

(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  
2023年7月13日(13.07.2023)



(10) 国際公開番号

WO 2023/132122 A1

- (51) 国際特許分類:  
CI2N 1/16 (2006.01) CI2P 13/04 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2022/040698
- (22) 国際出願日: 2022年10月31日(31.10.2022)
- (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 2022-000318 2022年1月5日(05.01.2022) JP
- (71) 出願人: 株式会社クレハ (KUREHA CORPORATION) [JP/JP]; 〒1038552 東京都中央区日本橋浜町三丁目3番2号 Tokyo (JP). 国立研究開発法人産業技術総合研究所(NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒1008921 東京都千代田区霞が関1丁目3番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 越山 竜行 (KOSHIYAMA, Tatsuyuki); 〒1038552 東京都中央区日本橋浜町三丁目3番2号 株式会社クレハ内 Tokyo (JP). 東山 幸弘(HIGASHIYAMA, Yukihiko); 〒1038552 東京都中央区日本橋浜町三丁目3番2号 株式会社クレハ内 Tokyo (JP). 佐藤 俊(SATO, Shun); 〒3058560 茨城県つくば市梅園1-1-1 中央第1 国立研究開発法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 森田 友岳(MORITA, Tomotake); 〒3058560 茨城県つくば市梅園1-1-1 中央第1 国立研究開発法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 雑賀 あずさ(SAIKA, Azusa); 〒3058560 茨城県つくば市梅園1-1-1 中央第1 国立研究開発法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP). 牛丸 和乗(USHIMARU, Kazunori); 〒3058560 茨城県つくば市梅園1-1-1 中央第1 国立研究開発法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP).
- (74) 代理人: 弁理士法人 H A R A K E N Z O W O R L D P A T E N T & T R A D E M A R K (HARAKENZO WORLD PATENT & TRADEMARK); 〒5300041 大阪府
- 大阪市北区天神橋2丁目北2番6号 大和南森町ビル Osaka (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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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, CV, 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, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告(条約第21条(3))  
— 規則13の2に基づいて明細書とは別に提出された、寄託された生物材料に関する表示(規則13の2.4(d)(i)及び48.2(a)(viii))

(54) Title: NOVEL MICROORGANISM, NOVEL MICROORGANISM CULTURE OR EXTRACT, AND ERGOTHIONEINE PRODUCTION METHOD

(54) 発明の名称: 新規微生物、新規微生物の培養物または抽出物、およびエルゴチオネインの生産方法

(57) Abstract: This invention relates to a microorganism (NITE BP-03572) belonging to Rhodosporidiobolus azoricus or a microorganism (NITE BP-03573) belonging to the Vanrija genus.

(57) 要約: 本開示は、ロドスポリジオボラス・アゾリカスに属する微生物(NITE BP-03572)またはワンリヤ属に属する微生物(NITE BP-03573)に関する。

WO 2023/132122 A1

## 明 細 書

発明の名称：

新規微生物、新規微生物の培養物または抽出物、およびエルゴチオネインの生産方法

### 技術分野

[0001] 本発明は、新規微生物、新規微生物の培養物または抽出物、および、エルゴチオネインの生産方法に関する。

### 背景技術

[0002] エルゴチオネインは含硫アミノ酸の一種である。エルゴチオネインは、ビタミンEの抗酸化作用よりも優れた抗酸化作用を有し、健康および美容等の分野において、利用価値の高い化合物として注目されている。

[0003] 例えば、特許文献1および非特許文献1には、エルゴチオネイン生産能が増強された形質転換糸状菌が記載されている。

[0004] 非特許文献2には、エルゴチオネイン生産能が増強された、形質転換した*Methylobacrium*属の微生物が記載されている。非特許文献2には、*Aureobasidium*属および*Rhodotorula*属の微生物がエルゴチオネイン生産能を有することが記載されている。

[0005] 非特許文献3には、*Pleurotus*属の微生物がエルゴチオネイン生産能を有することが記載されている。

[0006] 特許文献2には、*Methylobactrium*属および*Rhodotorula*属の微生物がエルゴチオネイン生産能を有することが記載されている。特許文献3には、*Moniliella*属の微生物がエルゴチオネイン生産能を有することが記載されている。特許文献4には、*Dirkmeia*属、*Papiliotrema*属および*Apiotrichum*属の微生物がエルゴチオネイン生産能を有することが記載されている。

### 先行技術文献

#### 特許文献

[0007] 特許文献1：国際公開第2016/121285号

特許文献2：国際公開第2016/121285号

特許文献3：国際公開第2019/004234号

特許文献4：国際公開第2021/140693号

### 非特許文献

[0008] 非特許文献1：S. Takusagawa, Biosci. Biotechnol. Biochem., 83, 181-184 (2019)

