列(すなわち、配列番号7における78番目～283番目のアミノ酸配列に相当する保存性の高いアミノ酸配列)と少なくとも50%、好ましくは、少なくとも65%、特に好ましくは、少なくとも80%、最も好ましくは、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有し、且つアシルACPチオエステラーゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子が挙げられる。また、FAT1遺伝子としては、配列番号7に示すアミノ酸配列と少なくとも50%、好ましくは、少なくとも65%、特に好ましくは、少なくとも80%、最も好ましくは、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有し、且つアシルACPチオエステラーゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子が挙げられる。ここで、アシルACPチオエステラーゼ活性とは、アシル-ACPのチオエステル結合を加水分解する酵素活性を意味する。

[0039] DGAT2遺伝子としては、例えばKJ株由来のDGAT2d遺伝子(遺伝子塩基配列：配列番号9、mRNA塩基配列：配列番号10、アミノ酸配列：配列番号11)又はその相同体が挙げられる。具体的には、DGAT2遺伝子としては、配列番号12に示すアミノ酸配列(すなわち、配列番号11における123番目～322番目のアミノ酸配列に相当する保存性の高いアミノ酸配列)と少なくとも50%、好ましくは、少なくとも65%、特に好ましくは、少なくとも80%、最も好ましくは、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有し、且つジアシルグリセロールアシル転移酵素活性を有するタンパク質をコードする遺伝子が挙げられる。また、DGAT2遺伝子としては、配列番号11に示すアミノ酸配列と少なくとも50%、好ましくは

、少なくとも65%、特に好ましくは、少なくとも80%、最も好ましくは、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有し、且つジアシルグリセロールアシル転移酵素活性を有するタンパク質をコードする遺伝子が挙げられる。ここで、ジアシルグリセロールアシル転移酵素活性とは、アシルCoAに由来するアシル基がジアシルグリセロールに付加し、TAGが合成される酵素活性を意味する。

[0040] 本発明に係る遺伝子は、例えば、上記で説明した緑藻に属する株、好ましくはトレボキシア藻綱に属する株、特に好ましくはコッコミクサ属又はシェードコッコミクサ属に属する株に由来するものであってよい。

[0041] また、本発明においては、好ましくは、AGL1遺伝子、FAT1遺伝子及びDGAT2遺伝子のうち2つ又は3つ全てを高発現させる。

[0042] 本発明に係る遺伝子によりコードされるタンパク質を真核微細藻類細胞内で高発現させるための多くの方法が存在する。最も一般的な方法は、高発現させたい遺伝子に機能的に連結させた(例えば、当該遺伝子の上流に)遺伝子高発現を担保するプロモーター(構成的に高発現するプロモーター)を配したコンストラクトを試験管内で構築し、これを宿主に導入する方法である。目的によっては、強度と特性(構成的又は誘導性)の異なるプロモーターを使用することができる。

[0043] 転写後、mRNA前駆体はキャッピング、スプライシング、ポリ(A)付加等の転写後修飾を受けた後、核より細胞質に移行する。この転写後修飾の効率を上げて遺伝子を高発現させる試みは、プロモーターの利用ほどには行われていない。

[0044] 一方、mRNAの翻訳効率の改良については、複数の技術が存在する。翻訳開始の効率は開始コドンより上流の配列(5'-UTR)に影響される(Kim et al., 2014, Nucleic Acids Res, 42, 485)ので、5'-UTR配列の最適化で翻訳効率を改良することが可能である。また、mRNAのコドン使用頻度を最適化することによって高発現を達成する手法は広く使われている。すなわち、コドン最適化した遺伝子を試験管内で作製し、これを宿主に導入することによって翻訳さ

れるタンパク質の量を増加させることができる。

[0045] 以下に述べるように、KJ株の本発明に係る遺伝子は、窒素欠乏又は塩ストレス等によって誘導される。当該遺伝子の発現を正又は負に制御する転写因子によって、この誘導が制御されていると考えられる。この転写因子を同定しその活性化の機構を明らかにすることで、その機構を利用した本発明に係る遺伝子の高発現を達成することができる。一般に、高発現させたい遺伝子がある転写因子によって正に制御されている場合、この転写因子を高発現させることで、目的遺伝子も高発現させることができる。一方、高発現させたい遺伝子がある転写因子によって負に制御されている場合は、逆に、この負の転写因子の発現又は活性を失くすことで、目的遺伝子の高発現を達成させることができる。あるいは、この転写因子を活性化又は不活性化するためのシグナル伝達系を操作することによっても、目的遺伝子の高発現を達成できる。

[0046] 近年、遺伝子の発現が周辺の染色体構造によって正及び負に制御されることが次第に明らかになってきた。このことから、高発現させたい遺伝子周辺の染色体構造を、例えばインスレーターを導入することによって変化させ、遺伝子の高発現を達成することができる。

[0047] 具体的な例として、下記の実施例に示すように、本発明に係る遺伝子を強力なプロモーター(例えば、KJ株由来のEF1 α 遺伝子のプロモーター(配列番号13))の下流にクローン化し、それをKJ株等の真核微細藻類に導入することによって本発明に係る真核微細藻類遺伝子改変株を作製する方法である。

[0048] なお、本発明に係る真核微細藻類遺伝子改変株の例として、実施例に示す、KJ株に由来する本発明に係る遺伝子3つ全てをKJ株において高発現させたKJ oxAFD-41417株が、平成27年(2015年)8月27日付で独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許生物寄託センター(NITE-IP0D)(〒292-0818日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 120号室)に受託番号FERM P-22294として寄託され、さらに受託番号FERM BP-22294としてブダペスト条約に基づく国際寄託へ移管されている。

[0049] さらに、本発明は、以上に説明した本発明に係る真核微細藻類遺伝子改変株を大量培養し、TAGを生産する方法である。大量培養法としては、既に確立されている特許文献7に記載の培養法等を用いることができる。具体的には、尿素を窒素源とし、pHが4以下である培地を用いて、微細藻類を培養する方法である。この培養方法によれば、窒素源を尿素とすることで、窒素分消費によるpHの変動は最小限となる。また、pH4以下の培養液中にCO₂を導入しても重炭酸イオンがほとんど生じないので、培養液のpHが変動しにくい特徴もある。このように培養液のpHを安定的に4以下に保つことが出来るので、他の微細藻類や原生生物の増殖を抑制することができる。

[0050] 培養後、例えば培養物からヘキサン抽出等によって、TAGを含む脂質を得ることができる。

実施例

[0051] 以下、実施例を用いて本発明をより詳細に説明するが、本発明の技術的範囲はこれら実施例に限定されるものではない。

[0052] なお、以下の実施例において、AGL1遺伝子は、KJ株由来のAGL1遺伝子(遺伝子塩基配列：配列番号1、mRNA塩基配列：配列番号2、アミノ酸配列：配列番号3)であり、FAT1遺伝子は、KJ株由来のFAT1遺伝子(遺伝子塩基配列：配列番号5、mRNA塩基配列：配列番号6、アミノ酸配列：配列番号7)であり、且つDGAT2遺伝子は、KJ株由来のDGAT2d遺伝子(遺伝子塩基配列：配列番号9、mRNA塩基配列：配列番号10、アミノ酸配列：配列番号11)である。

[0053] [実施例1] TAG生産性に関与する遺伝子のRNA-seqによる解析

多くの微細藻類では、窒素欠乏条件で、あるいはそれに加えNaClを100 mM程度培地に添加することによって、TAG生産を促進することができる。KJ株及びKJ株に近縁のシュードコリスティス・エリプソイディア(*Pseudochoricystis ellipsoidea*)Obi株(以下、「Obi株」と呼ぶ：Sato et al., 2010, J Jpn Inst Energ, 89, 909)においても、窒素欠乏条件下での培養、及びNaCl添加後の培養の双方において、TAG含有量の増加が見られ、一方でデンプンの蓄積量は減少した。100 mM NaCl添加後のKJ株培養での増殖、TAG及びデンプン

含有量の変化を図1に示す。

[0054] 具体的には、KJ株を、A6培地 [2.5 mM (NH₂)₂CO, 378 μM (NH₄)₂SO₄, 405 μM MgSO₄, 265 μM KH₂PO₄, 264 μM K₂HPO₄, 61.2 μM CaCl₂, 1.20 μM CuSO₄, 1.13 μM H₃BO₃, 1.04 μM ZnSO₄, 0.622 μM MnSO₄, 0.294 μM CoCl₂, 12.4 nM Na₂MoO₄, 0.4% (v/v) Fe solution (3 g/L citric acid, 4.9 g/L ammonium ferric citrate, 0.5 g/L EDTA-2Na)] を滅菌水で2倍に希釈した培地 (1/2 A6培地) を用いた培養液でOD₇₅₀ = 3になるまで培養し、NaClを0あるいは100 mM添加してから0時間後、24時間後、72時間後のサンプルの、細胞乾燥重量(g/L)と、細胞乾燥重量当たりのTAG重量およびデンプン重量(%DW)とを測定した。図1において、黒塗りの棒グラフは、NaCl添加無し、白塗りの棒グラフは100 mM NaCl添加での結果である。油分含量測定はNMRを用いて以下の条件で行った。細胞を8,000 rpm、5分以上の遠心分離で収穫し、凍結乾燥させた後、40 mg程度を量りとり、Oxford Instrumets社製モデルMQC油分測定装置で単位細胞乾燥重量当たりの油分含量を測定した。検量線は、日本薬局方のオリーブ油を標準物質として作成した。

[0055] 図1に示すように、NaCl添加によって増殖はわずかに促進された。一方、TAG含量は有意に増加し、デンプン含量は有意に減少した。

[0056] また、植物の代謝経路データベース(<http://www.plantcyc.org/>)を利用して、脂質代謝やデンプン代謝に関わる酵素のアミノ酸配列を得た。これらのアミノ酸配列をqueryとして、KJ株やObi株のゲノム配列あるいはトランスクリプトーム解析(RNA-seq)で得られたmRNA配列に対してtblastn検索を行い、KJ株及びObi株の脂質代謝やデンプン代謝に関わる酵素のアミノ酸配列とその遺伝子とを同定した。また、それらの遺伝子の発現量と発現変化をRNA-seq結果を用いて解析した。

[0057] その結果、NaCl添加によって、デンプンの分解に関わるアルファ・グルコシダーゼ(AGL1)遺伝子が、KJ株、Obi株とで共通して強く発現誘導されることが分かった。また、脂肪酸合成の最終段階で働くアシルACPチオエステラーゼ(FAT1)遺伝子と、TAG合成のためのケネディー経路の最終段階で働くジアシル

