

(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
2022年1月27日(27.01.2022)



(10) 国際公開番号

WO 2022/019272 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 5/10 (2006.01) *C12N 1/15* (2006.01)
A23K 10/16 (2016.01) *C12N 1/19* (2006.01)
A23L 17/00 (2016.01) *C12N 1/20* (2006.01)
A23L 33/12 (2016.01) *C12N 1/21* (2006.01)
A23L 33/135 (2016.01) *C12P 7/64* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2021/026983

(22) 国際出願日: 2021年7月19日(19.07.2021)

(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 2020-123809 2020年7月20日(20.07.2020) JP

(71) 出願人: 国立大学法人京都大学 (KYOTO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町3番地1 Kyoto (JP).
ホロバイオ株式会社 (HOLO BIO CO., LTD.) [JP/JP]; 〒6158245 京都府京都市西京区御陵大原1番地の3 Kyoto (JP).

(72) 発明者: 梅田 眞郷 (UMEDA, Masato); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町3番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 従二 直人 (JUNI, Naoto); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町3番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 長尾 耕治郎 (NAGAO, Kojiro); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町3番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP).

(74) 代理人: 山尾 憲人, 外 (YAMAOKI, Norihito et al.); 〒5300017 大阪府大阪市北区角田町8番1号梅田阪急ビルオフィスタワー 青山特許事務所 Osaka (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,

CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, 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))
- 規則13の2に基づいて明細書とは別に提出された、寄託された生物材料に関する表示 (規則13の2.4(d)(i)及び48.2(a)(viii))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

(54) Title: EICOSAPENTAENOIC ACID-PRODUCING MICROBE

(54) 発明の名称: エイコサペンタエン酸を生産する微生物

(57) Abstract: The present invention provides: a *Shewanella* sp. GI35 strain (National Institute of Technology and Evaluation, Patent Microorganisms Depository, deposit number NITE BP-03244) or a mutant strain thereof; a feed containing said strain; a method for producing fish that produces eicosapentaenoic acid (EPA) in the body, the method being characterized by feeding fish with said feed; and the like.

(57) 要約: 本発明は、シェワネラ属GI35株 (*Shewanella* sp. GI35株) (独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター 受託番号 N I T E B P - 0 3 2 4 4) またはその変異株、該菌株を含む飼料、および該飼料を魚類に投与することを特徴とする、エイコサペンタエン酸 (EPA) を体内で産生する魚類の製造方法等を提供する。



WO 2022/019272 A1

明 細 書

発明の名称：エイコサペンタエン酸を生産する微生物

技術分野

[0001] 本発明は、新規に単離されたエイコサペンタエン酸 (eicosapentaenoic acid; EPA) 著量産生細菌 *Shewanella* sp. GI35株またはその変異株、それを含む飼料、および該飼料を投与することを特徴とする、EPAを体内で産生する魚類の製造方法等に関する。

背景技術

[0002] EPAは、オメガ3多価不飽和脂肪酸 (ω 3-polyunsaturated fatty acid; ω 3-PUFA) に属し、動物の発達分化・成長に必須の脂肪酸であり、炎症応答の抑制、免疫機能の制御、脳血管障害・心筋梗塞などの心血管系疾患に対して発症抑制作用を示す機能性脂質である (非特許文献1、2)。一方、ヒトを含む多くの脊椎動物は、 ω 3-PUFAの生合成に関わる脂肪酸不飽和酵素群を持たず、自らEPAを作ることができない (非特許文献3)。このため、食事等として外界から摂取する必要があり、PUFAを含むイワシやサバなどの積極的な摂取が推奨され、さらに数多くのEPAを含むサプリメントや食品が市販されている。

[0003] EPAの調製法については、魚油からの精製、海洋性微細藻類であるラビリンチュラ類や極地や深海の様な低温環境から単離されたEPA高産生菌を用いた方法の開発が試みられている (特許文献1、非特許文献4、5)。一方、EPAは、シス型の二重結合を5個有する炭素数20の高度不飽和脂肪酸であり、酸素・光・温度等により容易に酸化されやすい性質を有している。EPAの分解により生ずる過酸化脂質は生体に有害な作用を及ぼすことから、EPAの分離精製、量的生産には多大なコストと時間がかかり、健康食品や医薬品として利用する上での問題点が残されている (非特許文献6)。

[0004] 海水魚および通し回遊魚はEPAを体外から摂取する必要がある。淡水魚にとってもEPAの体外からの摂取は好ましい。そのため養殖漁業において

は、サケ、マス、ブリ等の養殖飼料には通常40～50%程度の割合で魚粉が配合されている。魚粉にはEPAおよびDHAが含まれている。魚粉の主原料はマイワシであるが、その漁獲量は著しく減少しており、大豆やコーンを主原料とする飼料の開発が行われている。しかし、植物性飼料にはEPAおよびDHA等の必須脂肪酸が含まれず、飼料への添加に必要なEPAおよびDHAの量的確保と価格高騰の解消が喫緊の課題として残されている。稚魚の養殖飼料としても魚粉を添加することにより健苗性を維持している。EPAおよびDHA強化食で成長したサケ科魚類の種苗が河川に放流された場合には、河川ではこれら高度不飽和脂肪酸の供給源が乏しい為、EPAの欠乏による未成魚の死亡率の増加が漁獲量減少を招くことが指摘されており、持続的にEPAを供給する新技術により稚魚の健苗性を向上し、安定した量産技術の確立も待たれている(非特許文献7)。

[0005] これまでにEPAを含む魚類用飼料についても検討されている。EPA産生菌をワムシ等に取り込ませ、稚魚の飼料として使用することによりEPAを強化することが報告されている(特許文献2)。しかし、EPA産生菌をワムシ等に取り込ませる工程を含むため、飼料の調製が面倒である。しかもこの飼料を投与された稚魚の体内でEPAが持続的かつ安定的に産生されることは記載も示唆もされていない。また、プロバイオティクスについての研究では、摂食した生菌が腸管内で生残し、継続的に腸管内に存在することはほとんどの場合不可能であると考えられている(非特許文献8)。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：中華人民共和国特許出願公開公報CN106434416A
特許文献2：日本国特許出願公開公報H03-228652

非特許文献

[0007] 非特許文献1：Lancet 1, 1143-1145, 1971; J. Cardiol., 67, 22-27 2016.
非特許文献2：Biochem. Societ. Transac. 45, 1105-1115, 2017.
非特許文献3：Oikos, 125, 749-760, 2016.

非特許文献4 : Appl. Environ. Microbiol. 82, 218-231, 2016.

非特許文献5 : Methods Enzymol. 605, 3-32, 2018.

非特許文献6 : Biotech. Advances 20, 491-515, 2003.

非特許文献7 : 渡辺智治、DHA高含有魚油添加飼料によるサケ・マスの遊泳力強化, Japanese, 北海道立総合研究機構 試験研究は今, No.877, 2019).

非特許文献8 : 光岡知足、プロバイオティクスの歴史と進化, Japanese Journal of Lactic Acid Bacteria 22, 26-37, 2011.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 上記の事情に鑑みると、動物体内で持続的かつ安定的なEPA生産を可能にする飼料、ならびに体内で持続的かつ安定的にEPAを産生する魚などの動物を提供する必要がある。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らは、上記課題を解決せんと鋭意研究を重ね、琵琶湖固有種のハゼ科魚類イサザ (*Gymnogobius isaza*) の腸管内から *Shewanella* 属のEPA高産生菌を単離することに成功し、本発明を完成させるに至った。

[0010] すなわち本発明は以下のものを提供する。

(1) シェワネラ属GI35株 (*Shewanella* sp. GI35株) (独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター 受託番号 NITE BP-03244) またはその変異株。

(2) *Shewanella* sp. GI35株またはその変異株を含む飼料。

(3) *Shewanella* sp. GI35株またはその変異株を魚類に投与することを特徴とする、*Shewanella* sp. GI35株またはその変異株が腸管内に存在する魚類の製造方法。

(4) *Shewanella* sp. GI35株またはその変異株を魚類に投与することを特徴とする、エイコサペンタエン酸 (EPA) を体内で産生する魚類の製造方法。

(5) *Shewanella* sp. GI35株またはその変異株が腸管内に存在する魚類 (

GShewanella sp. GI35株が腸管内に存在するイサザを除く)。

(6) Shewanella sp. GI35株またはその変異株が腸管内に存在し、EPAを体内で産生する魚類 (Shewanella sp. GI35株が腸管内に存在するイサザを除く)。

(7) Shewanella sp. GI35株またはその変異株を魚類に投与することを特徴とする、成長が促進された魚類の製造方法。

(8) Shewanella sp. GI35株またはその変異株を魚類に投与することを特徴とする、腸内細菌叢が改変された魚類の製造方法。

(9) Shewanella sp. GI35株またはその変異株を培養することを特徴とする、EPAの製造方法。

(10) Shewanella sp. GI35株のEPA産生に関わる遺伝子群または該遺伝子群の変異体を導入した宿主細胞を培養することを特徴とする、EPAの製造方法。

