(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2025-504972
(P2025-504972A)
(43)公表日　令和7年2月19日(2025.2.19)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*1/14 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	1/14	Ａ	４Ｂ０４２
Ｃ１２Ｎ	*1/16 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	1/16	Ｇ	４Ｂ０６５
Ｃ１２Ｎ	*1/19 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	1/14	Ｅ	
Ｃ１２Ｎ	*5/071(2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	1/19		
Ａ２３Ｌ	*13/00 (2016.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/071		

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全39頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-545187(P2024-545187)
(86)(22)出願日　令和5年1月24日(2023.1.24)
(85)翻訳文提出日　令和6年9月25日(2024.9.25)
(86)国際出願番号　PCT/US2023/011442
(87)国際公開番号　WO2023/146852
(87)国際公開日　令和5年8月3日(2023.8.3)
(31)優先権主張番号　63/304,374
(32)優先日　令和4年1月28日(2022.1.28)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV
最終頁に続く

(71)出願人　524283110
ノベル ファームス インコーポレイテッド
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ９４７０２ バークリー サン パブロ アヴェニュー ２９８８
(74)代理人　100103610
弁理士　▲吉▼田 和彦
(74)代理人　100109070
弁理士　須田 洋之
(74)代理人　100119013
弁理士　山崎 一夫
(74)代理人　100111796
弁理士　服部 博信
(74)代理人　100123766
弁理士　松田 七重
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　細胞ベースの肉製品を製造するための方法及び組成物

(57)【要約】
【課題】細胞ベースの肉製品を製造するための方法及び組成物を提供する。
【解決手段】本明細書には、構造の均一性が向上した細胞ベースの肉製品を製造するための方法及び組成物が開示される。特に、本開示のこの技術は、糸状菌－酵母バイオカプセル、及び細胞ベースの肉製品の製造方法におけるそれらの使用に関する。
【選択図】図１Ａ

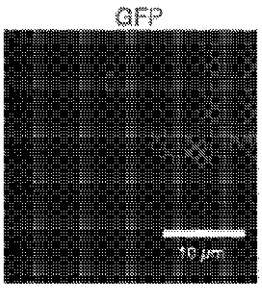


FIG. 1A

【特許請求の範囲】
【請求項１】
細胞ベースの肉製品の製造に使用するためのバイオカプセルであって、前記バイオカプセルは、
（ｉ）糸状菌、及び
（ｉｉ）複数の酵母細胞を含む生体材料足場を含む、バイオカプセル。
【請求項２】
前記糸状菌が菌糸体を含む、請求項１に記載のバイオカプセル。
【請求項３】
前記複数の酵母細胞が、１つ以上の異種タンパク質を発現するように遺伝子操作されている、請求項１又は２に記載のバイオカプセル。
【請求項４】
前記１つ以上の異種タンパク質が、１つ以上の細胞外マトリックス（ＥＣＭ）タンパク質、成長因子タンパク質、細胞接着タンパク質、細胞表面タンパク質、細胞シグナル伝達タンパク質、タンパク質モチーフ（合成又は天然に存在する）、フレーバータンパク質、又はそれらの任意の組み合わせから選択される、請求項３に記載のバイオカプセル。
【請求項５】
前記糸状菌が、子嚢菌門、担子菌門、及び接合菌門（ケカビ門及びトリモチカビ門）からなる群から選択される門に属する１つ以上の菌株を含む、請求項１～４のいずれか一項に記載のバイオカプセル。
【請求項６】
前記糸状菌株が、子嚢菌門に由来し、アスペルギルス、ペニシリウム、及びアカパンカビからなる群から選択される属に属する、１つ以上の菌株を含む、請求項５に記載のバイオカプセル。
【請求項７】
前記糸状菌が、アスペルギルス属に由来し、アスペルギルス・オリゼの１つ以上の菌株を含む、請求項６に記載のバイオカプセル。
【請求項８】
前記糸状菌が、アカパンカビ属に由来し、ニューロスポラ・クラッサの１つ以上の菌株を含む、請求項６に記載のバイオカプセル。
【請求項９】
前記糸状菌株が、ケカビ門に由来するリゾプス・オリゼ又はリゾプス・オリゴスポラスの菌株である、請求項５に記載のバイオカプセル。
【請求項１０】
前記複数の酵母細胞が、サッカロミセス・セレビシエ、サッカロミセス・バヤヌース、サッカロミセス・カペンシス、シゾサッカロミセス・ポンベ、及びピキア・パストリスからなる群から選択される１つ以上の菌株を含む、請求項１～９のいずれか一項に記載のバイオカプセル。
【請求項１１】
前記複数の酵母細胞が、サッカロミセス・セレビシエの１つ以上の菌株を含む、請求項１０に記載のバイオカプセル。
【請求項１２】
前記１つ以上の異種タンパク質が、脊索動物ＥＣＭタンパク質、成長因子タンパク質、細胞接着タンパク質、細胞シグナル伝達タンパク質、タンパク質モチーフ（合成又は天然に存在する）、フレーバータンパク質、細胞表面タンパク質、又はそれらの任意の組み合わせである、請求項３に記載のバイオカプセル。
【請求項１３】
前記異種脊索動物タンパク質が、哺乳動物ＥＣＭタンパク質、成長因子タンパク質、接着分子タンパク質、細胞シグナル伝達タンパク質、タンパク質モチーフ（合成又は天然に存在する）、フレーバータンパク質、細胞表面タンパク質、又はそれらの任意の組み合わ

せである、請求項１２に記載のバイオカプセル。
【請求項１４】
前記１つ以上の異種タンパク質は、コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチン、及びＲＧＤモチーフペプチドからなる群より選択される１つ以上のＥＣＭタンパク質を含む、請求項３に記載のバイオカプセル。
【請求項１５】
前記１つ以上の異種タンパク質が、可溶的に発現されるか、特定の細胞内局在を標的とするか、又は分泌される、請求項３に記載のバイオカプセル。
【請求項１６】
前記複数の酵母細胞が固定又は脱細胞化されている、請求項１～１５のいずれか一項に記載のバイオカプセル。
【請求項１７】
細胞ベースの肉製品であって、
（ｉ）
（ａ）糸状菌、及び
（ｂ）複数の酵母細胞を含む、食用生体材料足場と、
（ｉｉ）複数の１つ以上の細胞型と、を含む、細胞ベースの肉製品。
【請求項１８】
前記複数の１つ以上の細胞型が、筋芽細胞又はその前駆細胞、脂肪細胞又はその前駆細胞、線維芽細胞又はその前駆細胞、内皮細胞又はその前駆細胞、平滑筋細胞又はその前駆細胞、筋衛星細胞、人工多能性幹細胞、胚性幹細胞、間葉系幹細胞、及びそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される１つ以上の細胞型を含む、請求項１７に記載の細胞ベースの肉製品。
【請求項１９】
前記複数の酵母細胞が、１つ以上の異種タンパク質を発現するように遺伝子操作されている、請求項１７又は１８に記載の細胞ベースの肉製品。
【請求項２０】
前記複数の１つ以上の細胞型が、脊索動物細胞である、請求項１７～１９のいずれか一項に記載の細胞ベースの肉製品。
【請求項２１】
前記脊索動物細胞が、哺乳動物細胞である、請求項２０に記載の細胞ベースの肉製品。
【請求項２２】
前記脊索動物細胞が、ブタ細胞、ウシ細胞、又は家禽細胞である、請求項２０に記載の細胞ベースの肉製品。
【請求項２３】
前記糸状菌が菌糸体を含む、請求項１７～２２のいずれか一項に記載の細胞ベースの肉製品。
【請求項２４】
前記１つ以上の異種タンパク質が、１つ以上の細胞外マトリックス（ＥＣＭ）タンパク質、成長因子タンパク質、細胞接着タンパク質、細胞表面タンパク質、細胞シグナル伝達タンパク質、タンパク質モチーフ（合成又は天然に存在する）、フレーバータンパク質、又はそれらの任意の組み合わせから選択される、請求項１９に記載の細胞ベースの肉製品。
【請求項２５】
前記糸状菌が、子嚢菌門、担子菌門、及び接合菌門（ケカビ門及びトリモチカビ門）からなる群から選択される門に属する１つ以上の菌株を含む、請求項１７～２４のいずれか一項に記載の細胞ベースの肉製品。
【請求項２６】
前記糸状菌株が、子嚢菌門に由来し、アスペルギルス、ペニシリウム、及びアカパンカビからなる群から選択される属に属する、１つ以上の菌株を含む、請求項２５に記載の細

胞ベースの肉製品。
【請求項２７】
前記糸状菌が、アスペルギルス属に由来し、アスペルギルス・オリゼの１つ以上の菌株を含む、請求項２６に記載の細胞ベースの肉製品。
【請求項２８】
前記糸状菌が、アカパンカビ属に由来し、ニューロスポラ・クラッサの１つ以上の菌株を含む、請求項２６に記載の細胞ベースの肉製品。
【請求項２９】
前記糸状菌株が、ケカビ門に由来するリゾプス・オリゼ又はリゾプス・オリゴスポラスの菌株である、請求項２５に記載の細胞ベースの肉製品。
【請求項３０】
前記複数の酵母細胞が、サッカロミセス・セレビシエ、サッカロミセス・バヤヌース、サッカロミセス・カペンシス、シゾサッカロミセス・ポンベ、及びピキア・パストリスからなる群から選択される１つ以上の菌株を含む、請求項１７～２９のいずれか一項に記載の細胞ベースの肉製品。
【請求項３１】
前記複数の酵母細胞が、サッカロミセス・セレビシエの１つ以上の菌株を含む、請求項３０に記載の細胞ベースの肉製品。
【請求項３２】
前記１つ以上の異種タンパク質が、脊索動物ＥＣＭタンパク質、成長因子タンパク質、細胞接着タンパク質、細胞シグナル伝達タンパク質、タンパク質モチーフ（合成又は天然に存在する）、フレーバータンパク質、又は細胞表面タンパク質である、請求項１９に記載の細胞ベースの肉製品。
【請求項３３】
前記異種脊索動物タンパク質が、哺乳動物ＥＣＭタンパク質、成長因子タンパク質、接着分子タンパク質、細胞シグナル伝達タンパク質、タンパク質モチーフ（合成又は天然に存在する）、フレーバータンパク質、又は細胞表面タンパク質である、請求項３２に記載の細胞ベースの肉製品。
【請求項３４】
前記１つ以上の異種タンパク質が、コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチン、及びＲＧＤモチーフペプチドからなる群より選択される１つ以上のＥＣＭタンパク質を含む、請求項１９に記載の細胞ベースの肉製品。
【請求項３５】
前記１つ以上の異種タンパク質は、可溶的に発現されるか、特定の細胞内局在を標的とするか、又は分泌される、請求項１９に記載の細胞ベースの肉製品。
【請求項３６】
前記複数の酵母細胞が固定又は脱細胞化されている、請求項１７～３５のいずれか一項に記載の細胞ベースの肉製品。
【請求項３７】
糸状菌－酵母バイオカプセルを製造するための方法であって、
菌糸体を含む糸状菌培養物に複数の酵母細胞を添加して糸状菌－酵母調製物を形成すること、及び
前記糸状菌と酵母の自発的共固定化を誘導する条件下で前記調製物を培養して糸状菌－酵母バイオカプセルを形成することを含む、方法。
【請求項３８】
前記糸状菌と酵母の共固定化を誘導する前記条件が、第１の培養培地及び第２の培養培地の使用を含む、請求項３７に記載の方法。
【請求項３９】
前記複数の酵母細胞が、１つ以上の異種タンパク質を発現するように遺伝子操作されている、請求項３７又は３８に記載の方法。

【請求項４０】
前記第１の培養培地が、前記糸状菌によって使用可能であるが前記酵母によって使用できない炭素源を含み、前記炭素源が、グルコン酸、デンプン、セルロース、イヌリン、及び他の同様のコロイド分子からなる群から選択される、請求項３８に記載の方法。
【請求項４１】
前記第２の培養培地が、前記糸状菌によっても利用可能な前記酵母にとって好ましい炭素源を含む、請求項３８に記載の方法。
【請求項４２】
前記糸状菌を酵素と接触させて、前記糸状菌の密度、多孔性、又は組織の１つ以上を改変することをさらに含む、請求項３７に記載の方法。
【請求項４３】
前記酵素が、ザイモラーゼ、リチカーゼ、及びグルカラーゼからなる群から選択される、請求項４２に記載の方法。
【請求項４４】
前記酵母細胞を固定又は脱細胞化することをさらに含む、請求項３７～４３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４５】
前記糸状菌－酵母バイオカプセルが、細胞ベースの肉製造のための食用生体材料足場として使用される、請求項３７～４４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４６】
前記糸状菌－酵母バイオカプセルを成形することをさらに含む、請求項３７～４５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４７】
前記糸状菌－酵母バイオカプセルの形状が、三次元の肉製品の形状に似ている、請求項４６に記載の方法。
【請求項４８】
筋芽細胞又はその前駆細胞、脂肪細胞又はその前駆細胞、線維芽細胞又はその前駆細胞、内皮細胞又はその前駆細胞、平滑筋細胞又はその前駆細胞、筋衛星細胞、人工多能性幹細胞、胚性幹細胞、間葉系幹細胞、及びそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される、複数の１つ以上の細胞型を、前記糸状菌－酵母バイオカプセルに播種し、播種されたバイオカプセルを形成すること、並びに
前記播種されたバイオカプセルを、前記複数の１つ以上の細胞型の分化を誘導するのに有効な条件下で培養して、食用の細胞ベースの肉製品を製造することをさらに含む、請求項３７に記載の方法。
【請求項４９】
前記複数の１つ以上の細胞型が、脊索動物細胞である、請求項４８に記載の方法。
【請求項５０】
前記脊索動物細胞が、哺乳動物細胞である、請求項４９に記載の方法。
【請求項５１】
前記脊索動物細胞が、ブタ細胞、ウシ細胞、又は家禽細胞である、請求項４９に記載の方法。
【請求項５２】
前記１つ以上の異種タンパク質が、１つ以上の細胞外マトリックス（ＥＣＭ）タンパク質、成長因子タンパク質、細胞接着タンパク質、細胞表面タンパク質、細胞シグナル伝達タンパク質、タンパク質モチーフ（合成又は天然に存在する）、フレーバータンパク質、又はそれらの任意の組み合わせから選択される、請求項３９に記載の方法。
【請求項５３】
前記糸状菌が、子嚢菌門、担子菌門、及び接合菌門（ケカビ門及びトリモチカビ門）からなる群から選択される門に属する１つ以上の菌株を含む、請求項３７～５２のいずれか一項に記載の方法。

【請求項５４】
前記糸状菌株が、子嚢菌門に由来し、アスペルギルス、ペニシリウム、及びアカパンカビからなる群から選択される属に属する、１つ以上の菌株を含む、請求項５３に記載の方法。
【請求項５５】
前記糸状菌が、アスペルギルス属に由来し、アスペルギルス・オリゼの１つ以上の菌株を含む、請求項５４に記載の方法。
【請求項５６】
前記糸状菌が、アカパンカビ属に由来し、ニューロスポラ・クラッサの１つ以上の菌株を含む、請求項５４に記載の方法。
【請求項５７】
前記糸状菌株が、ケカビ門に由来するリゾプス・オリゼ又はリゾプス・オリゴスポラスの菌株である、請求項５３に記載の方法。
【請求項５８】
前記複数の酵母細胞が、サッカロミセス・セレビシエ、サッカロミセス・バヤヌース、サッカロミセス・カペンシス、シゾサッカロミセス・ポンベ、及びピキア・パストリスからなる群から選択される１つ以上の菌株を含む、請求項３７～５７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５９】
前記複数の酵母細胞が、サッカロミセス・セレビシエの１つ以上の菌株を含む、請求項５８に記載の方法。
【請求項６０】
前記１つ以上の異種タンパク質が、脊索動物ＥＣＭタンパク質、成長因子タンパク質、細胞接着タンパク質、細胞シグナル伝達タンパク質、ペプチドモチーフ（合成又は天然に存在する）、フレーバータンパク質、又は細胞表面タンパク質である、請求項３９に記載の方法。
【請求項６１】
前記異種脊索動物タンパク質が、哺乳動物ＥＣＭタンパク質、成長因子タンパク質、接着分子タンパク質、細胞シグナル伝達タンパク質、ペプチドモチーフ（合成又は天然に存在する）、フレーバータンパク質、又は細胞表面タンパク質である、請求項６０に記載の方法。
【請求項６２】
前記１つ以上の異種タンパク質が、コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチン、及びＲＧＤモチーフペプチドからなる群より選択される１つ以上のＥＣＭタンパク質を含む、請求項３９に記載の方法。
【請求項６３】
前記１つ以上の異種タンパク質が、可溶的に発現されるか、特定の細胞内局在を標的とするか、又は分泌される、請求項３９に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願との相互参照
本出願は、２０２２年１月２８日に出願された米国仮特許出願第６３／３０４，３７４号に対する優先権を主張し、その内容は、参照によりその全体が、本明細書に組み込まれる。
【０００２】
本技術は、構造の均一性が向上した細胞ベースの肉製品を製造するための方法及び組成物に関する。特に、この技術は、糸状菌－酵母バイオカプセルの生成、及び細胞ベースの肉製品の製造方法におけるそれらの使用に関する。
【背景技術】