グリセロール・アシル転移酵素(DGAT)の同義遺伝子の一つであるDGAT2dの発現も、NaCl添加によって強く誘導されていた。

[0058] 図2に、NaClを0及び100 mM添加した時の、KJ株のAGL1、FAT1、DGAT2d遺伝子発現を示す。具体的には、KJ株を、図1と同様に1/2 A6培地を用いた培養液で $OD_{750} = 3$ になるまで培養し、NaClを0あるいは100 mM添加してから0時間後、24時間後、48時間後のサンプルのRNA-seqによる発現量を解析した。図2において、グラフの縦軸はFPKM(Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads)である。FAT1遺伝子、DGAT2d遺伝子、AGL1遺伝子の発現は、NaCl添加無しでも、培養時間が経過するにしたがって増加したが、NaClを添加した場合は、さらにその発現量が増加した。NaCl添加無しの条件での遺伝子発現増加は、おそらく培地内の窒素分濃度の減少によって起こっていると考えられる。

[0059] また、窒素欠乏条件下でも、これらの遺伝子は、同様に誘導されていた(図3)。具体的には、KJ株を窒素十分培地(MA5)で培養後、窒素欠乏培地(MA5-N)に移し、12、24、72、144時間後にサンプリングを行ってRNA-seqにより遺伝子発現量を調べた。図3において、グラフの縦軸はFPKM(Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads)の平均値(N=2)である。MA5の組成は、18 mM NaNO_3 , 0.4 mM MgSO_4 , 60 μM CaCl_2 , 0.26 mM KH_2PO_4 , 0.26 mM K_2HPO_4 , 20 mM HEPES-KOH (pH 7.0), 0.4% (v/v) Fe solution, 0.1% (v/v) Trace elementsである。この培地作製に用いたストック溶液の組成は、Fe solutionが、3 g /L, citric acid, 4.9 g/L ammonium iron citrate, 0.5 g /L, EDTAであり、trace elementsが、70 mg/L H_3BO_3 , 150 mg/L $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 300 mg/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 300 mg/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 70 mg/L $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 3 mg /L Na_2MoO_4 である。MA5-Nでは NaNO_3 を加えず、NaClを Na^+ の濃度が同じになるように加えたものを使用した。

[0060] これらの遺伝子は、それぞれ、脂肪酸の合成、TAGの合成、デンプンの分解の最終段階で働く酵素をコードしているため、これらの遺伝子を高発現させることによって、TAG生産性がより向上した株が得られるのではないかと考え

、高発現株を作製することとした。

[0061] 〔実施例2〕AGL1遺伝子、FAT1遺伝子、DGAT2d遺伝子のcDNA高発現株の作製

KJ株内でAGL1遺伝子、FAT1遺伝子、DGAT2d遺伝子のcDNAを単独で、あるいは複数を同時に高発現させるために、KJ株の翻訳伸長因子の α サブユニットであるEF1 α をコードする遺伝子(以降、「KJEF1A」と呼ぶ)のプロモーター(配列番号13)とターミネーター(配列番号14)とを利用した。AGL1遺伝子、FAT1遺伝子及びDGAT2d遺伝子それぞれのcDNAを、KJEF1Aのプロモーターとターミネーターとの間に挿入したpAGL1、pFAT1及びpDGAT2dプラスミドを作製した(図4)。

[0062] 図4において、KJEF1A pro及びKJEF1A terは、それぞれ、KJ株のEF1A遺伝子(KJEF1A)のプロモーター及びターミネーターを含む配列である。KJRBCSは、KJ株のRuBisCO小サブユニット遺伝子を示し、その最初のイントロン配列(配列番号15)がプロモーターとcDNAとの間に挿入されている。各プラスミドの中央部分は、各遺伝子のcDNA配列を示している。FLAG-Tagは、N末端-DYKDDDDK-C末端というペプチド配列をコードするDNA断片である。ObiTub pro及びObiAct terは、それぞれ、Obi株のTubulin遺伝子プロモーター及びActin遺伝子ターミネーターを含む配列である(Imamura et al., 2012, J Gen Appl Microbiol, 58, 1)。bleは、ブレオマイシンやゼオマイシン[商品名ゼオシン(Zeocin™)]耐性遺伝子である(Stevens et al., 1996, Mol. Gen. Genet. 251, 23-30.)。Linkerは、N末端-GGSGGR-C末端というペプチド配列をコードするDNA断片である。PeEGFPは、EGFP(enhanced GFP : 高感度GFP)のコドン使用頻度をObi株での発現のために最適化した配列である。

[0063] これらのプラスミドを、パーティクルボンバードメントを用い、G418耐性を付与するpG418-T1Aプラスミド(Kasai et al., 2015, Biotechnol Biofuels, 8, 94)と共にKJ株に共導入し、G418耐性コロニーを選抜した。

[0064] pAGL1プラスミドを導入した実験では、G418耐性コロニー106個の内6株(5.7%)で、図4に示すpAGL1プラスミドのKJEF1Aプロモーター5'末端とターミネーター3'末端との間(以降、これを「KJAGL1 cDNA発現カセット」と呼ぶ)の

全長が挿入されていた。pFAT1プラスミドを導入した実験では、365個のG418耐性コロニーの内18株（5.0%）でKJFAT1 cDNA発現カセット全長が挿入されていた。pDGAT2dプラスミドを導入した実験では164個のG418耐性コロニーの内、6株（3.7%）でKJDGAT2d cDNA発現カセットの全長が挿入されていることが確認できた。

[0065] 〔実施例3〕 KJAGL1 cDNA高発現株のTAG生産性の評価

pAGL1プラスミドを導入して得られた6株の形質転換体におけるKJAGL1 cDNAの発現を、Real time PCRで解析した。最もKJAGL1 cDNAの発現が高かったKJo xAGL1-6060株(oxはoverexpression line：高発現株を示す)では、培養13日目のTAG生産性が野生株の約1.3倍であった(図5)。残りの株については、TAG含量が若干上昇し、デンプン含量が若干減少したが、TAG生産性は野生株とほぼ同等であった。

[0066] ここで、TAG生産性とは、野生株(KJ)のTAG生産量(g/L)を100%としたときの形質転換体のTAG生産量(%)である。また、本実施例では、各株は1/2 DENS0培地で同時に培養し、7日目(7d)と13日目(13d)にサンプリングを行った。図5において、棒グラフとエラーバーは独立な3回の実験で得られたサンプルの平均値と標準誤差(n = 3)を示す。なお、DENS0培地はA6培地とほぼ同じ組成であるが、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 及び $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ の濃度がそれぞれ863 μM と2.38 mMである。1/2 DENS0培地は、DENS0培地を蒸留水で2倍に薄めたものである。

[0067] 〔実施例4〕 KJFAT1 cDNA高発現株のTAG生産性の評価

pFAT1プラスミドを導入して得られた形質転換体18株についてTAGの生産性を評価した。18株中12株でTAG含有率が増加し、そのうち細胞乾燥重量の減少があまり見られなかった(すなわち、増殖が悪くならなかった)6株では、培養7日目にTAG生産性が約1.2～1.3倍に、14日目で約1.1～1.2倍に増加していた(図6)。このとき、TAGの増加と同時にデンプンの減少が見られたため、pFAT1プラスミドの導入によるTAGの増加はデンプンの減少を伴うと考えられた(図6)。本実施例では、各株は1/2 DENS0培地で同時に培養し、7日目(7d)と14日目(14d)にサンプリングを行った。

[0068] 〔実施例5〕 KJDGAT2d cDNA高発現株のTAG生産性の評価

pDGAT2dプラスミドの導入で得られた形質転換体6株のうち4株(KJoxDGAT2d-567, 5617, 5650, 5822)において、細胞乾燥重量当たりのTAG含有率に有意な増加が見られ($P < 0.01$, Student's t-test)、培養7日目で野生株の約1.2倍、14日目で約1.1倍に増加した(図7)。このとき、TAGの増加が見られた4株においてデンプン含有率が減少していた($P < 0.05$, Student's t-test)ことから、KJDGAT2d cDNAの高発現によるTAGの増加はデンプンの減少を伴うと考えられた(図7)。本実施例では、各株は1/2 DENS0培地で同時に培養し、7日目と14日目にサンプリングを行った。図7において、棒グラフとエラーバーは独立な実験で得られたサンプルの平均値と標準誤差($n = 3-6$)を示す。

[0069] 〔実施例6〕 複数cDNAを同時に高発現させた株の作製

pFAT1プラスミド形質転換体のうち、7日目におけるTAG生産性が最も高かったKJoxFAT1-325株(図6)にpDGAT2dプラスミドとpble-PeEGFP-T1Aプラスミドとを共導入し、Zeo耐性コロニーを228個選抜した。そして、KJDGAT2d cDNA発現カセットの挿入をPCRで解析したところ、13株(5.7%)でKJDGAT2d cDNA発現カセットの全長が挿入されていることが確認できた。

[0070] 複数のcDNAを同一細胞内で同時に高発現させた場合に、TAG生産性がどの程度向上するかを解析するため、3遺伝子のcDNAを4通りに組み合わせた形質転換体(AGL1 & FAT1, AGL1 & DGAT2d, FAT1 & DGAT2d, AGL1 & FAT1 & DGAT2d)を作製した。pAGL1プラスミド形質転換体のうち最もTAG生産性が高かったKJoxAGL1-6060株にpFAT1プラスミドをpble-PeEGFP-T1Aプラスミドと共にKJ株に共導入し、ゼオシン(Zeo)耐性コロニーを237個選抜した。この内の17株(7.2%)でKJFAT1 cDNA発現カセットの全長が挿入されていることを確認した。同様にKJoxAGL1-6060株にpDGAT2dプラスミドをpble-PeEGFP-T1Aプラスミドと共に導入し、Zeo耐性コロニーを130個選抜し、この内18株(13.8%)でDGAT2d cDNA発現カセットの全長が挿入されていることが確認できた。

[0071] 3つの遺伝子のcDNAを一つの細胞内で高発現させるため、KJoxAGL1-6060株にpFAT1、pDGAT2d及びpble-PeEGFP-T1Aの3つのプラスミドを同時導入し、Zeo

耐性コロニーを685個選抜した。この内17株(2.5%)で、KJFAT1 cDNA発現カセット及びKJDGAT2d cDNA発現カセットの両方が挿入されていた。

[0072] 〔実施例7〕複数のcDNAが高発現した株のTAG生産性評価

実施例6に示すように、KJoxFAT1-325株(図6)にKJDGAT2d cDNA発現カセットを導入した株、すなわち、KJFAT1 cDNAとKJDGAT2d cDNAとを高発現させた13株のうち、最もTAG生産性が高かったKJoxFD-2643株について詳しく解析を行った。また、下記に、形質転換体の構築手順を示す：