(11) Shewanella sp. GI35株のEPA産生に関わる遺伝子群または該遺伝子群の変異体を導入した細胞。

(12) Shewanella sp. GI35株またはその変異株を含む飲食物。

(13) (5) ~ (8) のいずれか記載の魚類を加工した飲食物。

発明の効果

[0011] 本発明のShewanella GI35株はEPAを著量産生し、腸管内によく生残する。本菌を含む飼料を動物に投与すると、腸管内に生残し、継続的に存在するようになった本菌株から持続的、安定的にEPAが宿主に供給される。すなわち、宿主は体内でEPAを産生できるようになる。かくして、EPAを豊富に含む動物が提供される。このような動物を食することによりオメガ3多価不飽和脂肪酸であるEPAを摂取することができ、健康が維持・増進され、心血管系疾患や生活習慣病等の予防が期待される。また、本菌を含む飼料を投与することにより、動物の生育を促進、および/または腸内細菌叢を改変することができる。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]図1は、イサザ腸管内から単離されたShewanella GI35株の増殖に対する温度の影響を調べた結果を示す。

[図2]図2は、低温下（4℃）および高温下（18℃）におけるShewanella GI35株によるEPA産生をガスクロマトグラフィーで調べた結果（それぞれ上段チャートおよび下段チャート）を示す。

[図3]図3は、Shewanella GI35株のpfaオペロンを導入した発現ベクターのスキームを示す。

[図4]図4下段チャートは、Shewanella GI35株のpfaオペロンを導入した発現ベクターを導入して形質転換した大腸菌によるEPA産生をガスクロマトグラフィーで調べた結果を示す（下段チャート）。図4上段チャートはコントロールとして外来遺伝子を組み込んでいないpBlueScript II KS(+)プラスミドを導入した大腸菌によるEPA産生をガスクロマトグラフィーで調べた結果を示す。

[図5]図5は、Shewanella GI35株を含む魚類用飼料を投与されたニジマスの脂質中の高度不飽和脂肪酸含量を調べた結果を示す。PCはホスファチジルコリンを示す。分子種名の右肩に記載したEPAは、その分子種がEPAを含むことを意味する。分子種名の右肩に記載したDHAは、その分子種がDHAを含むことを意味する。fold-changeはGI35-fedがcontrolに比べて何倍かを示す。PUFA含有PC ($\geq n$)は脂肪酸鎖の二重結合の数がn以上のPC分子が総PC分子に占める割合（%）である。p値はt-testでの値である。

[図6]図6は、Shewanella GI35株を含有する飼料によるニジマス稚魚の成長促進効果（3ヶ月飼育）を示すグラフである。

[図7]図7は、Shewanella GI35株を含有する飼料によるニジマス稚魚の成長促進効果（6ヶ月飼育）を示すグラフである。

[図8]図8は、メタゲノム解析の手順を示すチャートである。

[図9]図9は、主座標分析により菌叢の多様性を解析した結果（ β 多様性解析の結果：Weightened UniFrac距離）を示すグラフである。

[図10]図10は、P I C R U S tによる予測メタゲノム解析で細菌叢の機能プロファイルを比較したグラフである。各グループの3本のバーは、各グループから無作為に選んだ3個体の腸内細菌叢におけるアミラーゼ（左パネル）または亜硝酸還元酵素（右パネル）を有する細菌の豊富さを示す。

発明を実施するための形態

[0013] 上述のごとく、本発明者らは、琵琶湖固有種のハゼ科魚類イサザの腸管内から、E P Aを著量産生するShewanella属の新種の細菌を単離することに成功した。本発明者らは、この細菌をShewanella sp. GI35株と命名した。本菌株は、特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約に基づいて、郵便番号292-0818 千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 122号室に住所を有する独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センターに寄託され、2020年7月8日付で受領番号 N I T E A B P - 0 3 2 4 4 を付与され、2020年8月25日付で受託番号 N I T E B P - 0 3 2 4 4 を付与された。本明細書においてShewanella sp. GI35株を「G I 3 5 株」という場合がある。

[0014] G I 3 5 株はE P Aを著量産生し（E P A高産生菌であるShewanella livingstonensis Ac10株の数倍量—文献値との比較）、腸管内によく生残し、継続的に存在するようになる。しかも、G I 3 5 株はShewanella属の菌としては比較的高温（室温、例えば約18℃）でもよく増殖し、E P Aを多く産生する。G I 3 5 株はこれらの特別な性質により特徴づけられる新規な細菌株である。

[0015] したがって、本発明は、1つの態様において、G I 3 5 株またはその変異株を提供する。G I 3 5 株の変異株は、G I 3 5 株に由来する変異株である。G I 3 5 株の変異株は自然変異株であってもよく、人工変異株であってもよい。人工変異株の作製方法は公知であり、遺伝子組換え、ゲノム編集、N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン（N T G）、エチルメタンスルホン酸（E M S）などの薬剤での処理、紫外線照射などの方法が挙げられるが、これらに限定されない。G I 3 5 株の変異株の例としては、G I

35株よりもEPA産生能が高い株、より高い温度でよく増殖する株、腸管内定着性が優れた株などが挙げられるが、これらに限定されない。G135株の変異株は、その全ゲノム配列が、G135株の全ゲノム配列に対して70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、最も好ましくは98%以上の相同性を有するものであってもよい。ゲノム間の配列相同性は、FASTAやBLASTなどの公知のプログラムを用いて調べることができる。ただし、G135株の変異体は、G135株と同等のEPA産生能を有するものである。ここで、EPA産生能が同等とは、70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは100%以上、最も好ましくは120%以上を意味する。

[0016] 本発明は、さらなる態様において、G135株またはその変異株を含む飼料を提供する。本発明の飼料が投与される動物はあらゆる種類の動物であってよく、特に限定されない。本発明の飼料が投与される動物の例としては、魚類、ニワトリ、ウズラ、シチメンチョウ、アヒルなどの家禽、ウシ、ブタ、ヤギ、ヒツジ、ウマ、ロバなどの家畜、イヌ、ネコ、ウサギ、ハムスターなどのペットなどであってもよい。本発明の飼料を動物に投与することにより、動物の腸管内にG135株またはその変異株が生残し、継続的に存在するようになり、EPAが動物体内において持続的に産生されるようになるので、動物の健康増進に役立つと考えられる。好ましくは、本発明の飼料は魚類に投与される。魚類は、メクラウナギ綱、頭甲綱、軟骨魚綱および硬骨魚綱をひとまとめにした称呼である。本明細書では、魚類と魚は同義とする。本発明の飼料をあらゆる種類の魚に投与することができる。本発明の飼料は淡水魚、海水魚、通し回遊魚を問わず投与することができる。海水魚や通し回遊魚（サケ・マス類など）はEPA生合成に必要な酵素のいずれかを欠損しているか、あるいはそれらの酵素の活性が弱く、自らEPAを作り出すことができないので、本発明の飼料を海水魚や通し回遊魚に投与すると効果的である。本発明の飼料は稚魚、未成魚、成魚を問わず投与することができる。

。好ましくは、本発明の飼料は稚魚、未成魚に投与される。典型的には、本発明の飼料は養殖魚に投与される。養殖魚の例としては、サケ、マス、ブリ、マダイ、カンパチ、クロマグロ、トラフグ、ヒラメ、シマアジ、マアジ、ヒラマサ、イシダイ、カワハギ、スズキ、クロイソ、コイ、ニジマス、ヤマメ、ウナギ、アユなどが挙げられるがこれらに限定されない。

[0017] 本発明のG135株またはその変異株を含む飼料の形状は特に限定されないが、公知の動物用飼料と同様の形状であってよい。本発明の飼料の形状の例としては、モイストペレット、ドライペレット、粉末、クランブル、練り餌などが挙げられるが、これらに限定されない。本発明の飼料は、動物用飼料の原料に、あるいは動物用飼料の製造過程において、あるいは動物用飼料製品に、G135株またはその変異株を添加、混合等することによって製造されうる。G135株またはその変異株の添加、混合等の手法は公知である。G135株またはその変異株を培養することにより、必要量の菌体を得ることができる。G135株またはその変異株の培養については後で説明する。培養によって得られたG135株またはその変異株を遠心分離等の方法により培地から分離することができる。得られたG135株またはその変異株を凍結乾燥等の方法により乾燥させることもできる。動物用飼料の製造工程においてG135株またはその変異株の凍結乾燥品あるいはG135株またはその変異株の培養液を混合してもよい。あるいはできあがった動物用飼料にG135株またはその変異株の培養液を染み込ませる、あるいはG135株またはその変異株の凍結乾燥品をまぶしてもよい。飼料中のG135株またはその変異株の全部または一部が生菌として動物の腸に到達できるように、本発明の飼料を製造する。

[0018] 動物の種類やサイズ、飼料中の成分などに応じて、飼料中のG135株またはその変異株の配合量を適宜変更することができる。G135株またはその変異株を含む飼料の投与量も動物の種類やサイズに応じて適宜変更することができる。一例において、G135株またはその変異株を含む飼料の投与量は通常の飼料と同様であってもよい。

