

(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 2 月 9 日(09.02.2017)



(10) 国際公開番号
WO 2017/022740 A1

- (51) 国際特許分類:
C12P 7/64 (2006.01) *C12N 1/21* (2006.01)
C07K 14/405 (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)
C12N 1/11 (2006.01) *C12N 9/88* (2006.01)
C12N 1/13 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01) *C12N 9/02* (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/072606
- (22) 国際出願日: 2016 年 8 月 2 日(02.08.2016)
- (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 2015-154771 2015 年 8 月 5 日(05.08.2015) 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 1 4 番 1 0 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 尾崎 達郎(OZAKI, Tatsuro); 〒6408580 和歌山県和歌山市湊 1 3 3 4 花王株式会社研究所内 Wakayama (JP). 杉原 慎二(SUGIHARA, Shinji); 〒6408580 和歌山県和歌山市湊 1 3 3 4 花王株式会社研究所内 Wakayama (JP).
- (74) 代理人: 飯田 敏三, 外(HIDA, Toshizo et al.); 〒1050004 東京都港区新橋 3 丁目 1 番 1 0 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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, 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))
— 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: LIPID PRODUCTION METHOD

(54) 発明の名称: 脂質の製造方法

(57) Abstract: A lipid production method for cultivating a transformant having enhanced expression of a gene encoding protein (A) or (B) below, and producing long-chain fatty acids or a lipid having the same as components. (A) Protein comprising an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1. (B) Protein comprising an amino acid sequence having 70% or greater identity with the amino acid sequence of protein (A) and having β -ketoacyl-ACP synthase activity.

(57) 要約: 下記タンパク質 (A) 又は (B) をコードする遺伝子の発現を促進させた形質転換体を培養し、長鎖脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質を生産させる、脂質の製造方法。(A) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質。(B) 前記タンパク質 (A) のアミノ酸配列と同一性が 70% 以上のアミノ酸配列からなり、かつ β -ケトアシル-ACP シンターゼ活性を有するタンパク質。



WO 2017/022740 A1

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β-ケートアシル-ACPシンターゼ、これをコードする遺伝子、及び当該遺伝子の発現を促進させた形質転換体に関する。

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級アミン塩等のカチオン性界面活性剤は、繊維処理剤、毛髪リンス剤、殺菌剤等に日常的に利用されている。また、ベンザルコニウム型4級アンモニウム塩は殺菌剤や防腐剤等に日常的に利用されている。さらに、植物油脂はバイオディーゼル燃料の原料としても利用されている。

また、炭素原子数が18以上の長鎖脂肪酸、特に不飽和結合が複数導入された長鎖多価不飽和脂肪酸（以下、「PUFA」ともいう）の多くは、動物の生体内では合成できない必須脂肪酸であることが知られている。したがって、このようなPUFAは、栄養学的用途に特に有用であり、機能性食品な

どに用いられている。

[0003] 植物の脂肪酸合成経路は葉緑体に局在する。葉緑体ではアセチル-ACP (アシルキャリアプロテイン、acyl carrier protein) を出発物質とし、炭素鎖の伸長反応が繰り返され、最終的に炭素原子数 16 又は 18 のアシル-ACP (脂肪酸残基であるアシル基と ACP とからなる複合体) が合成される。この脂肪酸合成経路に関与する酵素のうち、 β -ケトアシル-ACP シンターゼ (β -Ketoacyl-ACP synthase、以下「KAS」ともいう) はアシル基の鎖長制御に関与する酵素である。植物では、KAS I、KAS II、KAS III、KAS IV、のそれぞれ機能が異なる 4 種の KAS が存在することが知られている。このうち、KAS III は鎖長伸長反応の開始段階で働き、炭素原子数 2 のアセチル-ACP (又はアセチル-CoA) を炭素原子数 4 の β -ケトアシル-ACP に伸長する。それ以降の伸長反応には、KAS I、KAS II、及び KAS IV が関与する。KAS I は主に炭素原子数 16 のパルミトイル-ACP までの伸長反応に関与し、KAS II は主に炭素原子数 18 のステアロイル-ACP までの伸長反応に関与する。一方、KAS IV は炭素原子数 6 ~ 14 の中鎖アシル-ACP までの伸長反応に関与するといわれている。

さらに、炭素原子数 18 以上の長鎖脂肪酸、特に PUFA は、葉緑体外にて多数のデサチュラーゼ (Desaturase) やエロンガーゼ (Elongase) によって合成されると言われている。

[0004] 前述のように、脂肪酸や脂質の利用は多岐にわたる。そのため、植物等の宿主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 (鎖長) や不飽和結合数 (不飽和度) に依存するため、脂肪酸の炭素原子数や不飽和結合数を制御する試みも行われている。

一般的に PUFA の生産性向上には、デサチュラーゼやエロンガーゼの強化が有効であると考えられており、様々な生物からこれらの酵素群が同定されている (特許文献 1 参照)。例えば、次世代の油脂生産源として注目を集めている微細藻類の一種であるナンノクロロプシス (*Nannochloropsis*) 属に

属する藻類由来のデサチュラーゼやエロンガーゼが、長鎖脂肪酸の合成に使用できることが知られている（特許文献2及び3参照）。

このように、油糧生物において所望の長鎖脂肪酸（特にPUFA）に富む脂質を効率的に産生させる方法に対しては、当技術分野における需要がある。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：国際公開第2012/052468号

特許文献2：国際公開第2012/149457号

特許文献3：米国特許出願公開第2012/0277418号明細書

発明の概要

[0006] 本発明は、下記タンパク質（A）又は（B）をコードする遺伝子の発現を促進させた形質転換体を培養して脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質を生産させる、脂質の製造方法に関する。

（A）配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

（B）前記タンパク質（A）のアミノ酸配列と同一性が70%以上のアミノ酸配列からなり、かつβ-ケトアシル-CoAシンターゼ活性（以下、「KAS活性」ともいう）を有するタンパク質。

[0007] また本発明は、前記タンパク質（A）又は（B）に関する

また本発明は、前記タンパク質（A）又は（B）をコードする遺伝子に関する。

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

発明を実施するための形態

[0008] 本発明は、長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、長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

させた形質転換体に関する。

[0009] 本発明者らは、長鎖脂肪酸の合成に関与する酵素として、藻類の1種であるナンノクロロプシス属の藻類のKASを新たに同定した。そして、このKASの微生物内での発現を促進させた結果、生産される長鎖脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質の生産性が有意に向上することを見出した。

本発明はこれらの知見に基づいて完成するに至ったものである。

[0010] 本発明の脂質の製造方法によれば、長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、長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。

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。

[0011] 本明細書における「脂質」は、中性脂肪（トリアシルグリセロール等）、ろう、セラミド等の単純脂質；リン脂質、糖脂質、スルホ脂質等の複合脂質；及びこれらの脂質から誘導される、脂肪酸、アルコール類、炭化水素類等の誘導脂質を包含するものである。

また本明細書において、脂肪酸や、脂肪酸を構成するアシル基の表記において「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「ストリンジェントな条件」としては、例えばMolecular Cloning—A LABORATORY MANUAL THIRD EDITION [Joseph Sambrook, David W. Russell., Cold Spring Harbor Laboratory Press] 記載の方法が挙げられる。例えば、6×SSC (1×SSCの組成：0.15M

塩化ナトリウム、0.015 Mクエン酸ナトリウム、pH 7.0)、0.5% SDS、5×デンハート及び100 mg/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。

[0012] 前記タンパク質(A)及び(B)(以下、「NoKASII」ともいう)はKASの1種であり、長鎖脂肪酸の合成に関与するタンパク質である。配列番号1のアミノ酸配列からなるタンパク質は、ナンノクロロプシス属に属する藻類であるナンノクロロプシス・オキュラータ(*Nannochloropsis oculata*) NIES2145株由来のKASの1つである。

[0013] KASは、脂肪酸合成経路においてアシル基の鎖長制御に関与する酵素である。植物の脂肪酸合成経路は一般的に葉緑体に局在する。葉緑体では、アセチル-CoA (又はアセチル-CoA) を出発物質とし、炭素鎖の伸長反応が繰り返され、最終的に炭素原子数16又は18のアシル-CoAが合成される。次いで、アシル-CoAチオエステラーゼ(以下、単に「TE」ともいう)の作用によってアシル-CoAのチオエステル結合が加水分解され、遊離の脂肪酸が生成する。

脂肪酸合成の第一段階では、アセチル-CoA (又はアセチル-CoA) とマロニル-CoAとの縮合反応により、アセトアセチル-CoAが生成する。この反応をKASが触媒する。次いで、 β -ケトアシル-CoAレダクターゼによりアセトアセチル-CoAのケト基が還元されてヒドロキシブチリル-CoAが生成する。続いて、 β -ヒドロキシアシル-CoAデヒドラーゼによりヒドロキシブチリル-CoAが脱水され、クロトニル-CoAが生成する。最後に、エノイル-CoAレダクターゼによりクロトニル-CoAが還元されて、ブチリル-CoAが生成する。これら一連の反応により、アセチル-CoAから

アシル基の炭素鎖が2個伸長されたブチリルACPが生成する。以下、同様の反応を繰り返すことで、アシルACPの炭素鎖が伸長し、最終的に炭素原子数16又は18のアシルACPが合成される。

[0014] 前記タンパク質(A)及び(B)はいずれも、 β -ケトアシルACPシンターゼ活性(以下、「KAS活性」ともいう)を有する。本明細書において「KAS活性」とは、アセチルACP(又はアセチルCoA)やアシルACPと、マロニルACPとの縮合反応を触媒する活性を意味する。

タンパク質がKAS活性を有することは、例えば、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下で細胞を培養し、宿主細胞内又は培養液中の脂肪酸組成の変化を常法により分析することで確認できる。あるいは、宿主細胞内で機能するプロモーターの下流に前記タンパク質をコードする遺伝子を連結したDNAを宿主細胞へ導入し、導入した遺伝子が発現する条件下で細胞を培養した後、細胞の破砕液に対し、各種アシルACPを基質とした鎖長伸長反応を行うことにより確認できる。

[0015] KASはその基質特異性によってKAS I、KAS II、KAS III、又はKAS IVに分類される。KAS IIIは、炭素原子数2のアセチルACP(又はアセチルCoA)を基質とし、炭素原子数2から4の伸長反応を触媒する。KAS Iは、主に炭素原子数4から16の伸長反応を触媒し、炭素原子数16のパルミトイルACPを合成する。KAS IIは、主に炭素原子数18以上の長鎖アシル基への伸長反応を触媒し、長鎖アシルACPを合成する。KAS IVは主に炭素原子数6から14の伸長反応を触媒し、中鎖アシルACPを合成する。

後述の実施例で示すように、前記タンパク質(A)をコードする遺伝子の発現を促進した形質転換体では、炭素原子数18や20の長鎖脂肪酸の生産性が向上する。よって前記タンパク質(A)及び(B)は、炭素原子数18以上の長鎖 β -ケトアシルACP合成活性を有する、KAS II型のKASであ

ると考えられる。また、ChloroP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>) を用いた局在予測より、前記タンパク質 (A) は葉緑体局在型のKASであり、N末端側のアミノ酸33残基は葉緑体移行シグナル配列であると考えられる。なお本明細書において「長鎖 β -ケトアシル-ACP合成活性」とは、主に炭素原子数16以上のアシル-ACPを基質とし、炭素原子数18以上の長鎖アシル-ACP合成の伸長反応を触媒する活性のことをいう。また本明細書において「長鎖」とは、アシル基の炭素原子数が18以上、好ましくは炭素原子数が18又は20であることをいう。

[0016] KASの長鎖 β -ケトアシル-ACP合成活性については、例えば、宿主細胞内で機能するプロモーターの下流に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下で細胞を培養して、宿主細胞又は培養液中の脂肪酸組成の変化を常法により分析することで確認できる。また、上記の系に後述するTEを共発現させ、TEのみを発現させた場合の脂肪酸組成と比較することにより確認できる。また、宿主細胞内で機能するプロモーターの下流に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下で細胞を培養した後、細胞の破碎液に対し鎖長伸長反応を行うことにより確認できる。

[0017] 前記タンパク質 (B) において、KAS活性の点から、前記タンパク質 (A) のアミノ酸配列との同一性は75%以上が好ましく、80%以上がより好ましく、85%以上がより好ましく、90%以上がより好ましく、92%以上がより好ましく、95%以上がより好ましく、98%以上がより好ましく、99%以上がさらに好ましい。また、前記タンパク質 (B) として、前記タンパク質 (A) のアミノ酸配列に、1又は複数個 (例えば1個以上142個以下、好ましくは1個以上118個以下、より好ましくは1個以上95個以下、より好ましくは1個以上71個以下、より好ましくは1個以上47個以下、より好ましくは1個以上38個以下、より好ましくは1個以上23個以下、より好ましくは1個以上9個以下、さらに好ましくは1個以上4個以下

）のアミノ酸を欠失、置換、挿入又は付加したタンパク質が挙げられる。

アミノ酸配列に変異を導入する方法としては、例えば、アミノ酸配列をコードする塩基配列に変異を導入する方法が挙げられる。変異を導入する方法としては、部位特異的な変異導入法が挙げられる。具体的な部位特異的な変異の導入方法としては、SOE-PCR反応を利用した方法、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）、TransformerTM Site-Directed Mutagenesisキット（Clontech社）、KOD-Plus-Mutagenesis Kit（東洋紡社）等の市販のキットを利用することもできる。また、ランダムな遺伝子変異を与えた後、適当な方法により酵素活性の評価及び遺伝子解析を行うことにより目的遺伝子を取得することもできる。

