

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-524816

(P2013-524816A)

(43) 公表日 **平成25年6月20日 (2013.6.20)**

(51) Int.Cl.	F I			テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/00	Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 N 1/13 (2006.01)	C 1 2 N	1/13		4 B O 6 4
C 1 2 P 7/64 (2006.01)	C 1 2 P	7/64		4 B O 6 5
C 1 2 R 1/89 (2006.01)	C 1 2 P	7/64		
	C 1 2 R	1:89		
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 20 頁)				

(21) 出願番号 特願2013-506324 (P2013-506324)
 (86) (22) 出願日 平成23年4月22日 (2011.4.22)
 (85) 翻訳文提出日 平成24年12月25日 (2012.12.25)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2011/033585
 (87) 国際公開番号 W02011/133866
 (87) 国際公開日 平成23年10月27日 (2011.10.27)
 (31) 優先権主張番号 61/326,979
 (32) 優先日 平成22年4月22日 (2010.4.22)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 502458132
 セネスコ テクノロジーズ, インコーポレ
 イティド
 アメリカ合衆国, ニュージャージー 08
 901, ニュー ブルンズウィック, スイ
 ート 420, ジョージ ストリート 3
 03
 (74) 代理人 100107456
 弁理士 池田 成人
 (74) 代理人 100148596
 弁理士 山口 和弘
 (74) 代理人 100123995
 弁理士 野田 雅一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 油の発現が増強された遺伝子導入藻類

(57) 【要約】

本発明は、増大した量の油を産生する遺伝子導入藻類細胞、遺伝子導入藻類細胞を作製する方法、及びバイオ燃料を遺伝子導入藻類細胞から得る方法を提供する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒブシンを含有するタンパク質を過剰発現し、対応する天然の藻類細胞によって産生される油の量と比べて増大した量の油を産生する遺伝子導入藻類細胞。

【請求項 2】

真核生物翻訳開始因子 5 A (e I F - 5 A) を過剰発現する、請求項 1 に記載の遺伝子導入藻類細胞。

【請求項 3】

e I F - 5 A は、配列番号 3 と少なくとも 8 5 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 2 に記載の遺伝子導入藻類細胞。

10

【請求項 4】

プロモーターに作動可能に連結した e I F - 5 A をコードする核酸を含む構築体を含む、請求項 2 に記載の遺伝子導入藻類細胞。

【請求項 5】

プロモーターはサッカロミセスセレピシエ解糖系酵素プロモーターである、請求項 4 に記載の遺伝子導入藻類細胞。

【請求項 6】

構築体は、配列番号 1 に記載の配列を有する核酸を含む、請求項 4 に記載の遺伝子導入藻類細胞。

【請求項 7】

デオキシヒブシンシンターゼ (D H S) を過剰発現する、請求項 1 に記載の遺伝子導入藻類細胞。

20

【請求項 8】

D H S は、配列番号 4 と少なくとも 8 5 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 7 に記載の遺伝子導入藻類細胞。

【請求項 9】

プロモーターに作動可能に連結したトマト D H S をコードする核酸を含む構築体を含む、請求項 7 に記載の遺伝子導入藻類細胞。

【請求項 10】

プロモーターはサッカロミセスセレピシエ解糖系酵素プロモーターである、請求項 9 に記載の遺伝子導入藻類細胞。

30

【請求項 11】

構築体は、配列番号 2 に記載の配列を有する核酸を含む、請求項 9 に記載の遺伝子導入藻類細胞。

【請求項 12】

D H S をさらに過剰発現する、請求項 2 に記載の遺伝子導入藻類細胞。

【請求項 13】

サッカロミセスセレピシエ解糖系酵素プロモーターに作動可能に連結したトマト D H S をコードする核酸を含む構築体をさらに含む、請求項 4 に記載の遺伝子導入藻類細胞。

【請求項 14】

配列番号 2 に記載の配列を有する核酸を含む構築体をさらに含む、請求項 6 に記載の遺伝子導入藻類細胞。

40

【請求項 15】

油を製造する方法であって、バイオリクター中、油を産生する条件下で、かつ油を産生するのに十分な時間、請求項 1 に記載の遺伝子導入藻類細胞を増殖させるステップと、遺伝子導入藻類細胞から油を回収するステップと、を含む方法。

【請求項 16】

バイオディーゼル燃料を製造する方法であって、バイオリクター中、油を産生する条件下で、かつ油を産生するのに十分な時間、請求項 1 に記載の遺伝子導入藻類細胞を増殖させるステップと、遺伝子導入藻類細胞から油を回収するステップと、回収した油をバイ

50

オディーゼル燃料に加工するステップと、を含む方法。

【請求項 17】

対応する天然の藻類細胞によって産生される油の量と比べて増大した量の油を産生する遺伝子導入藻類細胞を作製する方法であって、プロモーターに作動可能に連結した e I F - 5 A をコードする核酸を含む e I F - 5 A 構築体を得るステップと、構築体を用いて藻類細胞を形質転換するステップと、藻類細胞の増殖が可能な条件下で、かつ藻類細胞が増殖するのに十分な時間、形質転換された藻類細胞を培養するステップと、藻類細胞を回収するステップと、を含む方法。

【請求項 18】

藻類細胞を形質転換するステップの前に、プロモーターに作動可能に連結した D H S をコードする核酸を含む D H S 構築体を得るステップと、D H S 構築体及び e I F - 5 A 構築体の両方を用いて藻類細胞を形質転換するステップと、をさらに含む、請求項 17 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【背景】

【0001】

[0001]再生可能エネルギーの持続可能な生産は、政府及び産業の重要な目標となってきた。主に食用作物から生産された第1世代のバイオ燃料は、バイオ燃料生産、気候変化の緩和及び経済成長の目標を達成する能力が限られている (Mata (2010) Renewable and Sustainable Energy Reviews 14: 217~232)。したがって、藻類を含む非原料から生産される第2世代のバイオ燃料への関心が増している。最も一般的なバイオ燃料は、現代の自動車において車のエンジンを少しの変更で又は全く変更しないでそれぞれディーゼル及びガソリンに取って替わることができるバイオディーゼル及びバイオエタノールである。バイオディーゼル及びバイオエタノールはまた、既存の技術を使用して生産でき、かつ利用可能な配給システムを通して配給することができる。藻類は、油の産生だけでなく、1ヘクタール当たりのエネルギー収量が高いう利点も有し、農地を必要とせず、汚染防止、特に排出CO₂及び他の温室効果ガスの生物学的隔離、又は排水処理と組み合わせることができる (Mata (2010) Renewable and Sustainable Energy Reviews 14: 217~232)。バイオ燃料生産のために藻類を使用することの主要な制約はコストである。藻類の大規模培養は、最大の増殖をもたらす、その結果油の回収が最大になるように、慎重に制御された条件及び最適な養育環境を有さなければならない。排出された燃焼ガスからのCO₂隔離又は排水改善プロセスなどの汚染防止及び/又は他のプロセス産業に適用される高価値化合物の抽出を組み込むためのシステムを設けることは、経済力を高める。