KJ → (+KJDGAT2d cDNA) → KJoxDGAT2d-5822
 KJ → (+KJFAT1 cDNA) → KJoxFAT1-325
 KJoxFAT1-325 → (+KJDGAT2d cDNA) → KJoxFD-2643
 KJ → (+KJAGL1 cDNA) → KJoxAGL1-6060
 KJoxAGL1-6060 → (+KJFAT1 cDNA) → (17 strains)
 KJoxAGL1-6060 → (+KJDGAT2d cDNA) → (18 strains)
 KJoxAGL1-6060 → (+KJFAT1 cDNA +KJDGAT2d cDNA) → KJoxAFD-41417

[0073] 当該構築手順では、KJ株に、カッコ内に示したcDNAの発現カセットを導入し構築した株名を示す。KJoxFAT1-325株には、再度、KJDGAT2d cDNA発現カセットを導入し、KJoxFD-2643株を作製した。KJoxAGL1-6060株にKJFAT1 cDNA発現カセットのみ、あるいはKJDGAT2d cDNA発現カセットのみを導入して作製した株の名前は示していない。KJoxAGL1-6060株にKJFAT1 cDNA発現カセット及びKJDGAT2d cDNA発現カセットを同時に導入し、KJoxAFD-41417株を作製した。

[0074] KJ株、KJoxFAT1-325株、KJoxDGAT2d-5822及びKJoxFD-2643株を、それぞれ1/2 DENS0培地で初期 $0.D_{750} = 0.2$ に調整して培養を開始し、培養4日目から18日目までの細胞乾燥重量当たりのTAG含有率(%DW)を測定した。KJoxFAT1-325株とKJoxDGAT2d-5822株は野生株よりTAG含有率が増加していたが、KJoxFD-2643株はそれらの株よりさらにTAG含有率が増加していた(図8)。すなわち、FAT1とDGAT2dの高発現は、KJ株のTAG含有率を加算的に増加させた。各株は1/2 DENS0培地で同時に培養し、培養4, 8, 11, 14, 18日目にサンプリングを行った。

[0075] また、KJAGL1 cDNA発現カセット導入株であるKJoxAGL1-6060株のTAG生産性

は、野生株よりも約30%高かった(図5)。KJoxAGL1-6060株にKJFAT1 cDNA発現カセットのみ、あるいはKJDGAT2d cDNA発現カセットのみを導入した株を、それぞれ17株と18株分離し、これらの株のTAG生産性を調べた。これらの発現カセット導入株の中に、親株であるKJoxAGL1-6060株のTAG生産性よりも有意に高いTAG生産性を示すものは見出されなかった。

[0076] 一方、KJoxAGL1-6060株にKJFAT1 cDNA発現カセットとKJDGAT2d cDNA発現カセットとを同時に導入したKJoxAFD-41417株は、以下に述べるように、その生産性は親株よりもはるかに高かった。

[0077] KJ株、前述のKJoxFD-2643株(KJFAT1 cDNA発現カセット+KJDGAT2d発現カセット導入株)、KJAGL1 cDNA発現カセット導入株(KJoxAGL1-6060)、及びKJoxAFD-41417株を1/2 DENS0培地で初期 $O.D._{750} = 0.2$ に調整して培養を開始し、培養4日目から18日目までの培養液当たりのTAG生産量(g/L)を測定した。KJoxFD-2643株では培養18日目のTAG生産量(g/L)が野生株の約1.2倍、KJoxAGL1-6060株では約1.5倍に増加していた。一方、KJoxAFD-41417株では、TAG生産量(g/L)が培養18日目で野生株の約1.7倍に増加していた(図9)。また、野生株及びKJoxFD-2643株では培養8日目から14日目でTAG生産性(g/L/d)が最大になったのに対して、KJoxAGL1-6060株、及びKJoxAGL1-6060株を親株にしたKJoxAFD-41417株では培養18日目までTAG生産性が増加していた(図9)。各株は1/2 DENS0培地で同時に培養し、培養4, 8, 11, 14, 18日目にサンプリングを行った。

[0078] 以上の結果より、KJDGAT2d cDNAの高発現とKJFAT1 cDNAの高発現とは、TAG生産性において加算性が認められること、また、KJAGL1 cDNAの高発現と上記2つのcDNAの高発現とを組み合わせることにより、TAG生産性が野生株の約1.7倍に増加した株を作ることが出来ることが示された。

受託番号

[0079] FERM BP-22254

FERM BP-22294

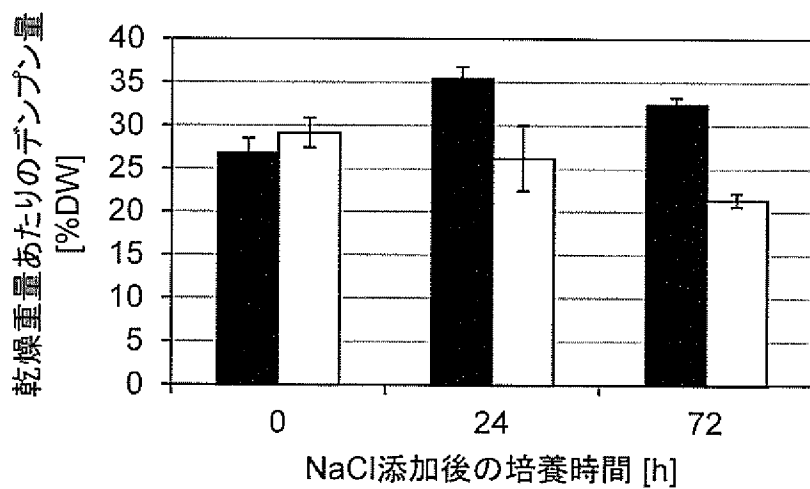
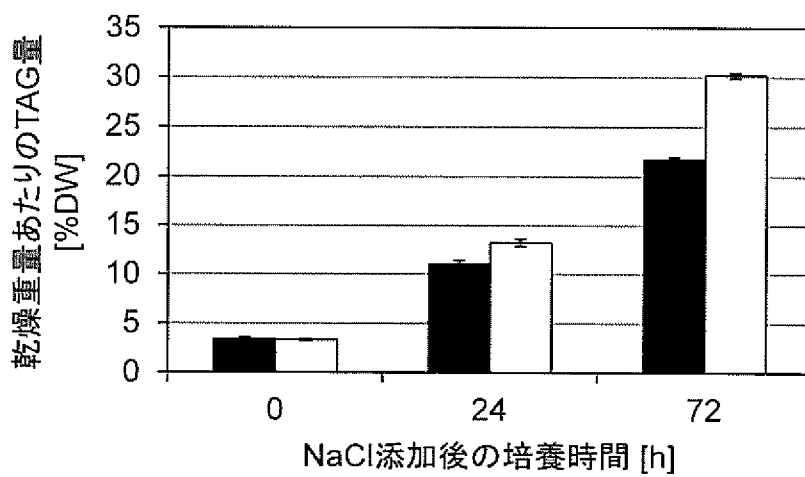
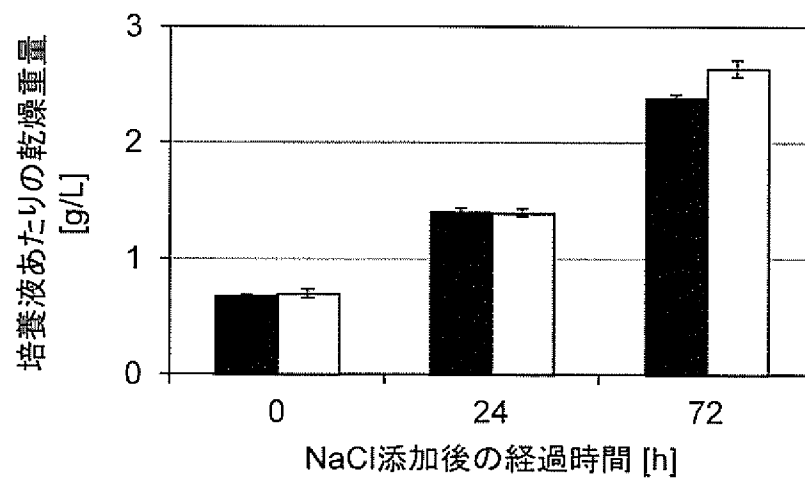
本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願はそのまま引用により本明細書に組み入れられるものとする。

