

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2016年1月21日(21.01.2016)



(10) 国際公開番号
WO 2016/009630 A1

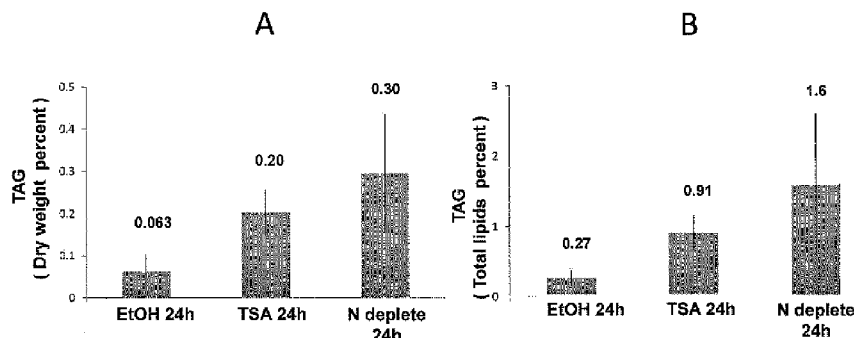
- (51) 国際特許分類:
C12P 7/64 (2006.01) *C12N 1/12* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2015/003505
- (22) 国際出願日: 2015年7月10日(10.07.2015)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2014-144756 2014年7月15日(15.07.2014) JP
- (71) 出願人: 国立研究開発法人科学技術振興機構(JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY) [JP/JP]; 〒3320012 埼玉県川口市本町4丁目1番8号 Saitama (JP). 国立研究開発法人理化学研究所(RIKEN) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢2番1号 Saitama (JP).
- (72) 発明者: 田中 寛(TANAKA, Kan); 〒2268502 神奈川県横浜市緑区長津田町4259 国立大学法人東京工業大学内 Kanagawa (JP). 今村 壮輔(IM-AMURA, Sousuke); 〒2268502 神奈川県横浜市緑区長津田町4259 国立大学法人東京工業大学内 Kanagawa (JP). 曾根 俊之(SONE, Toshiyuki); 〒2268502 神奈川県横浜市緑区長津田町4259 国立大学法人東京工業大学内 Kanagawa (JP). 吉田 稔(YOSHIDA, Minoru); 〒3510198 埼玉県和光市広沢2番1号 国立研究開発法人理化学研究所内 Saitama (JP). 松山 晃久(MATSUYAMA, Aki-hisa); 〒3510198 埼玉県和光市広沢2番1号 国立研究開発法人理化学研究所内 Saitama (JP).
- (74) 代理人: 大野 聖二, 外(OHNO, Seiji et al.); 〒1000005 東京都千代田区丸の内一丁目6番5号丸の内北口ビル21階 大野総合法律事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第21条(3))

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING ALGA FAT OR OIL AND ALGA FAT OR OIL PRODUCTION PROMOTER

(54) 発明の名称: 藻類油脂の製造方法及び藻類油脂の産生促進剤



(57) Abstract: Provided is a method for producing an alga fat or oil, said method comprising, as a technique for achieving a high productivity without exchanging a liquid culture medium for nutrient limitation in a method for producing a fat or oil using an alga, a step for treating the alga with a lysine deacetylase inhibitor (a KDAC inhibitor) and thus elevating the degree of acetylation of proteins in cells. According to this production method, fat or oil accumulation in cells can be induced merely by adding the KDAC inhibitor even in a liquid culture medium which contains sufficient nutrients.

(57) 要約: 藻類を用いて油脂を製造する方法において、栄養制限のための培養液の交換操作を行うことなく、高い生産性を達成することが可能な技術として、藻類をリジンデアセチラーゼ阻害剤(KDAC阻害剤)で処理し、細胞内タンパク質のアセチル化度を亢進させる工程を含む、藻類油脂の製造方法を提供する。この製造方法によれば、培養液中に栄養が十分に存在していてもKDAC阻害剤を添加するだけで細胞の油脂蓄積を誘導できる。

WO 2016/009630 A1

明 細 書

発明の名称：藻類油脂の製造方法及び藻類油脂の産生促進剤

技術分野

[0001] 本発明は、藻類油脂の製造方法及び藻類油脂の産生促進剤に関する。より詳しくは、リジンデアセチラーゼ阻害剤を用いた藻類油脂の製造方法等に関する。

背景技術

[0002] 植物油脂は、食用に加え、界面活性剤の原料や燃料の用途のために、需要が拡大している。藻類は、栄養欠乏、強光などのストレス条件下で油脂を蓄積する。藻類を用いて油脂を製造する方法として、窒素を含有している培養液を用いて藻類を培養し増殖させた後、培養液を窒素を含有しないものに交換して細胞を窒素飢餓状態とすることによって、藻類の油脂産生を誘導する方法がある。しかし、この従来方法では、栄養制限のための培養液の交換に多くのエネルギー消費とコストが発生する。

[0003] 特許文献1には、栄養制限のための培養液の交換操作を行うことなく、バイオマスを生産させることが可能な藻類が開示されている。この藻類は、葉緑体内のグルタチオン濃度を増加させる操作を加えることにより、デンプンの産生能を向上させたものである。

[0004] リジンデアセチラーゼ阻害剤（KDAC阻害剤）は、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤（HDAC阻害剤）とも称され、抗がん剤としての応用が検討されてきている（特許文献2）。上市された抗がん剤に、皮膚T細胞性リンパ腫の治療薬であるゾリンザ（一般名ボリノスタット）がある。

[0005] 特許文献3では、KDAC阻害剤を糸状菌の分化抑制剤として用い、植物病害防除のために利用することが提案されている。藻類によるバイオマス産生のためにKDAC阻害剤を利用することは、これまで報告されていない。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：国際公開第2012/029727号

特許文献2：国際公開第99/11659号

特許文献3：特開2007-262058号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明は、藻類を用いて油脂を製造する方法において、栄養制限のための培養液の交換操作を行うことなく、高い生産性を達成することが可能な技術を提供することを主な目的とする。

課題を解決するための手段

[0008] 上記課題解決のため、本発明は、以下の[1]～[15]を提供する。

[1] 藻類をリジンデアセチラーゼ阻害剤（KDAC阻害剤）で処理する工程を含む、藻類油脂の製造方法。

[2] 前記工程は、前記藻類の細胞内タンパク質のアセチル化度を、リジンデアセチラーゼ阻害剤により処理していない場合（対照）に比して亢進させる工程である[1]の製造方法。

[3] 前記リジンデアセチラーゼ阻害剤が、Ky-6、Ky-9、Ky-72、Ky-317、FK228、MC1568、Tubastatin A、トリコスタチン及びこれらの塩からなる群より選択される一以上の化合物である[1]又は[2]の製造方法。

[4] 前記藻類が、紅藻類、緑藻類又は灰色藻類である[1]～[3]のいずれかの製造方法。

[5] 前記藻類が、シアニジオシゾン（Cyanidioschyzon）属、クラミドモナス（Chlamydomonas）属又はユーグレナ（Euglena）属に属する[4]の製造方法。

[6] 前記藻類が、シアニジオシゾン・メロラエ（Cyanidioschyzon merolae）、クラミドモナス・レインハルディ（Chlamydomonas reinhardtii）又はユーグレナ・グラシリス（Euglena gracilis）である[5]の製造方法。

[7] 前記藻類がシアニジオシゾン・メロラエ（Cyanidioschyzon merolae）

であり、前記リジンデアセチラーゼ阻害剤がKy-6、Ky-72、Ky-317、FK228、TSA及びこれらの塩からなる群より選択される一以上の化合物である〔6〕の製造方法。