- [0019] 本発明の飼料を、他の飼料と組み合わせて使用してもよい。
- [0020] 魚粉にはEPAやDHAなどが含まれており、養殖飼料に魚粉が配合されている。しかし、魚粉の原料であるマイワシの漁獲量が著しく減少しているため、養殖飼料への魚粉の配合が困難となり、量を減らさざるを得ない。そのため、大豆やコーンを主原料とする魚粉代替飼料の開発が行われている。しかし、植物性原料にはEPAやDHA等の必須脂肪酸が含まれていない。そこで、植物性原料にG135株またはその変異株を混合して本発明の飼料を製造し、使用することにより、上記課題を解決することができる。また、EPA・DHA強化食で成長したサケ科魚類の種苗が河川に放流された場合に、EPAの欠乏による未成魚の死亡率の増加が漁獲量減少を招いている。かかる状況下において、本発明の飼料をサケ科魚類の稚魚に投与しておけば、河川に放流された場合であっても持続的かつ安定的に種苗体内でEPAが産生され、死亡率を低下させることができ、漁獲量減少を食い止めることができる。
- [0021] 実施例に示すように、G135株は魚類の腸管内においてよく生残し、腸管内に継続的に存在するようになる。したがって、G135株またはその変異株を魚類に投与することによって、G135株またはその変異株が腸管内に存在する魚類を得ることができる。魚類へのG135株またはその変異株の投与方法はいずれの方法であってもよく、特に限定されないが、一般的には、G135株またはその変異株を飼料に混ぜて投与する。G135株またはその変異株が腸管内に存在する魚類は、体内でEPAを持続的、安定的に産生することができる。
- [0022] したがって、本発明は、さらなる態様において、G135株またはその変異株を魚類に投与することを特徴とする、G135株またはその変異株が腸管内に存在する魚類の製造方法を提供する。
- [0023] 本発明は、さらなる態様において、G135株またはその変異株を魚類に投与することを特徴とする、EPAを体内で産生する魚類の製造方法を提供する。

- [0024] これらの態様の発明における投与は、上記飼料を投与することにより行ってもよい。
- [0025] 本発明は、さらなる態様において、G135株またはその変異株が腸管内に存在する魚類（G135株が腸管内に存在するイサザを除く）、およびG135株またはその変異株が腸管内に存在し、EPAを体内で産生する魚類（G135株が腸管内に存在するイサザを除く）を提供する。これらの魚類はEPAを体内で持続的、安定的に産生することができ、それらの肉のEPA含量も高い。
- [0026] 海水魚および通し回遊魚はEPAを自ら産生することができない。淡水魚は少量のEPAしか自ら産生することができない。これに対して、本発明の飼料を投与された魚類は、海水魚、通し回遊魚および淡水魚ともにEPAを体内で持続的、安定的に産生できるようになる。すなわち、本発明の飼料を投与することによって、EPAに富む魚を持続的、安定的に得ることができ、EPAに富む魚を食することによって、健康が維持、増進され、心血管系疾患や生活習慣病等の予防につながると期待される。
- [0027] 本発明は、さらなる態様において、G135株またはその変異株を魚類に投与することを特徴とする、成長が促進された魚類の製造方法を提供する。G135株またはその変異株を魚類に投与することにより、魚類の成長を促進することができる。例えば、G135株またはその変異株を、稚魚である期間を通して投与してもよく、稚魚である期間において一過的に投与してもよい。この態様の方法で得られる魚類は、EPAに富む魚類であってもよい。
- [0028] 本発明は、さらなる態様において、G135株またはその変異株を魚類に投与することを特徴とする、腸内細菌叢が改変された魚類の製造方法を提供する。G135株またはその変異株を魚類に投与することにより、成長後の腸内細菌叢を改変することができる。G135株またはその変異株の投与については上で説明したとおりである。この態様の方法を用いて腸内細菌叢を改変することにより、腸内細菌叢が有する様々な酵素の活性を亢進または抑

制することができる。例えば、食物の消化吸収促進に関連する酵素の活性を亢進させてもよく、肉質の向上に資する酵素の活性を亢進させてもよい。この態様の方法で得られる魚類は、EPAに富む魚類であってもよい。

[0029] 本発明は、さらなる態様において、G135株またはその変異株を培養することを特徴とする、EPAの製造方法を提供する。

[0030] G135株またはその変異株の培養方法は、G135株またはその変異株が増殖してEPAを産生することができるものであれば、いずれの培養方法であってもよい。公知のShewanella属の細菌の培養方法と同様の方法でG135株またはその変異株を培養してもよい。例えば、グルコース、ペプトン、酵母エキス、食塩および他の無機塩類を含む培地にてG135株またはその変異株を培養してもよい。培地は液体培地、固体培地いずれであってもよい。液体培養の場合、振盪培養、攪拌培養、静置培養などであってもよい。培養容器としてフラスコ、ジャー、タンク等を用いてもよい。G135株は約4℃～約37℃で増殖可能であり、約18℃～約30℃が増殖に好適である。一方、十分に高いEPA産生量と両立する好ましい培養温度は約4℃～約20℃である。当業者は、G135株またはその変異株に適した培養条件を選択し、決定することができる。培地中のEPA量は、例えばガスクロマトグラフィーを用いて測定することができる。生産されたEPAを、公知の方法により培養液または菌体から回収することができる。

[0031] G135株またはその変異株の保存方法は、公知のShewanella属の細菌の保存方法と同様であってもよい。保存方法としては、スラントでの保存、凍結乾燥などが挙げられるが、これらに限定されない。

[0032] 本発明は、さらにもう1つの態様において、G135株のEPA産生に関わる遺伝子群または該遺伝子群の変異体を導入した宿主細胞を培養することを特徴とする、EPAの製造方法を提供する。

[0033] 本発明者らは、G135株のEPA産生に関わる遺伝子群pfaオペロンの全ゲノムクローニングに成功した。このオペロンを発現ベクターに組み込んで、該ベクターを宿主細胞（例えば大腸菌など）に導入し、宿主細胞を培

養することにより、EPAを製造することができる。pfaオペロンの各成分を別々の発現ベクターに組み込んで用いてもよい。この方法に使用できる発現ベクターや宿主細胞は様々なものが公知であり、適宜選択して用いることができる。

[0034] 本発明のEPAの製造方法に使用しうるG135株のEPA産生に関わる遺伝子群の例として、配列番号：1で示される塩基配列を有するもの（pfaオペロン）が挙げられる。G135株のEPA産生に関わる遺伝子群は、pfaA、pfaB、pfaC、pfaDおよびpfaEの5つの遺伝子を含む。pfaAのヌクレオチド配列は配列番号：1の2413～10503番目のヌクレオチド配列で示される。pfaBのヌクレオチド配列は配列番号：1の10500～12794番目のヌクレオチド配列で示される。pfaCのヌクレオチド配列は配列番号：1の12791～18724番目のヌクレオチド配列で示される。pfaDのヌクレオチド配列は配列番号：1の18835～20481番目のヌクレオチド配列で示される。pfaEのヌクレオチド配列の相補鎖配列は配列番号：1の30～899番目のヌクレオチド配列で示される。G135株のEPA産生に関わる遺伝子群の変異体は、G135株のpfaA、pfaB、pfaC、pfaDおよびpfaEに相当する遺伝子を含むものであってもよい。pfaA、pfaB、pfaC、pfaDおよびpfaEに相当する遺伝子の塩基配列は、それぞれ、G135株のpfaA、pfaB、pfaC、pfaDおよびpfaEの塩基配列に対して70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、最も好ましくは98%以上の相同性を有するものであってもよい（ただし上記5つの遺伝子がすべて100%の相同性を有する場合を除く）。また、G135株のEPA産生に関わる遺伝子群の変異体は、配列番号：1で示される塩基配列に対して70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、最も好ましくは98%以上の相同性を有するものであってもよい。遺伝子間の配列相同性は、FASTAやBLASTなどの公知のプログラムを用いて

調べることができる。また、G135株のEPA産生に関わる遺伝子群の変異体は、G135株の変異株の配列番号：1で示される塩基配列に相当する塩基配列を有するものであってもよい。ただし、G135株のEPA産生に関わる遺伝子群の変異体は、G135株のEPA産生に関わる遺伝子群を使用した場合と比較して、70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは100%以上、最も好ましくは120%以上のEPA産生をもたらすものである。G135株のEPA産生に関わる遺伝子群の変異体は、部位特異的変異導入などの遺伝子組換え、ゲノム編集、化学的方法などの公知の方法にて作製されうる。

[0035] EPA産生に関わる遺伝子群の宿主細胞への導入は、通常は、当該遺伝子群を組み込んだ発現ベクターを細胞に導入することにより行われる。発現ベクターの種類、発現ベクターへの遺伝子群の組み込み方法およびその導入方法は公知であり、宿主細胞の種類および導入遺伝子のサイズや塩基配列などに応じて、適宜選択されうる。pfaA、pfaB、pfaC、pfaDおよびpfaEをすべて1つの発現ベクターに組み込んで宿主細胞に導入してもよく、複数の発現ベクターに分けて組み込んで、これらのベクターを細胞に導入してもよい。

[0036] 本発明は、さらにもう1つの態様において、G135株のEPA産生に関わる遺伝子群または該遺伝子群の変異体を導入した細胞を提供する。かかる細胞を培養してEPAを製造することができる。細胞は、微生物細胞、動物細胞、植物細胞いずれの細胞であってもよく、特に限定されないが、典型例として大腸菌細胞、枯草菌細胞などの細菌細胞が挙げられる。

[0037] 本発明は、さらにもう1つの態様において、G135株またはその変異株を含む飲食物を提供する。飲食物は、食品、飲料、およびサプリメントやいわゆるトクホなどの健康食品を包含する。本発明の飲食物を摂取することによって、G135株またはその変異株が腸管内に生残し、継続的に腸管内に存在するようになり、EPAが持続的に体内で産生されるようになる。このことは、健康を維持・増進させて、心血管系疾患や生活習慣病等の予防につ

ながると期待される。具体的には、中性脂肪の低下や、血小板凝集の抑制などの効果が期待できる。G135株は、食用とされているイサザの腸管内に生息する菌であるから、それを含む飼料や飲食物は安全性が高い。