【0002】

[0002]植物及び動物では、真核生物翻訳開始因子5A (e I F - 5 A)、デオキシヒプシンシンターゼ (D H S) 及びデオキシヒプシンヒドロキシラーゼ (D H H) は、細胞増殖及び細胞死において重要な役割を果たしている。植物では、e I F - 5 A 又は D H S のいずれかの発現が改変されると、速く成長して、油の組成に変化がないまま、全体的により大きい植物と種子生産の増大をもたらす (Wang (2005) Physiologia Plantarum 124: 493~503)。植物における改変された e I F - 5 A 又は D H S 発現の別の正の効果は、広範囲のストレスに耐える又は広範囲のストレスから回復する植物の能力である (Wang (2001) J. Biol. Chem. 276: 17541~17549、(2003) Plant Mol. Biol. 52: 1223~1235、(2005) Physiologia Plantarum 124: 493~503)。藻類は、バイオディーゼルのための油を生産するのに理想的な生物であり、これらの遺伝子のいずれか又は両方の改変された発現が細胞数の増大をもたらせば、油の組成が維持されたまま油産生が増大することにもなるであろう。藻類をバイオ燃料生産のために使用する際に重要な要素の1つは、最大の藻類増殖を維持するため

10

20

30

40

50

に増殖条件の慎重なモニタリングを必要とする大規模バイオリクターの使用である。これらの条件におけるいかなる変更も「ストレス」環境をもたらすことになり、したがって藻類の増殖速度に悪影響を与えることになる。ストレスに耐えることができる又はストレスを与えられた後に速く回復できる藻類を有することは生産力を増大させ、したがって油の生産コストをより市場性の高いレベルに低減させることができる。

【発明の概要】

【0003】

[0003]本発明は、対応する天然の藻類細胞によって産生される油の量と比べて増大した量の油を産生する遺伝子導入藻類細胞を提供する。遺伝子導入藻類細胞は、ヒブシンを含有するタンパク質を過剰発現する。遺伝子導入藻類細胞は、真核生物翻訳開始因子5A (eIF-5A)、デオキシヒブシンシンターゼ(DHS)、デオキシヒブシンヒドロキシラーゼ(DHH)又はそれらの組み合わせを過剰発現することができる。

10

【0004】

[0004]eIF-5Aタンパク質は任意の供給源から得ることができる。eIF-5Aタンパク質は、配列番号4と少なくとも85%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含んでもよい。eIF-5Aタンパク質は、ポプラeIF-5Aタンパク質又は任意の他の植物eIF-5Aタンパク質であってもよい。eIF-5Aタンパク質は、配列番号4に記載のアミノ酸配列を含んでもよい。

【0005】

[0005]DHSタンパク質は任意の供給源から得ることができる。DHSは、配列番号6と少なくとも85%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。DHSタンパク質は、トマトDHSタンパク質又は任意の他の植物DHSタンパク質であってもよい。DHSタンパク質は、配列番号6に記載のアミノ酸配列を含んでもよい。

20

【0006】

[0006]DHHは、配列番号8と少なくとも85%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。DHHタンパク質は、配列番号8を有するアミノ酸配列を含んでもよい。いくつかの実施形態では、DHHは、配列番号7を含むヌクレオチド配列によってコードされている。

【0007】

[0007]本発明は、対応する天然の藻類細胞と比べて増大した量の油を産生する遺伝子導入藻類細胞を作製する方法を提供する。この方法は、ヒブシンを含有する1種又は複数のタンパク質をコードする或いはヒブシンを含有するタンパク質の発現又は合成に關与する1種又は複数の構築体を得るステップと、1種又は複数の構築体を用いて藻類細胞を形質転換して、遺伝子導入藻類細胞を得るステップと、バイオリクター中、油を産生する条件下で、かつ油を産生するのに十分な時間、遺伝子導入藻類細胞を培養するステップと、遺伝子導入藻類細胞から油を回収するステップと、を含む。

30

【0008】

[0008]藻類細胞は、2種以上の構築体を用いて形質転換させてもよく、それぞれの構築体は、eIF-5A、DHS又はDHHをコードする核酸を含んでもよい。藻類細胞は、eIF-5Aをコードする核酸を含む構築体及びDHSをコードする核酸を含む構築体を用いて形質転換してもよい。したがって、遺伝子導入藻類細胞は、eIF-5A及びDHSをコードする構築体を含み、eIF-5A及びDHSを過剰発現してもよい。

40

【0009】

[0009]本発明は、eIF-5A、DHS、DHH又はそれらの組み合わせを発現するための構築体を提供する。構築体は、eIF-5Aをコードする核酸、DHSをコードする核酸及びDHHをコードする核酸からなる群から選択される2種以上の核酸の組み合わせを含んでもよい。

【0010】

[0010]構築体は、プロモーターに作動可能に連結したeIF-5A、DHS又はDHHをコードする核酸を含んでもよい。プロモーターは、サッカロミセスセレビシエ(Sac

50

charomyces cerevisiae) 解糖系酵素プロモーターであってもよい。構築体は、配列番号 1、配列番号 2 に記載の配列を有する核酸を含んでもよい。

【0011】

[0011]本発明は、バイオディーゼル燃料を製造する方法であって、バイオリクター中、油を産生する条件下で、かつ油を産生するのに十分な時間、ヒブシンを含有するタンパク質を過剰産生する遺伝子導入藻類細胞を増殖させるステップと、遺伝子導入藻類細胞から油を回収するステップと、回収した油をバイオディーゼル燃料に加工するステップと、を含む方法を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図 1】開始 4 日後の T0 株スクリーニングデータ (75% N - P - K 栄養素、3 反復 / 株、30% 遮光の振盪機、120 rpm)、75% BBM における対照に対する増殖速度の増加率 (%) を示す。(A) 上: pPGK: PdF5A3cDNA - tNos 構築体 (PF) (配列番号 1)。(B) 下: pPGK: PdF5A3cDNA - tNos + pPGK: TDHS - tTEF1 二重構築体 (FD) (配列番号 2)。

【図 2】CO₂ 飽和及び空気回復を示す。CO₂ での 24 時間バブリング、続いて空気での 24 時間バブリング、100 μMol 光、3 反復 / 株、100% BBM。構築体は、PF (PGK: PdF5A) 及び FD (PGK: PdF5A + PGK: TDHS) である。

【図 3】バイオリクター及び培地の次の処方を使用した株スクリーニングデータを示す。4 × マクロ、2 × N、2 × マイクロ、24 時間増殖、プラス 60% CO₂、130 μMol 光 (3 反復 / 実験)。