[0018] 前記タンパク質（A）及び（B）は、通常の化学的手法、遺伝子工学的手法等により得ることができる。例えば、ナンノクロロプシス・オキュラータから単離、精製等することで天然物由来のタンパク質を取得することができる。また、配列番号1に示すアミノ酸配列情報をもとに人工的に化学合成することで、前記タンパク質（A）及び（B）を得ることができる。あるいは、遺伝子組み換え技術により、組換えタンパク質として前記タンパク質（A）及び（B）を作製してもよい。組換えタンパク質を作製する場合には、後述する β -ケトアシル-ACPシンターゼ遺伝子を用いることができる。

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

[0019] 前記タンパク質（A）又は（B）をコードする遺伝子（以下、「KAS遺伝子」ともいう）の一例として、下記DNA（a）又は（b）からなる遺伝子（以下、「NoKASII遺伝子」ともいう）が挙げられる。

（a）配列番号2で表される塩基配列からなるDNA。

(b) 前記DNA (a) の塩基配列と同一性が70%以上の塩基配列からなり、かつβ-ケトアシル-ACPシンターゼ活性を有する前記タンパク質 (A) 又は (B) をコードするDNA。

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

[0020] 前記DNA (b) において、KAS活性の点から、前記DNA (a) の塩基配列との同一性は75%以上が好ましく、80%以上がより好ましく、85%以上がより好ましく、90%以上がより好ましく、92%以上がより好ましく、95%以上がより好ましく、98%以上がより好ましく、99%以上がさらに好ましい。

また前記DNA (b) として、配列番号2で表される塩基配列において1又は複数個 (例えば1個以上428個以下、好ましくは1個以上357個以下、より好ましくは1個以上285個以下、より好ましくは1個以上214個以下、より好ましくは1個以上142個以下、より好ましくは1個以上114個以下、より好ましくは1個以上71個以下、より好ましくは1個以上28個以下、さらに好ましくは1個以上14個以下) の塩基が欠失、置換、挿入、又は付加されており、かつKAS活性を有するタンパク質をコードするDNAも好ましい。

さらに前記DNA (b) として、前記DNA (a) と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつKAS活性を有するタンパク質をコードするDNAも好ましい。

[0021] 前記KAS遺伝子の発現を促進させる方法としては、常法より適宜選択することができる。例えば、前記KAS遺伝子を宿主に導入する方法、前記KAS遺伝子をゲノム上に有する宿主において、当該遺伝子の発現調節領域 (プロモーター、ターミネーター等) を改変する方法、などが挙げられる。

以下本明細書において、目的のタンパク質をコードする遺伝子の発現を促

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

本発明で用いる形質転換体は、宿主自体に比べ、長鎖脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質の生産性（長鎖脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質の生産量、生産される全脂肪酸中又は全脂質中に占める長鎖脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質の割合（比率））が有意に向上する。またその結果、当該形質転換体では、脂質中の脂肪酸組成が改変される。そのため、当該形質転換体を用いた本発明は、特定の炭素原子数の脂質、特に長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 18 以上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 18～22 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 18～20 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 18 若しくは 20 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 18 若しくは 20 の不飽和脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質、より好ましくは C18 : 1、C18 : 2、C18 : 3、C20 : 4 若しくは C20 : 5、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 18 若しくは 20 の PUFA 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 20 の PUFA 又はこれを構成する脂質、より好ましくは C20 : 4 若しくは C20 : 5、又はこれを構成する脂質、よりさらに好ましくはエイコサペンタエン酸（以下、「EPA」ともいう）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。

さらに本発明の形質転換体は、宿主と比較して、脂肪酸、及びそのエステル化合物を構成する脂肪酸エステルの総量に占める、長鎖脂肪酸量及びそのエステル化合物量の比率が向上する。前記長鎖脂肪酸は、炭素原子数 18 以上の脂肪酸が好ましく、炭素原子数 18～22 の脂肪酸がより好ましく、炭素原子数 18～20 の脂肪酸がより好ましく、炭素原子数 18 又は 20 の脂肪酸がより好ましく、炭素原子数 18 又は 20 の不飽和脂肪酸がより好ましく、C18 : 1、C18 : 2、C18 : 3、C20 : 4 又は C20 : 5 がよ

り好ましく、炭素原子数 18 若しくは 20 の P U F A がより好ましく、炭素原子数 20 の P U F A がより好ましく、C 20 : 4 若しくは C 20 : 5 がより好ましく、EPA がより好ましい。

なお、宿主や形質転換体の脂肪酸及び脂質の生産性については、実施例で用いた方法により測定することができる。

[0022] 前記 KAS 遺伝子を宿主に導入して前記遺伝子の発現を促進させる方法について説明する。

前記 KAS 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、KAS 遺伝子を人工的に合成できる。KAS 遺伝子の合成は、例えば、インビトロジェン社等のサービスを利用することができる。また、ナンノクロロプシス・オキュラータからクローニングによって取得することもできる。例えば、Molecular Cloning—A LABORATORY MANUAL THIRD EDITION [Joseph Sambrook, David W. Russell, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001)] 記載の方法等により行うことができる。また、実施例で用いたナンノクロロプシス・オキュラータ NIES-2145 は、国立環境研究所 (NIES) より入手することができる。

[0023] 本発明で好ましく用いることができる形質転換体は、前記 KAS 遺伝子を常法により前記宿主に導入することで得られる。具体的には、前記 KAS 遺伝子を宿主細胞中で発現させることのできる組換えベクターや遺伝子発現カセットを調製し、これを宿主細胞に導入して宿主細胞を形質転換させることにより作製できる。

[0024] 形質転換体の宿主としては通常用いられるものより適宜選択することができる。本発明で用いることができる宿主としては、微生物（藻類や微細藻類を含む）、植物体、及び動物体が挙げられる。製造効率及び得られた脂質の利用性の点から、宿主は微生物又は植物体であることが好ましく、微生物であることがより好ましく、微細藻類であることがさらに好ましい。

前記微生物は原核生物、真核生物のいずれであってもよく、エシェリキア

(Escherichia) 属の微生物やバシラス (Bacillus) 属の微生物、シネコシステイス (Synechocystis) 属の微生物、シネココッカス (Synechococcus) 属の微生物等の原核生物、又は酵母や糸状菌等の真核微生物を用いることができる。なかでも、脂質生産性の観点から、大腸菌 (Escherichia coli)、枯草菌 (Bacillus subtilis)、赤色酵母 (Rhodospiridium toruloides)、又はモルチエレラ・エスピー (Mortierella sp.) が好ましく、大腸菌がより好ましい。

前記藻類や微細藻類としては、遺伝子組換え手法が確立している観点から、クラミドモナス (Chlamydomonas) 属の藻類、クロレラ (Chlorella) 属の藻類、ファエオダクティラム (Phaeodactylum) 属の藻類、又はナンノクロロプシス属の藻類が好ましく、ナンノクロロプシス属の藻類がより好ましい。ナンノクロロプシス属の藻類の具体例としては、ナンノクロロプシス・オキュラータ、ナンノクロロプシス・ガディタナ (Nannochloropsis gaditana)、ナンノクロロプシス・サリナ (Nannochloropsis salina)、ナンノクロロプシス・オセアニカ (Nannochloropsis oceanica)、ナンノクロロプシス・アトムス (Nannochloropsis atomus)、ナンノクロロプシス・マキュラタ (Nannochloropsis maculata)、ナンノクロロプシス・グラニユラータ (Nannochloropsis granulata)、ナンノクロロプシス・エスピー (Nannochloropsis sp.) 等が挙げられる。なかでも、脂質生産性の観点から、ナンノクロロプシス・オキュラータ、又はナンノクロロプシス・ガディタナが好ましく、ナンノクロロプシス・オキュラータがより好ましい。

前記植物体としては、種子に脂質を高含有する観点から、シロイヌナズナ (Arabidopsis thaliana)、西洋アブラナ (Brassica napus)、アブラナ (Brassica rapa)、ココヤシ (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。

[0025] 遺伝子発現用プラスミドベクター又は遺伝子発現カセットの母体となるベクター（プラスミド）としては、目的のタンパク質をコードする遺伝子を宿主に導入することができ、宿主細胞内で当該遺伝子を発現させることができるベクターであればよい。例えば、導入する宿主の種類に応じたプロモーターやターミネーター等の発現調節領域を有するベクターであって、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 (Mckenzie, T. et al., 1986, Plasmid 15 (2), p. 93-103)、pBR322（タカラバイオ社製）、pRS403（ストラタジーン社製）、及びpMW218/219（ニッポンジーン社製）が挙げられる。特に、宿主が大腸菌の場合は、pBluescript II SK(-)、又はpMW218/219が好ましく用いられる。

藻類又は微細藻類を宿主とする場合には、例えば、pUC19（タカラバイオ社製）、P66 (Chlamydomonas Center)、P-322 (Chlamydomonas Center)、pPha-T1 (Yangmin Gong, et al., Journal of Basic Microbiology, 2011, vol. 51, p. 666-672参照)、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、Oliver Kilian, et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, vol. 108(52)の記載の方法を参考にして、目的の遺伝子、プロモーター及びターミネーターからなるDNA断片（遺伝子発現カセット）を用いて宿主を形質転換することもできる。このDNA断片としては、例えば

、PCRにより増幅したDNA断片や制限酵素で切断したDNA断片が挙げられる。

植物細胞を宿主とする場合には、例えば、pRI系ベクター（タカラバイオ社製）、pBI系ベクター（クロンテック社製）、及びIN3系ベクター（インプラントイノベーションズ社製）が挙げられる。特に、宿主がシロイヌナズナの場合は、pRI系ベクター又はpBI系ベクターが好ましく用いられる。

[0026] また、前記発現ベクターに組み込んだ目的のタンパク質をコードする遺伝子の発現を調整するプロモーターの種類も、使用する宿主の種類に応じて適宜選択することができる。本発明で好ましく用いることができるプロモーターとしては、lacプロモーター、trpプロモーター、tacプロモーター、trcプロモーター、T7プロモーター、SpoVGプロモーター、イソプロピル 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、ハウスキープینگ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ビオラキサンチン／クロロフィルa結合タンパク質遺伝子のプロモーター（VCP1プロモーター、VCP2プロモーター）（Oliver Kilian, et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, vol. 108 (52))、及びナンノクロロプシス属由来のオレオシン様タンパクLDSP (lipid droplet surface protein) 遺伝子のプロモーター（Astrid Vieler, et al., PLOS Genetics, 2012;8(11):e1003064, doi: 10.1371）が挙げられる。本発明で宿主としてナンノクロロプシスを用いる場合、ビオラキサンチン／クロロフィルa結合タンパク質遺伝子のプロモーターや、ナンノクロロプシス属由来のオレオシン様タンパクLDSP遺伝子のプロモーターを好ましく用いることができる。

また、目的のタンパク質をコードする遺伝子が組み込まれたことを確認す

るための選択マーカーの種類も、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、ビアラフォス耐性遺伝子、ゼオシン耐性遺伝子、パロモマイシン耐性遺伝子、及びハイグロマイシン耐性遺伝子等の薬剤耐性遺伝子が挙げられる。さらに、栄養要求性に関連する遺伝子の欠損等を選択マーカー遺伝子として使用することもできる。

[0027] 目的のタンパク質をコードする遺伝子の前記ベクターへの導入は、制限酵素処理やライゲーション等の常法により行うことができる。

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

[0028] 目的遺伝子断片が導入された形質転換体の選択は、選択マーカー等を利用することで行うことができる。例えば、薬剤耐性遺伝子が、形質転換時に目的DNA断片とともに宿主細胞中に導入された結果、形質転換体が獲得する薬剤耐性を指標に行うことができる。また、ゲノムを鋳型としたPCR法等によって、目的DNA断片の導入を確認することもできる。

[0029] 前記KAS遺伝子をゲノム上に有する宿主において、当該遺伝子の発現調節領域を改変して、前記遺伝子の発現を促進させる方法について説明する。

「発現調節領域」とは、プロモーターやターミネーターを示し、これらの配列は一般に隣接する遺伝子の発現量（転写量、翻訳量）の調節に関与して

いる。ゲノム上に前記KAS遺伝子を有する宿主においては、当該遺伝子の発現調節領域を改変して前記KAS遺伝子の発現を促進させることで、長鎖脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質の生産性を向上させることができる。

[0030] 発現調節領域の改変方法としては、例えばプロモーターの入れ替えが挙げられる。ゲノム上に前記KAS遺伝子を有する宿主において、当該遺伝子のプロモーター（以下、「KASプロモーター」ともいう）を、より転写活性の高いプロモーターに入れ替えることで、前記KAS遺伝子の発現を促進させることができる。例えば、ゲノム上に前記KAS遺伝子を有する宿主の1つであるナンノクロロプシス・オキュラータNIES-2145株においては、配列番号23に示す塩基配列からなるDNA配列の直下にNoKASII遺伝子が存在しており、配列番号23に示す塩基配列からなるDNA配列中にプロモーター領域が存在している。この配列番号23に示す塩基配列からなるDNA配列の一部又は全部をより転写活性の高いプロモーターに入れ替えることで、前記KAS遺伝子の発現を促進させることができる。

[0031] KASプロモーターの入れ替えに用いるプロモーターとしては特に限定されず、KASプロモーターよりも転写活性が高く、長鎖脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質の生産に適したものから適宜選択することができる。