[0038] 本発明の飲食物は、飲食物の原料に、あるいは飲食物の製造過程において、あるいは飲食物製品に、G135株またはその変異株を添加、混合することによって製造されうる。飲食物の製造工程においてG135株またはその変異株の凍結乾燥品またはG135株またはその変異株の培養液を混合してもよい。あるいはできあがった飲食物にG135株またはその変異株の培養液を染み込ませる、あるいはG135株またはその変異株の凍結乾燥品をまぶしてもよい。飲食物中のG135株またはその変異株の全部または一部が生菌として動物の腸に到達できるように、本発明の飲食物を製造する。公知の医薬品の製造と同様またはそれに準ずる方法にてサプリメントや健康食品を製造してもよい。

[0039] 本発明の飲食物の形状はいずれの形状であってもよく、例えば、既存の飲食物と同様の形状であってもよく、あるいはドリンク、ペースト、クリーム、錠剤、粉末、顆粒、カプセルなどの形状であってもよい。また、本発明の飲食物を食品添加物として用いてもよい。

[0040] 上述のごとく、本発明の飲食物は安全性が高いので、本発明の飲食物の摂取量は特に制限はない。

[0041] 本発明は、さらにもう1つの態様において、G135株またはその変異株が腸管内に存在する魚類（G135株が腸管内に存在するイサザを除く）、またはG135株またはその変異株が腸管内に存在し、EPAを体内で産生する魚類（G135株が腸管内に存在するイサザを除く）を加工した飲食物を提供する。これらの魚類はEPAを豊富に含む。したがって、これらの魚類を加工した飲食物もまたEPAを豊富に含むものであり、それらを摂取することによりEPA摂取量が増加し、健康が維持・増進され、心血管系疾患や生活習慣病等の予防につながると期待される。具体的には、中性脂肪の低下や、血小板凝集の抑制などの効果が期待できる。

[0042] 上記魚類を加工した飲食物もまた、食品、飲料、およびサプリメントやいわゆるトクホなどの健康食品を包含する。上記魚類を加工した飲食物の形状はいずれの形状であってもよい。上記魚類を加工した飲食物は、魚類の全体または一部を通常の調理法に従って調理（例えば、煮る、焼く、蒸す、刺身にする等）したものであってもよく、魚類の全体または一部を他の食材と混合したものであってもよい。あるいは、上記魚類を加工した飲食物は、魚類の全体または一部の抽出物であってもよく（例えばエキスを封入したカプセル剤の形状）、魚類の全体または一部を乾燥させて粉末、顆粒、錠剤、フレーク等の形状にしたものであってもよい。上記魚類を加工した飲食物の摂取量は特に制限はない。

[0043] 本明細書中で使用する用語は、特に断らない限り、生物学、微生物学、生化学、水産学等の分野において通常に理解されている意味に解される。

[0044] 以下に実施例を示して本発明をより詳細かつ具体的に説明するが、実施例は本発明の範囲を限定するものではない。

実施例 1

[0045] (1) イサザ腸管内からのEPA著量産生株G135の単離および同定
本発明者らは、琵琶湖固有種ハゼ科魚類イサザが、淡水魚では例外的にEPAを多量に蓄積することを見いだした。その一方で、本発明者らは、イサザ体内のEPA産生酵素の代謝活性が低いこと明らかにした。そこで、本発明者らは、イサザのEPA摂取経路の一環として、腸管内細菌叢の解析を行ったところ、EPAを高産生するShewanella属の海洋細菌がイサザ腸管内に存在することを見出した。一方、琵琶湖の固有種で中層を回遊するホンモロコ(Gnathopogon caerulescens)の個体から同菌が検出されないことからイサザ固有の腸管内細菌であると考えられた。

[0046] さらに、イサザ腸管内よりEPA産生細菌の同定を試み、Shewanella属細菌の単離培養に成功した。単離した菌株群のEPA産生能を元に有用菌株の同定を行い、EPA著量産生菌であるG135株について詳細な解析を進めた。

[0047] まず、G135株の全ゲノム配列を決定して種同定を行った。原核生物 rDNAユニバーサルプライマー（8EFと1492R）でPCRを行い、16S rDNAのほぼ全長にあたる約1.5kb取得した。この塩基配列の分子系統解析を行ったところ、*Shewanella putrefaciens*の塩基配列と91.1%の相同性を示した。この結果から、G135株が*Shewanella putrefaciens*と近縁種であることが示された。次に、NextSeqシステム（イルミナ社）を用いた全ゲノムショットガンシーケンシング法によって約5.56MbのG135株全ゲノム配列を決定した。ANI法（Average Nucleotide Identity法）により種同定を行った結果、ANI値が86%（95%未満）であるため異種と判定され、*Shewanella*属菌G135株は新種であることが明らかとなった。上で説明したとおり、G135株は独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センターに寄託され、2020年7月8日付で受領番号 NITE ABP-03244を付与され、2020年8月25日付で受託番号 NITE BP-03244を付与された。

[0048] (2) G135株の温度依存的増殖およびEPA産生様式

G135株の温度依存的増殖について調べた。G135株を異なる温度で液体培養したときの菌の増殖を濁度増分で追跡した。結果を図1に示す。G135株は4℃～37℃で増殖可能であり、18℃～30℃が増殖に好適であることがわかった。

[0049] G135株のEPA産生様式について検討を行った。菌の培養は、LB培地（10g トリプトン／5g イースト抽出物／10g NaCl／1L）にて4℃で約24時間、18℃で約12時間行った。その結果、G135株は低温培養下（4℃）および高温培養下（18℃）の両方において多量のEPAを産生することが明らかとなった（図2）。産生されたリン脂質構成脂肪酸に占めるEPAの含有率は以下のとおりであった。比較のため、南極海水より単離されたEPA高産生菌である*Shewanella livingstonensis* Ac10株の文献値（Kawamoto et al. (2009) *Journal of Bacteriology* 191, 632-640）も示す。

G I 3 5 株： 4. 2 % (1 8 ° C) ; 1 2. 3 % (4 ° C)

A c 1 0 株： 0. 7 % (1 8 ° C) ; 5. 1 % (4 ° C)

以上の結果より、G I 3 5 株が極めて高いE P A 産生能を有することが示された。また、十分に高いE P A 産生量と両立する好ましい培養温度は約4 ° C ~ 約2 0 ° C であると考えられた。

[0050] (3) G I 3 5 株からのE P A 産生に関わる遺伝子群P f a オペロンの全ゲノムクローニング、およびP f a オペロンを導入した大腸菌でのE P A 産生

G I 3 5 株よりE P A 産生に関わる遺伝子群P f a オペロンの全ゲノムクローニングに成功した。G I 3 5 株の全ゲノム配列から予想されたP f a オペロン全長(配列番号：1)を含む領域をP C R にて増幅し、N o t I およびK p n I サイトでpBlueScript II KS+に組み込んで発現ベクターを得た(図3)。E P A 産生能を有さない大腸菌(E. coli)に上記発現ベクターを導入した形質転換体を作製したところ、当該大腸菌がE P A を産生することが明らかとなった(図4下段)。コントロールとして外来遺伝子を組み込んでいないpBlueScript II KS(+)プラスミドを導入した大腸菌はE P A を産生しなかった(図4上段)。

[0051] (4) G I 3 5 株を投与したニジマス稚魚におけるE P A 産生

G I 3 5 株を魚類に摂食させ、腸管内で生残・増殖させ、腸管内に継続的に存在させることにより、体内からの持続的なE P A 供給が可能であるか否かについて検討を進めた。具体的には、ニジマス稚魚を、魚粉を含む通常飼料(日清丸紅 マス餌付スーパーA)と共にG I 3 5 株を1週間摂取した群(GI35-fed)と非摂取群(control)に分け、G I 3 5 株の投与後、菌を含まない通常飼料で2週間飼育した。さらに、飼料中の高度不飽和脂肪酸等の脂質成分を除去した脱脂飼料に切り替え、2週間飼育後に個体の脂質(ホスファチジルコリン)中の高度不飽和脂肪酸含量をG I 3 5 株摂取群と非摂取群間で比較した。その結果、G I 3 5 株摂取群でE P A 及びD H A の含量が有意に増加していることが観察された(図5)。ニジマスは、E P A を生合成

する $\Delta 5$ 脂肪酸不飽和化酵素は有さないが、EPAからDHAを生合成する $\Delta 6$ 脂肪酸不飽和化酵素を有することから、GI35株から供給されたEPAはDHAに変換されたものと考えられた（EPAからDHAへの変換についてはAquaculture 315, 131-143, 2011; Scientific Reports 7, 3889, 2017参照）。一方、GI35株摂取後、2週間通常餌で飼育した個体においては、GI35株摂取群（GI35-fed）と非摂取群（control）での高度不飽和脂肪酸含量には有意な違いは認められなかった（データ示さず）。この結果は、通常飼料中には多量の高度不飽和脂肪酸が含まれている為に、GI35株由来のEPA供給による有意な差が生じなかった事によると考えられる。これらの知見により、1週間摂取したGI35株が腸管内で生残し、継続的に存在し、4週間後においても個体内で持続的にEPAを供給していることが明らかとなった。

実施例 2

[0052] (1) GI35株含有飼料によるニジマス稚魚の成長促進（3ヶ月飼育）

(i) 実験方法

(a) 摂餌条件

通常餌グループ：ニジマス用飼料（日清丸紅 マス餌付スーパーA）（通常餌：魚粉を約40%含む）にて3ヶ月飼育した。

通常餌→GI35グループ：通常餌にて1ヶ月飼育し、その後、GI35株を添加（ $\sim 3 \times 10^9$ cells/g 飼料）した通常餌（GI35添加餌）にて2ヶ月飼育した。