【図 4】バイオリクター中で 24 時間増殖させた後の 4 × マクロ、2 × N、2 × マイクロ、プラス 60% CO₂、130 μMol 光 (3 反復 / 実験) における藻類の油産生を示す。

【図 5】バイオリクター中で 72 時間増殖させた後の 10 × マクロ、2 × N、2 × マイクロ、プラス 60% CO₂、130 μMol 光 (3 反復 / 実験) における藻類の油産生を示す。

【0013】

[0013]表 1 は、(A) ポブラ eIF - 5A3 及び他の植物由来の eIF - 5A に関するアミノ酸配列アライメント及びヌクレオチド配列アライメント、並びに (B) トマト DHS 及び他の植物由来の DHS に関するアミノ酸配列アライメント及びヌクレオチド配列アライメントからの配列同一性の値を示す。

【発明の詳細な説明】

【0014】

[0014]本発明は、遺伝子導入藻類細胞におけるポブラ増殖因子 5A (eIF - 5A) の過剰発現はより速い藻類細胞の増殖及び分裂をもたらし、次いでこれにより、培養ごとに産生される油の総量の増大がもたらされるという知見に一部基づいている。遺伝子導入藻類細胞から回収された油の総量は、細胞数の増大だけに起因し得るものを超える。したがって、本発明はまた、eIF - 5A を単独で又はデオキシヒブシンシンターゼ (DHS) と併せて過剰発現する遺伝子導入藻類細胞が、1 細胞当たりより多くの油を含有するという知見に一部基づいている。

【0015】

[0015]本発明は、ヒブシンを含有するタンパク質を過剰発現する遺伝子導入藻類細胞を提供する。ヒブシンを含有するタンパク質は eIF - 5A であってもよい。遺伝子導入藻類細胞は、DHS 及び DHH などの、eIF - 5A を含有するタンパク質の合成、発現、又は翻訳後に関与する酵素を過剰発現することができる。遺伝子導入藻類細胞は、eIF - 5A、DHS、DHH 又はそれらの組み合わせを過剰発現することができる。本発明の遺伝子導入藻類細胞は原核藻類細胞及び真核藻類細胞の両方を包含する。本発明の遺伝子導入藻類細胞を作製するための藻類細胞は任意の藻類細胞であってもよい。藻類細胞は、紅藻植物 (Rhodophyta)、緑藻植物 (Chlorophyta)、藍藻植物 (

10

20

30

40

50

Cyanophyta) 及び褐藻植物 (Phaeophyta) からなる門から選択されてもよい。藻類の例には、クラミドモナス属 (Chlamydomonas) に属するクラミドモナスラインハルディ (Chlamydomonas reinhardtii)、クラミドモナスモエブシ (Chlamydomonas moewusii)、クラミドモナス属の種の MGA161 株、クラミドモナスユーゲメタス (Chlamydomonas eugametos)、及びクラミドモナスセグニス (Chlamydomonas segnis); クロレラ属 (Chlorella) に属するクロレラブルガリス (Chlorella vulgaris); セネデスムス属 (Senedesmus) に属するセネデスムスオブリガス (Senedesmus obliquus) 及びセネデスムスアクタス (Senedesmus acutus); デュナリエラ属 (Dunaliella) に属するデュナリエラテルトロレクタ (Dunaliella tertrelecta); アナベナ属 (Anabaena) に属するアナベナバリアピリス (Anabaena variabilis) ATCC 29413; シアノテセ属 (Cyanothecae) に属するシアノテセ属の種の ATCC 51142; シネノコッカス属 (Synechococcus) に属するシネノコッカス属の種の PCC 7924; 並びにアナシステイス (Anacystis) 属に属するアナシステイスニデュランス (Anacystis nidulans) が含まれるが、これらに限定されない。

10

【0016】

[0020] 本発明の藻類細胞は、eIF-5A、DHS、DHH 又はそれらの組み合わせをコードする外因性核酸を用いて形質転換させてもよい。eIF-5A、DHS 及び DHH は、任意の供給源由来であってもよい。eIF-5A、DHS 及び DHH の供給源は、植物、菌類又は動物供給源であってもよい。植物は、シロイヌナズナ (Arabidopsis thaliana) (At1)、アルファルファ、バナナ、カーネーション、キャノーラ、トウモロコシ、レタス、コメ、ジャガイモ、ポプラ、トマト又はタバコであってもよい。植物 eIF-5A の異なるアイソフォームがあってもよい。例えば、表 1 は、トマト eIFA5 の異なる 4 つのアイソフォーム、ジャガイモ eIFA5 の異なる 5 つのアイソフォーム、ポプラ eIFA5 の異なる 4 つのアイソフォームなどを示す。菌類は、酵母菌、カビ、粘菌又はアカパンカビ (Neurospora crassa) であってもよい。

20

【0017】

[0021] eIF-5A は種々の供給源由来であってもよく、配列番号 4 に対して少なくとも 60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 又は 99% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。eIFA はポプラ eIFA アイソフォーム 3 (eIF-5A3) であってもよく、配列番号 3 又はその機能的断片を含んでもよい。eIF-5A は、デフォルトパラメーターを使用した配列アライメントプログラムによって決定される、配列番号 4 と少なくとも 85% の配列同一性を有してもよい。

30

【0018】

[0022] DHS は種々の供給源由来であってもよく、配列番号 4 に対して少なくとも 45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 又は 99% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。DHS は、配列番号 6 又はその機能的断片を含んでもよい。DHS は、デフォルトパラメーターを使用した配列アライメントプログラムによって決定される、配列番号 6 と少なくとも 85% の配列同一性を有してもよい。

40

【0019】

[0023] DHH は種々の供給源由来であってもよく、配列番号 8 に対して少なくとも 45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 又は 99% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。DHH は、配列番号 8 又はその機能的断片を含んでもよい。DHH は、デフォルトパラメーターを使用した配列アライメントプログラムによって決定される、配列番号 8 と少なくとも

50

85%の配列同一性を有してもよい。

【0020】

[0024] eIF-5A、DHS又はDHHをコードする核酸は、構築体を用いて藻類細胞に導入することができる。eIF-5A、DHS又はDHHをコードする核酸は構築体内に存在してもよい。構築体は、調節エレメントに作動可能に連結しているeIF-5A、DHS又はDHHをコードする核酸を含んでもよい。調節エレメントは、eIF-5A、DHS又はDHHの発現を制御するプロモーターであってもよい。プロモーターは、サッカロミセスセレピシエ解糖系酵素プロモーターであってもよい。

【0021】

[0025] 構築体を含むことができる他の調節エレメントには、ターミネーター、所望の細胞を選択するためのマーカー、エンハンサー配列、核酸配列の発現を調節する応答エレメント又は誘導エレメントが含まれる。構築体を含むことができる調節エレメントの選択は、それらに限定されないが、複製効率、選択可能性、誘導能、所望の発現レベル、及び細胞又は組織特異性を含むいくつかの要因によって決まる。

