

(19) 日本国特許庁(JP)

**再公表特許(A1)**

(11) 国際公開番号

**W02015/137449**

発行日 平成29年4月6日(2017.4.6)

(43) 国際公開日 **平成27年9月17日(2015.9.17)**

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 1/13 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/13	4 B O 6 4
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 6 5
<b>C 1 2 N 15/00 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A	
<b>C 1 2 P 7/64 (2006.01)</b>	C 1 2 P 7/64	
<b>C 1 2 R 1/89 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/13	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 26 頁) 最終頁に続く

出願番号	特願2016-507824 (P2016-507824)	(71) 出願人	304021417 国立大学法人東京工業大学 東京都目黒区大岡山2丁目12番1号
(21) 国際出願番号	PCT/JP2015/057302	(74) 代理人	100107870 弁理士 野村 健一
(22) 国際出願日	平成27年3月12日(2015.3.12)	(74) 代理人	100098121 弁理士 間山 世津子
(31) 優先権主張番号	特願2014-49651 (P2014-49651)	(72) 発明者	岩井 雅子 東京都目黒区大岡山2-12-1 国立大 学法人東京工業大学内
(32) 優先日	平成26年3月13日(2014.3.13)	(72) 発明者	太田 啓之 東京都目黒区大岡山2-12-1 国立大 学法人東京工業大学内
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 トリアシルグリセロール高生産性藻類の作製法

## (57) 【要約】

藻類の細胞中にトリアシルグリセロールを効率的に蓄積させることを目的として、トリアシルグリセロール合成酵素遺伝子とリン欠乏応答プロモーターと3'非翻訳領域を藻類に導入する方法を提供する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

藻類に以下の(1)~(3)を含むコンストラクトを導入することを特徴とするトリアシルグリセロール高生産性藻類の作製法、

(1) トリアシルグリセロール合成酵素遺伝子、

(2) トリアシルグリセロール合成酵素遺伝子の上流に配置されるリン欠乏応答プロモーター、

(3) トリアシルグリセロール合成酵素遺伝子の下流に配置され、コンストラクトを導入しようとする藻類と同種の藻類に由来する遺伝子の3'非翻訳領域。

## 【請求項 2】

10

リン欠乏応答プロモーターが、SQD2遺伝子のプロモーターであることを特徴とする請求項1に記載のトリアシルグリセロール高生産性藻類の作製法。

## 【請求項 3】

トリアシルグリセロール合成酵素遺伝子が、DGAT2遺伝子であることを特徴とする請求項1又は2に記載のトリアシルグリセロール高生産性藻類の作製法。

## 【請求項 4】

トリアシルグリセロール合成酵素遺伝子が、DGTT4遺伝子であることを特徴とする請求項1又は2に記載のトリアシルグリセロール高生産性藻類の作製法。

## 【請求項 5】

藻類が、ナンノクロロプシス属、クラミドモナス属、シュードコリスチス属、フェオダクチャム属、オステレオコックス属、シアニディオシゾン属、クレブソルミディウム属、クロロキプス属、スピロギラ属、カラ属、コレオケーテ属、クロレラ属、又はフィスチユリフェラ属に属する藻類であることを特徴とする請求項1乃至4のいずれか一項に記載のトリアシルグリセロール高生産性藻類の作製法。

20

## 【請求項 6】

藻類が、ナンノクロロプシス属に属する藻類であることを特徴とする請求項1乃至4のいずれか一項に記載のトリアシルグリセロール高生産性藻類の作製法。

## 【請求項 7】

以下の(1)~(3)を含むコンストラクトが導入されていることを特徴とするトリアシルグリセロール高生産性藻類、

30

(1) トリアシルグリセロール合成酵素遺伝子、

(2) トリアシルグリセロール合成酵素遺伝子の上流に配置されるリン欠乏応答プロモーター、

(3) トリアシルグリセロール合成酵素遺伝子の下流に配置され、コンストラクトを導入しようとする藻類と同種の藻類に由来する遺伝子の3'非翻訳領域。

## 【請求項 8】

リン欠乏応答プロモーターが、SQD2遺伝子のプロモーターであることを特徴とする請求項7に記載のトリアシルグリセロール高生産性藻類。

## 【請求項 9】

トリアシルグリセロール合成酵素遺伝子が、DGAT2遺伝子であることを特徴とする請求項7又は8に記載のトリアシルグリセロール高生産性藻類。

40

## 【請求項 10】

トリアシルグリセロール合成酵素遺伝子が、DGTT4遺伝子であることを特徴とする請求項7又は8に記載のトリアシルグリセロール高生産性藻類。

## 【請求項 11】

藻類が、ナンノクロロプシス属、クラミドモナス属、シュードコリスチス属、フェオダクチャム属、オステレオコックス属、シアニディオシゾン属、クレブソルミディウム属、クロロキプス属、スピロギラ属、カラ属、コレオケーテ属、クロレラ属、又はフィスチユリフェラ属に属する藻類であることを特徴とする請求項7乃至10のいずれか一項に記載のトリアシルグリセロール高生産性藻類。

50

## 【請求項 1 2】

藻類が、ナンノクロロプシス属に属する藻類であることを特徴とする請求項 7 乃至 1 0 のいずれか一項に記載のトリアシルグリセロール高生産性藻類。

## 【請求項 1 3】

請求項 7 乃至 1 2 のいずれか一項に記載のトリアシルグリセロール高生産性藻類をリン欠乏条件下で培養し、藻類細胞中にトリアシルグリセロールを蓄積させ、蓄積したトリアシルグリセロールを採取することを特徴とするトリアシルグリセロールの製造方法。

## 【請求項 1 4】

藻類に以下の(1)及び(2)を含むコンストラクトを導入することを特徴とするトリアシルグリセロール高生産性藻類の作製法、

(1) トリアシルグリセロール合成酵素遺伝子、

(2) トリアシルグリセロール合成酵素遺伝子上流に配置されるリン欠乏応答プロモーター。

## 【請求項 1 5】

リン欠乏応答プロモーターが、SQD2遺伝子のプロモーターであることを特徴とする請求項 1 4 に記載のトリアシルグリセロール高生産性藻類の作製法。

## 【請求項 1 6】

トリアシルグリセロール合成酵素遺伝子が、DGAT2遺伝子であることを特徴とする請求項 1 4 又は 1 5 に記載のトリアシルグリセロール高生産性藻類の作製法。

## 【請求項 1 7】

トリアシルグリセロール合成酵素遺伝子が、DGTT4遺伝子であることを特徴とする請求項 1 4 又は 1 5 に記載のトリアシルグリセロール高生産性藻類の作製法。

## 【請求項 1 8】

藻類が、ナンノクロロプシス属、クラミドモナス属、シュードコリスチス属、フェオダクチラム属、オステレオコックス属、シアニディオシゾン属、クレブソルミディウム属、クロロキプス属、スピロギラ属、カラ属、コレオケーテ属、クロレラ属、又はフィスチュリフェラ属に属する藻類であることを特徴とする請求項 1 4 乃至 1 7 のいずれか一項に記載のトリアシルグリセロール高生産性藻類の作製法。

## 【請求項 1 9】

藻類が、ナンノクロロプシス属に属する藻類であることを特徴とする請求項 1 4 乃至 1 7 のいずれか一項に記載のトリアシルグリセロール高生産性藻類の作製法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、トリアシルグリセロール(以下、「TAG」という)高生産性藻類の作製法、及びTAG高生産性藻類、並びに前記藻類を用いたTAGの製造方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

クラミドモナス・レインハーディ(*Chlamydomonas reinhardtii*、以下「*C. reinhardtii*」という場合がある。)などの藻類にTAG合成酵素遺伝子を導入し、それにより細胞中にTAG蓄積させることは従来行われてきた(特許文献1、非特許文献1)。

## 【0003】

例えば、非特許文献1には、*C. reinhardtii*に、強発現プロモーターである*psaD*を付加したDGAT2遺伝子を導入し、これを窒素又は硫黄欠乏条件下で培養し、TAGを細胞中に蓄積させる方法が記載されている。特許文献1にも、非特許文献1と同様に、*psaD*を付加したDGAT2遺伝子を導入した*C. reinhardtii*が記載されている。

## 【0004】

TAGの生産に関しては、*C. reinhardtii*以外にも、ナンノクロロプシス(*Nannochloropsis*)属の藻類も注目されている。この藻類は、*C. reinhardtii*の100倍程の高密度で培養することが可能であることから、*C. reinhardtii*よりもTAGの生産に適していると考えら

10

20

30

40

50

れる。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】国際公開WO 2011/156520

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】M. La Russa et al., J. Biotechnol. 2012 Nov 30; 162(1):13-20

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

10

【0007】

上述したようにTAG合成酵素遺伝子を藻類に導入することにより、細胞中にTAGを蓄積させる方法は既に知られているが、それらの方法では十分な量のTAGを蓄積させることができなかった。例えば、非特許文献1には、窒素欠乏、硫黄欠乏のいずれの条件においても、DGAT2遺伝子導入株と野生株との間にTAGの蓄積量に統計的に意味のある差異はなかったと記載されている（Fig. 5など）。

【0008】

本発明は、このような背景の下、藻類の細胞中にTAGを効率的に蓄積させる手段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】

20

【0009】

本発明者は、まず、従来の方法において十分な量のTAGが蓄積しないのはプロモーターに原因があるのではないかと考えた。即ち、TAGは栄養欠乏時に蓄積されるが、栄養欠乏時には、psaDのような強発現プロモーターは十分機能していないのではないかと考えた。そこで、強発現プロモーターに代えて、栄養欠乏応答プロモーターを使用するという発想を得た。また、本発明者は、窒素欠乏条件とリン欠乏条件におけるTAGの蓄積量とTAGの脂肪酸組成を調べた。その結果、1) 増殖の盛んな細胞を植え継いだ場合、窒素欠乏条件よりリン欠乏条件の方がTAGの蓄積量が多いこと、2) 窒素欠乏条件では、葉緑体の膜脂質由来の脂肪酸を含むTAGが多く、新しく合成された脂肪酸は少ないこと、3) 窒素欠乏、リン欠乏のいずれの条件でも細胞の増殖は阻害されるが、リン欠乏条件では、窒素欠乏条件ほど、細胞の増殖は阻害されないことなどがわかった。これらの知見から、TAG高生産性藻類としては、窒素欠乏応答性のものよりも、リン欠乏応答性のものの方が好ましいという発想を得た。更に、本発明者は、リン欠乏応答プロモーターとしては、*C. reinhardtii*のSQD2a遺伝子のプロモーターが好適であり、TAG合成酵素遺伝子としては、*C. reinhardtii*のDGTT4遺伝子が好適であるという知見も得た。

30

【0010】

以上の知見に基づき、本発明者は、SQD2a遺伝子のプロモーターを付加したDGTT4遺伝子を*C. reinhardtii*に導入することにより、高いTAG生産能を持つ*C. reinhardtii*株の作製に成功し、このTAG高生産性*C. reinhardtii*株に関する特許出願を行った（特開2014-68638、この出願は、本願の優先権の基礎である特願2014-049651の出願時点においては出願公開されていない）。。

