

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6901859号

(P6901859)

(45) 発行日 令和3年7月14日 (2021.7.14)

(24) 登録日 令和3年6月22日 (2021.6.22)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 P 7/64 (2006.01)	C 1 2 P 7/64 Z N A
A 2 3 L 33/12 (2016.01)	A 2 3 L 33/12
C 1 2 N 1/12 (2006.01)	C 1 2 N 1/12 C
A 2 3 K 20/158 (2016.01)	A 2 3 K 20/158
A 2 3 K 10/10 (2016.01)	A 2 3 K 10/10

請求項の数 7 (全 53 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-568903 (P2016-568903)	(73) 特許権者	509262736
(86) (22) 出願日	平成27年5月22日 (2015.5.22)		シンセティック ジェノミクス インコー ポレーテッド
(65) 公表番号	特表2017-518747 (P2017-518747A)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ラ ホヤ ノース トレー パインズ ロード
(43) 公表日	平成29年7月13日 (2017.7.13)		1 1 1 4 9
(86) 国際出願番号	PCT/US2015/032308	(74) 代理人	100102978
(87) 国際公開番号	W02015/179844		弁理士 清水 初志
(87) 国際公開日	平成27年11月26日 (2015.11.26)	(74) 代理人	100102118
審査請求日	平成30年5月11日 (2018.5.11)		弁理士 春名 雅夫
(31) 優先権主張番号	62/002, 107	(74) 代理人	100160923
(32) 優先日	平成26年5月22日 (2014.5.22)		弁理士 山口 裕孝
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	(74) 代理人	100119507
			弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ドコサヘキサエン酸を生産するためのラビリンチュラ綱株

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

総脂肪酸の少なくとも 35% をドコサヘキサエン酸 (DHA) として、及び総脂肪酸の少なくとも 25% をミリスチン酸として含む、トラストキトリウム (*Thraustocytrium*) 属、シゾキトリウム (*Schizocytrium*) 属またはオーランチオキトリウム (*Aurantiochytrium*) 属から選択される変異ラビリンチュラ綱 (*labrynthulomycete*) 微生物により生産される微生物油であって、該微生物が UV 処置を施されている、前記微生物油。

【請求項 2】

DHA 対 DPA の比が少なくとも 3.5 : 1 である、請求項 1 に記載の微生物油。

10

【請求項 3】

総脂肪酸に 10% 以下のドコサペンタエン酸 (DPA) が含まれ；

総脂肪酸に 2% 未満のアラキドン酸 (ARA) が含まれ；および／または

総脂肪酸に 1% 未満のエイコサペンタエン酸 (EPA) が含まれる、

請求項 1 に記載の微生物油。

【請求項 4】

前記微生物油の脂肪酸の少なくとも 30% がミリスチン酸である、請求項 1 に記載の微生物油。

【請求項 5】

請求項 1 に記載の微生物油が含まれる製品であって、随意で食品、動物飼料、化粧品、

20

または医薬品である、製品。

【請求項 6】

請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の微生物油が含まれる、微生物バイオマス。

【請求項 7】

請求項 6 に記載の微生物バイオマスが含まれる、製品。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、米国特許法第 119 条 (e) の下で、2014 年 5 月 22 日に出願された米国仮特許出願第 62/002,107 号に基づく優先権を主張し、ここにその内容を参照により援用する。

10

【0002】

配列表

本出願には、2015 年 5 月 22 日作成の容量 16 キロバイト (kb) の配列表テキストファイル「SGI1710_2WO_Sequence_Listing_ST25.txt」として本出願と同時に提出された核酸配列レファレンスが含まれ、37 C. F. R. 1.52 (e) (iii) (5) に従ってその内容を参照により援用する。

【0003】

本発明は、一つには、ドコサヘキサエン酸 (DHA) などのオメガ 3 多価不飽和脂肪酸 (オメガ 3 PUFA) を含む脂質の生産に有用な微生物株に関する。本発明はまた、原株と比べて強化された脂質生産性を有する由来株を選択し分離する方法にも関する。

20

【背景技術】

【0004】

背景

長鎖オメガ 3 脂肪酸は、人の食生活に必須の要素であり、現在主として魚油に由来している。水産資源の重金属汚染はもとより魚の乱獲の問題もあり、人の健康を促進することが実証されているエイコサペンタエン酸 (EPA) やドコサヘキサエン酸 (DHA) などの各種オメガ 3 脂肪酸の維持可能な代替供給源が必要とされている。

【0005】

30

現在ツボカビ類 (ラビリンチュラ綱の真核海洋微生物) が DHA 供給源として用いられているが、今のところ魚由来の DHA と比べてツボカビ類により生産される DHA はコストが高い。DHA 生産率が強化された株を用いることで、DHA 生産コストを下げるができる。

【発明の概要】

【0006】

概要

本明細書では、ドコサヘキサエン酸 (DHA) の生産に有用なラビリンチュラ綱微生物の新規株、及びそのような株により生産される油を提供する。本明細書で提供する株はまた、原株と比べて強化された脂質生産性、増殖性、栄養利用性または薬剤耐性といった新規のまたは改良された形質を有する株を含む由来株の分離にも用いることができる。本明細書ではまた、たとえば変異誘発及び／または選択剤の存在下 (随意) でサイトスタットもしくはケモスタット選択することで、原株と比べて、限定ではないが脂質生産率などの形質が強化された由来株を分離する方法も提供する。

40

【0007】

本明細書の一態様では、DHA の生産に有用な新規のラビリンチュラ綱微生物を提供する。このラビリンチュラ綱微生物は、郵便番号 61604 米国イリノイ州ペオリア ユニバーシティストリート 1815 N 所在の Agricultural Research Service Culture Collection (NRRL) に 2013 年 4 月 4 日に NRRL-50836 (NH-05783 株) 及び NRRL-50837 (NH-

50

06161株)として寄託されている微生物であり得、または、これら寄託された株のいずれかに由来する株の微生物であり得る。本明細書で提供する株は、配列番号1、配列番号2、配列番号3及び／または配列番号4と少なくとも95%、96%、97%、97.5%、98%、98.1%、98.2%、98.3%、98.4%、98.5%、98.6%、98.7%、98.8%、98.9%、99.0%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%または99.9%の同一性を有する配列を含む18S rRNA遺伝子を含み得、あるいは配列番号5、配列番号6、配列番号7及び／または配列番号8と少なくとも95%、96%、97%、97.5%、98%、98.1%、98.2%、98.3%、98.4%、98.5%、98.6%、98.7%、98.8%、98.9%、99.0%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%または99.9%の同一性を有する配列を含む18S rRNA遺伝子を含み得、あるいは配列番号9、配列番号10、配列番号11及び／または配列番号12と少なくとも95%、96%、97%、97.5%、98%、98.1%、98.2%、98.3%、98.4%、98.5%、98.6%、98.7%、98.8%、98.9%、99.0%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%または99.9%の同一性を有する配列を含む18S rRNA遺伝子を含み得る。

10

【0008】

本明細書にはさらに、目的の形質について選択するかもしれない継代培養、ケモスタットもしくはサイトスタット選択、変異誘発、遺伝子操作、またはそれらの任意の組合せを限定ではなく含む何らかの方法による由来株NH-05783またはNH-06161の分離微生物を含む。

20

【0009】

さまざま実施形態で、NRRL-50836 (NH-05783株)及びNRRL-50837 (NH-06161株)ならびにそれらの由来株を含む本明細書で提供する株は、脂肪酸の少なくとも25%をDHAとして生産できる。たとえば、由来株(たとえば変異株またはバリエーション株)を含むある株により生産される脂肪酸の少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%または少なくとも40%がDHAであり得る。株は、小規模の回分培養で生育すると、DHAを少なくとも40mg/L/h、少なくとも45mg/L/h、少なくとも50mg/L/h、少なくとも100mg/L/h、少なくとも130mg/L/h、少なくとも160mg/L/h、少なくとも190mg/L/hまたは少なくとも200mg/L/hのペースで生産できる。いくつかの実施形態では、株は、振盪フラスコ中25mL、50mL、100mL、200mL、400mLまたは500mLの回分培養で生育すると、DHAを少なくとも100mg/L/h、少なくとも150mg/L/h、少なくとも200mg/L/h、少なくとも250mg/L/h、少なくとも300mg/L/hまたは少なくとも350mg/L/hのペースで生産できる。いくつかの実施形態では、株は、少なくとも1リットルの発酵培養で生育すると、DHAを少なくとも100mg/L/h、少なくとも150mg/L/h、少なくとも200mg/L/h、少なくとも250mg/L/h、少なくとも300mg/L/h、少なくとも350mg/L/h、少なくとも400mg/L/h、少なくとも450mg/L/h、少なくとも500mg/L/h、少なくとも600mg/L/h、少なくとも700mg/L/hまたは少なくとも800mg/L/hのペースで生産できる。本明細書に開示の株及びそれらの由来株は、DHA対ドコサペンタエン酸(DPA)(C22:5n6)の比が少なくとも3.5対1であるかまたは少なくとも約4.0対1であるような脂質を生産できる。本明細書で提供する微生物によりドコサペンタエン酸(DPA)として生産される脂肪酸のパーセンテージは、たとえば、12%未満か10%未満である。NH-05783株、NH-06161株、及びそれらの由来株は、油を生産することができ、その油の脂肪酸の少なくとも25%、30%または35%がDHAであり、脂肪酸の少なくとも10%、少なくとも12%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくと

30

40

50

も25%または少なくとも30%がミリスチン酸である。いくつかの例では、脂肪酸の約5%未満、約3%未満または約2%未満がエイコサペンタエン酸(EPA)である。また、本明細書で提供する株またはその由来株により生産される油の脂肪酸の2%未満、1%未満または0.5%未満がアラキドン酸(ARA)であり得る。

【0010】

本明細書の別の態様では、ラビリンチュラ綱の分離微生物及び変異微生物、ならびにそれらに由来する変異体またはバリエーションを提供し、これら微生物は、配列番号1、配列番号2、配列番号3及び配列番号4と少なくとも95%、96%、97%、97.5%、98%、98.1%、98.2%、98.3%、98.4%、98.5%、98.6%、98.7%、98.8%、98.9%、99.0%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%または99.9%の同一性を有する配列を含む18S rRNA遺伝子を有する。株は、たとえばDHAなどオメガ-3脂肪酸の生産に有用であり得、生産される脂質の脂肪酸の少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%または少なくとも45%がDHAであるような脂質を生産できる。いくつかの例では、株は、トラストキトリウム(*Thraustochytrium*)属、シゾキトリウム(*Schizochytrium*)属またはオーランチオキトリウム(*Aurantiochytrium*)属に属する、と特徴付けることができ、野生株または天然株の変異体であり得、この変異体は、由来元の野生株よりもDHAを少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%または少なくとも50%多く生産する。あるいは、またはそれに加えて、いくつかの例では、株は、トラストキトリウム属、シゾキトリウム属またはオーランチオキトリウム属に属する、と特徴付けることができ、野生株または天然株の変異体であり得、この変異体は、由来元の野生株よりもミリスチン酸を少なくとも50%、少なくとも100%、少なくとも200%または少なくとも300%多く生産する。たとえば、ある変異微生物は、その総脂肪酸の少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%または少なくとも30%をミリスチン酸として生産できる。株はさらに、DHA対DPAの比が少なくとも約3.5対1であるか、少なくとも約4.0対1である脂質を生産できる。いくつかの例では、株は、小規模の回分培養で12~24時間生育すると、たとえば14時間または23時間回分培養すると、DHAを少なくとも40mg/L/h、少なくとも45mg/L/h、少なくとも50mg/L/h、少なくとも100mg/L/h、少なくとも130mg/L/h、少なくとも160mg/L/h、少なくとも190mg/L/hまたは少なくとも200mg/L/hのペースで生産できる。

【0011】

本明細書の別の態様では、ラビリンチュラ綱の分離微生物及び変異微生物を提供し、これら微生物は、配列番号5、配列番号6、配列番号7及び配列番号8と少なくとも95%、96%、97%、97.5%、98%、98.1%、98.2%、98.3%、98.4%、98.5%、98.6%、98.7%、98.8%、98.9%、99.0%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%または99.9%の同一性を有する配列を含む18S rRNA遺伝子を有する。株は、たとえばDHAなどオメガ-3脂肪酸の生産に有用であり得、生産される脂質の脂肪酸の少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%または少なくとも45%がDHAであるような脂質を生産できる。いくつかの例では、株は、トラストキトリウム属、シゾキトリウム属またはオーランチオキトリウム属に属する、と特徴付けることができ、野生株または天然株の変異体であり得、この変異体は、由来元の野生株よりもDHAを少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%または少なくとも50%多く生産する。あるいは、またはそれに加えて、いくつかの例では、株は、トラストキトリウム属、シゾキトリウム属またはオーランチオキトリウム属に属する、と特徴付けることができ、野生株または天然株の変異体であり得、この変異体は、由来元の野生株よりもミリスチン酸を少なくとも50%、少なくとも100%、少なくとも200%または少なくとも300%多く生産する。たとえば、ある

変異微生物は、その総脂肪酸の少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%または少なくとも30%をミリスチン酸として生産できる。株はさらに、DHA対DPAの比が少なくとも約3.5対1であるか、少なくとも約4.0対1である脂質を生産できる。いくつかの例では、株は、小規模の回分培養で12~24時間生育すると、たとえば14時間または23時間回分培養で生育すると、DHAを少なくとも40mg/L/h、少なくとも45mg/L/h、少なくとも50mg/L/h、少なくとも100mg/L/h、少なくとも130mg/L/h、少なくとも160mg/L/h、少なくとも190mg/L/hまたは少なくとも200mg/L/hのペースで生産できる。

【0012】

本明細書のさらに別の態様では、ラビリンチュラ綱の分離微生物及び変異微生物、ならびにそれらに由来する変異体またはバリエーションを提供し、これら微生物は、配列番号9、配列番号10、配列番号11及び配列番号12と少なくとも95%、96%、97%、97.5%、98%、98.1%、98.2%、98.3%、98.4%、98.5%、98.6%、98.7%、98.8%、98.9%、99.0%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%または99.9%の同一性を有する配列を含む18S rRNA遺伝子を有する。株は、たとえばDHAなどオメガ-3脂肪酸の生産に有用であり得、生産される脂質の脂肪酸の少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%または少なくとも45%がDHAであるような脂質を生産できる。いくつかの例では、株は、トラストキトリウム属、シゾキトリウム属またはオーランチオキトリウム属に属する、と特徴付けることができ、野生株または天然株の変異体であり得、この変異体は、由来元の野生株よりもDHAを少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%または少なくとも50%多く生産する。あるいは、またはそれに加えて、いくつかの例では、株は、トラストキトリウム属、シゾキトリウム属またはオーランチオキトリウム属に属する、と特徴付けることができ、野生株または天然株の変異体であり得、この変異体は、由来元の野生株よりもミリスチン酸を少なくとも50%、少なくとも100%、少なくとも200%または少なくとも300%多く生産する。たとえば、ある変異微生物は、その総脂肪酸の少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%または少なくとも30%をミリスチン酸として生産できる。株はさらに、DHA対DPAの比が少なくとも約3.5対1であるか、少なくとも約4.0対1である脂質を生産できる。いくつかの例では、株は、小規模の回分培養で12~24時間生育すると、たとえば14時間または23時間回分培養すると、DHAを少なくとも40mg/L/h、少なくとも45mg/L/h、少なくとも50mg/L/h、少なくとも100mg/L/h、少なくとも130mg/L/h、少なくとも160mg/L/h、少なくとも190mg/L/hまたは少なくとも200mg/L/hのペースで生産できる。

【0013】

別の態様では、本発明は、由来元の株と比べて、生産される総脂肪酸のパーセンテージとしてより多くのミリスチン酸を生産する変異微生物を提供する。たとえば、変異体は、由来元の株と比べて、生産される総脂肪酸のパーセンテージとして少なくとも20%多くの、少なくとも30%多くの、少なくとも40%多くの、少なくとも50%多くの、少なくとも70%多くの、または少なくとも100%多くのミリスチン酸を生産できる。いくつかの例では、変異体は、由来元の株と比べて、生産される総脂肪酸のパーセンテージとして少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍または少なくとも6倍のミリスチン酸を生産できる。変異微生物は、たとえば、その脂肪酸の少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%または少なくとも30%をミリスチン酸として生産できる。いくつかの例では、微生物は、ラビリンチュラ綱 (labrinthulomycete) に属する。いくつかの例では、微生物は、トラストキトリウム属、シゾキトリウム属またはオーランチオキトリウム属の種である。変異微生物はさらに、由来元の株と比べて、総脂肪酸のパーセンテージとしてより多くのDHA

10

20

30

40

50

を生産できる。本明細書ではまた、由来元の株が生産するよりも、総脂肪酸のパーセンテージとして多くのミリスチン酸及び多くのDHAを生産する変異微生物を提供する。たとえば、変異体は、野生株または原株と比べて総脂肪酸のパーセンテージとして少なくとも50%多くの、または少なくとも100%多くのミリスチン酸を生産することに加えて、由来元の株と比べて、生産される総脂肪酸のパーセンテージとして少なくとも20%多くの、少なくとも30%多くの、少なくとも40%多くの、少なくとも50%多くの、少なくとも70%多くの、または少なくとも100%多くのDHAを生産できる。変異微生物は、たとえば、その脂肪酸の少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%または少なくとも39%をDHAとして、またその脂肪酸の少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%または少なくとも30%をミリスチン酸として生産できる。いくつかの例では、ある変異ラビリントウ属株は、小規模の回分発酵培養で、少なくとも150mg/L/hのペースでDHAを生産する。たとえば、本明細書で提供される変異ラビリントウ属株は、小規模培養で、少なくとも170mg/L/hのペースで、少なくとも190mg/L/hのペースで、または少なくとも200mg/L/hのペースでDHAを生産できる。さまざまな例において、本明細書で提供される変異微生物により生産される総脂肪酸には、ARAが2%未満、たとえばARAが1%未満含まれ、EPAが3%未満、たとえばEPAが1%未満含まれ得る。変異微生物により生産されるDHA対DPAの比は、いくつかの例では少なくとも4:1であり得る。

【0014】

そのような変異株は、たとえば、ラビリントウ属 (*Labryinthula*) 属、ラビリントウロイデス (*Labryinthuloides*) 属、トラストキトリウム属、シゾキトリウム属、アプラノキトリウム (*Aplanochytrium*) 属、オーランチオキトリウム属、ジャポノキトリウム属 (*Japonochytrium*)、オブロングキトリウム (*Oblongichytrium*) 属、ディプロフリス (*Diplophrys*) 属またはウルケニア (*Ulkenia*) 属などの株であり得る。たとえば、本明細書で提供される変異株は、トラストキトリウム属、シゾキトリウム属またはオーランチオキトリウム属の株であり得る。いくつかの例では、微生物は、トラストキトリウム属、シゾキトリウム属またはオーランチオキトリウム属の種である。たとえば、脂肪酸の高パーセンテージをDHAとして、また脂肪酸の高パーセンテージをミリスチン酸として生産する変異株は、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11および配列番号12のいずれかと少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも98.1%、少なくとも98.2%、少なくとも98.3%、少なくとも98.4%、少なくとも98.5%、少なくとも98.6%、少なくとも98.7%、少なくとも98.8%、少なくとも98.9%、少なくとも99%、少なくとも99.1%、少なくとも99.2%、少なくとも99.3%、少なくとも99.4%、少なくとも99.5%、少なくとも99.6%、少なくとも99.7%、少なくとも99.8%、または少なくとも99.9%同一である18SrDNA配列を有するオーランチオキトリウム属株またはシゾキトリウム属株であり得る。

【0015】

ある変異ラビリントウ属株により生産される総脂肪酸は、たとえば、10%以下のDPA、9%以下のDPA、8%以下のDPA、7%以下のDPA、または6%以下のDPAを含み得る。本明細書で提供される変異ラビリントウ属株により生産される脂肪酸中のDHA対DPAの比は、たとえば、約3.5:1かそれ以上、たとえば約4:1かそれ以上、たとえば約4.5:1かそれ以上、約4.9:1かそれ以上、または約5:1かそれ以上であり得る。

【0016】

本発明の別の態様は、ある微生物原株と比べて高い脂質生産性を有する1種類以上の微生物株の由来体または変異体を分離する方法であり、該方法は、脂質代謝に参与する酵素

または因子の少なくとも1種類の阻害剤の存在下で対象の微生物菌株をサイトスタットまたはケモスタットで培養することと、微生物株の由来体または変異体のうち高い脂質生産性を示すものを少なくとも1種類分離することを含む。高い脂質生産性とは、生産される脂質の培養液体積当たりの増量、生産される脂質の乾燥菌体重量パーセントとしての増加、生産されるトリグリセリド（TAG）の培養液体積当たりの増量、生産されるTAGの乾燥菌体重量パーセントとしての増加、生産されるFAMEの培養液体積当たりの増量、生産されるFAMEの乾燥菌体重量パーセントとしての増加、生産される脂肪酸1種類以上（たとえば、C8、C10、C12、C14、C16またはC18脂肪酸のうちの1種類以上）の培養液体積当たりの増量、生産される脂肪酸1種類以上の乾燥菌体重量パーセントとしての増加、生産される脂肪酸1種類以上の生産される総脂肪酸（FAME）のパーセンテージとしての増加、生産されるPUFA1種類以上（たとえばARA、EPAまたはDHAのうちの1種類以上）の培養液体積当たりの増量、生産されるPUFA1種類以上の乾燥菌体重量パーセントとしての増加、生産されるPUFA1種類以上の生産される総脂肪酸（FAME）のパーセンテージとしての増加、分離株により生産される総脂質、TAG、FAME、脂肪酸1種類以上もしくはPUFA1種類以上のうちのいずれかの生産率の増加、のうちのどれでもよい。対象の株をサイトスタットまたはケモスタットで培養してからコロニーを分離することができ、分離コロニーから生育させた分離由来株を上述のいずれかの値について試験できる。また、由来株は、増殖率またはバイオマス蓄積度、たとえば培養の脂質生産期における増殖率またはバイオマス蓄積度などに基づいて試験し選択することもできる。

10

20

【0017】

脂質合成阻害剤を用いて対象の微生物株を選択するステップの前または後に、随意で、脂質合成阻害剤を含まないサイトスタットまたはケモスタットで株を選択することができる。対象の微生物株をサイトスタットまたはケモスタットで選択する前に、方法は、やはり随意で、株を1種類以上の変異誘発プロトコルに供することも含み得、該変異誘発プロトコルは、たとえば1種類以上の化学的変異原、UV光またはガンマ線照射などを用いることができる。さらに、方法は、随意で、対象の微生物株を、同一の脂質合成阻害剤または異なる脂質合成阻害剤を用いるサイトスタットまたはケモスタットで培養して、順次選択することを含み得る。たとえば、変異誘発手順を行ってから、脂質代謝に關与する酵素または因子の少なくとも1種類の阻害剤の存在下でサイトスタットまたはケモスタットで選択する、ということを1回、2回、3回、または4回以上行うことができる。

30

【0018】

本発明のさらなる態様では、微生物をUV照射で処置してから、ある形質、たとえば限定ではないが、高濃度の総脂質、TAG、PUFA、オメガー3脂肪酸、または高濃度の1種類以上の特定の脂肪酸、たとえばミリスチン酸、オレイン酸、ARA、DHAもしくはEPAといった形質についてスクリーニングすることができる。微生物のUV処置は株の変異誘発後に行うことができ、変異誘発はUVまたは他の変異原を利用することができる。いくつかの例では、微生物は、変異後、UV処置前に、目的の形質についてスクリーニングまたは選択され得る。さらに、それに加えて、またはその代わりに、微生物はUV処置後に目的の形質についてスクリーニングまたは選択され得る。たとえば、高い脂質生産性について選択された変異誘発済み微生物をUV照射した後、さらに高い脂質生産性について選択または試験することができる。随意で、UV処置した株を、目的の形質について選択できる化合物、たとえば脂質合成を阻害する化合物を用いてまたは用いずに、ケモスタットまたはサイトスタットで選択することができる。ケモスタットまたはサイトスタットで選択した後に分離した株を、続いて、目的の形質が強化されているか、たとえば脂質増加、PUFA増加、ARA増加、EPA増加、またはDHA増加について試験して、変異誘発済み原株と比べて脂質、PUFA、ARA、EPAまたはDHAの生産率または生産レベルが増大した由来株を分離することができる。