10

【0022】

[0026] 作動可能に連結したタンパク質コード化配列の発現を調節するのに使用される発現制御エレメントは当技術分野で既知であり、それらに限定されないが、誘導プロモーター、構成プロモーター、分泌シグナル、及び他の調節エレメントを含む。誘導プロモーターは、宿主細胞の培地中の栄養素に応答性であるなど、容易に制御されることが好ましい。

20

【0023】

[0027] eIF-5A、DHS又はDHHをコードする核酸が作動可能に連結したベクター及び/又は発現制御配列の選択は、所望の機能特性、例えばタンパク質発現、及び形質転換させる宿主細胞によって直接決まる。本発明によって意図されるベクターは、藻類細胞中の組換えDNA分子に含まれる構造遺伝子の複製及び好ましくは発現をも誘導することが少なくとも可能である。

【0024】

[0028] 一実施形態では、コード核酸分子を含むベクターは、原核レプリコン、すなわち、それを用いて形質転換された藻類細胞などの原核宿主細胞中の染色体外で自律複製及び組換えDNA分子の維持を導く能力を有するDNA配列を含むことになる。このようなレプリコンは当技術分野でよく知られている。その上、原核レプリコンを含むベクターは、その発現が薬剤耐性などの検出可能なマーカーを付与する遺伝子を含んでもよい。原核レプリコンを含むベクターは、藻類細胞中のコード遺伝子配列の発現(転写及び翻訳)を導くことができる原核又はバクテリオファージプロモーターをさらに含むことができる。

30

【0025】

[0029] 本発明の組換えDNA分子を用いた藻類細胞の形質転換は、使用するベクターのタイプ及び用いる宿主系によって通常決まる周知の方法によって達成される。藻類細胞の形質転換に関しては、電気穿孔法及び塩処理法を用いてもよい。構築体は、例えば、外因性DNA、酸洗浄ビーズ、ポリエチレングリコール及び微粒子銃の存在下で細胞をボルテックスにかけるなど、他の標準的な形質転換法によって藻類に導入することもできる。

40

【0026】

[0030] 本発明の遺伝子導入藻類細胞は油を製造するのに使用できる。遺伝子導入藻類細胞は、バイオリクター中、油を産生する条件下、油を産生するのに十分な時間増殖させることができる。油は、当技術分野で既知の方法によって細胞から回収することができる。遺伝子導入藻類細胞からの油はバイオディーゼル燃料に加工することができる。

【0027】

[0031] さらに説明なしに、当業者は、前述の説明及び以下の例示的な実施例を使用して、本発明を作製及び利用でき、特許請求された方法を実施できると考えられる。以下の実施例は、したがって、本発明の好ましい実施形態を具体的に示したものであり、決して開示の残りを限定するものと見なされるべきではない。

50

【実施例】

【0028】

実施例1（遺伝子導入藻類）：

藻類培養：

[0032] セネデスムスアクタス (S. a.) 及びクロレラブルガリス (C. v.) 細胞を、植物増殖用インキュベーター内、(100 × 10) mm ペトリ皿中、凝固BBM培地 (Stein (1973) (編) Handbook of Phycological methods. Culture methods and growth measurements. Cambridge University Press) 上で、16 h 明 (100 μmol m⁻² s⁻¹ 光合成有効放射) / 8 時間暗期を用いて 21 で増殖させ、かつ維持した。遺伝子導入株を、植物増殖チャンパー内で、液体BBM培地を含む 25 mm ガラス製試験管中、16 h (100 μmol m⁻² s⁻¹ 光合成有効放射) / 8 h の明暗サイクルを用いて、120 rpm での振盪機上、21 の温度で増殖させた。OD600 が 0.01 になるように細胞を希釈し、振盪機上に戻して、遺伝子導入株の増殖速度の促進が示されたかどうかを判定した。増殖速度は、振盪機上で10日を経た後にOD600として測定した。

10

【0029】

[0033] 増殖チャンパー内、蓋付きの 25 mm ガラス製試験管中で、100 μmol m⁻² s⁻¹ 光合成有効放射を用いて 24 h、21 の温度で増殖させた培養物について、CO₂ 濃縮実験を最初に行なった。CO₂ (100%) は、先端が各試験管の底に配置された 25 ゲージ針に接続された 1 cc 注射器の切断端にはめられた Tygon チューブを通して、それぞれ個々の試験管にバブリングされた。

20

【0030】

[0034] #3 ゴム栓がそれぞれの首部にはめられた 200 ml ガラス製四角瓶 (Kimax) からなる小規模バイオリクターを開発した。栓には穴が2つあり、一方には切断された 1 cc 注射器を取り付け、その注射器に CO₂ を供給する Tygon チューブを挿入し、他方の穴には、綿栓を含む 1 ml プラスチック製ピペット (Fisher Scientific Canada) の 3 cm の後端部 (plugged end) を取り付けた。これは、リアクター内の圧力上昇を防ぐために通気孔として使用された。バイオリクターは、4.0 の OD600 での藻類細胞 20 ml で開始された。瓶は、70 rpm での回転振盪機上の植物増殖チャンパー内に 24 時間明下で、130 μMol 及び 21 で置かれた。3 L / 分で流れる空気と 2 L / 分で流れる 100% CO₂ とを混合して、約 60% CO₂ 濃縮をもたらすことによって、炭素濃縮を達成した。

30

【0031】

プラスミド構築体及び菌株：

1. pBI-PGKF5A 構築体 (PF)

[0035] ポプラ eIF-5A3 cDNA ヌクレオチド配列は配列番号 3 に示されており、アミノ酸配列は配列番号 4 に示されている。翻訳開始コドンは、ヌクレオチド 48 から始まり、停止コドンは、ヌクレオチド 525 から始まる。サッカロミセスセレピシエ解糖系酵素プロモーター、PGK1 は、SalI 制限部位を含む上流プライマー：5' - GTCTACAGGCATTTGCAAGAATTACTCG - 3' (配列番号 9) 及び BamHI 制限部位を含む下流プライマー：5' - GGATCCTGTTTTATATTTGTTGTA AAAAGTAG - 3' (配列番号 10) を用いて PCR によって増幅された (Kong (2006) Biotechnol. Lett 28: 2033 ~ 2038)。PGK1 プロモーターの PCR 産物を、SalI 及び BamHI 部位を含む pBI101 ベクターに連結した (pBI-PGK と命名した)。

40

【0032】

[0036] PdeIF-5A1、PdeIF-5A2、PdeIF-5A3 及び PdeIF-5A4 と命名された 4 つの異なる完全長 PdeIF-5A cDNA は、AteIF-5A1 cDNA を使用してヒロハハコヤナギ (Populus deltoides)