GI35→通常餌グループ：GI35添加餌にて1ヶ月飼育し、その後、通常餌にて2ヶ月飼育した。

(b) 体重測定

5匹を1群として、水槽内の全個体について体重を測定した。

図6の縦軸は、1群当たりの平均体重として示してある。

それぞれのグループの測定数は、

通常餌グループ：20群

通常餌→G135グループ：11群

G135→通常餌グループ：15群

であった。

[0053] (ii) 結果

結果を図6に示す。

通常餌→G135グループおよびG135→通常餌グループのいずれも、通常餌グループに比して顕著な ($p < 0.01$) 成長促進 (体重増加) が観察された。

通常餌→G135グループとG135→通常餌グループの体重増加に有意な差は認められず、G135の初期投与により成長が顕著に促進されることが明らかとなった。

通常餌→G135グループおよびG135→通常餌グループのいずれにおいても稚魚の斃死は観察されず、G135株の長期摂取による毒性は全く認められなかった。

これらの結果から以下のことが言える。

- ・ G135株の長期摂取による毒性は認められない。
- ・ G135株の摂取により顕著に成長が促進される。
- ・ G135株の一過的な摂取により、2ヶ月後においても成長促進が維持されていることが明らかとなった。

[0054] (2) G135株含有飼料によるニジマス稚魚の成長促進 (6ヶ月飼育)

(i) 実験方法

(a) 摂餌条件

通常餌グループ：ニジマス用飼料 (日清丸紅 マス餌付スーパーA およびマス稚魚スーパー) (通常餌：魚粉を約40%含む) にて6ヶ月飼育した。

通常餌→G135グループ：通常餌にて1ヶ月飼育し、その後、G135株を添加 ($\sim 3 \times 10^9$ cells/g 飼料) した通常餌 (G135添加餌) にて5ヶ月飼育

G135→通常餌グループ：G135添加餌にて1ヶ月飼育し、その後、通常餌にて5ヶ月飼育

(b) 体重測定

各水槽より20個体を無作為に採取し、体重を測定した。

図7の縦軸は、1匹当たりの平均体重を示してある。

それぞれのグループの測定数は、

通常餌グループ：20匹

通常餌→G135グループ：20匹

G135→通常餌グループ：20匹

であった。

[0055] (ii) 結果

結果を図7に示す。

G135→通常餌グループ（初期摂取グループ）で、顕著な成長促進（ $p < 0.01$ ）が観察された。

通常餌→G135グループ（長期摂取グループ）でも、有意な成長促進（ $p < 0.05$ ）が観察されたが、初期摂取グループに比べその効果は低かった。

通常餌→G135グループおよびG135→通常餌グループのいずれにおいても稚魚の斃死は観察されず、G135株のさらなる長期摂取による毒性は全く認められなかった。

これらの結果から以下のことが言える。

G135株の5ヶ月間に渡る長期摂取によっても毒性は認められない。実際、その後もG135株の投与を6ヶ月間継続し、飼育を終了するまで、斃死は認められなかった。

2) G135株摂取による成長促進効果は顕著である。

3) G135株による成長促進効果は、継続的な摂取を必要とせず、一過的な摂取によりその効果が持続する。

実施例 3

[0056] G135株を投与したニジマス稚魚の腸内細菌叢のメタゲノム解析
実施例2の(2)の示す方法で得られた6ヶ月飼育後の、通常餌グループの稚魚、およびG135→通常餌グループの稚魚について、腸内細菌叢のメタゲノム解析により、G135摂取による腸内細菌叢の変化とその結果生じると予測される代謝活性の変化を特定した。

[0057] (1) 実験方法

以下の手順1~6によりライブラリー作製およびシーケンシングを行った。

1. 各グループより無作為にそれぞれ3個体を採取し、腸内容物よりQIAamp DNA Microbiome Kit を用いてDNA を抽出・精製した。
2. DNA溶液の定量測定: Synergy LX (BioTek) と QuantiFluor dsDNA System (Promega) を用いて、DNA溶液の濃度を測定した。
3. ライブラリー作製: 2-step tailed PCR 法を用いて、16S rDNAライブラリーを作製した。
4. ライブラリーの定量: Synergy H1 (BioTek) と QuantiFluor dsDNA Systemを用いて、作製されたライブラリーの濃度を測定した。
5. ライブラリーの品質確認: Fragment Analyzer dsDNA 915 Reagent Kit (Advanced Analytical Technologies) を用いて、作製したライブラリーの品質確認を行った。
6. シーケンシング解析: MiSeq システムとMiSeq Reagent Kit v3 (Illumina) を用いて、2x300bpの条件でシーケンシングを行った。

[0058] メタゲノム解析は図8に示す手順で行った。

[0059] (2) 実験結果

(i) 主座標分析による菌叢の多様性の解析： β 多様性解析

図9に示すように、通常餌グループとG135→通常餌グループでは細菌叢が顕著に異なっていた。この結果から、G135株を稚魚に投与することにより、成長後の腸内細菌叢の改変を行うことができることがわかった。そしてこの効果は、一過的なG135株の投与によって得られることがわかった。

[0060] (ii) PICRUStによる予測メタゲノム解析を用いる細菌叢の機能プロファイル比較

図10に結果を示す。通常餌グループと比較して、G135→通常餌グループにおいて、アルファアミラーゼ活性および亜硝酸還元酵素活性を有する菌種の増加が認められた。

腸管内でのアルファアミラーゼ活性の亢進は、飼料に含まれるデンプンの消化・吸収を助け、個体の成長への寄与が多大であると推察される。腸管内での亜硝酸還元酵素活性の亢進は、亜硝酸の除去を促進し、個体の恒常性維持に重要と考えられる。また、亜硝酸還元酵素の作用で生成する一酸化窒素(NO)は、強いシグナル伝達物質であり、様々な生理機能を活性化する機能を有し、その作用として消化管粘膜の肥厚や血行促進作用が知られている。そのため、腸管内での亜硝酸還元酵素活性の亢進により食物の消化吸収が促進されると想定される。

以上まとめると、G135株を魚類に投与することにより、飼料の消化・吸収を促進する腸内細菌叢を増加させ得ることがわかった。そしてこの効果は、一過的なG135株の投与によって得られることがわかった。

産業上の利用可能性

[0061] 本発明のG135株またはその変異株およびそれを含む飼料を動物に投与することにより、EPAを豊富に含む動物が持続的、安定的に提供される。また、本発明のG135株またはその変異株およびそれを含む飼料を投与することにより、動物の成長を促進、および／または腸内細菌叢を改変することができる。したがって、本発明は、畜産業、漁業、特に養殖漁業、および

食品産業などにおいて非常に有用である。

受託番号

[0062] G135株は、千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 122号室に住所を有する独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センターに寄託され、2020年7月8日付で受領番号 NITE ABP-03244を付与され、2020年8月25日付で受託番号 NITE BP-03244を付与された。

配列表フリーテキスト

[0063] 配列番号1は、G135株全ゲノム配列から予想されたPfaオペロン全長の塩基配列を示す。

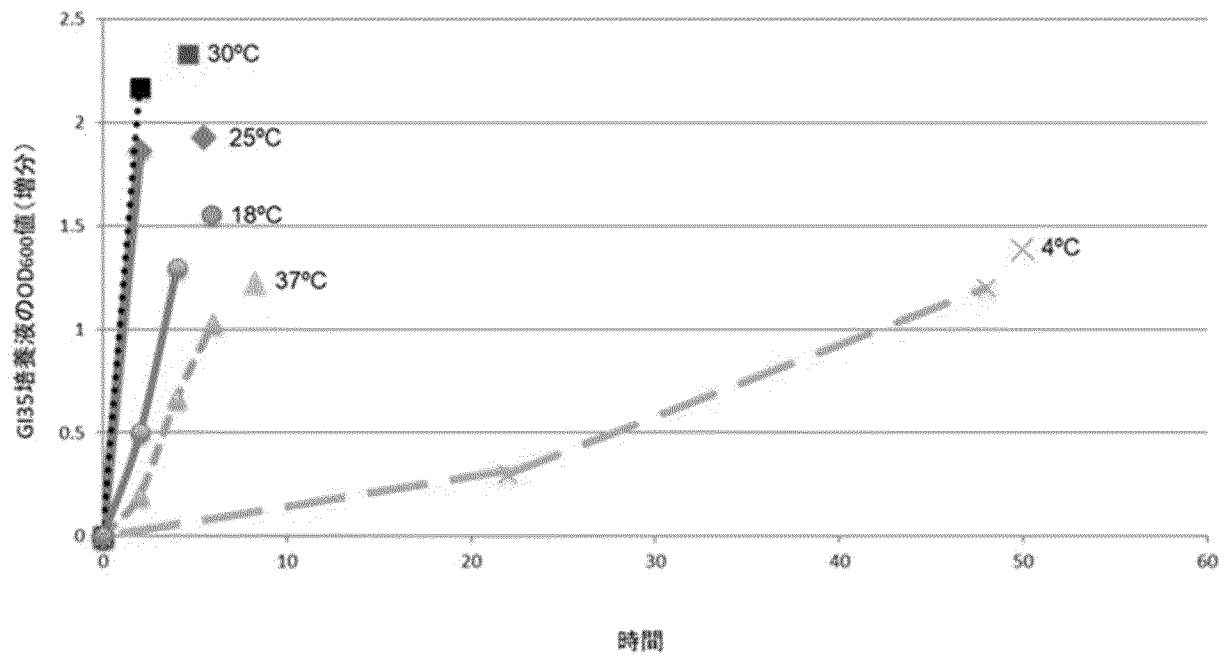
[0064] 本願は、2020年7月20日出願の日本国特許出願第2020-123809号を基礎とする優先権主張出願であり、参照により当該日本国特許出願の全内容を本願に取り入れる。