【０００３】
以下の説明は、読み手の理解を助けるために提供されている。提供される情報又は引用される参考文献はいずれも、本明細書に開示される組成物及び方法の先行技術であると認めるものではない。
【０００４】
畜産は環境、公衆衛生、動物福祉に重大な悪影響を及ぼす。地球表面のおおよそ３０％、全耕作地の７０％が動物の飼育に専用されており、家畜が地上バイオマス総量の２０％を占めると推定されている。驚異的な土地消費に加えて、畜産は地球上の総淡水供給量の推定８％を消費する。最後に、畜産業は世界の温室効果ガス（ＧＨＧ）排出量の１８％を占めており、世界の生物多様性に対する最大の脅威となっている。
【０００５】
畜産慣行と劣悪な動物福祉条件は食中毒の原因である。豚インフルエンザや鳥インフルエンザなど、多くの病原性ウイルスが家畜に由来する。さらに、家禽製品や生の豚肉を扱う際の悪い衛生慣行は、大腸菌、サルモネラ菌、カンピロバクター、寄生虫の蔓延を促進する。さらに、米国で使用されているすべての抗生物質の７０％は家畜に使用されており、この抗生物質の過剰使用が抗生物質耐性菌の出現の主な原因となっている。米国だけでも、これらの抗生物質耐性菌は、おおよそ５５０億ドルの経済的負担を生み出し、年間おおよそ２００万人の感染、２５万人の入院、少なくとも２３，０００人の死亡により医療システムを圧倒している。最後に、畜産業界には公衆衛生上の脅威にさらされているだけでなく、悪質な畜産慣行と動物福祉のあからさまな無視が蔓延している。
【０００６】
畜産業の悪影響と闘う態勢を整えている新興産業は、細胞ベースの肉（クリーンミート、人工肉、培養肉、実験室で育てられた肉、人工培養肉としても知られている）業界である。細胞ベースの食肉産業は、エネルギー使用量を７～４５％、温室効果ガスを７８～９６％、土地使用量を９９％、水使用量を８２～９６％削減すると推定されている。さらに、細胞ベースの肉の無菌生産環境により、抗生物質の使用が不要になり、その結果、抗生物質耐性菌の出現が防止される。
【０００７】
現在の細胞ベースの食肉技術は、動物細胞を液体培地懸濁液中で増殖させ、マイクロキャリア上に凝集させる技術である衛星細胞培養に大きく依存している。これらの細胞ベースの肉製品はミンチ肉に似ており、天然の動物の肉の形状や質感がなく、その全体構造は細胞外マトリックス（ＥＣＭ）などの生体材料足場に由来する。ＥＣＭは、天然肉の生化学的及び生体力学的特性を与えるオリゴ糖と糖タンパク質で構成されている。構造を与えることに加えて、ＥＣＭには細胞の付着、増殖を促進し、最終的な組織の全体的な挙動と組成を決定するさまざまなマトリックスタンパク質が含まれている。したがって、ＥＣＭなどの生体材料足場は、細胞ベースの肉の生成にとって重要である。
【０００８】
ＥＣＭ及び同様の生体材料足場を生成する現在の方法は、非効率であり、コストがかかる。Ｍａｔｒｉｇｅｌ（商標）などの市販のＥＣＭは、マウス肉腫から採取される。Ｍａｔｒｉｇｅｌ（商標）の製造は、マウス癌細胞株とバイオセーフティ実験室を必要とする、高価で非効率なプロセスである。非ＥＣＭ足場を、アルギン酸塩、シルク、キトサンなどの天然生体材料のほか、ポリエチレングリコール、ポリグリコール酸、ポリアクリルアミドなどの合成生体材料から作成できる。ただし、動物細胞の成長に適した生体材料足場を生成するには、これらの天然生体材料基質を精製マトリックスタンパク質でさらに機能化する必要がある。マトリックスタンパク質の精製には時間とコストがかかる。さらに、精製マトリックスタンパク質を使用して生体材料基質を機能化するには、イオンビーム蒸着やプラズマ処理などのコストと時間のかかる技術が必要である。したがって、任意の所定の動物細胞型を任意の所望の組織に成長及び増殖させるための、多糖類ベースの構造要素及び／又はタンパク質を含む、安価で堅牢でカスタマイズ可能な食用生体材料足場を製造するための新しいアプローチを開発する必要がある。

【発明の概要】
【０００９】
一態様では、本技術の開示は、細胞ベースの肉製品の製造に使用するためのバイオカプセルを提供し、ここで、バイオカプセルは、（ｉ）糸状菌、及び（ｉｉ）複数の酵母細胞を含む生体材料足場を含む。
【００１０】
いくつかの実施形態では、糸状菌は菌糸体を含む。
【００１１】
いくつかの実施形態では、複数の酵母細胞は、１つ以上の異種タンパク質を発現するように遺伝子操作される。いくつかの実施形態では、１つ以上の異種タンパク質は、１つ以上の細胞外マトリックス（ＥＣＭ）タンパク質、成長因子タンパク質、細胞接着タンパク質、細胞表面タンパク質、細胞シグナル伝達タンパク質、タンパク質モチーフ（合成又は天然に存在する）、フレーバータンパク質、又はそれらの任意の組み合わせから選択される。
【００１２】
いくつかの実施形態では、糸状菌は、子嚢菌門、担子菌門、及び接合菌門（ケカビ門及びトリモチカビ門）からなる群から選択される門に属する、１つ以上の菌株を含む。
【００１３】
いくつかの実施形態では、糸状菌株は、子嚢菌門に由来し、アスペルギルス、ペニシリウム、及びアカパンカビからなる群から選択される属に属する、１つ以上の菌株を含む。いくつかの実施形態では、糸状菌は、アスペルギルス属に由来し、アスペルギルス・オリゼの１つ以上の菌株を含む。いくつかの実施形態では、糸状菌は、アカパンカビ属に由来し、ニューロスポラ・クラッサの１つ以上の菌株を含む。
【００１４】
いくつかの実施形態では、糸状菌株は、ケカビ門に由来するリゾプス・オリゼ又はリゾプス・オリゴスポラスの菌株である。
【００１５】
いくつかの実施形態では、複数の酵母細胞は、サッカロミセス・セレビシエ、サッカロミセス・バヤヌース、サッカロミセス・カペンシス、シゾサッカロミセス・ポンベ、及びピキア・パストリスからなる群から選択される１つ以上の菌株を含む。いくつかの実施形態では、複数の酵母細胞は、サッカロミセス・セレビシエの１つ以上の菌株を含む。
【００１６】
いくつかの実施形態では、１つ以上の異種タンパク質は、脊索動物ＥＣＭタンパク質、成長因子タンパク質、細胞接着タンパク質、細胞シグナル伝達タンパク質、タンパク質モチーフ（合成又は天然に存在する）、フレーバータンパク質、細胞表面タンパク質、又はそれらの任意の組み合わせである。いくつかの実施形態では、異種脊索動物タンパク質は、哺乳動物ＥＣＭタンパク質、成長因子タンパク質、接着分子タンパク質、細胞シグナル伝達タンパク質、タンパク質モチーフ（合成又は天然に存在する）、フレーバータンパク質、細胞表面タンパク質、又はそれらの任意の組み合わせである。
【００１７】
いくつかの実施形態では、１つ以上の異種タンパク質は、コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチン、及びＲＧＤモチーフペプチドからなる群より選択される１つ以上のＥＣＭタンパク質を含む。
【００１８】
いくつかの実施形態では、１つ以上の異種タンパク質は、可溶的に発現されるか、特定の細胞内局在を標的とするか、又は分泌される。
【００１９】
いくつかの実施形態では、複数の酵母細胞は固定化又は脱細胞化される。
【００２０】
一態様では、本技術の開示は、（ｉ）（ａ）糸状菌、及び（ｂ）複数の酵母細胞を含む

食用生体材料足場と、（ｉｉ）複数の１つ以上の細胞型を含む生体材料足場と、を含む、細胞ベースの肉製品を提供する。

【００２１】

いくつかの実施形態では、複数の１つ以上の細胞型は、筋芽細胞又はその前駆細胞、脂肪細胞又はその前駆細胞、線維芽細胞又はその前駆細胞、内皮細胞又はその前駆細胞、平滑筋細胞又はその前駆細胞、筋衛星細胞、人工多能性幹細胞、胚性幹細胞、間葉系幹細胞、及びそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される１つ以上の細胞型を含む。

【００２２】

いくつかの実施形態では、複数の酵母細胞は、１つ以上の異種タンパク質を発現するように遺伝子操作される。

【００２３】

いくつかの実施形態では、複数の１つ以上の細胞型は脊索動物細胞である。いくつかの実施形態では、脊索動物細胞は、哺乳動物細胞である。

【００２４】

いくつかの実施形態では、脊索動物細胞は、ブタ細胞、ウシ細胞、又は家禽細胞である。

【００２５】

いくつかの実施形態では、糸状菌は菌糸体を含む。

【００２６】

いくつかの実施形態では、１つ以上の異種タンパク質は、１つ以上の細胞外マトリックス（ＥＣＭ）タンパク質、成長因子タンパク質、細胞接着タンパク質、細胞表面タンパク質、細胞シグナル伝達タンパク質、タンパク質モチーフ（合成又は天然に存在する）、フレーバータンパク質、又はそれらの任意の組み合わせから選択される。

【００２７】

いくつかの実施形態では、糸状菌は、子嚢菌門、担子菌門、及び接合菌門（ケカビ門及びトリモチカビ門）からなる群から選択される門に属する、１つ以上の菌株を含む。

【００２８】

いくつかの実施形態では、糸状菌株は、子嚢菌門に由来し、アスペルギルス、ペニシリウム、及びアカパンカビからなる群から選択される属に属する、１つ以上の菌株を含む。いくつかの実施形態では、糸状菌は、アスペルギルス属に由来し、アスペルギルス・オリゼの１つ以上の菌株を含む。いくつかの実施形態では、糸状菌は、アカパンカビ属に由来し、ニューロスポラ・クラッサの１つ以上の菌株を含む。

【００２９】

いくつかの実施形態では、糸状菌株は、ケカビ門に由来するリゾプス・オリゼ又はリゾプス・オリゴスポラスの菌株である。

【００３０】

いくつかの実施形態では、複数の酵母細胞は、サッカロミセス・セレビシエ、サッカロミセス・バヤヌース、サッカロミセス・カペンシス、シゾサッカロミセス・ポンベ、及びピキア・パストリスからなる群から選択される１つ以上の菌株を含む。いくつかの実施形態では、複数の酵母細胞は、サッカロミセス・セレビシエの１つ以上の菌株を含む。

【００３１】

いくつかの実施形態では、１つ以上の異種タンパク質は、脊索動物ＥＣＭタンパク質、成長因子タンパク質、細胞接着タンパク質、細胞シグナル伝達タンパク質、タンパク質モチーフ（合成又は天然に存在する）、フレーバータンパク質、又は細胞表面タンパク質である。いくつかの実施形態では、異種脊索動物タンパク質は、哺乳動物ＥＣＭタンパク質、成長因子タンパク質、接着分子タンパク質、細胞シグナル伝達タンパク質、タンパク質モチーフ（合成又は天然に存在する）、フレーバータンパク質、又は細胞表面タンパク質である。

【００３２】

いくつかの実施形態では、１つ以上の異種タンパク質は、コラーゲン、ラミニン、フィ

ブロネクチン、及びＲＧＤモチーフペプチドからなる群より選択される１つ以上のＥＣＭタンパク質を含む。

【００３３】

いくつかの実施形態では、１つ以上の異種タンパク質は、可溶的に発現されるか、特定の細胞内局在を標的とするか、又は分泌される。

【００３４】

いくつかの実施形態では、複数の酵母細胞は固定又は脱細胞化される。

【００３５】

一態様では、本技術の開示は、糸状菌－酵母バイオカプセルを製造するための方法であって、方法は、菌糸体を含む糸状菌培養物に複数の酵母細胞を添加して糸状菌－酵母調製物を形成すること、及び糸状菌と酵母の自発的共固定化を誘導する条件下で調製物を培養して糸状菌－酵母バイオカプセルを形成することを含む。

【００３６】

いくつかの実施形態では、糸状菌と酵母の共固定化を誘導する条件は、第１の培養培地及び第２の培養培地の使用を含む。

【００３７】

いくつかの実施形態では、複数の酵母細胞は、１つ以上の異種タンパク質を発現するように遺伝子操作される。

【００３８】

いくつかの実施形態では、第１の培地は、糸状菌によって使用可能であるが酵母によって使用できない炭素源を含み、炭素源は、グルコン酸、デンプン、セルロース、イヌリン、及び他の同様のコロイド分子からなる群から選択される。

【００３９】

いくつかの実施形態では、第２の培養培地は、糸状菌によっても利用可能な酵母にとって好ましい炭素源を含む。

【００４０】

いくつかの実施形態では、この方法は、糸状菌を酵素と接触させて、糸状菌の密度、多孔性、又は組織の１つ以上を改変することをさらに含む。いくつかの実施形態では、酵素は、ザイモラーゼ、リチカーゼ、及びグルカラーゼからなる群から選択される。

【００４１】

いくつかの実施形態では、この方法は、酵母細胞を固定又は脱細胞化することをさらに含む。

【００４２】

いくつかの実施形態では、糸状菌－酵母バイオカプセルは、細胞ベースの肉製造のための食用生体材料足場として使用される。

【００４３】

いくつかの実施形態では、この方法は、糸状菌－酵母バイオカプセルを成形することをさらに含む。いくつかの実施形態では、糸状菌－酵母バイオカプセルの形状は、三次元肉製品の形状に似ている。

【００４４】

いくつかの実施形態では、この方法は、筋芽細胞又はその前駆細胞、脂肪細胞又はその前駆細胞、線維芽細胞又はその前駆細胞、内皮細胞又はその前駆細胞、平滑筋細胞又はその前駆細胞、筋衛星細胞、人工多能性幹細胞、胚性幹細胞、間葉系幹細胞、及びそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される、複数の１つ以上の細胞型を、糸状菌－酵母バイオカプセルに播種し、播種されたバイオカプセルを形成すること、並びに、播種されたバイオカプセルを、複数の１つ以上の細胞型の分化を誘導するのに有効な条件下で培養して、食用の細胞ベースの肉製品を製造することをさらに含む。

【００４５】

いくつかの実施形態では、複数の１つ以上の細胞型は脊索動物細胞である。

【００４６】

いくつかの実施形態では、脊索動物細胞は、哺乳動物細胞である。

【００４７】

いくつかの実施形態では、脊索動物細胞は、ブタ細胞、ウシ細胞、又は家禽細胞である。

【００４８】

いくつかの実施形態では、１つ以上の異種タンパク質は、１つ以上の細胞外マトリックス（ＥＣＭ）タンパク質、成長因子タンパク質、細胞接着タンパク質、細胞表面タンパク質、細胞シグナル伝達タンパク質、タンパク質モチーフ（合成又は天然に存在する）、フレーバータンパク質、又はそれらの任意の組み合わせから選択される。

【００４９】

いくつかの実施形態では、糸状菌は、子嚢菌門、担子菌門、及び接合菌門（ケカビ門及びトリモチカビ門）からなる群から選択される門に属する、１つ以上の菌株を含む。

【００５０】

いくつかの実施形態では、糸状菌株は、子嚢菌門に由来し、アスペルギルス、ペニシリウム、及びアカパンカビからなる群から選択される属に属する、１つ以上の菌株を含む。いくつかの実施形態では、糸状菌は、アスペルギルス属に由来し、アスペルギルス・オリゼの１つ以上の菌株を含む。いくつかの実施形態では、糸状菌は、アカパンカビ属に由来し、ニューロスポラ・クラッサの１つ以上の菌株を含む。

【００５１】

いくつかの実施形態では、糸状菌株は、ケカビ門に由来するリゾプス・オリゼ又はリゾプス・オリゴスポラスの菌株である。

【００５２】

いくつかの実施形態では、複数の酵母細胞は、サッカロミセス・セレビシエ、サッカロミセス・バヤヌース、サッカロミセス・カペンシス、シゾサッカロミセス・ポンベ、及びピキア・パストリスからなる群から選択される１つ以上の菌株を含む。いくつかの実施形態では、複数の酵母細胞は、サッカロミセス・セレビシエの１つ以上の菌株を含む。

【００５３】

いくつかの実施形態では、１つ以上の異種タンパク質は、脊索動物ＥＣＭタンパク質、成長因子タンパク質、細胞接着タンパク質、細胞シグナル伝達タンパク質、ペプチドモチーフ（合成又は天然に存在する）、フレーバータンパク質、又は細胞表面タンパク質である。いくつかの実施形態では、異種脊索動物タンパク質は、哺乳動物ＥＣＭタンパク質、成長因子タンパク質、接着分子タンパク質、細胞シグナル伝達タンパク質、ペプチドモチーフ（合成又は天然に存在する）、フレーバータンパク質、又は細胞表面タンパク質である。

【００５４】

いくつかの実施形態では、１つ以上の異種タンパク質は、コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチン、及びＲＧＤモチーフペプチドからなる群より選択される１つ以上のＥＣＭタンパク質を含む。

【００５５】

いくつかの実施形態では、１つ以上の異種タンパク質は、可溶的に発現されるか、特定の細胞内局在を標的とするか、又は分泌される。

【図面の簡単な説明】

【００５６】

【図１Ａ】酵母（サッカロミセス・セレビシエ）及び麹菌（アスペルギルス・オリゼ）菌糸体の共固定化を示す画像である。菌糸体を含む麹菌糸構造への酵母細胞壁の吸着を促進する条件下で麹菌とともに成長された、細胞質ＧＦＰを発現する酵母レポーター株を示す画像である。徹底的な洗浄後でも、酵母の亜集団は依然として麹菌糸体の菌糸に結合した状態で残る。