〔8〕前記藻類がクラミドモナス・レインハルディ (*Chlamydomonas reinhardtii*) であり、前記リジンデアセチラーゼ阻害剤がKy-6、Ky-9、Ky-317、MC1568、TSA、4-phenylbutyric acid、Butyryl hydroxamic acid及びこれらの塩からなる群より選択される一以上の化合物である〔6〕の製造方法。

〔9〕前記藻類がユーグレナ・グラシリス (*Euglena gracilis*) であり、前記リジンデアセチラーゼ阻害剤がKy-6、Ky-9、Ky-29、Ky-72、Ky-317、SAHA、MS-275、FK228、Tubastatin A及びこれらの塩からなる群より選択される一以上の化合物である〔6〕の製造方法。

〔10〕栄養制限のための培養液の交換工程を含まない〔1〕～〔9〕のいずれかの製造方法。

[0009] 〔11〕リジンデアセチラーゼ阻害剤を含む、藻類油脂の産生促進剤。

〔12〕前記リジンデアセチラーゼ阻害剤が、Ky-6、Ky-9、Ky-72、Ky-317、FK228、MC1568、Tubastatin A、トリコスタチン及びこれらの塩からなる群より選択される一以上の化合物である〔11〕の産生促進剤。

[0010] 〔13〕細胞内タンパク質のアセチル化度が対照に比して高められた藻類。

〔14〕〔13〕の藻類を培養する工程を含む、藻類油脂の製造方法。

〔15〕栄養制限のための培養液の交換工程を含まない〔14〕の製造方法。

[0011] 本発明において、「藻類の細胞内タンパク質のアセチル化度を対照に比して亢進させる（高める）」とは、KDAC阻害剤により処理した細胞内のタンパク質のアセチル化度が、KDAC阻害剤による処理をしていない細胞（対照）内のタンパク質のアセチル化度に比べて高いことを意味する。具体的

には、K D A C 阻害剤未処理の藻類のアセチル化タンパク質の量と比較して、K D A C 阻害剤処理後の藻類のアセチル化タンパク質の量が1.1倍以上であることをいう。あるいは、K D A C 阻害剤未処理の藻類のアセチル化タンパク質の量と、K D A C 阻害剤処理後の藻類のアセチル化タンパク質の量との間にt検定で5%レベルの有意な増加があることをいう。タンパク質のアセチル化度は、従来公知の手法によって測定することができ、例えばアセチル化タンパク質に特異的な抗体を用いたウェスタンブロットにより測定できる。

- [0012] また、本発明において、「K D A C 阻害剤」には、藻類に対して、上記の「藻類の細胞内タンパク質のアセチル化度を対照に比して亢進させる」活性を示す物質が広く包含されるものとする。具体的には、「K D A C 阻害剤」には、少なくともK y - 6、K y - 9、K y - 7 2、K y - 3 1 7、F K 2 2 8、M C 1 5 6 8、T u b a s t a t i n A、トリコスタチン及びこれらの塩が含まれるものとする。塩としては、上記活性を有すれば特に限定されることはなく、例えばナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩などであってよい。

発明の効果

- [0013] 本発明により、栄養制限のための培養液の交換操作を行うことなく、高い生産性を達成することが可能な藻類油脂の製造方法が提供される。

図面の簡単な説明

- [0014] [図1] T S A を処理した *C y a n i d i o s c h y z o n m e r o l a e* におけるトリグリセリドの蓄積量を測定した結果を示す図である（実施例1）。Aは細胞の乾燥重量に対するT A G 重量の比率、Bは総脂質重量に対するT A G 重量の比率を示す。
- [図2] T S A を処理した *C y a n i d i o s c h y z o n m e r o l a e* におけるトリグリセリドの蓄積量を測定した結果を示す図である（実施例1）。図は細胞の乾燥重量に対するT A G 重量の比率を示す。
- [図3] T S A を処理した *C y a n i d i o s c h y z o n m e r o l a e* の

細胞の蛍光観察像を示す（実施例1）。

[図4] TSAを処理した*Chlamydomonas reinhardtii*におけるトリグリセリドの蓄積量を測定した結果を示す図である（実施例2）。図は細胞の乾燥重量に対するTAG重量の比率を示す。

[図5]種々のKDAC阻害剤により処理した*Cyanidioschyzon merolae* (A) 及び*Chlamydomonas reinhardtii* (B) において、ヒストンH3及びH4のアセチル化度を評価した結果を示す図である（実施例3）。

[図6] 4-PBとBHAを処理した*Chlamydomonas reinhardtii*のトリグリセリドの蓄積量を測定した結果を示す図である（実施例5）。

[図7] 4-PBとBHAを処理した*Chlamydomonas reinhardtii*が蓄積したトリグリセリド中の脂肪酸組成の解析結果を示す図である（実施例5）。

発明を実施するための形態

[0015] 以下、本発明を実施するための好適な形態について説明する。なお、以下に説明する実施形態は、本発明の代表的な実施形態の一例を示したものであり、これにより本発明の範囲が狭く解釈されることはない。

[0016] [KDAC阻害剤処理工程]

本発明に係る藻類油脂の製造方法は、藻類をリジンデアセチラーゼ阻害剤（KDAC阻害剤）で処理する工程を含むことを特徴とする。該工程では、KDAC阻害剤の処理の結果、細胞内タンパク質のアセチル化度の亢進が生じる。すなわち、細胞内タンパク質のアセチル化度が高められた藻類が得られる。実施例に示されるように、KDAC阻害剤の処理によって、細胞内タンパク質のアセチル化度が亢進された状態となると、藻類が油脂を蓄積するようになる。

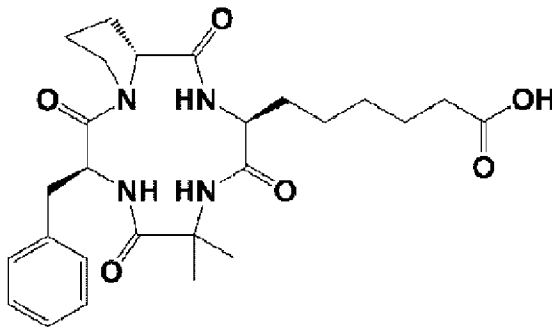
[0017] KDAC阻害剤の処理は、藻類の培養液中にKDAC阻害剤を添加することによって行えばよい。培養液中へのKDAC阻害剤の添加濃度は、特に限

定されないが、 $0.5 \sim 100 \mu\text{M}$ 、好ましくは $1 \sim 10 \mu\text{M}$ とされる。また、KDAC阻害剤の処理時間は、特に限定されないが、24時間以上、好ましくは48時間以上とされる。

[0018] 本発明に用いるKDAC阻害剤は、藻類に対してリジンデアセチラーゼ阻害活性を示すものであればよく、特に限定されない。KDAC阻害剤としては、以下の化合物又はその塩を例示できる。本発明において、KDAC阻害剤は藻類油脂の産生促進剤として作用するものであり、本発明は、KDAC阻害剤を含む藻類油脂の産生促進剤をも提供するものである。

[0019] Ky-1 (特許文献2参照)

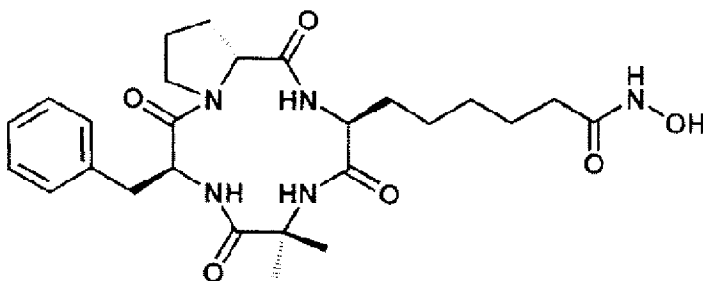
[化1]