請求の範囲

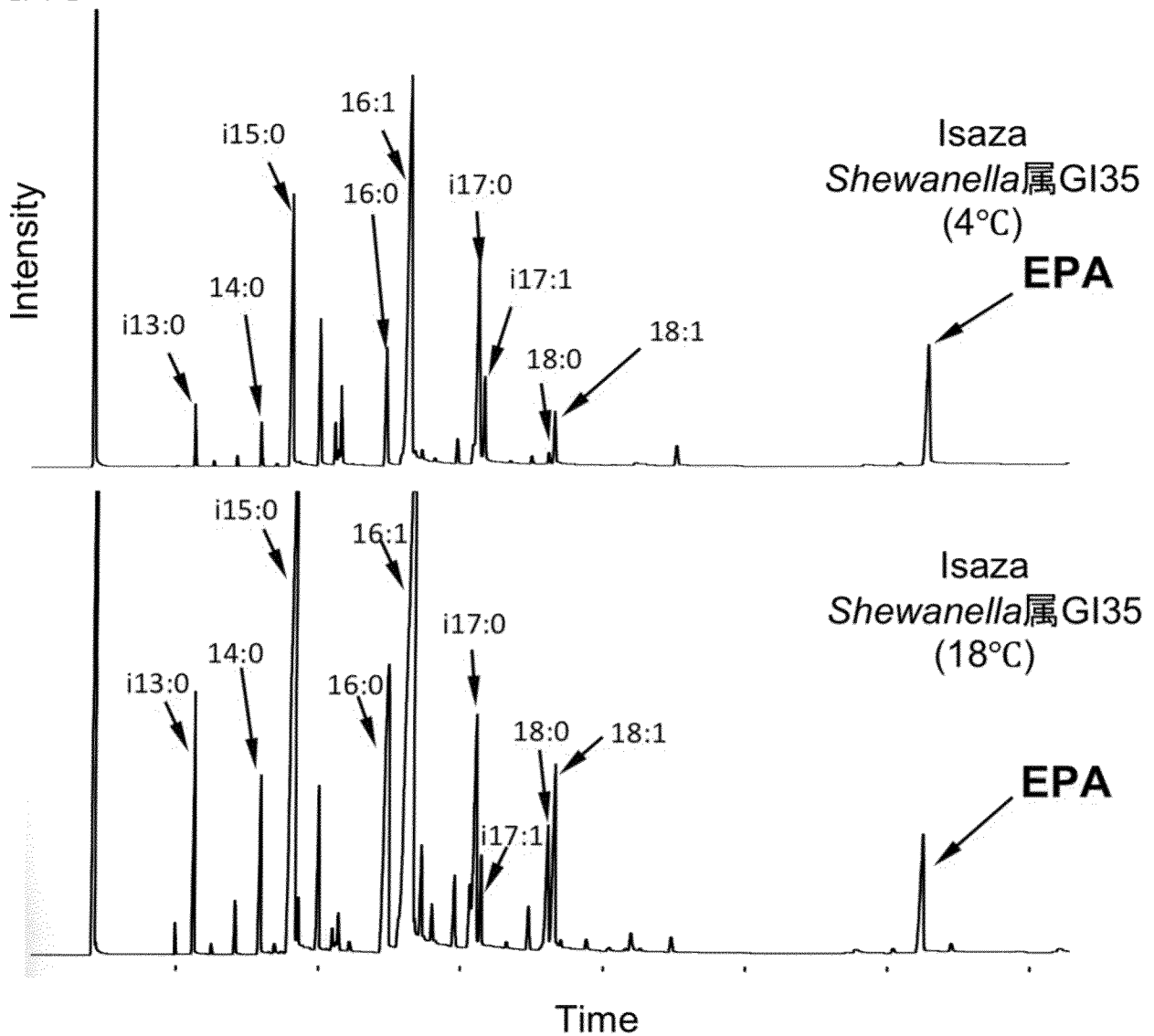
- [請求項1] シェワネラ属GI35株 (Shewanella sp. GI35株) (独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター 受託番号 N I T E B P - 0 3 2 4 4) またはその変異株。
- [請求項2] Shewanella sp. GI35株またはその変異株を含む飼料。
- [請求項3] Shewanella sp. GI35株またはその変異株を魚類に投与することを特徴とする、Shewanella sp. GI35株またはその変異株が腸管内に存在する魚類の製造方法。
- [請求項4] Shewanella sp. GI35株またはその変異株を魚類に投与することを特徴とする、エイコサペンタエン酸 (E P A) を体内で産生する魚類の製造方法。
- [請求項5] Shewanella sp. GI35株またはその変異株が腸管内に存在する魚類 (Shewanella sp. GI35株が腸管内に存在するイサザを除く)。
- [請求項6] Shewanella sp. GI35株またはその変異株が腸管内に存在し、E P A を体内で産生する魚類 (Shewanella sp. GI35株が腸管内に存在するイサザを除く)。
- [請求項7] Shewanella sp. GI35株またはその変異株を魚類に投与することを特徴とする、成長が促進された魚類の製造方法。
- [請求項8] Shewanella sp. GI35株またはその変異株を魚類に投与することを特徴とする、腸内細菌叢が改変された魚類の製造方法。
- [請求項9] Shewanella sp. GI35株またはその変異株を培養することを特徴とする、E P A の製造方法。
- [請求項10] Shewanella sp. GI35株のE P A 産生に関わる遺伝子群または該遺伝子群の変異体を導入した宿主細胞を培養することを特徴とする、E P A の製造方法。
- [請求項11] Shewanella sp. GI35株のE P A 産生に関わる遺伝子群または該遺伝子群の変異体を導入した細胞。
- [請求項12] Shewanella sp. GI35株またはその変異株を含む飲食物。

[請求項13] 請求項5～8のいずれか1項記載の魚類を加工した飲食物。

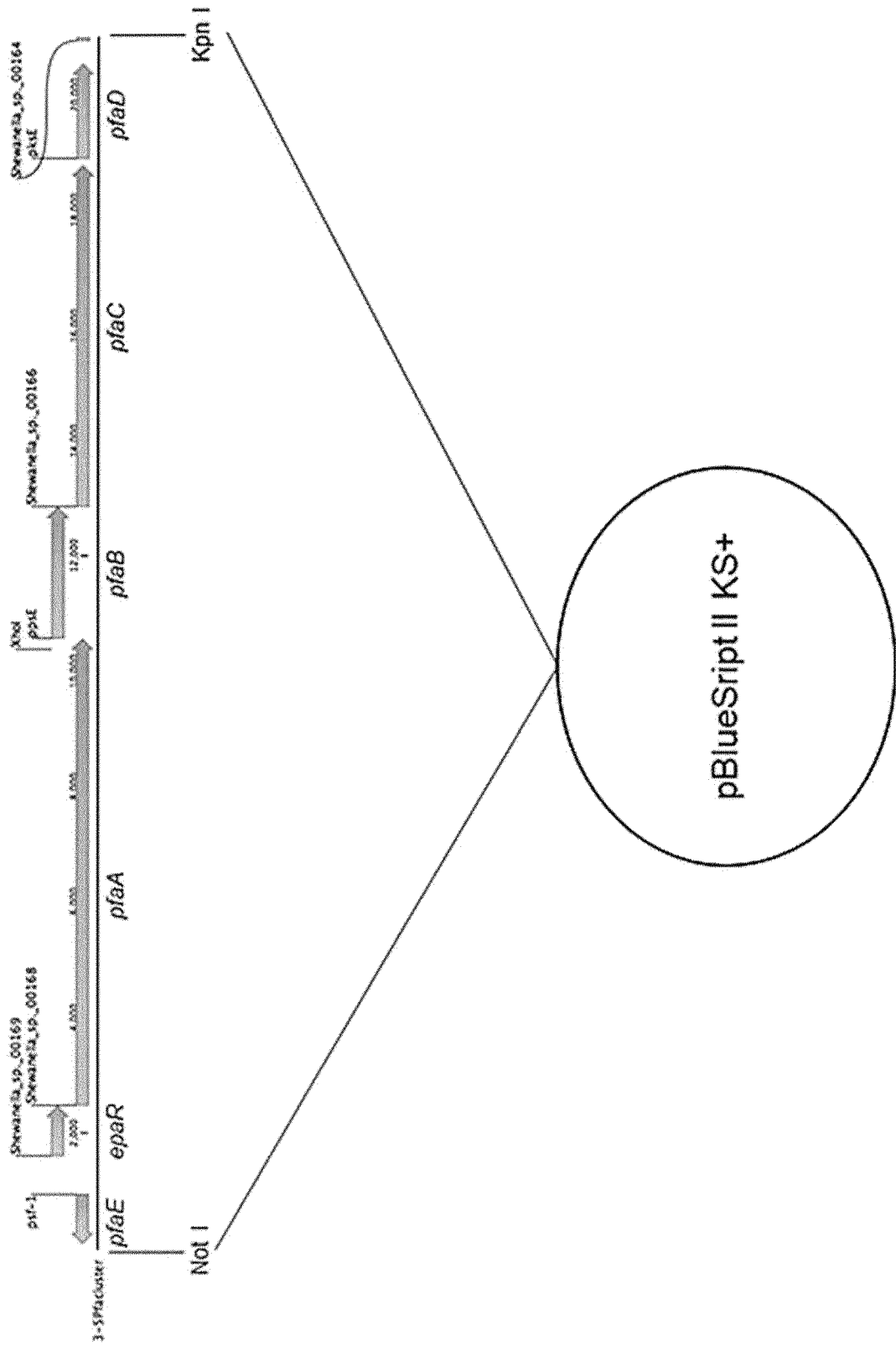
[図1]