【図１Ｂ】酵母（サッカロミセス・セレビシエ）及び麹菌（アスペルギルス・オリゼ）菌糸体の共固定化を示す画像である。共固定化された酵母及び麹菌構造は、平らなシートに

成長させることができる。
【図１Ｃ】酵母（サッカロミセス・セレビシエ）及び麹菌（アスペルギルス・オリゼ）菌糸体の共固定化を示す画像である。共固定化された酵母及び麹菌構造は、球体に成長させることができる。
【図２】アスペルギルス・オリゼ及びサッカロミセス・セレビシエの共生成長からなる足場に筋芽細胞が接着していることを示す画像である。ウズラ筋芽細胞（ＱＭ７細胞株）を、実施例７（足場生成－平らなシートの場合）に記載の方法で成長された共生成長サッカロミセス・セレビシエ、及びアスペルギルス・オリゼから構成される平らなシート状足場上に播種した。細胞を含んだ足場を固定化し、動物細胞を染色するアクチン（５４３－ファロイジンで可視化）を染色した。
【図３Ａ】構造化培養肉製品に組み立てられた細胞を含んだ足場を示す画像である。採取され、赤色で染色され、微生物トランスグルタミナーゼで架橋されて「生の」培養肉製品を製造した、細胞を含んだ足場を示す画像である。
【図３Ｂ】構造化培養肉製品に組み立てられた細胞を含んだ足場を示す画像である。アボカド油で調理した培養肉製品の画像である。
【図４】ウシＣＯＬ１Ａ１４５ｋＤａフラグメントをコードするサッカロミセス・セレビシエ細胞質発現プラスミドのプラスミドマップである。ウシ（Ｂｏｓ　ｔａｕｒｕｓ）ＣＯＬ１Ａ１フラグメントの４５ｋＤａフラグメントに６×ＨＩＳエピトープが付加され（「６×ＨＩＳ－Ｂｔ＿ＣＯＬ１Ａ１^{45kDa}」）、酵母ＣＹＣ１遺伝子からの３’ＵＴＲで終端した（「３’ＵＴＲ＿ＣＹＣ１」）。発現は酵母ＧＰＤプロモーター（「Ｐ＿ＧＰＤ」）によって駆動される。このプラスミドは、大腸菌選択用のカナマイシン耐性マーカー（「Ｋａｎ＿Ｒ」）、大腸菌増殖用のｐＵＣプラスミドからの複製起点（「Ｏｒｉ＿ｐＵＣ」）、酵母選択用のＬＥＵ２栄養要求性マーカー（「ＬＥＵ２」）、及び酵母増殖用の２ｕｍエレメント（「２ｕｍ」）を含む。
【図５Ａ】ウシコラーゲンＣＯＬ１Ａ１を発現するように操作されたアスペルギルス・オリゼ及びサッカロミセス・セレビシエの共生成長から構成される足場に接着した筋芽細胞を示す画像である。ウズラ筋芽細胞（ＱＭ７細胞株）を、実施例８（足場生成－平らなシートの場合）に記載の方法で成長されたウシＣＯＬ１Ａ１の４５ｋＤａフラグメントを発現する、共生成長サッカロミセス・セレビシエ、及びアスペルギルス・オリゼから構成される平らなシート状足場上に播種した。細胞を含んだ足場を固定し、アクチン（５４３－ファロイジンで可視化）を染色した。
【図５Ｂ】ウシコラーゲンＣＯＬ１Ａ１を発現するように操作されたアスペルギルス・オリゼ及びサッカロミセス・セレビシエの共生成長から構成される足場に接着した筋芽細胞を示す画像である。ウズラ筋芽細胞（ＱＭ７細胞株）を、実施例８（足場生成－平らなシートの場合）に記載の方法で成長されたウシＣＯＬ１Ａ１の４５ｋＤａフラグメントを発現する、共生成長サッカロミセス・セレビシエ、及びアスペルギルス・オリゼから構成される平らなシート状足場上に播種した。細胞を含んだ足場を固定化し、核（ＤＡＰＩで可視化）を染色した。
【図５Ｃ】ウシコラーゲンＣＯＬ１Ａ１を発現するように操作されたアスペルギルス・オリゼ及びサッカロミセス・セレビシエの共生成長から構成される足場に接着した筋芽細胞を示す画像である。ウズラ筋芽細胞（ＱＭ７細胞株）を、実施例８（足場生成－平らなシートの場合）に記載の方法で成長されたウシＣＯＬ１Ａ１の４５ｋＤａフラグメントを発現する、共生成長サッカロミセス・セレビシエ、及びアスペルギルス・オリゼから構成される平らなシート状足場上に播種した。細胞を含んだ足場を固定化し、アクチン及び核を染色し、共同可視化した。
【図６Ａ】構造化培養肉製品に組み立てられた、細胞を含んだ遺伝子操作された足場を示す画像である。細胞質コラーゲンを発現するように遺伝子操作されたサッカロミセス・セレビシエを有し、採取され、トランスグルタミナーゼで架橋されて「生の」ウズラ細胞（ＱＭ７）培養肉製品を製造した、細胞を含んだ足場の上面図である。
【図６Ｂ】図６Ａの培養肉製品の側面図である。

【図６Ｃ】アボカド油で調理した培養肉製品の画像である。
【図７】ウシＣＯＬ１Ａ１４５ｋＤａフラグメントをコードするサッカロミセス・セレビシエ分泌発現プラスミドのプラスミドマップである。ウシ（Ｂｏｓ　ｔａｕｒｕｓ）ＣＯＬ１Ａ１フラグメントの４５ｋＤａフラグメント（「Ｂｔ＿ＣＯＬ１Ａ１^{45kDa}」）を、６×ヒスチジンエピトープ（「ＭＦａ－６×ＨＩＳ」）に融合した交配因子αリーダー配列の３’末端に融合し、続いてトロンビン切断部位（「トロンビン切断」）を付加した。融合タンパク質の発現は、酵母ＴＥＦ１プロモーター（「Ｐ＿ＴＥＦ１」）から駆動され、３×停止コドン（「３×　ｓｔｏｐ」）で終端した。このプラスミドは、大腸菌選択用のカナマイシン耐性マーカー（「Ｋａｎ＿Ｒ」）、大腸菌増殖用の複製起点（「ＣｏｌＥ１　ｏｒｉ」）、酵母選択用のＵＲＡ３栄養要求性マーカー（「ＬＥＵ２」）、及び酵母増殖用の２ｕｍエレメント（「２ｕｍ」）を含む。
【図８】小胞体標的ウシＰ４ＨＡ１の発現のためのサッカロミセス・セレビシエ組み込みベクターのプラスミドマップである。３’ＨＤＥＬペプチド配列が付加されたウシ（Ｂｏｓ　ｔａｕｒｕｓ）Ｐ４ＨＡ１遺伝子（「Ｂｔ＿Ｐ４ＨＡ１－ＨＤＥＬ」）が、小胞体を標的とするために、Ｋａｒ２リーダー配列（「Ｋａｒ２」）の３’末端に融合された。融合タンパク質は酵母ＴＥＦ１プロモーター（「Ｐ＿ＴＥＦ１」）から駆動され、酵母ＣＹＣ１遺伝子からの３’ＵＴＲ（「３’ＵＴＲ＿ＣＹＣ１」）で終端した。このプラスミドは、大腸菌選択用のカナマイシン耐性マーカー（「Ｋａｎ＿Ｒ」）、大腸菌増殖用の複製起点（「ＣｏｌＥ１　ｏｒｉ」）、酵母選択用のＬＥＵ２栄養要求性マーカー（「ＬＥＵ２」）、酵母選択用のＨＩＳ３栄養要求性マーカー（「ＨＩＳ３」）、及び酵母増殖用の２ｕｍエレメント（「２ｕｍ」）を含む。
【図９】小胞体標的ウシＰ４ＨＢの発現のためのサッカロミセス・セレビシエ組み込みベクターのプラスミドマップである。３’ＨＤＥＬペプチド配列が付加されたウシ（Ｂｏｓ　ｔａｕｒｕｓ）Ｐ４ＨＢ遺伝子（「Ｂｔ＿Ｐ４ＨＢ－ＨＤＥＬ」）が、小胞体を標的とするために、Ｋａｒ２リーダー配列（「Ｋａｒ２」）の３’末端に融合された。融合タンパク質は酵母ＴＥＦ１プロモーター（「Ｐ＿ＴＥＦ１」）から駆動され、酵母ＣＹＣ１遺伝子の３’ＵＴＲ（「３’ＵＴＲ＿ＣＹＣ１」）で終端する。このプラスミドは、大腸菌選択用のカナマイシン耐性マーカー（「Ｋａｎ＿Ｒ」）、大腸菌増殖用の複製起点（「ＣｏｌＥ１　ｏｒｉ」）、酵母選択用のＵＲＡ３栄養要求性マーカー（「ＵＲＡ３」）、酵母選択用のＨＩＳ３栄養要求性マーカー（「ＨＩＳ３」）、及び酵母増殖用の２ｕｍエレメント（「２ｕｍ」）を含む。
【発明を実施するための形態】
【００５７】
本技術の実質的な理解を提供するために、本技術のある特定の態様、モード、実施形態、変形及び特徴が、以下に様々な詳細さのレベルで記載されることを理解されたい。本明細書で使用されるようなある特定の用語の定義が、以下に提供される。別段に定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、概して、本技術が属する当業者によって一般的に理解されるものと同じ意味を有する。
【００５８】
Ｉ．定義
本明細書で使用されるすべての専門用語は、生化学及び分子生物学で一般的に使用される。したがって、それらは、本技術が属する分野の当業者には理解されるものである。これらの専門用語は、たとえば次の書類において見つけることができる：Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ　３ｒｄ　ｅｄ．，ｖｏｌ．１－３，ｅｄ．Ｓａｍｂｒｏｏｋ及びＲｕｓｓｅｌ（Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．，２００１）、Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　Ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ，ｅｄ．Ａｕｓｕｂｅｌ　ｅｔ　ａｌ．，（Ｇｒｅｅｎｅ　Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ　Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ　ａｎｄ　Ｗｉｌｅｙ－Ｉｎｔｅｒｓｃｉｅｎｃｅ，Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ，１９８８）（定期更新を含む）、Ｓｈｏｒｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌ

ｓ Ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ： Ａ Ｃｏｍｐｅｎｄｉｕｍ Ｏｆ Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｆｒｏｍ Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ Ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ ５ｔｈ ｅｄ．， ｖｏｌ．１－２，ｅｄ．Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．，（Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．，２００２）、Ｇｅｎｏｍｅ Ａｎａｌｙｓｉｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，ｖｏｌ．１－２，ｅｄ．Ｇｒｅｅｎ ｅｔ ａｌ．，（Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．，１９９７）。

【００５９】

本明細書では以下の用語が使用されており、その定義が指針として提供されている。

【００６０】

本明細書で使用される場合、単数形「ａ」、「ａｎ」、及び「ｔｈｅ」は、単数形のみを指定するように明示的に記載されない限り、単数形及び複数形の両方を指定する。

【００６１】

「約（ａｂｏｕｔ）」という用語及び範囲の使用は一般に、約という用語によって制限されるか否かにかかわらず、理解される数が本明細書に記載される正確な数に限定されず、本技術の範囲から逸脱しないが、実質的に引用された範囲内の範囲を指すことが意図されることを意味する。本明細書で使用される場合、「約」は、当業者によって理解され、使用される文脈である程度変動するであろう。使用される文脈を考慮して当業者には明らかではない用語の使用が存在する場合、「約」は、特定の用語のプラス又はマイナス１０％までを意味する。

【００６２】

本明細書で使用される場合、「及び／又は」という語句は、そのように結合された要素、例えば、場合によっては連結的に存在し、他の場合には分離的に存在する要素の「いずれか又は両方」を意味すると理解されるべきである。したがって、非限定的な例として、「Ａ及び／又はＢ」への言及は、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」などのオープンエンドの文言と組み合わせて使用される場合、一実施形態では、Ａのみ（任意でＢ以外の要素を含む）、別の実施形態では、Ｂのみ（任意でＡ以外の要素を任意に含む）、さらに別の実施形態では、ＡとＢの両方（任意選択で他の要素を含む）などを指すことができる。

【００６３】

本明細書で使用される場合、「おおよそ（ａｐｐｒｏｘｉｍａｔｅｌｙ）」という用語が数値範囲と共に使用されるとき、それは、その数値の上及び下の境界を拡張することによって範囲を修正する。一般に、「おおよそ」という用語は、本明細書では、数値を記載された値を上及び下に２０％、１０％、５％、又は１％の変動で修正するために使用される。ある特定の実施形態では、「おおよそ」という用語は、数値を、記述された値を上及び下に１０％の変動で修正するために使用される。ある特定の実施形態では、「おおよそ」という用語は、数値を、記述された値を上及び下に５％の変動で修正するために使用される。ある特定の実施形態では、「おおよそ」という用語は、数値を、記述された値を上及び下に１％の変動で修正するために使用される。

【００６４】

本明細書で使用される場合、「少なくとも１つ」という用語は、１つ以上の要素のリストに関して、要素のリスト内の要素のうちの任意の１つ以上から選択される少なくとも１つの要素を意味すると理解されるべきであるが、必ずしも要素のリスト内に具体的に列挙された各要素及びすべての要素のうちの少なくとも１つを含むわけではなく、要素のリスト内の要素の任意の組み合わせを除外しない。この定義はまた、「少なくとも１つ」という語句が指す要素のリスト内で具体的に識別される要素以外の要素が、具体的に識別される要素に関連するかどうかにかかわらず、任意選択的に存在し得ることも可能にする。したがって、非限定的な例として、「Ａ及びＢの少なくとも１つ」（又は同等に「Ａ又はＢの少なくとも１つ」、又は同等に「Ａ及び／又はＢの少なくとも１つ」）は、一実施形態では、Ｂが存在せずに（及び任意選択でＢ以外の要素を含む）、少なくとも１つの、任意

選択で２つ以上のＡ、別の実施形態では、Ａが存在せずに（及び任意でＡ以外の要素を含む）、少なくとも１つの、任意で２つ以上のＢ、さらに別の実施形態では、少なくとも１つの、任意選択で２つ以上のＡ、及び少なくとも１つの、任意選択で２つ以上のＢ（及び任意選択で他の要素を含む）、などを指すことができる。

【００６５】

本明細書で使用する場合、「バイオカプセル」又は「糸状菌－酵母バイオカプセル」という用語は、酵母及び糸状菌の共固定化の形態を指す。酵母と糸状菌の組み合わせた固有の接着特性により、液体培地中である特定の条件下で培養すると、疎水性相互作用を通じてバイオカプセルが自発的に形成される。いくつかの実施形態では、酵母は遺伝子操作されていない。いくつかの実施形態では、酵母は、１つ以上の細胞外マトリックス（ＥＣＭ）タンパク質、成長因子タンパク質、細胞接着タンパク質、細胞表面タンパク質、細胞シグナル伝達タンパク質、モチーフペプチド（合成又は天然に存在する）、フレーバータンパク質、又はそれらの任意の組み合わせから選択される１つ以上の異種タンパク質を発現するように遺伝子操作され、異種タンパク質は可溶的に発現されるか、特定の細胞内局在を標的とするか、又は分泌される。いくつかの実施形態では、酵母は固定又は脱細胞化される。いくつかの実施形態では、バイオカプセルは生体材料足場として使用される。いくつかの実施形態では、バイオカプセルは、食用生体材料足場として使用される。いくつかの実施形態では、バイオカプセルは、本明細書に記載の方法に従って細胞ベースの肉製造のための食用生体材料足場として使用される。

【００６６】

本明細書で使用する場合、「実施形態」という用語は、特定の特徴、構造、又は特性が本技術の少なくとも１つ以上の発現、実施例、又は実装態様に含まれることを意味する。さらに、特定の特徴、構造、又は特性は、当業者には明らかであるように、任意の適切な方法で組み合わせることができる。異なる実施形態の特徴の組み合わせは、本技術の範囲内にあることを意図しており、あらゆる可能な置換を例によって明示的に説明する必要はない。したがって、特許請求された実施形態のいずれも、任意の組み合わせで使用することができる。

【００６７】

本明細書で使用する場合、「遺伝子工学」又は「遺伝子操作された」という用語は、宿主生物に核酸又は特異的突然変異を導入するための任意の方法を包含する。例えば、酵母細胞は、異種タンパク質を発現するポリヌクレオチド配列で形質転換されるときに遺伝子操作される。ポリヌクレオチド配列が導入され、その結果、細胞内での新規及び／又は異種遺伝子の発現、又はアップレギュレーション若しくはダウンレギュレーション、欠失、コピー数の変化により、細胞内に自然に見出される遺伝子産物のレベル増加若しくは減少を引き起こす場合に、細胞は遺伝子操作される。

【００６８】

「異種核酸」とは、細胞（又は細胞の祖先）に導入された核酸、ＤＮＡ、又はＲＮＡを指し、それは、それが導入された細胞内に自然に見出される配列のコピーではない。このような異種核酸は、それが導入された細胞内に天然に見出される配列のコピーであるセグメント、又はそのフラグメントを含み得る。

【００６９】

本明細書で使用する場合、「前駆細胞」という用語は、複数の系統で分化した細胞を生じさせることができる細胞を指す。前駆細胞には、胚性幹細胞、間葉系幹細胞、成体幹細胞、分化した胚性幹細胞、分化した成体幹細胞、又は人工多能性幹細胞などの幹細胞が含まれ得る。