非特許文献2：Y. Fujitani et al., J. Biosci. Bioeng., 126, 715-722 (2018)

非特許文献3：SY. Lin, Int. J. Med. Mushrooms, 17, 749-761 (2015)

### 発明の概要

#### 発明が解決しようとする課題

[0009] エルゴチオネインは、ヒトの体内では生合成されず、一部の微生物で生合成されることが知られている。よって、上述の先行技術文献に記載されるように、エルゴチオネインを産生する微生物の探索、および、エルゴチオネインの生産を増強させるための微生物の改変等の研究開発が進められている。

[0010] 遺伝子組換え技術により、エルゴチオネインの生産を増強させるように微生物を改変することができる。しかしながら、当該微生物により生産されたエルゴチオネインは食品産業等では利用できない。したがって、遺伝子組換えが行われておらず未改変である、エルゴチオネイン生産量が高い微生物の探索が強く望まれている。

[0011] 本発明は、上記課題に鑑みてなされたものであり、エルゴチオネインの生産量が高い新規微生物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

[0012] 本発明者らは、スクリーニングの結果、エルゴチオネインの生産量が高い新規微生物を見出し、本発明を完成するに至った。

[0013] 本発明の一態様に係る微生物は、ロドスポリジオボラス・アゾリカスに属する微生物（NITE BP-03572）またはワンリヤ・ヒュミコーラ

(*Vanrija humicola*) に近縁な種に属するワンリヤ・エスピーに属する微生物 (N I T E B P - 0 3 5 7 3) である。

[0014] また、本発明の一態様に係るエルゴチオネインの生産方法は、ロドスポリジオボラス属またはワンリヤ属に属する微生物を培養し、エルゴチオネインを含む培養物を得る工程を含む、エルゴチオネインの生産方法である。

### 発明の効果

[0015] 本発明の一態様によれば、エルゴチオネインの生産量が高い微生物を提供することができる。

### 発明を実施するための形態

[0016] 本明細書において特記しない限り、数値範囲を表す「A～B」は、「A以上（Aを含みかつAより大きい）B以下（Bを含みかつBより小さい）」を意図する。

[0017] 〔新規微生物〕

本発明の一態様に係る微生物は、エルゴチオネインを生産する能力を有するロドスポリジオボラスに属する微生物、または、エルゴチオネインを生産する能力を有するワンリヤ属に属する微生物である。

[0018] 本発明の一態様に係る微生物は、エルゴチオネインの生産量が高い。エルゴチオネインは、含硫アミノ酸の一種であり、優れた抗酸化作用を有する。また、本発明の一態様に係る微生物は遺伝子組換え技術等による改変が行われていないため、食品産業でも使用することができる。

[0019] （1. ロドスポリジオボラス・アゾリカス E B 1 5 2）

ロドスポリジオボラス・アゾリカス (*Rhodospiridiobolus azoricus*) E B 1 5 2（以下、「酵母 E B 1 5 2」と略記する場合がある）は、植物の葉を分離源として初めて分離された微生物である。

[0020] リボソーム RNA 遺伝子の 26S rDNA の D1/D2 領域および ITS 領域の塩基配列を決定した。そして、テクノスルガラボ微生物同定システム (TechnoSuruga Laboratory, Japan) データベース DB-FU13.0 および国際塩基配列データベース (DDBJ/ENA(EMBL)/GenBank) に対する BLAST 相同検索を行っ

た。その結果、EB152はロドスポリジオボラス・アゾリカスに帰属された。また、炭素源としてのマルトースと水溶性でんぷんの資化性およびビタミン要求性以外は、ロドスポリジオボラス・アゾリカスとほぼ類似した生理・生化学的性状を示す。

[0021] 酵母EB152は、千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 122号室、独立行政法人製品評価技術基盤機構（National Institute of Technology and Evaluation；以下、「NITE」と略記する）の特許微生物寄託センター（NPMD）に寄託した（原寄託日：2021年12月15日、受託番号：NITE BP-03572）。

[0022] 酵母EB152の培養方法は、ロドスポリジオボラス属の微生物に対して行われる一般的な培養方法に準じて行えばよい。培養形態は液体培地を用いた回分培養あるいは培養系に炭素源および／または有機窒素源を連続添加する流加培養であり、通気攪拌することが望ましい。培地としては、ロドスポリジオボラス属に属する微生物が資化可能な炭素源、窒素源、または無機塩類等の必要な栄養源を含有する培地を使用してもよい。培養pHは3～8が好ましく、培養温度は20℃～30℃が好ましく、培養時間は2～14日が好ましい。