[0020] Ky-2

<cyclo(-L-2-amino-8-hydroxamido-suberoyl-aminoisobutyryl-L-phenylalanyl-D-prolyl)-> (特許文献3参照)

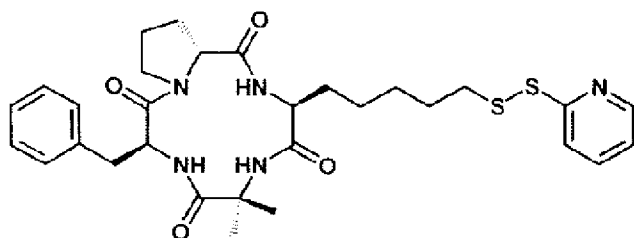
[化2]



[0021] Ky-6

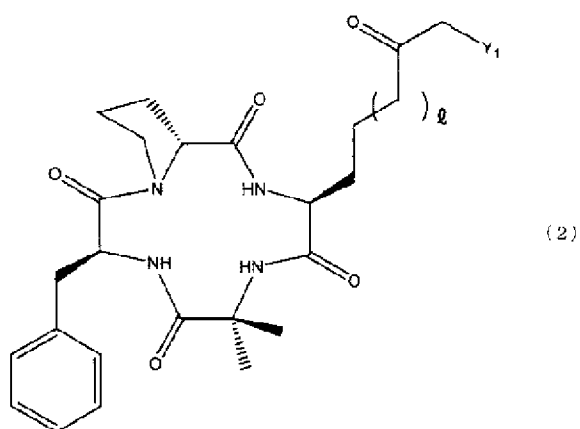
<cyclo(-L-2-amino-7-(2-pyridyldisulfidryl)heptanoyl-aminoisobutyryl-L-phenylalanyl-D-prolyl)-> (特許文献3参照)

[化3]



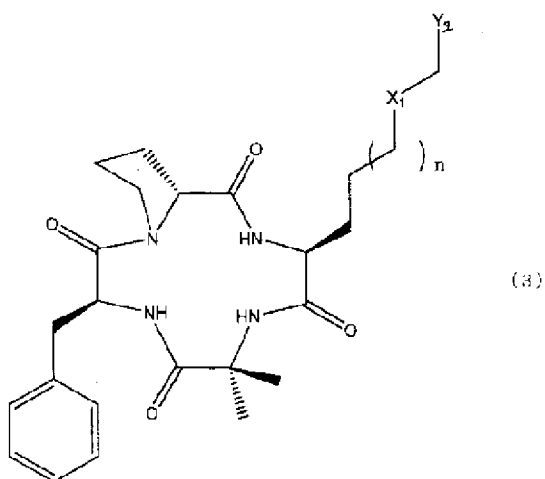
[0022] Ky-9 (特開2008-143886参照)

[化4]

Ky-9 : 上記式において $l = 3$ 、 $\text{Y}_1 = \text{OCH}_3$

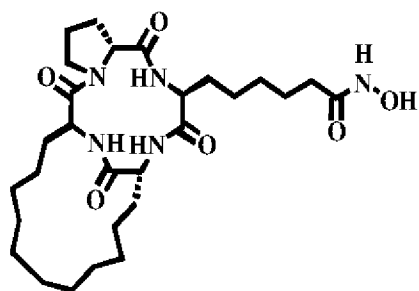
[0023] Ky-29 (特開2008-143886参照)

[化5]

Ky-29 : 上記式において $n = 3$ 、 $\text{X}_1 = \text{S}$ 、 $\text{Y}_2 = \text{COCF}_3$ Ky-72 : 上記式において $n = 3$ 、 $\text{X}_1 = \text{S}$ 、 $\text{Y}_2 = \text{COCH}_3$

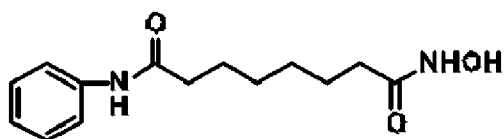
[0024] Ky-317 (Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 20 (2010) 997-999参照)

[化6]



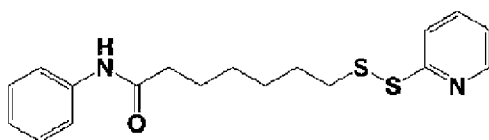
[0025] SAHA (特許文献3参照)

[化7]



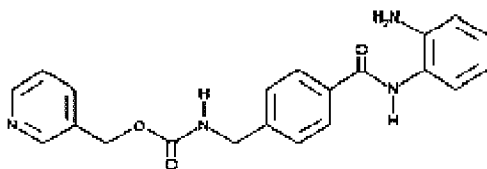
[0026] SAHA analog

[化8]



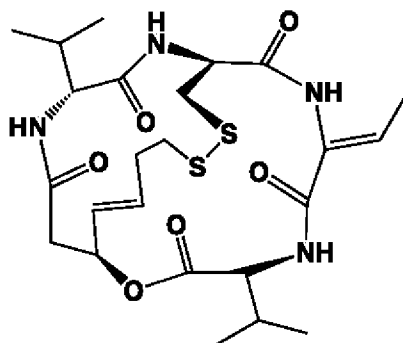
[0027] MS-275

[化9]



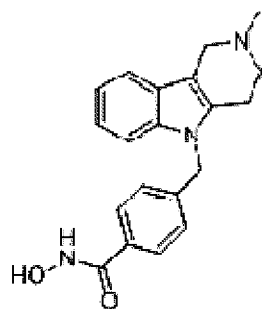
[0028] FK228

[化10]



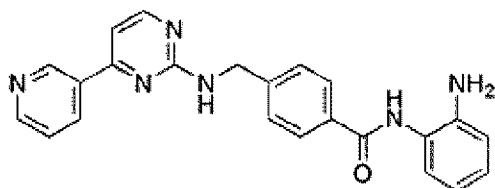
[0029] T u b a s t a t i n A

[化11]



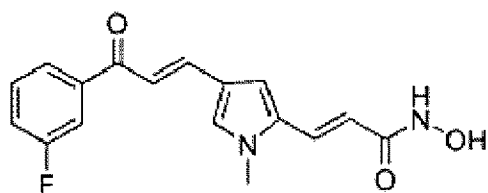
[0030] MGCD0103 (Mocetinosat)

[化12]



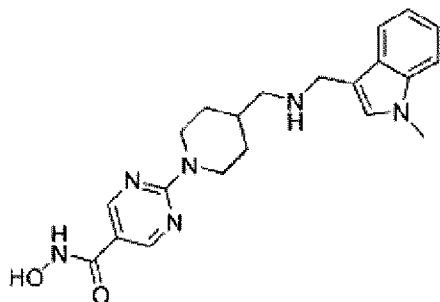
[0031] MC 1 5 6 8

[化13]



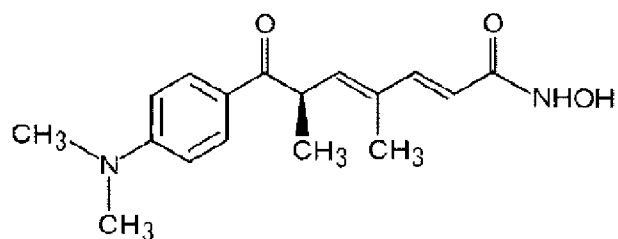
[0032] J N J - 2 6 4 8 1 5 8 5

[化14]