50

の葉の cDNA ライブラリをスクリーニングすることによって単離された。製造業者の取扱説明書に従って Qiagen キットを使用して、葉 mRNA を単離した。製造業者の取扱説明書に従って Stratagene ZAP Express cDNA Synthesis Kit 及び ZAP Express cDNA Gigapack III Gold Cloning Kit を使用して、cDNA ライブラリを調製した。PdeIF-5A1、PdeIF-5A2、PdeIF-5A3 及び PdeIF-5A4 の GenBank アクセション番号は、それぞれ FJ032302、FJ032303、FJ032304 及び FJ032305 である。pBK-CMV ベクター中に 5' - 及び 3' - UTR を含む PdeIF-5A3 完全長 cDNA は、BamHI 及び SacI 制限酵素で消化した。pBI-PGK 中の GUS 遺伝子も BamHI 及び SacI 制限酵素消化によって取り出した。次いで、前消化した PdeIF-5A3 cDNA を前消化した pBI-PGK ベクターと連結して、pBI-PGKF5A (PF) を形成した。PF の最終構築体は、PGK1 - プロモーター : Pdf5A3 - cDNA : Nos - ターミネーター (配列番号 1) を含む。PF ベクターをアグロバクテリウム ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) GV3101 に電気穿孔法によって導入した。

10

【0033】

[0037] pPGK : Pdf5A3 cDNA - tNos 構築体のヌクレオチド配列は、配列番号 1 に示されている。PGK1 プロモーター領域は、ヌクレオチド 1 ~ 737 に存在する。中間領域は、ポブラ eIF-5A3 完全長 cDNA (5' - 及び 3' - UTR を含む) 配列 (ヌクレオチド 738 ~ 1832) である。残りの領域は、Nos ターミネーター (ヌクレオチド 1562 ~ 1832) である。

20

【0034】

2. pBI-PGKFD 構築体 (FD)

[0038] トマト DHS ヌクレオチドコード配列は、配列番号 5 に示されており、アミノ酸配列は、配列番号 6 に示されている。ソラナムリコペルシカム (*Solanum lycopersicum*) + TEF1 - ターミネーター由来の PGK1 - プロモーター + TDHS (トマトデオキシヒプシンシンターゼ) cDNA コード配列を、pBluescript (pBS-KS) ベクター中にサブクローニングした。PGK1 プロモーターは、HindIII 制限部位を含む上流プライマー : 5' - AAGCTTAGGCATTTGC AAGAATTACTCG - 3' (配列番号 11) 及び XhoI 制限部位を含む下流プライマー : 5' - ATCGATTGTTTTATAATTTGTTGTA AAAAGTAG - 3' (配列番号 12) を用いて PCR によって増幅された。TDHS は、Wang (2001) J. Biol. Chem. 276 : 17541 ~ 17549 に記載されているようにクローニングし、XhoI 制限部位を含む上流プライマー : 5' - CTCGAG ATGGGAGAAAGCTCTGAAGTACAG - 3' (配列番号 13) 及び BamHI 制限部位を含む下流プライマー : 5' - GGA TCCCTCAAACTTGGCACCTTATCTGGG (配列番号 14) を用いて PCR によって増幅された。TEF1 ターミネーターは、BamHI 制限部位を含む上流プライマー : 5' - GGATCCTCAGT ACTGACAATAAAAAGATTTCTTG (配列番号 15) 及び ClaI 制限部位を含む下流プライマー : 5' - ATCGATA TCGATACTGGATGGCGGGCGTTAGTATCG - 3' (配列番号 16) を用いて、酵母菌 pFA6a-kanMX6 (Longtine (1998) Yeast 14 : 953 ~ 961) ベクターから PCR によって増幅された。PGK1 プロモーター、TDHS cDNA 及び TEF1 ターミネーターは制限酵素で消化し、pBS-KS ベクター中にサブクローニングした。

30

40

【0035】

[0039] PGK1 : TDHS : TEF1 構築体は、pBS-KS ベクターから HindIII 及び ClaI で消化した。PGK1 : Pdf5A は、ClaI 制限部位を含む上流プライマー : 5' - ATCGATA AAGAATTACTCGTGAAGTAAAGG - 3' (配列番号 17) 及び SacI 制限部位を含む下流プライマー : 5' - GAGCTCTTTT

50

TTTTTTTTTTTTTTTT - 3' (配列番号18)、並びにテンプレートとして pBI-PGKF5A を用いて PCR によって増幅された。次いで PCR 断片は ClaI 及び SacI で消化した。pBI101 を、HindIII 及び SacI ベクターで消化して、GUS 遺伝子を取り出した。次いで PGK1:TDHS:TEF1 (配列番号2) 及び PGK1:PdF5A3 の両方を前消化した pBI101 に連結して、pBI-PGKFD を形成した。pBI-PGKFD は、PGK1:TDHS:TEF1 及び PGK1:PdF5A3:Nos を含む。pBI-PGKFD は、アグロバクテリウム ツメファシエン ス GV3101 に電気穿孔法によって導入した。

【0036】

[0040] pPGK:TDHS-tTEF1 構築体のヌクレオチド配列は、配列番号2に示されている。PGK1プロモーター領域は、ヌクレオチド1~733に存在する。中間領域は、ポブラDHSコード配列(ヌクレオチド734~1879)である。強調された領域は、TEF1ターミネーター(ヌクレオチド1880~2126)である。

【0037】

藻類の形質転換:

[0041] S.a. 及び C.v. は、Kumar (2004) Plant Science 166:731~738 に従って以下の変更を加えて形質転換させた。BBM を増殖培地として使用した。アグロバクテリウム細胞を、2xYT培地中28で終夜増殖させた。抗生物質カナマイシンの代わりにG418を選択剤として使用した。遺伝子導入藻類コロニーは、形質転換から7~10日後に選択培地上に現れた。50コロニーを選択し、G418への耐性を確認するために新鮮な選択プレート上に2回線条接種した。

【0038】

[0042] 遺伝子操作した S.a. 及び C.v. 株を生成し、これらの株は単独で又は TDHS と併せて PdeIF-5A (eIF-5A) の過剰発現を示した。遺伝子導入藻類コロニーは、アグロバクテリウム感染から7~10日後に選択プレート上に現れた。一例として、20株の遺伝子導入株を選択し、液体培養で4日増殖させた後分析して、eIF-5A発現が増加せず、WT株と比べて増殖が増加した株を特定した。試験した20株のうち、eIF-5AをPGK1プロモーターの制御下で過剰発現した12株は、対照株に対して4%~55%の範囲の増殖の増加を示した(図1)。F5A及びDHSの両方を含み、両方ともPGKプロモーターによって駆動される第2の構築体を用いて形質転換した株も試験し、WT株よりも良好に機能して増殖が3%~20%の範囲で増加した株が4株だけもたらされた。これらの実験は、異なる時間に実施されたので、パーセント増加の差は、出発原料の異なる条件又は実験中の増殖条件に起因し得た。したがって、構築体ごとに最も良好な4株を特定し、その後の実験に使用した。