40

【0011】

本発明者は、この研究を更に進め、*C. reinhardtii*よりもTAGの生産に適した藻類であるナンクロロプシス属の藻類についても、高いTAG生産能を持つ藻類株を得ることに成功した。また、DGTT4遺伝子をSQD2a遺伝子のプロモーターとナンクロロプシス属の藻類由来の遺伝子の3'非翻訳領域で挟み込むような構造のコンストラクトを作製し、これをナンクロロプシス属の藻類の細胞に導入することにより、効率的にTAG高生産性株を作製できるという知見を得た。

【0012】

本発明は、以上の知見に基づき完成されたものである。

50

## 【 0 0 1 3 】

即ち、本発明は、以下の〔 1 〕～〔 1 9 〕を提供するものである。

〔 1 〕 藻類に以下の（ 1 ）～（ 3 ）を含むコンストラクトを導入することを特徴とする  
トリアシルグリセロール高生産性藻類の作製法、

（ 1 ）トリアシルグリセロール合成酵素遺伝子、

（ 2 ）トリアシルグリセロール合成酵素遺伝子の上流に配置されるリン欠乏応答プロモーター、

（ 3 ）トリアシルグリセロール合成酵素遺伝子の下流に配置され、コンストラクトを導入しようとする藻類と同種の藻類に由来する遺伝子の3'非翻訳領域。

## 【 0 0 1 4 】

〔 2 〕リン欠乏応答プロモーターが、SQD2遺伝子のプロモーターであることを特徴とする  
〔 1 〕に記載のトリアシルグリセロール高生産性藻類の作製法。

## 【 0 0 1 5 】

〔 3 〕トリアシルグリセロール合成酵素遺伝子が、DGAT2遺伝子であることを特徴とする  
〔 1 〕又は〔 2 〕に記載のトリアシルグリセロール高生産性藻類の作製法。

## 【 0 0 1 6 】

〔 4 〕トリアシルグリセロール合成酵素遺伝子が、DGTT4遺伝子であることを特徴とする  
〔 1 〕又は〔 2 〕に記載のトリアシルグリセロール高生産性藻類の作製法。

## 【 0 0 1 7 】

〔 5 〕藻類が、ナンノクロロプシス属、クラミドモナス属、シュードコリスチス属、フェオダクチャム属、オステレオコックス属、シアニディオシゾン属、クレブソルミディウム属、クロロキプス属、スピロギラ属、カラ属、コレオケーテ属、クロレラ属、又はフィスチュリフェラ属に属する藻類であることを特徴とする〔 1 〕乃至〔 4 〕のいずれかに記載のトリアシルグリセロール高生産性藻類の作製法。

## 【 0 0 1 8 】

〔 6 〕藻類が、ナンノクロロプシス属に属する藻類であることを特徴とする〔 1 〕乃至〔 4 〕のいずれかに記載のトリアシルグリセロール高生産性藻類の作製法。

## 【 0 0 1 9 】

〔 7 〕以下の（ 1 ）～（ 3 ）を含むコンストラクトが導入されていることを特徴とするトリアシルグリセロール高生産性藻類、

（ 1 ）トリアシルグリセロール合成酵素遺伝子、

（ 2 ）トリアシルグリセロール合成酵素遺伝子の上流に配置されるリン欠乏応答プロモーター、

（ 3 ）トリアシルグリセロール合成酵素遺伝子の下流に配置され、コンストラクトを導入しようとする藻類と同種の藻類に由来する遺伝子の3'非翻訳領域。

## 【 0 0 2 0 】

〔 8 〕リン欠乏応答プロモーターが、SQD2遺伝子のプロモーターであることを特徴とする  
〔 7 〕に記載のトリアシルグリセロール高生産性藻類。

## 【 0 0 2 1 】

〔 9 〕トリアシルグリセロール合成酵素遺伝子が、DGAT2遺伝子であることを特徴とする  
〔 7 〕又は〔 8 〕に記載のトリアシルグリセロール高生産性藻類。

## 【 0 0 2 2 】

〔 1 0 〕トリアシルグリセロール合成酵素遺伝子が、DGTT4遺伝子であることを特徴とする  
〔 7 〕又は〔 8 〕に記載のトリアシルグリセロール高生産性藻類。

## 【 0 0 2 3 】

〔 1 1 〕藻類が、ナンノクロロプシス属、クラミドモナス属、シュードコリスチス属、フェオダクチャム属、オステレオコックス属、シアニディオシゾン属、クレブソルミディウム属、クロロキプス属、スピロギラ属、カラ属、コレオケーテ属、クロレラ属、又はフィスチュリフェラ属に属する藻類であることを特徴とする〔 7 〕乃至〔 1 0 〕のいずれかに記載のトリアシルグリセロール高生産性藻類。

10

20

30

40

50

## 【0024】

〔12〕藻類が、ナンノクロロプシス属に属する藻類であることを特徴とする〔7〕乃至〔10〕のいずれかに記載のトリアシルグリセロール高生産性藻類。

## 【0025】

〔13〕〔7〕乃至〔12〕のいずれかに記載のトリアシルグリセロール高生産性藻類をリン欠乏条件下で培養し、藻類細胞中にトリアシルグリセロールを蓄積させ、蓄積したトリアシルグリセロールを採取することを特徴とするトリアシルグリセロールの製造方法。

## 【0026】

〔14〕藻類に以下の(1)及び(2)を含むコンストラクトを導入することを特徴とするトリアシルグリセロール高生産性藻類の作製法、

(1) トリアシルグリセロール合成酵素遺伝子、

(2) トリアシルグリセロール合成酵素遺伝子上流に配置されるリン欠乏応答プロモーター。

## 【0027】

〔15〕リン欠乏応答プロモーターが、SQD2遺伝子のプロモーターであることを特徴とする〔14〕に記載のトリアシルグリセロール高生産性藻類の作製法。

## 【0028】

〔16〕トリアシルグリセロール合成酵素遺伝子が、DGAT2遺伝子であることを特徴とする〔14〕又は〔15〕に記載のトリアシルグリセロール高生産性藻類の作製法。

## 【0029】

〔17〕トリアシルグリセロール合成酵素遺伝子が、DGTT4遺伝子であることを特徴とする〔14〕又は〔15〕に記載のトリアシルグリセロール高生産性藻類の作製法。

## 【0030】

〔18〕藻類が、ナンノクロロプシス属、クラミドモナス属、シュードコリスチス属、フェオダクチラム属、オステレオコックス属、シアニディオシゾン属、クレブソルミディウム属、クロロキプス属、スピロギラ属、カラ属、コレオケーテ属、クロレラ属、又はフィスチュリフェラ属に属する藻類であることを特徴とする〔14〕乃至〔17〕のいずれかに記載のトリアシルグリセロール高生産性藻類の作製法。

## 【0031】

〔19〕藻類が、ナンノクロロプシス属に属する藻類であることを特徴とする〔14〕乃至〔17〕のいずれかに記載のトリアシルグリセロール高生産性藻類の作製法。

## 【0032】

本明細書は、本願の優先権の基礎である日本国特許出願、特願2014 049651の明細書および/または図面に記載される内容を包含する。

## 【発明の効果】

## 【0033】

本発明の高生産性藻類は、例えば、以下のような効果を有する。

(1) 従来知られている藻類よりも、多くのTAGを蓄積する。

(2) TAG合成酵素遺伝子はリン欠乏応答プロモーターの制御下にあるので、通常培養時にこの遺伝子は強発現しない。このため、TAG蓄積のタイミングをコントロールすることができる。

(3) 通常条件に比べて増殖効率は低下するものの、リン欠乏条件下でもある程度の細胞増殖は可能なので、細胞を増殖させながら、TAGを蓄積させることも可能である。

(4) 蓄積されるTAG中の脂肪酸は、既に合成されている脂質(葉緑体の脂質など)に由来するものではなく、新たに合成されたものなので、有用な特殊脂肪酸の生産にも有用である。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0034】

【図1】栄養欠乏条件下での増殖曲線を示す図。図中のf/2はf/2培地、Nは窒素欠乏f/2培地、Pはリン欠乏f/2培地で培養した場合をそれぞれ示す。

10

20

30

40

50

【図2】培養開始から0日、5日、8日、及び13日後の培養液の状態を示す写真。図中のf/2はf/2培地、Nは窒素欠乏f/2培地、Pはリン欠乏f/2培地で培養した場合をそれぞれ示す。

【図3】栄養欠乏時の細胞の蛍光顕微鏡写真。図中のf/2はf/2培地、-Nは窒素欠乏f/2培地、-Pはリン欠乏f/2培地、TAPはTAP培地、TAP-Nは窒素欠乏TAP培地、TAP-Pはリン欠乏TAP培地で培養した場合をそれぞれ示す。

【図4】培養液1L当たりのTAG量を示す図。

【図5】TAG生産系強化のためのコンストラクトの構造を模式的に表した図。

【図6】定量PCRによるCrDGTT4遺伝子の発現確認実験の結果を示す図。

【図7】細胞当たりのTAG量を示す図。図中のP4d及びP7dはそれぞれ培養4日目及び7日目のTAG量を示す。各棒グラフは、左から野生株、コントロール株、#18、#3、#8、#9、#19、#21のTAG量を示す。なお、#19の7日目のTAG量は測定していない。

10

【図8】培養液1L当たりのTAG量を示す図。図中のP4d及びP7dはそれぞれ培養4日目及び7日目のTAG量を示す。各棒グラフは、左から野生株、コントロール株、#18、#3、#8、#9、#19、#21のTAG量を示す。なお、#19の7日目のTAG量は測定していない。

【図9】培養4日目のTAG脂肪酸組成を示す図。各棒グラフは、左から野生株、コントロール株、#18、#3、#8、#9、#19、#21のTAG量を示す。

【図10】培養7日目のTAG脂肪酸組成を示す図。各棒グラフは、左から野生株、コントロール株、#18、#3、#8、#9、#19、#21のTAG量を示す。

【図11】N. 2145を栄養欠乏下で育てたときの遺伝子発現の変化を示す図（栄養欠乏4日目）。図中のF2NはF2N50%SW培地、Pはリン欠乏F2N50%SW培地、Nは窒素欠乏F2N50%SW培地で培養した場合をそれぞれ示す。グラフの縦軸は、アクチンの発現量に対する相対値を示す。

20

【図12】N. 2145を栄養欠乏下で育てたときの遺伝子発現の変化を示す図（栄養欠乏6日目）。図中のF2NはF2N50%SW培地、Pはリン欠乏F2N50%SW培地、Nは窒素欠乏F2N50%SW培地で培養した場合をそれぞれ示す。グラフの縦軸は、アクチンの発現量に対する相対値を示す。