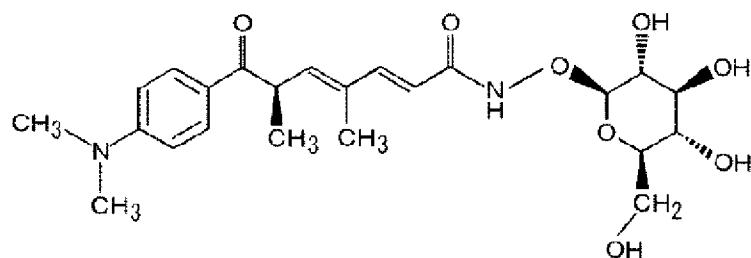
[0033] トリコスタチン A (特許文献 3 参照)

[化15]



[0034] トリコスタチン C (特許文献 3 参照)

[化16]



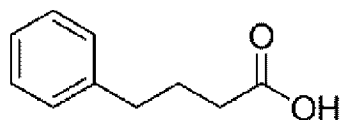
[0035] 酪酸ナトリウム (sodium butyrate: SB)

ニコチンアミド (nicotinamide: NA)

バルプロ酸 (Valproic Acid: VPA)

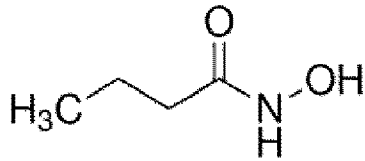
[0036] 4-phenylbutyric acid (Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 2005, 45:495-528, Figure 2参照)

[化17]



[0037] Butyryl hydroxamic acid (Experimental Hepatology, 2003, 31, 197-203, Table 1参照)。

[化18]



[0038] これらのKDAC阻害剤のなかでは、Ky-6、Ky-9、Ky-72、Ky-317、FK228、MC1568、Tubastatin A及びトリコスタチンが好ましい。

[0039] KDAC阻害剤の藻類に対するリジンデアセチラーゼ阻害活性の評価は、例えば、アセチル化タンパク質に特異的な抗体を用いたウェスタンブロットにより、細胞内のアセチル化タンパク質の量を測定し、KDAC阻害剤の処理前後で比較することによって行うことができる（実施例3参照）。

[0040] 具体的には、KDAC阻害剤の処理前の藻類のアセチル化タンパク質（例えば、アセチル化ヒストン）の量と比較して、処理後の量が1.1倍以上である場合に、該KDAC阻害剤が該藻類に対してリジンデアセチラーゼ阻害活性を有すると判断することができる。さらに、KDAC阻害剤の処理前後でアセチル化タンパク質の量にt検定で5%レベルの有意な増加がある場合に、該KDAC阻害剤が該藻類に対してリジンデアセチラーゼ阻害活性を有すると判断することが好ましい。

[0041] 実施例に示されるように、KDAC阻害剤の処理によって、細胞内タンパク質のアセチル化度が亢進された状態となると、細胞は油脂蓄積するようになることが確認されている。ここで、細胞内タンパク質のアセチル化度を亢進させるための手段は、KDAC阻害剤によるリジンデアセチラーゼの阻害に替えて、リジンデアセチラーゼの発現抑制や、リジンアセチラーゼ（KAT）の活性化又は発現誘導であってもよい。これらの手段によっても、細胞内タンパク質のアセチル化度の亢進を伴う油脂蓄積を誘導できる可能性がある。

[0042] [藻類]

本発明に用いる藻類は、油脂の産生能を有するあるいはK D A C阻害剤による処理によって油脂の産生能を発現するものであればよく、特に限定されない。油脂の産生能を有する藻類としては、例えば、紅藻類、緑藻類又は灰色藻類が知られている。

[0043] 紅藻類としては、シアニジオシゾン・メロラエ (*Cyanidioschyzon merolae*) 等のシアニジオシゾン属、ポルフィリジウム・クルエンタム (*Porphyridium cruentum*) 及びポルフィリジウム・エゾエンシス (*Porphyra yezoensis*) 等のポルフィリジウム属などが挙げられる。

[0044] 緑藻類としては、クラミドモナス・レインハルディ (*Chlamydomonas reinhardtii*) 等のクラミドモナス属、クロレラ・ブルガリス (*Chlorella vulgaris*) 等のクロレラ属、ボトリオコッカス・ブラウニー (*Botryococcus braunii*) 等のボトリオコッカス属などが挙げられる。

[0045] 灰色藻類としては、シアノフォア・パラドキサ (*Cyanophora paradoxa*) 等のシアノフォア属が挙げられる。

[0046] 藻類としては、シアニジオシゾン (*Cyanidioschyzon*) 属、クラミドモナス (*Chlamydomonas*) 属又はユーグレナ (*Euglena*) 属に属するものを好適に選択できる。より具体的には、シアニジオシゾン・メロラエ (*Cyanidioschyzon merolae*)、クラミドモナス・レインハルディ (*Chlamydomonas reinhardtii*) 又はユーグレナ・グラシリス (*Euglena gracilis*) を好適に選択できる。

[0047] 藻類としてシアニジオシゾン・メロラエ (*Cyanidioschyzon merolae*) を用いる場合には、K D A C阻害剤にはK y - 6、K y - 7 2、K y - 3 1 7、F K 2 2 8 及びT S Aからなる群より選択される一以上の化合物を用いることが好適となる。

藻類としてクラミドモナス・レインハルディ (*Chlamydomonas reinhardtii*) を用いる場合には、K D A C阻害剤にはK y - 6、K y - 9、K y - 3 1 7、M C 1 5 6 8 及びT S Aからなる群より選択される一以上の化合物を用いることが好適となる。

藻類としてユーグレナ・グラシリス (*Euglena gracilis*) を用いる場合には、KDAC阻害剤にはKy-6, Ky-9, Ky-29, Ky-72, Ky-317, SAHA, MS-275, FK228及びTubastatin Aからなる群より選択される一以上の化合物を用いることが好適となる。

[0048] [油脂]

製造する油脂としては、脂肪族カルボン酸と、1価又は3価の脂肪族アルコールと、からなる脂肪族エステル化合物が挙げられる。脂肪族カルボン酸は、藻類が産生するものであれば特に限定されず、例えば、炭素数14～22の脂肪族カルボン酸であって、具体的には、パルミチン酸、パルミトレイン酸、マルガリン酸、ステアリン酸、オレイン酸及びリノール酸等を挙げることができる。また、油脂としては、リン脂質、遊離脂肪酸、ステロイド化合物、カロテノイド等の光合成色素等も含み得る。

[0049] [培養工程]

KDAC処理前及び処理後の藻類の培養は、従来から採用されている培養条件で行えばよい。通常、空気中の二酸化炭素を炭素源として光合成で増殖させる光独立栄養的培養によって、常温で、好ましくは25～37℃で培養する。光合成のための光源は、太陽光、又は人工的な光源を用いることができる。藻類の増殖を早めるため、藻類への光照射は、2～100キロルクスで30～500時間行うことが好ましい。培地雰囲気中の二酸化炭素濃度は0.3～10体積%が好ましく、培地中への溶解込みを促進するために、必要に応じて培地を攪拌、又は空気によって曝気してもよい。

[0050] 培地には、CHU培地、JM培地、MDM培地等、一般的な無機培地を用いることができる。無機培地には、通常、窒素源として $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ や KNO_3 が、その他の主要な栄養成分として KH_2PO_4 や $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 等が含まれている。また、培地には、藻類の生育に影響を与えない抗生物質等を添加してもよい。培地のpHは、3～10が好ましい。培養期間は、初めに接種する藻体量にもよるが、0.5g/Lの藻体濃度で培養を開始し