40

【0019】

脂質生産性が強化された由来株を選択する方法で用いられ得る対象の微生物株は、たと

50

えば、藻類株、細菌株、菌類株または不等毛類株であり得る。いくつかの例では、微生物株は、油糧酵母株、たとえばカンジダ属 (*Candida*)、クリプトコッカス属 (*Cryptococcus*)、リボマイセス属 (*Lipomyces*)、モルティエラ属 (*Mortierella*)、ロドスポリジウム属 (*Rhodospiridium*)、ロドトルラ属 (*Rhodotortula*)、トリコスポロン属 (*Trichosporon*)、またはヤロウイア属 (*Yarrowia*) の株である。いくつかの例では、微生物株は、藻類株、たとえばボツリオコッカス属 (*Botryococcus*)、クロレラ属 (*Chlorella*)、キクロテラ属 (*Cyclotella*)、ドナリエラ属 (*Dunaliella*)、ユーグレナ属 (*Euglena*)、ハンチア属 (*Hantzschia*)、ヘマトコッカス属 (*Haematococcus*)、イソクリシス属 (*Isochrisis*)、モノダス属 (*Monodus*)、ナンノクロロプシス属 (*Nannochloropsis*)、ネオクロリス属 (*Neochloris*)、ニッチア属 (*Nitzschia*)、パリエトクロリス属 (*Parietochloris*)、パブロバ属 (*Pavlova*) またはポルフィリディウム属 (*Porphyridium*) の株である。いくつかの例では、微生物株は、ラビリンチュリッド (*labrinthulid*) 株またはヤブレッツボカビ株である。たとえば、株は、ラビリンチュラ、ラビリンチュロイデス、トラストキトリウム属、シゾキトリウム属、アブラノキトリウム属、オーランチオキトリウム属、ジャポノキトリウム属、オブロンギキトリウム属、ディプロフリスまたはウルケニアの種であり得る。

【0020】

本発明は、野生株の由来株、実験室株及び操作した株を含み、これらには遺伝子操作した株や、脂質代謝において作用する酵素の阻害剤を培養培地中に含むサイトスタットやケモスタットで選択するという標準的なやり方で改良した株が含まれる。また、本明細書の方法による由来株を次に遺伝子操作するか、または標準的方法でさらに改良した株も含まれる。このような株は、たとえばDHAなどの多価不飽和脂肪酸や、DHAなどの多価不飽和脂肪酸を含有する油の生産に有用であり得る。株は、人や動物の栄養製品の成分として用いることができるバイオマスの生産に用いることができる。

【0021】

また、本明細書で提供する分離ラビリンチュラ綱株が含まれるバイオマスも提供する。いくつかの例では、分離株の乾燥バイオマスの脂肪酸の少なくとも20重量%、少なくとも25重量%、少なくとも30重量%、または少なくとも35重量%がDHAである。あるいは、またはそれに加えて、分離株の乾燥バイオマスの脂肪酸の少なくとも6重量%、少なくとも8重量%、少なくとも10重量%、少なくとも15重量%、少なくとも20重量%、または少なくとも25重量%がミリスチン酸であり得る。いくつかの例では、分離ラビリンチュラ綱バイオマスには、バイオマスの乾燥菌体重量の少なくとも約10重量%、少なくとも約20重量%、少なくとも30重量%、少なくとも40重量%、少なくとも50重量%、少なくとも60重量%、または少なくとも70重量%の脂肪酸が含まれ得、脂肪酸の少なくとも20重量%、少なくとも25重量%、少なくとも30重量%、少なくとも40重量%、または少なくとも50重量%がオメガー3脂肪酸であり得る。

【0022】

本発明のさらに別の態様は、本明細書で提供する微生物またはその由来体から分離された微生物油、たとえば本明細書で提供する任意の微生物の培養後の全培養のまたは採取したバイオマスの微生物油である。微生物油は、たとえば、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、または少なくとも40%のDHAを含み得る。いくつかの実施形態では、微生物油は、その脂肪酸の少なくとも6%、少なくとも8%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、または少なくとも30%をミリスチン酸 (*myristate*) として含み得る。いくつかの実施形態では、ドコサヘキサエン酸対ドコサペンタエン酸の比は、3.5:1かそれ以上、あるいは約4:1かそれ以上であり得る。いくつかの実施形態では、微生物油には、約5%未満、4%未満、3%未満、2%未満、1%未満、または0.5%未満のEPAが

10

20

30

40

50

含まれる。いくつかの実施形態では、微生物油には、約2%未満、1%未満、0.5%未満、または検出不能な量のARAが含まれる。

【0023】

本発明はまた、本発明のラビリンチュラ綱微生物もしくはバイオマスのいずれか1種類またはそれらの混合物が含まれる食品、動物飼料、化粧品、栄養製品、治療製品、または医薬品にも関する。本発明はまた、本発明の各種微生物油のいずれかが含まれる人や動物用の食品、化粧品または医薬組成物にも関する。いくつかの実施形態では、食品は乳児用調合乳である。いくつかの実施形態では、食品は、ミルク、飲料、治療飲料、栄養飲料またはそれらの組合せである。いくつかの実施形態では、食品は、動物や人の食品の添加剤である。いくつかの実施形態では、食品は栄養サプリメントである。いくつかの実施形態では、食品は、動物飼料である。いくつかの実施形態では、動物飼料は養殖飼料である。いくつかの実施形態では、動物飼料は、ペットの餌、動物園の動物の餌、使役動物の餌、家畜の餌、またはそれらの組合せである。

10

[本発明1001]

総脂肪酸の少なくとも25%をDHAとして、及び総脂肪酸の少なくとも6%をミリスチン酸として含む、微生物油。

[本発明1002]

DHA対DPAの比が少なくとも3.5:1である、本発明1001の微生物油。

[本発明1003]

DHA対DPAの比が少なくとも4:1である、本発明1001の微生物油。

20

[本発明1004]

前記微生物油の総脂肪酸の少なくとも30%がDHAである、本発明1003の微生物油。

[本発明1005]

前記微生物油の総脂肪酸の少なくとも35%がDHAである、本発明1004の微生物油。

[本発明1006]

総脂肪酸に10%以下のDPAが含まれる、本発明1001の微生物油。

[本発明1007]

総脂肪酸に2%未満のARAが含まれる、本発明1001の微生物油。

[本発明1008]

総脂肪酸に1%未満のEPAが含まれる、本発明1001の微生物油。

30

[本発明1009]

前記微生物油の脂肪酸の少なくとも10%がミリスチン酸である、本発明1001の微生物油。

[本発明1010]

前記微生物油の脂肪酸の少なくとも12%がミリスチン酸である、本発明1009の微生物油。

[本発明1011]

前記微生物油の脂肪酸の少なくとも15%がミリスチン酸である、本発明1010の微生物油。

40

[本発明1012]

本発明1001の微生物油が含まれる、製品。

[本発明1013]

食品、動物飼料、化粧品、または医薬品である、本発明1012の製品。

[本発明1014]

変異微生物から分離される、本発明1001の微生物油。

[本発明1015]

本発明1001の微生物油を生産する、変異ラビリンチュラ綱 (labyrinthulo mycete) 微生物。

[本発明1016]

その脂肪酸の少なくとも25%をDHAとして、及びその脂肪酸の少なくとも6%をミリ

50

スチン酸として生産する、変異ラビリンチュラ綱微生物。

[本発明1017]

その脂肪酸の少なくとも30%をDHAとして、及びその脂肪酸の少なくとも10%をミリスチン酸として生産する、本発明1016の変異ラビリンチュラ綱微生物。

[本発明1018]

小規模培養で少なくとも100mg/L/hのペースでDHAを生産し、さらに、由来元である野生株よりも、総脂肪酸のパーセントとして少なくとも20%多くのドコサヘキサエン酸（DHA）及び少なくとも100%多くのミリスチン酸を生産する、本発明1016の変異ラビリンチュラ綱微生物。

[本発明1019]

前記微生物により生産される総脂肪酸には、少なくとも30%のDHA及び少なくとも10%のミリスチン酸が含まれる、本発明1016の変異ラビリンチュラ綱微生物。

[本発明1020]

配列番号1、配列番号2、配列番号3及び配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11及び配列番号12からなる群より選択される配列と少なくとも98%の同一性を有する18S rDNA配列を含む、本発明1019の変異ラビリンチュラ綱微生物。

[本発明1021]

配列番号5及び配列番号9から選択される配列、
配列番号6及び配列番号10から選択される配列、
配列番号7及び配列番号11から選択される配列、ならびに
配列番号8及び配列番号12から選択される配列
と少なくとも98%の同一性を有する18S rDNA配列を含む、本発明1020の変異ラビリンチュラ綱微生物。

[本発明1022]

配列番号5及び配列番号9から選択される配列、
配列番号6及び配列番号10から選択される配列、
配列番号7及び配列番号11から選択される配列、ならびに
配列番号8及び配列番号12から選択される配列
と少なくとも98.5%の同一性を有する18S rDNA配列を含む、本発明1021の変異ラビリンチュラ綱微生物。

[本発明1023]

NRRL番号50836として寄託された株、NRRL番号50837として寄託された株、またはそのいずれかの由来株である、本発明1022の変異ラビリンチュラ綱微生物。

[本発明1024]

本発明1016の前記変異微生物が含まれる、微生物バイオマス。

[本発明1025]

本発明1024の微生物バイオマスが含まれる、製品。

[本発明1026]

高脂質生産性を有する微生物由来株の選択方法であって、
脂質生産に関与する酵素または因子を阻害する少なくとも1種類の化合物を含むケモスタットまたはサイトスタットで原株の微生物を培養する工程と、
前記サイトスタットまたはケモスタットの培養物から、前記原株の微生物と比べて強化された脂質生産性をもつ少なくとも1種類の由来株微生物を分離する工程
を含む、前記方法。

[本発明1027]

前記由来株が、1種類以上のFAME脂質の増大した生産性を有している、本発明1026の方法。

[本発明1028]

前記由来株が、少なくとも1種類の多価不飽和脂肪酸の増大した生産性を有している、

10

20

30

40

50

本発明1027の方法。

[本発明1029]

前記由来株が、ARA、DHAまたはEPAのうち少なくとも1つの増大した生産性を有している、本発明1028の方法。

[本発明1030]

前記由来株が、DHAの増大した生産性を有している、本発明1029の方法。

[本発明1031]

前記由来株が、ミリスチン酸の増大した生産性を有している、本発明1027の方法。

[本発明1032]

脂質生産に關与する酵素を阻害する前記化合物が、没食子酸アルキル、没食子酸プロピル、カプサイシン、セルレニン、クルクミン、シクロプロペン、ジフェニルアミン、ノルフルラゾン、ピリダジノン、セトキシジム、トルイル酸、トリクロサン、3-デシノイル-NAC、ジアザボリン、イソニアジド、チオラクトマイシン、SBPT04、BP1、TOFA、ソラフェンA、セサミン、セサモール、クルクミン、シクロエート、チオカルバメート、スルホキシド、リンゴ酸塩、1種類以上の脂肪酸、キャノーラ油、ピーナッツ油、またはゴマ油を含む、本発明1026の方法。

10

[本発明1033]

前記培養する工程がサイトスタット培養である、本発明1026の方法。

[本発明1034]

前記ケモスタットまたはサイトスタット培養の前に、少なくとも1回の変異誘発手順を実施する工程をさらに含む、本発明1026の方法。

20

[本発明1035]

前記少なくとも1回の変異誘発手順には、化学的変異原、ガンマ線照射、またはUV照射による処置が含まれる、本発明1034の方法。

[本発明1036]

脂質生産に關与する酵素または因子を阻害する少なくとも1種類の化合物を含むケモスタットまたはサイトスタットで前記原微生物株を培養する前に、脂質生産に關与する酵素を阻害する化合物の非存在下でケモスタットまたはサイトスタットで前記原微生物株を培養する工程と、前記対象微生物株と比べて強化された増殖率を有する少なくとも1種類の対象微生物株バリエーションを分離する工程とをさらに含む、本発明1035の方法。

30

[本発明1037]

強化された脂質生産性を有する前記少なくとも1種類の微生物由来株の分離後に、前記微生物由来株をUV処置する工程と、さらに強化された脂質生産性を有するUV処置済み由来株を選択する工程とをさらに含む、本発明1036の方法。

[本発明1038]

前記さらに強化された脂質生産性を有するUV処置済み由来株を選択する工程には、前記UV処置済み由来株をサイトスタットまたはケモスタットで培養することが含まれる、本発明1037の方法。

[本発明1039]

2回以上の変異誘発手順を実施し、少なくとも1回の変異誘発手順の後にサイトスタットまたはケモスタット選択を実施する、本発明1026~1038のいずれかの方法。

40

[本発明1040]

2回以上の変異誘発手順を実施し、各変異誘発手順の後にサイトスタットまたはケモスタット選択を実施する、本発明1039の方法。

[本発明1041]

前記サイトスタットまたはケモスタット選択では、脂質生産に關与する酵素または因子を阻害する少なくとも1種類の化合物がサイトスタットまたはケモスタット培養中に含まれる、本発明1039または本発明1040の方法。

[本発明1042]

前記少なくとも1種類の第1の微生物由来株が、1回目の変異誘発手順後に、脂質生産に

50

関与する酵素または因子を阻害する第1の化合物を含むサイトスタットまたはケモスタットで選択され、少なくとも1種類の第2の微生物由来株が、2回目の変異誘発手順後に、脂質生産に関与する酵素または因子を阻害する第2の化合物を含むサイトスタットまたはケモスタットで選択される、本発明1041の方法。

[本発明1043]

変異微生物の形質の強化方法であって、
微生物を変異誘発して、変異誘発済み微生物の集団を得る工程と、
前記変異誘発済み微生物を少なくとも1種類の関心対象の形質について選択して、少なくとも1種類の関心対象の形質を有する少なくとも1種類の変異微生物を得る工程と、
前記少なくとも1種類の変異微生物をUV処置して、強化された関心対象の形質を有する少なくとも1種類のUV処置済み変異体を得る工程と
を含む、前記方法。

10

[本発明1044]

前記変異誘発には、化学的変異原、ガンマ線照射、またはUV照射での処置が含まれる、本発明1043の方法。

[本発明1045]

少なくとも1種類の関心対象の形質には、増殖率、バイオマス蓄積度、産物の生産率、産物の生産量、1種類以上の化合物に対する抵抗性もしくは耐性、または温度耐性が含まれる、本発明1044の方法。

[本発明1046]

少なくとも1種類の関心対象の形質には、脂質の生産率が含まれる、本発明1045の方法。

20

[本発明1047]

少なくとも1種類の関心対象の形質には、多価不飽和脂肪酸（PUFA）の生産率が含まれる、本発明1046の方法。

[本発明1048]

前記選択することには、野生型細胞の増殖を阻害する化合物の存在下での増殖が含まれる、本発明1043の方法。

[本発明1049]

前記選択することには、ケモスタットまたはサイトスタットでの増殖が含まれる、本発明1048の方法。

30

[本発明1050]

前記選択することには、1種類以上の変異誘発済み微生物により生産された産物の量を検定することが含まれる、本発明1043の方法。

[本発明1051]

前記少なくとも1種類の変異微生物をUV処置した後に、前記少なくとも1種類のUV処置済み変異体をサイトスタットまたはケモスタットで培養する工程をさらに含む、本発明1043の方法。

【図面の簡単な説明】

【0024】

【図1】本開示の株を特徴づけるための配列が提供されている各フラグメントの起源を示す18S rDNA遺伝子座のマップである。

【図2】ガンマ線照射されたWH-05554の、脂質生合成阻害剤セルレニンの存在下でのサイトスタット培養の増殖特徴を示す図である。

【図3A】WH-05554と、脂質生合成阻害剤を含むサイトスタットで選択された由来株の、小規模回分培養での23時間培養期間の脂質の比率変化を示す図である。

【図3B】WH-05554と、脂質生合成阻害剤を含むサイトスタットで選択された由来株の、小規模回分培養での23時間培養期間の脂質の比率変化を示す図である。

【図3C】WH-05554と、脂質生合成阻害剤を含むサイトスタットで選択された由来株の、小規模回分培養での23時間培養期間の脂質の比率変化を示す図である。

40

50

【図4】原株WH-05554、ならびに標準的なやり方で改良したNH-05783株、NH-06161株及びNH-06181株の総脂肪酸の組成を表す図である。小規模発酵培養のFAME分析から、改良株NH-05783のミリスチン酸及びDHAが増加したことが示され、また、改良株NH-05783の由来株であるUV処置したNH-06161株及びNH-06181株ではさらにミリスチン酸及びDHAが増加したことが示された。

【図5】WH-05628株とWH-05554株をAurantionchytium種に類別した、様々なツボカビ類株の類縁性を示す系統樹図である。

【図6】野生株WH-05628（黒塗り棒）及び標準的なやり方で改良されたNH-05783株（白っぽい棒）により生産されたさまざまなカロテノイドの量を示す棒グラフである。

10

【図7A】本発明のラビリンチュラ綱株の細胞の形態を示す顕微鏡写真の一式である。標準的なやり方で改良された株NH-05783をT=0時間で示す。

【図7B】本発明のラビリンチュラ綱株の細胞の形態を示す顕微鏡写真の一式である。標準的なやり方で改良された株NH-05783をT=6時間で示す。

【図7C】本発明のラビリンチュラ綱株の細胞の形態を示す顕微鏡写真の一式である。標準的なやり方で改良された株NH-05783をT=24時間で示す。

【図7D】本発明のラビリンチュラ綱株の細胞の形態を示す顕微鏡写真の一式である。標準的なやり方で改良された株NH-05783をT=30時間で示す。

【図7E】本発明のラビリンチュラ綱株の細胞の形態を示す顕微鏡写真の一式である。標準的なやり方で改良された株NH-05783をT=48時間で示す。

20

【図7F】本発明のラビリンチュラ綱株の細胞の形態を示す顕微鏡写真の一式である。標準的なやり方で改良された株NH-05783をT=72時間（図7F）で示す。

【図7G】本発明のラビリンチュラ綱株の細胞の形態を示す顕微鏡写真の一式である。分離野生株WH-05628をT=0時間で示す。

【図7H】本発明のラビリンチュラ綱株の細胞の形態を示す顕微鏡写真の一式である。分離野生株WH-05628をT=6時間（図7H）で示す。

【図7I】本発明のラビリンチュラ綱株の細胞の形態を示す顕微鏡写真の一式である。分離野生株WH-05628をT=24時間で示す。

【図7J】本発明のラビリンチュラ綱株の細胞の形態を示す顕微鏡写真の一式である。分離野生株WH-05628をT=30時間で示す。

30

【図7K】本発明のラビリンチュラ綱株の細胞の形態を示す顕微鏡写真の一式である。分離野生株WH-05628をT=48時間で示す。

【図7L】本発明のラビリンチュラ綱株の細胞の形態を示す顕微鏡写真の一式である。分離野生株WH-05628をT=72時間で示す。

【発明を実施するための形態】

【0025】

発明の詳細な説明

特に別途定義しないかぎり、本明細書で使用するすべての技術用語、表記法、その他科学用語や術語の意味は、本発明の技術分野の当業者により一般的に理解されるものを意図している。なかには、一般的に理解される用語の意味を明確さ及び／または参照の便利さを期して本明細書内で定義する場合もあるが、そのような定義が本明細書に含まれるからといって、当技術分野で一般に理解される意味ではない何か実質的な違いがあるということにはならない。本明細書に記載または参照する技術や手順の多くは、当業者らが十分に理解し、従来の方法論を用いて一般的に利用しているものである。

40

【0026】

単数を表す「a」「an」及び「the」は、文脈から複数の意味が明らかに除外されないかぎり、複数の意味も包含する。たとえば、「a cell」という語には、単数または複数の細胞という意味が含まれ、1つ以上の細胞という意味も含まれる。本明細書では「A及び／またはB」は、「A」、「B」、「AまたはB」、及び「A及びB」とい

50

う意味すべてを包含する。

【0027】

「約 (a b o u t)」という用語は、所与の値のプラスもしくはマイナス10%以内、または近似の有効数字に丸めた値のいずれかを意味し、どの場合にもその値を含むものとする。範囲として記載している場合には、両端の値も含む。

【0028】

本開示の全体を通して、さまざまな情報源を参照し、及び／または参照により援用している。情報源には、たとえば、科学誌の文献、特許文書、教科書及びワールド・ワイド・ウェブのブラウザは起動しないページアドレスが含まれる。このような情報源を当業者が利用できるようにレファレンスを明記しているが、本明細書に全体を引用している情報源は、特に「参照により援用」と書いていなくても、その1つひとつの内容を参照により明確に援用するものである。

【0029】

本出願中に見出しは読み手の便宜だけを目的とし、本発明またはその実施形態の範囲を何ら限定するものではない。

【0030】

新規ラビリンチュラ綱株

本明細書では、多価不飽和脂肪酸 (P U F A)、具体的にはドコサヘキサエン酸 (D H A) (C 2 2 : 6 n 3) などのオメガ-3脂肪酸を生産する能力のあるラビリンチュラ綱 (本明細書では「ラビリンチュラ綱」として言及) の新規分離株を提供する。開示の真核微生物は、高DHA生産率を有する株を識別するように設計されたスクリーニングで特定した。本明細書で提供する株は、ブタペスト条約にしたがい、2013年4月4日に、郵便番号61604米国イリノイ州ペオリア ユニバーシティストリート1815N所在の A g r i c u l t u r a l R e s e a r c h S e r v i c e (A R S) C u l t u r e C o l l e c t i o n (N R R L) に S y n t h e t i c G e n o m i c s 社によって寄託された。これら寄託株の受領番号はNRRL-50836 (NH-05783株) 及びNRRL-50837 (NH-06161株) である。

【0031】

(表1) 微生物分離株と対応する受領番号

株ID	受領番号	分類
NH-SGI-05783	NRRL-50836	オーランチオキトリウム種
NH-SGI-06161	NRRL-50837	オーランチオキトリウム種

【0032】

ラビリンチュラ綱はストラメノパイル (S t r a m e n o p i l e s) 界に属し、ヤブレツボカビ科 (T h r a u s t o c h y t r i a c e a e) とラビリンチュラ科 (L a b r y n t h u y l a c e a e) の2つの科を包含する。ラビリンチュラ類 (L a b r y n t h u l o m y c e t e) の属には、アプラノキトリウム属、オーランチオキトリウム属、ディプロフリス、ジャポノキトリウム属、ラビリンチュラ属 (L a b y r i n t h u l a)、ラビリンチュロイデス、オブロンギキトリウム属、シゾキトリウム属、トラストキトリウム属、及びウルケニアが含まれる。

【0033】

いくつかの例では、本発明の微生物は、寄託株を特定する特徴のすべてを有し、具体的には、DHAを生産できるという寄託株を特定する特徴を有する。本発明の特定の微生物は、上述の寄託微生物ならびにそれらの由来株を指す場合もある。たとえば、本明細書では、NRRL受領番号50836及びNRRL受領番号50837としてARS微生物株保存機関に寄託された株の由来株である微生物を提供し、これらの由来株はDHAを生産する。これらの株は、その総脂肪酸の少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、または少なくとも50%をDHAとして

生産し得る。また、これらの株はさらに、その総脂肪酸の少なくとも6%、少なくとも8%、少なくとも10%、少なくとも12%、少なくとも15%、または少なくとも20%をミリスチン酸として生産し得る。

【0034】

本明細書では「脂質 (lipid)」という用語は、油脂を指し、遊離脂肪酸、脂肪酸アルコールやワックスエステルなどの脂肪酸誘導体、テルペノイド、炭化水素（たとえばアルカンやアルケン）、ステロール、及びグリセリン脂肪酸エステルを含み、膜脂質または貯蔵脂質、たとえばリン脂質、ガラクト脂質、硫脂質、トリアシルグリセロール、ジアシルグリセロール及びモノアシルグリセロールを含む。（たとえば脂肪酸生合成から誘導されるアシル鎖を含む）脂肪酸成分を含む脂質としては、たとえば、リン脂質、糖脂質、ガラクト脂質、硫脂質、トリアシルグリセロール、ジアシルグリセロール及びモノアシルグリセロール、スフィンゴミエリン及びグリコスフィンゴ脂質、エイコサノイド、プロスタグランジン、トロンボキサン、ロイコトリエン、レゾルビン、プロテクチン、イソプロスタン、オキシリピンが挙げられる。本明細書では「総脂肪酸 (total fatty acid)」という用語は、当分野で知られており本明細書でも説明する分析や定量化のために脂肪酸メチルエステル (FAME) へと誘導され得る上述及びその他細胞脂質の成分である脂肪酸（直鎖アシル部分）を含む。したがって、「脂肪酸パーセント」、「脂肪酸%」または「総脂肪酸%」及び「FAMEパーセント」または「FAME%」は、脂質または油の脂肪酸成分を指す場合に交換可能に使用され得る。