請求の範囲

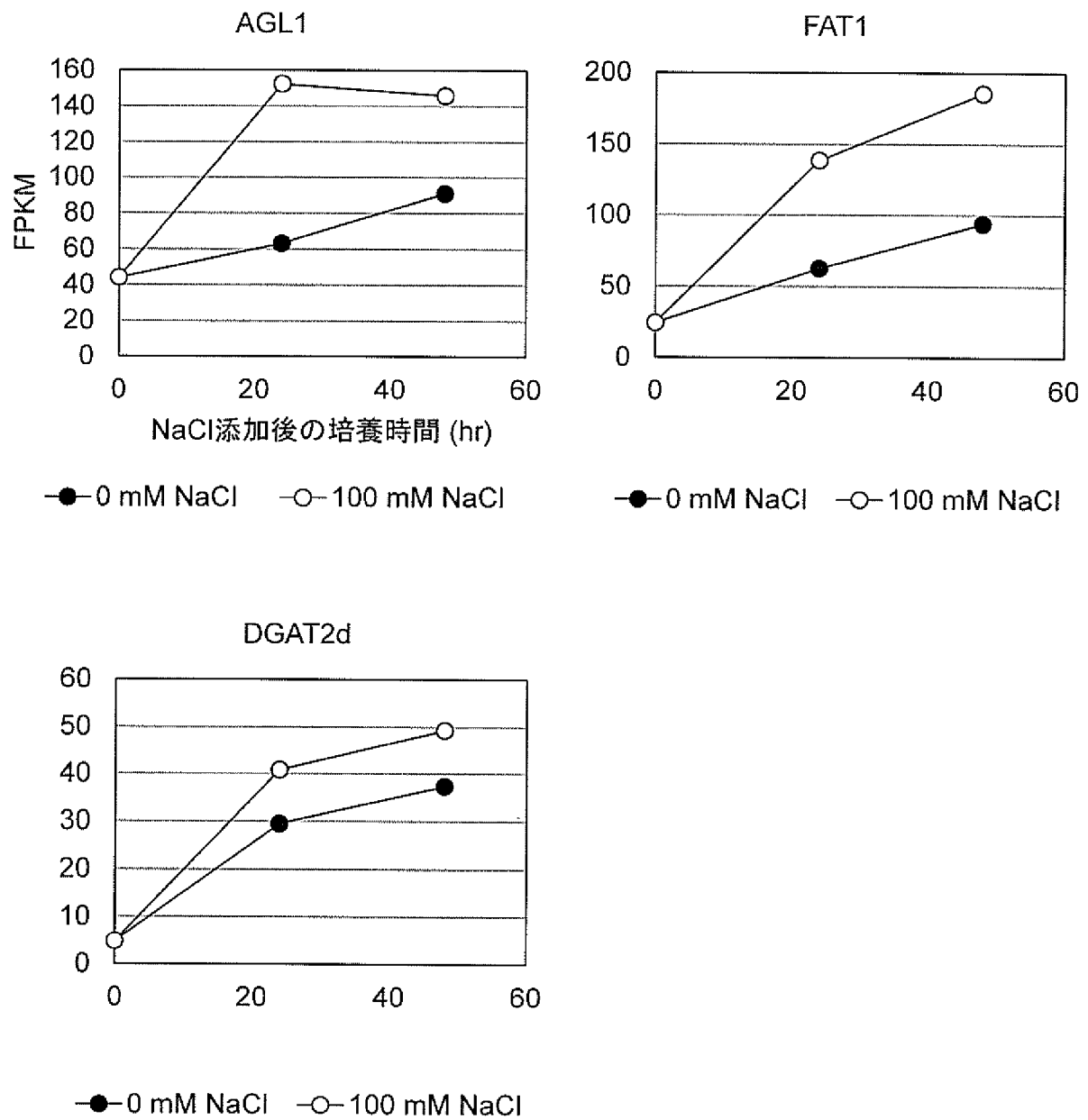
- [請求項1] AGL1タンパク質をコードする遺伝子を高発現させた真核微細藻類遺伝子改変株であって、親株と比較してトリアシルグリセロール(TAG)生産性が向上しており、前記AGL1タンパク質が配列番号4に示すアミノ酸配列と少なくとも50%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有し、且つアルファ・グリコシダーゼ活性を有するタンパク質である、前記真核微細藻類遺伝子改変株。
- [請求項2] さらに、FAT1タンパク質をコードする遺伝子及び/又はDGAT2タンパク質をコードする遺伝子を高発現させた、請求項1記載の真核微細藻類遺伝子改変株であって、前記FAT1タンパク質が配列番号8に示すアミノ酸配列と少なくとも50%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有し、且つアシルACPチオエステラーゼ活性を有するタンパク質であり、前記DGAT2タンパク質が配列番号12に示すアミノ酸配列と少なくとも50%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有し、且つジアシルグリセロールアシル転移酵素活性を有するタンパク質である、前記真核微細藻類遺伝子改変株。
- [請求項3] 前記遺伝子が、遺伝子高発現を担保するプロモーターに機能的に連結されている、請求項1又は2記載の真核微細藻類遺伝子改変株。
- [請求項4] トレボキシア藻綱に属する、請求項1～3のいずれか1項記載の真核微細藻類遺伝子改変株。
- [請求項5] コッコミクサ(Coccomyxa)属又はシュードコッコミクサ(Pseudococcomyxa)属に属する、請求項4記載の真核微細藻類遺伝子改変株。
- [請求項6] 前記遺伝子が、緑藻に属する株に由来する、請求項1～5のいずれか1項記載の真核微細藻類遺伝子改変株。
- [請求項7] 前記遺伝子が、トレボキシア藻綱に属する株に由来する、請求項6記載の真核微細藻類遺伝子改変株。
- [請求項8] 前記遺伝子が、コッコミクサ属又はシュードコッコミクサ属に属する株に由来する、請求項7記載の真核微細藻類遺伝子改変株。

[請求項9] 請求項1～8のいずれか1項記載の真核微細藻類遺伝子改変株を培養する工程を含む、TAG生産方法。

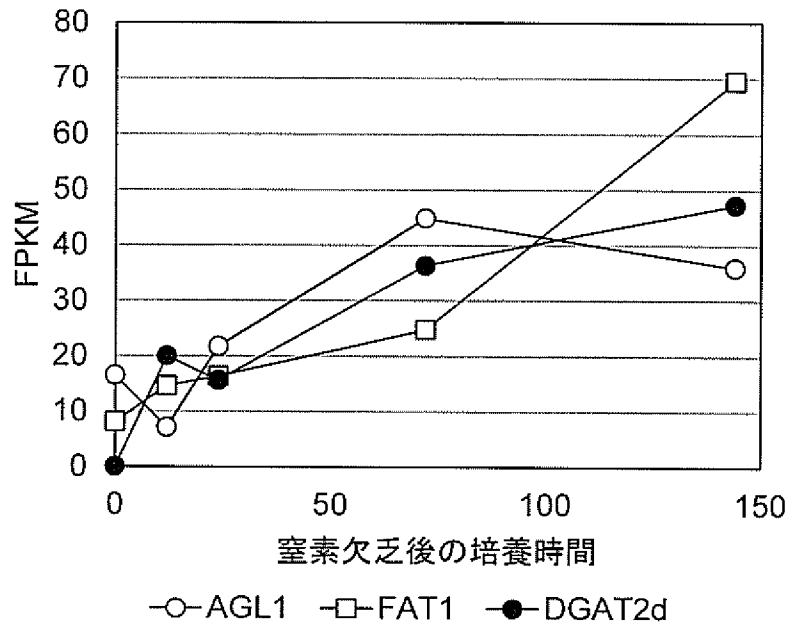
[図1]



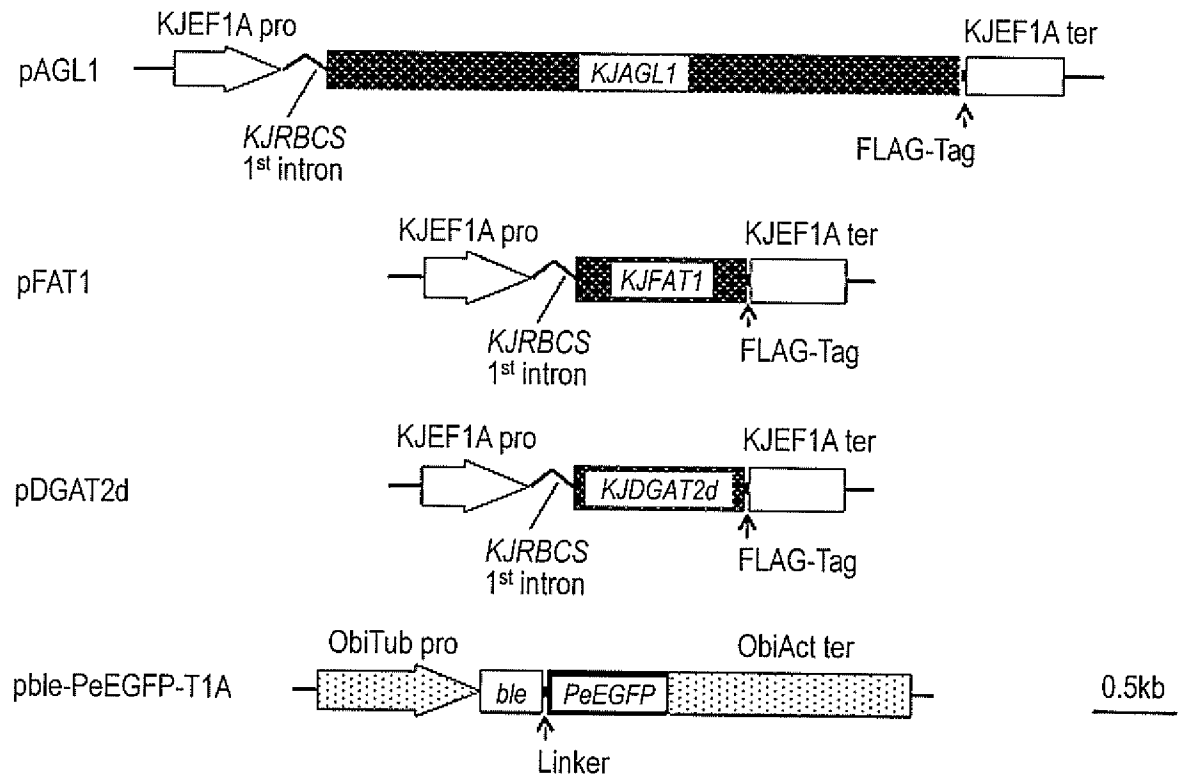
[図2]



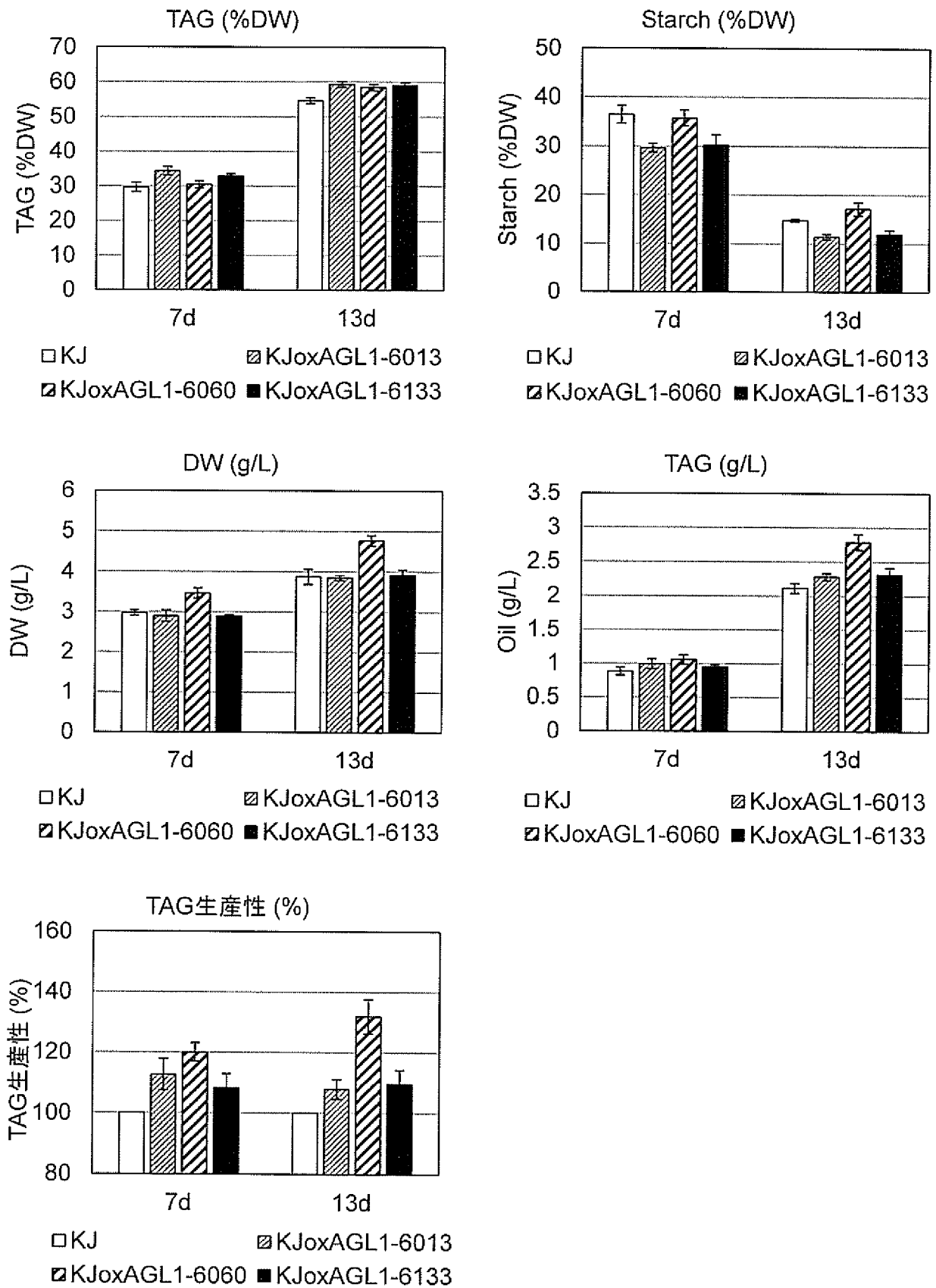
[図3]