【0039】

実施例2(遺伝子導入藻類細胞の油含有量):

[0043] 藻類細胞の総脂質含有量は、パニリンリン酸反応(sulpho-phospho-vanilin reaction)(Izaard(2003)Jof Microbial Methods 55:411~418)を使用して測定した。遺伝子導入藻類株を作製することの目標は、バイオディーゼルのための油を産生するためにバイオリアクター中でそれらを使用することである。したがって、バイオリアクターの条件を模倣する実験を設計した。一般に、バイオリアクターは、連続光及び藻類細胞の一定の流動にさらされる藻類増殖チャンパー内に100%CO₂をバブリングする。これらの条件をシミュレートするために、個々の藻類株を含む試験管内にCO₂をバブリングするためのCO₂バブラーを開発し、それによって複数の株を同時に同じ増殖条件下で試験することが可能になった。培養を低細胞密度で開始したときに観察されたように、CO₂の添加は必要ではなく、藻類の増殖に有害であることが証明された。連続光及び100%CO₂濃縮で24時間培養された藻類細胞は、増殖しなかったが、定常期のままであった。CO₂濃縮を中断し、空気を培養物内にバブリングした場合、増殖は再開され、PF株5で試験された4遺伝子導入株のうち2株においてより高い増殖速度が観察され、これによりWT

10

20

30

40

50

の増殖速度に対して151%の増加が示された(図2)。この実験は、eIF-5A及び/又はDHSを過剰発現している藻類が、ストレス事象に耐える又はストレス事象からより速く回復することを実証するものであり、ここで、ストレス事象はCO₂濃縮が過度であり、増殖培地における毒性条件をもたらしたことであった。

【0040】

[0044]小規模バイオリアクターを開発した。遺伝子導入株を、バイオリアクター中、CO₂濃縮条件下かつ増大した多量栄養素[リン(P)、カリウム(K)、カルシウム(Ca)、マグネシウム(Mg)及び硫黄(S)]レベルでスクリーニングした。従来の藻類増殖は、BBMなどの培地中で起こる。対照及び遺伝子導入藻類培養物の両方は、多量栄養素レベル(4x)及び微量栄養素レベル(2x、データ示さず)を増大させた培地中で増殖させた場合、より速く増殖し、より多く油を産生する。したがって、遺伝子導入株をこれらの条件下でスクリーニングした。PGK:F5A株の1株及びPGK:F5A-PGK:TDHS株の4株すべては増殖速度の増加を示したこと、並びにこれらの各株は対照株から産生されたものに比して油産生が増大したこと(244~407%増大)が判明した(図3)。油産生をさらに試験するために、2つの遺伝子導入株を選択した。PGK:F5A株8(PF8)及びPGK:F5A-PGK:TDHS株16(FD16)の株を使用してバイオリアクターに播種した。4x多量栄養素と一緒に2x微量栄養素及び2x窒素で24時間増殖させた場合、両方の遺伝子導入株は、同条件下で増殖した対照株よりも著しく多く(それぞれ対照に対して226及び206%増大)油を産生した(図4)。

10

20

【0041】

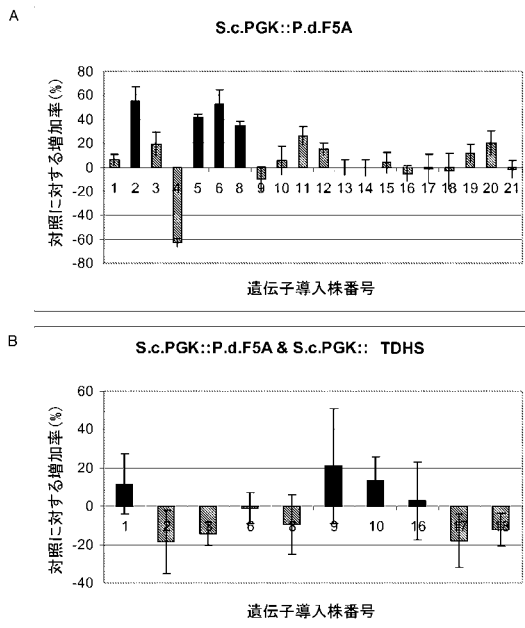
[0045]栄養素レベルを10x多量栄養素、4x窒素及び2x微量栄養素までさらに増大させ、構築体ごとに2つの株をより長期間(72時間)増殖させて、最大量の油を産生するのに最適な栄養素レベルを決定した。これらの条件下で増殖させた場合、遺伝子導入株と対照との間で細胞増殖に差はなかったが、油産生がFD16において著しく増大した(対照の560%増大、図5)。これらのデータは、藻類細胞におけるeIF-5A及び/又はDHSの過剰発現が、細胞増殖の増加及び油産生の増大をもたらすことを裏付ける。

【0042】

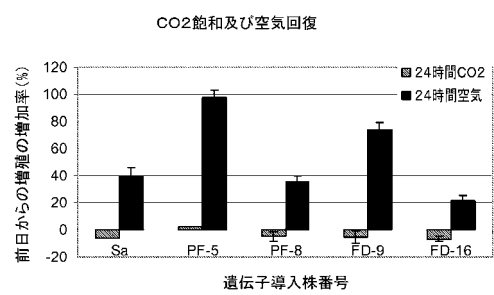
[0046]本発明は上記の実施例を参照して詳細に説明されているが、種々の変更形態が本発明の精神から逸脱することなく実施できることは理解されたい。したがって、本発明は、以下の特許請求の範囲によってのみ限定される。本出願で参照されたすべての引用特許及び刊行物は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれている。