[0023] （2. ワンリヤ・エスピーEB891）

ワンリヤ・エスピー（*Vanrija* sp.）EB891（以下、「酵母EB891」と略記する場合がある）は、担子菌子実体を分離源として初めて分離された微生物である。

[0024] リボソームRNA遺伝子の26S rDNAのD1/D2領域およびITS領域の塩基配列を決定した。そして、テクノスルガラボ微生物同定システム（TechnoSuruga Laboratory, Japan）データベースDB-FU13.0および国際塩基配列データベース（DDBJ/ENA(EMBL)/GenBank）に対するBLAST相同検索を行った。その結果、EB891はワンリヤ・ヒュミコーラ（*Vanrija humicola*）に近縁であることが示された。また、炭素源イヌリンおよび水溶性でんぷんの資化性、窒素源硝酸塩の資化性、ビタミン要求性、50% D-グルコースおよ

び10% NaCl/5% グルコースにおける生育性に関して相違が認められた以外は、ワンリヤ・ヒュミコーラとほぼ類似した生理・生化学的性状を示す。

[0025] 酵母EB891は、千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 122号室、独立行政法人製品評価技術基盤機構（National Institute of Technology and Evaluation；以下、「NITE」と略記する）の特許微生物寄託センター（NPMD）に寄託した（原寄託日：2021年12月15日、受託番号：NITE BP-03573）。

[0026] 酵母EB891の培養方法は、ワンリヤ属の微生物に対して行われる一般的な培養方法に準じて行えばよい。培養形態は液体培地を用いた回分培養あるいは培養系に炭素源および／または有機窒素源を連続添加する流加培養であり、通気攪拌することが望ましい。培地としては、ワンリヤ属に属する微生物が資化可能な炭素源、窒素源、または無機塩類等の必要な栄養源を含有する培地を使用してもよい。培養pHは3～8が好ましく、培養温度は20℃～30℃が好ましく、培養時間は2～14日が好ましい。

[0027] [培養物]

本発明の一態様に係る培養物は、酵母EB152または酵母EB891の培養物である。本発明の一態様に係る培養物には、培養上清、培養沈殿物、培地、培養菌体、培養菌体破砕物、培養菌体の凍結乾燥物等の培養菌体処理物等が含まれる。本発明の一態様に係る培養物にはエルゴチオネインが含まれる。

[0028] [抽出物]

本発明の一態様に係る抽出物は、酵母EB152または酵母EB891の抽出物である。本明細書において「微生物の抽出物」とは、微生物に対して抽出処理を行うことにより得られるもの、および微生物の培養物に対して抽出処理を行うことにより得られるものを指す。したがって、本発明の一態様に係る抽出物は、例えば、酵母EB152もしくは酵母EB891の抽出処理、または、酵母EB152もしくは酵母EB891の培養物を抽出処理することによって得られる。本発明の一態様に係る抽出物にはエルゴチオネイ

ンが含まれる。

[0029] 抽出処理として、熱水抽出；有機溶媒等による溶媒抽出；加圧抽出；酵素および界面活性剤等による化学的抽出；超音波抽出；アルカリ抽出；酸抽出；浸透圧による抽出；粉碎による抽出；すり潰しによる抽出；凍結融解による抽出；液体窒素による抽出；高速攪拌による抽出；等が挙げられる。優れた植物生長効果を発揮する点等で、抽出処理は熱水抽出であることが好ましい。抽出処理は1種類であってもよいし、2種類以上の抽出処理を行ってもよい。

[0030] 熱水抽出は、熱水に抽出対象物を一定時間接触または浸漬させる抽出である。熱水抽出に用いる水の温度は、40℃以上が好ましく、60℃以上がより好ましい。

[0031] 本発明の一態様に係る抽出物は、酵母EB152または酵母EB891である微生物の、熱水抽出物、有機溶媒等による溶媒抽出物；加圧抽出物；酵素および界面活性剤等による化学的抽出物；超音波抽出物；アルカリ抽出物；酸抽出物；浸透圧による抽出物；粉碎による抽出物；すり潰しによる抽出物；凍結融解による抽出物；液体窒素による抽出物；または、高速攪拌による抽出物；であってもよい。

[0032] 本発明の一態様に係る培養物または抽出物の用途として、当該培養物または抽出物を有効成分として含む植物生長調整剤等が挙げられる。

[0033] [エルゴチオネインの生産方法]