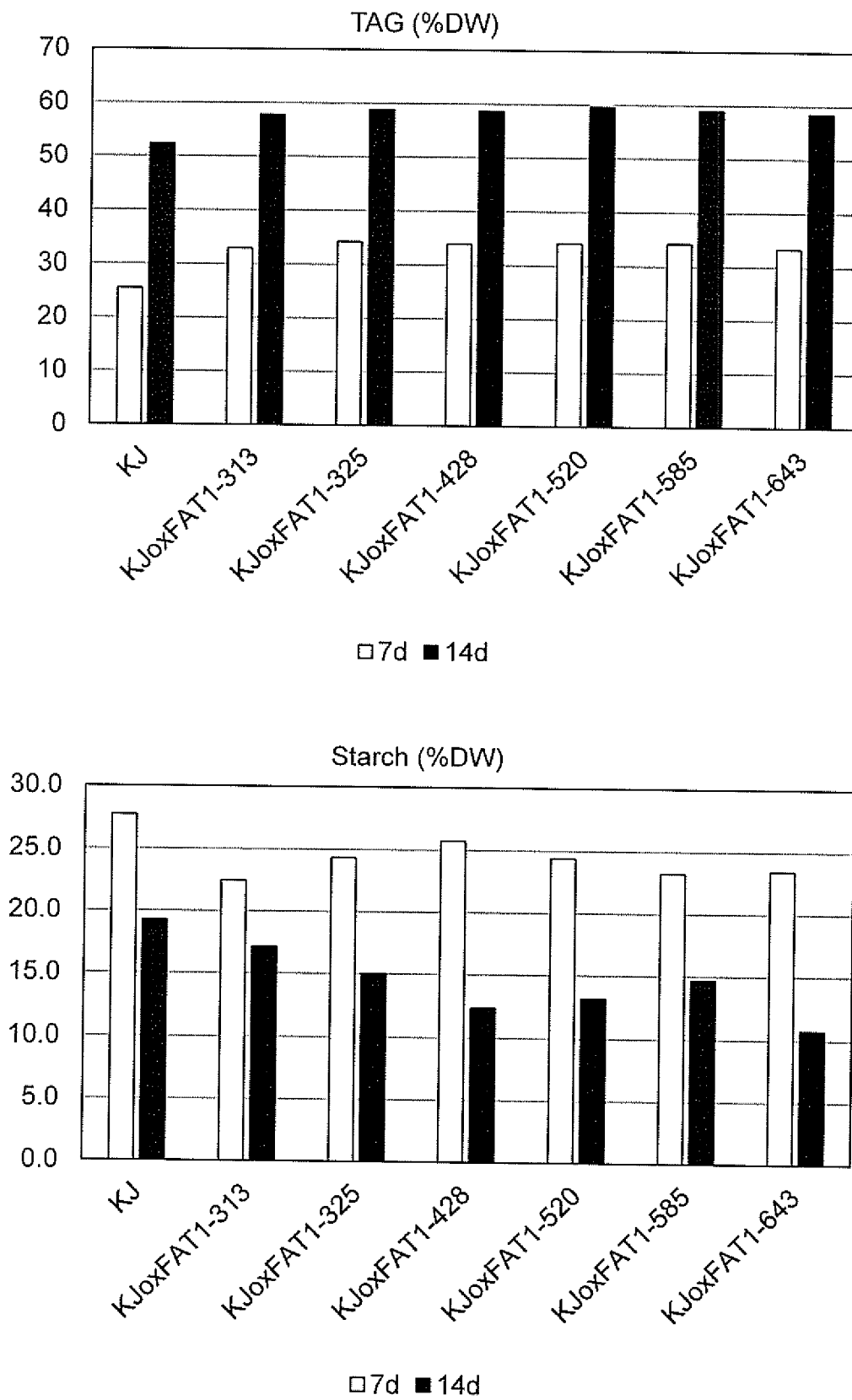
[図4]



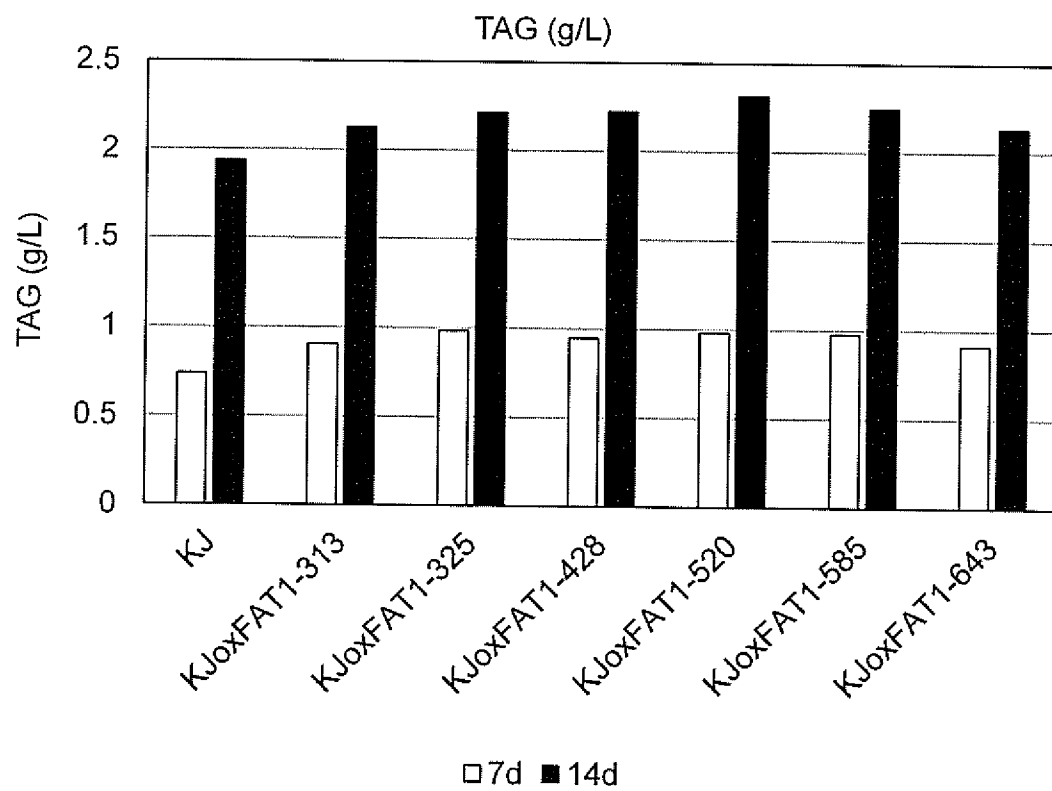
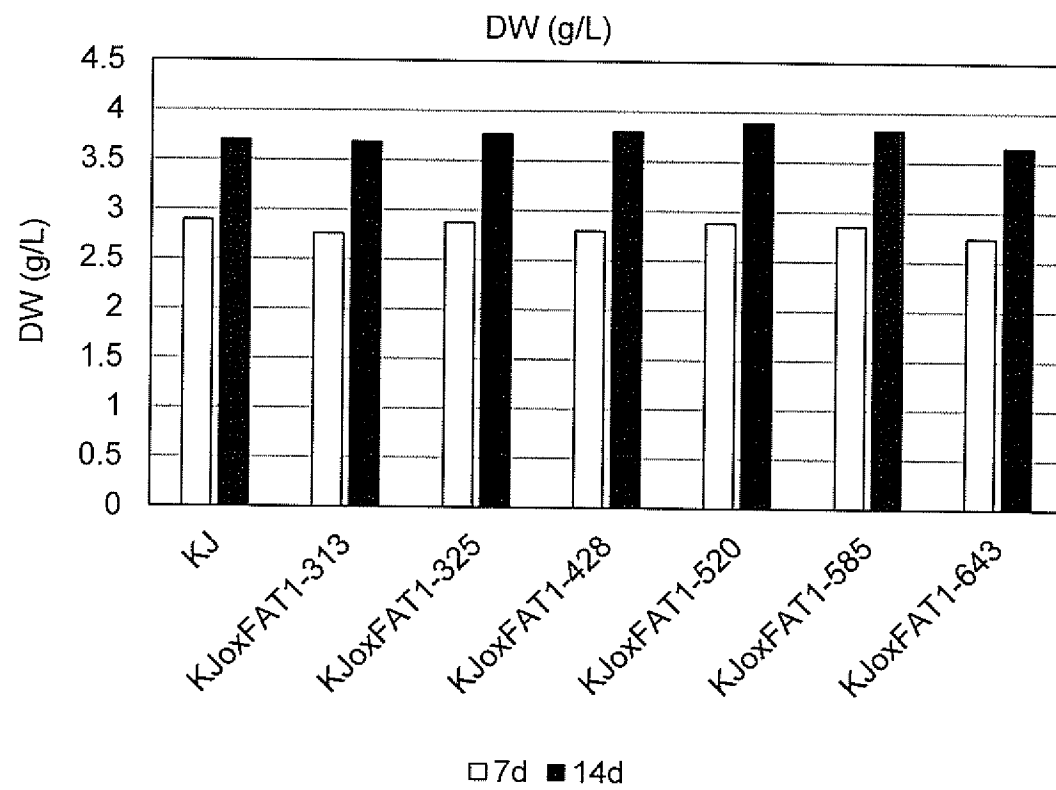
[図5]