宿主としてナンノクロロプシスを用いる場合には、チューブリンプロモーター、ヒートショックプロテインプロモーター、上述のビオラキサンチン／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）、又はナンノクロロプシス属由来のオレオシン様タンパクLDSP遺伝子のプロモーター（配列番号6）を好ましく用いることができる。長鎖脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質の生産性向上の観点から、ビオラキサンチン／クロロフィルa結合タンパク質遺伝子のプロモーター又はLDSP遺伝子のプロモーターがより好ましく、LDSP遺伝子のプロモーターがさらに好ましい。

[0032] 前述のプロモーターの改変は、相同組換えなどの常法に従い行うことができる。具体的には、標的とするプロモーターの上流、下流領域を含み、標的

プロモーターに代えて別のプロモーターを含む直鎖状のDNA断片を構築し、これを宿主細胞に取り込ませ、宿主ゲノムの標的プロモーターの上流側と下流側とで2回交差の相同組換えを起こす。その結果、ゲノム上の標的プロモーターが別のプロモーター断片と置換され、プロモーターを改変することができる。

このような相同組換えによる標的プロモーターの改変方法は、例えば、Besher et al., *Methods in molecular biology*, 1995, vol. 47, p. 291-302等の文献を参考に行うことができる。特に、宿主がナンノクロロプシス属に属する藻類の場合、Oliver Kilian, et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, vol. 108(52)等の文献を参考にして、相同組換え法によりゲノム中の特定の領域を改変することができる。

[0033] 本発明の形質転換体は、前記タンパク質（A）又は（B）をコードする遺伝子に加えて、TEをコードする遺伝子（以下、「TE遺伝子」ともいう）の発現も促進されていることが好ましい。

前述したように、TEは、KAS等の脂肪酸合成酵素によって合成されたアシル-ACPのチオエステル結合を加水分解し、遊離の脂肪酸を生成する酵素である。TEの作用によってACP上での脂肪酸合成が終了し、切り出された脂肪酸はPUFAの合成やトリアシルグリセロール（以下、「TAG」ともいう）等の合成に供される。そのため、KAS遺伝子に加えてTE遺伝子の発現を促進することで、脂質の製造に用いる形質転換体の脂質の生産性、特に脂肪酸の生産性を一層向上させることができる。

本発明で用いることができるTEは、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ればよい。ここで「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。

[0034] TE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いる。よってTEはKASと同様、生体内での脂肪酸組成を決定する重要なファクターであると考えられている。また、TEをコードする遺伝子を元来有していない宿主を用いる場合、TEをコードする遺伝子、好ましくは長鎖アシル-CoA対する基質特異性を有するTEをコードする遺伝子の導入が効果的である。このような遺伝子を導入することで、長鎖脂肪酸の生産性を一層向上させることができる。

本発明で用いることができるTEは、通常のTEや、それらと機能的に均等なタンパク質から、宿主の種類等に応じて適宜選択することができる。例えば、シロイヌナズナ由来FatA（配列番号24）、シロイヌナズナ由来FatB（配列番号25）、マンゴスチン（*Garcinia mangostana*）由来FatA（配列番号26）、ナンノクロロプシス・ガディタナ由来TE（配列番号27）、ナンノクロロプシス・オキュラータ由来TE（配列番号28又は30）、ナンノクロロプシス・グラニユラータ由来TE（配列番号29）、大腸菌由来tesA（配列番号31）などを用いることができる。長鎖アシル-CoAに対する基質特異性の観点から、シロイヌナズナ由来FatA、マンゴスチン由来FatAがより好ましい。

また、TE遺伝子の発現を促進させた形質転換体は、常法により作製できる。例えば、前述のKAS遺伝子の発現を促進させる方法と同様、TE遺伝子を宿主に導入する方法、TE遺伝子をゲノム上に有する宿主において当該遺伝子の発現調節領域を改変する方法、などにより形質転換体を作製することができる。

[0035] さらに本発明の形質転換体は、前記タンパク質（A）又は（B）をコードする遺伝子に加えて、デサチュラーゼをコードする遺伝子（以下、「デサチュラーゼ遺伝子」ともいう）、及びエロンガーゼをコードする遺伝子（以下、「エロンガーゼ遺伝子」ともいう）からなる群より選ばれる少なくとも1種の遺伝子の発現も促進されていることが好ましい。

前述したように、炭素原子数18以上の長鎖脂肪酸、特にPUFAは、葉緑体外にて多数のデサチュラーゼやエロンガーゼによって合成されると言わ

れている。そのため、KAS遺伝子に加えデサチュラーゼやエロンガーゼをコードする遺伝子の発現を促進することで、長鎖脂肪酸、特にP U F Aの生産性を一層向上させることができる。

[0036] 本発明で用いることができるデサチュラーゼやエロンガーゼは、通常のデサチュラーゼやエロンガーゼや、それらと機能的に均等なタンパク質から、宿主の種類等に応じて適宜選択することができる。例えば、特許文献1～3記載のナンノクロロプシス由来デサチュラーゼ、エロンガーゼを好ましく用いることができる。

[0037] 本発明で用いることができるデサチュラーゼとしては、 $\Delta 12$ -デサチュラーゼ（以下、「 $\Delta 12$ -DES」ともいう）、 $\Delta 6$ -デサチュラーゼ（以下、「 $\Delta 6$ -DES」ともいう）、 $\omega 3$ -デサチュラーゼ（以下、「 $\omega 3$ -DES」ともいう）、 $\Delta 5$ -デサチュラーゼ（以下、「 $\Delta 5$ -DES」ともいう）、 $\Delta 9$ -デサチュラーゼ（以下、「 $\Delta 9$ -DES」ともいう）が挙げられる。

なお本発明において、これらのデサチュラーゼを単独で用いてもよいし、2種以上を組合せて用いてもよい。

[0038] 本明細書において「 $\Delta 12$ -DES」とは、オレイン酸の $\Delta 12$ 位に不飽和結合を導入し、リノール酸を生成する反応を触媒するタンパク質（酵素）を意味する。そして本明細書において「 $\Delta 12$ -デサチュラーゼ活性（以下、「 $\Delta 12$ -DES活性」ともいう）」とは、オレイン酸の $\Delta 12$ 位に不飽和結合を導入する活性を意味する。タンパク質が $\Delta 12$ -DES活性を有することは、例えば、 $\Delta 12$ -DES合成遺伝子欠損株を用いた系により確認することができる。あるいは、宿主細胞内で機能するプロモーターの下流に前記タンパク質をコードする遺伝子を連結したDNAを $\Delta 12$ -DES合成遺伝子欠損株に導入し、リノール酸の生成を検討することで確認できる。あるいは、 $\Delta 12$ -DES又はこれを含む細胞破碎液を調製し、オレイン酸、オレオイルC o Aなどを含む反応液と反応させ、常法に従いオレイン酸量の減少又はリノール酸量の増加を測定することで確認できる。

本発明で好ましく用いることができる $\Delta 12$ -DESは、通常の $\Delta 12$ -DESや、そ

れらと機能的に均等なタンパク質から、宿主の種類等に応じて適宜選択することができる。例えば、ナンノクロロプシス・オキュラータ由来の $\Delta 12$ -DES（以下、「No $\Delta 12$ -DES」ともいう）（配列番号32）やナンノクロロプシス・ガディタナ由来の $\Delta 12$ -DES（以下、「Ng $\Delta 12$ -DES」ともいう）（配列番号34）等が挙げられる。また、これと機能的に均等なタンパク質として、No $\Delta 12$ -DESやNg $\Delta 12$ -DESのアミノ酸配列との同一性が60%以上（好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上）のアミノ酸配列からなり、かつ $\Delta 12$ -DES活性を有するタンパク質も用いることができる。No $\Delta 12$ -DESをコードする遺伝子としては、配列番号33で表される塩基配列からなるDNAからなる遺伝子、又は配列番号33で表される塩基配列との同一性が60%以上（好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上）の塩基配列からなり、かつ $\Delta 12$ -DES活性を有するタンパク質をコードするDNAからなる遺伝子が挙げられる。Ng $\Delta 12$ -DESをコードする遺伝子としては、配列番号35で表される塩基配列からなるDNAからなる遺伝子、又は配列番号35で表される塩基配列との同一性が60%以上（好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上）の塩基配列からなり、かつ $\Delta 12$ -DES活性を有するタンパク質をコードするDNAからなる遺伝子が挙げられる。

[0039] 本明細書において「 $\Delta 6$ -DES」とは、リノール酸の $\Delta 6$ 位に不飽和結合を導入し、 γ -リノレン酸を生成する反応を触媒するタンパク質（酵素）を意味する。そして本明細書において本明細書において「 $\Delta 6$ -デサチュラーゼ活性（以下、「 $\Delta 6$ -DES活性」ともいう）」とは、リノール酸の $\Delta 6$ 位に不飽和結合を導入する活性を意味する。タンパク質が $\Delta 6$ -DES活性を有することは、例えば、 $\Delta 6$ -DES合成遺伝子欠損株を用いた系により確認することができる。あるいは、宿主細胞内で機能するプロモーターの下流に前記タンパク質をコードする遺伝子を連結したDNAを $\Delta 6$ -DES合成遺伝子欠損株に導入し、 γ -リノレン酸の生成を検討することで確認できる。あるいは、 $\Delta 6$ -DES又はこれを含む含有する細胞破碎液を調製し、リノール酸、リノレオイルCoAなどを含む反

応液と反応させ、常法に従いリノール酸量の減少又は γ -リノレン酸量の増加を測定することで確認できる。

本発明で好ましく用いることができる $\Delta 6$ -DESは、通常の $\Delta 6$ -DESや、それらと機能的に均等なタンパク質から、宿主の種類等に応じて適宜選択することができる。例えば、ナンノクロロプシス・オキュラータ由来の $\Delta 6$ -DES（以下、「No $\Delta 6$ -DES」ともいう）（配列番号36）やナンノクロロプシス・ガディタナ由来の $\Delta 6$ -DES（以下、「Ng $\Delta 6$ -DES」ともいう）（配列番号38）等が挙げられる。また、これと機能的に均等なタンパク質として、No $\Delta 6$ -DESやNg $\Delta 6$ -DESのアミノ酸配列との同一性が60%以上（好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上）のアミノ酸配列からなり、かつ $\Delta 6$ -DES活性を有するタンパク質も用いることができる。No $\Delta 6$ -DESをコードする遺伝子としては、配列番号37で表される塩基配列からなるDNAからなる遺伝子、又は配列番号37で表される塩基配列との同一性が60%以上（好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上）の塩基配列からなり、かつ $\Delta 6$ -DES活性を有するタンパク質をコードするDNAからなる遺伝子が挙げられる。Ng $\Delta 6$ -DESをコードする遺伝子としては、配列番号39で表される塩基配列からなるDNAからなる遺伝子、又は配列番号39で表される塩基配列との同一性が60%以上（好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上）の塩基配列からなり、かつ $\Delta 6$ -DES活性を有するタンパク質をコードするDNAからなる遺伝子が挙げられる。

[0040] 本明細書において「 $\omega 3$ -DES」とは、アラキドン酸の $\omega 3$ 位に不飽和結合を導入し、EPAを生成する反応を触媒するタンパク質（酵素）を意味する。そして本明細書において「 $\omega 3$ -デサチュラーゼ活性（以下、「 $\omega 3$ -DES活性」ともいう）」とは、アラキドン酸の $\omega 3$ 位に不飽和結合を導入する活性を意味する。タンパク質が $\omega 3$ -DES活性を有することは、例えば、 $\omega 3$ -DES合成遺伝子欠損株を用いた系により確認することができる。あるいは、宿主細胞内で機能するプロモーターの下流に前記タンパク質をコードする遺

伝子を連結したDNAを ω 3-DES合成遺伝子欠損株に導入し、EPAの生成を検討することで確認できる。あるいは、 ω 3-DES又はこれを含有する細胞破碎液を調製し、アラキドン酸誘導体（CoAとのチオエステル化合物、グリセロールとのエステル化合物など）を含む反応液と反応させ、常法に従いアラキドン酸量の減少又はEPA量の増加を測定することで確認できる。

本発明で好ましく用いることができる ω 3-DESは、通常の ω 3-DESや、それらと機能的に均等なタンパク質から、宿主の種類等に応じて適宜選択することができる。例えば、ナンノクロロプシス・オキュラータ由来の ω 3-DES（以下、「No ω 3-DES」ともいう）（配列番号40）やナンノクロロプシス・ガディタナ由来の ω 3-DES（以下、「Ng ω 3-DES」ともいう）（配列番号42）等が挙げられる。また、これと機能的に均等なタンパク質として、No ω 3-DESやNg ω 3-DESのアミノ酸配列との同一性が60%以上（好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上）のアミノ酸配列からなり、かつ ω 3-DES活性を有するタンパク質も用いることができる。No ω 3-DESをコードする遺伝子としては、配列番号41で表される塩基配列からなるDNAからなる遺伝子、又は配列番号41で表される塩基配列との同一性が60%以上（好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上）の塩基配列からなり、かつ ω 3-DES活性を有するタンパク質をコードするDNAからなる遺伝子が挙げられる。Ng ω 3-DESをコードする遺伝子としては、配列番号43で表される塩基配列からなるDNAからなる遺伝子、又は配列番号43で表される塩基配列との同一性が60%以上（好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上）の塩基配列からなり、かつ ω 3-DES活性を有するタンパク質をコードするDNAからなる遺伝子が挙げられる。