30

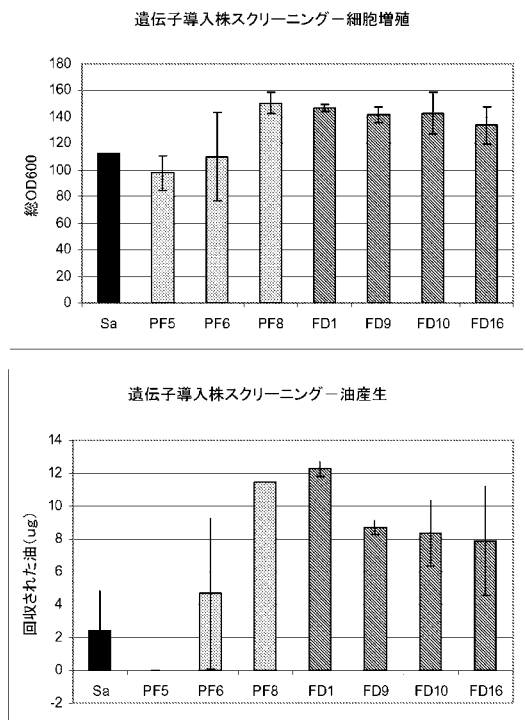
【 図 1 】



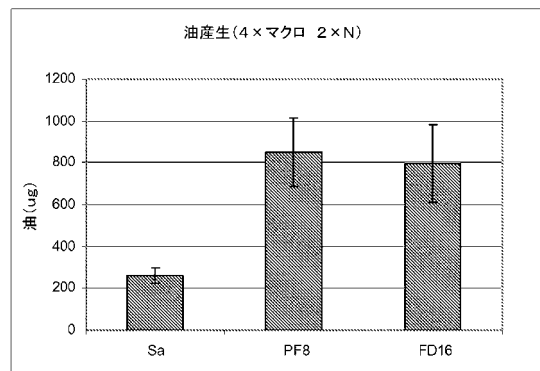
【 図 2 】



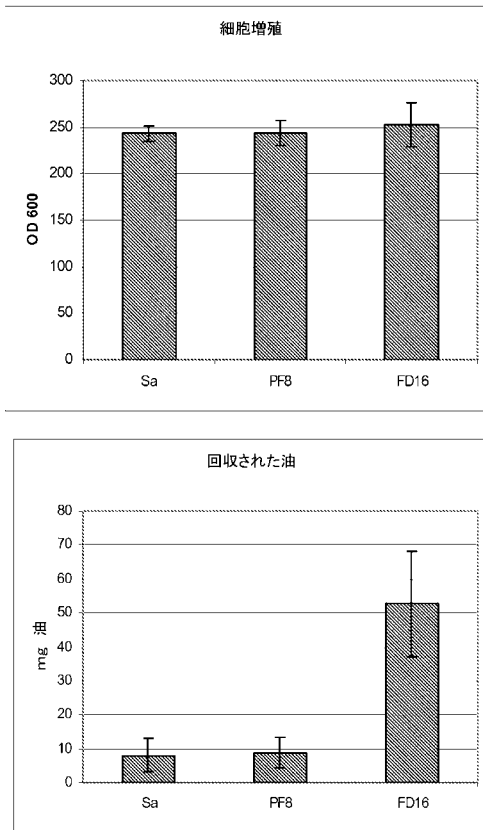
【 図 3 】



【 図 4 】





【 図 5 】



【 配列表 】

2013524816000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2011/033585
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>A01H 13/00(2006.01)i, C12N 1/13(2006.01)i, C12N 15/63(2006.01)i, C12P 7/64(2006.01)i, C11B 1/04(2006.01)i</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) A01H 13/00; C12N 15/29; C12N 15/82		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: hypusine, eIF, modified algae, oil production		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Laura L Beer, et al., "Engineering algae for biohydrogen and biofuel production", Current Opinion in Biotechnology, 2009, Vol. 20, pages 264-271 - See "Progress in metabolic engineering toward biofuel production" and "Metabolic engineering toward enhanced carbon storage" at pages 266-287.	1-18
A	Jonathan Gressel, "Transgenics are imperative for biofuel crops", Plant Science, 2008, Vol. 174, pages 246-263. - See "4. Third generation technologies: algae and cyanobacteria for biofuel production" at pages 258-259.	1-18
A	Byung-Hwan Um & Young-Soo Kim, "Review: A chance for Korea to advance algal-biodiesel technology", Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 2009, Vol. 15, pages 1-7 - See "8. Seeking an efficient strain" at pages 4-5.	1-18
A	Curt R. Fischer, et al. "Selection and optimization of microbial hosts for biofuels production", Metabolic Engineering, 2008, Vol. 10, pages 295-304 - See "3. Biofuels hosts" at pages 299-302.	1-18
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" 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 citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 20 DECEMBER 2011 (20.12.2011)		Date of mailing of the international search report 26 DECEMBER 2011 (26.12.2011)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Cheongsu-ro, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer KIM, JUNG HEE Telephone No. 82-42-481-8191 

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2011/033585

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Qiang Hu, et al., "Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances", The Plant Journal, 2008, Vol. 54, pages 621-639 - See "Microalgal molecular biology and genetic engineering" at page 634.	1-18
A	KR 10-0865256 B1 (SENESCO, INC.) 24 October 2008 - See claims.	1-18
A	KR 10-0861330 B1 (SENESCO, INC.) 01 October 2008 - See claims.	1-18
A	Marianne T. Hopkin, et al., "Eukaryotic Translation Initiation Factor 5A Is Involved in pathogen-Induced Cell Death and Development of Disease Symptoms in Arabidopsis", Plant Physiology, September 2008, Vol. 148, pages 479-489 - See "Abstract" and "Introduction" at pages 479-480.	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2011/033585

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
KR 10-0885256 B1	24.10.2008	AU 2000-59132 A1	22.01.2001
		AU 2000-59132 B2	08.09.2005
		AU 2002-236498 B2	11.10.2007
		AU 2002-36498 A1	11.06.2002
		AU 2004-250254 A1	29.12.2004
		AU 2004-250254 B2	22.09.2011
		AU 2005-311640 A1	08.06.2006
		AU 2005-311640 B2	18.08.2011
		CA 2378326 A1	11.01.2001
		CA 2529838 A1	29.12.2004
		CA 2588330 A1	08.06.2006
		CA 2750854 A1	11.01.2001
		CN 101166826 A0	23.04.2008
		CN 1252273 C0	19.04.2006
		CN 1402790 A0	12.03.2003
		CN 1608134 A	20.04.2005
		CN 1608134 C0	20.04.2005
		CN 1624135 A	08.06.2005
		CN 1624135 B	08.12.2010
		CN 1624135 C0	08.06.2005
		CN 1839154 A0	27.09.2006
		EP 1200612 A2	02.05.2002
		EP 1200612 B1	18.03.2009
		EP 1339858 A2	03.09.2003
		EP 1339858 B1	16.02.2011
		EP 1638997 A2	29.03.2006
		EP 1824982 A2	29.08.2007
		EP 1881072 A1	23.01.2008
		EP 2019142 A2	28.01.2009
		EP 2019142 A3	01.04.2009
		EP 2019142 A9	13.05.2009
		JP 2004-500030 A	08.01.2004
		JP 2004-536560 A	09.12.2004
		JP 2007-524384 A	30.08.2007
		JP 2008-521445 A	26.06.2008
		JP 2010-193911 A	09.09.2010
		KR 10-0832257 B1	28.05.2008
		KR 10-0861330 B1	01.10.2008
		KR 10-1016198 B1	24.02.2011
		KR 10-2006-0016120 A	21.02.2006
		TW 201041900 A	01.12.2010
		TW 1337185 A	11.02.2011
		US 2003-0101488 A1	29.05.2003
		US 2003-0101489 A1	29.05.2003
		US 2003-0106101 A1	05.06.2003
		US 2003-0106102 A1	05.06.2003
		US 2003-0106103 A1	05.06.2003
US 2003-0106104 A1	05.06.2003		
US 2003-0115635 A1	19.06.2003		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2011/033585