【００７０】

ＩＩ．概要

本技術は、ステーキ様の培養肉製品などの細胞ベースの肉製品の製造のための培養動物細胞の付着、増殖、及び形態形成のための構造及び適切な成長環境を提供する、食用バイオカプセルの製造のための組成物及び方法に関する。バイオカプセルは、食用ベース基質

及び酵母細胞（例えば、パン酵母（サッカロミセス・セレビシエ）など）を含む。いくつかの実施形態では、バイオカプセルの酵母は改変又は遺伝子操作されていない。いくつかの実施形態では、バイオカプセルの酵母は、１つ以上の異種タンパク質（例えば、１つ以上の細胞外マトリックス（ＥＣＭ）タンパク質、成長因子タンパク質、細胞接着タンパク質、細胞表面タンパク質、細胞シグナル伝達タンパク質、モチーフペプチド（合成又は天然に存在する）、フレーバータンパク質、又はそれらの任意の組み合わせ）を発現するために遺伝子操作される。ベース基質は食用糸状菌の菌糸体を含み、任意の所望の形状及びサイズに成長させることができ、最終的な培養肉製品の主要な構造要素として機能する。ベース基質は酵母によって機能化されており、任意選択で遺伝子操作することができる。ベース基質は、例えば、主に食用多糖類で構成される、遺伝子操作されたパン酵母によって発現される組換えタンパク質で機能化できる。遺伝子操作されたパン酵母は、脱細胞化又は固定することができ、酵母を不活性にする一方で、可溶性発現され得る、特定の細胞内局在を標的とし得る、又は分泌され得る異種タンパク質が構造的に無傷のままであるようにする。

【００７１】

ＩＩＩ．動物組織の成長のための足場

動物の組織は、三次元構造に成長した様々な細胞型の組織化された配置である。個々の細胞が組織化された組織に成長するためには、細胞は、三次元での膨脹性成長を促進するある種の支持足場に接着する可能性がある。足場生体材料は、組織の構造を三次元で模倣する生体適合性表面を有し、細胞／組織の浸透をサポートするために相互接続された多孔性を示す可能性がある。天然源から作られた足場は、生物学的認識を促進し、細胞の接着と機能をサポートする生来の能力により有利である。

【００７２】

天然由来の足場生体材料は、一般に２つのグループに分類される：（１）コラーゲン、シルクフィブロイン、ゼラチン、フィブロネクチン、ケラチン、フィブリン、卵殻膜などの細胞外マトリックス（ＥＣＭ）タンパク質ベースの生体材料、並びに（２）ヒアルロナン、セルロース、グルコース、アルギン酸塩、コンドロイチン、キチン及びその誘導体であるキトサンなどの多糖類ベースの生体材料。足場タンパク質の両方のグループが組織の成長にとって重要であるが、開発のほとんどは多糖類ベースの生体材料の分野でのみ行われている。ジェランガム、アルギン酸塩、ペクチン、修飾セルロースなどの食品に安全な植物由来のポリマーで作られた調整可能な足場の開発は進んでいるが、ＥＣＭタンパク質は現在まだほとんどが動物源から採取されており、これは非効率的であり、バッチ間のばらつきが生じる。さらに、ＥＣＭタンパク質と多糖類ベースの生体材料の両方を組み合わせる足場を製造するための当該技術分野の現在の方法は、高度に精製されたＥＣＭタンパク質を必要とする機能化技術を使用しており、これは非常にコストが高く非効率的である。

【００７３】

本明細書に記載されるように、本技術は、多糖類ベースの構造要素及び／又はタンパク質（ＥＣＭタンパク質など）を有し、任意の所定の動物細胞型の任意の所望の組織への成長及び増殖を改善する可能性がある、堅牢でカスタマイズ可能な足場を製造するための菌類ベースのアプローチの使用に関する。

【００７４】

ＩＶ．菌類

カビ及び酵母は自然界に広く分布している菌類である。菌類とは、酵母やカビなどの微生物、並びによりよく知られているキノコを含む真核生物のグループの任意のメンバーである。カビ又はは糸状菌は、菌糸体を形成する細胞の長いフィラメント（菌糸）として提示される。菌糸は、菌類の長く分岐した糸状構造である。糸状菌は菌糸の架橋ネットワークで構成され、極性化した先端の伸長と分枝形成（成長先端の数の増加）を介して膨張し、これは動物や植物の細胞分裂に相当する。ほとんどの菌類では、菌糸が栄養成長の主な様式であり、総称して「菌糸体」と呼ばれる。

【００７５】
本技術の菌糸体は、当業者に知られている任意の方法によって成長できることが理解されるべきである。
【００７６】
いくつかの実施形態では、菌糸足場は、細胞ベースの食肉技術用の灌流バイオリアクターシステムを使用することによって生成され得る。灌流バイオリアクターシステムには、例えば、牛筋細胞の増殖、透析、酸素化のための懸濁リアクターユニット、リアクターユニット間の培地循環及び培地供給のためのポンプ、及び凝集細胞塊の機械的作動の有無にかかわらず凝集細胞塊を製造するための足場バイオリアクターユニットが含まれ得る。
【００７７】
いくつかの実施形態では、糸状菌は、子嚢菌門、担子菌門、及び接合菌門（ケカビ門及びトリモチカビ門）からなる群から選択される門に属する１つ以上の菌株を含む。いくつかの実施形態では、糸状菌株は、子嚢菌門に由来し、アスペルギルス、ペニシリウム、及びアカパンカビからなる群から選択される属に属する、１つ以上の菌株を含む。いくつかの実施形態では、糸状菌は、アスペルギルス属に由来し、アスペルギルス・オリゼの１つ以上の菌株を含む。いくつかの実施形態では、糸状菌は、アカパンカビ属に由来し、ニューロスポラ・クラッサの１つ以上の菌株を含む。いくつかの実施形態では、糸状菌は、ケカビ門に由来するリゾプス・オリゼ又はリゾプス・オリゴスポラスの菌株である。
【００７８】
ペニシリウムやアスペルギルスなどのカビは好気性であり、その化学活性により、抗生物質、チーズなどの製造において非常に重要である。ペニシリウムは、自然環境、食品の腐敗、食品や医薬品の製造において重要な子嚢菌の属である。アスペルギルスは、糸状菌又は普通のカビのグループからなる属であり、そのほとんどが無性状態で発生し、多くの異なる環境に広がり、発芽し得る分生子（無性胞子又は分生子柄）を生成することによって繁殖し、成長する。
【００７９】
酵母は、菌界のメンバーとして分類される真核性の単細胞微生物である。サッカロミセス・セレビシエ（一般にビール酵母として知られている）は、ワイン製造、製パン、醸造に役立つ嫌気性酵母の一種である。一部のサッカロミセス・セレビシエは、アルコール発酵が終了し、発酵性糖が枯渇すると、ワインの表面にベール又は花を形成することがあるが、これは自発的固定化の形態である。
【００８０】
ビール酵母は室温で液体として容易に培養でき、成長が速く（倍加時間が約２時間）、そのゲノムを十分に確立された分子生物学ツールセットを使用して、容易に操作できる。真核生物であるビール酵母には、哺乳動物タンパク質を効率的に生産できる細胞機構が備わっている。ビール酵母は食用であり、製パンと醸造における役割、アルコール製造における役割で最もよく知られており、その数多くの健康上の利点により栄養補助食品としても消費されている。
【００８１】
アスペルギルス・オリゼ（一般に麹菌として知られる）は、伝統的に酒、醤油及び味噌の製造に使用され、肉に似た自然なうま味を有しているため、人間が消費しても安全である。単独の材料として、又は出芽酵母と組み合わせて、麹菌の菌糸体からの繊維状材料は、分岐、糸状の菌糸で構成される菌類の栄養構造を形成することができる。麹菌は、任意のサイズの固体構造を形成するように成長させることができる。
【００８２】
また、麹菌の密度及び材料特性を製造時に調整することができ、必要に応じて、この糸状菌は、遺伝子工学に適している。したがって、本技術のいくつかの実施形態では、麹菌は足場の主要なキチン構造要素を構成し、動物組織の構造的骨格を提供する。人工ビール酵母を麹足場に添加すると、機能的な組織へのさまざまな動物細胞の接着と増殖を改善するために使用できるカスタマイズ可能な特性が追加される。

【００８３】
Ｖ．キチン
キチンは出芽酵母や糸状菌の細胞壁の主成分である。キチンは、天然に豊富に存在する多糖類であり、天然に豊富に存在する別のポリマーである脱アセチル化キトサンの生成物である。キチン／キトサンは、エビ、カニ、ロブスターなどの甲殻類の殻の主成分であり、アスペルギルス・オリゼ（一般的に麹菌として知られる）、サッカロミセス・セレビシエ（一般的にビール酵母、パン酵母、又は出芽酵母と呼ばれる）を含むさまざまな菌類の細胞壁の主成分でもある。キチンは、動物組織培養の基質として三次元足場に容易に操作できる。扱いやすい化学的特性、動物を含まない性質、豊富さに加えて、キチン／キトサンには抗菌特性及び栄養上の利点も含まれている。本明細書に記載されるように、いくつかの実施形態では、パン／ビール酵母と麹菌の両方に由来するキチン／キトサンが、各動物組織用に特異的に操作されるカスタマイズされた足場の主要な構造成分として使用される。
【００８４】
単独の材料として、又は出芽酵母と組み合わせて、麹菌の菌糸体からの繊維状材料は、分岐、糸状の菌糸で構成される菌類の栄養構造を形成することができる。麹菌は、当技術分野で知られている手順を使用して、任意のサイズの固体構造を形成するように成長させることができる。さらに、その密度と材料特性は製造中に調整でき、必要に応じて、この糸状菌は遺伝子工学に適している。したがって、本明細書に記載されるように、いくつかの実施形態では、麹が生体材料足場の主要なキチン構造要素を構成し、動物組織の構造的骨格（例えば、ステーキの形状）を提供する。人工ビール酵母を麹足場に添加すると、さまざまな脊索動物細胞及び非脊索動物細胞の機能的な組織への接着と増殖を改善するために使用できるカスタマイズ可能な特性が追加される。
【００８５】
ＶＩ．酵母及び遺伝子操作された酵母
本明細書に記載されるように、本技術のバイオカプセル組成物及び方法は酵母細胞を含む。これらの酵母細胞は、動物細胞の接着とその後の細胞活性のために１つ以上の異種タンパク質を発現するように任意選択で遺伝子操作できる。いくつかの実施形態では、酵母は、サッカロミセス・セレビシエ、サッカロミセス・バヤヌース、サッカロミセス・カペンシス、シゾサッカロミセス・ポンベ、及びピキア・パストリスからなる群から選択される１つ以上の菌株を含む。いくつかの実施形態では、酵母は、サッカロミセス・セレビシエ（パン酵母、ビール酵母）の１つ以上の菌株を含む。
【００８６】
いくつかの実施形態では、１つ以上の異種タンパク質は、１つ以上の細胞外マトリックス（ＥＣＭ）タンパク質、成長因子タンパク質、細胞接着タンパク質、細胞表面タンパク質、細胞シグナル伝達タンパク質、モチーフペプチド（合成又は天然に存在する）、フレーバータンパク質、又はそれらの任意の組み合わせから選択される。いくつかの実施形態では、異種タンパク質は、１つ以上の脊索動物又は非脊索動物の海洋生物ＥＣＭタンパク質、成長因子タンパク質、細胞接着タンパク質、細胞表面タンパク質、細胞シグナル伝達タンパク質、モチーフペプチド（合成又は天然に存在する）、フレーバータンパク質、又はそれらの任意の組み合わせから選択される。いくつかの実施形態では、異種脊索動物タンパク質は、哺乳動物ＥＣＭタンパク質、成長因子タンパク質、接着分子タンパク質、細胞表面タンパク質、細胞シグナル伝達タンパク質、モチーフペプチド（合成又は天然に存在する）、フレーバータンパク質、又はそれらの任意の組み合わせである。いくつかの実施形態では、異種タンパク質は、コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチン、及びＲＧＤモチーフペプチドからなる群から選択される１つ以上のＥＣＭタンパク質を含む。フレーバータンパク質には、例えばフレーバー付与化合物の結合及び／又は吸収を通じて組成物のフレーバーに影響を与えるタンパク質が含まれる。適切なフレーバータンパク質の範囲、及びそれらが組成物のフレーバーにどのように影響を与えるかは、当業者には理解されるであろう。Ｚｈａｎｇ，Ｊｉａｎ，Ｋａｎｇ，Ｄａｃｈｅｎｄ，Ｚｈａｎｇ，Ｗａｎｇ

ａｎｇ，及びＬｏｒｅｎｚｏｅ，Ｊｏｓｅ，Ｒｅｃｅｎｔ ａｄｖａｎｔａｇｅ ｏｆ ｉｎｔｅｒａｃｔｉｏｎｓ ｏｆ ｐｒｏｔｅｉｎ－ｆｌａｖｏｒ ｉｎ ｆｏｏｄｓ：Ｐｅｒｓｐｅｃｔｉｖｅ ｏｆ ｔｈｅｏｒｅｔｉｃａｌ ｍｏｄｅｌｓ，ｐｒｏｔｅｉｎ ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ ａｎｄ ｅｘｔｒｉｎｓｉｃ ｆａｃｔｏｒｓ．Ｔｒｅｎｄｓ ｉｎ Ｆｏｏｄ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ．２０２１ Ｍａｙ；１１１：４０５－４２５を参照のこと。いくつかの実施形態では、異種タンパク質は、可溶的に発現されるか、特定の細胞内局在を標的とするか、又は分泌される。

【００８７】

いくつかの実施形態では、酵母細胞は、生細胞又は死細胞、無傷の状態、透過処理された状態、又は元の細胞質の内容物をすべて空にした状態（脱細胞化）でさえ使用することができる。いくつかの実施形態では、本技術の酵母細胞は固定される。酵母細胞は、熱衝撃、洗剤、アルコールなどの脱水剤による処理、浸透圧衝撃、凍結乾燥、物理的（機械的）溶解、電気的破壊、酵素消化、又はそれらの任意の組み合わせによる固定又は脱細胞化を含むがこれらに限定されない、当技術分野で公知の任意の適切な方法によって固定又は脱細胞化することができる。

【００８８】

ＶＩＩ．カプセル化

カプセル化では、食品成分、酵素、細胞、又はその他の材料を小さなカプセルに組み込むことを含む。カプセル化された材料を湿気、熱、又はその他の極端な条件から保護できるため、その安定性が向上し、生存能力が維持されるため、この技術の応用は食品業界で増加している。バイオカプセルを形成するには、噴霧乾燥、噴霧冷却又は噴霧冷却、押出コーティング、流動床コーティング、リポソーム封入、コアセルベーション、包接錯体形成、遠心押出及び回転懸濁分離を含む様々な技術が使用される。香料添加剤、酸塩基、人工甘味料、着色料、保存料、膨脹剤、酸化防止剤、望ましくないフレーバー、匂い、栄養素を含む薬剤など、多種多様な食品がカプセル化されている。マイクロカプセル化、又は微小な粒子又は液滴をコーティングで囲んで小さなカプセルを与えるプロセスも、特に酵素の固定化のために実行されており、これは、多数の酵素を変性や化学修飾を受けずに合成ポリマー（セルロースアセテートタレートなど）で捕捉できるためである。

【００８９】

異種タンパク質を含む固定酵母と糸状菌ベース（例えば、麹菌ベース）の足場との組み合わせは、これら両方の菌類の固有の付着特性を利用する。ビール酵母は、強力な疎水性相互作用を通じて糸状菌の菌糸と自然に結合する。

【００９０】

当該プロセスで使用される真菌類（粘菌類とは区別されるすべての真菌類（子嚢菌類及び担子菌類）を含む菌類の一部門）の固有の付着特性により、酵母細胞による麹菌ベースの基質の機能化が可能になる。パン酵母は、強力な疎水性相互作用を通じて糸状菌の菌糸と自然に結合する。さらに、化学架橋剤や外部支持体を添加せずに、糸状菌（例えば、麹菌）とビール酵母の共固定化を誘導するためのプロトコルが以前に記載されている。両方の微生物を含む大きな球体（直径が約２ｃｍ）、すなわち「糸状菌－酵母バイオカプセル」を製造する技術が実証されており、この糸状菌－酵母バイオカプセルは多くの過酷な条件下で極めて安定であり、確立された足場に似ている。

【００９１】

これらのバイオカプセルの密度及び多孔性は、出芽酵母細胞壁の主成分であるグルカンの固有の特性を利用することで調節できる。グルカンは、グリコシド結合によって連結された、Ｄ－グルコースに由来する多糖類である。グルカンは中性ｐＨで重合してゲルを形成することができるため、システムに別の同調可能な層が追加される。本明細書に記載ように、細胞外マトリックス（ＥＣＭ）タンパク質、成長因子タンパク質、細胞接着タンパク質、細胞表面タンパク質、細胞シグナル伝達タンパク質、モチーフペプチド（合成又は天然は存在する）、フレーバータンパク質又はそれらの任意の組み合わせなどの異種タンパク質を発現するように任意選択で遺伝子操作される、食用で構造的に堅牢な麹菌ベース