[0041] 本明細書において「 Δ 5-DES」とは、ジホモ- γ -リノレン酸の Δ 5位に不飽和結合を導入し、アラキドン酸を生成する反応を触媒するタンパク質（酵素）を意味する。そして本明細書において本明細書において「 Δ 5-デサチュラーゼ活性（以下、「 Δ 5-DES活性」ともいう）」とは、ジホモ- γ -リノレン酸

の $\Delta 5$ 位に不飽和結合を導入する活性を意味する。タンパク質が $\Delta 5$ -DES活性を有することは、例えば、 $\Delta 5$ -DES合成遺伝子欠損株を用いた系により確認することができる。あるいは、宿主細胞内で機能するプロモーターの下流に前記タンパク質をコードする遺伝子を連結したDNAを $\Delta 5$ -DES合成遺伝子欠損株に導入し、アラキドン酸の生成を検討することで確認できる。あるいは、 $\Delta 5$ -DES又はこれを含有する細胞破碎液を調製し、ジホモ- γ -リノレン酸誘導体（C₁₈ Aとのチオエステル化合物、グリセロールとのエステル化合物など）を含む反応液と反応させ、常法に従いジホモ- γ -リノレン酸量の減少又はアラキドン酸量の増加を測定することで確認できる。

本発明で好ましく用いることができる $\Delta 5$ -DESは、通常の $\Delta 5$ -DESや、それらと機能的に均等なタンパク質から、宿主の種類等に応じて適宜選択することができる。例えば、ナンノクロロプシス・オキュラータ由来の $\Delta 5$ -DES（以下、「No $\Delta 5$ -DES」ともいう）（配列番号44）やナンノクロロプシス・ガディタナ由来の $\Delta 5$ -DES（以下、「Ng $\Delta 5$ -DES」ともいう）（配列番号46）等が挙げられる。また、これと機能的に均等なタンパク質として、No $\Delta 5$ -DESやNg $\Delta 5$ -DESのアミノ酸配列との同一性が60%以上（好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上）のアミノ酸配列からなり、かつ $\Delta 5$ -DES活性を有するタンパク質も用いることができる。No $\Delta 5$ -DESをコードする遺伝子としては、配列番号45で表される塩基配列からなるDNAからなる遺伝子、又は配列番号45で表される塩基配列との同一性が60%以上（好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上）の塩基配列からなり、かつ $\Delta 5$ -DES活性を有するタンパク質をコードするDNAからなる遺伝子が挙げられる。Ng $\Delta 5$ -DESをコードする遺伝子としては、配列番号47で表される塩基配列からなるDNAからなる遺伝子、又は配列番号47で表される塩基配列との同一性が60%以上（好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上）の塩基配列からなり、かつ $\Delta 5$ -DES活性を有するタンパク質をコードするDNAからなる遺伝子が挙げられる。

[0042] 本明細書において「 $\Delta 9$ -DES」とは、ステアリン酸（以下、「C18:0」とも表記する）の $\Delta 9$ 位に不飽和結合を導入し、オレイン酸を生成する反応を触媒するタンパク質（酵素）を意味する。そして本明細書において本明細書において「 $\Delta 9$ -デサチュラーゼ活性（以下、「 $\Delta 9$ -DES活性」ともいう）」とは、ステアリン酸の $\Delta 9$ 位に不飽和結合を導入する活性を意味する。タンパク質が $\Delta 9$ -DES活性を有することは、例えば、 $\Delta 9$ -DES合成遺伝子欠損株を用いた系により確認することができる。あるいは、宿主細胞内で機能するプロモーターの下流に前記タンパク質をコードする遺伝子を連結したDNAを $\Delta 9$ -DES合成遺伝子欠損株に導入し、オレイン酸の生成を検討することで確認できる。あるいは、 $\Delta 9$ -DES又はこれを含有する細胞破碎液を調製し、ステアリン酸、ステアロイルCoAなどを含む反応液と反応させ、常法に従いステアリン酸量の減少又はオレイン量の増加を測定することで確認できる。

本発明で好ましく用いることができる $\Delta 9$ -DESは、通常の $\Delta 9$ -DESや、それらと機能的に均等なタンパク質から、宿主の種類等に応じて適宜選択することができる。例えば、ナンノクロロプシス・オキュラータ由来の $\Delta 9$ -DES（以下、「No $\Delta 9$ -DES」ともいう）（配列番号48）やナンノクロロプシス・ガディタナ由来の $\Delta 9$ -DES（以下、「Ng $\Delta 9$ -DES」ともいう）（配列番号50）等が挙げられる。また、これと機能的に均等なタンパク質として、No $\Delta 9$ -DESやNg $\Delta 9$ -DESのアミノ酸配列との同一性が60%以上（好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上）のアミノ酸配列からなり、かつ $\Delta 9$ -DES活性を有するタンパク質も用いることができる。No $\Delta 9$ -DESをコードする遺伝子としては、配列番号49で表される塩基配列からなるDNAからなる遺伝子、又は配列番号49で表される塩基配列との同一性が60%以上（好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上）の塩基配列からなり、かつ $\Delta 9$ -DES活性を有するタンパク質をコードするDNAからなる遺伝子が挙げられる。Ng $\Delta 9$ -DESをコードする遺伝子としては、配列番号51で表される塩基配列からなるDNAからなる遺伝子、又は配列番号51で表される塩基配列との同一性が60%以上

(好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上)の塩基配列からなり、かつ $\Delta 9$ -DES活性を有するタンパク質をコードするDNAからなる遺伝子が挙げられる。

[0043] また、これらデサチュラーゼ遺伝子やエロンガーゼ遺伝子の発現を促進させた形質転換体は、常法により作製できる。例えば、前述のKAS遺伝子の発現を促進させる方法と同様、デサチュラーゼ又はエロンガーゼをコードする遺伝子を宿主に導入する方法、デサチュラーゼ又はエロンガーゼをコードする遺伝子をゲノム上に有する宿主において当該遺伝子の発現調節領域を改変する方法、などにより形質転換体を作製することができる。

[0044] 本発明の形質転換体は、長鎖脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質の生産性が、前記タンパク質(A)又は(B)をコードする遺伝子の発現が促進されていない宿主と比較して向上している。したがって、本発明の形質転換体を適切な条件で培養し、次いで得られた培養物又は生育物から長鎖脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質を回収すれば、長鎖脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質を効率の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。

[0045] 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る、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。

[0046] 宿主として大腸菌を用いる場合、大腸菌の培養は、例えば、LB培地又はovernight Express Instant TB Medium (Novagen社)で、30~37℃、0.5~1日間培養することができる。

また、宿主としてシロイヌナズナを用いる場合、シロイヌナズナの培養は、例えば、土壌で温度条件20~25℃、白色光を連続照射又は明期16時間・暗期8時間等の光条件下で1~2か月間栽培することができる。

[0047] 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、E S M 培地、ダイゴ I M K 培地、L 1 培地、M N K 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、E S M 培地、又はダイゴ I M K 培地が好ましく、f / 2 培地、又はダイゴ I M K 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。

培地に接種する形質転換体の量は適宜選択することができ、生育性の点から培地当たり 1 ~ 5 0 % (vol/vol) が好ましく、1 ~ 1 0 % (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 ~ 4 0 °C の範囲である。藻類の生育促進、脂肪酸の生産性向上、及び生産コストの低減の観点から、好ましくは 1 0 ~ 3 5 °C であり、より好ましくは 1 5 ~ 3 0 °C である。

また藻類の培養は、光合成ができるよう光照射下で行うことが好ましい。光照射は、光合成が可能な条件であればよく、人工光でも太陽光でもよい。光照射時の照度としては、藻類の生育促進、脂肪酸の生産性向上の観点から、好ましくは 1 0 0 ~ 5 0 0 0 0 ルクスの範囲、より好ましくは 3 0 0 ~ 1 0 0 0 0 ルクスの範囲、さらに好ましくは 1 0 0 0 ~ 6 0 0 0 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、2 4 時間のうち明期が好ましくは 8 ~ 2 4 時間、より好ましくは 1 0 ~ 1 8 時間、さらに好ましくは 1 2 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 . 0 3 (大気条件と同程度) ~ 1 0 % が好ましく、より好ましくは 0 . 0 5 ~ 5 %、さらに好ましくは 0 . 1 ~ 3 %、よりさらに好

ましくは0.3～1%である。炭酸塩の濃度は特に限定されないが、例えば炭酸水素ナトリウムを用いる場合、生育促進、脂肪酸の生産性向上の観点から0.01～5質量%が好ましく、より好ましくは0.05～2質量%、さらに好ましくは0.1～1質量%である。

培養時間は特に限定されず、脂質を高濃度に蓄積する藻体が高い濃度で増殖できるように、長期間（例えば150日程度）行なってもよい。藻類の生育促進、脂肪酸の生産性向上、及び生産コストの低減の観点から、培養期間は、好ましくは3～90日間、より好ましくは3～30日間、さらに好ましくは7～30日間である。なお、培養は、通気攪拌培養、振とう培養又は静置培養のいずれでもよく、通気性の向上の観点から、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。

[0048] 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。

[0049] 本発明の製造方法において製造される脂質は、その利用性の点から、脂肪酸又は脂肪酸化合物を含んでいることが好ましく、脂肪酸又は脂肪酸エステル化合物を含んでいることがさらに好ましい。

脂質中に含まれる脂肪酸又は脂肪酸エステル化合物は、界面活性剤等への利用性や栄養学的観点から、長鎖脂肪酸又はそのエステル化合物が好ましく、炭素原子数18以上の脂肪酸又はそのエステル化合物がより好ましく、炭

素原子数 18～22 の脂肪酸又はそのエステル化合物がより好ましく、炭素原子数 18～20 の脂肪酸又はそのエステル化合物がより好ましく、炭素原子数 18 若しくは 20 の脂肪酸又はそのエステル化合物がさらに好ましく、炭素原子数 18 若しくは 20 の不飽和脂肪酸又はそのエステル化合物がさらに好ましく、C18 : 1、C18 : 2、C18 : 3、C20 : 4 若しくは C20 : 5、又はそのエステル化合物がより好ましく、炭素原子数 18 若しくは 20 の P U F A 又はそのエステル化合物がより好ましく、炭素原子数 20 の P U F A 又はそのエステル化合物がより好ましく、C20 : 4 若しくは C20 : 5、又はそのエステル化合物がより好ましく、EPA 又はその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。

[0050] 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。

[0051] 上述した実施形態に関し、本発明はさらに以下の脂質の製造方法、脂質生産性の向上方法、生産される脂肪酸の組成を改変する方法、タンパク質、遺伝子、組換えベクター、生物、形質転換体、及び形質転換体の作製方法を開示する。

[0052] <1> 下記タンパク質 (A) 又は (B) をコードする遺伝子の発現を促進させた形質転換体を培養し、脂肪酸、好ましくは長鎖脂肪酸、より好ましくは炭素原子数 18 以上の脂肪酸、より好ましくは炭素原子数 18～22 の脂肪酸、より好ましくは炭素原子数 18～20 の脂肪酸、より好ましくは炭素原子数 18 若しくは 20 の脂肪酸、より好ましくは炭素原子数 18 若しくは 20 の不飽和脂肪酸、より好ましくは C18 : 1、C18 : 2、C18 : 3、C20 : 4 若しくは C20 : 5、より好ましくは炭素原子数 18 若しくは 20 の P U F A、より好ましくは炭素原子数 20 の P U F A、より好ましくは

C 2 0 : 4 若しくは C 2 0 : 5、より好ましくは EPA、又はこれを構成成分とする脂質を生産させる、脂質の製造方法。

(A) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

(B) 前記タンパク質 (A) のアミノ酸配列と同一性が 7 0 % 以上、好ましくは 7 5 % 以上、より好ましくは 8 0 % 以上、より好ましくは 8 5 % 以上、より好ましくは 9 0 % 以上、より好ましくは 9 2 % 以上、より好ましくは 9 5 % 以上、より好ましくは 9 8 % 以上、さらに好ましくは 9 9 % 以上、のアミノ酸配列からなり、かつ KAS 活性を有するタンパク質。

[0053] < 2 > 前記タンパク質 (A) 又は (B) をコードする遺伝子の発現を促進させ、形質転換体の細胞内で生産される長鎖脂肪酸、好ましくは炭素原子数 1 8 以上の脂肪酸、より好ましくは炭素原子数 1 8 ~ 2 2 の脂肪酸、より好ましくは炭素原子数 1 8 ~ 2 0 の脂肪酸、より好ましくは炭素原子数 1 8 若しくは 2 0 の脂肪酸、より好ましくは炭素原子数 1 8 若しくは 2 0 の不飽和脂肪酸、より好ましくは C 1 8 : 1、C 1 8 : 2、C 1 8 : 3、C 2 0 : 4 若しくは C 2 0 : 5、より好ましくは炭素原子数 1 8 若しくは 2 0 の P U F A、より好ましくは炭素原子数 2 0 の P U F A、より好ましくは C 2 0 : 4 若しくは C 2 0 : 5、より好ましくは EPA、又はこれを構成成分とする脂質の生産性を向上させる、脂質生産性の向上方法。

< 3 > 前記タンパク質 (A) 又は (B) をコードする遺伝子の発現を促進させて、形質転換体の細胞内で生産される長鎖脂肪酸、好ましくは長鎖脂肪酸、より好ましくは炭素原子数 1 8 以上の脂肪酸、より好ましくは炭素原子数 1 8 ~ 2 2 の脂肪酸、より好ましくは炭素原子数 1 8 ~ 2 0 の脂肪酸、より好ましくは炭素原子数 1 8 若しくは 2 0 の脂肪酸、より好ましくは炭素原子数 1 8 若しくは 2 0 の不飽和脂肪酸、より好ましくは C 1 8 : 1、C 1 8 : 2、C 1 8 : 3、C 2 0 : 4 若しくは C 2 0 : 5、より好ましくは炭素原子数 1 8 若しくは 2 0 の P U F A、より好ましくは炭素原子数 2 0 の P U F A、より好ましくは C 2 0 : 4 若しくは C 2 0 : 5、より好ましくは EPA、又はこれを構成成分とする脂質の生産性を向上させ、生産される全脂肪酸中又は