【図13】N. 2145由来のプロモーターを用いたコンストラクトの構造を模式的に表した図。

【図14】定量PCRによるCrDGTT4遺伝子の発現確認実験の結果を示す図。左図は栄養欠乏4日目の結果を示し、右図は栄養欠乏6日目の結果を示す。

30

【図15】細胞当たりのTAG量[pg]（上図）と培養液当たりのTAG量[mg]（下図）を示す図。

【発明を実施するための形態】

【0035】

以下、本発明を詳細に説明する。

【0036】

本発明のTAG高生産性藻類の作製法は、藻類に（1）TAG合成酵素遺伝子、（2）TAG合成酵素遺伝子の下流に配置されるリン欠乏応答プロモーター、及び（3）TAG合成酵素遺伝子の下流に配置され、コンストラクトを導入しようとする藻類と同種の藻類に由来する遺伝子の3'非翻訳領域を含むコンストラクトを導入することを特徴とするものである。

40

【0037】

TAG合成酵素遺伝子としては、ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ(DGAT)遺伝子を使用することができる。DGATには、DGAT1とDGAT2という2種類のアイソザイムが存在する。本発明においてはいずれも使用できるが、DGAT2を使用するのが好ましい。DGAT2やそれをコードする遺伝子については、多くの論文において報告されているので（例えば、Jay M. Shockey et al., The Plant Cell, Vol. 18 September 2006, 2294-2313, Miller et al., Plant Physiology, vol.154 2010, 1737-1752）、当業者はDGAT2遺伝子がどのようなものであるか理解することができる。DGAT2遺伝子の具体例としては、後述するC. reinhardtiiのDGTT4遺伝子のほか、Nannochloropsis sp.のDGAT2A遺伝子（その塩基配列を配列番号28に示す。）、DGAT2B遺伝子（その塩基配列を配列番号29に示す。）

50

、DGAT2C遺伝子（その塩基配列を配列番号30に示す。）、DGAT2D遺伝子（その塩基配列を配列番号31に示す。）、DGAT2E遺伝子（その塩基配列を配列番号32に示す。）、DGAT2F遺伝子（その塩基配列を配列番号33に示す。）、DGAT2G遺伝子（その塩基配列を配列番号34に示す。）、DGAT2H遺伝子（その塩基配列を配列番号35に示す。）、DGAT2I遺伝子（その塩基配列を配列番号36に示す。）、DGAT2J遺伝子（その塩基配列を配列番号37に示す。）、DGAT2K遺伝子（その塩基配列を配列番号38に示す。）などを挙げる  
ことができる。

#### 【0038】

DGAT2遺伝子としては、例えば、DGTT4遺伝子を使用することができる。DGTT4は、*C. reinhardtii*に含まれるDGAT2ファミリーに属するタンパク質であり、このタンパク質やそれをコードする遺伝子については、多くの論文において報告されているので（例えば、Boyle et al. The Journal of biological chemistry, 287 (2012), pp. 15811-15825、Chen JE and Smith AG, J Biotechnol. 2012 Jun 29）、当業者はDGTT4遺伝子がどのようなものであるか理解することができる。DGTT4のアミノ酸配列及びそれをコードする遺伝子の塩基配列は、それぞれ配列番号3及び配列番号2に示すとおりである。本発明におけるDGTT4遺伝子には、*C. reinhardtii*のDGTT4遺伝子(Cre03.g205050)だけでなく、他の生物におけるこの遺伝子に相当する遺伝子（ホモログなど）も含まれる。このような*C. reinhardtii*以外の生物におけるDGTT4遺伝子の具体例としては、*Volvox carterii f. nagariensis*のDGAT2 (JGI protein ID77655)遺伝子、*Ostreococcus tauri*のDGAT2 (JGI protein ID 21937)遺伝子などを挙げる  
ことができる。

#### 【0039】

DGTT4遺伝子の塩基配列としては、配列番号2に示す塩基配列を例示できる。また、DGTT4遺伝子の塩基配列は、配列番号2に示す塩基配列と高い同一性を示す塩基配列であって、活性（ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ活性など）のあるタンパク質をコードしている塩基配列であってもよい。ここでいう「高い同一性」とは、通常90%以上の同一性、好ましくは95%以上の同一性、より好ましくは97%以上の同一性、更に好ましくは99%以上の同一性を意味する。なお、本明細書における「同一性」の値は、当業者に公知の相同性検索プログラムを用いて算出することができる。例えば、NCBIの相同性アルゴリズムBLAST (Basic local alignment search tool)においてデフォルト（初期設定）のパラメーターを用いることにより、算出することができる。

#### 【0040】

また、DGTT4遺伝子の塩基配列は、配列番号3に示すアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、活性（ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ活性など）のあるタンパク質をコードするものであってもよい。ここでいう「1若しくは数個」とは、通常は、1～10個であり、好ましくは、1～5個であり、より好ましくは1～3個であり、更に好ましくは1個である。また、「欠失、置換若しくは付加」には、人為的な変異のほか、個体差、種や属の違いに基づく場合などの天然に生じる変異（mutantやvariant）も含まれる。

#### 【0041】

TAG合成酵素遺伝子としては、DGTT4遺伝子以外の酵素遺伝子を使ってもよい。例えば、多価不飽和脂肪酸を多く含むTAGを藻類に生産させたい場合は、多価不飽和脂肪酸を優先的にTAG内に取り込むTAG合成酵素遺伝子を使えばよい。このような遺伝子としては、例えば、*Thalassiosira pseudonana*（*Thalassiosira pseudonana*）の持つDGAT2遺伝子（特表2011-507513号公報）など挙げる  
ことができる。

#### 【0042】

リン欠乏応答プロモーターとしては、例えば、SQD2遺伝子のプロモーターを使用することができる。SQD2はスルホキノボシルジアシルグリセロール（SQDG）の合成に参与する酵素であり、この酵素やそれをコードする遺伝子については、多くの論文において報告されており（例えば、Yu B, Xu C, Benning C., Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Apr;99(8):5732-7.）、また、この酵素のアミノ酸配列もデータベース上で公表されているので（

10

20

30

40

50



例えば、*C. reinhardtii*のSQD2(SQD2a)のアミノ酸配列はGenBank Accession No. XP\_001689662に記載されている。) 、当業者はSQD2遺伝子がどのようなものであるか理解することができる。SQD2遺伝子のプロモーターとしては、*C. reinhardtii*のSQD2a遺伝子のプロモーター(その塩基配列を配列番号1に示す。) 、*Nannochloropsis* sp.のSQD2A遺伝子のプロモーター(その塩基配列を配列番号45に示す。) 、*Nannochloropsis* sp.のSQD2B遺伝子のプロモーター(その塩基配列を配列番号15に示す。) などを使用することができる。

#### 【0043】

SQD2遺伝子のプロモーターの塩基配列としては、配列番号1、配列番号15若しくは配列番号45に示す塩基配列、又は配列番号1、配列番号15若しくは配列番号45に示す塩基配列と高い同一性を示す塩基配列であって、プロモーター活性を維持している塩基配列などを例示できる。ここでいう「高い同一性」とは、通常90%以上の同一性、好ましくは95%以上の同一性、より好ましくは97%以上の同一性、更に好ましくは99%以上の同一性を意味する。

10

#### 【0044】

また、SQD2遺伝子のプロモーターの塩基配列は、配列番号1、配列番号15若しくは配列番号45に示す塩基配列において1若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列であって、プロモーター活性を維持している塩基配列であってもよい。ここでいう「1若しくは数個」とは、通常は、1~10個であり、好ましくは、1~5個であり、より好ましくは1~3個であり、更に好ましくは1個である。また、「欠失、置換若しくは付加」には、人為的な変異のほか、個体差、種や属の違いに基づく場合などの天然に生じる変異(mutantやvariant)も含まれる。

20

#### 【0045】

リン欠乏応答プロモーターとしては、SQD2遺伝子のプロモーター以外のプロモーターを使ってもよい。例えば、LDSP遺伝子のプロモーター(その塩基配列を配列番号46に示す。) 、LPAT-Y遺伝子のプロモーター(その塩基配列を配列番号44に示す。) などを使うことができる。

#### 【0046】

リン欠乏応答プロモーターは、藻類に導入するコンストラクトにおいて、TAG合成酵素遺伝子の上流に配置される。リン欠乏応答プロモーターは、TAG合成酵素遺伝子に直接接続していてもよいし、リンカーなどを介して接続していてもよい。

30

#### 【0047】

3'非翻訳領域は、コンストラクトを導入しようとする藻類と同種の藻類に由来する遺伝子の3'非翻訳領域を使用する。実施例では、VCP(violaxanthin/chlorophyll a-binding protein)1の3'非翻訳領域を使用しているが、コンストラクトを導入しようとする藻類と同種の藻類に由来する遺伝子の3'非翻訳領域であればどのようなものでもよい。VCP1遺伝子以外の遺伝子の3'非翻訳領域としては、カリフラワーモザイクウイルスのT35Sの3'非翻訳領域、ナンノクロロプシス属の藻類のRubisco小サブユニットRBCS2の3'非翻訳領域などを例示できる(Genome, Functional Gene Annotation, and Nuclear Transformation of the Heterokont Oleaginous Alga *Nannochloropsis oceanica* CCMP1779, PLoS Genet. 2012 Nov;8(11). Epub 2012 Nov 15.)。3'非翻訳領域の長さは特に限定されないが、500~1500塩基とするのが好ましく、500~700塩基とするのが更に好ましい。コンストラクト中にTAG合成酵素遺伝子とプロモーターのほか、この3'非翻訳領域を含めることにより、効率的にTAG高生産性藻類を作製できるようになる。

40

#### 【0048】

3'非翻訳領域は、藻類に導入するコンストラクトにおいて、TAG合成酵素遺伝子の下流に配置される。3'非翻訳領域は、TAG合成酵素遺伝子に直接接続していてもよいし、リンカーなどを介して接続していてもよい。