た場合、1～20日間とすることが好ましい。

[0051] [油脂抽出工程]

培養した藻類を培地から分離し、必要に応じて乾燥を行った後、油脂の抽出を行う。分離は、ろ過や遠心分離等の固液分離手段を用いて藻類を培地から分離することが好ましい。また、培地成分の残留量を一層低減する観点から、固液分離手段によって分離された藻類を水、好ましくは脱イオン水又は蒸留水、あるいは緩衝液等で洗浄することが好ましい。

[0052] 乾燥は、一般的な条件で行うことが可能である。なお、効率的に水分が除去され、かつ、藻類細胞内の脂肪族化合物が酸化劣化を受けない条件で行うことが好ましい。例えば、大気中－30～180℃の温度で行うことが好ましい。具体的な乾燥方法としては、凍結乾燥や、加温による乾燥等が挙げられる。乾燥によって、藻類の固形粉末が得られる。

[0053] なお、培地から分離された藻類は、乾燥を行うことなく油脂抽出に供してもよい。また、分離を行うことなく、培養工程に引き続いて、藻類を含む培養液を直接油脂抽出に供してもよい。

[0054] 油脂抽出は、得られた藻類の固形粉末中に含まれる脂肪族化合物、及び／又は該固形粉末に付着する脂肪族化合物を溶媒によって抽出する。ここで、溶媒には、ヘキサンやペンタン等の脂肪族炭化水素や、酢酸エチル、ジエチルエーテル、メチルエチルケトン等の極性溶媒が用いられる。

[0055] 本発明に係る藻類油脂の製造方法によれば、培養液中に栄養が十分に存在していてもKDAC阻害剤を添加するだけで細胞の油脂蓄積を誘導できる。従って、本発明に係る藻類油脂の製造方法では、栄養制限のための培養液の交換操作を行う必要がなく、高い生産性を達成することが可能である。

[0056] また、本発明に係る藻類油脂の製造方法においては、従来の栄養欠乏条件による方法とは異なり、細胞内の葉緑体を維持できる（実施例1、図3参照）。従って、本発明に係る藻類油脂の製造方法では、藻類の光合成による炭素固定を維持したまま、油脂の産生を誘導できる可能性がある。

実施例

[0057] <実施例1：TSAを処理した*Cyanidioschyzon merolae*の油脂産生能の評価>

TSA（トリコスタチンA）処理した*Cyanidioschyzon merolae*の油脂産生能を、窒素欠乏条件で培養した*Cyanidioschyzon merolae*の油脂産生能との比較により評価した。

[0058] 藻類の培養：MA2培地、40℃、2% CO₂にて通気培養を行った。培養液を適宜希釈して以下の処理に使用した。

TSAの処理：シゾン培養液の細胞密度を 1×10^7 /ml程度に調整し、TSAを終濃度1μMとなるよう培養液に添加し、MA2培地、40℃、2% CO₂にて通気培養を行った。対照群には、エタノールのみを添加した。

窒素欠乏条件での培養：シゾン培養液の細胞密度を $2 \sim 5 \times 10^7$ /ml程度となるように調整した。培地を、MA2培地から、硫酸アンモニウムを硫酸ナトリウムに置換したMA2-N培地に交換した後、40℃、2% CO₂にて通気培養を行った。

[0059] TSAの処理24、48、72、96時間後及び窒素欠乏条件での培養開始24、48、72、96時間後に細胞を回収した。回収した細胞を凍結乾燥機により十分乾燥させ、Bligh-Dyer法により脂質を抽出し、薄層クロマトグラフィーによりトリグリセリド（TAG）を分離・精製した。精製したTAGをメタノリシス化し、TAG中の脂肪酸組成をガスクロマトグラフィー水素炎イオン検出器（GC-FID）により定量し、TAG量を算出した。

[0060] 結果を図1～図3に示す。図1A及び図2は細胞の乾燥重量に対するTAG重量の比率、図1Bは総脂質重量に対するTAG重量の比率を示す。窒素欠乏条件で培養した細胞と同様に、TSAを処理した細胞では、対照群に比してTAGの蓄積量が増加していた。

[0061] 図3に、TSAの処理後24、48、96時間及び窒素欠乏条件での培養開始後24、48、96時間における細胞の蛍光観察像を示す。緑蛍光は油滴の染色像、赤蛍光は葉緑体の染色像である。TSAを処理した細胞及び窒素欠乏条件で培養した細胞では全ての観察時間において油滴の蓄積が確認できる。窒素欠乏条件で培養した細胞では、48時間以後、葉緑体が破壊され

ているのに対し、T S A を処理した細胞では、同時間以降も、葉緑体が維持されているのが確認できる。この知見は、T S A 処理においては、窒素欠乏条件での培養と異なり、細胞内の葉緑体を維持して藻類の光合成による炭素固定を停止させることなく、油脂産生を誘導できる可能性を示している。

[0062] T A G 中の脂肪酸組成の解析結果を表 1 に示す。

[0063] [表1]

Table 1: Fatty acid compositions under TSA treatment in *C. merolae* (%)

	16:0	16:1	17:0	18:0	18:1	18:2
EtOH 24h	39.9±2.6	1.5±0.020	0.49±0.058	33.8±1.9	11.2±4.2	4.1±1.4
TSA 24h	26.9±5.6	0.76±0.20	2.5±0.57	24.0±1.3	19.1±2.3	23.2±5.4
N deplete 24h	17.9±2.6	1.45±1.2	3.1±0.74	34.6±0.48	17.4±2.0	26.8±3.0
EtOH 48h	35.8±3.6	1.7±3.0	7.4±0.86	25.0±2.39	15.5±2.4	11.4±4.8
TSA 48h	18.6±0.91	0.82±0.10	3.1±0.71	22.4±0.37	20.2±1.2	29.8±1.2
N deplete 48h	16.4±0.59	0.10±0.052	3.8±0.14	23.7±0.20	15.7±0.64	37.8±0.88
EtOH 96h	39.9±2.6	1.5±0.020	0.49±0.058	33.8±1.9	11.2±4.2	4.1±1.4
TSA 96h	14.8±2.2	0.28±0.064	1.2±0.65	18.3±2.0	17.6±2.4	29.2±0.89
N deplete 96h	17.3±3.0	0.030±0.026	3.3±0.42	17.3±3.0	16.5±3.2	43.8±10.1

[0064] T S A を処理した細胞では、処理時間に依存してリノール酸（18：2）の蓄積が進行する傾向が認められた。

[0065] <実施例 2：T S A を処理した *Chlamydomonas reinhardtii* の油脂産生能の評価>

T S A（トリコスタチン A）処理した *Chlamydomonas reinhardtii* の油脂産生能を、窒素欠乏条件で培養した *Chlamydomonas reinhardtii* の油脂産生能との比較により評価した。

[0066] T S A の処理及び窒素欠乏条件での培養は実施例 1 と同様に行った。T S A の処理 24 時間後及び窒素欠乏条件での培養開始 24 時間後に細胞を回収した。実施例 1 と同様にしてトリグリセリド（T A G）の分離及び定量と、T A G 中の脂肪酸組成の解析を行った。

[0067] 結果を図 4 に示す。図は細胞の乾燥重量に対する T A G 重量の比率を示す。窒素欠乏条件で培養した細胞と同様に、T S A を処理した細胞では、対照群に比して T A G の蓄積量が増加していた。