【0035】

多価不飽和脂肪酸（「PUFA」）としては、オメガ-3脂肪酸とオメガ-6脂肪酸が挙げられる。オメガ-3脂肪酸としては、限定ではないが、ドコサヘキサエン酸 (DHA) (C22:6n3) 及びエイコサペンタエン酸 (EPA) (C20:5n3) が挙げられる。オメガ-6脂肪酸としては、限定ではないが、アラキドン酸 (ARA) (C20:4n6) 及びドコサペンタエン酸 (DPA) (C22:5n6)、ガンマーリノール酸 (C18:3n-6)、エイコサジエン酸 (C20:2n-6) 及びエイコサトリエン酸 (C20:3n-6) が挙げられる。オメガ-3脂肪酸としては、エイコサトリエン酸 (C20:3n3)、ステアリドン酸 (C18:4n3)、エイコサテトラエン酸 (C20:4n-3)、オクタデカペンタエン酸 (C18:5n-3) も挙げられる。

【0036】

18S遺伝子領域に独特の配列を与える18S rRNA遺伝子の4つの重複するフラグメントを、野生型分離株WH-05554（配列番号1、配列番号2、配列番号3及び配列番号4）ならびに由来株NH-05783（配列番号5、配列番号6、配列番号7及び配列番号8）及びNH-06161（配列番号9、配列番号10、配列番号11及び配列番号12）について得た。18S rRNA遺伝子はマルチコピーなので、異なる配列の並びから決定された4つのフラグメントの配列は、別々に準備して、異なる遺伝子座からの配列を含むキメラ配列を呈するのを回避した。WH-05783株の18S rDNA遺伝子座に各フラグメントをマッピングした図を説明目的で図1に示す。

【0037】

本明細書では、特に断らない限りは、同一性パーセント (%) への言及は、(1) 標準デフォルトパラメータ（デフォルトでクエリ配列は低複雑領域についてフィルタ）を用いるアミノ酸検索用blastp及び核酸検索用blastnによるBLAST 2.0 Basic BLAST相同性検索 (Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaafer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997) "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." Nucleic Acids Res. 25:3389-3402に説明されており、本明細書にその内容を参照により援用する)、(2) BLAST 2アラインメント（以下に説明するパラメータを用いる）及び/または(3) 標準デフォルトパラメータ

タを用いる Position-Specific Iterated BLAST (PSI-BLAST) により実施される相同性の評価を指す。なお、BLAST 2.0 Basic BLAST と BLAST 2 では標準パラメータが一部異なるため、2つの特定の配列が BLAST 2 プログラムでは有意な相同性を有すると認識され得るが、一方の配列をクエリ配列として用いる BLAST 2.0 Basic BLAST による検索では第2の配列をトップマッチとして同定しないかもしれないことに留意されたい。さらに、PSI-BLAST は、自動化された簡便なバージョンの「プロファイル」検索を提供しており、配列相同体を高感度で探す。このプログラムではまず gapped BLAST データベース検索を行う。PSI-BLAST プログラムは、戻り値の有意なアラインメントの情報を用いて部位特異的スコアマトリックスを構築し、これが次のデータベース検索用のクエリ配列と置き換わる。したがって、同一性パーセントは、これらのプログラムのうちのどれを用いても決定できることを理解されたい。

【0038】

たとえば、Tatusova and Madden (1999) の "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", FEMS Microbiol Lett. 174: 247-250 (本明細書にその内容を参照により援用する) に説明されているように、BLAST 2 の配列を使って2つの特定の配列を互いに対してアラインメントできる。BLAST 2 の配列アラインメントは、BLAST 2.0 アルゴリズムを用いて blastp または blastn で実行されて、2つの配列間の Gapped BLAST 検索 (BLAST 2.0) を実行して結果のアラインメントにギャップ (欠失及び挿入) を差し込むことを可能にする。本明細書では明瞭さを期して、BLAST 2 の配列アラインメントを以下の標準デフォルトパラメータを用いて行う。blastn の場合、0 BLOSUM62 マトリックスを用いて、一致の報酬 = 1、不一致のペナルティ = -2、ギャップ開始時ペナルティ (5)、ギャップ伸長時ペナルティ (2)、ギャップ x_ ドロップオフ (50)、期待値 (10)、配列長 (11)、フィルタ (オン) とする。blastp の場合、0 BLOSUM62 マトリックスを用いて、ギャップ開始時ペナルティ (11)、ギャップ伸長時ペナルティ (1)、ギャップ x_ ドロップオフ (50)、期待値 (10)、配列長 (3)、フィルタ (オン) とする。

【0039】

本明細書でその配列を提供する各フラグメントは、18S rRNA 遺伝子の同じ領域に沿って伸長するが、18S rRNA 遺伝子配列に関しては異なる塩基位置で開始し終了する。たとえば、配列番号 1、5 及び 9 はすべて図 1 の「フラグメント 1」に対応するが、長さが異なり、異なる位置で開始及び／または終了する場合があります。配列番号 2、6 及び 10 はすべて図 1 の「フラグメント 2」に対応するが、長さが異なり、異なる位置で開始し終了する場合があります。配列番号 3、7 及び 11 はすべて図 1 の「フラグメント 3」に対応するが、長さが異なり、異なる位置で開始及び／または終了する場合があります。配列番号 4、8 及び 12 はすべて図 1 の「フラグメント 4」に対応するが、長さが異なり、異なる位置で開始し終了する場合があります。したがって、18S rRNA 遺伝子の同一のフラグメントに対応するこれらの配列間の同一性%は、BLAST アラインメントが開始 (または終了) する部位に基づいて計算される場合もあり、それは、ある配列の最初のヌクレオチドから 10 個、20 個、50 個、75 個、100 個または 200 個のヌクレオチド以内であり得、ある配列の最初のヌクレオチドから 10 個、20 個、50 個、75 個、100 個または 200 個のヌクレオチド以内であり得る。同様に、本明細書に提供する配列番号 1~12 に対する他の配列の同一性%を評価する場合、同一性%は、2つのフラグメント間で BLAST アラインメントが開始し終了する部位で開始し終了し得る。好ましくは、本明細書で特定する同一性%は、配列番号 1~12 のいずれかの少なくとも 200 個、少なくとも 300 個、または少なくとも 400 個の連続するヌクレオチドに亘り、さらに好ましくは配列番号 1~12 のいずれかの少なくとも 500 個のヌクレオチドに亘る。

【0040】

本発明は、配列番号1、配列番号2、配列番号3または配列番号4と少なくとも95%、96%、97%、97.5%、98%、98.1%、98.2%、98.3%、98.4%、98.5%、98.6%、98.7%、98.8%、98.9%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%または99.9%の同一性を有する配列を含む18SリボソームRNA遺伝子を有する、不等毛類ラビリンチュラ綱の変異微生物を提供する。いくつかの例では、変異微生物は、配列番号1、配列番号2、配列番号3及び配列番号4と少なくとも95%、96%、97%、97.5%、98%、98.1%、98.2%、98.3%、98.4%、98.5%、98.6%、98.7%、98.8%、98.9%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%または99.9%の同一性を有する配列を含む18SリボソームRNA遺伝子を有する。微生物は、好ましくは、生産される油の脂肪酸の少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、約40%、または少なくとも45%がDHAである微生物油を生産でき、また好ましくは、脂質生合成阻害剤の非存在下で、生産される微生物油の脂肪酸の少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、約40%、または少なくとも45%がDHAである微生物油を生産できる。変異微生物は、さらに、たとえば、脂肪酸の少なくとも6%、少なくとも8%、少なくとも10%、少なくとも12%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、または少なくとも30%がミリスチン酸である微生物油を生産でき、好ましくは、脂質生合成阻害剤の非存在下で、生産される微生物油の脂肪酸の少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、約40%、または少なくとも45%がDHAである脂質を生産できる。いくつかの例では、微生物は、脂肪酸の50%未満、40%未満、30%未満、または20%未満がパルミチン酸である微生物油を生産する。たとえば、変異微生物が生産する総脂肪酸のパーセンテージは、パルミチン酸よりもミリスチン酸のほうが高くなり得る。いくつかの例では、変異微生物は、小規模回分培養で、少なくとも45mg/リットル/時間のペースでDHAを生産できる。いくつかの例では、好ましくは、株は、体積2~10mLの回分培養で、たとえば体積5~6mLなど体積4~8mLの回分培養で、約12~約24時間インキュベートされて、少なくとも45mg/L/h、約50mg/L/h、少なくとも50mg/L/h、少なくとも100mg/L/h、少なくとも130mg/L/h、少なくとも160mg/L/h、少なくとも190mg/L/h、または少なくとも200mg/L/hのペースでDHAを生産できる。好ましい例では、株は、DHA対ドコサペンタエン酸(DPA)の比が少なくとも約3.5:1かまたは少なくとも約4.0:1である脂質を生産できる。微生物は、好ましくは、脂肪酸の5%未満、2%未満、1%未満、または約0.5%未満がEPAである脂質を生産できる。さらに、微生物は、好ましくは、脂肪酸の2%未満、1%未満、約0.5%未満、または約0.2%未満がARAである脂質を生産する。

【0041】

本発明はまた、配列番号5、配列番号6、配列番号7または配列番号8と少なくとも95%、96%、97%、97.5%、98%、98.1%、98.2%、98.3%、98.4%、98.5%、98.6%、98.7%、98.8%、98.9%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、または99.9%の同一性を有する配列を含む18SリボソームRNA遺伝子を有する、不等毛類ラビリンチュラ綱の変異微生物を提供する。いくつかの例では、変異微生物は、配列番号5、配列番号6、配列番号7及び配列番号8と少なくとも95%、96%、97%、97.5%、98%、98.1%、98.2%、98.3%、98.4%、98.5%、98.6%、98.7%、98.8%、98.9%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、または99.9%の同一性を有する配列を含む18SリボソームRNA遺伝子

を有する。微生物は、好ましくは、生産される油の脂肪酸の少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、約40%、または少なくとも45%がDHAである微生物油を生産でき、また好ましくは、脂質生合成阻害剤の非存在下で、生産される微生物油の脂肪酸の少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、約40%、または少なくとも45%がDHAである微生物油を生産できる。変異微生物は、さらに、たとえば、脂肪酸の少なくとも6%、少なくとも8%、少なくとも10%、少なくとも12%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、または少なくとも30%がミリスチン酸である微生物油を生産でき、好ましくは、脂質生合成阻害剤の非存在下で、生産される微生物油の脂肪酸の少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、約40%、または少なくとも45%がDHAである脂質を生産できる。いくつかの例では、微生物は、脂肪酸の50%未満、40%未満、30%未満、または20%未満がパルミチン酸である微生物油を生産する。たとえば、変異微生物が生産する総脂肪酸のパーセンテージは、パルミチン酸よりもミリスチン酸のほうが高くなり得る。いくつかの例では、変異微生物は、小規模回分培養で、少なくとも45mg/リットル/時間のペースでDHAを生産できる。いくつかの例では、好ましくは、株は、体積2~10mLの回分培養で、たとえば体積5~6mLなど体積4~8mLの回分培養で、約12~約24時間インキュベートされて、少なくとも45mg/L/h、約50mg/L/h、少なくとも50mg/L/h、少なくとも100mg/L/h、少なくとも130mg/L/h、少なくとも160mg/L/h、少なくとも190mg/L/h、または少なくとも200mg/L/hのペースでDHAを生産できる。好ましい例では、株は、DHA対ドコサペンタエン酸(DPA)の比が少なくとも約3.5:1かまたは少なくとも約4.0:1である脂質を生産できる。微生物は、好ましくは、脂肪酸の5%未満、2%未満、1%未満、または約0.5%未満がEPAである脂質を生産できる。さらに、微生物は、好ましくは、脂肪酸の2%未満、1%未満、約0.5%未満、または約0.2%未満がARAである脂質を生産する。いくつかの例では、変異微生物は、NH-05783(NRR L-50836)であるか、またはその由来株である。

【0042】

本発明はまた、配列番号9、配列番号10、配列番号11または配列番号12と少なくとも95%、96%、97%、97.5%、98%、98.1%、98.2%、98.3%、98.4%、98.5%、98.6%、98.7%、98.8%、98.9%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%または99.9%の同一性を有する配列を含む18SリボソームRNA遺伝子を有する、不等毛類ラビリンチュラ綱の変異微生物を提供する。いくつかの例では、変異微生物は、配列番号9、配列番号10、配列番号11及び配列番号12と少なくとも95%、96%、97%、97.5%、98%、98.1%、98.2%、98.3%、98.4%、98.5%、98.6%、98.7%、98.8%、98.9%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%または99.9%の同一性を有する配列を含む18SリボソームRNA遺伝子を有する。微生物は、好ましくは、生産される油の脂肪酸の少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、約40%、または少なくとも45%がDHAである微生物油を生産でき、また好ましくは、脂質生合成阻害剤の非存在下で、生産される微生物油の脂肪酸の少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、約40%、または少なくとも45%がDHAである微生物油を生産できる。変異微生物は、さらに、たとえば、脂肪酸の少なくとも6%、少なくとも8%、少なくとも10%、少なくとも12%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、または少なくとも30%がミリスチン酸である微生物油を生産でき、好ましくは、脂質生合成阻害剤の非存在下で、生産される微生物油の脂肪酸の少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、約40%、または少なくとも45%がDHAである

10

20

30

40

50

脂質を生産できる。いくつかの例では、微生物は、脂肪酸の50%未満、40%未満、30%未満、または20%未満がパルミチン酸である微生物油を生産する。たとえば、変異微生物が生産する総脂肪酸のパーセンテージは、パルミチン酸よりもミリスチン酸のほうが高くなり得る。いくつかの例では、変異微生物は、小規模回分培養で、少なくとも45mg/リットル/時間のペースでDHAを生産できる。いくつかの例では、好ましくは、株は、体積2~10mLの回分培養で、たとえば体積5~6mLなど体積4~8mLの回分培養で、約12~約24時間インキュベートされて、少なくとも45mg/L/h、約50mg/L/h、少なくとも50mg/L/h、少なくとも100mg/L/h、少なくとも130mg/L/h、少なくとも160mg/L/h、少なくとも190mg/L/h、または少なくとも200mg/L/hのペースでDHAを生産できる。好ましい例では、株は、DHA対ドコサペンタエン酸(DPA)の比が少なくとも約3.5:1かまたは少なくとも約4.0:1である脂質を生産できる。微生物は、好ましくは、脂肪酸の5%未満、2%未満、1%未満、または約0.5%未満がEPAである脂質を生産できる。さらに、微生物は、好ましくは、脂肪酸の2%未満、1%未満、約0.5%未満、または約0.2%未満がARAである脂質を生産する。いくつかの例では、変異微生物は、NH-06161(NRRL-50837)であるか、またはその由来株である。

10

【0043】

「由来体(derivative)」という用語を株に関して使用する場合は、ある株またはその子孫株の変異体及びバリエーションを包含する。したがって、たとえばある野生株の由来株は、野生株または天然株に直接由来することもできるし、野生株または天然株に

20

【0044】

さまざまな実施形態では、本明細書で提供する変異株は、体積が少なくとも100mL、少なくとも200mL、少なくとも500mL、または少なくとも1リットルの培養中、少なくとも50mg/L/h、少なくとも100mg/L/h、少なくとも150mg/L/h、少なくとも200mg/L/h、少なくとも250mg/L/h、少なくとも300mg/L/h、少なくとも350mg/L/h、または少なくとも400mg/L/hのDHAを生産できる。

【0045】

本発明はまた、変異ラビリンチュラ綱株を提供するが、これらの株は、由来元の野生株または原株と比べて、株が生産する総脂肪酸のパーセンテージとしてミリスチン酸が増加した変異体である。そのような変異株は、たとえば、ラビリンチュラ属、ラビリンチュロイデス属、トラストキトリウム属、シゾキトリウム属、アプラノキトリウム属、オーランチオキトリウム属、ジャポノキトリウム属、オブロンギキトリウム属、ディプロフリス属、またはウルケニア属の株であり得る。たとえば、本明細書で提供する変異株は、トラストキトリウム属、シゾキトリウム属またはオーランチオキトリウム属の株であり得る。たとえば、高パーセンテージの脂肪酸をミリスチン酸として生産する変異株は、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11及び配列番号12のいずれかと少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも98.5%、少なくとも99%、少なくとも99.1%、少なくとも99.2%、少なくとも99.3%、少なくとも99.4%、少なくとも99.5%、少なくとも99.6%、少なくとも99.7%、少なくとも99.8%、少なくとも99.9%、または100%同一である18SrDNA配列を有するオーランチオキトリウム属株かシゾキトリウム属株であり得る。総脂肪酸としてのミリスチン酸パーセントは、由来元の株により生産されるミリスチン酸パーセントと比べて、変異ラビリンチュラ綱微生物で50%以上増加し得る。さまざまな例で、生産される総脂肪酸としてのミリスチン酸パーセントは、由来元の株と比べて、変異体では少なくとも100%増加する。

30

40

【0046】

さまざまな例で、由来元の株が生産するよりも高パーセンテージの総脂肪酸をミリスチ

50

ン酸として生産する本明細書で提供する変異ラビリンチュラ綱株は、総脂肪酸の少なくとも10%、少なくとも20%、または少なくとも30%がミリスチン酸である脂肪酸を生産できる。株は、トリクロサン及び／またはセルレニンに抵抗性があり得る。微生物は、好ましくは、培養液中の脂質生合成阻害剤の非存在下で、生産される脂肪酸の少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも25%、または少なくとも30%がミリスチン酸である脂質を生産できる。株は、さらに、総脂肪酸のパーセントとしてより多くのPUFAを生産し得る。

【0047】

たとえば、本発明はまた、変異ラビリンチュラ綱株を提供し、これらの株は、由来元の野生株と比べて、生産される総脂肪酸パーセンテージとして増量したDHA、そしてさらには生産される総脂肪酸パーセンテージとして増量したミリスチン酸を有する変異体である。たとえば、由来元の株により生産されるDHAパーセントとミリスチン酸パーセントと比べて、変異ラビリンチュラ綱微生物では、生産される総脂肪酸としてのDHAパーセントは20%以上増加し得、生産される総脂肪酸としてのミリスチン酸パーセントは50%以上増加し得る。さまざまな例で、由来元の株と比べて、変異体では、生産される総脂肪酸のDHAパーセントは少なくとも30%増加し、生産される総脂肪酸としてのミリスチン酸パーセントは少なくとも100%増加する。株は、セルレニン及び／またはトリクロサンなどの脂肪酸シターゼ阻害剤に抵抗性があり得る。

【0048】

さまざまな例で、由来元の株が生産するよりも高いパーセンテージの脂肪酸をドコサヘキサエン酸（DHA）として、及び高いパーセンテージの脂肪酸をミリスチン酸として生産する本明細書で提供する変異ラビリンチュラ綱株は、総脂肪酸の少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、または少なくとも39%がDHAであり、総脂肪酸の少なくとも10%、少なくとも20%、または少なくとも30%がミリスチン酸である脂肪酸を生産できる。由来元の株が生産するよりも高パーセンテージの脂肪酸をドコサヘキサエン酸（DHA）として、及び高パーセンテージの脂肪酸をミリスチン酸として生産する本明細書で提供する変異ラビリンチュラ綱株は、培養液中の脂質生合成阻害剤の非存在下で、総脂肪酸の少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、または少なくとも39%がDHAであり、総脂肪酸の少なくとも10%、少なくとも20%、または少なくとも30%がミリスチン酸である脂肪酸を生産できる。本明細書で提供する変異ラビリンチュラ綱株は、小規模の回分発酵培養で、少なくとも150mg/L/h、少なくとも160mg/L/h、少なくとも170mg/L/h、少なくとも180mg/L/h、少なくとも190mg/L/h、少なくとも200mg/L/h、または少なくとも210mg/L/hのペースでDHAを生産できる。本明細書で提供する変異ラビリンチュラ綱株は、由来元の株よりも高いペースでDHAを生産できる。

【0049】

変異ラビリンチュラ綱株により生産される総脂肪酸には、たとえば、10%以下のDPA、9%以下のDPA、8%以下のDPA、7%以下のDPA、10%以下のDPA、または6%以下のDPAが含有され得る。本明細書で提供する変異ラビリンチュラ綱株により生産される脂肪酸中のDHA対DPAの比は、約4:1かそれ以上、たとえば、約4.5:1かそれ以上、約4.9:1かそれ以上、または約5:1であり得る。

【0050】

本発明には、本明細書で提供する変異ラビリンチュラ綱微生物を含む分離ラビリンチュラ綱バイオマスも含まれる。いくつかの実施形態では、バイオマスの乾燥菌体重量の少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、または少なくとも80%が脂肪酸である。いくつかの実施形態では、バイオマスは、脂肪酸の少なくとも20重量%、少なくとも30重量%、少なくとも40重量%、少なくとも50重量%、少なくとも60重量%、少なくとも70重量%、または少なくとも80重量%をDHAとして含む。いくつかの実施形態では、バイオマスは、脂肪酸の少なくとも6重量%、少なくとも8重量%、少なくとも10重量%、少なく

とも12重量%、少なくとも15重量%、少なくとも20重量%、少なくとも25重量%、または少なくとも30重量%をミリスチン酸として含む。いくつかの実施形態では、バイオマスは、脂肪酸の6重量%以下、5重量%以下、4重量%以下、3重量%以下、2重量%以下、1重量%以下、または0.55重量%以下をEPAとして含む。いくつかの実施形態では、バイオマスはEPAをほぼ含まない。いくつかの実施形態では、バイオマスは、脂肪酸の約0.5重量%～約1重量%、約0.5重量%～約2重量%、約0.5重量%～約5重量%、約0.5重量%～約6重量%、約1重量%～約5重量%、約1重量%～約6重量%、約2重量%～約5重量%、または約2重量%～約6重量%、または約2重量%～約10重量%をDPAとして含む。

【0051】

微生物油

本発明はさらに、本明細書で提供する微生物によって生産される微生物油に関する。本発明の微生物油は微生物由来のどのような油でもよく、たとえば微生物バイオマスから抽出したまま未処理の粗油、微生物粗油を精製、漂白及び／または脱臭などの処理工程で処理して得られる精製油、微生物粗油または精製した微生物油を希釈して得られる希釈微生物油、またはたとえば微生物粗油または精製した微生物油をさらに不純物除去法で処理して油中の（DHAなどの）脂肪酸濃度を高めて得られる濃縮油が例として挙げられるが、特に断らない限りは、本明細書で開示する微生物油は、微生物または微生物バイオマスから抽出された未処理の粗油である。たとえば、限定ではないがヘキサンなどの炭化水素、メタノールなどのアルコール、クロロホルム、塩化メチレンなどが例として挙げられる有機溶媒または水と混和する溶媒などの溶媒を加えて、溶解細胞または非溶解細胞を抽出することによって、粗油を得ることができる。

【0052】

本明細書に開示の粗油に含まれる脂肪酸含有量は、一般には、本明細書の実施例で説明する脂肪酸メチルエステル（FAME）分析により決定される。本明細書では、「fatty acids（脂肪酸）」という用語（ならびに「オメガー3脂肪酸」「PUFA」「DHA」「ミリスチン酸」などの他の脂肪酸の用語）は、細胞脂質または微生物油の脂肪酸含有量に関して使われる場合は、遊離脂肪酸に加えて、限定ではないがトリグリセリド、ジグリセリド及びモノグリセリド、ワックスエステル、ならびにリン脂質などの極性脂質などの脂質の文脈での脂肪酸（たとえばエステル化されるかまたはその他生化学的に他の化学部分に接合されたアシル鎖など）を指す。したがって、微生物油の総脂肪酸中のDHAなど特定の脂肪酸種のパーセンテージとは、たとえばグリセロ脂質やリン脂質中の脂肪酸を含み、総脂肪酸のパーセントまたは「FAME脂質パーセント」として表される。