#### 【0049】

コンストラクトは、上述したTAG合成酵素遺伝子、プロモーター、及び3'非翻訳領域の

50

ほかに、他の遺伝子等、例えば、抗生物質耐性遺伝子やそれを発現させるためのプロモーターなどを含んでいてもよい。

【0050】

コンストラクトの導入対象とする藻類としては、ナンノクロロプシス (*Nannochloropsis*) 属の藻類が好ましいが、これ以外の藻類、例えば、クラミドモナス (*Chlamydomonas*) 属、シュードコリスチス (*Pseudochoricystis*) 属、フェオダクチラム (*Phaeodactylum*) 属、オステレオコックス (*Ostreococcus*) 属、シアニディオシゾン (*Cyanidioschyzon*) 属、クレブソルミディウム (*Klebsormidium*) 属、クロロキプス (*Chlorokybus*) 属、スピロギラ (*Spirogyra*) 属、カラ (*Chara*) 属、コレオケーテ (*Coleochaete*) 属、クロレラ (*Chlorella*) 属、又はフィスチュリフェラ (*Fistulifera*) 属に属する藻類などであってもよい。ナンノクロロプシス属の藻類としては、ナンノクロロプシス・オクラタ (*Nannochloropsis oculata*)、ナンノクロロプシス・サリナ (*Nannochloropsis salina*)、ナンノクロロプシス・ガディタナ (*Nannochloropsis gaditana*) などを例示でき、クラミドモナス属の藻類としては、クラミドモナス・レインハーディ (*Chlamydomonas reinhardtii*) などを例示でき、シュードコリスチス属の藻類としては、シュードコリスチス・エリプソイディア (*Pseudochoricystis ellipsoidea*) などを例示でき、フェオダクチラム (*Phaeodactylum*) 属の藻類としてはフェオダクチラム・トリコルヌーツム (*Phaeodactylum tricornutum*) を例示でき、オステレオコックス属の藻類としてはオステレオコックス・タウリ (*Ostreococcus tauri*) を例示でき、シアニディオシゾン属の藻類としてはシアニディオシゾン・メロラ (*Cyanidioschyzon merolae*) を例示でき、クレブソルミディウム属の藻類としてはクレブソルミディウム・フラチダム (*Klebsormidium flaccidum*) を例示でき、カラ属の藻類としては、カラ・フラギリス (*Chara fragilis*) を例示でき、コレオケーテ属の藻類としては、コレオケーテ・スクタータ (*Coleochaete scutata*) を例示でき、クロレラ属の藻類としては、クロレラ・ブルガリス (*Chlorella vulgaris*) などを例示でき、フィスチュリフェラ属の藻類としては、フィスチュリフェラ・ソラリス (*Fistulifera solaris*) などを例示できる。

10

20

【0051】

上述したように、3'非翻訳領域は、コンストラクトを導入しようとする藻類と同種の藻類に由来するものである必要があるが、TAG合成酵素遺伝子とリン欠乏応答プロモーターは、コンストラクトを導入しようとする藻類と同種、異種のいずれの藻類由来のものであってもよい。

30

【0052】

コンストラクトの構築やこれを藻類に導入する操作などは常法に従って行うことができる。

【0053】

上述した方法によって作製されたTAG高生産性藻類の培養は、TAG蓄積時にリン欠乏条件下で培養すること以外、通常の藻類の培養と同様に行うことができる。例えば、藻類として、ナンノクロロプシス属の藻類を培養する場合は、培地としては、f/2培地などを用いることができ、培養温度は20~25 程度とすることができ、培養時の光強度は10~40  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{sec}$ とすることができ、クラミドモナス属の藻類を培養する場合は、培地としては、TAP培地などを用いることができ、培養温度は23~25 程度とすることができ、培養時の光強度は10~40  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{sec}$ とすることができる。

40

【0054】

TAG高生産性藻類にTAGを蓄積させる場合は、リン欠乏条件下で培養する。リン欠乏条件下での培養は、例えば、対数増殖期の細胞を、増殖時に用いていた培地からリン成分(例えば、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ など)を除いた培地、あるいはリン成分の濃度を33  $\mu\text{M}$ 以下にした培地に移して培養することにより、行うことができる。通常、8~13日程度の培養で細胞中に十分な量のTAGが蓄積される。また、ナンノクロロプシス属の藻類など高密度培養が可能な藻類では、リン成分を除いた培地等に移すことなく、増殖時に用いていた培地で、高密度条件下で一定期間以上培養することによっても、TAGを蓄積させることができる。

50

これは、長期間培養することにより、自然にリン欠乏条件になるためであると考えられる。この高密度培養法では、通常、7~20日程度の培養で細胞中に十分な量のTAGが蓄積される。なお、ここでいう「高密度培養」とは、通常、細胞密度が $1 \times 10^8$  cells/ml以上の培養をいう。

【0055】

TAGを蓄積した細胞からTAGの採取は常法に従って行うことができる。

【実施例】

【0056】

以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

10

〔実施例1〕

〔実験材料〕

(1) 藻類株

真正眼点藻 *Nannochloropsis* NIES-2145 (以後N. 2145)を使用した。この藻類株は独立行政法人国立環境研究所(<http://www.nies.go.jp/>)から入手可能である。

【0057】

緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* C9株 (CC-408 mt-)を使用した。この藻類株は *Chlamydomonas* Center (<http://chlamycollection.org/>)から入手可能である。

(2) 遺伝子名とprotein ID

遺伝子名とprotein ID(*JGI Chlamydomonas reinhardtii* 4.0)は以下の通りである。

20

DGTT4: PID190539

SQD2a: PID116277

CBLP: PID164254

(3) 遺伝子配列

*C. reinhardtii*由来のSQD2aプロモーター (pCrSQD2a)の配列は、配列番号1に示す通りである。

【0058】

*C. reinhardtii*由来のDGTT4遺伝子 (CrDGTT4)の配列は、配列番号2に示す通りである。

【0059】

sh ble遺伝子の配列は、配列番号4に示す通りである。

30

【0060】

ナンノクロロプシス由来のVCP2遺伝子のプロモーター (NannoVCP2gene promoter)の配列は、配列番号5に示す通りである。

【0061】

ナンノクロロプシス由来のVCP1遺伝子の3'非翻訳領域 (NannoVCP1(VCP1) 3'UTR)の配列は、配列番号6に示す通りである。

【0062】

〔実験操作〕

(1) 培養条件

*C. reinhardtii*の培養にはTAP培地を通常培養の培地として使用した。

40

【0063】

$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  5 g,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2.2 g,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  1.14 g,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  506 mg,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  499 mg,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  161 mg,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  157 mg,  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  110 mg, KOH 1.6gをイオン交換水 1Lへ溶解し、Hutner's trace elementsとして4に保存しておいた。

【0064】

$\text{NH}_4\text{Cl}$  400 mg,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  51 mg,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  100 mg,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  119 mg,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  60.3 mg, Hutner's trace elements 10 mL, 酢酸 1 mL, Tris (hydroxymethyl) aminomethane 2.42 gをイオン交換水 998 mLへ溶解し、オートクレーブ滅菌してから液体TA

50

P培地として使用した。プレート培地として使用する場合はINA Agar 12 gをオートクレーブ前に添加した。

【0065】

TAP培地を通常培養の培地として使用し、 $20 \sim 30 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{sec}$ , 23 で巡回培養した。リン欠乏培地ではTAP培地から  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ をのぞき、窒素欠乏培地では  $\text{NH}_4\text{Cl}$ をのぞいた。

【0066】

N. 2145の培養にはf/2培地又はF2N50%SW培地を通常培養の培地として使用した。

【0067】

f/2培地は、以下のように調製した。

$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  440 mg,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  316 mg,  $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.2 mg,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2.1 mg,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  18 mg,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.7 mg,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.7 mgをイオン交換水 100 mLへ溶解し、f/2 metalとして4 に保存しておいた。 $\text{NaNO}_3$  7.5 mg,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.6 mg, Vitamin  $\text{B}_{12}$  0.05  $\mu\text{g}$ , Biotin 0.05  $\mu\text{g}$ , Thiamine HCl 10  $\mu\text{g}$ ,  $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  1 mg, f/2 metal 0.1 mLを人工海水 99.9 mLへ溶解し、フィルター滅菌してから液体f/2培地として使用した。プレート培地として使用する場合は  $\text{NaNO}_3$  7.5 mg,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.6 mg, Vitamin  $\text{B}_{12}$  0.05  $\mu\text{g}$ , Biotin 0.05  $\mu\text{g}$ , Thiamine HCl 10  $\mu\text{g}$ ,  $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  1 mg, f/2 metal 0.1 mLを2倍濃度の人工海水 50 mLに溶解し、フィルター滅菌しておき、別のフラスコでINA Agar 8 gをイオン交換水 50 mLに加えてオートクレーブしてから、培地に加えた。

【0068】

野生型N. 2145を用いた実験(図1~4)では、f/2培地を通常培養の培地として使用し、 $20 \sim 30 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{sec}$ , 23 で巡回培養した。リン欠乏培地ではf/2培地から $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ をのぞき、窒素欠乏培地では $\text{NaNO}_3$ をのぞいた。

【0069】

F2N50%SW培地は、F2N培地(PNAS, 2011, vol. 108 (no. 52) 21265-21269)に含まれる人工海水を50%濃度にしたものであり、以下のように調製した。

Tris(hydroxymethyl)aminomethane 12.11gをイオン交換水 100 mLへ溶解し、HClでpH7.6にあわせたものを1 M Tris(pH7.6)とした。1 M Tris(pH7.6) 10 mL,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  26.745 mg,  $\text{NaNO}_3$  7.5 mg,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  3.0 mg, Vitamin  $\text{B}_{12}$  0.25  $\mu\text{g}$ , Biotin 0.25  $\mu\text{g}$ , Thiamine HCl 50  $\mu\text{g}$ ,  $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  1 mg, f/2 metal 0.5 mLを50%濃度の人工海水へ溶解して全量100 mLとし、フィルター滅菌してから液体F2N50%SW培地として使用した。脂質合成遺伝子発現のコンストラクトを導入したN. 2145を用いた実験(図6~15)では、F2N50%SW培地をコントロール培地、コントロール培地から $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ をのぞいたものをリン欠培地、コントロール培地から $\text{NaNO}_3$ 、 $\text{NH}_4\text{Cl}$ をのぞいたものを窒素欠乏培地とした。

【0070】

(2) 脂質抽出

培養液100~450 mLを800 x g, 5分間遠心して、培養細胞を沈殿させ、イオン交換水1 mLに懸濁した後、-80 に保存した。

【0071】

凍結細胞を解凍し、クロロホルム 1 mL, メタノール 2 mLを添加し、10分おきに懸濁しながら1時間室温に置いた。800 g, 5分間スイングローターで遠心し、上清 4 mLを回収した。沈殿に1%(W/V)KCl 0.8 mL, クロロホルム 1 mL, メタノール 2 mLを添加し、懸濁した後、800 x g, 5分間スイングローターで遠心し、上清 3.8 mLを先ほどの上清とあわせて回収した。上清 7.8 mLにクロロホルム 2 mL, 1%(W/V)KCl 1.2 mLを添加し、懸濁した後、800 x g, 5分間スイングローターで遠心し、下層の脂質抽出液を回収した。脂質抽出液を乾燥させ、60 mg/mLになるようにクロロホルム:メタノール=2:1に溶解した後、-20 に保存した。