[図2]

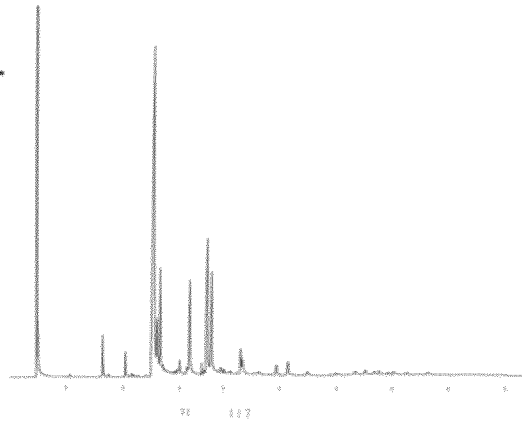


[3]

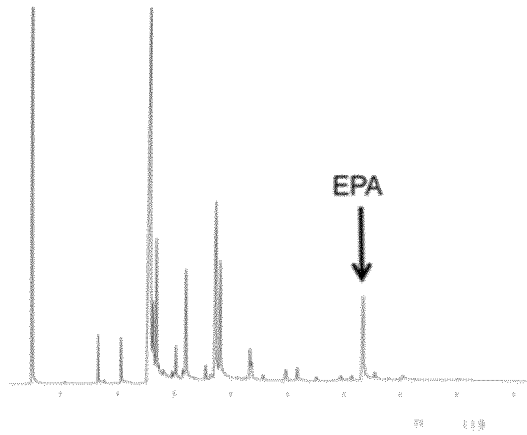


[図4]

コントロール遺伝子
導入大腸菌株



EPAオペロン
導入大腸菌株

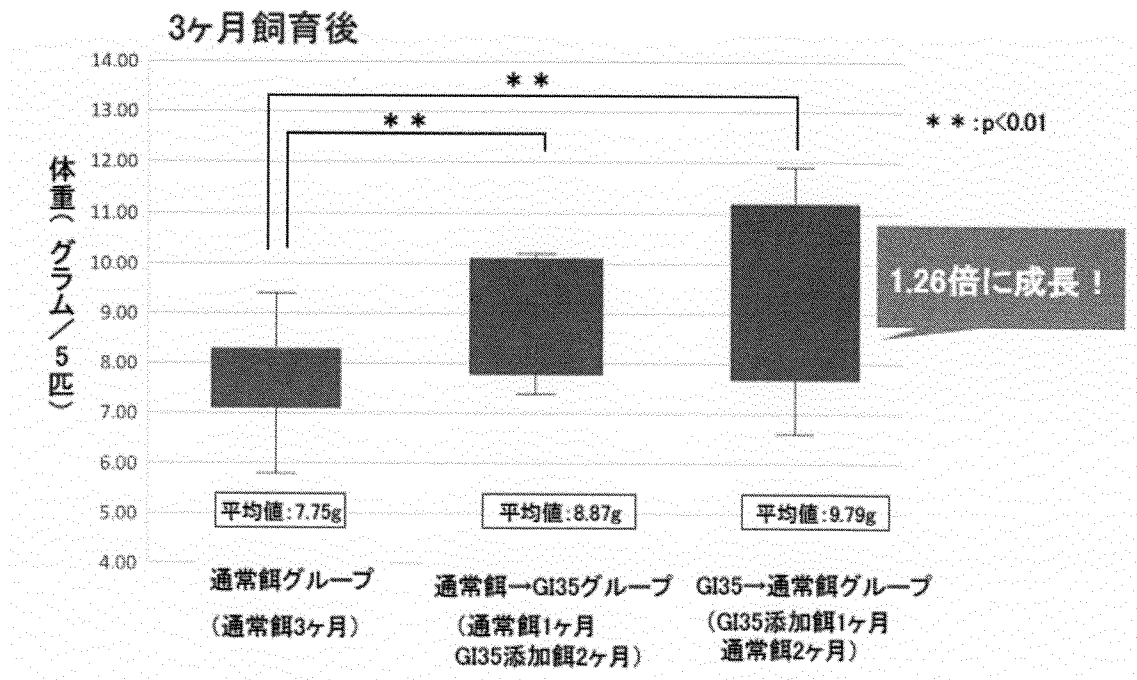


[図5]

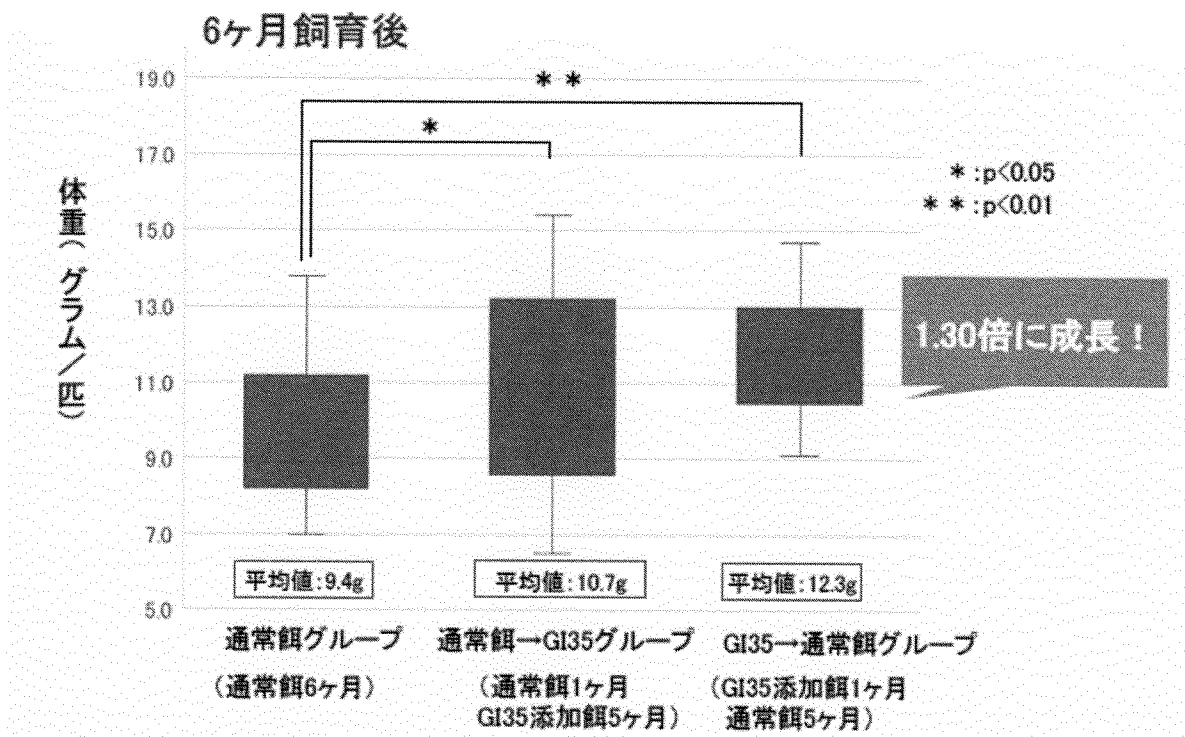
	control	GI35-fed	fold-change
PC (30:0)	0.5±0.1	0.5±0.1	1.06
PC (30:1)	0.8±0.1	0.6±0.2	0.73
PC (32:0)	0.8±0.2	1.0±0.2	1.27
PC (32:1)	9.1±0.9	6.1±0.9	0.67 **
PC (32:2)	1.7±0.5	0.8±0.2	0.47 *
PC (34:1)	21.7±1.7	20.5±1.3	0.94
PC (34:2)	5.3±0.5	3.5±0.6	0.66 **
PC (34:3)	0.9±0.1	0.6±0.1	0.62 *
PC (34:5) ^{EPA}	0.5±0.1	0.5±0.1	1.02
PC (36:1)	1.3±0.2	1.4±0.2	1.08
PC (36:2)	2.8±0.3	2.0±0.1	0.74 *
PC (36:3)	1.7±0.1	1.1±0.1	0.66 **
PC (36:4)	2.2±0.2	2.7±0.6	1.19
PC (36:5) ^{EPA}	5.4±0.5	6.0±0.3	1.11
PC (36:6) ^{EPA, DHA}	2.4±0.5	2.1±0.3	0.86
PC (38:4)	0.5±0.1	0.5±0.1	1.04
PC (38:5) ^{EPA}	2.0±0.1	2.0±0.1	1.00
PC (38:6) ^{EPA, DHA}	22.9±2.7	27.1±2.4	1.18
PC (38:7) ^{EPA, DHA}	2.1±0.3	2.0±0.2	0.94
PC (40:6) ^{DHA}	1.2±0.1	1.4±0.2	1.15
PC (40:7) ^{DHA}	4.1±0.4	4.1±0.3	0.99
PC (40:8) ^{DHA}	0.8±0.0	0.8±0.0	1.09
PC (40:9) ^{EPA, DHA}	0.5±0.1	0.6±0.1	1.13
PC (42:10) ^{EPA, DHA}	0.7±0.1	1.1±0.3	1.55 *
PC (42:11) ^{EPA, DHA}	1.3±0.1	2.0±0.4	1.57 *
PC (44:12) ^{DHA}	3.8±0.8	6.0±1.3	1.58 *
PUFA含有PC (≧3)	55.8±2.7	63.2±2.8	1.13 *
PUFA含有PC (≧4)	52.7±3.0	61.2±3.1	1.16 *
PUFA含有PC (≧5)	49.5±3.2	57.7±3.4	1.16 *
PUFA含有PC (≧6)	41.5±3.3	49.0±3.2	1.18 *