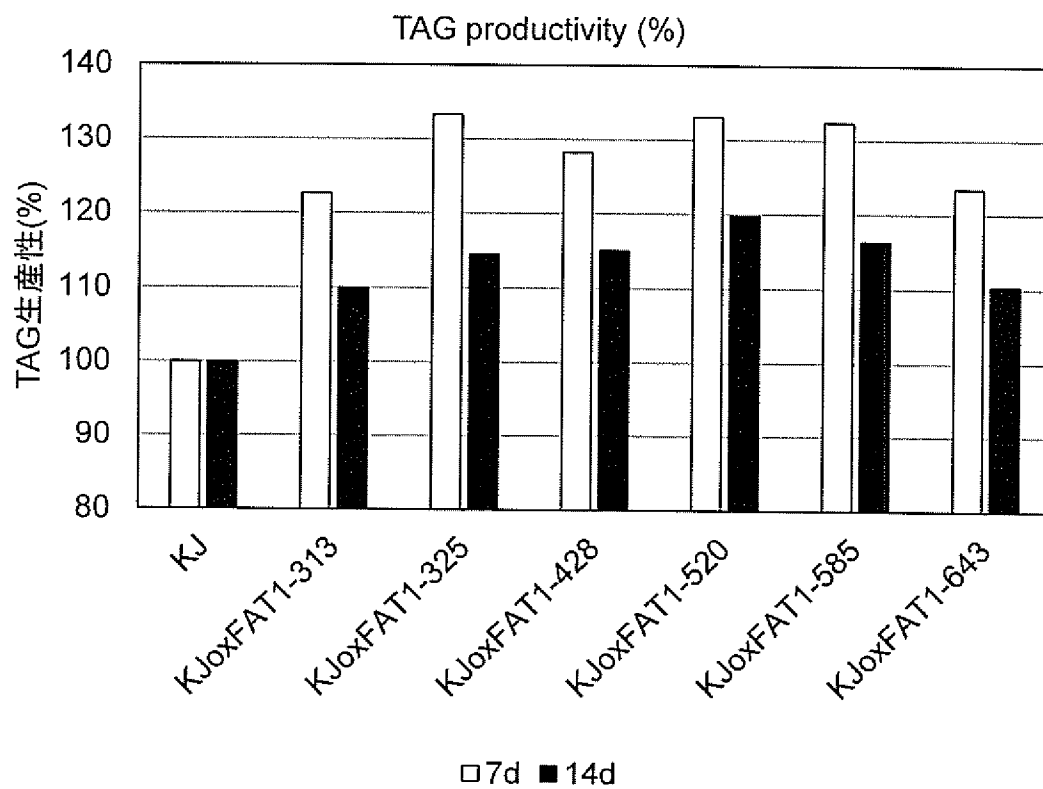
[図6-1]



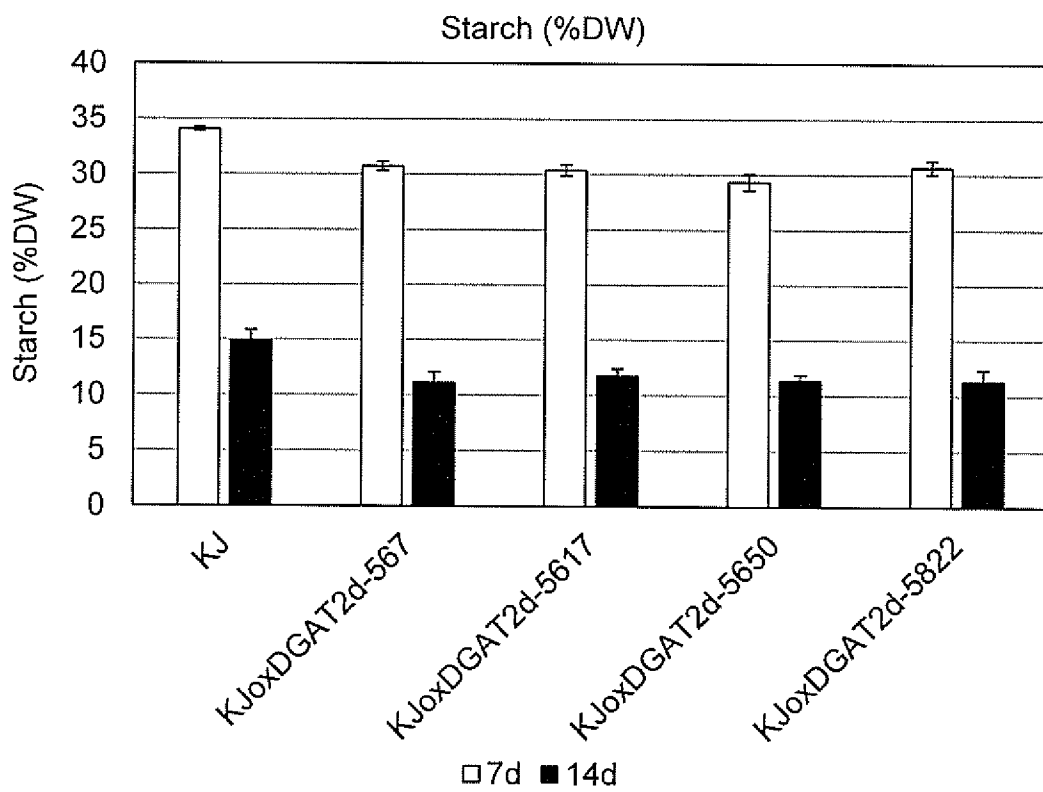
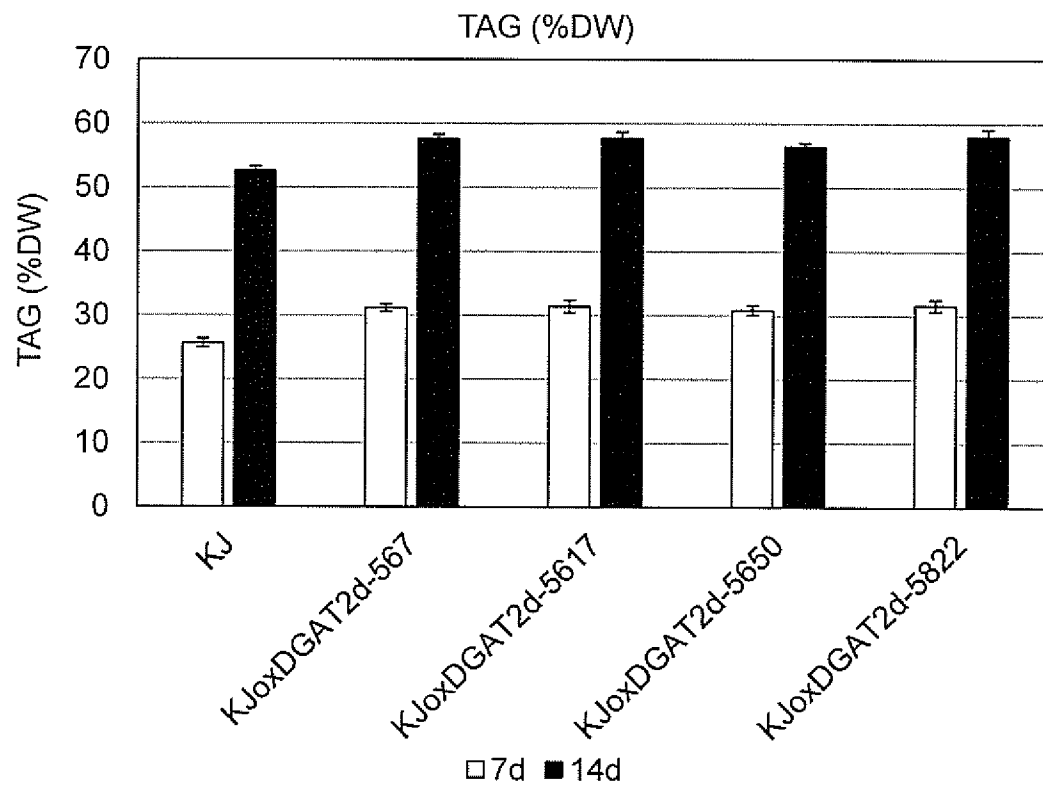
[図6-2]



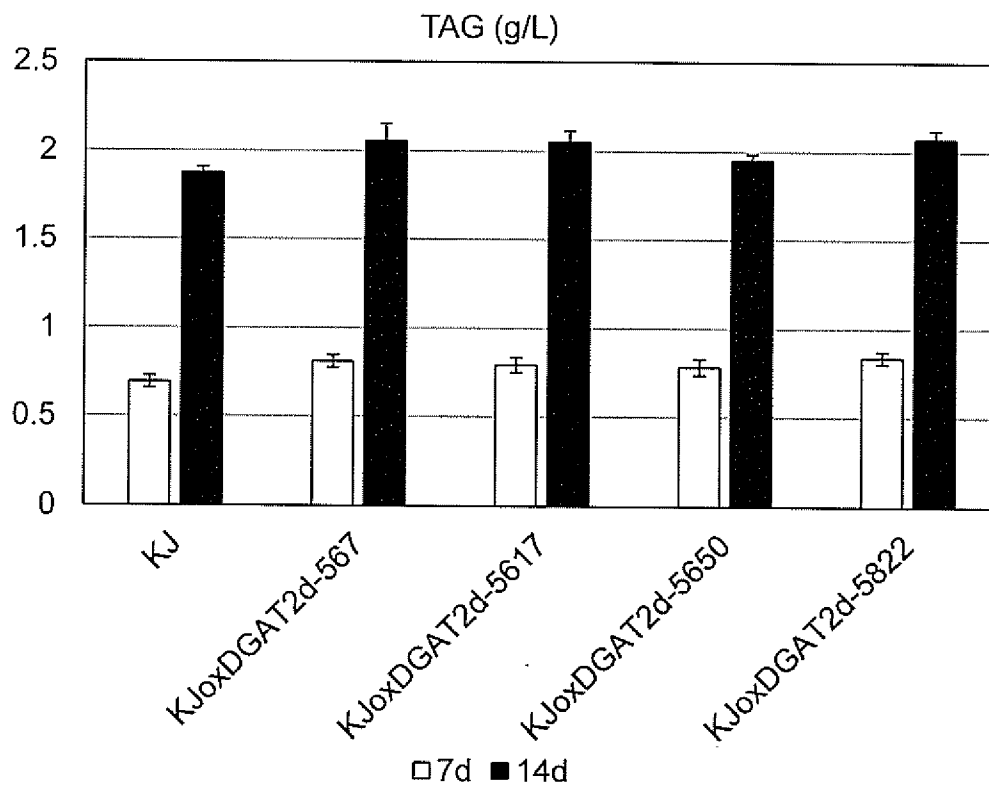
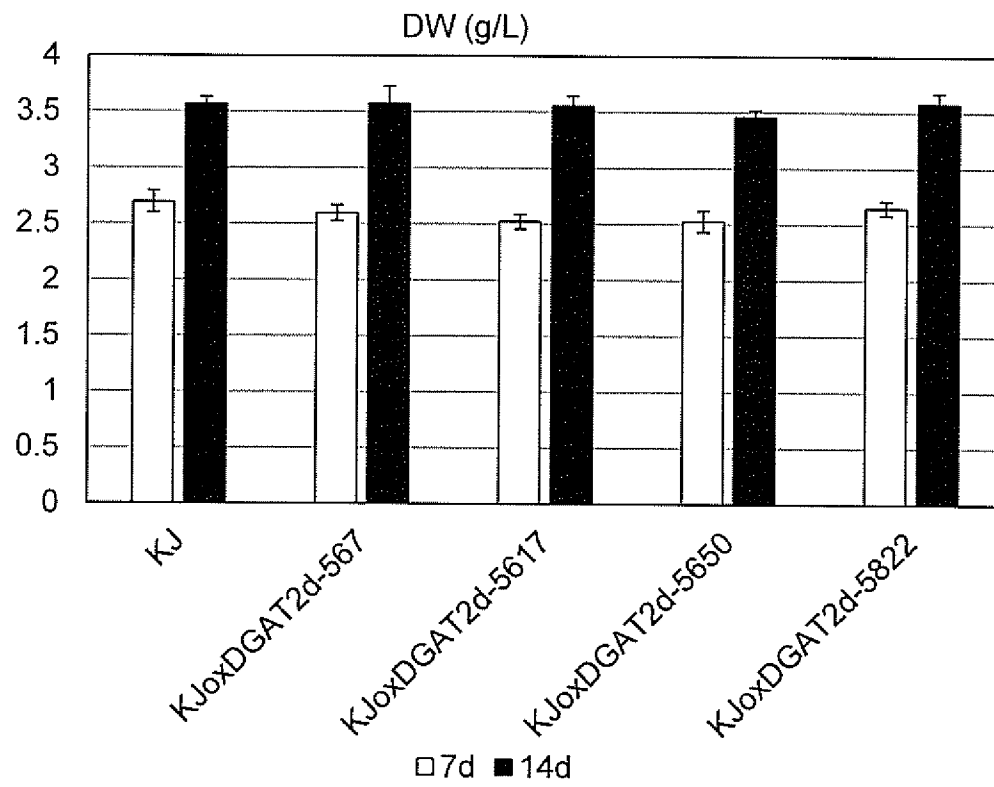
[図6-3]