[0068] T A G中の脂肪酸組成の解析結果を表2に示す。

[0069] [表2]

	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	20:0	20:1	20:2
EtOH 24h	32.9±1.5	2.71±0.087	11.0±0.75	13.7±0.89	10.6±0.25	12.0±0.55	10.8±1.6	0.41±0.11	4.5±0.30
TSA 24h	20.6±0.37	5.8±0.29	12.3±0.58	17.7±0.95	13.1±0.10	12.2±0.21	11.9±0.64	0.095±0.13	4.3±0.27
N deplete 24h	30.2±0.23	2.4±0.78	9.3±0.23	24.1±0.25	10.2±0.22	6.6±0.027	0	11.1±0.42	0.014±0.0046

[0070] <実施例3：種々のKDAC阻害剤の油脂産生促進作用の評価>

Cyanidioschyzon merolae及びChlamydomonas reinhardtiiを種々のKDAC阻害剤により処理し、油脂産生量の変化を評価した。

[0071] KDAC阻害剤には、Ky-1, Ky-2, Ky-6, Ky-9, Ky-29, Ky-72, Ky-317, VPA, SAHA, SAHA analog, MS-275, FK228, Tubastatin A, MGCD0103, MC1568, JNJ-26481585, sodium butyrate (SB), nicotinamide (NA), TSAを用いた。KDAC阻害剤の処理は実施例1と同様にして行った。TSAの処理24時間後及び窒素欠乏条件での培養開始24時間後に細胞を回収した。実施例1と同様にしてトリグリセリド (TAG) の分離及び定量を行った。

[0072] また、回収した細胞内のヒストンH3及びH4のアセチル化度をウェスタンブロットにより評価した。回収した細胞を8M Ureaに懸濁し、超音波破碎と遠心分離を行って得た抽出物をサンプルとした。ウェスタンブロットは抗アセチル化抗体 (Cell Signaling Technology, #9441) を用いて行い、15kDa付近と12kDa付近に現れるバンドをそれぞれアセチル化ヒストンH3、H4として検出した。LAS-3000(Fujifilm) chemiluminescence modeにてバンドを撮像し、画像解析ソフト (image gauge) にてエリア値を算出した。

[0073] ヒストンのアセチル化度を図5に示す。図は、ヒストンのアセチル化度を、対照群 (各阻害剤の溶媒 (エタノール、DMSO、1mM DTT含DMSO) で処理したもの) を1とした相対値により示す。Ky-6, Ky-317, TSAを処置したCyanidioschyzon merolae (図A参照) 及び

Chlamydomonas reinhardtii (図B参照)では、ヒストンのアセチル化度が亢進されているのが確認できる。また、Ky-72, FK228を処理した*Cyanidioschyzon merolae*と、Ky-9, MC1568を処理した*Chlamydomonas reinhardtii*では、ヒストンのアセチル化度が亢進された。

[0074] TAGの定量の結果、ヒストンのアセチル化度の亢進が確認された細胞と、TAGの蓄積量の増加が認められた細胞とは一致した。すなわち、Ky-6, Ky-317, TSAは、*Cyanidioschyzon merolae*及び*Chlamydomonas reinhardtii*において油脂産生促進作用を示した。また、Ky-72, FK228は*Cyanidioschyzon merolae*において、Ky-9, MC1568は*Chlamydomonas reinhardtii*において油脂産生促進作用を示した。この結果から、培養液への添加によって藻類に対して活性を示し得るKDAC阻害剤であれば、藻類による油脂の産生を促進できることが明らかとなった。

[0075] <実施例4：KDAC阻害剤を処理した*Euglena gracilis* Klebsの油脂産生能の評価>

KDAC阻害剤を処理した*Euglena gracilis* Klebs NIES-48 (国立環境研究所から入手)の油脂産生能を評価した。KDAC阻害剤には、Ky-1, Ky-2, Ky-6, Ky-9, Ky-29, Ky-72, Ky-317, SAHA, SAHA analog, MS-275, FK228, Tubastatin A, MGCD0103, MC1568, JNJ-26481585, TSAを用いた。KDAC阻害剤の処理は実施例1と同様にして行った。TSAの処理24時間後に、細胞内の油滴を蛍光染色し、蛍光観察を行った。

[0076] その結果、Ky-6, Ky-9, Ky-29, Ky-72, Ky-317, SAHA, MS-275, FK228, Tubastatin Aを処理した細胞では、対照群に比して細胞内の油滴が増加した。特にKy-6及び

Tubastatin Aは効果が顕著であった。

[0077] <実施例5：KDAC阻害剤を処理した*Chlamydomonas reinhardtii*の油脂産生能の評価2>

KDAC阻害剤を処理した*Chlamydomonas reinhardtii*の油脂産生能を評価した。KDAC阻害剤には、4-phenylbutyric acid (4-PB) とButyryl hydroxamic acid (BHA) を用いた。

[0078] 光照射下、25℃で、TAP培地 (10 mM NH₄Cl添加) 中で藻類を前培養した。前培養は、細胞濃度が 0.5×10^7 cells/ml (4-PB処理群) 又は 0.2×10^7 cells/ml (BHA処理群) に達するまで行った。遠心分離後、上清を除き、同量のTAP培地で再懸濁した。懸濁液を25 mlずつプレートに分注し、4-PB又はBHAをそれぞれ終濃度3 mM、1 mMで添加した。対照群には、メタノールを添加した。光照射下、25℃で24時間静置培養した。回収した細胞を凍結乾燥機により十分乾燥させ、Bligh-Dyer法により脂質を抽出し、薄層クロマトグラフィーによりトリグリセリド (TAG) を分離・精製した。精製したTAGをメタノリシス化し、TAG中の脂肪酸組成をガスクロマトグラフィー水素炎イオン検出器 (GC-FID) により定量し、TAG量を算出した。結果を図6及び図7に示す。BHAを処理した細胞では、対照群に比してTAGの蓄積量の顕著な増加が確認された (図6参照)。また、4-PBを処理した細胞でも、対照群に比してTAGの蓄積量が増加する傾向がみられた (図6参照)。

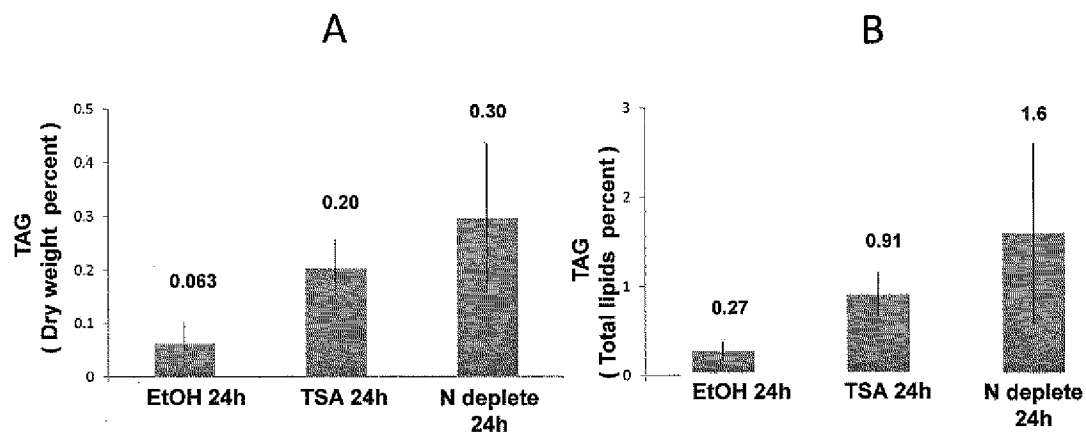
産業上の利用可能性

[0079] 本発明に係る藻類油脂の製造方法によれば、培養液中に栄養が十分に存在していてもKDAC阻害剤を添加するだけで細胞の油脂蓄積を誘導でき、従来方法のような栄養制限のための培養液の交換操作を不要とできる。従って、本発明に係る藻類油脂の製造方法は、界面活性剤の原料や燃料に用いられる藻類油脂を生産性良く製造するために利用できる。