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		US 2003-0115636 A1	19.06.2003
		US 2003-0140377 A1	24.07.2003
		US 2003-182688 A1	25.09.2003
		US 2005-0155110 A1	14.07.2005
		US 2005-0235378 A1	20.10.2005
		US 2006-0031968 A1	09.02.2006
		US 2006-0162022 A1	20.07.2006
		US 2006-0294623 A1	28.12.2006
		US 2009-0235390 A1	17.09.2009
		US 2009-0288221 A1	19.11.2009
		US 2010-0333233 A1	30.12.2010
		US 2011-0172290 A1	14.07.2011
		US 6538182 B1	25.03.2003
		US 6849782 B2	01.02.2005
		US 6855529 B2	15.02.2005
		US 6878860 B1	12.04.2005
		US 6897359 B2	24.05.2005
		US 6900368 B2	31.05.2005
		US 6989258 B2	24.01.2006
		US 7033833 B2	25.04.2006
		US 7070997 B2	04.07.2006
		US 7217866 B2	15.05.2007
		US 7226784 B2	05.06.2007
		US 7265280 B2	04.09.2007
		US 7358418 B2	15.04.2008
		US 7588888 B2	15.09.2009
		US 7663028 B2	16.02.2010
		WO 01-02592 A2	11.01.2001
		WO 01-02592 A3	11.01.2001
		WO 02-44392 A2	06.06.2002
		WO 02-44392 A3	06.06.2002
		WO 2004-113528 A2	29.12.2004
		WO 2004-113528 A3	29.12.2004
		WO 2006-060699 A2	08.06.2006
		WO 2006-060699 A3	08.06.2006
KR 10-0861330 B1	01.10.2008	AU 2000-59132 A1	22.01.2001
		AU 2000-59132 B2	08.09.2005
		AU 2002-236498 B2	11.10.2007
		AU 2002-36498 A1	11.06.2002
		AU 2004-250254 A1	29.12.2004
		AU 2004-250254 B2	22.09.2011
		AU 2005-311640 A1	08.06.2006
		AU 2005-311640 B2	18.08.2011
		CA 2378326 A1	11.01.2001
		CA 2529838 A1	29.12.2004
		CA 2588330 A1	08.06.2006
		CA 2750854 A1	11.01.2001
		CN 101166826 A0	23.04.2008
		CN 1252273 C0	19.04.2006

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2011/033585

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		CN 1402790 A0	12.03.2003
		CN 1608134 A	20.04.2005
		CN 1608134 C0	20.04.2005
		CN 1624135 A	08.06.2005
		CN 1624135 B	08.12.2010
		CN 1624135 C0	08.06.2005
		CN 1839154 A0	27.09.2006
		EP 1200612 A2	02.05.2002
		EP 1200612 B1	18.03.2009
		EP 1339858 A2	03.09.2003
		EP 1339858 B1	16.02.2011
		EP 1638997 A2	29.03.2006
		EP 1824982 A2	29.08.2007
		EP 1881072 A1	23.01.2008
		EP 2019142 A2	28.01.2009
		EP 2019142 A3	01.04.2009
		EP 2019142 A9	13.05.2009
		JP 2004-500030 A	08.01.2004
		JP 2004-536560 A	09.12.2004
		JP 2007-524384 A	30.08.2007
		JP 2008-521445 A	26.06.2008
		JP 2010-193911 A	09.09.2010
		KR 10-0832257 B1	28.05.2008
		KR 10-0865256 B1	24.10.2008
		KR 10-1016198 B1	24.02.2011
		KR 10-2006-0016120 A	21.02.2006
		TW 201041900 A	01.12.2010
		TW 1337185 A	11.02.2011
		US 2003-0101488 A1	29.05.2003
		US 2003-0101489 A1	29.05.2003
		US 2003-0106101 A1	05.06.2003
		US 2003-0106102 A1	05.06.2003
		US 2003-0106103 A1	05.06.2003
		US 2003-0106104 A1	05.06.2003
		US 2003-0115635 A1	19.06.2003
		US 2003-0115636 A1	19.06.2003
		US 2003-0140377 A1	24.07.2003
		US 2003-182688 A1	25.09.2003
		US 2005-0155110 A1	14.07.2005
		US 2005-0235378 A1	20.10.2005
		US 2006-0031968 A1	09.02.2006
		US 2006-0162022 A1	20.07.2006
		US 2006-0294623 A1	28.12.2006
		US 2009-0235390 A1	17.09.2009
		US 2009-0288221 A1	19.11.2009
		US 2010-0333233 A1	30.12.2010
		US 2011-0172290 A1	14.07.2011
		US 6538182 B1	25.03.2003
		US 6849782 B2	01.02.2005
		US 6855529 B2	15.02.2005

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/US2011/033585

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		US 6878860 B1	12.04.2005
		US 6897359 B2	24.05.2005
		US 6900368 B2	31.05.2005
		US 6989258 B2	24.01.2006
		US 7033833 B2	25.04.2006
		US 7070997 B2	04.07.2006
		US 7217866 B2	15.05.2007
		US 7226784 B2	05.06.2007
		US 7265280 B2	04.09.2007
		US 7358418 B2	15.04.2008
		US 7588888 B2	15.09.2009
		US 7663028 B2	16.02.2010
		WO 01-02592 A2	11.01.2001
		WO 01-02592 A3	11.01.2001
		WO 02-44392 A2	06.06.2002
		WO 02-44392 A3	06.06.2002
		WO 2004-113528 A2	29.12.2004
		WO 2004-113528 A3	29.12.2004
		WO 2006-060699 A2	08.06.2006
		WO 2006-060699 A3	08.06.2006

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, 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

(72)発明者 ルーカス, ホリー
カナダ, エヌ5エー 2ビー7, オンタリオ, ストラトフォード, モワット ストリート
18

(72)発明者 ワン, ツァン ウェイ
カナダ, エヌ2ブイ 2エル5, オンタリオ, ウォータールー, サルツバーグ ドライブ
607

(72)発明者 トンプソン, ジョン
カナダ, エヌ2ケー 4エヌ1, オンタリオ, ウォータールー, ユニバーシティ アベニ
ュー イー. 901

Fターム(参考) 4B024 AA03 AA17 BA80 CA01 DA01 DA20 GA11 HA20
4B064 AD85 CA08 CA19 CC24 DA16 DA20
4B065 AA83X AB01 AC14 BA02 CA13 CA54 CA60