全脂質中の脂肪酸又は脂質の組成を改変する、脂質の組成の改変方法。

＜4＞前記タンパク質（A）又は（B）をコードする遺伝子の発現を促進させた形質転換体を培養し、脂肪酸、及びそのエステル化合物を構成する脂肪酸エステルの総量に占める、長鎖脂肪酸（好ましくは炭素原子数18以上の脂肪酸、より好ましくは炭素原子数18～22の脂肪酸、より好ましくは炭素原子数18～20の脂肪酸、より好ましくは炭素原子数18若しくは20の脂肪酸、より好ましくは炭素原子数18若しくは20の不飽和脂肪酸、より好ましくはC18：1、C18：2、C18：3、C20：4若しくはC20：5、より好ましくは炭素原子数18若しくは20のPUFA、より好ましくは炭素原子数20のPUFA、より好ましくはC20：4若しくはC20：5、より好ましくはEPA）量及びそのエステル化合物量の比率を向上させる方法。

＜5＞前記タンパク質（A）又は（B）をコードする遺伝子を宿主に導入して前記遺伝子の発現を促進させる、前記＜1＞～＜4＞のいずれか1項記載の方法。

[0054] ＜6＞前記タンパク質（A）又は（B）をコードする遺伝子を導入した形質転換体を培養し、脂肪酸、好ましくは長鎖脂肪酸、より好ましくは炭素原子数18以上の脂肪酸、より好ましくは炭素原子数18～22の脂肪酸、より好ましくは炭素原子数18～20の脂肪酸、より好ましくは炭素原子数18若しくは20の脂肪酸、より好ましくは炭素原子数18若しくは20の不飽和脂肪酸、より好ましくはC18：1、C18：2、C18：3、C20：4若しくはC20：5、より好ましくは炭素原子数18若しくは20のPUFA、より好ましくは炭素原子数20のPUFA、より好ましくはC20：4若しくはC20：5、より好ましくはEPA、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。

＜7＞前記タンパク質（A）又は（B）をコードする遺伝子を宿主に導入して形質転換体を作製し、形質転換体の細胞内で生産される長鎖脂肪酸、好ましくは炭素原子数18以上の脂肪酸、より好ましくは炭素原子数18～22

の脂肪酸、より好ましくは炭素原子数 18～20 の脂肪酸、より好ましくは炭素原子数 18 若しくは 20 の脂肪酸、より好ましくは炭素原子数 18 若しくは 20 の不飽和脂肪酸、より好ましくは C 18 : 1、C 18 : 2、C 18 : 3、C 20 : 4 若しくは C 20 : 5、より好ましくは炭素原子数 18 若しくは 20 の P U F A、より好ましくは炭素原子数 20 の P U F A、より好ましくは C 20 : 4 若しくは C 20 : 5、より好ましくは EPA、又はこれを構成成分とする脂質の生産性を向上させる、脂質生産性の向上方法。

<8>前記タンパク質 (A) 又は (B) をコードする遺伝子を導入して形質転換体を作製し、形質転換体の細胞内で生産される長鎖脂肪酸、好ましくは炭素原子数 18 以上の脂肪酸、より好ましくは炭素原子数 18～22 の脂肪酸、より好ましくは炭素原子数 18～20 の脂肪酸、より好ましくは炭素原子数 18 若しくは 20 の脂肪酸、より好ましくは炭素原子数 18 若しくは 20 の不飽和脂肪酸、より好ましくは C 18 : 1、C 18 : 2、C 18 : 3、C 20 : 4 若しくは C 20 : 5、より好ましくは炭素原子数 18 若しくは 20 の P U F A、より好ましくは炭素原子数 20 の P U F A、より好ましくは C 20 : 4 若しくは C 20 : 5、より好ましくは EPA、又はこれを構成成分とする脂質の生産性を向上させ、生産される全脂肪酸中又は全脂質中の脂肪酸又は脂質の組成を改変する、脂質の組成の改変方法。

<9>前記タンパク質 (A) 又は (B) をコードする遺伝子を導入した形質転換体を培養し、脂肪酸、及びそのエステル化合物を構成する脂肪酸エステルの総量に占める、長鎖脂肪酸 (好ましくは炭素原子数 18 以上の脂肪酸、より好ましくは炭素原子数 18～22 の脂肪酸、より好ましくは炭素原子数 18～20 の脂肪酸、より好ましくは炭素原子数 18 若しくは 20 の脂肪酸、より好ましくは炭素原子数 18 若しくは 20 の不飽和脂肪酸、より好ましくは C 18 : 1、C 18 : 2、C 18 : 3、C 20 : 4 若しくは C 20 : 5、より好ましくは炭素原子数 18 若しくは 20 の P U F A、より好ましくは炭素原子数 20 の P U F A、より好ましくは C 20 : 4 若しくは C 20 : 5、より好ましくは EPA) 量及びそのエステル化合物量の比率を向上させる方法

。

[0055] <10>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142個以下、より好ましくは1個以上118個以下、より好ましくは1個以上95個以下、より好ましくは1個以上71個以下、より好ましくは1個以上47個以下、より好ましくは1個以上38個以下、より好ましくは1個以上23個以下、より好ましくは1個以上9個以下、さらに好ましくは1個以上4個以下、のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたタンパク質である、前記<1>～<9>のいずれか1項記載の方法。

<11>前記タンパク質（B）が、前記タンパク質（A）のアミノ酸配列と同一性が92%以上のアミノ酸配列からなり、かつKAS活性を有するタンパク質である、前記<1>～<10>のいずれか1項記載の方法。

<12>前記タンパク質（A）又は（B）をコードする遺伝子が、下記DNA（a）又は（b）からなる遺伝子である、前記<1>～<11>のいずれか1項記載の方法。

（a）配列番号2で表される塩基配列からなるDNA。

（b）前記DNA（a）の塩基配列と同一性が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、より好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上、さらに好ましくは99%以上、の塩基配列からなり、かつKAS活性を有する前記タンパク質（A）又は（B）をコードするDNA。

<13>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428個以下、より好ましくは1個以上357個以下、より好ましくは1個以上285個以下、より好ましくは1個以上214個以下、より好ましくは1個以上142個以下、より好ましくは1個以上114個以下、より好ましくは1個以上71個以下、より好ましくは1個以上28個以下、よりさらに好ましくは1個以上14個以下、の塩基が欠失

、置換、挿入、若しくは付加された塩基配列からなり、かつKAS活性を有する前記タンパク質（A）又は（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、かつKAS活性を有する前記タンパク質（A）又は（B）をコードするDNAである、前記＜1＞～＜12＞のいずれか1項記載の方法。

＜14＞前記タンパク質（A）及び（B）が、長鎖β-ケトアシル-ACP合成活性を有するKASである、前記＜1＞～＜13＞のいずれか1項記載の方法。

＜15＞前記形質転換体において、TEをコードする遺伝子の発現を促進させた、前記＜1＞～＜14＞のいずれか1項記載の方法。

＜16＞前記形質転換体において、デサチュラーゼをコードする遺伝子の発現を促進させた、前記＜1＞～＜15＞のいずれか1項記載の方法。

＜17＞デサチュラーゼをコードする遺伝子を前記形質転換体に導入した、前記＜1＞～＜16＞のいずれか1項記載の方法。

＜18＞前記デサチュラーゼが、Δ12-DES、Δ6-DES、ω3-DES、Δ5-DES、及びΔ9-DESからなる群より選ばれる少なくとも1つのデサチュラーゼである、前記＜16＞又は＜17＞項記載の方法。

＜19＞前記Δ12-DESが、配列番号32若しくは34で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質、又は配列番号32若しくは34で表されるアミノ酸配列と同一性が60%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、のアミノ酸配列からなり、かつΔ12-DES活性を有するタンパク質である、前記＜18＞項記載の方法。

＜20＞前記Δ12-DESをコードする遺伝子が、配列番号33若しくは35で表される塩基配列からなるDNAからなる遺伝子、又は配列番号33若しくは35で表される塩基配列との同一性が60%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、の塩基配列からなり、かつΔ12-DES活性を有するタンパク質をコードするDNAからなる遺伝子である、前記＜18＞又は＜19＞項記載の方法。

<21>前記 $\Delta 6$ -DESが、配列番号36若しくは38で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質、又は配列番号36若しくは38で表されるアミノ酸配列と同一性が60%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、のアミノ酸配列からなり、かつ $\Delta 6$ -DES活性を有するタンパク質である、前記<18>~<20>のいずれか1項記載の方法。

<22>前記 $\Delta 6$ -DESをコードする遺伝子が、配列番号37若しくは39で表される塩基配列からなるDNAからなる遺伝子、又は配列番号37若しくは39で表される塩基配列との同一性が60%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、の塩基配列からなり、かつ $\Delta 6$ -DES活性を有するタンパク質をコードするDNAからなる遺伝子である、前記<18>~<21>のいずれか1項記載の方法。

<23>前記 $\omega 3$ -DESが、配列番号40若しくは42で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質、又は配列番号40若しくは42で表されるアミノ酸配列と同一性が60%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、のアミノ酸配列からなり、かつ $\omega 3$ -DES活性を有するタンパク質である、前記<18>~<22>のいずれか1項記載の方法。

<24>前記 $\omega 3$ -DESをコードする遺伝子が、配列番号41若しくは43で表される塩基配列からなるDNAからなる遺伝子、又は配列番号41若しくは43で表される塩基配列との同一性が60%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、の塩基配列からなり、かつ $\omega 3$ -DES活性を有するタンパク質をコードするDNAからなる遺伝子である、前記<18>~<23>のいずれか1項記載の方法。

<25>前記 $\Delta 5$ -DESが、配列番号44若しくは46で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質、又は配列番号44若しくは46で表されるアミノ酸配列と同一性が60%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、のアミノ酸配列からなり、かつ $\Delta 5$ -DES活性

を有するタンパク質である、前記<18>~<24>のいずれか1項記載の方法。

<26>前記Δ5-DESをコードする遺伝子が、配列番号45若しくは47で表される塩基配列からなるDNAからなる遺伝子、又は配列番号45若しくは47で表される塩基配列との同一性が60%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、の塩基配列からなり、かつΔ5-DES活性を有するタンパク質をコードするDNAからなる遺伝子である、前記<18>~<25>のいずれか1項記載の方法。

<27>前記Δ9-DESが、配列番号48若しくは50で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質、又は配列番号48若しくは50で表されるアミノ酸配列と同一性が60%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、のアミノ酸配列からなり、かつΔ9-DES活性を有するタンパク質である、前記<18>~<26>のいずれか1項記載の方法。

<28>前記Δ9-DESをコードする遺伝子が、配列番号49若しくは51で表される塩基配列からなるDNAからなる遺伝子、又は配列番号49若しくは51で表される塩基配列との同一性が60%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、の塩基配列からなり、かつΔ9-DES活性を有するタンパク質をコードするDNAからなる遺伝子である、前記<18>~<27>のいずれか1項記載の方法。

<29>前記形質転換体において、エロンガーゼをコードする遺伝子の発現を促進させた、前記<1>~<28>のいずれか1項記載の方法。

<30>前記形質転換体が微生物又は植物である、前記<1>~<29>のいずれか1項記載の方法。

<31>前記微生物が微細藻類、好ましくはナンノクロロプシス属に属する藻類、より好ましくはナンノクロロプシス・オキュラータ、である、前記<30>項記載の方法。

<32>前記微生物が大腸菌である、前記<30>項記載の方法。

<33>前記植物がシロイヌナズナである、前記<30>項記載の方法。

<34>前記脂質が、長鎖脂肪酸又はそのエステル化合物、好ましくは炭素原子数18以上の脂肪酸又はそのエステル化合物、より好ましくは炭素原子数18~22の脂肪酸又はそのエステル化合物、より好ましくは炭素原子数18~20の脂肪酸又はそのエステル化合物、より好ましくは炭素原子数18若しくは20の脂肪酸又はそのエステル化合物、より好ましくは炭素原子数18若しくは20の不飽和脂肪酸又はそのエステル化合物、より好ましくはC18:1、C18:2、C18:3、C20:4若しくはC20:5、又はそのエステル化合物、より好ましくは炭素原子数18若しくは20のPUFA又はそのエステル化合物、より好ましくは炭素原子数20のPUFA又はそのエステル化合物、より好ましくはC20:4若しくはC20:5又はそのエステル化合物、よりさらに好ましくはEPA又はそのエステル化合物、を含む、前記<1>~<33>のいずれか1項記載の方法。

<35>前記長鎖脂肪酸が長鎖多価不飽和脂肪酸である、前記<1>~<34>のいずれか1項記載の方法。

[0056] <36>前記<1>~<35>のいずれか1項で規定した、前記タンパク質(A)又は(B)。

<37>前記<36>項記載のタンパク質をコードする遺伝子。

<38>前記<1>~<35>のいずれか1項で規定した、前記DNA(a)又は(b)からなる遺伝子。

<39>前記<37>又は<38>項記載の遺伝子を含有する、組換えベクター。

[0057] <40>前記<37>又は<38>項記載の遺伝子の発現を促進させた形質転換体。

<41>長鎖脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質の生産性が、宿主と比較して向上している、前記<40>項記載の形質転換体。