本発明の一態様に係るエルゴチオネインの生産方法は、ロドスポリジオボラス属またはワンリヤ属に属する微生物を培養し、エルゴチオネインを含む培養物を得る工程を含む。

[0034] 本発明の一態様に係るエルゴチオネインの生産方法において、エルゴチオネインの生産量が高い点で、ロドスポリジオボラス属に属する微生物は、ロドスポリジオボラス・アゾリカスに属する微生物であることが好ましく、酵母EB152であることがより好ましい。また、エルゴチオネインの生産量が高い点で、ワンリヤ属に属する微生物は、ワンリヤ・ヒュミコーラに近縁

な種に属するワンリヤ・エスピーに属する微生物であることが好ましく、酵母E B 8 9 1であることがより好ましい。

[0035] エルゴチオネインを含む培養物からのエルゴチオネインの回収は、例えば、通常の微生物培養物からエルゴチオネインを回収し精製する方法で行えばよい。例えば、培養物を遠心分離等して菌体を回収する。次に、回収した菌体を熱水抽出に供する等により、エルゴチオネインを含む抽出液を得る。そして、当該抽出液を精製することによって、エルゴチオネインを回収することができる。微生物のエルゴチオネインの生産量は、例えば、得られた抽出液を、高速液体クロマトグラフィー装置およびLCMS等の質量分析装置によって測定することによって、定量することができる。

[0036] [まとめ]

本発明の態様1に係る微生物は、ロドスポリジオボラス・アゾリカスに属する微生物(NITE BP-03572)またはワンリヤ・ヒュミコーラに近縁な種に属するワンリヤ・エスピーに属する微生物(NITE BP-03573)である。

[0037] 本発明の態様2に係る培養物は、前記微生物の培養物である。

[0038] 本発明の態様3に係る抽出物は、前記微生物の抽出物である。

[0039] 本発明の態様4に係るエルゴチオネインの生産方法は、ロドスポリジオボラス属またはワンリヤ属に属する微生物を培養し、エルゴチオネインを含む培養物を得る工程を含む。

[0040] 本発明の態様5に係るエルゴチオネインの生産方法は、上記の態様4において、前記ロドスポリジオボラス属に属する微生物がロドスポリジオボラス・アゾリカスであってもよい。

[0041] 本発明の態様6に係るエルゴチオネインの生産方法は、上記の態様4または5において、前記ワンリヤ属に属する微生物がワンリヤ・ヒュミコーラに近縁な種に属するワンリヤ・エスピーであってもよい。

[0042] 本発明の態様7に係るエルゴチオネインの生産方法は、上記の態様4～6のいずれかにおいて、前記ロドスポリジオボラス属に属する微生物がロドス

ポリジオボラス・アゾリカスに属する微生物（N I T E B P - 0 3 5 7 2）であってもよい。

[0043] 本発明の態様8に係るエルゴチオネインの生産方法は、上記の態様4～7のいずれかにおいて、前記ワンリヤ属に属する微生物がワンリヤ・ヒュミコーラに近縁な種に属するワンリヤ・エスピーに属する微生物（N I T E B P - 0 3 5 7 3）であってもよい。

[0044] 以下に実施例を示し、本発明の実施の形態についてさらに詳しく説明する。もちろん、本発明の以下の実施例に限定されるものではなく、細部については様々な態様が可能であることはいうまでもない。さらに、本発明は上述した実施形態に限定されるものではなく、請求項に示した範囲で種々の変更が可能であり、それぞれ開示された技術的手段を適宜組み合わせて得られる実施形態についても本発明の技術的範囲に含まれる。また、本明細書中に記載された文献の全てが参考として援用される。

## 実施例

[0045] 以下の実施例中、特に記載がない限り、%は質量%を表す。

[0046] （1）環境から採取した分離源での集積培養

まず、植物および土壌等の環境からの微生物サンプル採取を2回に分けて行った。その結果、合計150個のサンプル（1回目90個、2回目60個）を採取した。

[0047] 次に、スクリーニング培地2 mLを含む15 mLのプラスチックチューブに採取したサンプルをそれぞれ浸漬し、200 rpmにおいて、3～5日間25℃にて培養した。スクリーニング培地は抗生物質を含むYM培地を使用した。具体的には、1%グルコース、0.5%ペプトン、0.3%酵母エキス、0.3%麦芽エキス、0.01%ストレプトマイシン硫酸塩、0.005%クロラムフェニコールを含む培地を使用した。

[0048] そして、目視により培地が濁った（微生物が増殖した）、126個のサンプル（1回目70個、2回目56個）を選抜した。

[0049] （2）酸化ストレス負荷によるサンプルの選抜

上記（１）で選抜した１２６個のサンプルの培養液を、ＹＭ培地で１００倍または１０００００倍に希釈した。そして、ＹＭ寒天培地、および、３ｍＭの $H_2O_2$ が添加されたＹＭ寒天培地（以下、 $H_2O_2$ 含有ＹＭ寒天培地と略記する。）に希釈した培養液を塗布し、２５℃において２～５日間培養した。