【0053】

いくつかの実施形態では、微生物油にはDHAが少なくとも20重量%、少なくとも25重量%、少なくとも30重量%、少なくとも35重量%、少なくとも40重量%、少なくとも45重量%、少なくとも50重量%、少なくとも55重量%、少なくとも60重量%、少なくとも65重量%、少なくとも70重量%、少なくとも75重量%、または少なくとも80重量%含まれる。いくつかの例では、微生物油は、脂質の脂肪酸の少なくとも10%、少なくとも20%、または少なくとも30%をミリスチン酸として含み得る。いくつかの実施形態では、微生物油は、FAMEの約10%以下、約9%以下、約8%以下、約7%以下、約6%以下、約5%以下、約4%以下、約3%以下、約2%以下、または約1%以下をEPAとして含む。いくつかの実施形態では、微生物油は、EPAをほぼ含まない。いくつかの実施形態では、微生物油は、FAMEの約0.5%～約1%、約0.5%～約2%、約0.5%～約2.5%、約0.5%～約3%、約0.5%～約3.5%、約0.5%～約5%、約0.5%～約6%、約1%～約2%、約2%～約3%、約2%～約3.5%、約1%～約2.5%、約1%～約3%、約1%～約3.5%、約1%～約5%、または約1%～約6%をDPA n6として含む。いくつかの実施形態では、微生物油は、DHA対DPA n6の重量比が、約4：1かそれ以上、少なくとも5：1、ま

10

20

30

40

50

たは少なくとも6：1である。

【0054】

脂質の生産

脂質は、本発明の1種類以上の分離ラビリンチュラ綱微生物またはその由来体を用いて生産され得る。ラビリンチュラ綱類のバイオマスの接種、増殖及び回収のさまざまな発酵パラメータは、米国特許第5, 130, 242号、同第6, 582, 941号、同第8, 207, 363号、同第6, 607, 900号、同第6, 607, 900号及び米国特許出願公開第20080155705号にも説明されているように当分野では知られており、これらの文書すべてを参照により本明細書に援用する。

【0055】

ラビリンチュラ綱微生物の増殖にはどのような培地を使ってもよい。たとえば、ラビリンチュラ綱類を培養するレシピは、米国特許第8, 207, 363号にも記載されているし、本明細書の実施例でも説明されている。培養培地は、随意で、最終的な培地配合のたとえば1%~9%の希釈で存在し得る天然または人工の海水を含む場合がある。ラビリンチュラ綱微生物の培養培地は、微生物用に少なくとも1種類の炭素源を含む。培養培地中に存在し得る炭素源の例としては、限定ではないが、グルコース、フルクトース、ガラクトース、L-アラビコース（ガラクトース由来）、ラクトース、ラクツロース、マルトース、maltroseキシロース、サッカロース、可溶性デンプン、デキストリン（トウモロコシ由来）及びアルファシクロデキストリン（デンプン由来）、グリコーゲン、ゼラチン、糖蜜、コーンステープリカー、m-イノシトール（コーンステープリカー由来）、グルコサミン、デキストラン、脂肪、油、グリセロール、アセテート（たとえば酢酸ナトリウム、酢酸カリウム）、酢酸、マンニトール、エタノール、ガラクトuron酸（ペクチン由来）、セロビオース（セルロース由来）、ならびにマルチトール、エリスリトール及びアドニトールなどのポリオール、ならびにグリセロール及びtween 80などのオレイン酸、ならびにN-アセチル-D-ガラクトサミン、N-アセチル-D-グルコサミン及びN-アセチル-β-D-マンノサミンなどのアミノ糖が挙げられる。培養培地は、窒素源を含むことができ、それはたとえば、酢酸アンモニウム、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウムまたは硝酸アンモニウムなどの無機窒素源であり得る。あるいは、またはそれに加えて、培養培地に与えられる窒素源は、有機窒素源であり得、限定ではないが、ペプトン、酵母エキス、ポリペプトン、麦芽エキス、大豆粉、肉エキス、魚肉、カザミノ酸、コーンステープリカー、グルタメート又は尿素が例として挙げられる。培養培地はまた、リン酸カリウムやリン酸ナトリウムなど何らかの形のリン酸塩、及び無機塩、酸、または塩基を含み、それらはたとえば硫酸アンモニウム、水酸化アンモニウム、塩化マグネシウム、硫酸マグネシウム、水酸化カリウム、重炭酸ナトリウム、ホウ酸、クエン酸、リン酸、オルトバナジン酸ナトリウム、クロム酸カリウム、塩化カリウム、塩化ナトリウム、硫酸ナトリウム、モリブデン酸ナトリウム、亜セレン酸、硫酸ニッケル、硫酸銅、硫酸亜鉛、塩化コバルト、塩化鉄、塩化マンガン及び塩化カルシウムなど、微量栄養素も含めて栄養素を補給できるものである。1種類以上のキレート化合物（たとえばエチレンジアミン四酢酸、クエン酸またはクエン酸塩）もまた培養培地中に存在し得る。さらに、1種類以上のビタミン、たとえば限定ではないが、塩酸ピリドキシン、塩酸チアミン、パントテン酸カルシウム、p-アミノ安息香酸、リボフラビン、ニコチン酸、ビオチン、葉酸及びビタミンB₁₂も培地成分として存在し得る。

【0056】

いくつかの実施形態では、培養培地には、飽和度パーセントで少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、または少なくとも90%の溶解酸素が含まれる。いくつかの実施形態では、培養培地には、飽和度パーセントで約5%~約20%、約5%~約50%、約5%~約100%、約10%~約20%、約10%~約50%、約10%~約100%、約20%~約50%、または約20%~約100%の溶解酸素が含まれる。

【0057】

発酵体積は実施可能などのような体積でもよい。いくつかの実施形態では、発酵体積（培養体積）は、少なくとも約1リットルまたは少なくとも約2リットル、少なくとも約5リットル、少なくとも約10リットル、少なくとも約50リットル、少なくとも約100リットル、少なくとも約200リットル、少なくとも約500リットル、少なくとも約1000リットル、少なくとも約10,000リットル、少なくとも約20,000リットル、少なくとも約50,000リットル、少なくとも約100,000リットル、少なくとも約150,000リットル、少なくとも約200,000リットル、または少なくとも約250,000リットルである。いくつかの実施形態では、発酵体積は、約1リットル～約300,000リットル、約2リットル、約10リットル、約50リットル、約100リットル、約200リットル、約500リットル、約1000リットル、約10,000リットル、約20,000リットル、約50,000リットル、約100,000リットル、約150,000リットル、約200,000リットル、約250,000リットル、または約300,000リットルである。

10

【0058】

発酵は、温度約15℃～約40℃、たとえば約17℃～約35℃、または約18℃～約35℃、または約20℃～約32℃、または約22℃～約30℃で実施することができる。たとえば、少なくとも発酵の1つの段階を温度約17℃、約18℃、約19℃、約20℃、約21℃、約22℃、約23℃、約24℃、約25℃、約26℃、約27℃、約28℃、約29℃、約30℃、約31℃、約32℃、約33℃、約34℃、または約35℃で実施することができる。培養培地のpHは約4.0～約8.5であり得、たとえば培養培地のpHは約4.2～約8.0、または約pH4.5～約pH7.8、または約5.0～約7.5であり得、たとえば発酵は約pH4.5～約pH5.0、約pH5.0～約pH5.5、約pH5.5～約pH6.0、約pH6.0～約pH6.5、約pH6.5～約pH7.0、約pH7.0～約pH7.5、約pH7.5～約pH8.0、または約pH8.0～約pH8.5の培地でなされ得る。

20

【0059】

培養は、通気振盪培養、振盪培養、静置培養、回分培養、流加培養、連続培養、ローリング回分培養またはwave式培養などで、1～30日間、1～21日間、1～15日間、1～12日間、1～9日間、1～7日間、または1～5日間かけて、温度4～40℃で、好ましくは18～35℃で行うことができる。さまざまな培養法で、たとえば温度、溶解酸素濃度、攪拌または攪乱度、1種類以上の栄養素の可用性などが異なり得る2つ以上の培養期（たとえば増殖期と脂質生産期）があり得る。

30

【0060】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供する分離ラビリンチュラ綱の培養は、炭素源、窒素源及び栄養源を有する約pH4.5～約pH8.0、約15℃～約35℃の培養培地での培養期の間、少なくとも約2g/L/日、少なくとも約4g/L/日または少なくとも約8g/L/日のオメガー3脂肪酸生産性を有する。いくつかの実施形態では、分離ラビリンチュラ綱の培養は、炭素源、窒素源及びその他の栄養源を有する約pH4.5～約pH7.5、約20℃～約35℃の培養培地での培養期の間、約1g/L/日～約30g/L/日、約2g/L/日～約25g/L/日、約2g/L/日～約25g/L/日、約3g/L/日～約20g/L/日または約4g/L/日～約20g/L/日のオメガー3脂肪酸生産性を有する。

40

【0061】

抽出

さまざまな培養培地での発酵で得られた細胞バイオマスを回収するには、濾過や遠心分離などさまざまな手順を用いることができる。次いで細胞を洗浄し、凍結、凍結乾燥またはスプレー乾燥させ、酸素を存在させない非酸化環境で保存した後、加工食品や飼料に混合することができる。

【0062】

50

D H Aを含有する脂質は、回収した細胞バイオマスをと例えばミリング、超音波処理または他の何らかの便利な手段で破壊または破碎してから、クロロホルム、ヘキサン、塩化メチレン、メタノール、エタノールなどの溶媒を用いるかまたは超臨界流体抽出手段により抽出することで、得ることができる。オメガー3多価不飽和脂肪酸は、脂質を加水分解して、高不飽和画分を尿素付加や分留、カラムクロマトグラフ法または超臨界流体分画など従来の方法により濃縮することで、さらに濃縮することができる。また、細胞を破壊または溶解して、脂質を植物油または動物油（たとえば魚油）として抽出することができる。抽出した油は、植物油を精製するのに日常的に使われる公知の方法（たとえば化学的または物理的な精製法）で精製することができる。このような精製法により、抽出された油を食用油として使用または販売する前に、不純物が除去される。精製後、油を直接飼料や食品の添加物として用いて、オメガー3及び／またはオメガー6強化製品を製造することができる。あるいは、以下に説明するように油をさらに処理して精製してから、上述の用途や、医薬用途にも使用できる。

10

【0063】

オメガー3またはオメガー6強化（濃縮）油を製造する別の方法では、採取した細胞バイオマス（新鮮または乾燥済）を、超音波処理、液せん断破壊、ビーズミル、高圧印加、凍結融解または細胞壁の酵素消化などの公知の技法により、破裂させるかまたは透過処理することができる。破裂細胞の脂質は、ヘキサン、クロロホルム、エーテルまたはメタノールなどの溶媒または混合溶媒を用いて抽出する。溶媒を除去し、塩基、酸または酵素による加水分解など、トリグリセリドを遊離脂肪酸または脂肪酸エステルに転換する任意の公知の方法で、脂質を加水分解する。加水分解が完了すると、非鹼化合物をエーテル、ヘキサンまたはクロロホルムなどの溶媒中に抽出して、除去する。次いで残った溶液に酸を添加して酸性化し、遊離脂肪酸をヘキサン、エーテルまたはクロロホルムなどの溶媒中に抽出する。次に、遊離脂肪酸を含有する溶媒溶液を非PUFA化合物が結晶化する温度にまで冷却すると、非PUFA化合物を濾過、遠心分離または沈殿により除去することができる。残ったPUFAが濃縮液中に得られ、人間用の栄養サプリメントとして、食品添加物として、または医薬用途に用いられる。

20

【0064】

製品

本発明の組成物としては、限定ではないが、食品、医薬組成物、化粧品及び産業組成物が挙げられる。

30

【0065】

本明細書で提供する微生物油を含み得る食品には、固体と液体両方の組成物が含まれる。食品は、動物や人間の食物の添加剤であり得る。食物としては、限定ではないが、一般的な食物、（ミルク、飲料、治療飲料及び栄養飲料などの）液体製品、機能性食品、サプリメント、栄養補助食品、（未熟児用も含む）乳児用調合乳、妊婦や授乳中の女性用の食品、成人用食品、老人用食品及び動物飼料などが挙げられる。

【0066】

本発明のラビリンチュラ綱バイオマスまたは微生物油は、油、ショートニング、スプレッド、その他の脂肪性材料、飲料、ソース、（ミルク、ヨーグルト、チーズ、アイスクリームなどの）乳製品もしくは大豆製品、焼いた食品、たとえば（カプセル剤や錠剤としての）栄養サプリメントなどの栄養製品、ビタミンサプリメント、ダイエットサプリメント、粉末飲料、完成（finished）もしくは半完成（semi-finished）粉末食品、及びそれらの組合せのうちの1つ以上にそのまま用いられるか、または添加剤として用いられ得る。

40

【0067】

いくつかの実施形態では、組成物は、限定ではないが水生動物や陸生動物の飼料を含む動物飼料である。いくつかの実施形態では、組成物は、肉、卵またはミルクが人間の消費用に採取される何らかの動物などの、肉または産物を人間が消費する何らかの動物用の飼料または飼料サプリメントである。これら動物に給餌すると、LC-PUFAなどの栄養

50

分がその動物の肉、ミルク、卵または他の産物に吸収される場合があり、そのような栄養分の含有量が増加し得る。

【0068】

いくつかの実施形態では、組成物は、医薬組成物である。適切な医薬組成物としては、限定ではないが、抗炎症組成物、冠動脈心疾患の治療薬、動脈硬化治療薬、化学療法剤、活性賦形剤、骨粗しょう症薬、抗鬱剤、抗痙攣薬、抗ピロリ菌薬、神経変性疾患治療薬、肝臓変性疾患治療薬、抗生物質、コレステロール降下組成物及びトリグリセリド降下組成物が挙げられる。いくつかの実施形態では、組成物は医療用食品である。医療用食品としては、医師の指示下で外用摂取または投与される組成物に含まれる、何らかの症状に特化した食事管理用の食品が挙げられ、そのための特別な栄養要件は、公認の科学的原理に基づき、医学的評価によって決定される。

10

【0069】

微生物油は剤形として製剤され得る。剤形としては、限定ではないが、錠剤、カプセル剤、カシェー剤、ペレット剤、丸薬、粉末剤や顆粒剤、及び非経口剤形が挙げられ、非経口剤形としては、限定ではないが、有効量の微生物油を含有する溶液、懸濁液、乳剤及び乾燥粉末剤が挙げられる。そのような製剤は、薬学的に許容可能な希釈剤、フィラー、崩壊剤、結合剤、滑剤、界面活性剤、疎水性ビヒクル、水溶性ビヒクル、乳化剤、バッファー、湿潤剤、モイストチャライザー、可溶化剤、保存剤などを含み得ることも当分野で知られている。投与形態としては、限定ではないが、微生物油及び1種類以上の適切な薬学的に許容可能な担体を含有する錠剤、糖衣錠、カプセル剤、カプレット及び丸薬が挙げられ

20

【0070】

経口投与用に、微生物油を当分野で公知の薬学的に許容可能な担体と組み合わせることができる。そのような担体のおかげで、本発明の微生物油を、治療対象が経口摂取する錠剤、丸薬、糖衣錠、カプセル剤、液体、ゲル、シロップ、スラリー、懸濁液などとして製剤することが可能になる。いくつかの実施形態では、剤形は、錠剤、丸薬またはカプレットである。経口利用のための医薬調製物は、所望により適切な補助物質を加えてから、固体の賦形剤を加え、得られた混合物を随意で粉碎し、顆粒状混合物を処理して、錠剤または糖衣錠の芯剤を得ることにより、得られ得る。適切な賦形剤としては、限定ではないが、糖（限定ではないが、ラクトース、スクロース、マンニトール及びソルビトールなど）や、セルロース調製物（限定でないが、トウモロコシデンプン、小麦デンプン、米デンプン、ジャガイモデンプン、ゼラチン、トラガカントゴム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム及びポリビニルピロリドン（PVP））が挙げられる。所望により、限定ではないが例として、架橋ポリビニルピロリドン、寒天またはアルギン酸もしくはその塩（たとえばアルギン酸ナトリウム）などの崩壊剤を加えることができる。経口利用可能な医薬調製物としては、限定ではないが、ゼラチン製のプッシュフィット型カプセル剤、ならびにゼラチンと（グリセロールやソルビトールなどの）可塑剤とで作製された密閉型軟カプセル剤が挙げられる。

30

【0071】

さらなる実施形態では、組成物は、化粧品または身だしなみ用品である。化粧品や身だしなみ用品としては、限定ではないが、乳液、クリーム、ローション、マスク、石鹸、シャンプー、シェービングクリーム、洗顔剤、フェイシャルクリーム、コンディショナー、メイクアップ用品、入浴剤及び消散剤が挙げられる。化粧品は薬用または非薬用であり得る。

40

【0072】

由来株の分離方法

本明細書ではさらに、脂質生産性が強化された微生物株を分離する方法を提供し、該方法には、脂質代謝に関与する酵素の活性を阻害する少なくとも1種類の化合物を含む培養培地を含むサイトスタットまたはケモスタットで原微生物株を培養して、阻害剤により選択された集団を提供することと、阻害剤により選択された集団から原微生物株と比べて脂

50

質生産性が高い微生物を分離して、脂質生産性が強化された由来株を提供すること、が含まれる。強化された脂質生産性としては、限定ではないが、任意の種類の脂質または特定の脂質の総生産量または生産率の増加が挙げられ、脂質としては、限定ではないが、総脂質、中性脂質、FAME脂質（「FAME」）、総脂肪酸、任意の脂肪酸または脂肪酸誘導体（たとえば1種類以上の脂肪酸、脂肪酸アルコール、脂肪酸エステル、ワックスエステル、アルカンもしくはアルケン）、トリグリセリド（TAG）、不飽和脂肪酸、オレイン酸、オメガー3脂肪酸、DHA、EPA、オメガー6脂肪酸、ARA、飽和脂肪酸、パルミチン酸、ミリスチン酸などが挙げられる。いくつかの例では、サイトスタットで培養して、サイトスタットにより選択された集団を得る。いくつかの例では、微生物は、サイトスタットまたはケモスタットで培養される前に変異手順を受ける。いくつかの例では、脂質生合成に参与する酵素または因子の阻害剤の存在下で微生物を培養する前に、微生物を脂質生合成阻害剤の非存在下でサイトスタット培養またはケモスタット培養し、増殖特性が改良された1種類以上の微生物を選択することができる。いくつかの例では、変異手順を受ける微生物は、変異誘発手順の後でUV処置され得る。変異誘発後のUV処置は、サイトスタット培養またはケモスタット培養の前に行ってもよいし、変異させた集団を脂質生合成に参与する酵素または因子の阻害剤を含むサイトスタットまたはケモスタットで選択してから行って、阻害剤により選択された変異誘発済み微生物の集団がUV処置されるようにしてもよい。いくつかの例では、選択は脂質生合成阻害剤の存在下でなされ、かつたとえばサイトスタットまたはケモスタットでなされ得る。

10

【0073】

20

微生物または株は、変異誘発手順を複数回受ける場合があり、随意であるが好ましくは、毎回の変異誘発手順の後に、脂質代謝に参与する酵素または因子を阻害する少なくとも1種類の化合物を含むサイトスタットまたはケモスタットで培養される。変異誘発手順を複数回行う場合、随意で、1回の、2回以上の、または毎回の変異誘発手順の後に微生物をUV照射することができる。

【0074】

このように、本明細書では、強化された脂質生産性を有する微生物株を分離する方法を提供し、該方法には、原微生物株に変異誘発手順を施すことと、脂質生合成に参与する酵素または因子の阻害剤の存在下で変異誘発済み微生物をサイトスタット培養またはケモスタット培養して阻害剤により選択された変異誘発済み集団を提供することと、阻害剤により選択された変異誘発済み集団から原微生物株と比べて高い脂質生産性を有する少なくとも1種類の微生物由来株を分離すること、が含まれる。ある例では、方法は、原微生物株に変異誘発手順を施すこと、脂質生合成に参与する酵素または因子の阻害剤の存在下で一定期間にわたり複数回細胞分裂させながら変異誘発済み微生物をサイトスタット培養またはケモスタット培養して、阻害剤により選択された微生物集団を提供すること、少なくとも1種類の変異誘発済み微生物をUV照射すること、及び原株と比べて高い脂質生産性を有する少なくとも1種類の微生物原株の由来株の微生物を分離すること、を含み得る。変異誘発済み微生物を脂質生合成に参与する酵素または因子の阻害剤を含むサイトスタットまたはケモスタットで選択する前及び／または後に、UV照射で処置することができる。脂質生合成に参与する酵素または因子の阻害剤の存在下または非存在下でのサイトスタットまたはケモスタットでの選択は、UV処置の後でも実施できる。

30

40

【0075】

本明細書のさらなる態様では、変異誘発済み株の形質を改善する方法を提供し、該方法では、原微生物株に変異誘発手順を施した後にUV処置を施す。本発明を何ら特定の機構に限定するわけではないが、UV処置は変異誘発済み株の形質を強化する場合がある。UV処置は、変異誘発後、目的の形質についての選択またはスクリーニングの前か後に実施され得る。いくつかの例では、目的の形質についての選択には、サイトスタットまたはケモスタットでの選択が含まれ得る。あるいは、またはそれに加えて、目的の形質についての選択またはスクリーニングには、（1種類以上の化合物に対する抵抗性試験を含む）増殖アッセイ、生化学分析、遺伝子分析、または表現型、細胞もしくは生化学アッセイが含

50

まれ得る。

【0076】

いくつかの例では、目的の形質についての選択またはスクリーニングは、UV処置前に実施される。目的の形質についての選択には、随意で、変異誘発済み微生物をサイトスタット培養またはケモスタット培養することが含まれ得る。いくつかの例では、目的の形質についての選択には、変異誘発済み微生物を、野生型細胞の増殖を阻害するかまたはたとえば脂質代謝に関与する酵素もしくは因子の活性を阻害する少なくとも1種類の化合物を含むサイトスタットまたはケモスタットで培養することが含まれ得る。あるいは、またはそれに加えて、変異誘発済み微生物をたとえば生化学分析または細胞もしくは生化学アッセイでスクリーニングするかまたは特徴づけて、目的の形質、たとえば任意の化合物もしくは化合物群もしくは化合物類に関する生産性、対化合物抵抗性、温度耐性、増殖率などについて評価することができる。

10

【0077】

微生物または株に対して変異誘発手順を複数回行うことができ、随意であるが好ましくは、毎回変異誘発手順をした後にUV照射が実施され得、また随意で、複数回の変異誘発手順の後、UV処置の前及び／または後に、目的の形質について微生物を選択する。

【0078】

本明細書で提供する方法は、任意の対象の微生物株に実施することができ、その非限定的な例は、不等毛類、藻類、菌類または細菌類であり得る。限定ではないが高脂質生産性などの目的の形質があるとして選択される株は、組換え株または非組換え株であり得る。たとえば、株は、対象とする脂質をかなりまたは大量に生産するとして知られていない種の株であり得るが、遺伝子操作によって、脂質生産性を高めるかまたは特定の脂質もしくは脂質類を生産するようになる1種類以上の遺伝子を発現することがあり得る。UV処置を受けた微生物は、分離された単一の細胞由来であり得、または変異誘発手順を受けた細胞集団であり得る。変異誘発手順（たとえば変異誘発化合物を用いての処置、ガンマ線照射、またはUV照射であり得る）に続いてUV処置を受ける微生物は、選択手順の前に、1回以上の変異誘発手順及び／または1回以上のスクリーニングもしくは選択手順を受けている微生物であり得る。

20

【0079】

本明細書の方法で用いる微生物には、原核生物と真核生物を含むあらゆる微生物が含まれ得る。この方法を脂質生産性が強化された株を得るために使用する場合、脂質を自然に蓄積する種が好ましいが、本発明はそのような種に限定されない。本明細書のどの方法でも用いられる微生物は、いくつかの例では、ラビリンチュラ綱の不等毛類株であり得、アプラノキトリウム属、オーランチオキトリウム属、ディプロフリス属、ジャポノキトリウム属、ラビリンチュラ属、ラビリンチュロイデス属、オブロンギキトリウム属、シゾキトリウム属、トラストキトリウム属、またはウルケニア属のいずれかの種などの、たとえばヤブレッツボカビ (*Thrustochytrid*) またはラビリンチュリッドであり得る。