<42>前記<37>若しくは<38>項記載の遺伝子、又は前記<39>項記載の組換えベクターを宿主に導入してなる、形質転換体。

<4 3>前記<3 7>若しくは<3 8>項記載の遺伝子、又は前記<3 9>項記載の組換えベクターを宿主に導入する、形質転換体の作製方法。

<4 4>TEをコードする遺伝子の発現を促進させた、前記<4 0>～<4 3>のいずれか1項記載の形質転換体又はその作製方法。

<4 5>デサチュラーゼをコードする遺伝子の発現を促進させた、前記<4 0>～<4 4>のいずれか1項記載の形質転換体又はその作製方法。

<4 6>デサチュラーゼをコードする遺伝子を形質転換体に導入した、前記<4 0>～<4 5>のいずれか1項記載の形質転換体又はその作製方法。

<4 7>前記デサチュラーゼが、 $\Delta 12$ -DES、 $\Delta 6$ -DES、 $\omega 3$ -DES、 $\Delta 5$ -DES、及び $\Delta 9$ -DESからなる群より選ばれる少なくとも1つのデサチュラーゼである、前記<4 5>又は<4 6>項記載の形質転換体又はその作製方法。

<4 8>前記デサチュラーゼ、又はデサチュラーゼをコードする遺伝子が、前記<1 9>～<2 8>項のいずれか1項で規定したデサチュラーゼ、又はデサチュラーゼをコードする遺伝子、である、前記<4 5>～<4 7>のいずれか1項記載の形質転換体又はその作製方法。

<4 9>エロンガーゼをコードする遺伝子の発現を促進させた、前記<4 0>～<4 8>のいずれか1項記載の形質転換体又はその作製方法。

<5 0>前記形質転換体又は宿主が微生物又は植物である、前記<4 0>～<4 9>のいずれか1項記載の形質転換体又はその作製方法。

<5 1>前記微生物が微細藻類、好ましくはナンノクロロプシス属に属する藻類、より好ましくはナンノクロロプシス・オキュラータ、である、前記<5 0>項記載の形質転換体又はその作製方法。

<5 2>前記微生物が大腸菌である、前記<5 0>項記載の形質転換体又はその作製方法。

<5 3>前記植物がシロイヌナズナである、前記<5 0>項記載の形質転換体又はその作製方法。

[0058] <5 4>脂質を製造するための、前記<3 6>～<5 3>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、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。

<55>前記脂質が、長鎖脂肪酸又はそのエステル化合物、好ましくは炭素原子数18以上の脂肪酸又はそのエステル化合物、より好ましくは炭素原子数18～22の脂肪酸又はそのエステル化合物、より好ましくは炭素原子数18～20の脂肪酸又はそのエステル化合物、より好ましくは炭素原子数18若しくは20の脂肪酸又はそのエステル化合物、より好ましくは炭素原子数18若しくは20の不飽和脂肪酸又はそのエステル化合物、より好ましくはC18:1、C18:2、C18:3、C20:4若しくはC20:5、又はそのエステル化合物、より好ましくは炭素原子数18若しくは20のPUFA又はそのエステル化合物、より好ましくは炭素原子数20のPUFA又はそのエステル化合物、より好ましくはC20:4若しくはC20:5又はそのエステル化合物、よりさらに好ましくはEPA又はそのエステル化合物、を含む、前記<54>項記載の使用。

<56>前記長鎖脂肪酸が長鎖多価不飽和脂肪酸である、前記<55>項記載の使用。

実施例

[0059] 以下、本発明を実施例に基づきさらに詳細に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。ここで、本実施例で用いるプライマーの塩基配列を表1に示す。

[0060]

表1

プライマー番号	塩基配列 (5' → 3')	配列番号
8	CTTTTTTGTGAAGCAATGGCCAAGTTGACCAGTGCCG	配列番号8
9	TTTCCCCCATCCCGATTAGTCCTGCTCCTCGGCCAC	配列番号9
10	CGAGCTCGGTACCCGACTGCGCATGGATTGACCGA	配列番号10
11	TGCTTCACAAAAAAGACAGCTTCTTGAT	配列番号11
12	TCGGGATGGGGGAAAAAACCTCTG	配列番号12
13	ACTCTAGAGGATCCCCTTTCGTAAATAAATCAGCTC	配列番号13
14	GGGATCCTCTAGAGTCGACC	配列番号14
15	CGGGTACCGAGCTCGAATTC	配列番号15
16	CAGCCCGCATCAACAATGATGGAGAAGCTGACCCTC	配列番号16
17	CTCTTCCACAGAAGCCTAGGCAACATACTTCTTGAAG	配列番号17
18	CGAGCTCGGTACCCGTTCTTCCGCTTGTTGCTGCC	配列番号18
19	TGTTGATGCGGGCTGAGATTGGTGG	配列番号19
20	GCTTCTGTGGAAGAGCCAGTG	配列番号20
21	GGCAAGAAAAGCTGGGGGAAAAAGACAGG	配列番号21
22	CCAGCTTTTCTTGCCACTGCGCATGGATTGACCGA	配列番号22
52	CAGCCCGCATCAACAATGGGACGCGCGGTGAGAA	配列番号52
53	CTCTTCCACAGAAGCCTATGCCCGCTGCTTGTAGA	配列番号53
54	CAGCCCGCATCAACAATGGTTGAGCAAACGTTACC	配列番号54
55	CTCTTCCACAGAAGCTTACGGAGGGGAGGATGAAC	配列番号55
57	CTTTTTTGTGAAGCAATGGTCGAGATTGGAAGCAT	配列番号57
58	TTTCCCCCATCCCGATCAGAAGAACTCGTCCAACA	配列番号58
59	TGCTTCACAAAAAAGACAGCTTCTTGAT	配列番号59
60	TCGGGATGGGGGAAAAAACCTCTG	配列番号60

[0061] 実施例1 NoKASII遺伝子をナンノクロロプシス・オキユラータに導入した形質転換体の作製、及び形質転換体による脂肪酸の生産

(1) ゼオシン耐性遺伝子発現用プラスミドの構築

ゼオシン耐性遺伝子（配列番号3）、及び文献（Randor Radakovits, et al., Nature Communications, DOI:10.1038/ncomms1688, 2012）に記載されている、ナンノクロロプシス・ガディタナCCMP526株由来のチューブリンプロモーター配列（配列番号4）を人工合成した。

合成したDNA断片を鋳型として、表1に示すプライマー番号8及びプライマー番号9のプライマー対、並びにプライマー番号10及びプライマー番号11のプライマー対をそれぞれ用いてPCRを行い、ゼオシン耐性遺伝子及びチューブリンプロモーター配列をそれぞれ増幅した。

また、ナンノクロロプシス・オキユラータNIES2145株のゲノムを鋳型として、表1に示すプライマー番号12及びプライマー番号13のプライマー対

を用いてPCRを行い、ヒートショックプロテインターミネーター配列（配列番号5）を増幅した。

さらに、プラスミドベクターpUC19（タカラバイオ社製）を鋳型として、表1に示すプライマー番号14及びプライマー番号15のプライマー対を用いたPCRを行い、プラスミドベクターpUC19を増幅した。

[0062] これら4つの増幅断片をそれぞれ制限酵素DpnI（東洋紡株式会社製）にて処理し、High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Applied Science社製)を用いて精製した。その後、得られた4つの断片をIn-Fusion HD Cloning Kit (Clontech社製)を用いて融合し、ゼオシン耐性遺伝子発現用プラスミドを構築した。

なお、本発現プラスミドは、チューブリンプロモーター配列、ゼオシン耐性遺伝子、ヒートショックプロテインターミネーター配列の順に連結したインサート配列と、pUC19ベクター配列からなる。

[0063] (2) NoKASII遺伝子の取得、及びNoKASII遺伝子発現用プラスミドの構築

ナンノクロロプシス・オキュラータNIES2145株（独立行政法人国立環境研究所(NIES)より入手）の全RNAを抽出し、SuperScript（商標）III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR (invitrogen社製)を用いて逆転写を行ってcDNAを得た。このcDNAを鋳型として、表1に示すプライマー番号16及びプライマー番号17のプライマー対を用いたPCRにより、配列番号2に示す塩基配列からなる遺伝子断片を取得した。

また、ナンノクロロプシス・オキュラータNIES2145株のゲノムを鋳型として、表1に示すプライマー番号18及びプライマー番号19のプライマー対、並びにプライマー番号20及びプライマー番号21のプライマー対をそれぞれ用いたPCRを行い、LDSPのプロモーター配列（配列番号6）及びVCP1 (violaxanthin/chlorophyll a-binding protein 1) のターミネーター配列（配列番号7）を取得した。

さらに、前述のゼオシン耐性遺伝子発現用プラスミドを鋳型として、表1に示すプライマー番号22及びプライマー番号15のプライマー対を用いたP

CRを行い、ゼオシン耐性遺伝子発現カセット（チューブリンプロモーター配列、ゼオシン耐性遺伝子、ヒートショックプロテインターミネーター配列）及びpUC19ベクター配列からなる断片を増幅した。

[0064] これら4つの増幅断片を、前述の方法と同様の方法にて融合し、NoKASII遺伝子発現用プラスミドを構築した。

なお、本発現プラスミドは、LDSPプロモーター配列、NoKASII遺伝子、VCP1ターミネーター配列、チューブリンプロモーター配列、ゼオシン耐性遺伝子、ヒートショックプロテインターミネーター配列の順で連結したインサート配列と、pUC19ベクター配列からなる。

[0065] (3) NoKASII遺伝子発現カセットのナンノクロロプシスへの導入

前記NoKASII遺伝子発現用プラスミドを鋳型として、表1に示すプライマー番号13及びプライマー番号18のプライマー対を用いたPCRを行い、NoKASII遺伝子発現カセット（LDSPプロモーター配列、NoKASII遺伝子、VCP1ターミネーター配列、チューブリンプロモーター配列、ゼオシン耐性遺伝子、ヒートショックプロテインターミネーター配列からなるDNA断片）を増幅した。

増幅したDNA断片を、High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Applied Science社製)を用いて精製した。なお、精製の際の溶出には、キットに含まれる溶出バッファーではなく、滅菌水を用いた。

[0066] 約 1×10^9 細胞のナンノクロロプシス・オキユラータNIES2145株（独立行政法人国立環境研究所(NIES)より入手）を、384mMのソルビトール溶液で洗浄して塩を完全に除去し、形質転換の宿主細胞として用いた。上記で増幅したNoKASII遺伝子発現カセット約500ngを宿主細胞と混和し、50 μ F、500 Ω 、2,200V/2mmの条件でエレクトロポレーションを行った。

f / 2 液体培地 (NaNO₃ 75mg、NaH₂PO₄ · 2H₂O 6mg、ビタミンB12 0.5 μ g、ビオチン 0.5 μ g、チアミン 100 μ g、Na₂SiO₃ · 9H₂O 10mg、Na₂EDTA · 2H₂O 4.4mg、FeCl₃ · 6H₂O 3.16mg、FeCl₃ · 6H₂O 12 μ g、ZnSO₄ · 7H₂O 21 μ g、MnCl₂ · 4H₂O 180 μ g、CuSO₄ · 5H₂O 7 μ g、Na₂MoO₄ · 2H₂O 7 μ g / 人工海水1L)

にて1日間回復培養を行った。その後に、 $2\mu\text{g/mL}$ のゼオシン含有 f / 2 寒天培地に塗布し、 25°C 、 $0.3\%\text{CO}_2$ 雰囲気下、12h/12h明暗条件にて3週間培養した。得られたコロニーの中から、NoKASII遺伝子発現カセットを含むナンノクロロプシス・オキュラータ株をPCR法により選抜した（独立した2ラインを取得）。

[0067] （4）形質転換体の培養、培養液中の脂質の抽出、及び構成脂肪酸の分析

選抜した株を、f / 2 培地の窒素濃度を15倍、リン濃度を5倍に増強した培地（以下、「N15P5培地」という）20mLに播種し、 25°C 、 $0.3\%\text{CO}_2$ 雰囲気下、12h/12h明暗条件にて4週間振盪培養し、前培養液とした。前培養液2mLを、N15P5培地18mLに植継ぎ、 25°C 、 $0.3\%\text{CO}_2$ 雰囲気下、12h/12h明暗条件にて3週間振盪培養した。なお、陰性対照として、野生株であるナンノクロロプシス・オキュラータNIES2145株についても同様に実験を行った。

[0068] 培養液1mLに、内部標準として 1mg/mL の7-ペンタデカノン $50\mu\text{L}$ を添加後、クロロホルム 0.5mL 、及びメタノール1mLを培養液に添加して激しく攪拌し、10分間放置した。その後さらに、クロロホルム 0.5mL 及び $1.5\%\text{KCl}$ 0.5mL を添加して攪拌し、 $3,000\text{rpm}$ にて5分間遠心分離を行い、パスツールピペットにてクロロホルム層（下層）を回収した。

得られたクロロホルム層に窒素ガスを吹き付けて乾固し、 14% 三フッ化ホウ素-メタノール溶液（SIGMA社製）1mLを添加し、 80°C にて30分間恒温した。その後、ヘキサン 0.5mL 、飽和食塩水1mLを添加して激しく攪拌し、室温にて10分間放置し、上層であるヘキサン層を回収して脂肪酸メチルエステルを得た。