[0050] ＹＭ寒天培地上に生育したコロニーの数と、 $H_2O_2$ 含有ＹＭ寒天培地上に生育したコロニーの数をカウントした。そして、ＹＭ寒天培地および $H_2O_2$ 含有ＹＭ寒天培地の両方においてコロニーが生育した１１２個のサンプルを選抜した。

[0051] さらに、選抜した１１２個のサンプルの寒天培地上で生育したコロニーについて、目視で形態および色を観察し、種類が異なる酵母様のコロニー１８１個（１回目１０６個、２回目７５個）を選抜した。

[0052] （３）選抜コロニーの９６ウェルにおける培養

上記（２）で選抜したコロニー１８１個を、１ｍＬのＹＭ培地を含む９６ウェルプレートに植菌し、１６００rpmにおいて、３～４日間２５℃にて培養した。培養後、回収した培養液を２０００rpmにおいて、１０分間４℃にて遠心分離させた。遠心分離により得られた菌体ペレットを純粋１ｍＬで洗浄し、再度遠心分離に供した。

[0053] 遠心分離により得られた菌体ペレットに０．１ｍＬの純水を加えて懸濁した。得られた懸濁液を９６℃において１０分間加熱して、菌体内成分を抽出した。そして、抽出した菌体内成分を遠心分離に供して菌体残渣を取り除き、抽出液が得られた。

[0054] （４）ＬＣＭＳによる抽出液中のエルゴチオネインの定量分析

上記（３）で得られた抽出液０．１５ｍＬとアセトニトリル０．３５ｍＬとを混合した溶液を０．４５ $\mu$ mのＰＶＤＦフィルターで濾過した。得られた濾液をＬＣＭＳ測定のサンプルとして使用した。

[0055] ＬＣＭＳ分析には、島津製作所社製ＬＣＭＳ－２０２０を用いた。また、ＬＣのカラムには、ＳＨＯＤＥＸ社製Asahipak NH2P-40 2D+ガードカラムを

使用した。LCの移動相として、10 mMギ酸アンモニウムとアセトニトリルとの混合液（10 mMギ酸アンモニウム／アセトニトリル＝30／70（v／v））を使用した。また、流速は0.1 mL／minとし、25℃において分析を行った。

[0056] MS検出においては、ESIイオン化とAPCIイオン化とを同時に行うDUIモードでイオン化させた。また、エルゴチオネインを検出可能なm/z＝230（+）のSIMモードで検出を行った。

[0057] 上記（2）で選抜したコロニー181個の抽出液を分析した結果、エルゴチオネインの生産量が高かった22個のコロニー（1回目7個、2回目15個）を選抜した。

[0058] （5）エルゴチオネイン生産微生物のフラスコにおけるスケールアップ培養

上記（4）で選抜した22個のコロニーを、50 mLのYM培地を含む300 mLフラスコに植菌し、200 rpmにおいて、7日間25℃にて培養した（n＝1）。

[0059] 培養3～7日目の培養液を適宜採取した。上記（3）と同様に、菌体を遠心分離および洗浄後、熱水抽出により抽出液を回収した。

[0060] 得られた抽出液を、上記（4）と同様に、LCMSにより分析を行い、エルゴチオネインの生産量が高かった2株（EB152、EB891）を選抜した。

[0061] 選抜した2株のコロニーを、50 mLのYM培地を含む300 mLフラスコに植菌し、200 rpmにおいて、5日間25℃にて培養した（n＝3）。そして、5日目のエルゴチオネインの生産量を、LCMSにより測定した。

[0062] 選抜した2株のコロニーのエルゴチオネインの生産量と生産速度を表1に示す。表2は、公知の微生物の生産量と生産速度を示す。表1および2中、特に記載がない限り、エルゴチオネイン（EGT）の生産量の単位はmg／Lであり、EGTの生産速度はmg／L／d（1日当たりのエルゴチオネイ

ンの生産量)である。また、表1のEGTの生産量は、培養5日目のエルゴチオネインの生産量を示す。

[0063] 表1の「抽出物中のEGT量」について、抽出物は、YM培地2Lを入れた5Lジャーファーメンターを用いて、当該微生物を5日間25℃にて好氣的に培養し、培養後の乾燥菌体から熱水抽出することによって得た。そして、LCMSによって抽出物中のEGT量を測定した。

[0064] [表1]

株名	EGT生産量 (mg/L)	EGT生産速度 (mg/L/day)	抽出物中のEGT量 (mg/L)
EB152	22.6±1.4	4.5	192
EB891	26.3±1.3	5.3	269

[0065] [表2]