のマトリックス及びビール酵母で構成される生体材料足場は、筋肉／脂肪ベースの動物組織の生成のための三次元構造及び細胞増殖の合図を提供する。

【００９２】

ＶＩＩＩ．複数の１つ以上の細胞型、播種、及び細胞の培養

多数の細胞型又は細胞集団を、本技術の糸状菌－酵母バイオカプセルとともに培養して、三次元の食用の細胞ベースの肉製品を形成することができる。いくつかの実施形態では、１つ以上の細胞型は、筋芽細胞又はその前駆細胞、脂肪細胞又はその前駆細胞、線維芽細胞又はその前駆細胞、内皮細胞又はその前駆細胞、平滑筋細胞又はその前駆細胞、筋衛星細胞、人工多能性幹細胞、間葉系幹細胞、胚性幹細胞、及びそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。

【００９３】

いくつかの実施形態では、複数の細胞型は前駆細胞である。いくつかの実施形態では、前駆細胞は単培養で培養される。いくつかの実施形態では、前駆細胞は単培養で分化される。いくつかの実施形態では、前駆細胞は単培養で分化され、その後、本技術の三次元糸状菌－酵母バイオカプセル上に播種され、インキュベートされる。いくつかの実施形態において、前駆細胞は、本技術の三次元糸状菌－酵母バイオカプセル上に播種され、インキュベートされ、ｉｎ　ｓｉｔｕで分化される。前駆細胞を培養し、分化した細胞に分化させる方法は、当業者には容易に明らかであろう。

【００９４】

いくつかの実施形態では、複数の細胞型は生きた動物から得られ、初代細胞株として培養される。いくつかの実施形態では、細胞は生検によって取得され、生体外で培養された。いくつかの実施形態では、細胞は市販の細胞株から得られる。いくつかの実施形態では、細胞は不死化又は再プログラムされた初代細胞株である。

【００９５】

いくつかの実施形態では、複数の細胞型は脊索動物に由来する。いくつかの実施形態では、複数の細胞型は、哺乳動物、鳥類、魚類、爬虫類、両生類から選択される非ヒト脊索動物に由来する。いくつかの実施形態では、複数の細胞型は非ヒト哺乳動物に由来する。いくつかの実施形態では、複数の細胞型は家畜に由来し、家畜には、例えば、ウシ、ヘラジカ、トナカイ、バイソン、ウマ、シカ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、家禽、ラマ、アルパカ、生きた魚が含まれるが、これらに限定されない家畜、準家畜、捕獲野生動物が含まれる。いくつかの実施形態では、複数の細胞型は非脊索動物の海洋生物に由来する。いくつかの実施形態では、複数の細胞型は、甲殻類（例えば、ロブスター、カニ、エビ、ハマグリ、カキ、ムール貝）、ウニ、イカ、タコから選択されるが、これらに限定されない非脊索動物の海洋生物に由来する。いくつかの実施形態では、複数の１つ以上の細胞は、本技術のバイオカプセルの酵母細胞によって発現され得る異種タンパク質と同じ脊索動物又は非脊索動物に由来する。いくつかの実施形態では、本技術のバイオカプセルの酵母細胞によって発現され得る複数の１つ以上の細胞及び異種タンパク質は、哺乳動物に由来する。いくつかの実施形態では、本技術のバイオカプセルの酵母細胞によって発現され得る複数の１つ以上の細胞及び異種タンパク質は、本明細書に記載される脊索動物又は非脊索動物の同種又は異種の組み合わせのいずれかである。いくつかの実施形態では、本技術のバイオカプセルの酵母細胞によって発現され得る複数の１つ以上の細胞及び異種タンパク質は、ブタ、ウシ、又は家禽の細胞型の同種又は異種の組み合わせのいずれかである。

【００９６】

当業者であれば、本技術の組成物及び方法で使用される複数の細胞型のそれぞれが、細胞の成長及び維持に好ましい培地を有し、好ましい範囲の細胞密度も備えていることを容易に認識するであろう。

【００９７】

いくつかの実施形態では、本技術のバイオカプセルには、細胞の成長及び維持に適している約１ｍＬ～約１０ｍＬ培地中の約１ｃｍ^2～６０ｃｍ^{2}の総表面積の範囲の足場上の約１×１０^{3}細胞～約１×１０^{6}細胞の範囲の複数の細胞型が播種される。いくつかの実

施形態では、バイオカプセルには、約３ｍＬ培地中の足場の約９ｃｍ^{2}の総表面積上に約１×１０^{5}細胞が播種される。

【００９８】

いくつかの実施形態では、「被覆率％」は、複数の１つ以上の細胞型と接触するバイオカプセル足場の面積又は体積を指す。別の実施形態では、被覆率％は、複数の１つ以上の細胞型によって占有されるバイオカプセル足場の面積又は体積を指す。本明細書で使用される場合、バイオカプセル足場と接触する細胞は、その上、内部、又はそれらの組み合わせにある。

【００９９】

いくつかの実施形態では、複数の細胞型の被覆率％は、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％、少なくとも９０％、又は少なくとも９９％である。いくつかの実施形態では、複数の細胞の被覆率％は、５～２０％、１５～３０％、２５～４０％、３５～５０％、４５～６０％、５５～７０％、６５～８０％、７５～９０％、８５～１００％、又はそれらの間の任意の範囲である。

【０１００】

当業者であれば、細胞の播種及び／又は培養が細胞培養培地の存在下で行われることを理解するであろう。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、成長因子、サイトカイン、生物活性剤、栄養素、アミノ酸、抗生物質化合物、抗炎症化合物、又はそれらの任意の組み合わせを含む。細胞の生存能力及び成長に適した適切な培地及び化合物は、当業者に知られている。

【０１０１】

本技術の方法及び組成物で使用できる成長因子又はそのフラグメントには、血小板由来成長因子（ＰＤＧＦ）及びインスリン様成長因子（ＩＧＦ－１）が含まれるが、これらに限定されない。ＰＤＧＦ及びＩＧＦ－１は、細胞分裂促進性、走化性を刺激し、細胞反応を増殖（分化）させることが知られている。成長因子は、以下の１つ以上であり得るが、これらに限定されない：ＰＤＧＦ、例えばＰＤＧＦ　ＡＡ、ＰＤＧＦ　ＢＢ；ＩＧＦ、例えば、ＩＧＦ－Ｉ、ＩＧＦ－ＩＩ；線維芽細胞増殖因子（ＦＧＦ）、例えば、酸性ＦＧＦ、塩基性ＦＧＦ、β内皮細胞成長因子、ＦＧＦ４、ＦＧＦ５、ＦＧＦ６、ＦＧＦ７、ＦＧＦ８、及びＦＧＦ９；トランスフォーミング成長因子（ＴＧＦ）、例えばＴＧＦ－Ｐ１、ＴＧＦβ、ＴＧＦ－ｐ２、ＴＧＦ－ｐ３、ＴＧＦ－ｐ５；骨形成タンパク質（ＢＭＰ）、例えばＢＭＰ１、ＢＭＰ２、ＢＭＰ３、ＢＭＰ４；血管内皮成長因子（ＶＥＧＦ）、例えばＶＥＧＦ、胎盤増殖因子；上皮成長因子（ＥＧＦ）、例えばＥＧＦ、アンフィレグリン、ベータセルリン、ヘパリン結合ＥＧＦ；インターロイキン、例えば、ＩＬ－１、ＩＬ－２、ＩＬ－３、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－８、ＩＬ－９、ＩＬ－１０、ＩＬ－１１、ＩＬ－１２、ＩＬ－１３、ＩＬ－１４；コロニー刺激因子（ＣＳＦ）、例えばＣＳＦ－Ｇ、ＣＳＦ－ＧＭ、ＣＳＦ－Ｍ；神経成長因子（ＮＧＦ）；幹細胞因子；肝細胞増殖因子、毛様体神経栄養因子、及びニューレグリン（ＮＲＧ１）、又はそれらのフラグメント。

【０１０２】

いくつかの実施形態では、複数の細胞型を食用バイオカプセル足場とともにインキュベートする。足場は、増殖細胞の集団がとる三次元の形状若しくは形態に影響を与えるか、又はその境界を定めるような特定の形状若しくは形態であってもよい。いくつかの実施形態では、バイオカプセル足場は肉製品の三次元形状を模倣する。

【０１０３】

ＩＸ．糸状菌ー酵母バイオカプセルを生成するための方法

本明細書に記載されるように、本開示の技術は、糸状菌－酵母バイオカプセルを生成するための方法に関する。いくつかの実施形態では、糸状菌－酵母バイオカプセルは、培養肉製品の製造のための培養動物細胞の付着、増殖、及び形態形成のための三次元構造及び適切な成長環境を提供する食用生体材料足場として機能する。

【０１０４】
本技術のバイオカプセルを生成する方法は、化学結合化合物及び外部支持体の非存在下で、糸状菌と複数の酵母細胞との間の自発的共固定化を誘導し、対応する共生に有利な適切な条件を人工的に作り出すことを含む。酵母と糸状菌の組み合わせた固有の接着特性により、液体培地中である特定の条件下で培養すると、疎水性相互作用を通じてバイオカプセルが自発的に形成される。いくつかの実施形態では、酵母は、１つ以上の細胞外マトリックス（ＥＣＭ）タンパク質、成長因子タンパク質、細胞接着タンパク質、細胞表面タンパク質、細胞シグナル伝達タンパク質、モチーフペプチド（合成又は天然に存在する）、フレーバータンパク質、又はそれらの任意の組み合わせから選択される１つ以上の異種タンパク質を発現するように遺伝子操作され、異種タンパク質は可溶的に発現されるか、特定の細胞内局在を標的とするか、又は分泌される。いくつかの実施形態では、酵母は固定されている。いくつかの実施形態では、酵母は脱細胞化されている。
【０１０５】
いくつかの実施形態では、糸状菌は、子嚢菌門、担子菌門、及び接合菌門（ケカビ門及びトリモチカビ門）からなる群から選択される門に属する１つ以上の菌株を含む。いくつかの実施形態では、糸状菌株は、子嚢菌門に由来し、アスペルギルス、ペニシリウム、及びアカパンカビからなる群から選択される属に属する、１つ以上の菌株を含む。いくつかの実施形態では、糸状菌は、アスペルギルス属に由来し、アスペルギルス・オリゼ（麹菌）の１つ以上の菌株を含む。いくつかの実施形態では、糸状菌は、アカパンカビ属に由来し、ニューロスポラ・クラッサの１つ以上の菌株を含む。いくつかの実施形態では、糸状菌は、リゾプス属に由来し、リゾプス・オリゼ又はリゾプス・オリゴスポラスの１つ以上の菌株を含む。いくつかの実施形態では、酵母は、サッカロミセス・セレビシエ、サッカロミセス・バヤヌース、サッカロミセス・カペンシス、シゾサッカロミセス・ポンベ、及びピキア・パストリスからなる群から選択される１つ以上の菌株を含む。いくつかの実施形態では、酵母の種は、サッカロミセス・セレビシエ、サッカロミセス・バヤヌース、又はサッカロミセス・カペンシスであり、酵母は、サッカロミセス・セレビシエの１つ以上の菌株を含む。糸状菌及び酵母の具体例は、本明細書に明示的に列挙したものに限定されず、他の例も考えられることを理解されたい。
【０１０６】
この方法は、糸状菌と酵母細胞との間の共固定化を誘導する条件を作り出すことを含む。糸状菌と酵母細胞との間の共固定化を誘導するための条件は、第１の培養培地と第２の培養培地の使用を含む。第１の培養培地は、糸状菌には利用可能であるが酵母には利用できない炭素源を含み、炭素源はグルコン酸、デンプン、セルロース、イヌリン、又は他の同様のコロイド分子から選択される。第２の培養培地は、糸状菌によっても利用可能な酵母にとって好ましい炭素源を含む。撹拌を、軌道撹拌機、撹拌通気システムを備えたサーモスタット内、スパージング、又は撹拌に適した任意のその他の手段を使用して実行できる。
【０１０７】
本技術のバイオカプセルを生成する方法の外部要因又は条件には以下が含まれ得る：おおよそ２０℃～おおよそ３７℃のインキュベーション温度、おおよそ０ｒｐｍ～おおよそ２７０ｒｐｍの撹拌速度、及び２４時間以上の培養時間。これらの外部要因は説明の目的のみで提供されることを理解されたい。
【０１０８】
本技術の方法によって生成されたバイオカプセルは、いくつかの実施形態において、細胞ベースの肉製品の製造に使用され得る。したがって、いくつかの実施形態では、この方法は、筋芽細胞又はその前駆細胞、脂肪細胞又はその前駆細胞、線維芽細胞又はその前駆細胞、内皮細胞又はその前駆細胞、平滑筋細胞又はその前駆細胞、筋衛星細胞、人工多能性幹細胞、間葉系幹細胞、胚性幹細胞、及びそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される、複数の１つ以上の細胞型を、糸状菌－酵母バイオカプセルに播種し、播種されたバイオカプセルを形成することをさらに含み得る。この方法は、播種されたバイオカプ

セルを、複数の１つ以上の細胞型の分化を誘導して食用の細胞ベースの肉製品を製造するのに有効な条件下で培養することをさらに含んでもよい。

【０１０９】

いくつかの実施形態では、この方法はまた、少なくとも１つの異種タンパク質、タンパク質フラグメント、及び／又はタンパク質モチーフを発現するように酵母細胞を操作し、糸状菌に１つ以上の特性を付与することを含んでもよい。いくつかの実施形態では、異種タンパク質は、可溶的に発現されるか、特定の細胞内局在を標的とするか、又は分泌される。いくつかの実施形態では、異種タンパク質は、細胞外マトリックス（ＥＣＭ）タンパク質、成長因子タンパク質、細胞接着タンパク質、細胞表面タンパク質、細胞シグナル伝達タンパク質、モチーフペプチド（合成又は天然に存在する）、フレーバータンパク質、又はそれらの任意の組み合わせから選択される１つ以上の異種タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、ＥＣＭタンパク質は、コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチン、及びＲＧＤモチーフペプチドのうちの１つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、異種タンパク質は非ヒト脊索動物由来である。いくつかの実施形態では、異種タンパク質は非ヒト哺乳動物由来である。いくつかの実施形態では、異種タンパク質はブタ由来である。いくつかの実施形態では、異種タンパク質はウシ由来である。いくつかの実施形態では、異種タンパク質は家禽由来である。いくつかの実施形態では、異種タンパク質は非脊索動物の海洋生物由来である。実施例の非網羅的なリストには、ゼリー構造を与えるためのコラーゲンの添加、細胞接着を与えるためのフィブロネクチンの添加が含まれる。

【０１１０】

したがって、本明細書に記載の食用バイオカプセル足場の所望の１つ以上の特性は、バイオカプセル足場に組み込まれ、足場に固有のものであるが、技術分野の他のものは、ホルモン、ミネラル、アガロース／ゼラチンなどの外因性材料や生体材料の誘導、堆積、又は注入によって化学的性質を介して足場を改変し、足場に望ましい特性を与える。さらに、本技術の足場は調整可能であり、例えば、特に筋肉細胞と脂肪細胞の共培養を可能にし、細胞の増殖と分化を改善できる成長因子を発現して、潜在的に製造コストを削減するように設計することができる。

【０１１１】

いくつかの実施形態では、この方法は、足場を任意の所望の形状に成形することを含む。いくつかの実施形態では、足場の形状は、三次元の肉製品の形状を模倣する。

【０１１２】

いくつかの実施形態では、この方法は、酵素（例えば、ザイモリアーゼ、リチカーゼ、及び／又はグルカラーゼ、他のもの）を糸状菌に導入して、糸状菌の密度、多孔性、及び／又は組織などの糸状菌のパラメータを改変することを含む。

【０１１３】

いくつかの実施形態では、この方法は、糸状菌－酵母バイオカプセルを製造することを含む。いくつかの実施形態では、糸状菌－酵母バイオカプセルは、ある形状（例えば、肉製品の形状を模倣する形状である）の中空カプセルであり、その壁は、遊離酵母細胞及び菌糸に結合する他の細胞によって部分的に占有される内部空間を制限し、クラスターを形成し、培養培地を透明のままにする。いくつかの実施形態では、足場は、最終的な肉製品、例えば、肉のスライスの形状を有し、したがって、その形状は、微小孔又は条痕を有する層状形状となる。バイオカプセルの形状は限定されず、任意の形状が考慮されることが理解されるべきである。バイオカプセルのサイズは、撹拌速度、撹拌時間、インキュベーション温度などのいくつかの外部要因に依存し得る。バイオカプセルの直径は数ミリメートルから数センチメートルまで変化し得る。バイオカプセルの三次元構造は球状に限定されず、培養される容器の形状を採用することができる。

【０１１４】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のバイオカプセルは、ステーキ様の培養肉製品を製造するための培養動物細胞の付着、増殖、及び形態形成のための構造及び適切な成長環境を提供する食用生体材料足場である。いくつかの実施形態では、足場は、酵母細胞

で機能化された食用ベース基質（糸状菌）を含む。いくつかの実施形態では、ベース基質は、遺伝子操作された酵母細胞（例えば、パン酵母）によって発現される異種タンパク質で機能化される。いくつかの実施形態では、ベース基質は食用糸状菌の菌糸体を含み、任意の所望の形状及びサイズに成長させることができ、最終的な培養肉製品の主要な構造要素として機能する。いくつかの実施形態では、ベース基質は、主に食用多糖から構成される遺伝子操作酵母（例えば、パン酵母）によって発現される異種タンパク質で機能化される。いくつかの実施形態では、パン酵母は脱細胞化又は固定化される。

【実施例】

【０１１５】

以下の実施例は、限定ではなく、例示としてのみ提供される。当業者は、本質的に同じ又は同様の結果をもたらすように変更又は修正され得る、様々な重要でないパラメータを容易に認識するであろう。実施例は、添付の特許請求の範囲によって定義されるように、本技術の範囲を限定するものと決して解釈されるべきではない。