30

【0080】

さらなる例では、微生物は藻類であり得、たとえば、アクナンテス属 (*Achnanthes*)、アンフィプロラ属 (*Amphiproora*)、アンフォラ属 (*Amphora*)、アンキストロデスス属 (*Ankistrodesmus*)、アステロモナス属 (*Asteromonas*)、ボエケロウィア属 (*Boeckelovia*)、ボリドモナス属 (*Bolidomonas*)、ボロディネラ属 (*Borodinella*)、ボトリジウム属 (*Botrydium*)、ボツリオコッカス属、ブラクテアコックス属 (*Bracteococcus*)、キートケロス属 (*Chaetoceros*)、カルテリア属 (*Carteria*)、クラミドモナス属 (*Chlamydomonas*)、クロロコクム属 (*Chlorococcum*)、クロロゴニウム属 (*Chlorogonium*)、クロレラ属、クロオモナス属 (*Chroomonas*)、クリソスファエラ属 (*Chrysosphaera*)、クリコスファエラ属 (*Cricosphaera*)、クリプセコデ

40

50

ィニウム属 (*Crypthecodinium*)、クリプトモナス属 (*Cryptomonas*)、キクロテラ属、ドナリエラ属、エリプソイドン属 (*Ellipsoidon*)、エミリアニア属 (*Emiliania*)、エレモスフェラ属 (*Eremosphaera*)、エルノデスミウム属 (*Ernodesmus*)、ユーグレナ属、ユウスティグマトス属 (*Eustigmatos*)、フランセシア属 (*Franceia*)、フラギラリア属 (*Fragilaria*)、フラギラロプシス属 (*Fragilaropsis*)、グロエオサムニオン属 (*Gloeothamnion*)、ヘマトコッカス属、ハロカフエテリア属 (*Halocafeteria*)、ハンチア属、ヘテロシグマ属 (*Heterosigma*)、ヒメノモナス属 (*Hymenomonas*)、イソクリシス属 (*Isocorysis*)、レポキンクリス属 (*Lepocinclis*)、ミクラクティニウム属 (*Micractinium*)、モノダス属、モノラフィディウム属 (*Monoraphidium*)、ナンノクロリス属 (*Nannochloris*)、ナンノクロロプシス属、ナウィクラ属 (*Navicula*)、ネオクロリス属、ネフロクロリス属 (*Nephrochloris*)、ネフロセルミス属 (*Nephroselmis*)、ニッチア属 (*Nitzschia*)、オクロモナス属 (*Ochromonas*)、サヤミドロ属 (*Oedogonium*)、オオキスティス属 (*Oocystis*)、オストレオコッカス属 (*Ostreococcus*)、パプロバ属、パラクロレラ属 (*Parachlorella*)、パリエトクロリス属、パスケリア属 (*Pascheria*)、ペラゴモナス属 (*Pelagomonas*)、フェオダクチラム属 (*Phaeodactylum*)、ファガス属 (*Phagus*)、ピコクロラム属 (*Picochlorum*)、プラチモナス属 (*Platymonas*)、プレウロクリシス属 (*Pleurochrysis*)、プレウロコッカス属 (*Pleurococcus*)、プロトテカ属 (*Prototheca*)、シュードクロレラ属 (*Pseudochlorella*)、シュードネオクロリス属 (*Pseudoneochloris*)、シュードスタウラスツルム属 (*Pseudostaurastrum*)、ピラミモナス属 (*Pyramimonas*)、ピロボトリス属 (*Pyrobotrys*)、セネデスムス属 (*Scenedesmus*)、シゾクラミデラ属 (*Schizochlamydelia*)、スケルトネマ属 (*Skeletonema*)、アオミドロ属 (*Spyrogyra*)、スティココッカス属 (*Stichococcus*)、テトラクロレラ属 (*Tetrachlorella*)、テトラセルミス属 (*Tetraselmis*)、タラシオシラ属 (*Thalassiosira*)、トリボネマ属 (*Tribonema*)、フシナシミドロ属 (*Vaucheria*)、ヴィリディエラ属 (*Viridicella*)、ヴィシェリア属 (*Vischeria*) 及びボルボックス属 (*Volvvox*) からなる群より選択される属の種などの、肉微小藻などであり得る。たとえば、限定ではないが、キクロテラ属、フェオダクチラム属またはタラシオシラ属の種などの珪藻類が用いられ得る。あるいは、クリプセコディニウム属などの鞭毛虫 (*dinoflagellate*) が用いられ得る。あるいは、モノダス属またはナンノクロロプシス属の種などのユウスティグマトレファイト属 (*eustigmatophyte*) が、本明細書で提供する方法で用いられ得る。

【0081】

さらに他の例では、強化された脂質生産性などの目的の形質があるとして選択される微生物は、たとえばアスペルギルス属 (*Aspergillus*)、モルティエラ属、ケカビ属 (*Mucor*)、サッカロミセス属 (*Saccharomyces*)、シゾサッカロミセス属 (*Schizosaccharomyces*)、またはピチア属 (*Pichia*) の種などの、組換えまたは非組換え菌類であり得る。いくつかの例では、高脂質生産性があるとして選択される微生物は、油糧酵母菌であり、たとえば、カンジダ属、クリプトコッカス属、クニンギアメラ属 (*Cunninghamella*)、リポマイセス属、ロドスポリジウム属、ロドトルラ属、タンニジウム属 (*Thamnidium*)、トリコスポロン属、またはヤロウイア属の種である。高脂質生産性があるとして選択される候補となり得る油糧菌類の非限定的な種の例としては、アスペルギルス・ニデュランス (*Aspergillus nidulans*)、クリプトコッカス・カルバタス (*Cryptococcus calyculatus*)

ococcus curvatus)、クンニングアメラ・エキヌラタ (Cunninghamella echinulata)、デバリオマイセス・ハンセニ (Debaryomyces hansenii)、ゲオトリクム・ヒステリダルム (Geotrichum histeridarum)、ゲオトリクム・ブルガレ (Geotrichum vulgare)、リポマイセス・オリエンタリス (Lipomyces orientalis)、リポマイセス・スタルキー (Lipomyces starkeyi)、リポマイセス・テトラスポルス (Lipomyces tetrasporus)、モルティエラ・アルピネ (Mortierella alpine)、モルティエラ・ラマンニアナ (Mortierella ramanniana)、ロドスポリジウム・スファエロカプム (Rhodosporidium sphaerocarpum)、ロドトルラ・オーランテアカ (Rhodotorula aurantiaca)、ロドトルラ・グルチニス (Rhodotorula glutinis)、ロドトルラ・ムチラギノーザ (Rhodotorula mucilaginosus)、ロドトルラ・テルペンドイダリス (Rhodotorula terpendoidalis)、ロドトルラ・トルロイデス (Rhodotorula toruloides)、スポロボロマイセス・アルボルベッセン (Sporobolomyces alborubescens)、タンニジウム・クテニジウム (Thamnidium ctenidium)、タンニジウム・エレガンス (Thamnidium elegans)、トルラスポラ・デルブルッキ (Torulaspora delbruechii)、トリコスポロン・ベーレンド (Trichosporon behrend)、トリコスポロン・ブラッシカエ (Trichosporon brassicae)、トリコスポロン種 CBS 7617、トリコスポロン・ドメスティカム (Trichosporon domesticum)、トリコスポロン・ルビエリ (Trichosporon loubierii)、トリコスポロン・モンテビディーンセ (Trichosporon montevidense)、及びヤロウイア・リポリティカ (Yarrowia lipolytica) が挙げられる。

【0082】

高脂質生産性などの目的の形質があるとして選択される株はまた、組換えまたは非組換え細菌であり得る。たとえば、高脂質生産性があるとして選択され得る、トリグリセリドを生産することがわかっている細菌としては、アシネトバクター属 (Acinetobacter)、マイコバクテリウム属 (Mycobacterium)、ノカルジア属 (Nocardia)、ロドコッカス属 (Rhodococcus)、シェワネラ属 (Shewanella) 及びストレプトマイセス属 (Streptomyces) の種が挙げられ得る。候補となり得るシアノバクテリア属としては、アグメネルム属 (Agmenellum)、アナバナ属 (Anabaena)、アナベノプシス属 (Anabaenopsis)、アナシスティス属 (Anacystis)、アフアニゾメノン属 (Aphanizomenon)、アルスロスピラ属 (Arthrospira)、アステロカプサ属 (Asterocapsa)、ボルジア属 (Borzia)、カロスリックス属 (Calothrix)、チャメシフォン属 (Chamaesiphon)、クロオコッカス属 (Chroococcus)、クロログロエオプシス属 (Chlorogloeopsis)、クロオコッキディオプシス属 (Chroococcidiopsis)、クロオコッカス属 (Chroococcus)、クリナリウム属 (Crinalium)、シアノバクテリウム属 (Cyanobacterium)、シアノビウム属 (Cyanobium)、シアノシスティス属 (Cyanocystis)、シアノスピラ属 (Cyanospira)、シアノセイス属 (Cyanothecae)、シリンドロスペルモプシス属 (Cylindrospermopsis)、シリンドロスペルマム属 (Cylindrospermum)、ダクティロコッコプシス属 (Dactylococcopsis)、デルモカルペラ属 (Dermocarpella)、フィシェレーラ属 (Fischerella)、フレミエラ属 (Fremyella)、ゲイトレリア属 (Geitleria)、ゲイトレリネマ属 (Geitlerinema)、グロエオバクター属 (Gloeob

acter)、グロエオカプサ属 (Gloeocapsa)、グロエオセイス属 (Gloeothecae)、ハロスピルリナ属 (Halospirulina)、エンガリエーラ属 (Iyengarrella)、レプトリングビヤ属 (Leptolyngbya)、リムノスリックス属 (Limnothrix)、リングビア属 (Lyngbya)、ミクロコレウス属 (Microcoleus)、ミクロシスティス属 (Microcystis)、ミクソサルシナ属 (Myxosarcina)、ノドゥラリア属 (Nodularia)、ノストク属 (Nostoc)、ノストクオブシス属 (Nostochopsis)、オシラトリア属 (Oscillatoria)、フォルミディウム属 (Phormidium)、プランクトスリックス属 (Planktothrix)、プレウロカプサ属 (Pleurocapsa)、プロクロロコッカス属 (Prochlorococcus)、プロクロロン属 (Prochloron)、プロクロロスリックス属 (Prochlorothrix)、シュードアナベナ属 (Pseudanabaena)、リヴラリア属 (Rivularia)、シゾスリックス属 (Schizothrix)、シトネーマ属 (Scytonema)、スピルリナ属 (Spirulina)、スタニエリア属 (Stanieria)、スターリア属 (Starreria)、スティゴネマ属 (Stigonema)、シンプロカ属 (Symploca)、シネココッカス属 (Synechococcus)、シネコシスティス属 (Synechocystis)、トリポスリックス属 (Tolypothrix)、トリコデスミウム属 (Trichodesmium)、チコネマ属 (Tychonema)、及びキセノコッカス属 (Xenococcus) が挙げられる。

【0083】

サイトスタット及びケモスタットでの選択

本発明は、脂質生合成阻害剤またはその他の脂質生合成に影響する化合物に高い耐性を有するバリエーションを選択する方法を含む。選択手順は、ケモスタットまたはサイトスタットを用いて、選択条件下でもっとも急速に増殖するバリエーションを培養中に集積しながら、脂質生合成を阻害する化合物に高い耐性を有する1種類以上の由来体または変異体を選択することができる。

【0084】

ケモスタットは、培地を含むバイオリアクターであり、培地はたとえば選択培地（たとえばその化合物に対し抵抗性がない細胞やその栄養源を利用しない細胞の増殖を低下させるかまたは制限する化合物または栄養源を含む培地）であり得、培養培地中に1種類の栄養素が制限量で存在する。培養物は、この制限栄養素の濃度が、細胞分裂が減衰するレベルにまで低下するまで、生育する。細胞培養液の一定の排出と同じ流量で新培地の一定の流加が維持される。こうすることで、培養物は連続的に希釈されながら連続的に増殖（分裂）し、培養物の増殖（細胞分裂速度）が培養希釈率と直接関連づけられる。したがって、培養希釈率を調節すれば細胞分裂速度を調節することができ、選択条件下で有利に増殖するバリエーションは培養液中に集積するが、増殖性が低い細胞は培養の連続的な希釈を通じて「流出」する。

【0085】

サイトスタットはケモスタットと似ているが、培養物は栄養制限に接近することが許されず（培養物は、栄養制限が生じるような密度よりも低い密度に維持される）、またサイトスタットの希釈は培養物の細胞密度に基づいて実施され、細胞密度は定期的にまたは連続的にたとえばサイトスタットと一体であり得るフローサイトメーターで監視される（たとえば米国特許第7,901,937号を参照）。サイトスタットの培養物は栄養制限に接近しないので（または、増殖に影響しかねない発酵産物が著しく集積することがないので）、サイトスタットの培養物は安定した生育状態にあると考えられる。ケモスタットの培養と同様、選択培地を含むサイトスタットでは、選択条件下で最高の増殖率を有する細胞は培養中に集積するが、培養中の増殖性が低いバリエーションは培養物の希釈を通じて次第に減少する。サイトスタットでは、有利に増殖する変異体が途中で定期的に栄養素が枯渇することで邪魔をされずより速く分裂するように、栄養素の制限がないので、変異体は培

養中に急激に増える。そのうえ、希釈率は細胞分裂速度に合わせて較正されるので、細胞が一定の密度に達するようになる（通常は培養中に抵抗性を示す変異体が出現すると一定密度に達する）まで過剰な希釈なしに繁殖することができる。希釈が培養物の細胞密度と直接連動するこの連続集積法は、サイトスタット条件に好都合なバリエーションの選択に要する時間を大幅に短縮する。

【0086】

ツボカビ類や油糧酵母菌類などの微生物による脂質生産は、細胞分裂が生じない栄養制限（典型的なのは窒素制限）の間良好に誘導されるが、高速の細胞分裂に依存して目的の変異体を分離するケモスタット／サイトスタット選択法は、強化された脂質生産性を有する変異体の分離にも成功裏に用いられ得ることが見出されている。

10

【0087】

本明細書では「阻害する（inhibit）」は、酵素またはその他の因子の活性を何らかの手段で減じること指す。「脂質代謝に参与する因子（factor that participates in lipid metabolism）」とは、その存在または量によって細胞中の脂質生合成が可能になるか、誘発されるか、抑制されるか、増加するかまたは減少する任意の分子を意味する。参与する因子は、タンパク質またはペプチドであり得、例として、脂質生合成もしくは分解に参与する酵素の生合成を命令するかまたは増加させるタンパク質、または脂質生合成もしくは分解に参与する他のタンパク質酵素の活性を調節するタンパク質、たとえば、転写因子、キナーゼもしくはホスファターゼ、またはタンパク質もしくはペプチド酵素阻害因子もしくはアロステリック調節因子が挙げられる。脂質代謝に参与する因子はまた、たとえば担体タンパク質またはトランスポーターでもあり得る。脂質代謝に参与する因子はタンパク質やペプチドでなくてもよく、たとえば、小分子の補助因子、経路中間体、転写誘導因子もしくは抑制因子化合物、またはタンパク質の活性に直接または間接的に影響する脂質もしくはヌクレオチド補助因子などであり得る。

20

【0088】

ケモスタットまたはサイトスタットは、阻害剤として、たとえば、リンゴ酸、1種類以上の脂肪酸、酵素阻害剤、または脂質生産に影響するその他の化合物、たとえば没食子酸アルキル、没食子酸プロピル、カプサイシン、セルレニン、クルクミン、シクロプロペン、ジフェニルアミン、ノルフルラゾン、ピリダジノン、セトキシジム、トルイル酸、トリクロサン、ハロキシホップ、ジクロホップ、フェノキサプロップ、キザロホップ、6-アミノニコチンアミド、リンゴ酸塩、1種類以上の脂肪酸（たとえばオレイン酸）、キャノーラ油、ピーナッツ油、またはセサミンもしくはセサモールを含み得る。脂質生合成に影響し得る任意の化合物またはその組合せを用いてよい。いくつかの実施形態では、脂肪酸シンターゼ（FAS）の阻害剤またはその成分をケモスタットまたはサイトスタットの培養に与える場合がある。たとえば、阻害剤は、脱水酵素、エノイル-ACPレダクターゼ、またはFASのベーターケトアシルシンターゼの活性の阻害剤であり得る。ヒドロキシアシル担体タンパク質脱水酵素（「脱水酵素」または「DH」）阻害剤としては、3-デシノイル-N-アセチル-システアミン（3-デシノイル-NAC）及びその誘導体が挙げられる（Ishikawaら（2012） J. Amer. Chem. Soc. 134:769-772）。エノイル-ACPレダクターゼ（「ER」）の活性の阻害剤の例としては、限定ではないが、ジアザボリン、トリクロサン及びイソニアジドが挙げられる。ベーターケトアシル-ACPシンターゼ（「KAS」）の活性の阻害剤の例としては、限定ではないが、セルレニン、チオラクトマイシン及びSBPT04が挙げられる（Kingryら（2012） J. Bacteriol. 195:351-358）。酵素アセチル-CoAカルボキシラーゼ（ACCase）酵素の阻害剤としては、限定ではないが、ハロキシホップ、ジクロホップ、フェノキサプロップ、キザロホップ、BP1、TOFA及びソラフェンAが挙げられる（Beckerら（2007））。

30

40

【0089】

また、脂肪酸不飽和化酵素及び脂肪酸エロンガーゼ（elongase）の阻害剤、た

50

たとえば、セサミンまたはクルクミンなどの脂肪酸不飽和化酵素阻害剤（米国特許第 8, 349, 595 号）、またはシクロエート、チオカルバメート及びスルホキシドなどの脂肪酸エロンガーゼ阻害剤も考えられる。

【0090】

いくつかの例では、ケモスタットまたはサイトスタットで阻害剤としてトリクロサンを使用する場合がある。いくつかの例では、ケモスタットまたはサイトスタットで阻害剤としてセルレニンを使用する場合がある。さらに、野生型からの分離株または微生物株保存機関から入手した株などの任意の対象の株を、随意で、脂質代謝に参与する酵素またはその他の因子の阻害剤の非存在下でケモスタットまたはサイトスタットで培養して、もとの株よりも速く増殖する分離株を選択することができる。そのような選択は、阻害物化合物に抵抗性のある変異体を選別する前か後に実施することができる。

10

【0091】

脂質合成阻害剤を含むかまたは含まないサイトスタットまたはケモスタットでの選択は、細胞分裂周期が複数回連続できるような任意の期間にわたり実施でき、またその生物の増殖速度に依存し得る。ケモスタットまたはサイトスタットは任意の体積容量であり得る。菌類やツボカビ類などの微生物株の場合、たとえば、培養は、発酵槽の体積容量が約 25 mL～約 10 L のケモスタットまたはサイトスタットで実施でき、発酵槽の体積容量は 200 mL～約 5 L、または約 300 mL～約 2 L、または約 400 mL～約 1 L であり得る。培養期間は、たとえば 1 日から数か月など、任意の期間であり得る。好ましくは、菌類やツボカビ類の場合、ケモスタットまたはサイトスタットでの培養期間は、少なくとも 1 日、たとえば、約 2 日間～約 30 日間、または約 3 日間～約 20 日間、または約 4 日間～約 15 日間の期間である。いくつかの実施形態では、サイトスタットでの選別が好ましい。サイトスタットでの培養期間は、いくつかの実施形態では、たとえば約 3 日間～約 10 日間である。

20

【0092】

任意の期間増殖させた培養から微生物の単コロニーを希釈平板法またはフローサイトメトリーにより分離して、このまたはこれらの分離株を任意の所望の性質についてスクリーニングすることができる。

【0093】

たとえば、分離株は、高増殖率、高バイオマス蓄積度、脂質または脂肪酸の高生産率、高トリグリセリド生産率、高総脂質蓄積度、高 FAME 蓄積度、高トリグリセリド蓄積度、高 FAME 生産率、高 DHA 生産率、高 DHA 蓄積度、脂肪酸パーセンテージとしての DHA の増加、DHA 対 DPA 比の増大などのいずれか 1 つまたはそれらの組合せについて、試験され得る。親油性色素（たとえばボディパイまたはナイルレッド）の使用または FAME 分析を含め、脂質または脂肪酸の量を決定する任意の実施可能な方法をとることができる。試験は、試験前に株を培養するのに用いられ得る上述したような条件、たとえば特定の炭素源や窒素源もしくはその濃度、または塩分濃度、温度、pH などを用いる条件を含むあらゆる培養条件下で実施することができる。

30

【0094】

本明細書では、「変異体 (mutant)」は、遺伝子に突然変異つまり変化が生じた微生物を包含する。変異体は、自然に生じる（つまり、自発的に生じる）こともあるし、たとえば（薬物を含む）化学薬品、ガンマ線照射または UV 光により誘発されることもある。バリエーションという用語は、典型的には、自発的に生じた変異体、たとえば、もとの株（つまり原株）から生じた、原株とは別個の安定した遺伝性の形質をもつ分離株だが、その突然変異の性質、またはその別個の形質の原因となった遺伝子やタンパク質でさえも未知であり得る変異体をも包含するのに用いられる。「由来 (derivative)」株（由来株）とは、継代培養され原株とは別に維持されている、原株の子孫株である。由来株は、バリエーション株または変異株であり得、たとえば、原株とは別個の 1 種類以上の遺伝性の形質を有するバリエーション株または変異株であり得る。由来株はまた、たとえば代謝酵素や（たとえば転写因子、転写活性化因子、アロステリックタンパク質、トランスポータ

40

50

ーなどの) 調節因子をコード化する非天然遺伝子などの、少なくとも1種類の非天然遺伝子を含むように遺伝子操作された株であり得る。

【0095】

変異誘発

本発明は、本明細書で提供するあらゆる株のバリエーションを含み、バリエーションは変異体であり得、天然に生じる変異体であるか、または多数の変異誘発技術(限定ではないが、化学的変異誘発、ガンマ線照射、UV照射、または、使用され得る細胞に(直接または間接的に)導入されて微生物細胞の遺伝子座を変える核酸コンストラクトを用いる分子生物学的技術、たとえば限定ではないが、挿入変異誘発、部位特異的変異誘発、遺伝子置換または遺伝子切除)のいずれかによって作製された変異体であり得る。本発明にはまた、微生物株の(変異体を含む)バリエーションを選択する方法も含まれ、該方法には、限定ではないが本明細書で提供するような1つ以上の変異誘発ステップが含まれ得る。

10

【0096】

微生物株の変異体を作製する方法は公知である。たとえば、ガンマ線照射、UV照射、及び考えられる多数の化学的変異原(たとえば5-ブロモデオキシウリジン、エチルメタンスルホン酸(EMS)、メチルメタンスルホン酸(MMS)、硫酸ジエチル(DES)、ニトロソグアニジン(NTG)、ICR化合物など)のいずれかでの処置、または染色体切断を生じさせるエンジン抗生物質などの化合物(たとえばブレオマイシン、アドリアマイシン、ネオカルチノスタチン)での処置は、藻類、菌類及びツボカビ類の変異誘発に用いられている方法である(たとえば、米国特許第8,232,090号、米国特許出願第20120088831号、同第20100285557号、同第20120258498号を参照)。物理的変異原のなかでも電磁放射には放射線放射、ガンマ線及びX線、電離放射、紫外線光または高温が含まれる。当分野では多数の化学的変異原も知られており、限定ではないが、挿入剤、アルキル化剤、脱アミノ化剤、塩基類似体などがある。挿入剤としては、限定ではないが、アクリジン誘導体またはフェナントリジン誘導体、たとえば臭化エチジウム(2,7-ジアミノ-10-エチル-6-フェニルフェナントリジウムブロミドまたは3,8-ジアミノ-5-エチル-6-フェニルフェナントリジウムブロミドとしても知られている)が例として挙げられる。アルキル化剤の非限定的な例としては、ニトロソグアニジン誘導体(たとえばN-メチル-N'-ニトロニトロソグアニジン)、エチルメタンスルホン酸(EMS)、エチルエタンスルホン酸、硫酸ジエチル(DES)、メチルメタンスルホン酸(MMS)、亜硝酸、またはHNO₂、及びナイトロジェンマスタードまたはICR化合物が挙げられる。変異原として用いられ得る塩基類似体の非限定的な例としては、化合物5-ブロモウラシル(デオキシヌクレオシド5-ブロモデオキシウリジンとしても知られている)、5-ブロモデオキシウリジン及び2-アミノプリンが挙げられる。