*, P<0.05; **, P<0.01

[図6]



[図7]



[図8]

QIIME2(2021.2) dada2プラグインで
ペアエンドリードの結合と
キメラ配列とノイズ配列の除去

↓ Forward, Reverseの長さを変えて検証

代表配列とSilva(ver.138)の
99%OTUでの系統推定

↓

QIIME2 diversity pluginでの
α, β 多様性解析

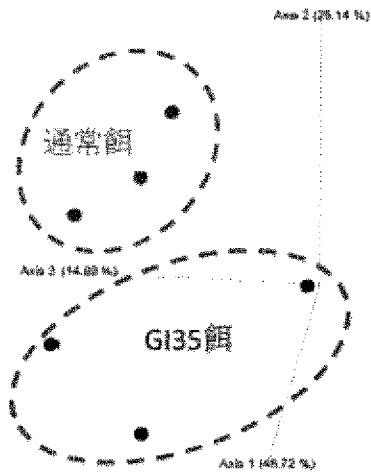
↓

LEfSE(Galaxy Version 1.0)を用いて群間で相対存在
量の異なる細菌系統解析

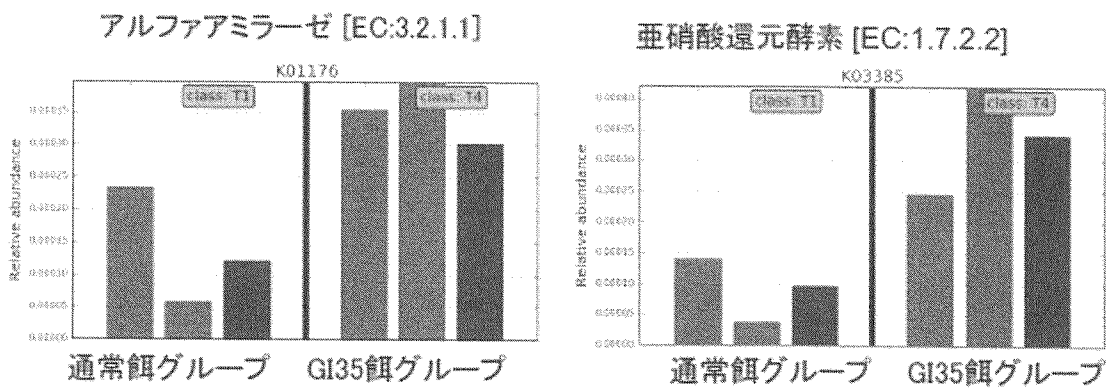
↓

PICRUS2での機能解析
KEGG Metacyc_Pathway_abundance

[図9]



[図10]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/026983

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl. C12N5/10(2006.01)i, A23K10/16(2016.01)i, A23L17/00(2016.01)i, A23L33/12(2016.01)i, A23L33/135(2016.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/20(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12P7/64(2006.01)i
 FI: C12N1/20 A 2NA, C12N1/20 E, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12P7/64, A23L33/135, A23L33/12, A23L17/00 A, A23K10/16

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)

Int. Cl. C12P7/64, C12N5/10, A23K10/16, A23L17/00, A23L33/12, A23L33/135, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/20, C12N1/21

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

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2021
 Registered utility model specifications of Japan 1996-2021
 Published registered utility model applications of Japan 1994-2021

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAPplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 6-46864 A (SAGAMI CHEMICAL RESEARCH CENTER) 22 February 1994 (1994-02-22), claims, paragraphs [0001], [0003], [0008], [0013], [0016]	1-13
X	@@@仲沢剛史 他, イサザの諸形質の長期的変動—オオクチバスの影響についての検討—, 日本陸水学会第 68 回大会 講演要旨集, 2003, 3B06 全文	2, 5-6, 12
A	SUITO, Takuto et al. Synthesis of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acid-rich triacylglycerols in an endemic goby, <i>Gymnogobius isaza</i> , from Lake Biwa, Japan, THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, 15 March 2018, vol. 164, no. 2, pp. 127-140, entire text	1-13

 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
10.08.2021Date of mailing of the international search report
24.08.2021Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, JapanAuthorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2021/026983

Patent Documents referred to in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
JP 6-46864 A	22.02.1994	EP 0594868 A1 claims, pp. 2, 3 US 5683898 A WO 1993/023545 A1	

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））</p> <p>C12N 5/10(2006.01)i; A23K 10/16(2016.01)i; A23L 17/00(2016.01)i; A23L 33/12(2016.01)i; A23L 33/135(2016.01)i; C12N 1/15(2006.01)i; C12N 1/19(2006.01)i; C12N 1/20(2006.01)i; C12N 1/21(2006.01)i; C12P 7/64(2006.01)i FI: C12N1/20 A ZNA; C12N1/20 E; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C12P7/64; A23L33/135; A23L33/12; A23L17/00 A; A23K10/16</p>														
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））</p> <p>C12P7/64; C12N5/10; A23K10/16; A23L17/00; A23L33/12; A23L33/135; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/20; C12N1/21</p> <p>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</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2021年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2021年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2021年</td> </tr> </table> <p>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）</p> <p>JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq</p>			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2021年	日本国実用新案登録公報	1996-2021年	日本国登録実用新案公報	1994-2021年				
日本国実用新案公報	1922-1996年													
日本国公開実用新案公報	1971-2021年													
日本国実用新案登録公報	1996-2021年													
日本国登録実用新案公報	1994-2021年													
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>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</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>JP 6-46864 A (財団法人相模中央化学研究所) 22.02.1994 (1994-02-22) 特許請求の範囲、段落 [0001]、[0003]、[0008]、[0013]、[0016]</td> <td>1-13</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>仲沢剛史 他, イサザの諸形質の長期的変動—オオクチバスの影響についての検討—, 日本陸水学会第68回大会 講演要旨集, 2003, 3B06 全文</td> <td>2, 5-6, 12</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>SUITO, Takuto et al., Synthesis of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acid-rich triacylglycerols in an endemic goby, <i>Gymnogobius isaza</i>, from Lake Biwa, Japan, THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, 2018.03.15, Vol. 164, No. 2, P. 127-140 全文</td> <td>1-13</td> </tr> </tbody> </table>			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	JP 6-46864 A (財団法人相模中央化学研究所) 22.02.1994 (1994-02-22) 特許請求の範囲、段落 [0001]、[0003]、[0008]、[0013]、[0016]	1-13	X	仲沢剛史 他, イサザの諸形質の長期的変動—オオクチバスの影響についての検討—, 日本陸水学会第68回大会 講演要旨集, 2003, 3B06 全文	2, 5-6, 12	A	SUITO, Takuto et al., Synthesis of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acid-rich triacylglycerols in an endemic goby, <i>Gymnogobius isaza</i> , from Lake Biwa, Japan, THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, 2018.03.15, Vol. 164, No. 2, P. 127-140 全文	1-13
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	JP 6-46864 A (財団法人相模中央化学研究所) 22.02.1994 (1994-02-22) 特許請求の範囲、段落 [0001]、[0003]、[0008]、[0013]、[0016]	1-13												
X	仲沢剛史 他, イサザの諸形質の長期的変動—オオクチバスの影響についての検討—, 日本陸水学会第68回大会 講演要旨集, 2003, 3B06 全文	2, 5-6, 12												
A	SUITO, Takuto et al., Synthesis of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acid-rich triacylglycerols in an endemic goby, <i>Gymnogobius isaza</i> , from Lake Biwa, Japan, THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, 2018.03.15, Vol. 164, No. 2, P. 127-140 全文	1-13												
<p><input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>														
<table border="0"> <tr> <td>* 引用文献のカテゴリー</td> <td>“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</td> </tr> <tr> <td>“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</td> <td>“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</td> </tr> <tr> <td>“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</td> <td>“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</td> </tr> <tr> <td>“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）</td> <td>“&” 同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td></td> </tr> <tr> <td>“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献</td> <td></td> </tr> </table>			* 引用文献のカテゴリー	“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの	“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	“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	“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	“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	“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）	“&” 同一パテントファミリー文献	“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献	
* 引用文献のカテゴリー	“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの													
“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	“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													
“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	“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													
“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）	“&” 同一パテントファミリー文献													
“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献														
“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献														
<p>国際調査を完了した日</p> <p>10.08.2021</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p>24.08.2021</p>													
<p>名称及びあて先</p> <p>日本国特許庁 (ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>	<p>権限のある職員（特許庁審査官）</p> <p>天野 皓己 4N 5084</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3448</p>													

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。
- a. 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
- 附属書C/ST.25テキストファイル形式
- 紙形式又はイメージファイル形式
- b. 国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c. 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
- 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))
- 紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)
2. さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。
3. 補足意見:

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2021/026983

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 6-46864 A	22.02.1994	EP 0594868 A1 Claims、第2-3ページ	
		US 5683898 A	
		WO 1993/023545 A1	