【0072】

(3) 脂質分析

10

20

30

40

50

脂質抽出液50  $\mu\text{L}$ を薄層シリカプレートにスポットし、ヘキサン：ジエチルエーテル：酢酸 = 160:40:4の展開液で45分間展開した。0.001%プリムリンを用いて、UV照射下でTAGを確認した。TAGがのっている部分のシリカを削り取り、1mM ペンタデカン酸 100  $\mu\text{L}$ 、5% 塩酸/メタノールを500  $\mu\text{L}$ を添加し、懸濁した後、85  $^{\circ}\text{C}$ 、1時間静置した。ヘキサン 500  $\mu\text{L}$ を添加し、懸濁した後、800  $\times\text{g}$ 、5分間スイングローターで遠心し、上層のメチルエステル化した脂肪酸を回収した。下層に再びヘキサン500  $\mu\text{L}$ を添加し、懸濁した後、800  $\times\text{g}$ 、5分間スイングローターで遠心し、上層を回収した。メチルエステル化した脂肪酸を乾燥させた後、ヘキサン60  $\mu\text{L}$ に溶解し、ガスクロマトグラフィサンプルとした。ガスクロマトグラフィはSHIMADZU GC-2014にHR-SS-10 25m (length)  $\times$  0.25mm (i.d.) (Shinwa Chemical Industries, Ltd., Japan)を取り付けて行った。

10

## 【 0 0 7 3 】

## ( 4 ) RNA抽出

凍結細胞に3倍量以上のRNA抽出液と3倍量以上の酸性フェノールを加え、凍ったまま超音波破碎(超音波15秒、氷冷30秒)を4回行った。20000  $\times\text{g}$ 、5分間、4  $^{\circ}\text{C}$ で遠心し、上清400~500  $\mu\text{L}$ を回収した。上清に酸性フェノール 300  $\mu\text{L}$ 、クロロホルム 300  $\mu\text{L}$ を添加し、懸濁した後、14k rpm、5分間、4  $^{\circ}\text{C}$ で遠心し、上清400~500  $\mu\text{L}$ を回収し、この操作を5回繰り返した。上清の1/10倍量の3 M 酢酸ナトリウム、1倍量のイソプロパノールを添加し、懸濁した後、20000  $\times\text{g}$ 、5分間、4  $^{\circ}\text{C}$ で遠心した。沈殿物に70% エタノールを1 mL加え、20000  $\times\text{g}$ 、5分間、4  $^{\circ}\text{C}$ で遠心し、この操作を2回繰り返した後、沈殿物を乾燥させた。乾燥した沈殿を滅菌イオン交換水 400  $\mu\text{L}$ に溶解した後、1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 以上の濃度の核酸であることを確認した。核酸 40  $\mu\text{L}$ に10  $\times$  DNase I Buffer 5  $\mu\text{L}$ 、DNase I 0.5  $\mu\text{L}$ 、滅菌イオン交換水 4.5  $\mu\text{L}$ を加え、37  $^{\circ}\text{C}$ 、30分間静置した。酸性フェノール 50  $\mu\text{L}$ 、クロロホルム 50  $\mu\text{L}$ を添加し、懸濁した後、20000  $\times\text{g}$ 、10分間、4  $^{\circ}\text{C}$ で遠心し、上清 35  $\mu\text{L}$ を回収した。上清の1/10倍量の3 M 酢酸ナトリウム、1倍量のイソプロパノールを添加し、懸濁した後、20000  $\times\text{g}$ 、10分間、4  $^{\circ}\text{C}$ で遠心した。沈殿物に70% エタノール 150  $\mu\text{L}$ 加え、20000  $\times\text{g}$ 、10分間、4  $^{\circ}\text{C}$ で遠心し、この操作を2回繰り返した後、沈殿物を乾燥させた。乾燥した沈殿を滅菌イオン交換水 50  $\mu\text{L}$ に溶解した後、1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 以上の濃度のRNAであることを確認した。

20

## 【 0 0 7 4 】

## ( 5 ) cDNAの調製

RNA 1  $\mu\text{g}$ に10 mM dNTP 0.5  $\mu\text{L}$ 、100 mM oligo dT18 0.25  $\mu\text{L}$ 、100 mM random 6mer 0.25  $\mu\text{L}$ 、RNase free waterを適量(0~5  $\mu\text{L}$ )加えて全量を6  $\mu\text{L}$ とし、65  $^{\circ}\text{C}$ 、5分間処理した後、氷上に静置した。さらに5 $\times$ cDNA Synthesis Buffer 2  $\mu\text{L}$ 、0.1 M DTT 0.5  $\mu\text{L}$ 、RNase OUT 0.5  $\mu\text{L}$ 、Thermo Script RT 0.5  $\mu\text{L}$ 、RNase free water 0.5  $\mu\text{L}$ を添加し、50  $^{\circ}\text{C}$ 、40分間、60  $^{\circ}\text{C}$ 、20分間、85  $^{\circ}\text{C}$ 、5分間処理した。得られたcDNAは-20  $^{\circ}\text{C}$ に保管した。

30

## 【 0 0 7 5 】

## ( 6 ) 定量RT-PCR法

2  $\times$  SYBR Green (TAKARA) 12.5  $\mu\text{L}$ 、10  $\mu\text{M}$  primer\_F 1  $\mu\text{L}$ 、10  $\mu\text{M}$  primer\_R 1  $\mu\text{L}$ 、5倍希釈したcDNA 2  $\mu\text{L}$ 、滅菌イオン交換水 8.5  $\mu\text{L}$ を懸濁し、反応に用いた。

40

## 【 0 0 7 6 】

プライマーは以下のものを使用した。

Nanno\_realRT\_TUBf AGCATGGCATTGACTCCACC (配列番号7)

Nanno\_realRT\_TUBr AACGGCCTCGTTGTAGTACACG (配列番号8)

CrDGTT4\_realRT\_F GTTCGTGCAGTTCAGTGTGG (配列番号9)

CrDGTT4\_realRT\_R CGGGCAGAATCCGAACA (配列番号10)

## 【 0 0 7 7 】

## ( 7 ) プロモーター配列の獲得

C. reinhardtii C9株のゲノムを鋳型にPCR反応を行い、プロモーター領域pCrSQD2aを得た。得られた約1 kbの配列をpMD20-T vector(TAKARA)またはpZErO-2 (Invitrogen)へ導

50

入した。

【 0 0 7 8 】

2x GC Buffer II 5  $\mu$ L, 2.5 mM dNTP 1.6  $\mu$ L, C9株のゲノム 1  $\mu$ L, LA Taq 0.05  $\mu$ L, 10  $\mu$ M primer\_F 1  $\mu$ L, 10  $\mu$ M primer\_R 1  $\mu$ L, 滅菌イオン交換水 1.35  $\mu$ Lを懸濁し、PCR反応に用いた。

【 0 0 7 9 】

PCR反応条件は以下の3stepで行った。

step1 94 2 分間

step2 94 4 5 秒間, 55 3 0 秒間, 71 1 分 3 0 秒間を 4 0 サイクル

step3 71 5 分間

10

プライマーは以下のものを使用した。

SQD2a\_F2 CGGGATAGTTGTAGCTGTAG ( 配列番号 1 1 )

SQD2a\_R2 CGAAGAGTTGAGGTGTGTGTTTC ( 配列番号 1 2 )

【 0 0 8 0 】

( 8 ) CrDGTT4遺伝子の配列の獲得

リン欠乏時の*C. reinhardtii*のcDNAを鋳型にPCR反応を行い、DGTT4遺伝子の全長を得た。得られた約 1 kbの配列をpMD20-T vector(TAKARA)またはpZErO-2 ( Invitrogen ) へ導入した。

【 0 0 8 1 】

LA PCR x10 buffer 1.5  $\mu$ L, 2.5 mM dNTP 1.2  $\mu$ L, MgCl<sub>2</sub> 1.05  $\mu$ L, LA Taq 0.075  $\mu$ L, 5 M ベタイン 1.5  $\mu$ L, DMSO 0.45  $\mu$ L, 10  $\mu$ M primer\_F 1.5  $\mu$ L, 10  $\mu$ M primer\_R 1.5  $\mu$ L, cDNA 0.2  $\mu$ L, 滅菌イオン交換水 6.1  $\mu$ Lを懸濁し、PCR反応に用いた。

20

【 0 0 8 2 】

PCR反応条件は以下の3stepで行った。

step1 94 3 分間

step2 94 3 0 秒間, 54 3 0 秒間, 72 1 分間を 4 1 サイクル

step3 72 3 分間

プライマーは以下のものを使用した。

DGTT4\_F2 ATGCCGCTCGCAAAGCTGCG ( 配列番号 1 3 )

DGTT4\_R2 CTACATTATGACCAGCTCCTC ( 配列番号 1 4 )

30

【 0 0 8 3 】

( 9 ) N. 2145形質転換法

通常培地で $2 \sim 3 \times 10^6$  cells/mLになるまで培養したN. 2145株 500mLを4 , 980 x g, 10 分間遠心し、細胞を沈殿させた。上清をのぞいた後、氷冷した375 mM Sorbitolで3回洗浄した。洗浄後の沈殿細胞を終濃度 $5 \times 10^8$  cells/mLになるように375 mM Sorbitolに懸濁した。濃縮細胞 200  $\mu$ lに2~10  $\mu$ gのコンストラクトDNA, 10 mg/mL キャリアssDNA ( Salmon Sperm) 2  $\mu$ Lを添加した。細胞懸濁液をエレクトロポレーション用キュベット ( 2 mm 幅 ) に入れ、11kV/cm, 時定数 12 msecで1回電圧をかけた。通常培地 1 mLをキュベットへ添加し、細胞を懸濁した後、15 mLチューブへ移した。さらに通常培地を4 mL添加し、全量を5 mLとした。10  $\mu$ E/m<sup>2</sup>/sec, 23 , 48 時間旋回培養し、0.4% INA Agar/f/2 5 mL を添加し、2  $\mu$ g/ $\mu$ Lゼオシンを添加したプレートに蒔いた。20~30  $\mu$ E/m<sup>2</sup>/sec, 23 で静置し、14~20日後に生えて来たコロニーを形質転換株として新しいゼオシン入りプレートへ植えついで。

40

【 0 0 8 4 】

〔 実験結果 〕

( 1 ) TAG/膜脂質合成系の制御検討

モデル藻類*C. reinhardtii*での脂質蓄積に関する知見として、窒素欠乏条件下で脂質が蓄積すること、脂質の中では貯蔵脂質であるTAGが蓄積すること、飽和脂肪酸の割合が増えることが報告されている ( BMC Biotechnol. 2011; 11: 7. )。本発明者は対数増殖期の細胞をリン欠乏条件下におくと脂質蓄積がおこることを見出した ( 特開2014-049651 )。

50

超微細藻類であり、オイル高生産能がある真正眼点藻N. 2145でも同様にリン欠条件下での脂質蓄積を調べた。

【0085】

(2) 栄養欠乏条件下でのTAG蓄積量の比較

C. reinhardtiiでの脂質蓄積の結果をふまえ、増殖が盛んな対数増殖期 ( $1 \times 10^7$  cells/mL) のN. 2145を用いて窒素欠乏条件、リン欠乏条件の比較を行った。

【0086】

窒素欠乏条件へ植え継いだ場合、C. reinhardtiiと同様に細胞増殖が大きく阻害されることがわかった(図1~3)。リン欠乏条件へ植え継いだ場合、C. reinhardtiiと同様に窒素欠乏条件下ほど阻害されず、TAG蓄積が見られた(図1~4)。リン欠乏条件へ植え継いだ場合、増殖が窒素欠乏条件下ほど阻害されないこと、TAG蓄積量が多いことから、C. reinhardtiiと同様にTAGの脂肪酸組成を膜脂質に含まれる脂肪酸から大きく改変するのに向いていることを見出した。

