

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】平成25年1月17日 (2013.1.17)

【公表番号】特表2012-510275(P2012-510275A)

【公表日】平成24年5月10日 (2012.5.10)

【年通号数】公開・登録公報2012-018

【出願番号】特願2011-538719(P2011-538719)

【国際特許分類】

C 1 2 N 1/13 (2006.01)

C 1 0 L 1/04 (2006.01)

C 1 0 L 1/08 (2006.01)

C 1 1 B 1/00 (2006.01)

A 2 3 K 1/16 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 P 7/64 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 1/13 Z N A

C 1 0 L 1/04

C 1 0 L 1/08

C 1 1 B 1/00

A 2 3 K 1/16 3 0 4 C

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 P 7/64

【手続補正書】

【提出日】平成24年11月21日 (2012.11.21)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

外来遺伝子を含み、前記外来遺伝子がプロモーターに動作可能に連結している、油産生微生物の細胞。

【請求項 2】

前記外来遺伝子が、ショ糖インベルターゼ、脂肪族アシル - A C P チオエステラーゼ、脂肪酸アシル - C o A / アルデヒド還元酵素、脂肪酸アシル - C o A 還元酵素、脂肪族アルデヒド還元酵素、脂肪族アルデヒド脱炭酸酵素、アシルキャリアータンパク質、抗生物質への耐性を付与するタンパク質からなる群から選択されるタンパク質をコードする、請求項 1 に記載の細胞。

【請求項 3】

前記外来遺伝子が、鎖長が C 8、C 1 0、C 1 2 又は C 1 4 の 1 つ以上の酸アシル - A C P 基質に対して加水分解活性を有する脂肪酸アシル - A C P チオエステラーゼをコードする、請求項 2 に記載の細胞。

【請求項 4】

前記脂肪酸アシル - A C P チオエステラーゼが、配列番号 5 9、6 1、6 3、1 3 8 ~ 1 4 0 からなる群から選択される 1 つ以上の配列に対するアミノ酸同一性が少なくとも 5 0 % である、請求項 3 に記載の細胞。

【請求項 5】

前記細胞の脂質プロファイルが、C 8 が少なくとも 0.3 %、C 10 が少なくとも 2 %、C 12 が少なくとも 2 %、C 14 が少なくとも 4 %、C 8 ~ C 14 が少なくとも 30 % からなる群から選択される、請求項 3 に記載の細胞。

【請求項 6】

前記細胞の脂質プロファイルが、C 8 ~ C 14 が少なくとも 4 % である、請求項 1、2、3 又は 4 のいずれか 1 項に記載の細胞。

【請求項 7】

前記細胞が、ショ糖インベルターゼをコードする外来遺伝子をさらに含む、請求項 2 に記載の細胞。

【請求項 8】

前記外来遺伝子が、脂肪酸デサチュラーゼをコードする、請求項 1 に記載の細胞。

【請求項 9】

前記脂肪酸デサチュラーゼが、- 6 脂肪酸デサチュラーゼ、 - 3 脂肪酸デサチュラーゼ、 - 6 - オレイン酸デサチュラーゼ、およびステアロイル - ACP デサチュラーゼ からなる群から選択される、請求項 8 に記載の細胞。

【請求項 10】

ノックアウトまたは下方調節された外来デサチュラーゼ遺伝子をさらに含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 11】

油産生微生物が、微細藻類である、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 12】

前記微細藻類は、Prototheca 属の微細藻類である、請求項 11 に記載の細胞。

【請求項 13】

前記外来遺伝子が、Prototheca 内での発現のためにコドンが最適化されたコード配列を含み、前記コード配列は、前記コドンが最適化された配列が、前記外来遺伝子をコードする天然の配列よりもPrototheca 内でより効率的に翻訳されるように、前記コード配列のコドンの少なくとも 60 % に対し、表 1 の最も好ましいコドンまたは 2 番目に好ましいコドンを含む、請求項 12 に記載の細胞。

【請求項 14】

前記細胞が、Prototheca 内での発現のためにコドンが最適化された第 2 のコード配列を含む、第 2 の外来遺伝子をさらに含み、前記第 2 のコード配列は、前記コドンが最適化された配列が、前記第 2 の外来遺伝子をコードする天然の配列よりもPrototheca 内でより効率的に翻訳されるように、前記第 2 のコード配列のコドンの少なくとも 60 % に対し、表 1 の最も好ましいコドンまたは 2 番目に好ましいコドンを含む、請求項 13 に記載の細胞。