20

30

【0097】

変異誘発には、外因性核酸分子を対象の微生物細胞に導入することを含む、分子生物学的技術を用いることもできる。たとえば、細胞に導入される外因性核酸分子を、ランダムまたは標的化組込みにより遺伝子座に組み込んで、外来性DNAが挿入する遺伝子またはゲノムに挿入された外来性DNA付近の遺伝子の発現に影響を及ぼすことができる(たとえば米国特許第7,019,122号及び同第8,216,844号)。たとえば外因性核酸分子としては、たとえばトランスポザーゼに認識され得る逆方向反復などの転移因子またはそのコンポーネント及び/またはトランスポザーゼをコードする遺伝子が挙げられ、あるいは外因性核酸分子は、組込みウイルスたとえばレトロウイルスなどのウイルスに少なくとも部分的に基づく場合もある。

40

【0098】

変異誘発対象の微生物は変異原または任意の公知の方法による変異誘発因子に曝露され得る。一般に、変異誘発は、適当な量の対象の微生物株の細胞を、適当な時間と条件で変異原または変異誘発因子に曝露することで実施され得る。対象の微生物株を変異原または変異誘発遺伝子に曝露して、変異体の作製には効果的だがあまり多くの細胞を死滅させな

50

いような濃度範囲を決定する予備実験を1回以上行うことが多い。このような手順は当分野では公知である。たとえば、そのような実験で得た結果に基づいて、約0.5%～約95%、または約1%～約90%、または約2%～約80%、または約5%～約70%、または約10%～約50%の細胞が生存可能な濃度及び／または曝露期間を変異誘発手順で用いることができることが示され得る。細胞を変異原に曝露する時間は、使用する変異原の性質による。細胞を変異原と接触させる時間は、たとえば約1分～約24時間、または約30分～約6時間、または約1.0時間～約3.0時間であり得る。一連の簡単な試験を行って、変異原でさまざまな処置を行った後の変異誘発対象の細胞の生存率を決定するとよい。

【0099】

限定ではなく例として、変異誘発は、たとえば化学的変異原または変異原化合物を含み得る滅菌液体培地または滅菌水中に、変異誘発対象の細胞を $10^5 \sim 10^{10}$ 個/mLの量で、たとえば約 $10^6 \sim 10^8$ 個/mLの密度で浮遊させるか、または変異対象の細胞を寒天プレートに拡げて変異原に曝露する（寒天プレートはたとえばガンマ線またはUV照射に利用できる）ことにより実施することができる。微生物細胞の変異誘発は、培養フラスコまたは試験管中の培養を用いて実施することができ、また対象の微生物が生存可能な任意の温度で実施することができる。

【0100】

化学的変異原で処置した後、細胞を滅菌水または培地で少なくとも1回洗浄するか、または変異原を含まない培地中で希釈することができる。細胞は、回復期間中は変異原の非存在下及び一切の選択剤の非存在下で培養され得、その後選択剤の存在下でサイトスタットまたはケモスタットで培養され得る。

【0101】

だいたい数日間から数週間であり得るサイトスタットまたはケモスタット培養期間の後、細胞を希釈平板培養してもよいし、または細胞を分別して単コロニー分離してもよい。コロニーを液体培養で生育して、たとえば脂質生産率や増殖率を試験することができる。

【0102】

変異誘発及びサイトスタットまたはケモスタット選択の手順を2回以上続けて実施することもできる。連続する複数のサイトスタットまたはケモスタットのインキュベーションに異なる種類の阻害因子（たとえば異なる種類の酵素を経路で阻害する脂質生合成阻害剤）を含むことができる。変異誘発手順に同種または異種の変異原を用いることができる。ある具体的な例では、変異誘発手順を1回以上受けた細胞をさらにUV処置に供し、脂質生合成阻害剤を含まないサイトスタットで選択する。

【0103】

UV処置

本明細書では、微生物をUV光で処置し、UV処置した微生物を培養し、所望の形質についてスクリーニングすることにより微生物の性能を改善する方法を提供する。「～の性能を改善する（improving the performance of）」とは、たとえば増殖率の改善、生産性の増大、化学物質、pH、塩分などに対する抵抗性または耐性の強化を意味する。UV照射は、たとえば化学物質またはガンマ線照射を用いるような変異誘発手順の後に行うことができ、または、別のUV変異誘発ステップの後で微生物にUV処置を行うこともできる。随意で、変異誘発ステップの後、細胞をUV放射に曝露する前に、選択を実施することもできる。

【0104】

たとえば、変異誘発手順を実施することができ、変異原で処置された細胞集団を、特定の形質の存在または程度について、たとえば高増殖率、高産物生産率、1種類以上の特定の生産される産物の絶対的もしくは相対的な生産量、化合物または生育条件に対する細胞の抵抗性または耐性などについて選択することができる。スクリーニングで所望の形質を有するとして選択された細胞は、次いでUV照射の処置を受ける。好ましくは、次に細胞を該形質の存在または程度について再試験して、たとえば高増殖率、高産物生産率、化合

10

20

30

40

50

物または生育条件に対する細胞の抵抗性または耐性の向上などの形質が強化または改善されたクローンを特定する。

【0105】

UV照射後、選択の前に、随意で細胞を光から保護する。たとえば、UV処置後の細胞をプレートに蒔き、そのプレートを棚などの暗所に保存するか、光不透過材でくるんでもよい。細胞は30分間～30日間、たとえば1時間～2週間、または2時間～1週間、暗所に保存され得る。

【0106】

本発明の範囲を何ら特定の機構に限定するわけではないが、野生型とは別個のある特定の形質を示す分離変異体またはバリエーションは、UV処置後に強化された形質を示すと考えられる。

10

【0107】

UV処置には、UV変異誘発の公知の方法を用いることができる。たとえば、UVランプまたは核酸とタンパク質のUV架橋に用いられるクロスリンカーデバイスを用いることができ、処置の強度と持続時間は、たとえば細胞の約0.1%から約99.99%が処置により死滅するように、たとえばUV処置を受ける微生物集団の少なくとも0.5%、少なくとも1%、少なくとも2%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%が処置により死滅するように、調整できる。約300 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ ～約30,000 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ 、または約500 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ ～約15,000 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ などの、約100 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ ～約50,000 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ のUV照射を、たとえば少なくとも約1000 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ 、3000 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ 、5000 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ 、7000 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ 、または10000 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ のエネルギー準位で実施できる。

20

【0108】

UV処置済みの微生物は、UV処置後、随意で、約15分間～約2週間以上、たとえば約30分間～約1週間の間、暗所でインキュベートされ得る。暗所で保管された後に細胞集団が選択され得、随意であるが好ましくは、暗所で保管された後に選択されてからさらに一定期間培養され得る。たとえば、細胞をUV処置し、暗所でインキュベートし、次いで選択またはスクリーニングする場合があります。たとえば、UV処置済み細胞は、たとえば脂質生合成阻害剤などの選択化合物を随意で含み得るサイトスタットまたはケモスタットでの増殖により選択され得る。あるいは、UV処置後、細胞は、暗所でのインキュベーション期間なしに、明所で保管され得る。細胞はUV処置の直後に選択される場合もあるし、または選択の前に「成育 (grow out)」培養期間が実施される場合もある。UV処置後に行う培養期間は、随意で、選択化合物を含むかまたは含まないサイトスタットまたはケモスタットで実施され得、最良の生育特徴をもつ細胞が成育期間中に選択される。

30

【0109】

いくつかの実施形態では、細胞は、1回目、2回目、3回目、または4回目以降の変異誘発手順及び、随意であるが好ましくは、サイトスタットもしくはケモスタット選択などのスクリーニングまたは選択の後に、UV処置され得る。たとえば、細胞は、化学的変異原またはガンマ線もしくはUV照射などの変異原で処置された後、続いてケモスタットまたはサイトスタットで選択され得る（好ましくは、目的の形質は脂質生産性であり、ケモスタットまたはサイトスタットは脂質生合成に関与する酵素または因子の阻害剤を含む）。1回以上の変異誘発及び選択手順で分離した株を、たとえば強化された増殖率もしくは脂質生産率、または特定の化学物質に対する強化された抵抗性もしくは耐性などの所望の形質についてスクリーニングまたは選択し、たとえば本明細書で説明するようにUV処置を施し、次いで（随意であるが好ましくは暗所でのインキュベーション期間の後に）随意で阻害剤または選択剤を含むかまたは含まないサイトスタットまたはケモスタットで選択

40

50

して、以前に変異誘発した株と比べて強化された特性（たとえば脂質生合成など）をもつ変異体を分離することができる。あるいは、細胞は、1回目、2回目、3回目、または4回目以降の変異誘発手順及び選択の後にUV処置され、次いで脂質生合成を阻害する化合物を含むプレートに蒔かれて、強化された脂質生産性などの強化された形質をもつ変異体が分離される場合もある。

【0110】

UV照射は、たとえば化学物質またはガンマ線照射を用いる変異誘発手順などの任意の変異誘発手順の後にでも実施でき、または微生物は別のUV変異誘発ステップの後にUV処置され得る。随意で、変異誘発ステップの後、細胞をUV放射に曝露する前に、選択を実施することができる。たとえば、複数回の変異誘発ステップを用いる株分離法において、UV処置は、1回だけの、数回の、または毎回の変異誘発手順の後に実施できる。

10

【0111】

上述したすべての実施形態に加えて、または代わりに、本明細書では以下の実施形態も提供する。

【0112】

実施形態1は、少なくとも20%のDHA、少なくとも25%のDHA、少なくとも30%のDHA、少なくとも35%のDHA、または少なくとも38%のDHAを生産する変異ラビリンチュラ綱微生物であって、以下のうち1つ以上が当てはまる。

前記変異微生物は、DHAを小規模培養で少なくとも125mg/L/h、少なくとも150mg/L/h、少なくとも170mg/L/h、または少なくとも190mg/L/hのペースで生産する；

20

前記変異微生物により生産される総脂肪酸には、10%以下のドコサペンタエン酸（DPA）が含まれ、随意で少なくとも1%、少なくとも2%、または少なくとも3%のDPAが含まれる；

前記変異微生物により生産されるDHA対DPAの比は、少なくとも3.5：1かまたは少なくとも4：1であり、随意でDHA対DPAの比は10：1未満である、

前記変異微生物により生産される総脂肪酸には、2%未満または1%未満のアラキドン酸（ARA）が含まれ、随意で0%のARAが含まれる；

前記変異微生物により生産される総脂肪酸には、1%未満または0.5%未満のエイコサペンタエン酸（EPA）が含まれ、随意で0%よりも多くのEPAが含まれる；及び

30

前記変異微生物により生産される総脂肪酸には、少なくとも10%、少なくとも12%、少なくとも20%、少なくとも25%、または少なくとも30%のミリスチン酸が含まれ、随意で60%未満または50%未満のミリスチン酸が含まれる。

【0113】

実施形態2は、実施形態2による変異ラビリンチュラ綱微生物であり、前記変異微生物は、標準的な方法による由来変異体であり、随意で、前記変異体は、電離放射、ガンマ線、X線、紫外線光または化学的変異原による変異誘発により得られる。

【0114】

実施形態3は、実施形態3による変異ラビリンチュラ綱微生物であり、前記変異微生物は、分子遺伝学的技術により生産され、随意で、前記分子遺伝学的技術は、挿入変異、転移因子、欠失、挿入、破壊もしくは遺伝子置換を生じさせる相同組換え、TALEN CRISPR/casシステム、Znフィンガーヌクレアーゼ、RNAi、アンチセンスRNAコンストラクト、及びリボザイムからなる群より選択される。

40

【0115】

実施形態4は、実施形態1～実施形態3のいずれかによる変異ラビリンチュラ綱微生物であり、前記変異微生物は、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11及び配列番号12からなる群より選択されるヌクレオチド配列と少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも97.5%、少なくとも98%、少なくとも98.5%、少なくとも99%、少なくとも99.1%、少なくとも99.2%、少な

50

くとも99.3%、少なくとも99.4%、少なくとも99.5%、少なくとも99.6%、少なくとも99.7%、少なくとも99.8%、または少なくとも99.9%の同一性を有する18S rDNA配列を含む。

【0116】

実施形態5は、実施形態1～実施形態3のいずれかによる変異ラビリンチュラ綱微生物であり、前記変異微生物は、配列番号1、配列番号2、配列番号3及び配列番号4からなる群より選択されるヌクレオチド配列と少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも97.5%、少なくとも98%、少なくとも98.5%、少なくとも99%、少なくとも99.1%、少なくとも99.2%、少なくとも99.3%、少なくとも99.4%、少なくとも99.5%、少なくとも99.6%、少なくとも99.7%、少なくとも99.8%、または少なくとも99.9%の同一性を有する18S rDNA配列を含み、

10

配列番号5、配列番号6、配列番号7及び配列番号8からなる群より選択されるヌクレオチド配列と少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも97.5%、少なくとも98%、少なくとも98.5%、少なくとも99%、少なくとも99.1%、少なくとも99.2%、少なくとも99.3%、少なくとも99.4%、少なくとも99.5%、少なくとも99.6%、少なくとも99.7%、少なくとも99.8%、または少なくとも99.9%の同一性を有する18S rDNA配列を含み、

配列番号9、配列番号10、配列番号11及び配列番号12からなる群より選択されるヌクレオチド配列と少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも97.5%、少なくとも98%、少なくとも98.5%、少なくとも99%、少なくとも99.1%、少なくとも99.2%、少なくとも99.3%、少なくとも99.4%、少なくとも99.5%、少なくとも99.6%、少なくとも99.7%、少なくとも99.8%、または少なくとも99.9%の同一性を有する18S rDNA配列を含む。

20

【0117】

実施形態6は、実施形態1～実施形態6のいずれかによる変異ラビリンチュラ綱微生物であって、前記変異ラビリンチュラ綱微生物は、ラビリンチュラ属、ラビリンチュロイデス属、トラストキトリウム属、シゾキトリウム属、アプラノキトリウム属、オーランチオキトリウム属、ジャポノキトリウム属、ディプロフリス属、またはウルケニア属のいずれかに属する種である。

30

【0118】

実施形態7は、NRRL番号50836として寄託された株の変異ラビリンチュラ綱微生物、またはその由来体である。

【0119】

実施形態8は、NRRL番号50837として寄託された株の変異ラビリンチュラ綱微生物、またはその由来体である。

【0120】

実施形態9は、実施形態1～実施形態18のいずれかの分離ラビリンチュラ綱微生物が含まれる微生物バイオマスである。

【0121】

実施形態10は、実施形態9による微生物バイオマスが含まれる産物である。

40

【0122】

実施形態11は、微生物油であり、前記微生物油の総脂肪酸の少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、または少なくとも38%がDHAであり、前記微生物油の総脂肪酸の少なくとも10%、少なくとも12%、少なくとも15%、または少なくとも20%がミリスチン酸であり、さらに、DHA対DPAの比が少なくとも3.5:1かまたは少なくとも4:1であること、総脂肪酸に含まれるDPAが10%以下であること、総脂肪酸に含まれるARAが2%以下または1%以下であること、及び総脂肪酸に含まれるEPAが1%以下または0.5%以下であること、のうちの1つ以上が満たされる。

50

【0123】

実施形態12は、請求項1による微生物油であり、前記微生物油は変異微生物から分離され、随意で、前記微生物は標準的な方法で由来させるかまたは遺伝子操作されている。

【0124】

実施形態13は、実施形態13または実施形態14による微生物油が含まれる製品であり、随意で、前記製品は、食品、動物飼料、化粧品または医薬品である。

【0125】

実施形態14は、脂質生産性が強化された変異微生物株の分離方法であり、前記方法は、脂質代謝に関与する酵素の活性を阻害する少なくとも1種類の化合物を含む培養培地を含むサイトスタットまたはケモスタットで原株の微生物を培養して、阻害剤により選択された集団を提供することと、前記阻害剤により選択された集団から前記原微生物株よりも高い脂質生産性を有する微生物を分離して、脂質生産性が強化された由来株を提供することを含み、随意で、前記培養の少なくとも一部は、脂質生合成に関与する酵素または因子の阻害剤の存在下で実施される。

【0126】

実施形態15は、実施形態14の方法であり、前記微生物は変異誘発手順を受ける。

【実施例】

【0127】

実施例1 野生型ラビリンチュラ綱株の分離

脂質生産性を評価するために数百種の微生物を分離する採集プロジェクトを開始した。合法的なアクセス及び生物分類に関する生物学的知識に基づき、試料の野生株分離バイオームを特定した。バイオームは、外洋、河口、近海潟湖、マングローブ潟湖、潮溜まり、高塩水、淡水、または養殖場として類別した。試料採取場所は、温帯、亜熱帯、熱帯地方に亘った。採水試料には、2リットルの直接試料も含まれた。10 μ m ネットを用いてプランクトンを網で採集した場合もあった。2010年から2012年にかけて、全部で466種類の環境試料を採集した。温度は4℃から61℃の範囲であり、pHは2.45から9.18の範囲であった。溶解酸素は空気飽和ゼロから204%の範囲であり、塩分はゼロpptから105pptの範囲であった。どの試料も現地で125f/2培地（培地成分：NaNO₃ 75mg/L、NaH₂PO₄・H₂O 5mg/L、ビオチン0.005mg/L、CoCl₂・6H₂O 0.01mg/L、CuSO₄・5H₂O 0.01mg/L、Na₂EDTA 4mg/L、FeCl₂ 3mg/L、MnCl₂ 0.18g/L、Na₂MoO₄・2H₂O 0.006mg/L、チアミン0.1g/L、ビタミンB12 0.005mg/L、ZnSO₄ 0.022mg/L）及び海水ーグルコースー酵母ーペプトン（SWGY P）培地（滅菌濾過海水1リットル当たりの培地成分：グルコース2g、ペプトン1g、Difco酵母エキス1g）に接種して、増殖を開始させた。別の試料セットを、10%グリセロールを含む二連の50mLアリコートとして作製し、続いてドライアイスで凍結させた。最後に、その後のDNA分離用に、追加の試料を、10%グリセロール、2L体積で凍結させた。試料は採集当日に実験室に発送され、翌日到着して、静置または振盪フラスコ中発酵ブイヨン中に接種された。カルベニシリン、ストレプトマイシン及びニスタチンを培養に含めて、細菌または菌類の増殖を遅らせた。

【0128】

接種した集積物を15℃～30℃の温度でインキュベートし、続いて抗生物質と一緒にSWGY Pまたはf/2寒天上に蒔いた。分離コロニーを回収し、SWGY Pまたはf/2培地で増幅させ、18srDNAのPCR増幅を実施して、分離微生物の分類学的同定を行った。

【0129】

実施例2 分離株の脂質生産性の比較

分離ラビリンチュラ綱株の脂質生産性についてMicro24ミニチュアバイオリアクターシステム（ニューヨーク州ポートワシントン Pall Life Science

s社)でスクリーニングした。簡単に説明すると、酵母エキス5 g/L、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.65 g/L、 KCl 0.5 g/L、 MgSO_4 2.5 g/L、Instant Ocean塩(フロリダ州アポポカ Aquatic Eco Systems社) 8 g/L、微量元素溶液5 mL、ビタミン溶液1 mL/L、及びデキストロース20 g/Lを含む培養培地を含む6 mLの培養を設定した。微量元素溶液には、EDTA二ナトリウム塩6 g/L、 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.29 g/L、 H_2BO_3 6.84 g/L、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.86 g/L、 ZnCl_2 保存液(60 g/L) 1 mL、 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 保存液(2 g/L) 1 mL、 $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 保存液(60 g/L) 1 mL、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 保存液(2 g/L) 1 mL、及び $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 保存液(5 g/L) 1 mLが含まれた。ビタミン溶液には、チアミン200 mg/L、1リットル当たり10 mLのビオチン保存液0.1 g/L、及び1リットル当たり1 mLのシアノコバラミン保存液1 g/Lが含まれた。3%シリコーン消泡剤10マイクロリットルを各6 mLの培養に加えた。培養は、各株の600マイクロリットルの対数中期の培養を接種し、600 rpmで攪拌しながら、30℃、pH約6.8で、14時間インキュベートした。溶解酸素濃度は飽和度10%であった。

【0130】

試験期間の終わりに細胞を回収して、バイオマス及びFAMEについてアリコート进行分析した。バイオマスの評価は、事前に秤量した15 mLのファルコン管に4 mLの発酵ブイオンをピペットで移した。培養アリコートが入った試験管を3220 x gで20分間遠心分離して、上清をデカントした。次いでペレットを-80℃で一晩凍結させてから、16~24時間凍結乾燥させた。乾燥ペレットが入ったファルコン管を秤量し、空の試験管の重量を引いて凍結乾燥ペレットの重量を求めた。凍結乾燥ペレットの重量を、アリコート体積(4 mL)で割って標準化して、培養1 mL当たりのバイオマス値を得た。脂肪酸メチルエステル(FAME)は、ガスクロマトグラフィーによる標準的な方法で、三連の50~200 μL 体積の培養アリコートの脂肪酸含有量を分析して評価した。培養アリコートは、FAME試料の準備のために、分注及び乾燥前に1倍のPBS中1:10に希釈した。試料をHT-4X GeneVacにより乾燥させて、脂肪酸メチルエステル分析に供する準備ができるまで-20℃で保存した。抽出は、5M 水酸化カリウムのメタノール溶液0.5 mL及び25 ppmのブチル化ヒドロキシトルエンを含むテトラヒドロフラン0.2 mLを試料に添加した。次に、C11:0遊離脂肪酸2 mg/mL、C13:0トリグリセリド2 mg/mL、及びC23:0脂肪酸を含むn-ヘプタン2 mg/mLを含むメチルエステル内部標準ミックス40 μL を添加した。425~600 μm の酸洗浄済ガラスビーズ約0.5 mLを添加後、試料を1200 rpmで7分間GenoGrinderにかけた。次に試料を80℃で5分間加熱してから、2500 rpmで5分間マルチチューブボルテックスにかけた。次に、14%三フッ化ホウ素を含むメタノールを試料に添加してから、80℃の加熱ブロックに戻して30分間置いた。次に、試料を2500 rpmで5分間再度ボルテックスした。最後に、試料にn-ヘプタン2 mL及び5M塩化ナトリウム0.5 mLを添加し、2500 rpmで5分間最終回のボルテックスにかけた。試料を激しく振って確実に乳濁させた。次に試験管立てを1000 rpmで1分間遠心分離し、その後水素炎イオン化検出器を備える7890 Agilent GCと対にしたGerstel MPSオートサンプラーで最上層を採取した。

【0131】

このスクリーニングでは、生産される総FAME脂質のDHA%及びDHA生産率(DHA生産量をmg/リットル/時間として計算)により決定される高DHA生産株として、野生株「886」及び「1602」を選択した(表2)。これらの株を、WH-5628(「886」)とWH-5554(「1602」)と改名した。

【0132】

(表2) 小規模発酵のラビリンチュラ綱分離株の生産性

株	886	25	94	1473	1578	1439	1478	1514	1602
バイオマス (g/l/h)	0.51 ±0.2	0.37 ±0.1	0.33 ±0.1	0.39 ±0.2	0.39 ±0.1	0.42 ±0.2	0.51 ±0.1	0.59 ±0.1	0.62 ±0.02
DHA (mg/l/h)	49.0 ±14	30.4 ±3	42.2 ±8	40.1 ±15	32.5 ±18	28.3 ±13	41.4 ±2.8	69.9 ±4.6	71.3 ±1.8