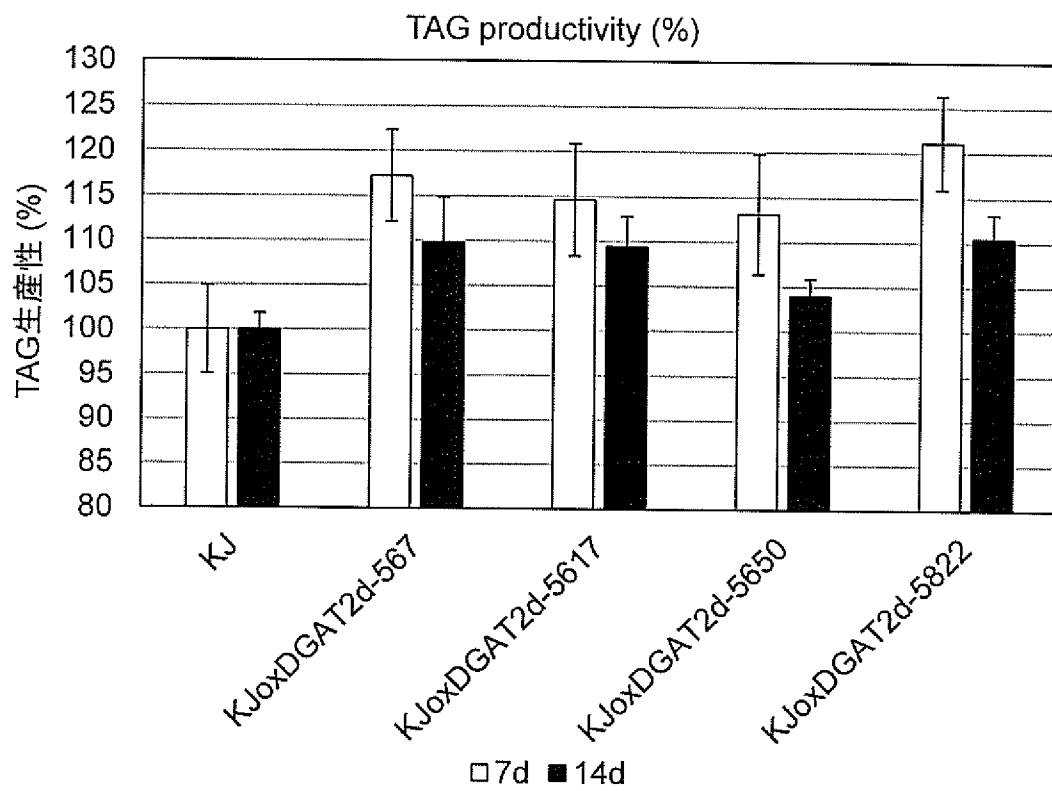
[図7-1]



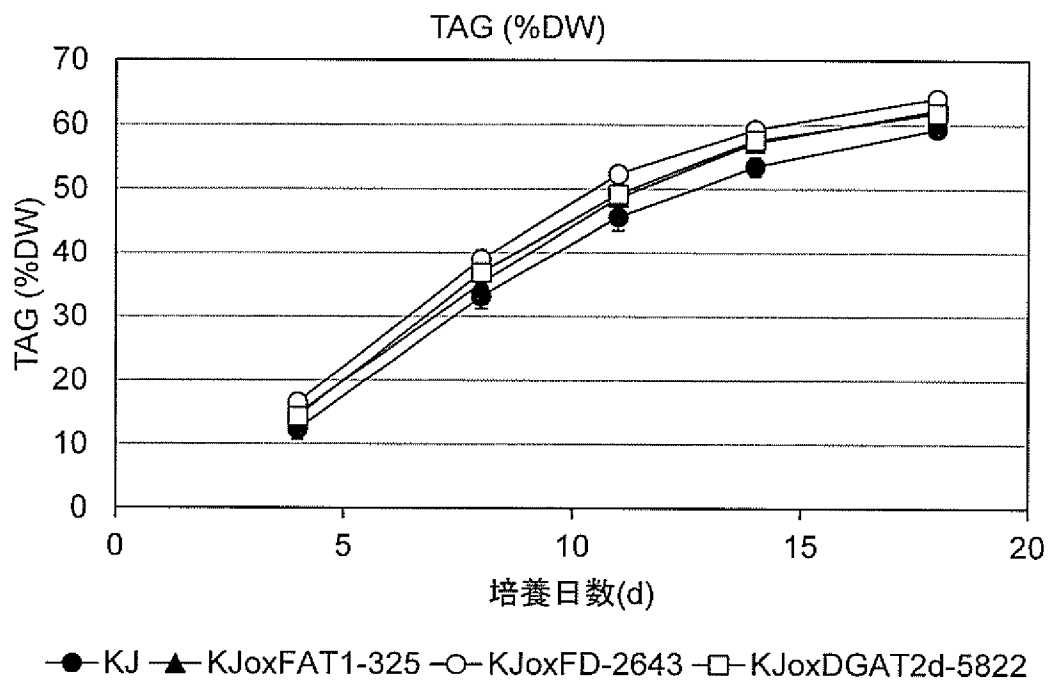
[図7-2]



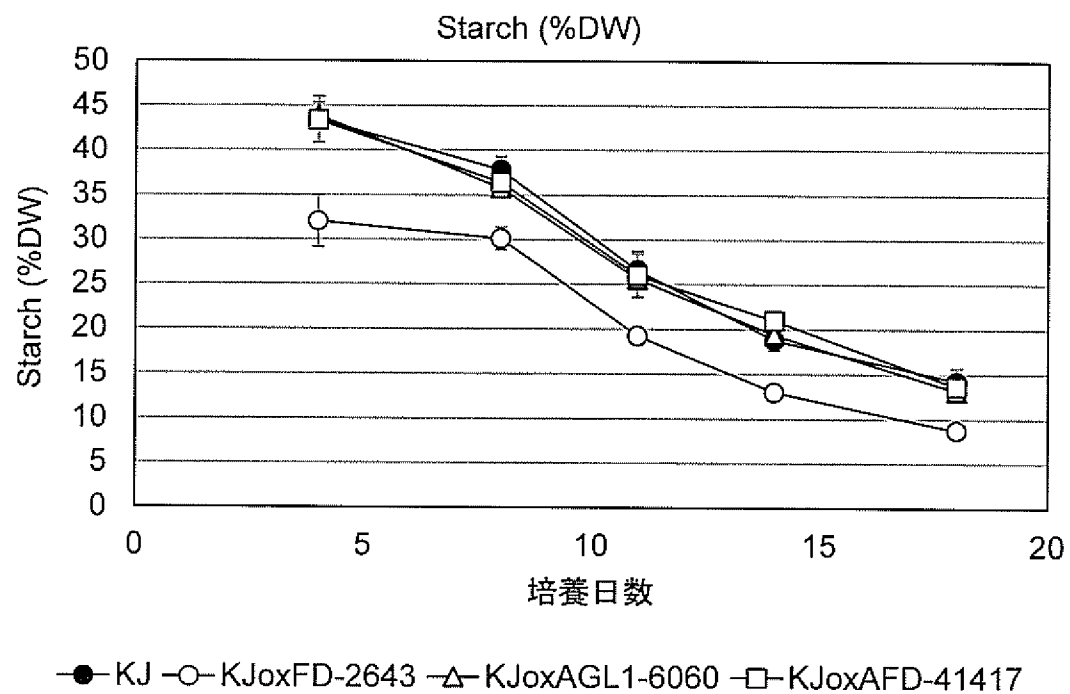
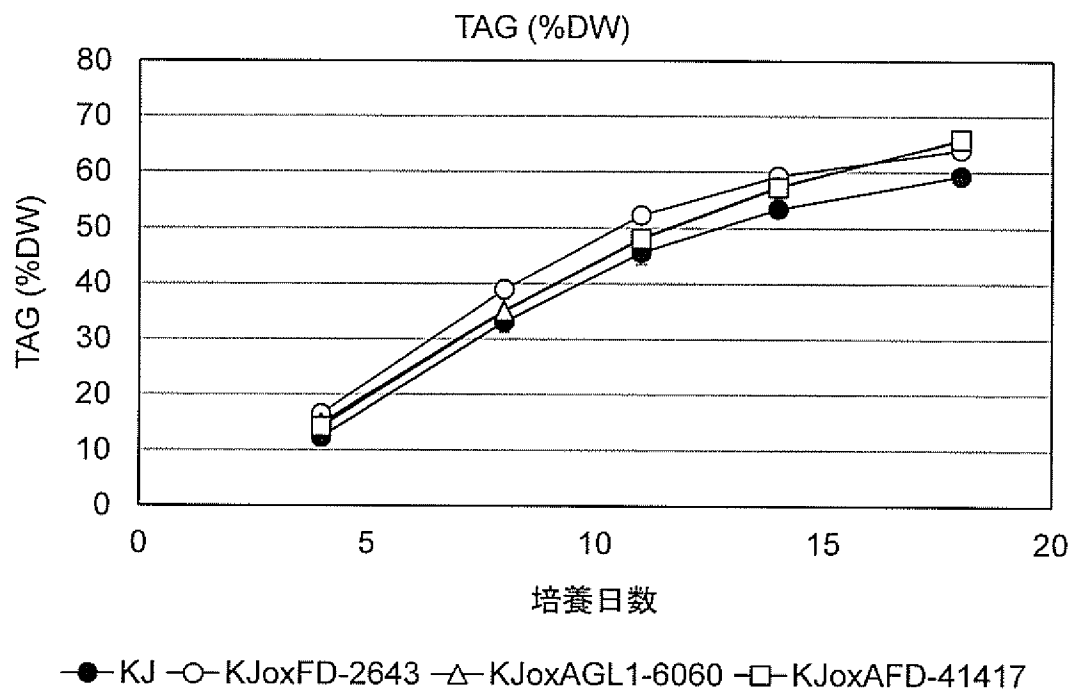
[図7-3]