微生物	EGT生産量	EGT生産速度	参考文献
<i>Aureobasidium pullulans</i> kz25	14	2	J Biosci Bioeng 126 (2018) 715
<i>Aspergillus oryzae</i> NSAR1	11.5 (mg/kg)	2.3 (mg/kg/d)	Biosci Biotechnol Biochem 83 (2019) 181
<i>Pleurotus citrinopileatus</i>	13-98	0.8-6.1	I J Med Mushroom 17 (2015) 749
<i>Methylobacterium aquaticum</i> 22A	12.2	1.7	J Biosci Bioeng 126 (2018) 715

[0066] 表1および2より、選抜した2株のエルゴチオネインの生産量は、既知のエルゴチオネイン生産微生物のエルゴチオネインの生産量の同等以上だったことが分かった。また、選抜した2株のエルゴチオネインの生産速度も、既知のエルゴチオネイン生産微生物の生産速度の同等以上であったことが分かった。また、選抜した2株の抽出物について、エルゴチオネインが豊富に含まれていることを確認した。

[0067] (6) 選抜した2株の同定

選抜した2株の帰属分類群の推定は、リボソームRNA遺伝子の26S rDNAのD1/D2領域およびITS領域の塩基配列の解析により行った。

- [0068] (7) EB152株の分子系統学的位置および生理学的性質  
EB152株の26S rDNAのD1/D2領域塩基配列およびITS-5.8 rDNA塩基配列について、国際塩基配列データベースに対するBLAST相同検索を行った。その結果、担子菌系酵母の一種であるロスポリジオボラス・アゾリカスの複数の塩基配列に対して、98.4~100%の同一性を示した。また、得られた塩基配列をもとに解析した分子系統樹において、EB152株はロスポリジオボラス属で構成される系統群に含まれた。そして、ロスポリジオボラス・アゾリカス JCM11251<sup>T</sup>と同一の分子系統学的位置を示した。
- [0069] EB152株を、YM寒天平板培地上で25℃3日間培養し、形成されたコロニーを観察した。コロニーの周縁の形状は全縁であり、隆起状態はクッション形だった。また、コロニーの表面の形状は平滑であった。さらに、コロニーはバター様および湿性を有し、ピンク色~薄橙色であった。
- [0070] また、EB152株を、YM寒天平板培地上で25℃3日間培養後、細胞形態性状についても観察した。栄養細胞は楕円形~卵形であり、増殖は出芽によることが認められた。培養開始6週間以上経過した平板で有性生殖器官の形成は認められなかった。
- [0071] 上記のEB152株の形態学的性質は、D1/D2領域およびITS領域のDNA配列解析で帰属されたロスポリジオボラス・アゾリカスの特徴にほぼ一致していた。EB152株の生理学的性質を表3に示す。
- [0072] 表3中、「+」は陽性を示す。「-」は陰性を示す。「W」は弱い陽性を示す。「D」は試験開始後1週間以上の時間をかけて徐々に陽性になったことを示す、「L」は試験開始後2週間以降に急速に陽性になったことを示す。
- [0073]

[表3]

<糖類発酵性試験>					
グルコース	—				
<炭素源資化性試験>					
グルコース	+	サリシン	+	D-マンニトール	+
ガラクトース	+	アルブチン	+	ガラクトチトール	+
L-ソルボース	+	メリビオース	—	イノシトール	—
D-グルコサミン	—	ラクトース	—	2-ケト-D-グルコン酸塩	—
D-リボース	+	ラフィノース	+	5-ケト-D-グルコン酸塩	—
D-キシロース	+	メレチトース	—	D-グルコン酸塩	+
L-アラビノース	+	イヌリン	+	D-グルクロン酸塩	—
D-アラビノース	+	水溶性デンプン	W	DL-乳酸塩	—
L-ラムノース	—	グリセロール	+	コハク酸塩	W
スクロース	+	エリスリトール	—	クエン酸塩	D
マルトース	—	リビトール	+	メタノール	—
トレハロース	+	キシリトール	+	エタノール	+
α-メチル-D-グルコシド*	—	L-アラビニトール	D	L-酒石酸	—
セロビオース	+	D-グルシトール	+		
<窒素源資化性試験>					
硝酸塩	+	亜硝酸塩	+		
<耐性試験>					
25℃での生育性	+	30℃での生育性	+	35℃での生育性	—
0.1% シクロヘキシミド*	D	50%(w/v) D-グルコース	+	10% NaCl/5% グルコース	W
<ビタミン要求性試験>					
ビタミンフリー培地	+				

[0074] 分子系統学的位置および生理学的性質ならびにエルゴチオネインの生産量の測定より、EB152株はロドスポリジオボラス・アゾリカスに帰属される新規微生物と判断した。