[0069] 下記に示す測定条件下で、得られた脂肪酸メチルエステルをガスクロマトグラフィー解析に供した。

<ガスクロマトグラフィー条件>

分析装置：7890A（Agilent technology社製）

キャピラリーカラム：DB-WAX（ $10\text{m}\times 100\mu\text{m}\times 0.10\mu\text{m}$ 、J&W Scientific社製）

移動相：高純度ヘリウム

オープン温度：100℃ 保持0.5分→100～250℃（20℃/min昇温）→250℃保持
3分（ポストラン：1分）

注入口温度：300℃

注入方法：スプリット注入（スプリット比：50：1）

注入量：5 μ L

洗浄バイアル：メタノール

検出方法：FID

検出器温度：350℃

[0070] 脂肪酸メチルエステルの同定は、同サンプルを同条件でガスクロマトグラフ質量分析解析に供することにより行った。

ガスクロマトグラフィー解析により得られた波形データのピーク面積より、各脂肪酸のメチルエステル量を定量した。各ピーク面積を、内部標準である7-ペンタデカノンのピーク面積と比較することで試料間の補正を行い、培養液1Lあたりの各脂肪酸量を算出した。さらに、各脂肪酸量の総和を総脂肪酸量とし、総脂肪酸量に占める各脂肪酸量の割合を算出した。

その結果（各脂肪酸量の割合、及びC20：5生産量）を表2に示す。なお、以下の表において、「脂肪酸組成（%TFA）」は総脂肪酸の重量に対する各脂肪酸量の割合（重量パーセント）を示す。

[0071]

表 2

	脂肪酸組成 (%TFA)														C20:5 生産量 (mg/L)
	C12:0	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C18:4	C20:0	C20:1	C20:3	C20:4	C20:5	
NIES2145	0.3	5.0	32.0	28.6	1.5	13.7	1.4	0.4	0.3	0.1	0.0	0.4	2.7	13.6	123.2
NoKASII_line1	0.1	0.5	19.2	19.7	1.5	19.6	4.0	1.5	0.4	0.2	0.5	0.7	6.9	25.2	172.0
NoKASII_line2	0.1	0.5	17.8	19.9	1.5	18.3	4.5	1.7	0.4	0.2	0.9	0.8	9.6	23.9	162.0

[0072] 表 2 から明らかなように、NoKASII遺伝子発現カセットを導入し、NoKASII 遺伝子を強制的に発現させた形質転換体 2 株 (NoKASII_line1、NoKASII_line 2) はいずれも、野生株 (NIES2145) と比べ、生産された全脂肪酸の総量に対

する、長鎖脂肪酸（C 1 8 脂肪酸、及びC 2 0 脂肪酸）の含有率が有意に増加した。特に、C 1 8 : 1、C 1 8 : 2、C 1 8 : 3、C 2 0 : 4、C 2 0 : 5（EPA）の含有率がより一層増加していた。

また、C 2 0 : 5 生産量の結果から、NoKASII_line1、NoKASII_line2のいずれの株においても、野生株と比較してEPAの生産性が向上していた。

[0073] （５）T A Gの分画、及びT A G中の構成脂肪酸の分析

前述の培養液1mLに、クロロホルム0.5mL、及びメタノール1mLを添加して激しく攪拌し、10分間放置した。その後さらに、クロロホルム0.5mL及び1.5%K C l 0.5mLを添加して攪拌し、3,000rpmにて5分間遠心分離を行い、パスツールピペットにてクロロホルム層（下層）を回収した。得られたクロロホルム層に窒素ガスを吹き付けて乾固し、クロロホルム20 μ Lに溶解した。

このようにして得られた脂質抽出液全量、及び3種類の標準溶液 {トリミリスチン（和光純薬工業社製）、ジオレイン酸グリセロール（和光純薬工業社製）、オレイン酸（和光純薬工業社製）、10mg/mLクロロホルム溶液} 3 μ LをそれぞれTLCプレートシリカゲル60F254（メルク社製）上にスポットし、TLC展開槽DT-150（三菱化学メディエンス社製）を用い、展開溶媒（ヘキサン：ジエチルエーテル：ギ酸＝42：28：0.3（体積比））で約15分展開した。展開後プレートを乾燥させ、メタノールに溶解させた0.1%プリムリン（和光純薬工業社製）を噴霧して乾燥させた後、ハンディ型UVランプUVL-21（相互理化学硝子製作所社製）でT A G画分を検出した。

[0074] 爪楊枝を用いてT A G画分を掻き取り、14%三フッ化ホウ素－メタノール溶液（SIGMA社製）1mLを添加し、80℃にて30分間恒温した。その後、ヘキサン0.5mL、飽和食塩水1mLを添加し激しく攪拌し、室温にて10分間放置後、上層であるヘキサン層を回収して脂肪酸メチルエステルを得た。

前述の方法と同様の方法にて、得られた脂肪酸メチルエステルをガスクロマトグラフィー解析に供した。その結果を脂肪酸組成として表3に示す。

[0075]

表3

	脂肪酸組成 (%TFA)													
	C12:0	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C18:4	C20:0	C20:1	C20:3	C20:4	C20:5
NIES2145	0.3	3.8	36.1	30.8	2.9	18.9	1.2	0.4	0.1	0.2	0.0	0.5	0.9	3.9
NoKASII_line1	0.2	0.3	17.9	20.1	3.0	25.5	4.0	1.4	0.3	0.2	0.6	1.0	5.8	19.5
NoKASII_line2	0.2	0.4	16.9	21.8	2.2	27.6	4.6	1.4	0.4	0.2	1.3	1.1	7.4	14.4

[0076] 表3から明らかなように、NoKASII遺伝子発現カセットを導入し、NoKASII遺伝子を強制的に発現させた形質転換体2株（NoKASII_line1, NoKASII_line2）はいずれも、野生株（NIES2145）と比べ、TAG中の長鎖脂肪酸（C18脂肪酸、及びC20脂肪酸）の含有率が有意に増加した。特に、C18:1

、C18:2、C18:3、C20:4、C20:5 (EPA) の含有率がより一層増加していた。なかでも、C20:4及びC20:5などのPUFAの含有率の増加が特に顕著であった。

さらに、ナンノクロロプシス・オキュラータは生育期にEPAを生産するものの、油脂蓄積期ではEPAは生産されない。よって、蓄積脂質であるTAG中には、EPAは約4%程度しか存在しないことが知られている。これに対して、NoKASII遺伝子を強制的に発現させた形質転換体ではTAG中にもEPAが多く取り込まれ、EPAの含有率が最大で19.5%にまで達した。

[0077] 実施例2 NoKASII遺伝子及びデサチュラーゼ遺伝子をナンノクロロプシス・オキュラータに導入した形質転換体の作製、及び形質転換体による脂肪酸の生産

(1) デサチュラーゼ遺伝子の取得、及びデサチュラーゼ遺伝子発現用プラスミド (ゼオシン耐性) の構築

実施例1で取得したナンノクロロプシス・オキュラータNIES2145株のcDNAを鋳型として、表1に示すプライマー番号52及びプライマー番号53のプライマー対、並びにプライマー番号54及びプライマー番号55のプライマー対、をそれぞれ用いたPCRを行い、配列番号33に示す塩基配列からなる遺伝子断片、及び配列番号41に示す塩基配列からなる遺伝子断片、をそれぞれ取得した。

得られた増幅断片を、実施例1と同様の方法で、LDSPプロモーター配列、VCP1ターミネーター配列、及びゼオシン耐性遺伝子発現カセットと融合し、No Δ 12-DES遺伝子発現用プラスミド及びNo ω 3-DES遺伝子発現用プラスミドをそれぞれ構築した。なお、本発現プラスミドは、LDSPプロモーター配列、各デサチュラーゼ遺伝子、VCP1ターミネーター配列、チューブリンプロモーター配列、ゼオシン耐性遺伝子、ヒートショックプロテインターミネーター配列の順で連結したインサート配列と、pUC19ベクター配列からなる。

[0078] (2) デサチュラーゼ遺伝子発現用プラスミド (パロモマイシン耐性) の構築

人工合成したパロモマイシン耐性遺伝子（配列番号56）を鋳型として、表1に示すプライマー番号57及びプライマー番号58のプライマー対を用いてPCRを行い、パロモマイシン耐性遺伝子断片を増幅した。

また、前記No Δ 12-DES遺伝子発現用プラスミド及びNo ω 3-DES遺伝子発現用プラスミドをそれぞれ鋳型として、表4に示すプライマー番号59及びプライマー番号60のプライマー対を用いたPCRを行った。得られた増幅断片をそれぞれパロモマイシン耐性遺伝子断片と融合し、No Δ 12-DES遺伝子発現用プラスミド（パロモマイシン耐性）及びNo ω 3-DES遺伝子発現用プラスミド（パロモマイシン耐性）をそれぞれ構築した。なお、本発現用プラスミドは、LDS Pプロモーター配列、各デサチュラーゼ遺伝子、VCP1ターミネーター配列、チューブリンプロモーター配列、パロモマイシン耐性遺伝子、ヒートショックプロテインターミネーター配列の順で連結したインサート配列と、pUC19ベクター配列からなる。

[0079] （3）デサチュラーゼ遺伝子発現用プラスミド（パロモマイシン耐性）のNoKASII遺伝子導入株への導入

前記No Δ 12-DES遺伝子発現用プラスミド（パロモマイシン耐性）及びNo ω 3-DES遺伝子発現用プラスミド（パロモマイシン耐性）をそれぞれ鋳型として、表1に示すプライマー番号13及びプライマー番号18のプライマー対を用いたPCRを行い、デサチュラーゼ遺伝子発現カセット（LDS Pプロモーター配列、各デサチュラーゼ遺伝子、VCP1ターミネーター配列、チューブリンプロモーター配列、パロモマイシン耐性遺伝子、ヒートショックプロテインターミネーター配列からなるDNA断片）を増幅した。

増幅したDNA断片を、実施例1と同様の方法でそれぞれ精製し、実施例1で作製した形質転換体NoKASII_line2（以降、「NoKASII遺伝子導入株」ともいう）に、精製した断片をエレクトロポレーションによりそれぞれ導入した。

実施例1と同様の方法にて回復培養を行った後、2 μ g/mLゼオシン及び100 μ g/mLパロモマイシン含有f / 2寒天培地に塗布し、25℃、0.3%CO₂雰囲気下

、12h/12h明暗条件にて2～3週間培養した。得られたコロニーの中から、各種デサチュラーゼ遺伝子発現カセットを含むナンノクロロプシス・オキュラータ株を選抜した。

[0080] (4) 形質転換体の培養、脂質の抽出、及び構成脂肪酸の分析

選抜した株を、N 1 5 P 5 培地20mLに播種し、25℃、0.3%CO₂雰囲気下、12h/12h明暗条件にて3～4週間振盪培養し、前培養液とした。前培養液2mLをf／2培地の窒素濃度を5倍、リン濃度を5倍に増強した培地（以下、「N 5 P 5 培地」という）18mLに植継ぎ、25℃、0.3%CO₂雰囲気下、12h/12h明暗条件にて10日間振盪培養した。なお、陰性対照として、野生株及びNoKASII遺伝子導入株についても同様の実験を行った。

得られた培養液について、実施例1と同様の方法にて脂質の抽出及び構成脂肪酸の分析を行った。その結果を表4に示す。

[0081]

表 4

	脂肪酸組成 (%TFA)										C20:5 生産量 (mg/L)
	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:3	C20:4	C20:5	
NIES2145	5.1	43.0	28.2	1.5	10.3	1.1	0.0	0.0	2.0	8.8	76.9
NoKASII	2.0	38.7	26.8	1.5	13.5	1.5	0.5	0.0	2.3	13.1	82.8
NoKASII + No Δ 12-DES	1.7	36.0	22.4	2.4	7.1	6.6	1.2	1.0	5.4	16.1	90.8
NoKASII + No ω 3-DES	1.1	39.4	24.2	1.8	13.8	1.9	0.5	0.0	1.2	16.1	107.4

[0082] 表 4 から明らかなように、NoKASII遺伝子及びNo Δ 12-DES遺伝子を導入した株 (NoKASII + No Δ 12-DES) では、野生株 (NIES2145) と比べ、C18:1の割合が減少し、C18:2、C18:3、C20:3、C20:4、及びC20:5の割合が向上していた。さらに、NoKASII遺伝子導入株 (NoKASII) にNo Δ 12-DES遺伝子を導入することで、C20:4及びC20:5の割合がより一層向上していた。

[0083] また、NoKASII遺伝子及びNo ω 3-DES遺伝子を導入した株（NoKASII + No ω 3-DES）では、野生株（NIES2145）と比べ、C20:4の割合が減少し、C20:5の割合が向上していた。さらに、NoKASII遺伝子導入株（NoKASII）にNo ω 3-DES遺伝子を導入することで、C20:5の割合がより一層向上していた。

[0084] これらの結果より、NoKASII遺伝子に加えデサチュラーゼ遺伝子の発現を促進することで、PUFAの生産性がより一層向上することが明らかになった。

[0085] 以上のように、本発明で規定するKAS遺伝子の発現を促進させることで、長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、長鎖脂肪酸の生産性を向上させることができる。

[0086] 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。

[0087] 本願は、2015年8月5日に日本国で特許出願された特願2015-154771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）又は（B）をコードする遺伝子の発現を促進させた形質転換体を培養し、長鎖脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質を生産させる、脂質の製造方法。