【0133】

実施例3 強化された増殖率を有するツボカビ類バリエーションのサイトスタット選択

1602 (WH-05554) 株を、Instant Ocean 塩（フロリダ州アポ
ップカ Aquatic Eco Systems 社）17 g/L、デキストロース10
g/L、硫酸アンモニウム1.65 g/L、リン酸二水素カリウム1 g/L、及び塩化カ
リウム0.5 g/Lを含む最少培地を有する0.5 Lサイトスタットの接種に用いた。サ
イトスタットは、Infors 発酵槽（スイス国ボットミンゲン／バーゼル）、MSPフ
ローサイトプレップ（ミネソタ州ショアビュー）及びAccuriサイトメーターを備え
ていた。発酵は30℃に保ち、pHは、0.5 M 水酸化ナトリウム及び0.5 M リン
酸の添加により安定してpH 5.8に保った。細胞濃度は、5日間をとおして常に500
、000個/mLに保った。希釈率は当初は0.1/h rであったが、4日目と5日目
には0.5/h r以上に上昇した。5日目に発酵を中断し、発酵槽培養アリコートプレ
ートに蒔いた。このプレートを30℃でインキュベートした後、コロニーを選択し、得られ
た株である1602-RR01を単コロニーから分離した。1 Lの発酵槽（New Br
unswick）内での1602-RR01株の増殖率は、親株1602よりもおよそ2
0%高かった（表3）、これをその後の変異誘発実験でベースライン株として用いる
ことにした。

【0134】

（表3）原株1602の分離株とサイトスタット選択された由来株の増殖率

株	増殖率(h ⁻¹) [2～4時間]	増殖率(h ⁻¹) [4～10時間]
1602, 野生型	0.4212	0.2071
1602-RR01, サイトスタット	0.4786	0.2871

【0135】

実施例4 急増殖するセルレニン抵抗性ツボカビ類株の選択

別々の処置で、4種類の線量（25 Gy、75 Gy、100 Gy及び150 Gy）のガ
ンマ線放射を用いて、実施例3で急増殖について選択したWH-5554株の分離株であ
る1602-RR01株の細胞400 X 10⁶個の変異誘発を行った。変異誘発した細胞
をペレット化（2,000 x gで5分間）し、最少培地5 mLに再度浮遊させ、セルレニ
ン3 µg/mLを含む最少培地500 mLを収容するサイトスタット発酵槽に接種した（
サイトスタットの設定は実施例3と同じ）。セルレニンは、脂肪酸シンターゼ（FAS）
酵素のケトアシルシンターゼドメイン（KAS）に結合するFAS阻害剤である（Pri
ceら（2001） J. Biol. Chem. 276:6551-6559）。
培養の希釈率は、最初の40時間は一定して0～0.05のままだったが、その後上昇し
始めた。だいたい45時間で、希釈率は>0.05に上昇し（図2）、セルレニン抵抗性
バリエーションが集積し始めたことが示された。培養への培地供給を56～68時間で中断し
て、培養の細胞密度を高めた。68時間で培養をセルレニン3 µg/mLを含む新培地で
徒手的に希釈して再度500,000個/mLとし、71時間でサイトスタット機能を再
開させた。発酵を82時間で中断し、この時点で5 mLの細胞をセルレニンなしの最少培
地を収容する振盪フラスコ内で継代培養して50 mLの培養にした。培養はセルレニンな

しで3日間に亘り3回継代培養し、その後セルレニン $0\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $2\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ 、及び $20\mu\text{g}/\text{mL}$ をそれぞれ含む寒天プレートに蒔いた。セルレニンの全濃度について増殖を観察した。各プレートからコロニーを5つ抜き取って、Micro 24発酵槽で生産性を評価した (Isettら (2007) Biotechnology and Bioengineering 98:1017-1028) ; ニューヨーク州ポートワシントン Pall Life Sciences社)。このバイオリクターシステムにより、完全最少培地で、 30°C で23時間インキュベートした複数の小規模 (6mL) の培養の同時試験が可能であった。最少培地には、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ $1.65\text{g}/\text{L}$ 、 KCl $0.5\text{g}/\text{L}$ 、 MgSO_4 $2.5\text{g}/\text{L}$ 、Instant Ocean塩 $17\text{g}/\text{L}$ 、微量元素溶液 5mL 、ビタミン溶液 $1\text{mL}/\text{L}$ 、及びデキストロース $40\text{g}/\text{L}$ が含まれた。微量元素溶液には、 EDTA 二ナトリウム塩 $6\text{g}/\text{L}$ 、 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ $0.29\text{g}/\text{L}$ 、 H_2BO_3 $6.84\text{g}/\text{L}$ 、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ $0.86\text{g}/\text{L}$ 、 ZnCl_2 保存液 ($60\text{g}/\text{L}$) 1mL 、 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 保存液 ($2\text{g}/\text{L}$) 1mL 、 $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 保存液 ($60\text{g}/\text{L}$) 1mL 、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 保存液 ($2\text{g}/\text{L}$) 1mL 、及び $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 保存液 ($5\text{g}/\text{L}$) 1mL が含まれた。ビタミン溶液には、チアミン $200\text{mg}/\text{L}$ 、1リットル当たり 10mL のビオチン保存液 $0.1\text{g}/\text{L}$ 、及び1リットル当たり 1mL のシアノコバラミン保存液 $1\text{g}/\text{L}$ が含まれた。インキュベーション培地に含まれる窒素は、(開始OD740値を1.4として培養を接種した後) だいたい培養8時間で枯渇するように計算した量で存在させたが、グルコースは、24時間時点で発酵中ずっと完全レベルであるのが可能なレベルで培地に与えた。したがって、Micro 24の培養培地は、試験の対象である株がおよそ8時間の間は活発に増殖し、その後およそ16時間で増殖及び活発な脂質生成は緩慢になってやがて停止するように設計した。

【0136】

24時間のMicro 24培養期間の終わりに、培養アリコート回収して、実施例3で説明したようにしてバイオマスと脂肪酸 (FAME脂質) を評価した。いくつかの由来株は、原株1602と比べて総有機炭素の高いパーセンテージがDHAであったのみならず、FAME/TOCが増加していることが認められた。

【0137】

培養期間中のTOC、FAME脂質及びDHAの比率変化を図3に示す。いくつかの由来株は、24時間の培養期間中、原株である1602よりも急速に総有機炭素、FAME脂質及びDHAが増加したことが示された。Micro 24発酵槽で一番性能が良かったのは、($20\mu\text{g}/\text{mL}$ のセルレニン寒天プレートから分離した) クローン1602-RR02-20-2であり、特にFAME及びDHAの生産性が良好であった。このセルレニン抵抗性株はまた、大容量発酵においてバイオマスとDHAの両方の生産性が野生株を上回り、NH-5574という名称を与えられた。

【0138】

実施例5 急増殖するトリクロサン抵抗性ツボカビ類株の選択

別々の処置で、5種類の線量 (25Gy 、 75Gy 、 100Gy 、 150Gy 及び 250Gy) のガンマ線放射を用いて、実施例4でセルレニン抵抗性について選択したNH-5574株の 400×10^6 個の細胞の変異誘発を行った。変異誘発した細胞をペレット化 ($2,000 \times \text{g}$ で5分間) し、最少培地 5mL に再度浮遊させ、トリクロサン $0.5\text{mg}/\text{L}$ を含む最少培地を収容するサイトスタット発酵槽に接種した (サイトスタットは実施例3で説明したように設定した)。トリクロサンは、脂肪酸シンターゼ (FAS) 酵素のエノイルレダクターゼドメイン (ER) に結合するFAS阻害剤である (Heathら (1999) J. Biol. Chem., 274:11110-11114)。サイトスタット培養の希釈率は、最初の55時間は一定して0~0.05のままだったが、だいたい56時間で上昇し始め、希釈率は >0.5 に上昇した。発酵は115時間で中断し、この時点で 5mL の細胞を、トリクロサンなしの最少培地を収容する 50mL の振盪フラスコ内に継代培養した。培養はトリクロサンなしで3日間に亘り3回継代培養し

、その後それぞれ0 mg/L、0.5 mg/L、1 mg/L及び2 mg/Lのトリクロサンを含む寒天プレートに蒔いた。トリクロサン全濃度について増殖を観察し、全プレートから全部で20コロニーを抜き取って、Micro24発酵槽で生産性を評価した。（実施例4で説明した）Micro24発酵槽アッセイで一番性能が良かったのは、クローン1602-RR03-08であった。表4は、セルレニン+トリクロサン抵抗性株の両方が、DHA生産性の両方において明確に野生型を上回ったことを示す。さらに、NH-5783株と改名されたクローン1602-RR03-08はまた、総脂肪酸パーセンテージとしてDHA含有量がより高かった（表4）。

【0139】

（表4）小規模発酵におけるラビリンチュラ綱分離株の生産性

	DHA (% FAME)	DHA生産性 (g/L/h)
WH-5554	24.6±0.5	133±2.6
NH-5873	32.6±0.5	159.3±2.9

【0140】

図4に、WH-5554株及びWH-5783株により生産された脂肪酸の独立成分分析の図を示す。同図から、DHA対DPAの比はNH-5783株（4.01）と野生型原株WH-5554（4.37）ではだいたい同じだが、WH-5783株のほうが原株よりもDHAとしてのFAMEのパーセンテージが高い（原株の26%に対し31%）ことがわかる。ミリスチン酸の顕著な増加も目立つが、これはNH-5783ではFAMEのパーセンテージで野生型原株WH-5554の2倍以上である。

【0141】

実施例6 株のDHA生産性をさらに強化するUV処置

実施例5で分離したNH-5783株の細胞4億個を4つの20×20 cmの寒天プレートに蒔き、2時間かけて付着させた。4つのプレートを4種類の線量（3000 μJ/cm²、5000 μJ/cm²、7000 μJ/cm²、及び10000 μJ/cm²）のUV放射に曝露してから、暗所で2時間かけて回復させ、その後細胞を6 mLの最少培地中に剥離させて阻害剤なしの最少培地を収容するサイトスタット発酵槽に注入した（サイトスタット設定は実施例3と同じ）。希釈率は最初の12時間は緩慢だった（約0.2）が、その後は野生型の増殖率に近似して上昇した（>0.5）。24時間発酵と120時間発酵の後に細胞をサイトスタットから回収し、単一クローンを寒天プレート上に分離した。24時間時点の9クローンと、120時間時点の10クローンを抜き出して、Micro24発酵槽で生産性を評価した。Micro24発酵槽で一番性能が良かったのは、24時間時点のクローン1602-RR13-04（NH-6161）と、120時間時点のクローン1602-RR13-10（NH-6181）であった。結果を表5に示し、また図4にもグラフ化するが、UV処置しサイトスタット選択した株はDHAとして高パーセンテージの脂肪酸を生産したことが示された（NH-6161とNH-6181では39%であったのに対し、セルレニン/トリクロサンで選択された原株NH-5783では30%、野生型原株WH-5554ではわずか24.6%）。さらに、NH-6161株とNH-6181株は、原株NH-5783よりもDHA及びミリスチン酸（myristate）（C14:0）の含有量が総脂肪酸パーセンテージとしてかなり高かった（32%及び31%に対してセルレニンで選択されたNH-5783株は12.7%、野生型WH-5554はわずか5%）。

【0142】

（表5）各株の脂肪酸組成

10

20

30

40

	WH-5554	NH-5783	NH-6161	NH-6181
ミリスチン酸	5.0%	12.7%	32.1%	31.1%
パルミチン酸	61.2%	46.9%	15.3%	16.1%
DPA	5.6%	6.1%	8.7%	8.9%
DHA	24.6%	30.4%	39.2%	39.5%
その他	3.7%	3.9%	4.7%	4.5%

【0143】

実施例7 野生型分離株WH-5554と標準的なやり方で改良した由来株の脂質生産性比較

標準的なやり方で改良した株のDHA生産性についてMicro24ミニチュアバイオリアクターシステム（ニューヨーク州ポートワシントン Pall Life Sciences社）でスクリーニングした。簡単に説明すると、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.65 g/L、KCl 0.5 g/L、 MgSO_4 2.5 g/L、Instant Ocean塩 17 g/L、微量元素溶液5 mL、ビタミン溶液1 mL/L、及びデキストロース40 g/Lを含む培養培地を含む6 mLの培養を設定した。微量元素溶液には、EDTA二ナトリウム塩6 g/L、 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.29 g/L、 H_2BO_3 6.84 g/L、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.86 g/L、ZnCl₂ 保存液（60 g/L）1 mL、 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 保存液（2 g/L）1 mL、 $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 保存液（60 g/L）1 mL、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 保存液（2 g/L）1 mL、及び $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 保存液（5 g/L）1 mLが含まれた。ビタミン溶液には、チアミン200 mg/L、1リットル当たり10 mLのビオチン保存液0.1 g/L、及び1リットル当たり1 mLのシアノコバラミン保存液1 g/Lが含まれた。

【0144】

6 mLの培養の開始OD740値が1.4となるように、振盪フラスコの各株の対数中期の培養を用いて標準化した。Micro24の発酵物は、600 rpmで攪拌しながら30℃で23時間インキュベートした。各株を二連培養で発酵した。溶解酸素濃度は飽和度10%であった。発酵の開始時と終了時に細胞を回収して、TOC、FAMEグルコース及びアンモニアについてアリコート进行分析した。標準的なやり方で改良した株のMicro24の小規模発酵データの一例を表6に示す。2回変異誘発し、サイトスタット選別したNH-5783株は、その原株WH-5554と比べて、脂肪酸パーセントとしてのDHAならびにDHA生産性が大幅に増加していた。UV処置したNH-5783由来株（NH-6161及びNH-61681）は、FAMEのパーセントとしてのDHA及びDHA生産率の両方においてさらに大幅な増加を示した。

【0145】

（表6）標準的なやり方で改良した株の小規模発酵におけるDHA生産性

株	WH-5554	NH-5783	NH-6161	NH-6181
DHA (mg/l/h)	133±2.6	159.3.2±2.9	199.2±21.4	212.9±3.3
DHA/FAME (%)	24.6±0.5	32.6±0.5	39.2±0.7	39.5±0.5

【0146】

実施例8 分離株の系統樹

18SrDNA、アクチン及びβチューブリンの3種類の遺伝子座を調査して、Tsuiら（Molecular Phylogenetics and Evolution 50: 129-140 (2007)）にしたがい系統樹を決定した。すべてのヤブレッツボカビ関連の属を分析に含めたが、例外としてビオコソエカ属（Biocosoea）の種及びカエシテルス属（Caecitellus）の種は除外した。各座について

、系統樹を構築する4つの方法として最尤法、最大節約法、最小進化法及び近隣結合法を実施した。便宜上、図8では、もっとも厳密な方法（最尤法）だけを18S rDNA配列に与えた。距離行列法（pairwise distance）の結果は、WH-5554株とWH-5628株が近縁関係にあることを示している。これらの株にもっとも近縁なのは、オーランチオキトリウム・マングロベイ（*Aurantiochytrium mangrovei*）（基礎異名シゾキトリウム・マングロベイ（*Schizochytrium mangrovei*））と考えられる。シゾキトリウム属の種ATCC 20888もまた、WH-5554株及びWH-5628株と近縁であるが、オーランチオキトリウム・マングロベイほどではない。3つの遺伝子座のギャップ差バーコードに基づき、本明細書ではWH-5554とWH-5628と命名しARS微生物株保存機関にNRRRL-50834（WH-5554株）とNRRRL-50835（WH-5628株）として寄託した新規分離株は、オーランチオキトリウム属の種であると考え。距離行列法の結果は、WH-5554株とWH-5628株が近縁関係にあることを示している。新規分離株の脂質プロファイルがこのことを立証している。Yokoyama and Honda（*Mycoscience* 48: 199-211（2007））は、オーランチオキトリウム属の種はFAME脂質の5%以下をアラキドン酸（ARA）として、またFAME脂質の最大約80%をDHAとして有すると定義している。一方で、シゾキトリウム属の種のARA含有量は、FAMEの約20%である。表8は、NH-6161から分離した微生物粗油の脂肪酸組成の分析結果を示す。

【0147】

（表8）微生物粗油中の脂肪酸（% FAME）

	脂肪酸の 平均%
DHAn3	
C22:6 n3	38.39%
DPA n6	
C22:5 n6	9.21%
ミリスチン酸	
C14:0	25.36%
パルミチン酸	
C16:0	19.51%
EPA	
C20:5 n3	0.60%
ARA	
C20:4 n6	0.16%

【0148】

さらに、分離されたWH-5554株に由来する分離されたWH-5628株及びNH-5783株（実施例6参照）のカロテノイド分析から、両方の株がカロテノイドであるエキネノン、カンタキサンチン、フェニコキサンチン及びアスタキサンチンを生産することが示されたが（表9及び図9）、これはオーランチオキトリウム属の種の特徴であって、シゾキトリウム属の種には見られない（Yokoyama and Honda（2007））。

【0149】

（表9）ラビリンチュラ綱分離株のカロテノイド含有量

株	トコトリエノール アルファ,	b-カロテン	エキネノン	カンタキサンチン	アスタキサンチン 20:4	アスタキサンチン (16:0/16:0)
WH-5628 (886)		+	+	+	+	+
NH-5783 (WH-5554 由来)		+		+		+

【0150】

最後に、分離株WH-5628、及びWH-5554由来株であるNH-5783の各細胞を栄養生長中に顕微鏡観察した（図10）。Yokoyama and Honda（2007）によるオーランチオキトリウム属の形態学的記述と一致して、WH-5628株及びNH-5783株の栄養細胞は、単一細胞として分散しており、シゾキトリウム属の特徴である大きな凝集塊としては観察されなかった。液体培地中15℃で繁殖させた培養は、繁殖後60時間着色しているのが肉眼観察され、これはNH-5783株（ひいては親株であるWH-5554）及びWH-5628株の両方がオーランチオキトリウム属であってシゾキトリウム属ではないとする同定と一致する表現型である。

【0151】

配列表

配列番号1

DNA

オーランチオキトリウム属の種

WH-05554株の18S rDNAフラグメント1

TCCGCAGGTTACCTACGGAACCTTGTTACGACTTCACCTTCCTCTAAACAATAAGATTCACCCGAG
TTCTGCCTCTGTCCAAAATTAATCCAAACAGAAACATCCCATGGTTTCATCGGACCGTTCAATCGGT
AGGTGCGACGGGCGGTGTGTACAAAGGGCAGGGACGTATTCAATGCAAGCTGATGACTTGCCTTTACT
AGGAATTCCTCGTTGGAGATTAATAATTGCAAAAATCTAGCCCCAGCACGATGAGCGTTCCAAGGATT
AGCCAGGCCTTCCGACCAAGCACTCAATTCCATTTAAATAGAATTTAAACCCGATGAACCCATCAGTG
TAGCGCGCGTGC GGCCAGAACATCTAAGGGCATCACAGACCTGTTATTGCCTCGAACTTCCTGCCCCG
TAAACCGGACATGTCCCTCTAAGAAGTTAAAAACGTACTATGTTGCCATACCACGCACTATTTAGTAG
GCCGAGGTCTCGTTTCGTTAACGGAATTAACCAGACAAATCACTCCACCAACTAAGAACGGCCATGCAC
CACCACCCATAGAATCATGAAAGAGCTCTCAATCTGTCAATCCTACCTATGTCTGGACCTGGTAAGTT
TTCCCGTGTTGAGTCAAATTAAGCCGCANGCTCCACTCCTGGTGGTGCCCTTCCGTCAATTCCTTTAA
GTTTCAGCCTTGCGACCATACTCCCCCGGAACCCAAAGACTTT

配列番号2

DNA

オーランチオキトリウム属の種

WH-05554株の18S rDNAフラグメント2

TCTAGCCCCAGCACGATGAGCGTTCCAAGGATTAGCCAGCCTTCCGACCAAGCACTCAATTCAAAAA
ATAGAATTTAAACCCGATGAACCCATCAGTGTAGCGCGCGTGCGGCCAGAACATNTAAGGGCATCAC
AGACCTGTTATTGCCTCGAACTTCCTGCCCCGTAAACCGGACATGTCCCTCTAAGAAGTAAAAACGTAC
TATGTTGCCATACCACGCACTATTTAGTAGCCGAGGTCTCGTTTCGTTAACGGAATTAACCAGACAAA
TCACTCCACCAACTAAGAACGGCCATGCACCACCACCCATAGAATCATGAAAGAGCTCTCAATCTGTC
AATCCTACCTATGTCTGGACCTGGTAAGTTTTCCTGTTGAGTCAAATTAAGCCGCAGGCTCCACTC
CTGGTGGTGCCCTTCCGTCAATTCCTTTAAGTTTCAGCCTTGCGACCATACTCCCCCGGAACCCAAA
GACTTTGATTTCTCATGTGCTGCTGCTGAGGCCCATAGAATAAAGCACCCAACAATCGCAAGTCGGCA
TCGTTTACGGTCTAGACTACGATGGTATCTAATCATCTTCGATCCCCAGACTTTTCGTTCTTGATTAAT
GAAAACATGCTTGGTAAATGCCTTCGCTCTAGTTCGTCTTTCGAAATCCAAGAATTTACCTCTAGC
TCCTAAATACGAATACCCCCAACTGTTCTTATTAACCATTACTCAGGCGTGCAAACCAACAAAATAGC
ACCCAAGTCCTATCTTATCATCCCATATAATAACATACCGGTCTACGACCTGCTTGGAACACTCTGCT
TTGATTACAGTGAAAGATTTCTCATCAATAAAGAAAAAGAAAAAGATGGCCAAGGCAACACAGACAATC
AATCCCCATTTCAGGGAAAGCACCGGTGCGCCATGCCAGAAATTCAACTACGAGCTTTTAACTGCAAC
AAC

10

20

30

40

50

配列番号 3

DNA

オーランチオキトリウム属の種

WH-05554株の18S rDNAフラグメント3

TTTGATTTCTCATGTGCTGCTGCTGAGGCCCATATAAAAAAGCACCCAACAATCGCAAGTCGGCATCG
TTTACGGTCTAGACTACGATGGTATCTAATCATCTTCGATCCCCAGACTTTCGTTCTTGATTAATGAA
AACATGCTTGGTAAATGCCTTCGCTCTAGTTCGTCTTTTCGGAAATCCAAGAATTTACCTCTAGCTCC
TAAATACGAATACCCCCAACTGTTCTTATTAACCATTACTCAGGCGTGCAAACCAACAAAATAGCACC
CAAGTCCTATCTTATCATCCCATATAAACAATACCGGTCATACGACCTGCTTGGAACACTCTGCTTTG
ATTACAGTGAAAGATTTCTCCCCAATAAAGAAAAGAAAAAGATGGCCAAGGCAACACAGACAATCAAT
CCCCATTACAGGGAAAGCACCGGTCGCCCATGCCAGAAATCAACTACGAGCTTTTTAACTGCAACAAC
TTTAGCATATGCTTCTGGAGCTGGAATTACCGCGGCTGCTGGCACCAGACTTGCCCTCCAGTTGATCC
TCGATGAGGGTTTTACATTGCTCTCATTCCGATAGCAAAACGCATACACGCTTCGCATCGATATTTCT
CGTCACTACCTCGTGGAGTCCACAGTGGGTAAATTTACGCGCCTGCTGCTATCCTTGGATATGGTAGCC
GTCTCTCAGGCTCCCTCTCCGGAGTCGAGCCCTAACTCTCCGTCACCCGTTATAGTCACCGTAGTCCA
ATACACTACCGTCGACAACCTGATGGGGCAGAACTCAAACGATTTCATCGACCAAAAAATAGTCAATCTG
CTCAATTATCATGATTACCAATAAAATCGGCTTCAATCTAATAAGTGCAGCCCCATACAGGGCTCTT
ACAGCATGTATTATTTCC

10

配列番号 4

DNA

オーランチオキトリウム属の種

WH-05554株の18S rDNAフラグメント4

ACTCTGCTTTGATTACAGTGAAAGATCTCATACCAAAAAATAGCATGAGAAAGATGGCCAAGGCAACA
CAGACAATCAATCCCCATTACAGGGAAAGCACCGGTCGCCCATGCCAGAAATCAACTACGAGCTTTTT
AACTGCAACAACCTTTAGCATATGCTTCTGGAGCTGGAATTACCGCGGCTGCTGGCACCAGACTTGCCC
TCCAGTTGATCCTCGATGAGGGTTTTACATTGCTCTCATTCCGATAGCAAAACGCATACACGCTTCGC
ATCGATATTTCTCGTCACTACCTCGTGGAGTCCACAGTGGGTAAATTTACGCGCCTGCTGCTATCCTTG
GATATGGTAGCCGTCTCTCAGGCTCCCTCTCCGGAGTCGAGCCCTAACTCTCCGTCACCCGTTATAGT
CACCGTAGTCCAATACACTACCGTCGACAACCTGATGGGGCAGAACTCAAACGATTTCATCGACAAAA
ATGTCAATCTGCTCAATTATCATGATTACCAATAAAATCGGCTTCAATCTAATAAGTGCAGCCCCGT
ACAGGGCTCTTACAGCATGTATTATTTCCAGAATTACTGCAGGTATCCATATAAAAGAACTACCGAA
GAAATTATTACTGATATAATGAGCCGTTTCGAGTCTCACAGTACAATCGCTTATACTTACACATGCAT
GGCTTAATCTTTGAGACAAGCATATGACTAC