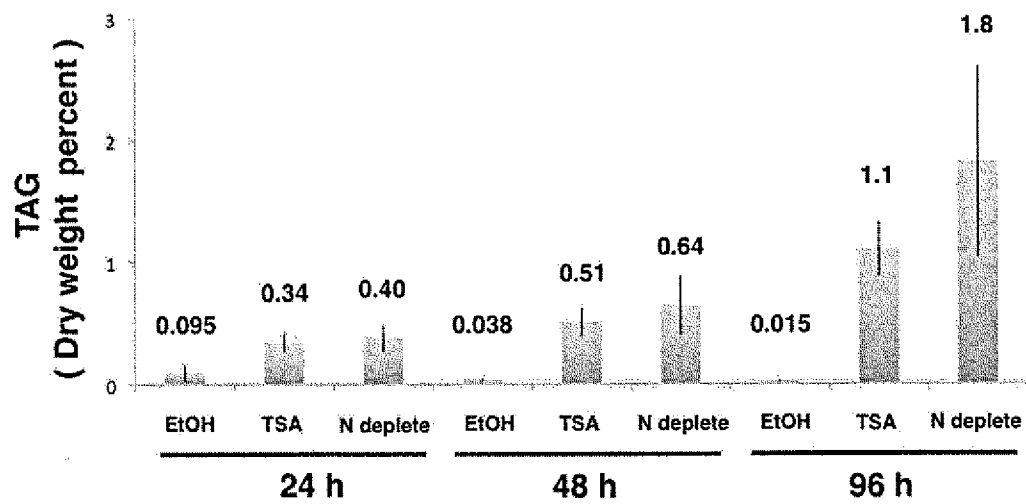
請求の範囲

- [請求項1] 藻類をリジンデアセチラーゼ阻害剤で処理する工程を含む、藻類油脂の製造方法。
- [請求項2] 前記工程は、前記藻類の細胞内タンパク質のアセチル化度を対照に比して亢進させる工程である、請求項1記載の製造方法。
- [請求項3] 前記リジンデアセチラーゼ阻害剤が、Ky-6、Ky-9、Ky-72、Ky-317、FK228、MC1568、Tubastatin A、トリコスタチン及びこれらの塩からなる群より選択される一以上の化合物である、請求項1又は2記載の製造方法。
- [請求項4] リジンデアセチラーゼ阻害剤を含む、藻類油脂の産生促進剤。
- [請求項5] 前記リジンデアセチラーゼ阻害剤が、Ky-6、Ky-9、Ky-72、Ky-317、FK228、MC1568、Tubastatin A、トリコスタチン及びこれらの塩からなる群より選択される一以上の化合物である、請求項4記載の藻類油脂の産生促進剤。
- [請求項6] 細胞内タンパク質のアセチル化度が対照に比して高められた藻類。
- [請求項7] 請求項6記載の藻類を培養する工程を含む、藻類油脂の製造方法。

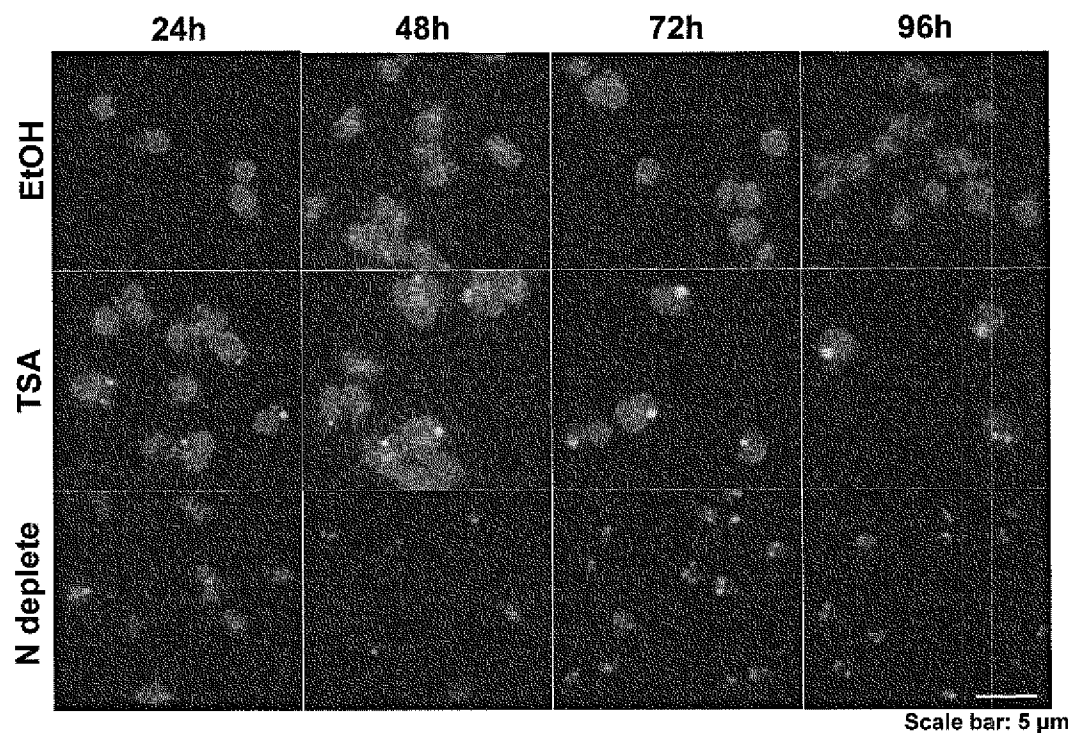
[図1]



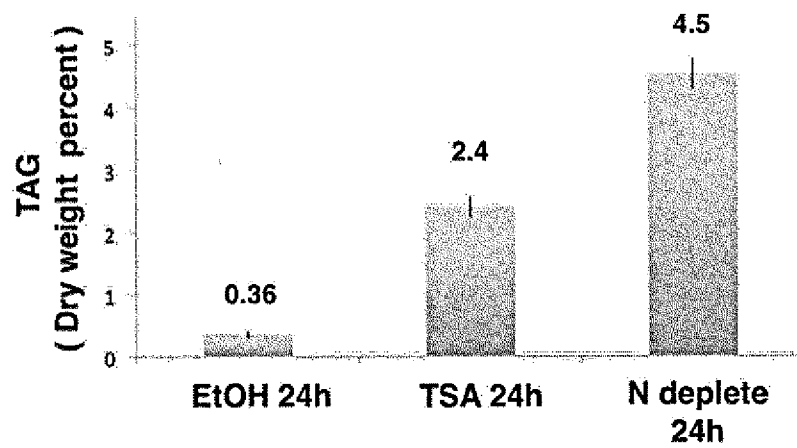
[図2]