[0075] (8) EB891株の分子系統学的位置および生理学的性質

EB891株の26S rDNAのD1/D2領域塩基配列について、国際塩基配列データベースに対するBLAST相同検索を行った。その結果、担子菌系酵母の一種であるワンリヤ・ヒュミコーラ (*Vanrija humicola*) の複数の塩基配列に対して、99.0~99.8%の同一性を示した。また、得られた塩基配列をもとに解析した分子系統樹において、EB891株はワンリヤ属で構成される系統群に含まれ、ワンリヤ・ヒュミコーラ CBS5711とクラスターを形成し、近縁であることが示された。一方で、EB891株のITS-5.8 rDNA塩基配列について、国際塩基配列データベースに対するBLAST相同検索を行った。その結果、担子菌系酵母の一種であるワンリヤ・ヒュミコーラ (*Vanrija humicola*) の複数の塩基配列に対

して、98.5～100%の同一性を示した。また、得られた塩基配列をもとに解析した分子系統樹において、EB891株はワンリヤ属で構成される系統群に含まれ、ワンリヤ・ヒュミコーラの複数の塩基配列と99%の高いブートストラップ値で支持されるクラスターを形成し、ワンリヤ・ヒュミコーラに帰属する可能性が示された。

[0076] EB891株を、YM寒天平板培地上で25℃3日間培養し、形成されたコロニーを観察した。コロニーの周縁の形状は全縁であり、隆起状態は平坦～クッション状だった。また、コロニーの表面の形状は平滑～やや粗面であった。さらに、コロニーはバター様で湿性を有し、白色～クリーム色であった。

[0077] また、EB891株を、YM寒天平板培地上で25℃3日間培養後、細胞形態性状についても観察した。栄養細胞は楕円形～棍棒形であり、増殖は出芽によることが認められた。培養開始6週間以上経過した平板で有性生殖器官の形成は認められなかった。

[0078] 上記のEB891株の形態学的性質は、D1/D2領域およびITS領域のDNA配列解析で帰属されたワンリヤ・ヒュミコーラの特徴にほぼ一致していた。EB891株の生理学的性質を表3に示す。

[0079] 表4中、「+」は陽性を示す。「-」は陰性を示す。「W」は弱い陽性を示す。「D」は試験開始後1週間以上の時間をかけて徐々に陽性になったことを示す、「L」は試験開始後2週間以降に急速に陽性になったことを示す。

[0080]

[表4]

<糖類発酵性試験>					
グルコース	—				
<炭素源資化性試験>					
グルコース	+	セロビオース	+	D-マンニトール	+
ガラクトース	+	サリシン	+	ガラクトール	+
L-ソルボース	+	メリビオース	+	イノシトール	+
D-グルコサミン	+	ラクトース	+	D-グルコン酸塩	+
D-リボース	+	ラフィノース	D	D-グルクロン酸塩	+
D-キシロース	+	メレチトース	+	DL-乳酸塩	+
L-アラビノース	+	イヌリン	+	コハク酸塩	+
D-アラビノース	+	水溶性デンプン	+	クエン酸塩	+
L-ラムノース	+	グリセロール	+	メタノール	—
スクロース	+	エリスリトール	+	エタノール	+
マルトース	+	リビトール	+	サッカラート	+
トレハロース	+	キシリトール	+		
$\alpha$ -メチル-D-グルコシド <sup>*</sup>	+	D-グルシトール	+		
<窒素源資化性試験>					
硝酸塩	W				
<耐性試験>					
30℃での生育性	+	35℃での生育性	+	37℃での生育性	—
0.01% シクロヘキシム <sup>*</sup>	+	50%(w/v) D-グルコース	+	10% NaCl/5% グルコース	+
<ビタミン要求性試験>					
ビタミンフリー培地	+				

[0081] 分子系統学的位置および生理学的性質ならびにエルゴチオネインの生産量の測定より、EB891株はワンリヤ・ヒュミコーラまたはそれに近縁な種に帰属される新規微生物と判断した。

[0082] 塩基配列の解析の結果、EB152株はロドスポリジオボラス・アゾリカス、EB891株はワンリヤ・ヒュミコーラまたはそれに近縁な種に属すると推定された。