10

【0087】

また、本発明者はN. 2145のリン欠乏条件下でのTAG蓄積量はC. reinhardtiiを上回っていることを見いだした。リン欠乏条件下で培養1週間目の培養液1L当たりのTAG蓄積量は12mg/Lであり、同期培養したC. reinhardtiiの2倍であった。さらに、N. 2145は通常培地で $1 \times 10^9$  cells/mL、リン欠乏培地で $2 \times 10^8$  cells/mLまで高密度培養が可能である。これはC. reinhardtiiの100倍の細胞密度である。高密度培養でリン欠乏培地に植え継げば、培養液1Lあたり1g以上のTAGが得られると期待される。

20

【0088】

(3) C. reinhardtii由来脂質合成遺伝子発現のコンストラクト

Diacylglycerol acyltransferase (DGAT)はTAG生合成の最終ステップを触媒する酵素である。DGATは動物、植物に広く存在する酵素であり、DGAT1, DGAT2の2種類が報告されている。

【0089】

C. reinhardtiiには、DGAT1が1種類、DGAT2が5種類(DGTT1-5)存在することがわかっており、これらのうちDGTT1については窒素欠乏条件下でmRNA量の変化がみられること、DGTT2およびDGTT3については窒素欠乏条件下でmRNA量の変化が少ないこと、DGTT5は発現していないことが報告されている(Plant Physiol. 2010, Vol.154, 1737-1752)。本発明者はリン欠条件下で強発現を誘導するプロモーターpSQD2aを見だし、DGTT4遺伝子に連結することで、TAG蓄積を促進する方法を開発した(特開2014-049651)。

30

【0090】

今回、本発明者はC. reinhardtiiのゲノムを鋳型として、SQD2aのプロモーター領域pCrSQD2aをPCRにより増幅した。またC. reinhardtiiのリン欠乏時のcDNAからCrDGTT4遺伝子の配列を得た。pCrSQD2aをCrDGTT4遺伝子上流に接続し、pCrSQD2aCrDGTT4とした。変異株選抜用にゼオシン遺伝子耐性遺伝子(S. hindustanus由来ble)を上流に接続し、shblepCrSQD2aCrDGTT4を得た。Kilian et al. PNAS 2011を参考に、この配列の5'末端側と3'末端側にそれぞれN.2145のVCP2のプロモーターとN.2145のVCP1 3'UTRを挿入したものをTAG生産系強化のためのコンストラクト(F)とした。コントロールにはN.2145のVCP2のプロモーターとN.2145のVCP1 3'UTRの間にshbleのみを挿入したコンストラクト(control)を用いた。さらにN.2145のVCP1 3'UTRをpCrSQD2aCrDGTT4の3'末端側につけることの有効性を確認するために、pCrSQD2aCrDGTT4を逆向きに挿入したコンストラクト(R)も作成した(図5)。

40

【0091】

(4) N. 2145でのTAG増産

図5のコンストラクトをN. 2145へ形質転換し、ゼオシンで選抜後、control株とF株については形質転換株を20~30株得た。R株は4株得られた。リン欠乏条件5日目の形質転換株から回収したRNAを用いて、定量RT-PCRを行い、CrDGTT4遺伝子の発現上昇が確認された株をさらに選抜した。野生株、control株、R株ではCrDGTT4遺伝子発現上昇は確認

50

されなかった(図6)。このことから、プロモーターpCrSQD2aとN.2145由来の3'UTRの組み合わせは間に挟んだ遺伝子の発現上昇に有効であると考えられる。

【0092】

野生株、コントロール株と、F株のうち、CrDGTT4遺伝子発現上昇の見られた5株(#3, #8, #9, #19, #21)と上昇の見られなかった1株(#18)についてリン欠乏培地300 mLで培養し、リン欠乏4日目と7日目で細胞を回収し、TAG蓄積量を調べた(図7、図8)。

【0093】

図7、図8より、リン欠乏4日目ではCrDGTT4遺伝子発現上昇の見られなかった#18はコントロール株と同程度のTAG蓄積しかみられなかった。CrDGTT4遺伝子発現上昇の見られた5株(#3, #8, #9, #19, #21)ではリン欠乏条件下で野生株、コントロール株よりも2~3倍のTAGが蓄積していることを発見した。7日目ではCrDGTT4遺伝子発現上昇の見られた株と野生株との差は小さくなった。これはN.2145細胞由来の11種類のDGAT2遺伝子発現によると考えられる。本手法は、短期間で効率よく脂質を蓄積できる方法であり、植物よりもバイオマスの大きい、藻類におけるバイオディーゼル生産や有用脂質生産を効実現するために、極めて有用性の高い手法である。

10

【0094】

さらに、4日目のリン欠乏条件下でのTAGの脂肪酸組成は図9に示したように、CrDGTT4遺伝子発現上昇の見られた株では野生株やコントロール株に比べてC18:1の割合が増加していた。7日目にはこの差は顕著ではなくなっていた。CrDGTT4はC18:1を基質として好むことが報告されている(Plant Cell 2013 Feb;25(2):677-93)。このことからプロモーターpCrSQD2aとN.2145由来の3'UTRの組み合わせはTAGの脂肪酸組成を膜脂質に含まれる脂肪酸から大きく改変するのに向いていると考えられる。

20

【0095】

今回の発明で使用したリン欠乏応答プロモーターpCrSQD2aとN.2145由来の3'UTRの組み合わせは通常培養時には発現を誘導しないので、油脂蓄積のタイミングをコントロールすることができる。リン欠乏条件下で細胞増殖させながら、油脂蓄積を行わせることができるので、新規脂肪酸合成に適している。これは有用な特殊脂肪酸を蓄積させるにも有効な方法である。

【0096】

〔実施例2〕

リン欠乏に応答するN.2145由来のプロモーター候補を探すために、栄養欠乏条件4日目、6日目の細胞からRNAを回収し、定量RT-PCR法を行った。C. reinhardtiiではリン欠乏条件下でSQD2aの発現上昇が見られたので、N.2145の相同遺伝子であるSQD2A, SQD2B, SQD2Cの遺伝子発現を調べた。また、先行論文(Plant Physiology, April 2012, Vol. 158, pp. 1562-1569)から、LDSP(lipid droplet surface protein)の高発現が予想され、LPATについて本発明者の所属する研究室の先行研究より高発現が予想されたので、遺伝子発現を調べた。このとき、アクチンの発現をコントロールとした。

30

使用したプライマー配列は以下の通りである。

【0097】

NannoACTf: 5-ACCTTCTACAACGAGCTGC-3(配列番号16)

40

NannoACTr: 5-GAACGTCTCAAACATAATCTGG-3(配列番号17)

NannoSQD2A\_realRT\_F:5-TCCCTTGCTTACTGCTCTGG-3(配列番号18)

NannoSQD2A\_realRT\_R:5-GATTTCGCGTAGCCGCTTA-3(配列番号19)

NannoSQD2B\_realRT\_F:5-CTTAATACGACCACACACGTCCTC-3(配列番号20)

NannoSQD2B\_realRT\_R:5-TGATACGCCTCCGCACTTT-3(配列番号21)

NannoSQD2C\_realRT\_F:5-CCACGACTGCCGAATGA-3(配列番号22)

NannoSQD2C\_realRT\_R:5-TGCTAGTGGACCCCTTGTGG-3(配列番号23)

qRT\_LPATY\_L:5-gcttgtcgagtaccattcat-3(配列番号24)

qRT\_LPATY\_:5-cagcagcccaaagaggttc-3(配列番号25)

qRT\_LDSP\_L:5-gtgcctttcgacctctcg-3(配列番号26)

50



qRT\_LDSP\_R:5-ggcacaaaaagatcctagcaa-3 (配列番号 27)

【0098】

LPAT-Y, SQD2-A, SQD2-Bがリン欠乏条件で発現上昇し、LDSPがリン欠乏および窒素欠乏条件で発現上昇した(図11及び図12)。N. 2145の11種類のDGAT2(DGAT2AからDGAT2K)と2種類のDGAT1についても発現を調べたが、上記4遺伝子ほどの発現上昇は見られなかった。そこで上記4遺伝子のプロモーター領域約1kbをリン欠条件下で強発現を誘導するN. 2145由来のプロモーターpNLPATY, pNSQD2A, pNSQD2B, pNLDSPPとした。

【0099】

本発明者はリン欠乏条件で発現上昇の見られたLPAT-Y, SQD2-Bのプロモーター領域pNLPATY, pNSQD2BをN. 2145のゲノムを鋳型としてPCRにより増幅した。pNLPATY, pNSQD2BをpCrSQD2aのかわりにCrDGTT4遺伝子上流に接続し、pNLPATYCrDGTT4, pNSQD2BCrDGTT4とした(図13)。図13のコンストラクトをN. 2145へ形質転換し、pCrSQD2aCrDGTT4の場合と同様に、ゼオシンで選抜後、リン欠乏条件4日目、6日目の形質転換株から回収したRNAを用いて、定量RT-PCRを行った。定量RT-PCRには以下のプライマーを使用した。

NannoACTf: 5-ACCTTCTACAACGAGCTGC-3 (配列番号 47)

NannoACTr: 5-GAACGTCTCAAACATAATCTGG-3 (配列番号 48)

CrDGTT4\_realRT\_F:5-GTTCGTGCAGTTCAGTGTGG-3 (配列番号 49)

CrDGTT4\_realRT\_R:5-CGGGCAGAATCCGAACA-3 (配列番号 50)

【0100】

野生株、control株ではCrDGTT4遺伝子発現は確認されず、形質転換体pLPATY-1, pLPATY-2, pLPATY-3, pSQD2B-1, pSQD2B-2, pSQD2B-3ではCrDGTT4の発現が確認された(図14)。リン欠乏培地200 mlで培養し、リン欠乏4日目で細胞を回収し、TAG蓄積量を調べた(図15)。図15より、CrDGTT4遺伝子発現上昇の見られた形質転換体pLPATY-3, pSQD2B-1ではリン欠乏条件下で野生株よりもTAGが蓄積していることを発見した。このことからリン欠乏条件に应答する遺伝子のプロモーター領域をTAG増産のための遺伝子発現に用いる本手法は短期間で効率よく脂質を蓄積できる方法であるといえる。