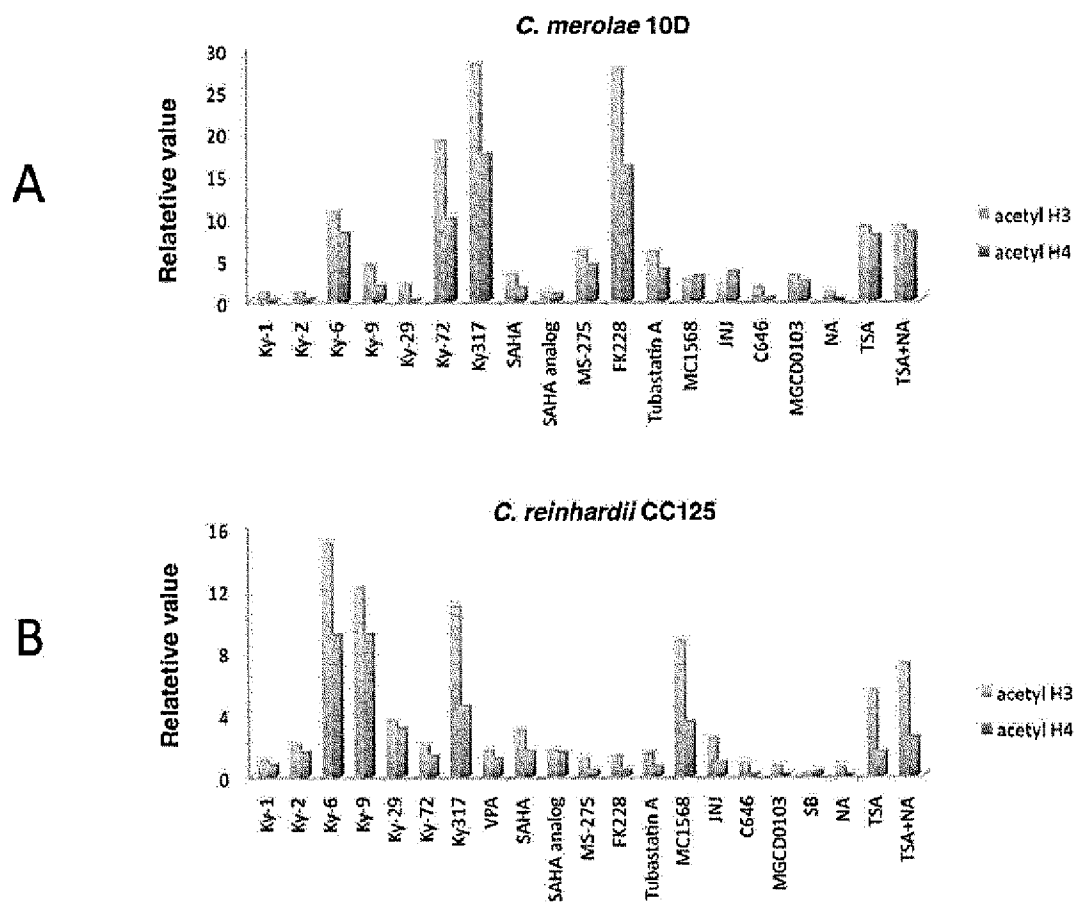
[図3]



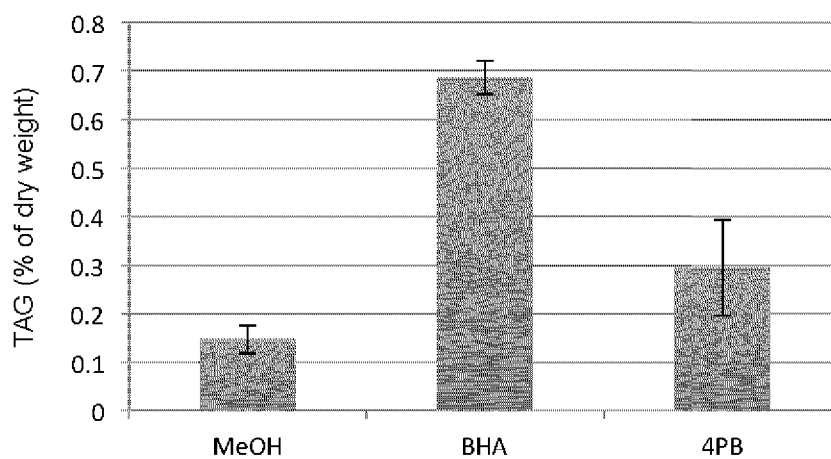
[図4]



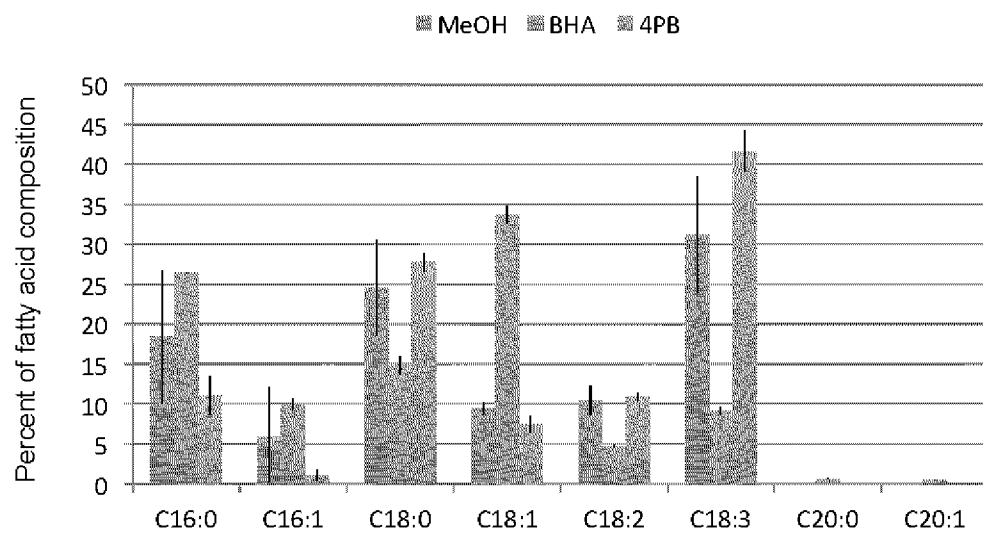
[図5]



[図6]



[図7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/003505

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P7/64(2006.01)i, C12N1/12(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12P7/64, C12N1/12

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2015
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2015	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2015

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII),
CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WATERBORG J. H., Dynamics of Histone Acetylation in Chlamydomonas reinhardtii, The Journal of Biological Chemistry, 1998, Vol.273, No.42, p.27602-27609, particularly, abstract, fig. 5	1-7
X	CHENG Q. et al., Effect of histone deacetylase inhibitors on tubulin acetylation and development in Volvox carteri(Volvocales), J. Phycol., 2006, Vol.42, p.417-422, particularly, abstract, Results, fig. 1	1-7

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
30 September 2015 (30.09.15)

Date of mailing of the international search report
13 October 2015 (13.10.15)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C）） Int.Cl. C12P7/64(2006.01)i, C12N1/12(2006.01)i			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C）） Int.Cl. C12P7/64, C12N1/12			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2015年 日本国実用新案登録公報 1996-2015年 日本国登録実用新案公報 1994-2015年			
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII) CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	
X	WATERBORG J. H., Dynamics of Histone Acetylation in Chlamydomonas reinhardtii, The Journal of Biological Chemistry, 1998, Vol.273, No.42, p.27602-27609, 特に、要約、図5	1-7	
X	CHENG Q. et al., Effect of histone deacetylase inhibitors on tubulin acetylation and development in Volvox carteri (Volvocales), J. Phycol., 2006, Vol.42, p.417-422, 特に、要約、結果、図1	1-7	
☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 30.09.2015		国際調査報告の発送日 13.10.2015	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（I S A/J P） 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官（権限のある職員） 吉岡 沙織 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4 B 3646