【０１１６】

実施例１：バイオカプセルの作成

酵母をＹＰ＋３％グリセロール中で成長させる。アスペルギルスをプレート上で成長させ、ＢＦＭで胞子を採取する。ＢＦＭ（０．６７％ＹＮＢ＋０．５％グルコン酸）にさまざまな比率の酵母と胞子を接種する。バイオカプセルが所望のサイズに達するまで、３０℃で振盪して成長が起こる。次に、バイオカプセルをＹＰ＋１８％グルコース中で成長させる。その後、バイオカプセルが採取され、水で洗浄される。

【０１１７】

実施例２：エタノール固定プロトコル

足場（バイオカプセル）を２×５０ｍＬ水で１０分間洗浄し、その後５０ｍＬの４０％エタノールとともに６０～１８０分間インキュベートする。次に、足場を滅菌チューブに移し、これを滅菌水で洗浄し、滅菌ＰＢＳ中で保存する。

【０１１８】

実施例３：足場上のＣ２Ｃ１２の播種、成長、分化

この実施例では、不死化マウス筋芽細胞株であるＣ２Ｃ１２を利用する。インビボ条件の複雑な相互作用から単離された筋芽細胞のインビトロ研究用に開発されたＣ２Ｃ１２細胞は、高血清条件下で急速に増殖し、低血清条件下での筋管線維への分化が可能であるため、生物医学研究に役立つ。

【０１１９】

Ｃ２Ｃ１２細胞を成長培地（ＤＭＥＭ＋１０％ＦＢＳ）中で８０～９０％コンフルエンスまで成長させる。細胞はトリプシン処理され、成長培地で洗浄される。次に、４０～５０％コンフルエンスでの播種が、実施例１で生成されたバイオカプセル足場などの足場上に直接行われる。ＤＭＥＭ＋ＦＢＳでは成長が７日間生じ、培地は２日ごとに補充される。任意選択で、一部のサンプルを殺処分し、ファロイジン／核染色によって検査して細胞増殖を決定する。７日目に、分化培地（ＤＭＥＭ＋２％ウマ血清）に切り替える。その後、成長が５～７日間生じ、そこで培地が４日ごとに補充される。任意選択で、一部のサンプルを殺処分し、ファロイジン／核染色によって検査して分化／筋管形成を決定する。

【０１２０】

実施例４：固体基質を使用したバイオカプセルの成長

アスペルギルスをプレート上で成長させ、ＢＦＭで胞子を採取する。酵母をＹＰ＋３％グリセロール中で成長させる。さまざまな比率のアスペルギルス胞子及び酵母を水に懸濁し、ＢＦＭ寒天上に広げる。プレートを２８℃で７２時間インキュベートする。ＢＦＭを吸引除去し、ＹＰＤ１８（１８％グルコース）に置き換える。インキュベーションは、２８℃で２４時間生じる。寒天表面のバイオカプセルを採取し、加工する。

【０１２１】

実施例５：細胞ベースの肉製品の製造のための糸状菌－酵母菌バイオカプセルの使用

この実施例は、本技術の糸状菌－酵母バイオカプセルが細胞ベースの肉製品を製造する

方法において有用であることを実証する。

【０１２２】

簡単に説明すると、遺伝子操作されたサッカロミセス・セレビシエ（パン酵母）細胞を、菌糸体を含むアスペルギルス・オリゼ（麹菌）の培養物に添加し、糸状菌－酵母調製物を形成する。酵母細胞は、１つ以上の異種タンパク質を発現するように遺伝子操作される。異種タンパク質は、可溶的に発現されるか、特定の細胞内局在を標的とするか、又は分泌され得る。異種タンパク質は、任意の１つ以上の脊索動物ＥＣＭタンパク質（例えば、コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチン、ＲＧＤモチーフペプチド）、成長因子タンパク質、細胞接着タンパク質、細胞シグナル伝達タンパク質、ペプチドモチーフ（合成又は天然に存在する）、又は細胞表面タンパク質を含み得る。次いで、調製物を、アスペルギルス・オリゼ及びサッカロミセス・セレビシエの自発的共固定化を誘導するのに十分な条件（本明細書に記載のとおり）下で培養し、それによって糸状菌－酵母バイオカプセルを形成する。次に、糸状菌－酵母バイオカプセルは固定、脱細胞化、又はその他の手段によって処理され、内因性タンパク質構造を無傷に保ちながらさらなる成長を抑制する。

【０１２３】

次に、不活性の糸状菌－酵母バイオカプセルには、筋芽細胞又はその前駆細胞、脂肪細胞又はその前駆細胞、線維芽細胞又はその前駆細胞、内皮細胞又はその前駆細胞、平滑筋細胞又はその前駆細胞、筋衛星細胞、人工多能性幹細胞、間葉系幹細胞、胚性幹細胞、又はそれらの任意の組み合わせから選択される複数の１つ以上の細胞型が播種され、播種されたバイオカプセルを形成する。次いで、播種されたバイオカプセルは、複数の１つ以上の細胞型の成長及び／又は分化を誘導するのに有効な条件下で培養されて、食用の細胞ベースの肉製品を製造する。

【０１２４】

したがって、これらの結果は、本技術の糸状菌－酵母バイオカプセルが細胞ベースの肉製品を製造する方法において有効であることを実証する。

【０１２５】

実施例６：パン酵母及び麹菌糸体の共固定化

導入。この実験は、細胞ベースの肉製品の製造に使用するためのバイオカプセル／足場の生成を実証する。特に、この実施例は、サッカロミセス・セレビシエ（パン酵母としても知られる）及び糸状菌、アスペルギルス・オリゼ（麹菌としても知られる）の共固定化を実証する。

【０１２６】

方法。簡単に言うと、糸状菌及び酵母の自発的共固定化は、糸状菌のみで利用できる炭素源中で菌類と酵母の両方が成長するときに生じる。その結果、酵母は、強い疎水性相互作用を通じて糸状菌の菌糸と強く結合する。得られるバイオカプセルは、さまざまな形状及びサイズに成長させることができ、最も一般的には１～２センチメートルの大きさになり得る球体に成長させることができる。共固定化の程度を決定するために、共固定化された麹菌／酵母の共生成長を、さまざまなイオン強度及び極性の異なる溶媒中で過剰に撹拌しながら徹底的に洗浄した。アスペルギルス・オリゼのみが利用する炭素源を含む液体培地（アミノ酸を含む０．６７％酵母窒素塩基、０．５％グルコン酸）に、等モル比のアスペルギルス・オリゼ胞子及びサッカロミセス・セレビシエで接種し、３０℃で激しく振盪しながら一晩成長させて糸状菌を発芽させた。翌日、等量の２×リッチグルコース含有培地（２％酵母エキス、４％ペプトン、３２％グルコース）を既存の共培養物に添加し、激しく振盪しながら３０℃で１～２日間インキュベートした。次に、両方の菌類で構成されるバイオカプセルを採取し、ボルテックスしながら総過剰の水で洗浄した。次いで、バイオカプセルを、４０％エタノール、１００ｍＭ　ＮａＣｌ、又は３００ｍＭ　ＮａＣｌとともに、撹拌しながら９０～１２０分間インキュベートした。次に、バイオカプセルを水で徹底的に洗浄し、アスペルギルス菌糸上のサッカロミセス・セレビシエの存在を顕微鏡で検査した。

【０１２７】

結果。この実験の結果により、アスペルギルス・オリゼ（麹菌）及びＳサッカロミセス・セレビシエ（パン酵母）が共固定化された。図１Ａに示すように、徹底的な洗浄後に一部の酵母は糸状菌から解離したが、蛍光顕微鏡で検査した場合、多くは麹菌糸体に吸着／付着したままであった。図１Ｂ及び図１Ｃに示すように、足場は平らなシート（図１Ｂ）から球体（図１Ｃ）まで、さまざまな形状及び密度に成長することができる。

【０１２８】

したがって、これらの結果は、本技術の方法が細胞ベースの肉製品の製造に使用できるバイオカプセルを生成するのに有用であることを実証しており、バイオカプセルは糸状菌と複数の酵母細胞を含む。

【０１２９】

実施例７：遺伝子操作されない酵母を用いた構造化培養肉製品の生成

足場の生成－平らなシートの場合。５ｍＬの液体ＹＰＤ１６（１％酵母エキス、２％ペプトン、１６％グルコース）にパン酵母菌株を接種し、３０℃で振盪しながら１６時間成長させた。アスペルギルス・オリゼ胞子をＢＦＭプレート（０．６７％酵母窒素塩基、０．５％グルコン酸、２％寒天）で２～３日間成長させた。アスペルギルス・オリゼ胞子を、滅菌水を使用してプレートから採取した。滅菌水中の酵母とアスペルギルス・オリゼ胞子の等モル混合物を、セロファンの薄膜を寒天の上に重ねた状態で、ＹＰＤ寒天プレート（（１％酵母エキス、２％ペプトン、２％グルコース、２％寒天）上にプレーティングした。重ねたセロファンの上にぼやけた層が見えるまで、プレートを３０℃で１～２日間インキュベートした。次に、菌糸体ー酵母共生成長構造体をセロファン層から剥がし、５０ｍＬのＹＰＤ１６を含む滅菌フラスコに移し、振盪せずに３０℃で１６～２４時間インキュベートした。次にフラスコをシェーカーに移し、穏やかに振盪しながら３０℃でさらに１６～２４時間成長させた。次いで、菌糸体ー酵母共生成長を過剰の滅菌水で洗浄することによって採取し、４０％エタノールとともに９０分間インキュベートした。次いで、足場をＰＢＳ中に保存した。平らな足場を、滅菌メスを使用して所望の形状に切断した。

【０１３０】

足場の生成－球状の場合。５ｍＬの液体ＹＰＤ１６（１％酵母エキス、２％ペプトン、１６％グルコース）にパン酵母を接種し、３０℃で振盪しながら１６時間成長させた。アスペルギルス・オリゼ胞子をＢＦＭプレート（０．６７％酵母窒素塩基、０．５％グルコン酸、２％寒天）上で２～３日間成長させた。アスペルギルス・オリゼ胞子を、滅菌水を使用してプレートから採取した。５ｍＬのＹＰＤ１６に、滅菌水中の酵母とアスペルギルス・オリゼ胞子の等モル混合物を接種し、３０℃で１６～２４時間激しく振盪しながら成長させた。次いで、過剰の滅菌水で洗浄することによって球状の菌糸体ー酵母共生成長構造体を採取し、４０％エタノールで９０分間インキュベートした。次いで、球状足場をＰＢＳ中に保存した。

【０１３１】

細胞の播種及び成長。平らな足場を直径３５ｍｍの円に切断し、６ウェル組織培養プレートのウェルに移した。足場を３ｍＬの成長培地（ＧＭ：ＤＭＥＭ高グルコース、ピルビン酸不含＋１０％ＦＢＳ＋１％ペニシリン／ストレプトマイシン）で洗浄した。次いで、ＧＭ中４×１０^{5}細胞／ｍＬのウズラ筋芽細胞（ＱＭ７）細胞の懸濁液３ｍＬを組織培養ウェル内の足場に滴下添加した。足場上の細胞は、３７℃、５％CO_2の加湿インキュベーター内でインキュベートした。３ｍＬの新しいＧＭを２～３週間隔日で交換した。細胞を含んだ足場を２日目に殺処分し、蛍光顕微鏡により細胞接着をアッセイした。

【０１３２】

蛍光共焦点顕微鏡。細胞を含んだ足場を新しい３５ｍｍペトリ皿に移した。細胞を１ｍＬの４％パラホルムアルデヒドにて２０分間室温で固定化した。次いで、細胞を含んだ足場をＰＢＳ＋０．２％トリトンＸ－１００中、室温で１５分間インキュベートした。次いで、細胞を含んだ足場を、ＰＢＳ中の５４３－ファロイジン及びＤＡＰＩの一次抗体溶液中で、室温で３０～６０分間インキュベートした。細胞を含んだ足場を室温で１５分間インキュベートしながらＰＢＳ中で２回洗浄した。次いで、染色された細胞を含んだ足場を

顕微鏡スライドに移し、カバーガラスで挟み、次いで、蛍光共焦点顕微鏡によって画像化して、足場への動物細胞の接着を確認した（図２）。

【０１３３】

培養肉製品の組み立て。細胞を含んだ足場を、採取時に滅菌ＰＢＳで徹底的に洗浄した。一部の足場を１％カルミン溶液で簡単に染色して赤色着色剤を付与し、その後ＰＢＳで洗浄して遊離染料を洗い流した。赤色及び白色の細胞を含んだ足場に、カゼイン＋微生物トランスグルタミナーゼ粉末混合物（ＭｏｏＧｌｏｏ　ＲＭ）をまぶした。次に、粉をまぶした足場を互いの上に重ねて三次元形状にした。次いで、塊を３７℃で１６時間インキュベートして、トランスグルタミナーゼが断片を互いに「接着」できるようにした（図３Ａ）。培養肉製品を、アボカド油を入れた鍋で調理した（図３Ｂ）。

【０１３４】

結果。この実験の結果により、図３Ａ及び３Ｂに示すような構造化培養肉製品が生成された。

【０１３５】

したがって、これらの結果は、本技術の方法が、糸状菌及び複数の酵母細胞と、筋芽細胞などの複数の１つ以上の細胞型とを含む食用生体材料足場を含む、細胞ベースの肉製品を生成するのに有用であることを実証する。

【０１３６】

実施例８：細胞質外因性ウシコラーゲンを発現する遺伝子操作された酵母を用いた構造化培養肉製品の生成

細胞質発現プラスミド設計。ウシＣＯＬ１Ａ１遺伝子の４５ｋＤａフラグメントを、ＬＥＵ２栄養要求性選択マーカー、アンピシリン耐性マーカー、及び２ｕｍ起点を含むサッカロミセス・セレビシエ細胞質発現プラスミドにクローン化した。ＣＯＬ１Ａ１の発現はＧＰＤプロモーターから駆動された。得られたプラスミドを図４に示す。

【０１３７】

酵母菌株の生成。サッカロミセス・セレビシエ株ｓ２８８ｃ（ＭＡＴα　ＳＵＣ２　ｇａｌ２　ｍａｌ２　ｍｅｌ　ｆｌｏ１　ｆｌｏ８－１　ｈａｐ１　ｈｏ　ｂｉｏ１　ｂｉｏ６）（Ｍｏｒｔｉｍｅｒ　ＲＫ，Ｊｏｈｎｓｔｏｎ　ＪＲ．Ｇｅｎｅａｌｏｇｙ　ｏｆ　ｐｒｉｎｃｉｐａｌ　ｓｔｒａｉｎｓ　ｏｆ　ｔｈｅ　ｙｅａｓｔ　ｇｅｎｅｔｉｃ　ｓｔｏｃｋ　ｃｅｎｔｅｒ．Ｇｅｎｅｔｉｃｓ．１９８６　Ｍａｙ；１１３（１）：３５－４３．ｄｏｉ：１０．１０９３／ｇｅｎｅｔｉｃｓ／１１３．１．３５．ＰＭＩＤ：３５１９３６３；ＰＭＣＩＤ：ＰＭＣ１２０２７９８．）を、液体ＹＰＤ培地（１％酵母エキス、２％ペプトン、２％グルコース）でＯＤ６００が０．４～０．８になるまで成長させた。酢酸リチウム形質転換法を用いて、酵母を細胞質発現プラスミド（図４）で形質転換し（Ｇｉｅｔｚ　ＲＤ，　Ｓｃｈｉｅｓｔｌ　ＲＨ．Ｈｉｇｈ－ｅｆｆｉｃｉｅｎｃｙ　ｙｅａｓｔ　ｔｒａｎｓｆｏｒｍａｔｉｏｎ　ｕｓｉｎｇ　ｔｈｅ　ＬｉＡｃ／ＳＳ　ｃａｒｒｉｅｒ　ＤＮＡ／ＰＥＧ　ｍｅｔｈｏｄ．Ｎａｔ　Ｐｒｏｔｏｃ．２００７、２（１）：３１－４．ｄｏｉ：１０．１０３８／ｎｐｒｏｔ．２００７．１３．ＰＭＩＤ：１７４０１３３４．）、合成完全ロイシンドロップアウト（ＳＣ－ＬＥＵ）寒天プレート（アミノ酸を含まない０．６７％酵母窒素塩基、２％グルコース、ロイシンを含まない合成ドロップアウト培地サプリメント、２％寒天）にプレーティングした。栄養要求性形質転換体を採取し、新しいＳＣ－ＬＥＵプレートに再画線した。栄養要求性株は、すべての下流用途のために選択培地内／上で維持された。

【０１３８】

足場の生成－平らなシートの場合。５ｍＬの液体ＳＣ－ＬＥＵ（アミノ酸を含まない０．６７酵母窒素塩基、２％グルコース、ロイシンを含まない合成ドロップアウト培地サプリメント）に上記の形質転換酵母菌株を接種し、３０℃で振盪しながら１６時間成長させた。アスペルギルス・オリゼ胞子をＢＦＭプレート（０．６７％酵母窒素塩基、０．５％グルコン酸、２％寒天）上で２～３日間成長させた。アスペルギルス・オリゼ胞子を、滅菌水を使用してプレートから採取した。滅菌水中の酵母とアスペルギルス・オリゼ胞子の