20

30

配列番号 5

DNA

オーランチオキトリウム属の種

NH-05783株の18S rDNAフラグメント1

TCCGCAGGTTACCTACGGAAACCTTGTTACGACTTCACCTTCCTCTAAACAATAAGATTACCCGAG
TTCTGCCTCTGTCCAAAAATCAATCCAAACAGAAACATCCCATGGTTTCATCGGACCGTTCAATCGGT
AGGTGCGACGGGCGGTGTGTACAAAGGGCAGGGACGTATTCAATGCAAGCTGATGACTTGCGTTTACT
AGGAATTCTCGTTGGAGATTAATAATTGCAAAAATCTAGCCCCAGCACGATGAGCGTTCCAAGGATT
AGCCAGGCCTTCCGACCAAGCACTCAATTCCAAAAATGAAATTAAAACCCGATGAACCCATCAGTGTA
GCGCGCGTGCGGCCAGAACATCTAAGGGCATCACAGACCTGTTATTGCCTCGAACTTCCTGCCCCGTA
AACCGGACATGTCCCTCTAAGAAGTAAAAACGTACTATGTTGCCATACCACGCACTATTTAGTAGGCC
GAGGTCTCGTTTCGTTAACGGAATTAACCAGACAAATCACTCCACCAACTAAGAACGGCCATGCACCAC
CACCCATAGAATCATGAAAGAGCTCTCAATCTGTCAATCCTACCTATGTCTGGACCTGGTAAGTTTTC
CCGTGTTGAGTCAAATTAAGCCGCANGCTCCACTCCTGGTGGTGCCCTTCCGTCAATTCC

40

配列番号 6

DNA

オーランチオキトリウム属の種

NH-05783株の18S rDNAフラグメント2

CACTCAATTCCAAAAATGAAATTAAACCCGATGAACCCATCAGTGTAGCGCGCGTGCGGCCCAGAAC
ATCTAAGGGCATCACAGACCTGTTATTGCCTCGAACTTCCTGCCCCGTAAACCGGACATGTCCCTCTAA
GAAGTAAAAACGTACTATGTTGCCATACCACGCACTATTTAGTAGGCCGAGGTCTCGTTTCGTTAACGG
AATTAACCAGACAAATCACTCCACCAACTAAGAACGGCCATGCACCACCACCCATAGAATCATGAAAG
AGCTCTCAATCTGTCAATCCTACCTATGTCTGGACCTGGTAAGTTTTCCCGTGTTGAGTCAAATTAAG
CCGCAGGCTCCACTCCTGGTGGTGCCCTTCCGTCAATTCCTTTAAGTTTCAGCCTTGCGACCATACTC
CCCCCGGAACCCAAAGACTTTGATTTCTCATGTGCTGCTGCTGAGGCCCATAAATAAAGCACCCAAACA
ATCGCAAGTCGGCATCGTTTACGGTCTAGACTACGATGGTATCTAATCATCTTCGATCCCCAGACTTT
CGTTCTTGATTAATGAAAACATGCTTGGTAAATGCCTTCGCTCTAGTTTCGTCTTTCGGAAATCCAAGA
ATTTACCTCTAGCTCCTAAATACGAATACCCCCAACTGTTCCCTATTAACCATTACTCAGGCGTGCAA
ACCAACAAAATAGCACCCCAAGTCCTATCTTATCATCCCATAATAAACATACCGGTCATACGACCTGCT
TGGAACACTCTGCTTTGATTACAGTGAAAGATTTCTCCCTATAAAGAAAAGAAAAAGATGGCCAAGG
CAACACAGACAATCAATCCCCATTACAGGGAAGCACCGGTCGCCCATGCCAGAAATTCAACTACGAGC
TTTTTAACGTCAA

配列番号 7

DNA

オーランチオキトリウム属の種

NH-05783株の18S rDNAフラグメント3

TTTGATTTCTCATGTGCTGCTGCTGAGGCCCATAAATAAAGCACCCAAACAATCGCAAGTCGGCATCGT
TTACGGTCTAGACTACGATGGTATCTAATCATCTTCGATCCCCAGACTTTCGTTCTTGATTAATGAAA
ACATGCTTGGTAAATGCCTTCGCTCTAGTTTCGTCTTTCGGAAATCCAAGAATTTACCTCTAGCTCCT
AAATACGAATACCCCCAACTGTTCCCTATTAACCATTACTCAGGCGTGCAAACCAACAAAATAGCACCC
AAGTCCTATCTTATCATCCCATAATAAACATACCGGTCATACGACCTGCTTGGAACACTCTGCTTTGA
TTACAGTGAAAGATTTCTCCCTATAAAGAAAAGAAAAAGATGGCCAAGGCAACACAGACAATCAATC
CCCATTCAGGGAAGCACCGGTCGCCCATGCCAGAAATTCAACTACGAGCTTTTTTAACGTCAAACAACT
TTAGCATATGCTTCTGGAGCTGGAATTACCGCGGCTGCTGGCACCAGACTTGCCCTCCAGTTGATCCT
CGATGAGGGTTTTACATTGCTCTCATTCGGATAGCAAAACGCATACACGCTTCGCATCGATATTTCTC
GTCACCTACCTCGTGGAGTCCACAGTGGGTAATTTACGCGCCTGCTGCTATCCTTGGATATGGTAGCCG
TCTCTCAGGCTCCCTCTCCGGAGTCGAGCCCTAACTCTCCGTCACCCGTTATAGTCACCGTAGTCCAA
TACACTACCGTCGACAACCTGATGGGGCAGAACTCAAACGATTTCATCGACAAAAATAGTCAATCTGCT
CAATTATCATGATTCACCAATAAAATCGGCTTCAATCTAATAAGTGCAGCCCCATACAGGGCTCTTAC
AGCATGTATTATTTCCAGAATTACTGCNNTATCCATATAAAAGAACTACCGAAGAAATTATTACTGA
TATAATGAGCCGTTTCGAGTCTC

配列番号 8

DNA

オーランチオキトリウム属の種

NH-05783株の18S rDNAフラグメント4

ATCAATCCCCATTACAGGGAAGCACCGGTCGCCCATGCCAGAAATTCAACTACGAGCTTTTTTAACGTGC
AACAACTTTAGCATATGCTTCTGGAGCTGGAATTACCGCGGCTGCTGGCACCAGACTTGCCCTCCAGT
TGATCCTCGATGAGGGTTTTACATTGCTCTCATTCGGATAGCAAAACGCATACACGCTTCGCATCGAT
ATTTCTCGTCACTACCTCGTGGAGTCCACAGTGGGTAATTTACGCGCCTGCTGCTATCCTTGGATATG
GTAGCCGTCTCTCAGGCTCCCTCTCCGGAGTCGAGCCCTAACTCTCCGTCACCCGTTATAGTCACCGT
AGTCCAATACACTACCGTCGACAACCTGATGGGGCAGAACTCAAACGATTTCATCGACTAAAAAAGTCA
ATCTGCTCAATTATCATGATTCACCAATAAAATCGGCTTCAATCTAATAAGTGCAGCCCCATACAGGG
CTCTTACAGCATGTATTATTTCCAGAATTACTGCAGGTATCCATATAAAAGAACTACCGAAGAAATT
ATTACTGATATAATGAGCCGTTTCGAGTCTCACAGTACAATCGCTTATACTTACACATGCATGGCTTA
ATCTTTGAGACAAGCATATGACTAC

配列番号 9

DNA

オーランチオキトリウム属の種

NH-06161株の18S rDNAフラグメント1

TCCGCAGGTTACCTACGGAAACCTTGTTACGACTTCACCTTCCTCTAAACAATAAGATTACCCGAG
TTCTGCCTCTGTCCAAAAATCAATCCAAACAGAAACATCCCATGGTTTCATCGGACCGTTCAATCGGT
AGGTGCGACGGGCGGTGTGTACAAAGGGCAGGGACGTATTCAATGCAAGCTGATGACTTGCCTTTACT
AGGAATTCCTCGTTGGAGATTAATAATTGCAAAAATCTAGCCCCAGCACGATGAGCGTTCCAAGGATT
AGCCAGGCCTTCCGACCAAGCACTCAATTCCAAAAATTGAAATTAAAACCCGATGAACCCATCAGTGT
AGCGCGCGTGC GGCCAGAACATCTAAGGGCATCACAGACCTGTTATTGCCTCGAACTTCCTGCCCCGT
AAACCGGACATGTCCCTCTAAGAAGTAAAAACGTACTATGTTGCCATACCACGCACTATTTAGTAGGC
CGAGGTCTCGTTCTTAACGGAATTAACCAGACAAATCACTCCACCAACTAAGAACGGCCATGCACCA
CCACCCATAGAATCATGAAAGAGCTCTCAATCTGTCAATCCTACCTATGTCTGGACCTGGTAAGTTTT
CCCGTGTGAGTCAAATTAAGCCGCANGCTCCACTCCTGGTGGTGCCTTCCGTCAATTCCTTTAAGT
TTCAGCCTTGCGACCATAC

10

配列番号 1 0

D N A

オーランチオキトリウム属の種

NH-06161株の18S rDNAフラグメント2

CGACCAAGCACTCAATTCCAAAAATTGAAATTAAAACCCGATGAACCCATCAGTGTAGCGCGCGTGCG
GCCCAGAACATCTAAGGGCATCACAGACCTGTTATTGCCTCGAACTTCCTGCCCCGTAAACCGGACATG
TCCCTCTAAGAAGTAAAAACGTACTATGTTGCCATACCACGCACTATTTAGTAGGCCGAGGTCTCGTT
CGTTAACGGAATTAACCAGACAAATCACTCCACCAACTAAGAACGGCCATGCACCAACCCCATAGAA
TCATGAAAGAGCTCTCAATCTGTCAATCCTACCTATGTCTGGACCTGGTAAGTTTTCCCGTGTGAGT
CAAATTAAGCCGCAGGCTCCACTCCTGGTGGTGCCTTCCGTCAATTCCTTTAAGTTTCAGCCTTGCG
ACCATACTCCCCCGGAACCCAAAGACTTTGATTTCTCATGTGCTGCTGCTGAGGCCCATAAAAAAGC
ACCCAACAATCGCAAGTCGGCATCGTTTACGGTCTAGACTACGATGGTATCTAATCATCTTCGATCCC
CAGACTTTTCGTTCTTGATTAATGAAAACATGCTTGGTAAATGCCTTCGCTCTAGTTCGTCTTTTCGGAA
ATCCAAGAATTTACCTCTAGCTCCTAAATACGAATACCCCCAACTGTTCCCTATTAACCATTACTCAG
GCGTGCAAACCAACAAAATAGCACCCAAGTCCTATCTTATCATCCCATAATAAACATACCGGTCATAC
GACCTGCTTGGAACACTCTGCTTTGATTACAGTGAAAGATCTCATACCAAATAGCATGAGAAAGATG
GCCAAGGCAACACAGACAATCAATCCCCATTACGGGAAAGCACCGGTCGCCCATGCCAGAAATTCAAC
TACGAGCTTTTTAACTGCAACAA

20

配列番号 1 1

D N A

オーランチオキトリウム属の種

NH-06161株の18S rDNAフラグメント3

AAGACTTTGATTTCTCATGTGCTGCTGCTGAGGCCCATATAATAAAGCACCCAACAATCGCAAGTCGG
CATCGTTTACGGTCTAGACTACGATGGTATCTAATCATCTTCGATCCCCAGACTTTCGTTCTTGATTA
ATGAAAACATGCTTGGTAAATGCCTTCGCTCTAGTTCGTCTTTTCGGAAATCCAAGAATTTACCTCTA
GCTCCTAAATACGAATACCCCCAACTGTTCCCTATTAACCATTACTCAGGCGTGCAAACCAACAAAATA
GCACCCAAGTCCTATCTTATCATCCCATAATAAACATACCGGTCATACGACCTGCTTGGAACACTCTG
CTTTGATTACAGTGAAA:GATCTCATACCGAAAACAGCATGAGAAAGATGGCCAAGGCAACGCAGACA
ATCAATCCCCATTACGGGAAAGCACCGGTCGCCCATGCCAGAAATTCAACTACGAGCTTTTTAACTGC
AACAACTTTAGCATATGCTTCTGGAGCTGGAATTACCGCGGCTGCTGGCACCAGACTTGCCCTCCAGT
TGATCCTCGATGAGGGTTTTACATTGCTCTCATTCGGATAGCAAAACGCATACACGCTTCGCATCGAT
ATTTCTCGTCACTACCTCGTGGAGTCCACAGTGGGTAATTTACGCGCCTGCTGCTATCCTTGGATATG
GTAGCCGTCTCTCAGGCTCCCTCTCCGGAGTCGAGCCCTAACTCTCCGTCACCCGTTATAGTCACCGT
AGTCCAATACACTACCGTCGACAACCTGATGGGGCAGAACTCAAACGATTTCATCGACTCAAAAAGTCA
ATCTGCTCAATTATCATGATTACCAATAAAATCGGCTTCAATCTAATAAGTGCAGCCCCATACAGGG
CTCTTACAGCATGTATTATTTCCAGAATTACTGC

30

40

配列番号 1 2

D N A

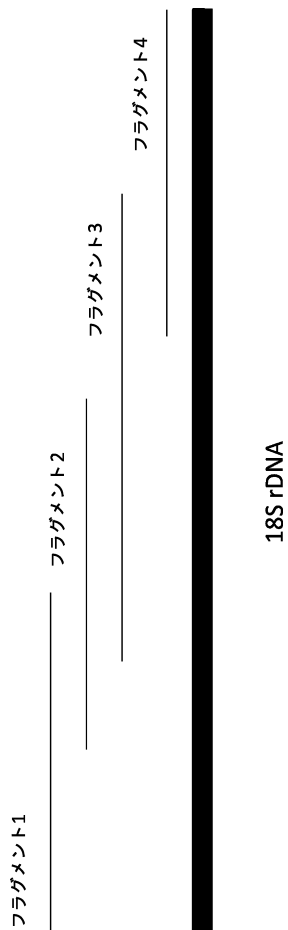
オーランチオキトリウム属の種

NH-06161株の18S rDNAフラグメント4

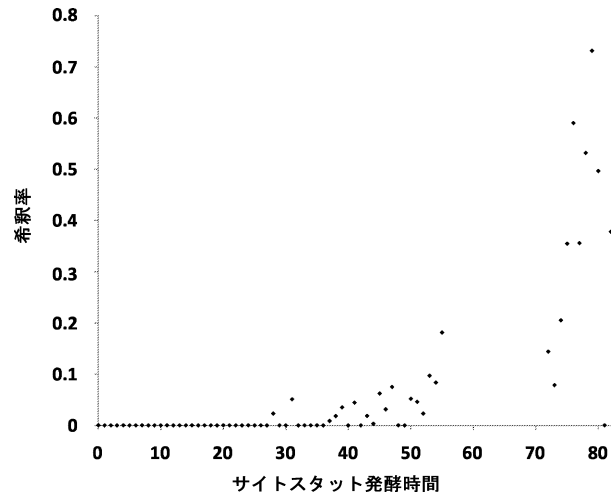
TCTGCTTTGATTACAGTGAAAAGATCTCATACCAAATAGCATGAGAAAGATGGCCAAGGCAACACAG
 ACAATCAATCCCCATTCAGGGAAAGCACCGGTCGCCCATGCCAGAAATTCAACTACGAGCTTTTAAAC
 TGCAACAACCTTTAGCATATGCTTCTGGAGCTGGAATTACCGCGGCTGCTGGCACCAGACTTGCCCTCC
 AGTTGATCCTCGATGAGGGTTTTACATTGCTCTCATTCCGATAGCAAAACGCATACACGCTTCGCATC
 GATATTTCTCGTCACTACCTCGTGGAGTCCACAGTGGGTAATTTACGCGCCTGCTGCTATCCTTGGAT
 ATGGTAGCCGTCTCTCAGGCTCCCTCTCCGGAGTCGAGCCCTAACTCTCCGTCAACCGTTATAGTCAC
 CGTAGTCCAATACACTACCGTCGACAACCTGATGGGGCAGAACTCAAACGATTTCATCGACCAAAAAAG
 TCAATCTGCTCAATTATCATGATTCACCAATAAAATCGGCTTCAATCTAATAAGTGCAGCCCCATACA
 GGGCTCTTACAGCATGTATTATTTCCAGAATTACTGCAGGTATCCATATAAAAGAACTACCGAAGAA
 ATTATTACTGATATAATGAGCCGTTTCGCAGTCTCACAGTACAATCGCTTATACTTACACATGCATGGC
 TTAATCTTTGAGACAAGCATATGACTAC

10

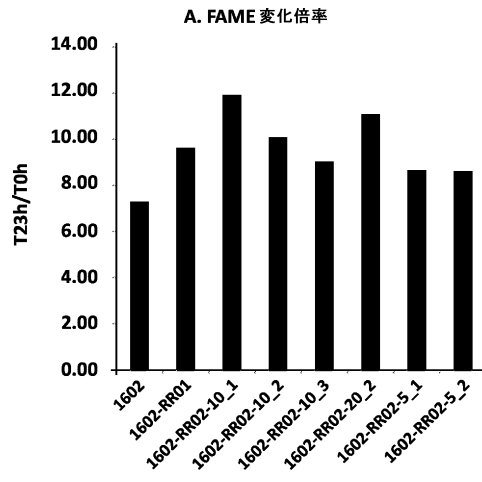
【図 1】



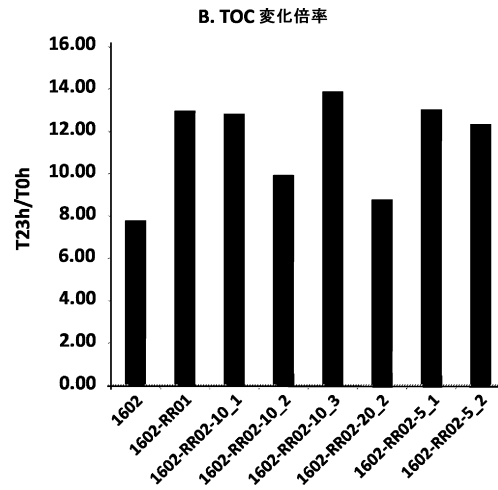
【図 2】



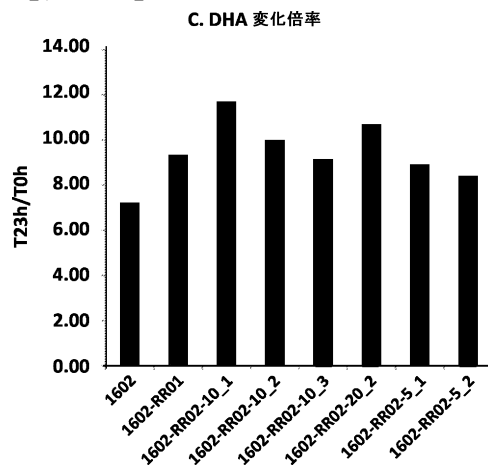
【図 3 A】



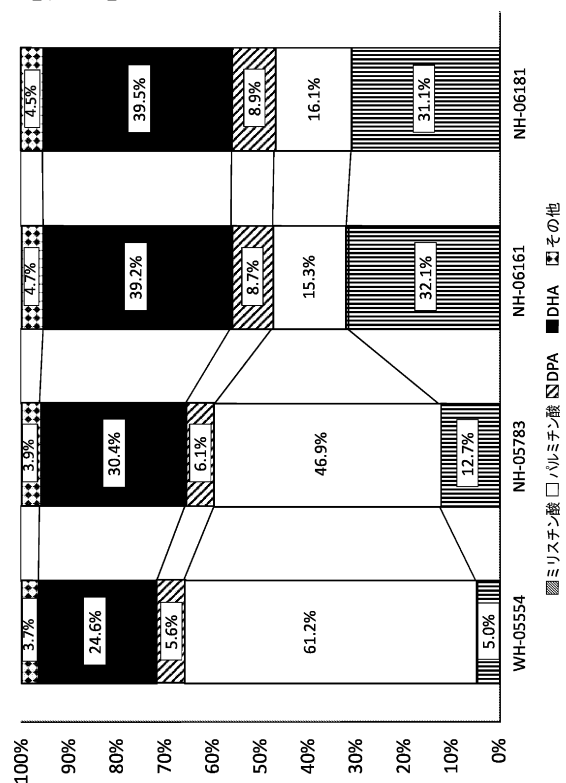
【図 3 B】



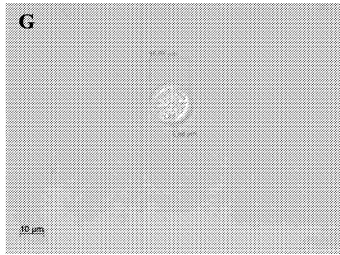
【図 3 C】



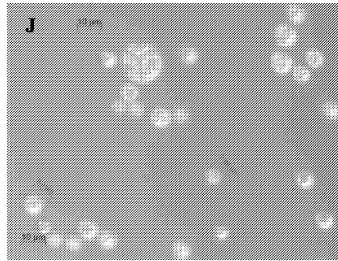
【図 4】



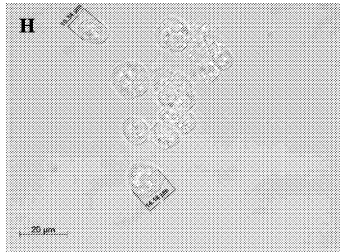
【図 7 G】



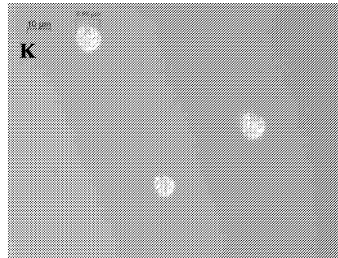
【図 7 J】



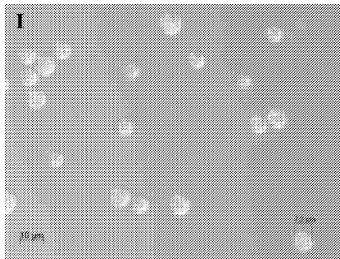
【図 7 H】



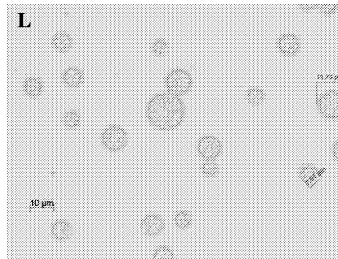
【図 7 K】



【図 7 I】



【図 7 L】



【配列表】

0006901859000001.app

フロントページの続き

- (51)Int.Cl. F I
- | | | | | | |
|----------------|---------------|------------------|----------------|---------------|----------|
| A 6 1 K | 31/202 | (2006.01) | A 6 1 K | 31/202 | |
| A 6 1 K | 31/20 | (2006.01) | A 6 1 K | 31/20 | |
| A 6 1 P | 3/02 | (2006.01) | A 6 1 P | 3/02 | |
| C 1 2 N | 15/09 | (2006.01) | C 1 2 N | 15/09 | Z |
- (74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一
- (74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
- (74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
- (74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
- (74)代理人 100205707
弁理士 小寺 秀紀
- (74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
- (74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘
- (74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥
- (72)発明者 ラダコヴィッツ ランドール アール.
アメリカ合衆国 9 2 0 2 6 カリフォルニア州 エスコンディード ランチョ ロブレ ロード
1 0 1 3 6
- (72)発明者 シャンパーニュ ミッシェル エム.
アメリカ合衆国 9 2 0 2 4 カリフォルニア州 サンディエゴ オックスボウ サークル 1 2
4

審査官 小倉 梢

(56)参考文献 特表2010-511377 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 P 7 / 6 4

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)