【請求項 15】

各コード配列が、各コード配列のコドンの少なくとも 80 % に対し、表 1 の最も好ましいコドンを含む、請求項 13 または 14 に記載の細胞。

【請求項 16】

前記プロモーターのヌクレオチド配列が、Prototheca 属の種に内在する、請求項 1 に記載の細胞。

【請求項 17】

前記プロモーターのヌクレオチド配列が、配列番号 91 ~ 102 のヌクレオチドの 50 ヌクレオチド以上のセグメントを含む、請求項 16 に記載の細胞。

【請求項 18】

細胞外の環境が、少なくとも 5 mM の窒素を含む状態から、0 mM の窒素を含む状態に変わると、前記プロモーターが、Prototheca 属の細胞において、少なくとも 3 倍上方調節される、請求項 1、16、又は 17 のいずれか 1 項に記載の細胞。

【請求項 19】

前記外来遺伝子が、プラスチド標的配列をさらに含む、請求項 1 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の細胞。

【請求項 20】

前記プラスチド標的配列のヌクレオチド配列が、*Prototheca* 属の種に内在する、請求項 19 に記載の細胞。

【請求項 21】

前記プラスチド標的配列が、配列番号 127 ~ 133 のアミノ酸配列に対するアミノ酸配列同一性が少なくとも 25 % である、請求項 20 に記載の細胞。

【請求項 22】

前記細胞は、23S rRNA を有しており、この 23S rRNA が、配列番号 11 ~ 19 のヌクレオチド配列に対するヌクレオチド同一性が少なくとも 75 % の配列を含む、請求項 1 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の細胞。

【請求項 23】

前記細胞が、*Prototheca moriformis*、*Prototheca krugani*、*Prototheca stagnora*、*Prototheca zoopfi* からなる群から選択される、請求項 1 ~ 22 のいずれか 1 項に記載の細胞。

【請求項 24】

a. C8 ~ C14 が少なくとも 4 %、および

b. 以下の 1 つ以上の属性：

i. 総カロチノイドが約 0.4 マイクログラム / ml 未満；

ii. リコピンが約 0.001 マイクログラム / ml 未満；

iii. カロチンが約 0.02 マイクログラム / ml 未満；

iv. 油脂 1 kg あたり、クロロフィルが約 0.02 ミリグラム 未満；

v. 油脂 100 g あたり、 α -トコフェロールが約 0.40 ~ 0.60 ミリグラム；

vi. 油脂 100 g あたり、カンベステロールが約 3 ~ 9 mg；

vii. 油脂 1 g あたり、総トコトリエノール量が約 0.5 ミリグラム 未満

の脂質プロフィールを有する、トリグリセリド油脂組成物。

【請求項 25】

請求項 24 の油を、大豆油、菜種油、キャノーラ油、パーム油、パーム核油、ココナツ油、トウモロコシ油、野菜くず油、ナンキンハゼ油、オリーブ油、ヒマワリ油、綿実油、鶏脂、牛脂、豚脂、微細藻類油、大型藻類油、クフェア油、亜麻油、ピーナツ油、上質のホワイトグリース、ラード、カメリナ・サティバ油、カラシの種子油、カシューナツ油、オーツ麦油、ハウチワマメ油、ケナフ油、キンセンカ油、麻油、コーヒー油、亜麻仁（亜麻）油、ヘーゼルナツ油、ユーホルピア油、カボチャの種油、コリアンダー油、ツバキ油、ゴマ油、ベニバナ油、イネ油、アブラギリ油、ココア油、コブラ油、ケシ油、トウゴマの実油、ピーカン油、ホホバ油、ジャトロファ油、マカダミア油、ブラジルナツ油、アボカド油、石油、または上述のいずれかの油の留分からなる群から選択される油とブレンドする、ブレンドした油。

【請求項 26】

トランスエステル化、水素化、ハイドロクラッキング、脱酸素、異性化、インターエステル化、ヒドロキシル化、加水分解、熱水処理、エポキシ化、アミノ化、オゾン分解、インターエステル化、方向性を持ったインターエステル化、および醗化からなる群から選択される 1 つ以上の化学反応を行う工程を含む、請求項 24 又は請求項 25 に記載の油を処理することによって、燃料を製造する方法。

【請求項 27】

再生可能なディーゼル又はバイオディーゼルである、請求項 26 に記載の方法で作られる燃料。

【請求項 28】

前記燃料は、ASTM D86 T10 - T90 の蒸留範囲が少なくとも 25 であり

、ASTM D 6751 A 1 の冷状態浸漬時間が 120 秒未満である、請求項 27 に記載の燃料。