等モル混合物を、寒天の上にセロファンの薄膜を重ねたＳＣ－ＬＥＵ寒天プレート上にプレーティングした。重ねられたセロファンの上に微細なぼやけた層が見えるまで、プレートを３０℃で１～２日間インキュベートした。次に、菌糸体ー酵母共生成長構造体をセロファン層から剥がし、５０ｍＬのＳＣ－ＬＥＵを含む滅菌フラスコに移し、振盪せずに３０℃で１６～２４時間インキュベートした。次にフラスコをシェーカーに移し、穏やかに振盪しながら３０℃でさらに１６～２４時間成長させた。次いで、菌糸体ー酵母共生成長を過剰の滅菌水で洗浄することによって採取し、４０％エタノールとともに９０分間インキュベートした。次いで、足場をＰＢＳ中に保存した。平らな足場を、滅菌メスを使用して所望の形状に切断した。

【０１３９】

足場の生成－球状の場合。５ｍＬの液体ＳＣ－ＬＥＵ（アミノ酸を含まない０．６７酵母窒素塩基、２％グルコース、ロイシンを含まない合成ドロップアウト培地サプリメント）に上記の形質転換酵母菌株を接種し、３０℃で振盪しながら１６時間成長させた。アスペルギルス・オリゼ胞子をＢＦＭプレート（０．６７％酵母窒素塩基、０．５％グルコン酸、２％寒天）上で２～３日間成長させた。アスペルギルス・オリゼ胞子を、滅菌水を使用してプレートから採取した。５ｍＬのＳＤ－ＬＥＵに、滅菌水中の酵母とアスペルギルス・オリゼ胞子の等モル混合物を接種し、３０℃で１６～２４時間激しく振盪しながら成長させた。次いで、過剰の滅菌水で洗浄することによって球状の菌糸体ー酵母共生成長構造体を採取し、４０％エタノールとともに９０分間インキュベートした。次いで、球状足場をＰＢＳ中に保存した。

【０１４０】

細胞の播種及び成長。平らな足場を直径３５ｍｍの円に切断し、６ウェル組織培養プレートのウェルに移した。足場を３ｍＬの成長培地（ＧＭ：ＤＭＥＭ高グルコース、ピルビン酸不含＋１０％ＦＢＳ＋１％ペニシリン／ストレプトマイシン）で洗浄した。次に、ＧＭ中の４×１０＾５細胞／ｍＬのＱＭ７細胞の懸濁液３ｍＬを組織培養ウェル内の足場に滴下添加した。足場上の細胞を、５％CO_2を含む３７℃の加湿インキュベーター内でインキュベートした。３ｍＬの新しいＧＭを２～３週間隔日で交換した。細胞を含んだ足場を２日目に殺処分し、蛍光顕微鏡により細胞接着をアッセイした。

【０１４１】

蛍光共焦点顕微鏡。細胞を含んだ足場を新しい３５ｍｍペトリ皿に移した。細胞を１ｍＬの４％パラホルムアルデヒドにて２０分間室温で固定化した。次いで、細胞を含んだ足場をＰＢＳ＋０．２％トリトンＸ－１００中、室温で１５分間インキュベートした。次いで、細胞を含んだ足場を、ＰＢＳ中の５４３－ファロイジン及びＤＡＰＩの一次抗体溶液中で、室温で３０～６０分間インキュベートした。細胞を含んだ足場を室温で１５分間インキュベートしながらＰＢＳ中で２回洗浄した。次に、染色された細胞を含んだ足場を顕微鏡スライドに移し、カバーガラスで挟み、蛍光共焦点顕微鏡で画像化して、動物細胞が足場に接着していることを確認した。図５Ａ～５Ｃに示すように、得られた足場は、アクチンネットワーク（図５Ａ）及び核を有する細胞（図５Ｂ）で覆われており、統合した図（図５Ｃ）は、無傷の細胞を含む足場を示している。

【０１４２】

培養肉製品の組み立て。ＱＭ７細胞を含んだ足場は、採取時に滅菌ＰＢＳで徹底的に洗浄した。細胞を含んだ足場に、カゼイン＋微生物トランスグルタミナーゼ粉末混合物（ＭｏｏＧｌｏｏ　ＲＭ）をまぶした。次に、粉をまぶした足場を互いの上に重ねて三次元形状にした。次いで、塊を３７℃で１６時間インキュベートして、トランスグルタミナーゼを、断片を互いに「接着」させた（図６Ａ、上面図、図６Ｂ、側面図）。培養ウズラ肉製品を、アボカド油を入れた鍋で調理した（図６Ｃ）。

【０１４３】

結果：図６Ａ～６Ｃに示すように、この実験の結果により、図３Ａ～３Ｂの肉製品と比較して構造の均一性が向上した培養肉製品の生成に成功した。

【０１４４】

したがって、これらの結果は、本技術の方法が、糸状菌、細胞内位置を標的とするコラーゲンなどの外因性タンパク質を発現する複数の操作された酵母細胞、及び筋芽細胞などの複数の１つ以上の細胞型を含む食用生体材料足場を含む、細胞ベースの肉製品を生成するのに有用であることを実証する。

【０１４５】

実施例９：分泌された外因性ウシコラーゲンを発現する遺伝子操作された酵母を用いた構造化培養肉製品の生成

分泌及び組み込み発現プラスミドの設計。ウシＣＯＬ１Ａ１遺伝子の４５ｋＤａフラグメントを、ＵＲＡ３栄養要求性選択マーカー、カナマイシン耐性マーカー、サッカロミセス・セレビシエ増殖用の２ｕｍエレメント、及び大腸菌増殖用のＣｏｌＥ１起点を含むサッカロミセス・セレビシエ分泌発現プラスミドにクローニングした。３’トロンビン切断部位を持つ接合因子α（ＭＦａ）リーダー配列を、ウシＣＯＬ１Ａ１遺伝子の４５ｋＤａフラグメントの５’末端に融合し、３×　ｓｔｏｐを付加した。ＭＦａ－ＣＯＬ１Ａ１^{45}$_{kDa}$融合体の発現は、ＴＥＦ１プロモーターから駆動された。得られた分泌発現プラスミドを図７に示す。ウシＰ４ＨＡ１遺伝子を、二重ＬＥＵ２及びＨＩＳ３栄養要求性選択マーカー、カナマイシン耐性マーカー、及び大腸菌増殖用の複製のＣｏｌＥ１起点を含むサッカロミセス・セレビシエ組み込みプラスミドにクローニングした。Ｐ４ＨＡ１遺伝子は、小胞体を標的とするために、Ｋａｒ２リーダー配列の３’末端とＨＤＥＬ３’末端ペプチド配列に融合された。得られたＰ４ＨＡ１－組み込みプラスミドを図８に示す。ウシＰ４ＨＢ遺伝子を、二重ＵＲＡ３及びＨＩＳ３栄養要求性選択マーカー、カナマイシン耐性マーカー、及び大腸菌増殖用の複製のＣｏｌＥ１起点を含むサッカロミセス・セレビシエ組み込みプラスミドにクローニングした。Ｐ４ＨＢ遺伝子は、小胞体を標的とするために、Ｋａｒ２リーダー配列の３’末端とＨＤＥＬ３’末端ペプチド配列に融合された。得られたＰ４ＨＢ組み込みプラスミドを図９に示す。

【０１４６】

酵母菌株の生成。連続形質転換手順を実行して、ゲノムに組み込まれたＰ４ＨＡ１及びＰ４ＨＢを含む三重形質転換体、及び栄養要求性選択下で維持されたＭＦａ－ＣＯＬ１Ａ１プラスミドを生成した。サッカロミセス・セレビシエ株ｓ２８８ｃ（ＭＡＴα　ＳＵＣ２　ｇａｌ２　ｍａｌ２　ｍｅｌ　ｆｌｏ１　ｆｌｏ８－１　ｈａｐ１　ｈｏ　ｂｉｏ１　ｂｉｏ６）（Ｍｏｒｔｉｍｅｒ　ＲＫ，Ｊｏｈｎｓｔｏｎ　ＪＲ．Ｇｅｎｅａｌｏｇｙ　ｏｆ　ｐｒｉｎｃｉｐａｌ　ｓｔｒａｉｎｓ　ｏｆ　ｔｈｅ　ｙｅａｓｔ　ｇｅｎｅｔｉｃ　ｓｔｏｃｋ　ｃｅｎｔｅｒ．Ｇｅｎｅｔｉｃｓ．１９８６　Ｍａｙ；１１３（１）：３５－４３．ｄｏｉ：１０．１０９３／ｇｅｎｅｔｉｃｓ／１１３．１．３５．ＰＭＩＤ：３５１９３６３；ＰＭＣＩＤ：ＰＭＣ１２０２７９８．）を、液体ＹＰＤ培地（１％酵母エキス、２％ペプトン、２％グルコース）でＯＤ６００が０．４～０．８になるまで成長させた。次に、酢酸リチウム形質転換法を用いて、酵母をＫａｒ２－Ｐ４ＨＢ－ＨＤＥＬを含むＰ４ＨＢ組み込みプラスミドで形質転換し（Ｇｉｅｔｚ　ＲＤ，Ｓｃｈｉｅｓｔｌ　ＲＨ．Ｈｉｇｈ－ｅｆｆｉｃｉｅｎｃｙ　ｙｅａｓｔ　ｔｒａｎｓｆｏｒｍａｔｉｏｎ　ｕｓｉｎｇ　ｔｈｅ　ＬｉＡｃ／ＳＳ　ｃａｒｒｉｅｒ　ＤＮＡ／ＰＥＧ　ｍｅｔｈｏｄ．Ｎａｔ　Ｐｒｏｔｏｃ．２００７、２（１）：３１－４．ｄｏｉ：１０．１０３８／ｎｐｒｏｔ．２００７．１３．ＰＭＩＤ：１７４０１３３４．）、合成完全ウラシルドロップアウト（ＳＣ－ＵＲＡ）寒天プレート（アミノ酸を含まない０．６７％酵母窒素塩基、２％グルコース、ロイシンを含まない合成ドロップアウト培地サプリメント、２％寒天）にプレーティングした。ウラシル栄養要求性形質転換体を採取し、新しいＳＣ－ＵＲＡプレート上に再画線し、次いで非選択リッチ培地ＹＰＤ寒天（１％酵母エキス、２％ペプトン、２％グルコース、２％寒天）上に再度再画線した。次いで、単一の形質転換体を液体ＹＰＤ中で一晩成長させ、酢酸リチウム法を用いてＰ４ＨＡ１組み込みプラスミドで形質転換し、ＳＣ－ＬＥＵプレート上にプレーティングした。形質転換体をＳＣ－ＬＥＵプレート上に画線し、次にＹＰＤプレート上に再画線した。次いで、Ｐ４ＨＡ１及びＰ４ＨＢ二重形質転換体をＹＰＤ中で成長させ、酢酸リチウム形質転換法を用いて、ＭＦａ－Ｃ

ＯＬ１Ａ１分泌プラスミドで形質転換し、ＳＣ－ＨＩＳプレートにプレーティングした。形質転換体を採取し、ＳＣ－ＨＩＳプレート上に画線した。最終的な栄養要求性株は、すべての下流用途のための選択ドロップアウトＨＩＳ培地内で維持された。

【０１４７】

分泌されたＣＯＬ１Ａ１で足場を作製する。５ｍＬの液体ＳＣ－ＨＩＳ（アミノ酸を含まない０．６７酵母窒素塩基、２％グルコース、ヒスチジンを含まない合成ドロップアウト培地サプリメント）に三重形質転換酵母菌株を接種し、３０℃で振盪しながら１６時間成長させた。アスペルギルス・オリゼ胞子をＢＦＭプレート（０．６７％酵母窒素塩基、０．５％グルコン酸、２％寒天）で２～３日間成長させた。アスペルギルス・オリゼ胞子を、滅菌水を使用してプレートから採取した。滅菌水中の酵母とアスペルギルス・オリゼ胞子の等モル混合物を、寒天の上にセロファンの薄膜を重ねたＳＣ－ＨＩＳ寒天プレート上にプレーティングした。重ねられたセロファンの上に微細なぼやけた層が見えるまで、プレートを３０℃で１～２日間インキュベートした。次に、菌糸体ー酵母共生成長構造体をセロファン層から剥がし、５０ｍＬのＳＣ－ＨＩＳを含む滅菌フラスコに移し、振盪せずに３０℃で１６～２４時間インキュベートした。次にフラスコをシェーカーに移し、穏やかに振盪しながら３０℃でさらに１６～２４時間成長させた。次いで、菌糸体ー酵母共生成長を過剰の滅菌水で洗浄することによって採取し、４０％エタノールとともに９０分間インキュベートした。次いで、足場をＰＢＳ中に保存した。平らな足場を、滅菌メスを使用して所望の形状に切断した（データは示さず）。

【０１４８】

したがって、これらの結果は、本技術の方法が、糸状菌及び複数の遺伝子操作された酵母細胞を含む食用生体材料足場を生成するのに有用であることを実証する。

【０１４９】

実施例１０：分泌型コラーゲン足場を使用した培養肉製品の組み立て

細胞の播種及び成長。実施例９で生成した平らな足場を直径３５ｍｍの円に切断し、６ウェル組織培養プレートのウェルに移す。足場を３ｍＬの成長培地（ＧＭ：ＤＭＥＭ高グルコース、ピルビン酸不含＋１０％ＦＢＳ＋１％ペニシリン／ストレプトマイシン）で洗浄する。ＧＭ中の４×１０＾５細胞／ｍＬのＱＭ７細胞の懸濁液３ｍＬを組織培養ウェル内の足場に滴下添加する。足場上の細胞を、５％CO_2を含む３７℃の加湿インキュベーター内でインキュベートする。３ｍＬの新しいＧＭを２～３週間隔日で交換する。

【０１５０】

培養肉製品の組み立て。ＱＭ７細胞を含んだ足場を、採取時に滅菌ＰＢＳで徹底的に洗浄する。細胞を含んだ足場に、カゼイン＋微生物トランスグルタミナーゼ粉末混合物（ＭｏｏＧｌｏｏ　ＲＭ）をまぶした。粉をまぶした足場を互いに重ねて三次元形状にする。次いで、塊を３７℃で１６時間インキュベートして、トランスグルタミナーゼが断片を互いに「接着」できるようにする。培養ウズラ肉製品を、アボカド油を入れた鍋で調理する。

【０１５１】

結果：これらの実験の結果により、培養肉製品の生成に成功することが期待される。

【０１５２】

したがって、これらの結果は、本技術の方法が、糸状菌、コラーゲンなどの分泌された外因性タンパク質、、筋芽細胞などの複数の１つ以上の細胞型、を含む食用生体材料足場を含む、細胞ベースの肉製品を生成するのに有用であることを実証する。

【０１５３】

均等物

本技術は、本出願に記載される特定の実施形態に関して限定されるものではなく、これは本技術の個々の態様の単一の例示として意図される。当業者に明白であろうように、本技術の多くの改変及び変形を、その趣旨及び範囲から逸脱することなく行うことができる。本明細書に列挙されるものに加えて、本技術の範囲内の機能的に等価な方法及び装置が、前述の説明から当業者には明らかであろう。かかる改変及び変形は、添付の特許請求の

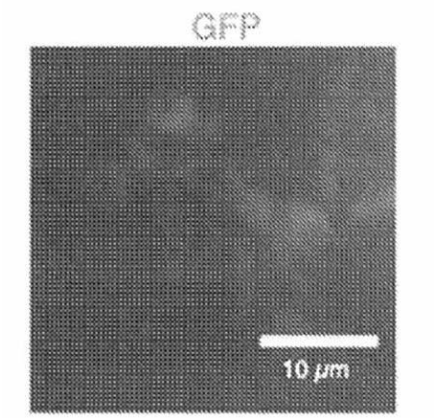
範囲内に入ることが意図される。本技術は、そのような特許請求の範囲が権利を有する均等物の全範囲とともに、添付の特許請求の範囲の条件によってのみ制限されるべきである。本技術は、特定の方法、試薬、化合物組成物、又は生物学的システムに限定されず、これは、もちろん、変動し得ることが理解されるべきである。本明細書で使用される用語は、特定の実施形態を説明することのみを目的とし、限定することが意図されないことも理解されるべきである。

【０１５４】

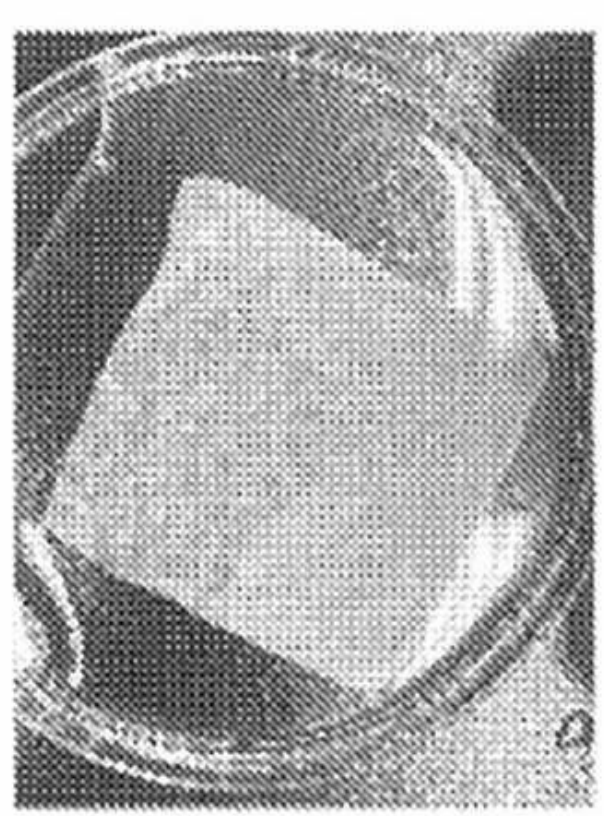
上記明細書で言及されたそれぞれの出版物及び特許は、あらゆる目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。本技術の記載される方法及びシステムの様々な改変及び変形が、本技術の範囲及び趣旨から逸脱することなく、当業者には明らかであろう。本技術は特定の実施形態に関連して説明されてきたが、特許請求される本技術は、そのような特定の実施形態に過度に限定されるべきではない。実際に、本技術を実施するために記載された様式の様々な改変は、当該技術分野及びそれに関連する分野における当業者には明らかであり、以下の特許請求の範囲内であることが意図される。