【0101】

なお、本実施例で使用した遺伝子等の配列は以下の通りである。

N. 2145由来のDGAT2A遺伝子の配列は、配列番号28に示す通りである。

N. 2145由来のDGAT2B遺伝子の配列は、配列番号29に示す通りである。

N. 2145由来のDGAT2C遺伝子の配列は、配列番号30に示す通りである。

N. 2145由来のDGAT2D遺伝子の配列は、配列番号31に示す通りである。

N. 2145由来のDGAT2E遺伝子の配列は、配列番号32に示す通りである。

N. 2145由来のDGAT2F遺伝子の配列は、配列番号33に示す通りである。

N. 2145由来のDGAT2G遺伝子の配列は、配列番号34に示す通りである。

N. 2145由来のDGAT2H遺伝子の配列は、配列番号35に示す通りである。

N. 2145由来のDGAT2I遺伝子の配列は、配列番号36に示す通りである。

N. 2145由来のDGAT2J遺伝子の配列は、配列番号37に示す通りである。

N. 2145由来のDGAT2K遺伝子の配列は、配列番号38に示す通りである。

N. 2145由来のSQD2A遺伝子の配列は、配列番号39に示す通りである。

N. 2145由来のSQD2B遺伝子の配列は、配列番号40に示す通りである。

N. 2145由来のSQD2C遺伝子の配列は、配列番号41に示す通りである。

N. 2145由来のLPAT-Y遺伝子の配列は、配列番号42に示す通りである。

N. 2145由来のLDSP遺伝子の配列は、配列番号43に示す通りである。

N. 2145由来のLPAT-Y遺伝子のプロモーターの配列は、配列番号44に示す通りである。

。

N. 2145由来のSQD2A遺伝子のプロモーターの配列は、配列番号45に示す通りである。

N. 2145由来のSQD2B遺伝子のプロモーターの配列は、配列番号46に示す通りである。

N. 2145由来のLDSP遺伝子のプロモーターの配列は、配列番号47に示す通りである。

【0102】

10

20

30

40

50

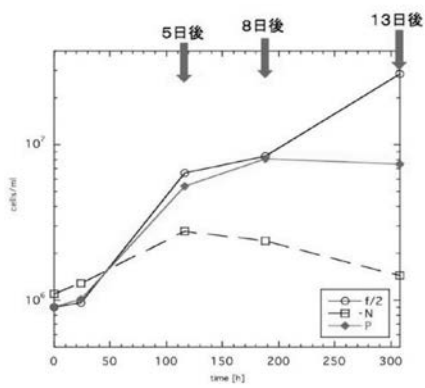
本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

【産業上の利用可能性】

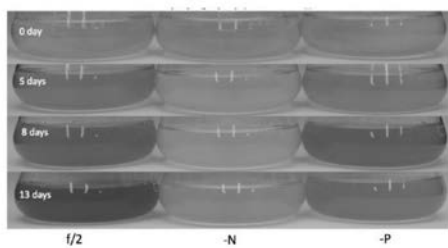
【0103】

本発明は、TAG生産に関連する各種産業分野において利用可能である。

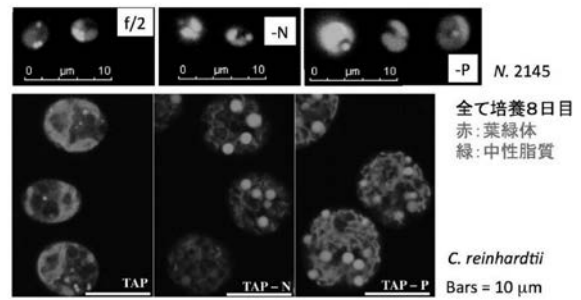
【図1】



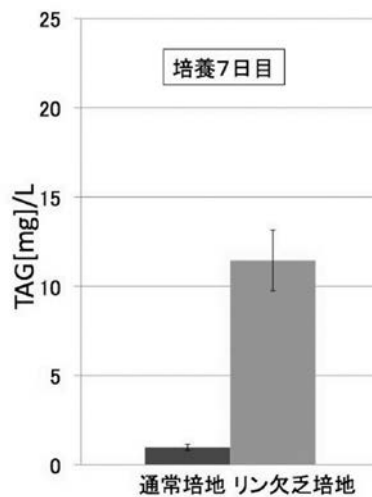
【図2】



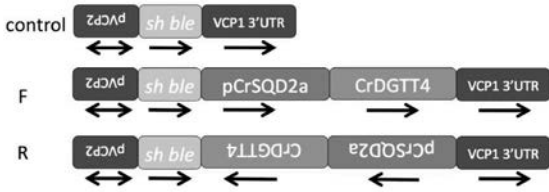
【図3】



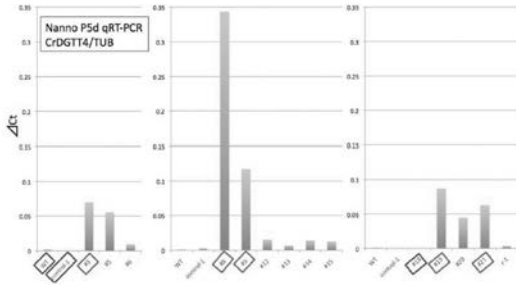
【図4】



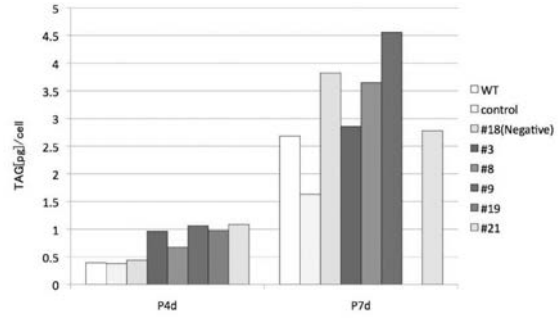
【 図 5 】



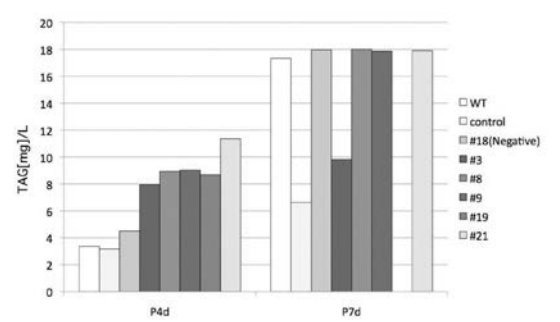
【 図 6 】



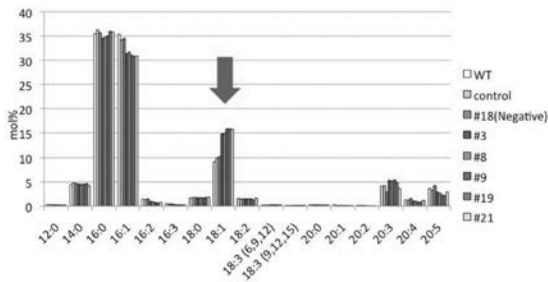
【 図 7 】



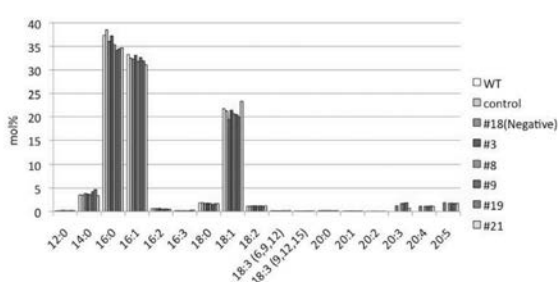
【 図 8 】



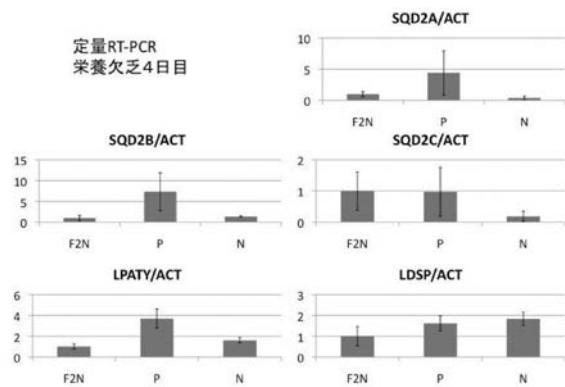
【 図 9 】



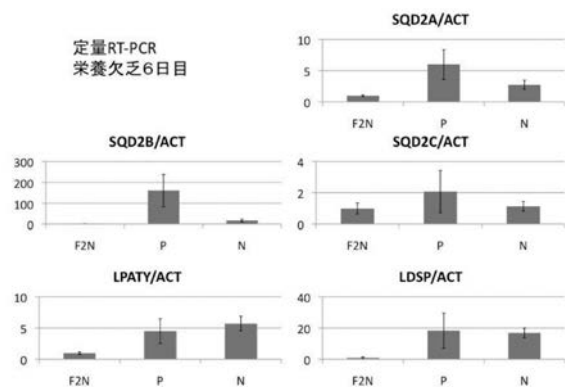
【 図 10 】



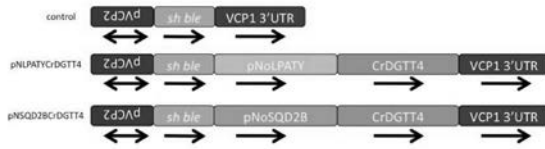
【 図 11 】



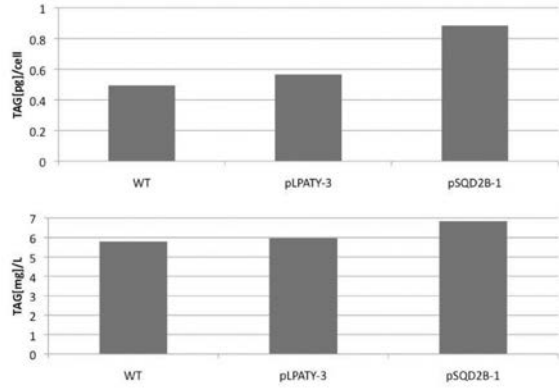
【 図 12 】



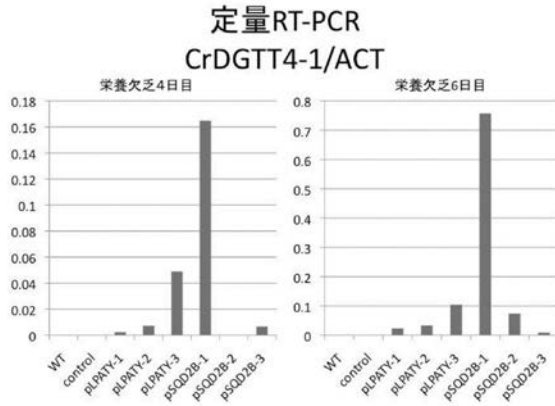
【 図 1 3 】



【 図 1 5 】



【 図 1 4 】



【 配列表 】

2015137449000001.app

【 手続補正書 】

【 提出日 】 平成28年9月26日 (2016.9.26)

【 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 】

藻類（但し、クラミドモナス・レインハーディに属する藻類を除く）に以下の（1）及び（2）を含むコンストラクトを導入することを特徴とするトリアシルグリセロール高生産性藻類の作製法、