### 産業上の利用可能性

[0083] 本発明の微生物は、エルゴチオネインの生産量が高く、健康および美容等の分野において利用可能である。

### 受託番号

[0084] N I T E B P - 0 3 5 7 2

N I T E B P - 0 3 5 7 3

## 請求の範囲

- [請求項1]           ロドスポリジオボラス・アゾリカスに属する微生物（N I T E   B P－0 3 5 7 2）またはワンリヤ・ヒュミコーラに近縁な種（ワンリヤ・エスピー）に属する微生物（N I T E   B P－0 3 5 7 3）。
- [請求項2]           請求項1に記載の微生物の培養物。
- [請求項3]           請求項1に記載の微生物の抽出物。
- [請求項4]           ロドスポリジオボラス属またはワンリヤ属に属する微生物を培養し、エルゴチオネインを含む培養物を得る工程を含む、エルゴチオネインの生産方法。
- [請求項5]           前記ロドスポリジオボラス属に属する微生物がロドスポリジオボラス・アゾリカスである、請求項4に記載のエルゴチオネインの生産方法。
- [請求項6]           前記ワンリヤ属に属する微生物がワンリヤ・ヒュミコーラに近縁な種（ワンリヤ・エスピー）である、請求項4に記載のエルゴチオネインの生産方法。
- [請求項7]           前記ロドスポリジオボラス属に属する微生物がロドスポリジオボラス・アゾリカスに属する微生物（N I T E   B P－0 3 5 7 2）である、請求項4に記載のエルゴチオネインの生産方法。
- [請求項8]           前記ワンリヤ属に属する微生物がワンリヤ・ヒュミコーラに近縁な種に属する微生物（N I T E   B P－0 3 5 7 3）である、請求項4に記載のエルゴチオネインの生産方法。

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/040698

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> <i>C12N 1/16</i> (2006.01)i; <i>C12P 13/04</i> (2006.01)i FI: C12N1/16; C12P13/04  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) C12N1/16; C12P13/04		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2022 Registered utility model specifications of Japan 1996-2022 Published registered utility model applications of Japan 1994-2022		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/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.
X	WO 2016/121285 A1 (KIKKOMAN CORP.) 04 August 2016 (2016-08-04) claims, examples	3
A	claims, examples	1, 2, 4-8
X	WO 2019/004234 A1 (MITSUBISHI CHEMICAL CORP.) 03 January 2019 (2019-01-03) claims, examples	3
A	claims, examples	1, 2, 4-8
A	高桑 直也, 有用脂質を生産する野生酵母の探索, 北農, 2019, vol. 86, pp. 18-21, non-official translation (TAKAKUWA, Naoya. Search for wild yeast that produces useful lipids. Hokuno.) table 1	1-8
A	IMANISHI, D. et al. Draft Genome Sequence of the Yeast <i>Vanrija humicola</i> (Formerly <i>Cryptococcus humicola</i> ) Strain UJ1, a Producer of d-Aspartate Oxidase. Genome Announcements. 2018, vol. 6, issue 11, e00068-18 abstract	1-8
<input 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 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 <b>04 January 2023</b>		Date of mailing of the international search report <b>17 January 2023</b>
Name and mailing address of the ISA/JP <b>Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan</b>		Authorized officer  Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/JP2022/040698**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2016/121285	A1	04 August 2016	US	2017/0321235	A1	
				claims, examples			
WO	2019/004234	A1	03 January 2019	US	2020/0140904	A1	
				claims, examples			

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12N 1/16(2006.01)i; C12P 13/04(2006.01)i FI: C12N1/16; C12P13/04		
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）） C12N1/16; C12P13/04 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2022年 日本国実用新案登録公報 1996-2022年 日本国登録実用新案公報 1994-2022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 (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
X	WO 2016/121285 A1 (キッコーマン株式会社) 04.08.2016 (2016-08-04) 特許請求の範囲、実施例	3
A	特許請求の範囲、実施例	1, 2, 4-8
X	WO 2019/004234 A1 (三菱ケミカル株式会社) 03.01.2019 (2019-01-03) 特許請求の範囲、実施例	3
A	特許請求の範囲、実施例	1, 2, 4-8
A	高桑 直也, 有用脂質を生産する野生酵母の探索, 北農, 2019, Vol.86, p.18-21 表1	1-8
A	IMANISHI D.et al., Draft genome sequence of the yeast <i>Vanrija humicola</i> (Formerly <i>Cryptococcus humicola</i> ) strain UJ1, a producer of D-Aspartae oxidase, genome announcements, 2018, Vol.6, Issue 11, e00068-18 abstract	1-8
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" 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 “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な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抵触するものではなく、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	04.01.2023	国際調査報告の発送日 17.01.2023
名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員（特許庁審査官）  松原 寛子 4N 4154  電話番号 03-3581-1101 内線 3488	

国際調査報告  
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号  
PCT/JP2022/040698

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO 2016/121285 A1	04.08.2016	US 2017/0321235 A1 claims, examples	
WO 2019/004234 A1	03.01.2019	US 2020/0140904 A1 claims, examples	