（A）配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

（B）前記タンパク質（A）のアミノ酸配列と同一性が70%以上のアミノ酸配列からなり、かつ β -ケトアシル-CoAシンターゼ活性を有するタンパク質。

[請求項2] 下記タンパク質（A）又は（B）をコードする遺伝子の発現を促進させ、形質転換体の細胞内で生産される長鎖脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質の生産性を向上させる、脂質生産性の向上方法。

（A）配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

（B）前記タンパク質（A）のアミノ酸配列と同一性が70%以上のアミノ酸配列からなり、かつ β -ケトアシル-CoAシンターゼ活性を有するタンパク質。

[請求項3] 下記タンパク質（A）又は（B）をコードする遺伝子の発現を促進させて、形質転換体の細胞内で生産される長鎖脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質の生産性を向上させ、生産される全脂肪酸中又は全脂質中の脂肪酸又は脂質の組成を改変する、脂質の組成の改変方法。

（A）配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

（B）前記タンパク質（A）のアミノ酸配列と同一性が70%以上のアミノ酸配列からなり、かつ β -ケトアシル-CoAシンターゼ活性を有するタンパク質。

[請求項4] 下記タンパク質（A）又は（B）をコードする遺伝子の発現を促進させた形質転換体を培養し、脂肪酸、及びそのエステル化合物を構成する脂肪酸エステルの総量に占める、長鎖脂肪酸及びそのエステル化合物量の比率を向上させる方法。

（A）配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

(B) 前記タンパク質 (A) のアミノ酸配列と同一性が70%以上のアミノ酸配列からなり、かつ β -ケトアシル-ACPシンターゼ活性を有するタンパク質。

[請求項5] 前記タンパク質 (A) 又は (B) をコードする遺伝子を宿主に導入して前記遺伝子の発現を促進させる、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

[請求項6] 下記タンパク質 (A) 又は (B) をコードする遺伝子を導入した形質転換体を培養し、長鎖脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質を生産させる、脂質の製造方法。

(A) 配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

(B) 前記タンパク質 (A) のアミノ酸配列と同一性が70%以上のアミノ酸配列からなり、かつ β -ケトアシル-ACPシンターゼ活性を有するタンパク質。

[請求項7] 前記タンパク質 (B) が、前記タンパク質 (A) のアミノ酸配列と同一性が92%以上のアミノ酸配列からなり、かつ β -ケトアシル-ACPシンターゼ活性を有するタンパク質である、請求項1～6のいずれか1項記載の方法。

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

(a) 配列番号2で表される塩基配列からなるDNA。

(b) 前記DNA (a) の塩基配列と同一性が70%以上の塩基配列からなり、かつ β -ケトアシル-ACPシンターゼ活性を有する前記タンパク質 (A) 又は (B) をコードするDNA。

[請求項9] 前記タンパク質 (A) 及び (B) が、長鎖 β -ケトアシル-ACP合成活性を有する β -ケトアシル-ACPシンターゼである、請求項1～8のいずれか1項記載の方法。

[請求項10] 前記形質転換体において、デサチュラーゼをコードする遺伝子の発

現を促進させた、請求項 1 ～ 9 のいずれか 1 項記載の方法。

[請求項11] デサチュラーゼをコードする遺伝子を前記形質転換体に導入した、請求項 1 ～ 10 のいずれか 1 項記載の方法。

[請求項12] 前記形質転換体が微生物又は植物である、請求項 1 ～ 11 のいずれか 1 項記載の方法。

[請求項13] 前記微生物が微細藻類である、請求項 12 記載の方法。

[請求項14] 前記微細藻類がナンノクロロプシス (Nannochloropsis) 属に属する藻類である、請求項 13 記載の方法。

[請求項15] 前記微生物が大腸菌である、請求項 12 記載の方法。

[請求項16] 前記脂質が、炭素原子数 18 ～ 22 の長鎖脂肪酸又はそのエステル化合物を含む、請求項 1 ～ 15 のいずれか 1 項記載の方法。

[請求項17] 前記長鎖脂肪酸が長鎖多価不飽和脂肪酸である、請求項 1 ～ 16 のいずれか 1 記載の方法。

[請求項18] 下記タンパク質 (A) 若しくは (B) をコードする遺伝子、又は下記 DNA (a) 若しくは (b) からなる遺伝子を含有する組換えベクター。

(A) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

(B) 前記タンパク質 (A) のアミノ酸配列と同一性が 70% 以上のアミノ酸配列からなり、かつ β -ケトアシル-ACP シンターゼ活性を有するタンパク質。

(a) 配列番号 2 で表される塩基配列からなる DNA。

(b) 前記 DNA (a) の塩基配列と同一性が 70% 以上の塩基配列からなり、かつ β -ケトアシル-ACP シンターゼ活性を有する前記タンパク質 (A) 又は (B) をコードする DNA。

[請求項19] 下記タンパク質 (A) 若しくは (B) をコードする遺伝子、又は下記 DNA (a) 若しくは (b) からなる遺伝子の発現を促進させ、長鎖脂肪酸又はこれを構成成分とする脂質の生産性が、宿主と比較して向上している、形質転換体。

(A) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

(B) 前記タンパク質 (A) のアミノ酸配列と同一性が 70% 以上のアミノ酸配列からなり、かつ β -ケトアシル-CoA シンターゼ活性を有するタンパク質。

(a) 配列番号 2 で表される塩基配列からなる DNA。

(b) 前記 DNA (a) の塩基配列と同一性が 70% 以上の塩基配列からなり、かつ β -ケトアシル-CoA シンターゼ活性を有する前記タンパク質 (A) 又は (B) をコードする DNA。

[請求項20] 下記タンパク質 (A) 若しくは (B) をコードする遺伝子、下記 DNA (a) 若しくは (b) からなる遺伝子、又は請求項 18 記載の組換えベクターを宿主に導入してなる、形質転換体。

(A) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

(B) 前記タンパク質 (A) のアミノ酸配列と同一性が 70% 以上のアミノ酸配列からなり、かつ β -ケトアシル-CoA シンターゼ活性を有するタンパク質。

(a) 配列番号 2 で表される塩基配列からなる DNA。

(b) 前記 DNA (a) の塩基配列と同一性が 70% 以上の塩基配列からなり、かつ β -ケトアシル-CoA シンターゼ活性を有する前記タンパク質 (A) 又は (B) をコードする DNA。

[請求項21] デサチュラーゼをコードする遺伝子の発現を促進させた、請求項 19 又は 20 記載の形質転換体。

[請求項22] デサチュラーゼをコードする遺伝子を導入した、請求項 19 ~ 21 のいずれか 1 項記載の形質転換体。

[請求項23] 前記形質転換体又は宿主が微生物又は植物である、請求項 19 ~ 22 のいずれか 1 項記載の形質転換体。

[請求項24] 前記微生物が微細藻類である、請求項 23 記載の形質転換体。

[請求項25] 前記微細藻類がナンノクロロプシス (*Nannochloropsis*) 属に属する藻類である、請求項 24 記載の形質転換体。

- [請求項26] 前記微生物が大腸菌である、請求項 2 3 記載の形質転換体。
- [請求項27] 脂質を製造するための、請求項 1 8 ～ 2 6 のいずれか 1 項記載の組換えベクター、又は形質転換体の使用。
- [請求項28] 前記脂質が、炭素原子数 1 8 ～ 2 2 の脂肪酸又はそのエステル化合物を含む、請求項 2 7 記載の使用。
- [請求項29] 前記脂肪酸が長鎖多価不飽和脂肪酸である、請求項 2 8 記載の使用。
- 。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/072606

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P7/64(2006.01)i, C07K14/405(2006.01)i, C12N1/11(2006.01)i, C12N1/13(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N9/88(2006.01)i, C12N15/09(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)

C12P7/64, C07K14/405, C12N1/11, C12N1/13, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N9/88, C12N15/09, C12N9/02

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)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII),
CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN), PubMed, CiNii

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	US 2013/0102040 A1 (RADAKOVITS R. et al.), 25 April 2013 (25.04.2013), abstract; claims 5, 7, 8, 11; example 4 (Family: none)	1-9, 12-20, 23-29/1-29
X/A	TSA: Nannochloropsis gaditana CCMP526 NGA_ Contig29928 mRNA, Database Genbank [online], Accession No. JU980979, 2012.05.16 [retrieved on 2016.08.25], Retrieved from the Internet, URL: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JU980979 >, entire text	18-20, 23-26/ 1-17, 21, 22, 27-29

☒ 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
25 August 2016 (25.08.16)

Date of mailing of the international search report
20 September 2016 (20.09.16)

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

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/072606

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CHATURVEDI R. et al, Isolation of enhanced eicosapentaenoic acid producing mutants of <i>Nannochloropsis oculata</i> ST-6 using ethyl methane sulfonate induced mutagenesis techniques and their characterization at mRNA transcript level, <i>Phycological Research</i> , 2006, 54, p.208-219, ISSN: 0340-0727, page 208, right column, lines 11 to 18, page 208, right column, 4th line from the bottom to page 209, left column, line 19, page 212, left column, 3rd paragraph to page 213, right column, 1st paragraph, page 216, right column, 3rd paragraph to page 217, left column, 1st paragraph, Table 2, Fig. 4	1-29
Y	LEI A. et al, Expression of fatty acid synthesis genes and fatty acid accumulation in <i>haematococcus pluvialis</i> under different stressors., <i>Biotechnology for Biofuels</i> [online], 2012.03 [retrieved on 2016.08.25], 5:18, p.1-11, Retrieved from the Internet, doi: 10.1186/1754-6834-5-18, URL: < http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/5/1/18 >, abstract, page 6, left column, 3rd paragraph, Table 3	1-29
Y	HAUVERMALE A. et al, Fatty Acid Production in <i>Schizochytrium</i> sp. :Involvement of a Polyunsaturated Fatty Acid Synthase and a Typer I Fatty Acid Synthase, <i>Lipids</i> , 2006, 41(8), p.739-747, ISSN: 0024-4201, Fig. 4	1-29
Y	WO 2012/149457 A2 (AURORA ALGAE INC.), 01 November 2012 (01.11.2012), fig. 1; paragraphs [0032], [0038], [0039] & JP 2014-519810 A & US 2012/0277417 A1	1-29
P/X, P/Y	WO 2015/133305 A1 (Kao Corp.), 11 September 2015 (11.09.2015), comparative example 2; fig. 12 to 14 (Family: none)	1-9, 12-20, 23-29/10, 11, 21, 22
P, A	WO 2016/021481 A1 (Kao Corp.), 11 February 2016 (11.02.2016), (Family: none)	1-29

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/072606

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
(International Patent Classification (IPC))

C12N9/02(2006.01)n

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

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12P7/64(2006.01)i, C07K14/405(2006.01)i, C12N1/11(2006.01)i, C12N1/13(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N9/88(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12N9/02(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 (I P C))

Int.Cl. C12P7/64, C07K14/405, C12N1/11, C12N1/13, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N9/88, C12N15/09, C12N9/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 6 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 6 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 6 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/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN), PubMed, CiNii

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X/Y	US 2013/0102040 A1 (RADAKOVITS R. et al) 2013.04.25, 要約、請求項5、7、8、11、実施例4、(ファミリーなし)	1-9, 12-20, 23-29 /1-29
X/A	TSA: Nannochloropsis gaditana CCMP526 NGA_Contig29928 mRNA, Database Genbank [online], Accession No. JU980979, 2012.05.16 [retrieved on 2016.08.25], Retrieved from the Internet, URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JU980979>, 全文	18-20, 23-26/ 1-17, 21, 22, 27-29

☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

2 5 . 0 8 . 2 0 1 6

国際調査報告の発送日

2 0 . 0 9 . 2 0 1 6

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

宮岡 真衣

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

4 B

4 0 4 4

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	CHATURVEDI R. et al, Isolation of enhanced eicosapentaenoic acid producing mutants of <i>Nannochloropsis oculata</i> ST-6 using ethyl methane sulfonate induced mutagenesis techniques and their characterization at mRNA transcript level, <i>Phycological Research</i> , 2006, 54, p.208-219, ISSN: 0340-0727, 第208頁右欄第11行-第18行、第208頁右欄下から第4行-第209頁左欄第19行、第212頁左欄第3段落-第213頁右欄第1段落、第216頁右欄第3段落-第217頁左欄第1段落、Table 2、Fig.4	1-29
Y	LEI A. et al, Expression of fatty acid synthesis genes and fatty acid accumulation in <i>haematococcus pluvialis</i> under different stressors., <i>Biotechnology for Biofuels</i> [online], 2012.03 [retrieved on 2016.08.25], 5:18, p.1-11, Retrieved from the Internet, doi: 10.1186/1754-6834-5-18, URL: < http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/5/1/18 >, 要約、第6頁左欄第3段落、Table 3	1-29
Y	HAUVERMALE A. et al, Fatty Acid Production in <i>Schizochytrium</i> sp.: Involvement of a Polyunsaturated Fatty Acid Synthase and a Typer I Fatty Acid Synthase, <i>Lipids</i> , 2006, 41(8), p.739-747, ISSN: 0024-4201, Fig.4	1-29
Y	WO 2012/149457 A2 (AURORA ALGAE INC.) 2012.11.01, Fig.1、[0032]、[0038]、[0039] & JP 2014-519810 A & US 2012/0277417 A1	1-29
P, X/P, Y	WO 2015/133305 A1 (花王株式会社) 2015.09.11, 比較例2、図12-14 (ファミリーなし)	1-9, 12-20, 23-29 /10, 11, 21, 22
P, A	WO 2016/021481 A1 (花王株式会社) 2016.02.11, (ファミリーなし)	1-29