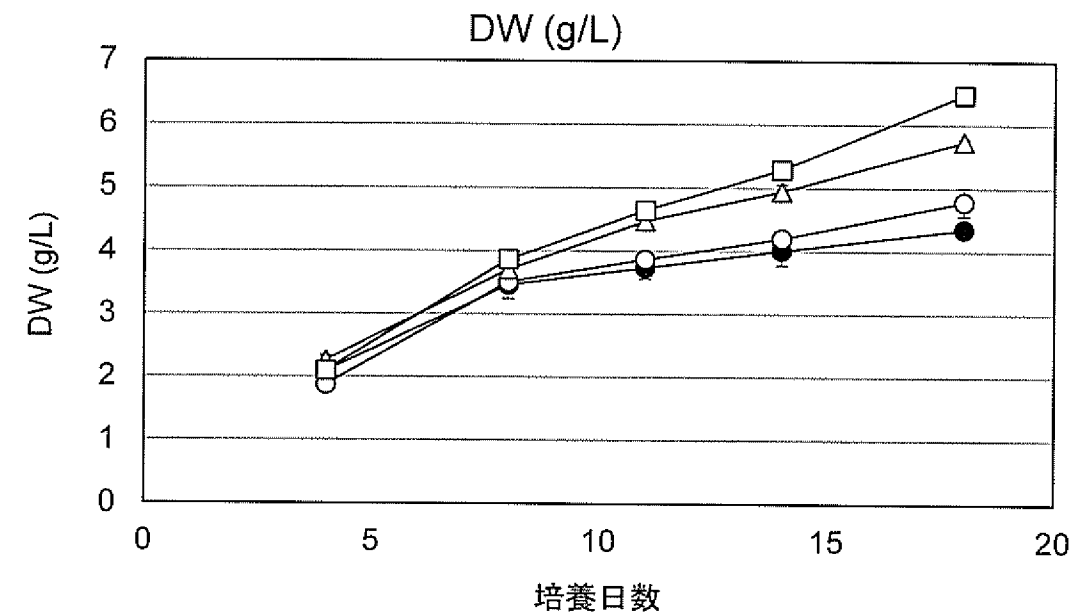
[図8]



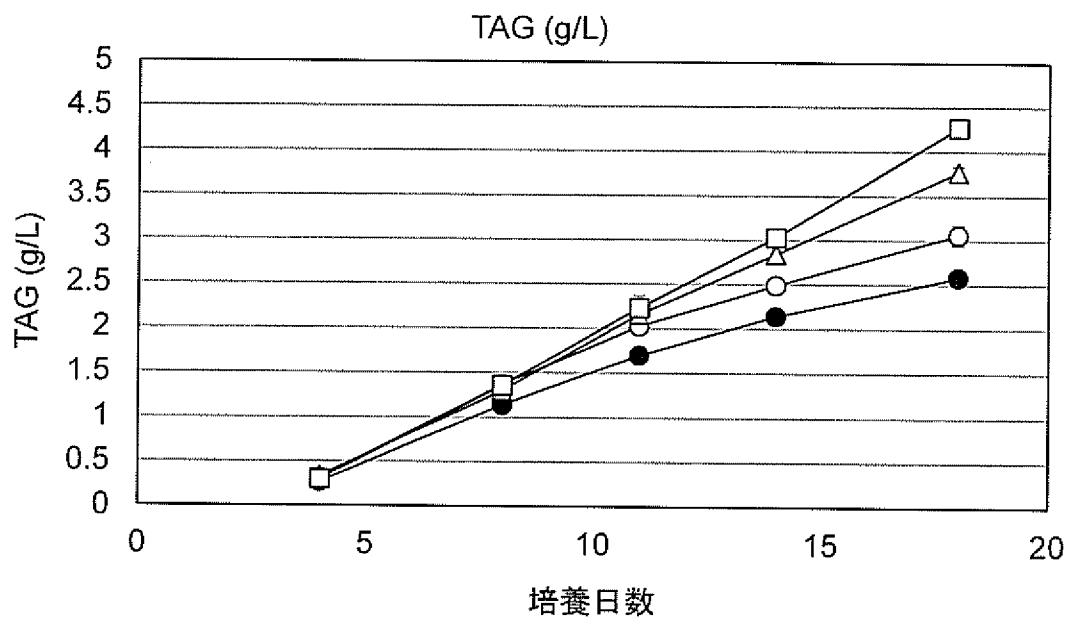
[図9-1]



[図9-2]

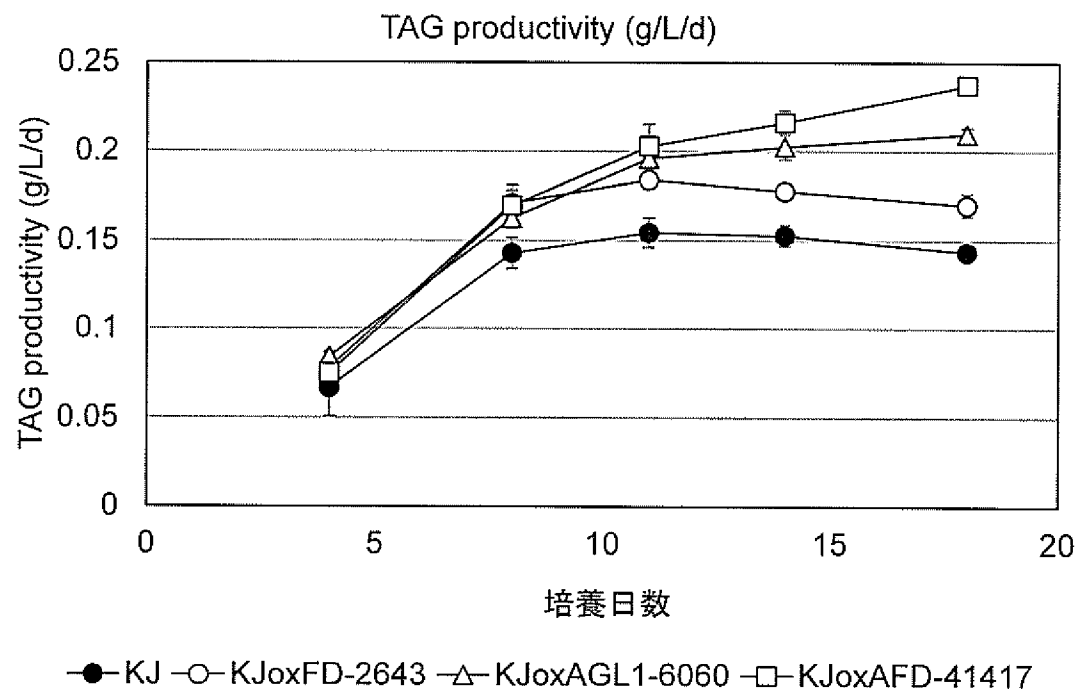


● KJ ○ KJoxFD-2643 △ KJoxAGL1-6060 □ KJoxAFD-41417



● KJ ○ KJoxFD-2643 △ KJoxAGL1-6060 □ KJoxAFD-41417

[図9-3]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/075875

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N1/13(2006.01)i, C12N1/12(2006.01)i, C12P7/64(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n, C12R1/89(2006.01)n

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N1/13, C12N1/12, C12P7/64, C12N15/09, C12R1/89

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

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

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

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq, SwissProt/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	UniProtKB IOYMX4, [online], URL: http://www.uniprot.org/uniprot/IOYMX4 , Last modified: June 13, 2012, [retrieved on 2016.11.15]	1-9
A	UniProtKB IOZAZ8, [online], URL: http://www.uniprot.org/uniprot/IOZAZ8 Last modified: June 13, 2012, [retrieved on 2016.11.15]	1-9
A	UniProtKB IOYMB8, [online], URL: http://www.uniprot.org/uniprot/IOYMB8 Last modified: June 13, 2012, [retrieved on 2016.11.15]	1-9
A	WO 2015/075881 A1 (Denso Corp.), 28 May 2015 (28.05.2015), & JP 2015-97504 A & US 2016/0273061 A	1-9

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
15 November 2016 (15.11.16)

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

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

Authorized officer

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N1/13(2006.01)i, C12N1/12(2006.01)i, C12P7/64(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n, C12R1/89(2006.01)n

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N1/13, C12N1/12, C12P7/64, C12N15/09, C12R1/89

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

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

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

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
 GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq, SwissProt/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	UniProtKB I0YMX4, [online], URL: http://www.uniprot.org/uniprot/I0YMX4 , Last modified: June 13, 2012, [retrieved on 2016.11.15]	1-9
A	UniProtKB I0ZAZ8, [online], URL: http://www.uniprot.org/uniprot/I0ZAZ8 Last modified: June 13, 2012, [retrieved on 2016.11.15]	1-9

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献
 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

15.11.2016

国際調査報告の発送日

29.11.2016

国際調査機関の名称及びあて先

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

特許庁審査官 (権限のある職員)

福岡 信子

4N

3539

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	UniProtKB I0YMB8, [online], URL: http://www.uniprot.org/uniprot/I0YMB8 Last modified: June 13, 2012, [retrieved on 2016.11.15]	1-9
A	WO 2015/075881 A1 (株式会社デンソー) 2015.05.28, & JP 2015-97504 A & US 2016/0273061 A	1-9