（1）トリアシルグリセロール合成酵素遺伝子、

（2）トリアシルグリセロール合成酵素遺伝子の上流に配置されるリン欠乏応答プロモーター。

【 請求項 2 】

藻類が、ナンノクロコプシス属、シュードコリスチス属、フェオダクチラム属、オステレオコックス属、シアニディオシゾン属、クレブソルミディウム属、クロロキプス属、スピロギラ属、カラ属、コレオケーテ属、クロレラ属、又はフィスチュリフェラ属に属する藻類であることを特徴とする請求項1に記載のトリアシルグリセロール高生産性藻類の作製法。

【 請求項 3 】

リン欠乏応答プロモーターが、SQD2遺伝子のプロモーターであることを特徴とする請求

項 1 又は 2 に記載のトリアシルグリセロール高生産性藻類の作製法。

【請求項 4】

トリアシルグリセロール合成酵素遺伝子が、DGAT2 遺伝子であることを特徴とする請求項 1 乃至 3 のいずれか一項に記載のトリアシルグリセロール高生産性藻類の作製法。

【請求項 5】

トリアシルグリセロール合成酵素遺伝子が、DGTT4 遺伝子であることを特徴とする請求項 1 乃至 3 のいずれか一項に記載のトリアシルグリセロール高生産性藻類の作製法。

【請求項 6】

藻類が、ナンノクロロプシス属に属する藻類であることを特徴とする請求項 1 乃至 5 のいずれか一項に記載のトリアシルグリセロール高生産性藻類の作製法。

【請求項 7】

コンストラクトが、トリアシルグリセロール合成酵素遺伝子の下流に配置され、コンストラクトを導入しようとする藻類と同種の藻類に由来する遺伝子の 3' 非翻訳領域を含むことを特徴とする請求項 1 乃至 6 のいずれか一項に記載のトリアシルグリセロール高生産性藻類の作製法。

【請求項 8】

以下の (1) 及び (2) を含むコンストラクトが導入されていることを特徴とするトリアシルグリセロール高生産性藻類 (但し、クラミドモナス・レインハーディに属する藻類を除く)、

(1) トリアシルグリセロール合成酵素遺伝子、

(2) トリアシルグリセロール合成酵素遺伝子の上流に配置されるリン欠乏応答プロモーター。

【請求項 9】

藻類が、ナンノクロロプシス属、シュードコリスチス属、フェオダクチャム属、オステレオコックス属、シアニディオシゾン属、クレブソルミディウム属、クロロキプス属、スピロギラ属、カラ属、コレオケーテ属、クロレラ属、又はフィスチュリフェラ属に属する藻類であることを特徴とする請求項 8 に記載のトリアシルグリセロール高生産性藻類。

【請求項 10】

リン欠乏応答プロモーターが、SQD2 遺伝子のプロモーターであることを特徴とする請求項 8 又は 9 に記載のトリアシルグリセロール高生産性藻類。

【請求項 11】

トリアシルグリセロール合成酵素遺伝子が、DGAT2 遺伝子であることを特徴とする請求項 8 乃至 10 のいずれか一項に記載のトリアシルグリセロール高生産性藻類。

【請求項 12】

トリアシルグリセロール合成酵素遺伝子が、DGTT4 遺伝子であることを特徴とする請求項 8 乃至 10 のいずれか一項に記載のトリアシルグリセロール高生産性藻類。

【請求項 13】

藻類が、ナンノクロロプシス属に属する藻類であることを特徴とする請求項 8 乃至 12 のいずれか一項に記載のトリアシルグリセロール高生産性藻類。

【請求項 14】

コンストラクトが、トリアシルグリセロール合成酵素遺伝子の下流に配置され、コンストラクトを導入しようとする藻類と同種の藻類に由来する遺伝子の 3' 非翻訳領域を含むことを特徴とする請求項 8 乃至 13 のいずれか一項に記載のトリアシルグリセロール高生産性藻類。

【請求項 15】

請求項 8 乃至 14 のいずれか一項に記載のトリアシルグリセロール高生産性藻類をリン欠乏条件下で培養し、藻類細胞中にトリアシルグリセロールを蓄積させ、蓄積したトリアシルグリセロールを採取することを特徴とするトリアシルグリセロールの製造方法。

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2015/057302
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> A01H1/00(2006.01)i, A01H5/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12P7/64 (2006.01)i  According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A01H1/00, A01H5/00, C12N15/09, C12P7/64  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAPLUS/MEDLINE/WPIDS/BIOSIS (STN)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2001-512977 A (Performance Plants Inc.), 28 August 2001 (28.08.2001), & US 5922564 A & WO 1998/038295 A1 & EP 973884A	1-19
Y	WO 2011/156520 A2 (GREEN PACIFIC BIOLOGICALS, INC.), 15 December 2011 (15.12.2011), & US 2014/0030771 A1	1-19
Y	LA RUSSA M. et al., Functional analysis of three type-2 DGAT homologue genes for triacylglycerol production in the green microalga Chlamydomonas reinhardtii, J. Biotechnol., 2012, vol.162, no.1, p.13-20	1-19
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 05 June 2015 (05.06.15)		Date of mailing of the international search report 16 June 2015 (16.06.15)
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/JP2015/057302

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CAKMAK Z. E. et al., Induction of triacylglycerol production in <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> : comparative analysis of different element regimes, <i>Bioresour. Technol.</i> , Epub 2013.12.31, vol.155, p.379-87	1-19
P,X	JP 2014-068638 A (Tokyo Institute of Technology), 21 April 2014 (21.04.2014), (Family: none)	14-19
P,X	WO 2015/029997 A1 (Tokyo Institute of Technology), 05 March 2015 (05.03.2015), (Family: none)	14-19
P,X	IWAI M. et al., Enhancement of extraplastidic oil synthesis in <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> using a type-2 diacylglycerol acyltransferase with a phosphorus starvation--inducible promoter, <i>Plant Biotechnol. J.</i> , 2014.06, vol.12, no.6, p.808-19	14-19
P,X	Masako IWAI et al., "Sorui ni Okeru Rin Ketsubo Otosei Promoter o Mochiita Shishitsu Chikuseki Kyoka", Proceedings of the 78th Annual Meeting of the Botanical Society of Japan, 01 September 2014 (01.09.2014), vol.78th, page 162, 1pF02	14-19
P,X	Masako IWAI et al., "Ryokuso <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> Yurai no Rin Ketsubo Otosei Promoter o Mochiita Shishitsu Chikuseki Kyoka", Proceedings of the 56th Annual Meeting of the Japanese Society of Plant Physiologists, 09 March 2015 (09.03.2015), vol.56th, page 129, 1aC05	14-19
P,X	Masako IWAI et al., "Ryokuso <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ni Okeru Rin Ketsubo Otosei Promoter o Mochiita Shishitsu Chikuseki Kyoka", Proceedings of the 55th Annual Meeting of the Japanese Society of Plant Physiologists, 11 April 2014 (11.04.2014), vol.55th, page 362, PL147	14-19
A	JP 2012-007146 A (Tokyo Institute of Technology), 12 January 2012 (12.01.2012), & WO 2011/149068 A1	1-19

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 5 / 0 5 7 3 0 2	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A01H1/00(2006.01)i, A01H5/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12P7/64(2006.01)i			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A01H1/00, A01H5/00, C12N15/09, C12P7/64			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
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/WPIDS/BIOSIS (STN)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	
Y	JP 2001-512977 A (パフォーマンス プランツ, インコーポレイテッド) 2001.08.28, & US 5922564 A & WO 1998/038295 A1 & EP 973884 A	1-19	
Y	WO 2011/156520 A2 (GREEN PACIFIC BIOLOGICALS, INC.) 2011.12.15, & US 2014/0030771 A1	1-19	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> 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		の日の後に公表された文献	
「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		「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	
「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		「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	
「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)		「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	
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」同一パテントファミリー文献	
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願			
国際調査を完了した日 05.06.2015		国際調査報告の発送日 16.06.2015	
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) 松田 芳子	4 B 3 1 2 6
		電話番号 03-3581-1101 内線 3448	



国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 5 / 0 5 7 3 0 2
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	LA RUSSA M. et al., Functional analysis of three type-2 DGAT homologue genes for triacylglycerol production in the green microalga <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> , J. Biotechnol., 2012, vol.162, no.1, p.13-20	1-19
Y	CAKMAK Z. E. et al., Induction of triacylglycerol production in <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> : comparative analysis of different element regimes, Bioresour. Technol., Epub 2013.12.31, vol.155, p.379-87	1-19
P X	JP 2014-068638 A (国立大学法人東京工業大学) 2014.04.21, (ファミリーなし)	14-19
P X	WO 2015/029997 A1 (国立大学法人東京工業大学) 2015.03.05, (ファミリーなし)	14-19
P X	IWAI M. et al., Enhancement of extraplasmidic oil synthesis in <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> using a type-2 diacylglycerol acyltransferase with a phosphorus starvation--inducible promoter, Plant Biotechnol. J., 2014.06, vol.12, no.6, p.808-19	14-19
P X	岩井雅子 他, 藻類におけるリン欠乏応答性プロモーターを用いた脂質蓄積強化, 日本植物学会第78回大会研究発表記録, 2014.09.01, vol.78th, p.162, 1pF02	14-19
P X	岩井雅子 他, 緑藻 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> 由来のリン欠乏応答性プロモーターを用いた脂質蓄積強化, 第56回日本植物生理学会年会要旨集, 2015.03.09, vol.56th, p.129, 1aC05	14-19
P X	岩井雅子 他, 緑藻 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> におけるリン欠乏応答性プロモーターを用いた脂質蓄積強化, 第55回日本植物生理学会年会要旨集, 2014.04.11, vol.55th, p.362, PL147	14-19
A	JP 2012-007146 A (国立大学法人東京工業大学) 2012.01.12, & WO 2011/149068 A1	1-19

## フロントページの続き

(51) Int. Cl. F I テーマコード (参考)

C 1 2 R	1:89
C 1 2 P	7/64
C 1 2 R	1:89

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(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), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), 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

(出願人による申告) 平成 25 年度、独立行政法人科学技術振興機構、戦略的創造研究推進事業チーム型研究 (CREST)、 「藻類・水圏微生物の機能解明と制御によるバイオエネルギー創成のための基盤技術の創出」、 「植物栄養細胞をモデルとした藻類脂質生産系の戦略的構築」、 「栄養飢餓による脂質蓄積機構解明と脂質高生産系構築」、 産業技術力強化法第 19 条の適用を受ける特許出願

(72) 発明者 下嶋 美恵

東京都目黒区大岡山 2 - 1 2 - 1 国立大学法人東京工業大学内

F ターム(参考) 4B064 AD85 CA02 CA11 CA19 CC09 CC24 DA10 DA20

4B065 AA83X AA83Y AB01 AC14 BA03 BB31 CA13 CA41 CA60

(注) この公表は、国際事務局 (WIPO) により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願 (日本語実用新案登録出願) の国際公開の効果は、特許法第 184 条の 10 第 1 項 (実用新案法第 48 条の 13 第 2 項) により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。