【図面】

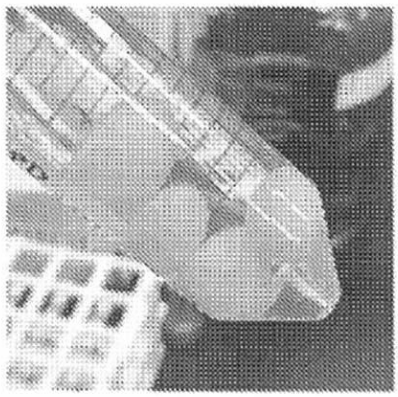
【図１Ａ】



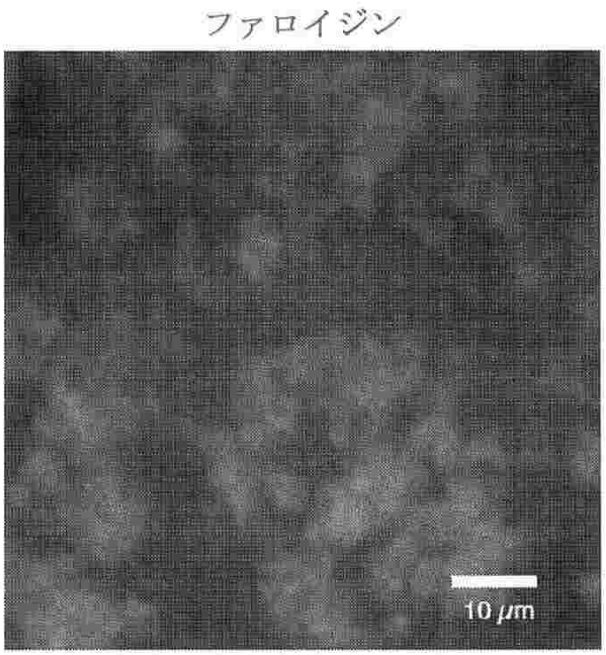
【図１Ｂ】



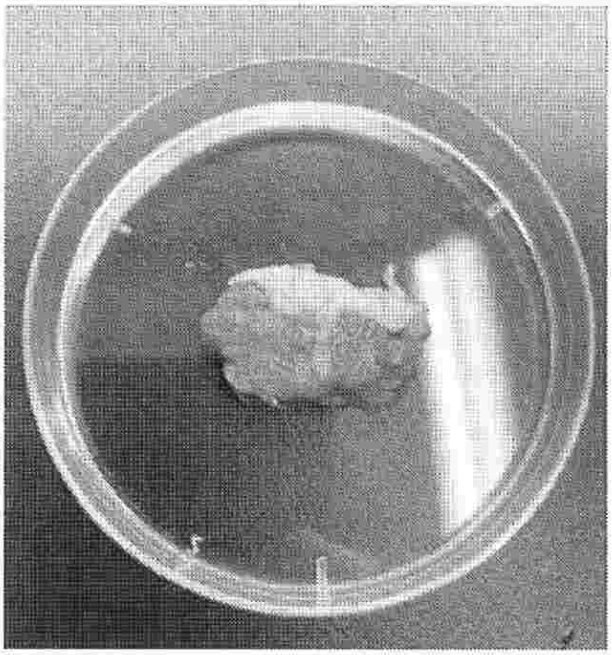
【図１Ｃ】



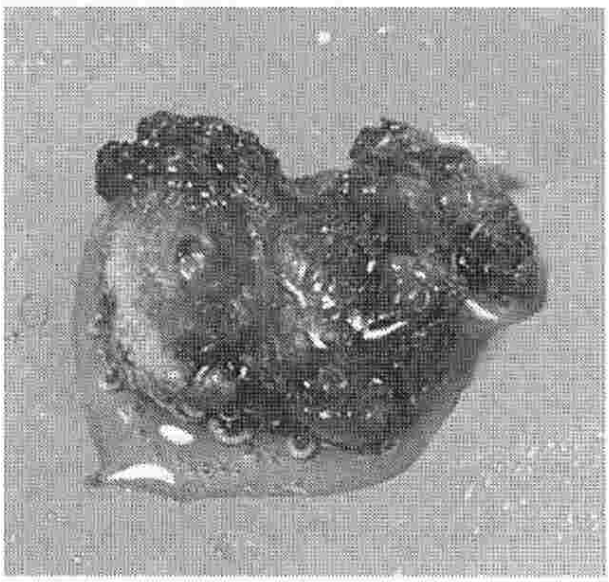
【図２】



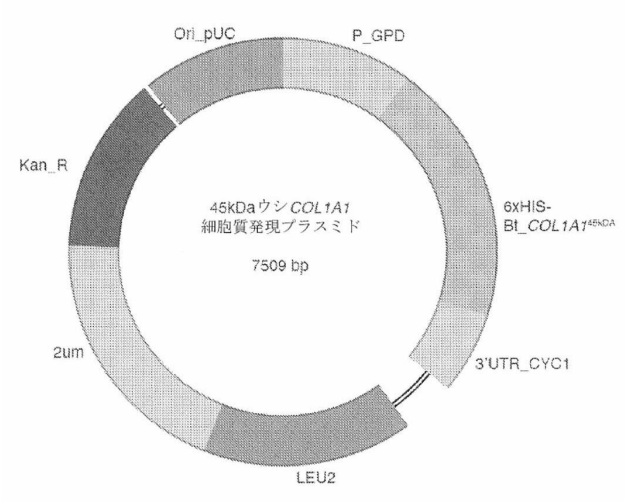
【図３Ａ】



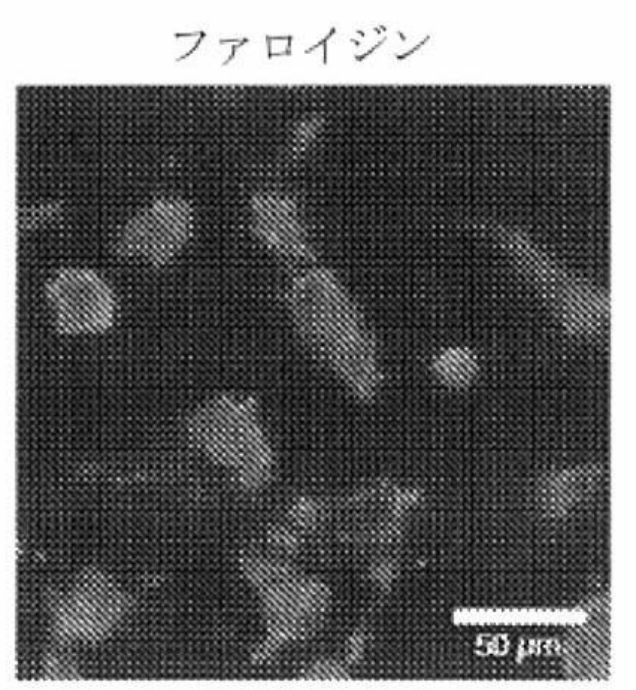
【図３Ｂ】



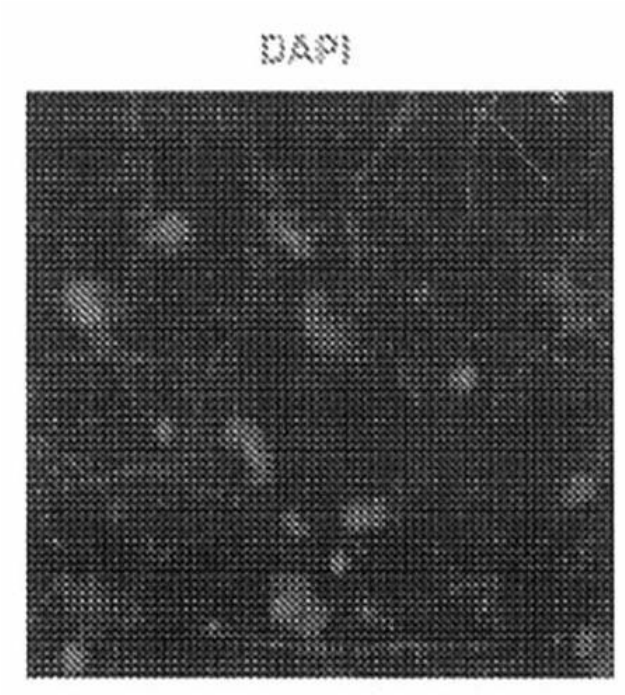
【図４】



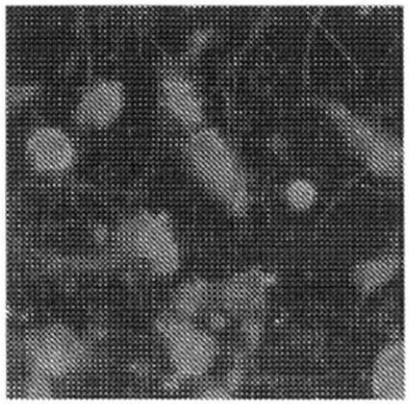
【図５Ａ】



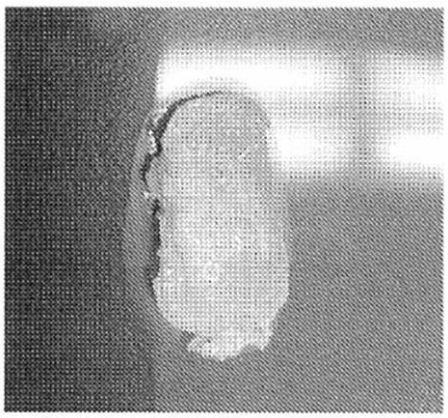
【図５Ｂ】



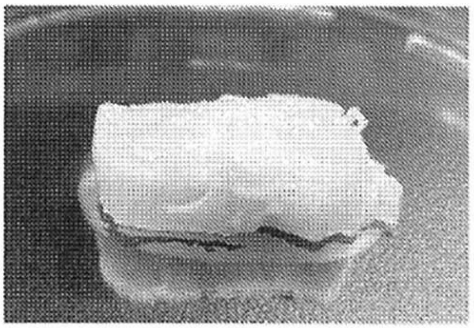
【図５Ｃ】



【図６Ａ】



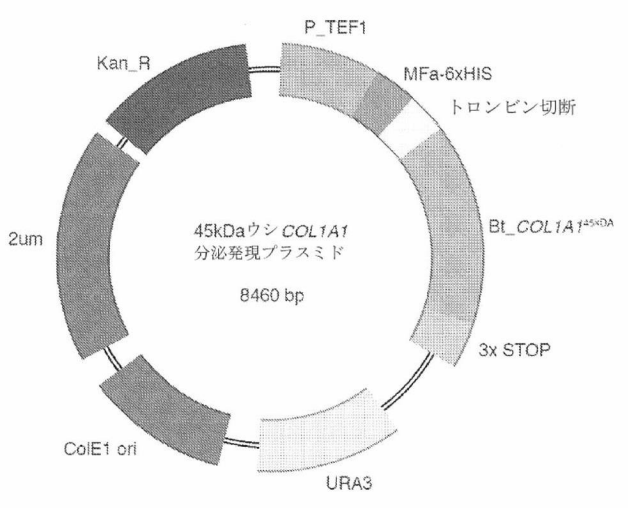
【図６Ｂ】



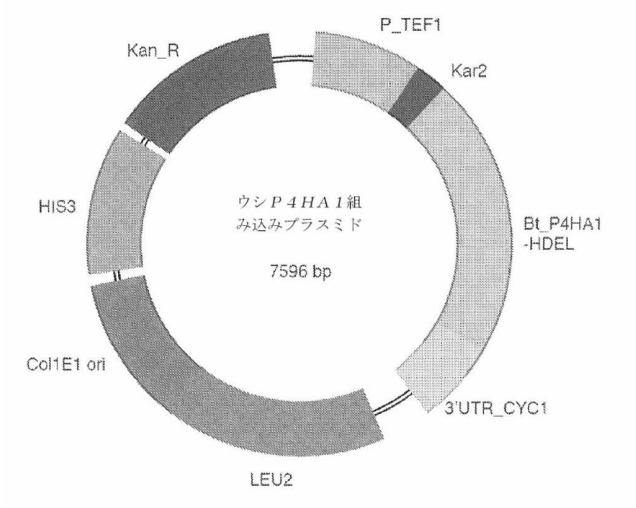
【図６Ｃ】



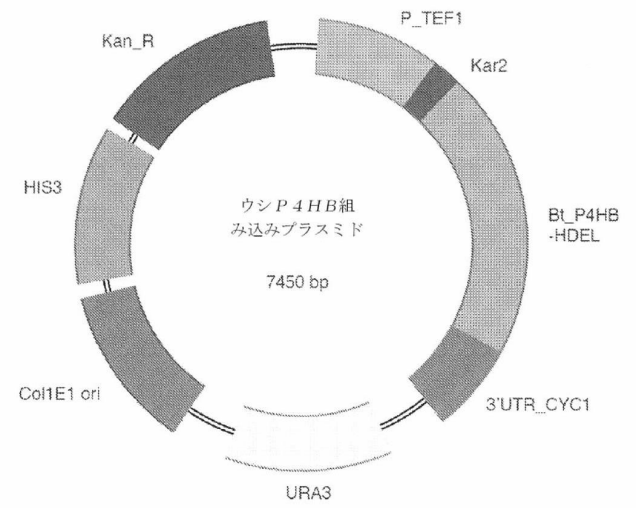
【図７】



【図８】


P_TEF1
Kan_R
Kar2
HIS3
ウシP4HA1組
み込みプラスミド
7596 bp
Bt_P4HA1
-HDEL
Col1E1 ori
3'UTR_CYC1
LEU2

【図９】


P_TEF1
Kan_R
Kar2
HIS3
ウシP4HB組
み込みプラスミド
7450 bp
Bt_P4HB
-HDEL
Col1E1 ori
3'UTR_CYC1
URA3

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2023/011442

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - INV. - A23L 31/10; A23J 3/04; A23J 3/22; A23L 13/00 (2023.01)
ADD. - C12N 1/19; C12N 5/16 (2023.01)

CPC - INV. - A23L 31/10; A23J 3/04; A23L 13/00 (2023.05)
ADD. - C12N 5/0062; C12N 1/16; C12N 2513/00; C12N 2533/90; C12N 5/0602 (2023.05)

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)
See Search History document

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

Electronic database consulted during the international search (name of database and, where practicable, search terms used)
See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2020/0157506 A1 (ECOVATIVE DESIGN LLC) 21 May 2020 (21.05.2020) entire document	1, 2, 17, 18
Y		3, 4, 12-15, 19, 24, 32-35
Y	WO 2020/160187 A2 (BOND PET FOODS INC.) 06 August 2020 (06.08.2020) entire document	3, 4, 12-15, 19, 24, 32-35
A	PEINADO et al. "Yeast biocapsules: A new immobilization method and their applications," Enzyme and Microbial Technology, 2006, Vol. 40, Pgs. 79-84. entire document	1-4, 12-15, 17-19, 24, 32-35
A	WO 2004/029240 A1 (UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA) 08 April 2004 (08.04.2004) entire document	1-4, 12-15, 17-19, 24, 32-35
P, X	WO 2022/240910 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 17 November 2022 (17.11.2022) entire document	1-4, 12-15, 17-19, 24, 32-35

☐ 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
"D" document cited by the applicant in the international application
"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	Date of mailing of the international search report
09 May 2023	JUN 29 2023
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Taina Matos Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2023/011442

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 5-11, 16, 20-23, 25-31, 36, 44-47, 53-59
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
See extra sheet(s).

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-4, 12-15, 17-19, 24, 32-35

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2023/011442

Continued from Box No. III Observations where unity of invention is lacking

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees need to be paid.

Group I: claims 1-4, 12-15, 17-19, 24, and 32-35 are drawn to cell-based meat products and biocapsules comprising the same.

Group II: claims 37-43, 48-52, and 60-63 are drawn methods for producing a filamentous fungus-yeast biocapsule.

The inventions listed in Groups I and II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1, because under PCT Rule 13.2 they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The special technical features of Group I, a cell-based meat product, are not present in Group II; and the special technical features of Group II, culturing the preparation under conditions to induce spontaneous co-immobilization of the filamentous fungus and yeast to form a filamentous fungus-yeast biocapsule, are not present in Group I.

Additionally, even if Groups I and II were considered to share the technical features of a biocapsule wherein the biocapsule comprisee a biomaterial scaffold comprising: (i) a filamentous fungus, and (ii) a plurality of yeast cells. However, these shared technical features do not represent a contribution over the prior art.

Specifically, US 2020/0157506 to Ecovative Design LLC discloses a biocapsule (mycelium scaffolds for implementation in perfusion bioreactor systems for cell-based meat technologies, Para. [0011]; the described invention to produce biocompatible and biodegradable mycelium scaffolds with unique plasticity of manufacture, allowing for porosity and structure to be uniquely tunable for biomedical applications, Para. [0013]; non-filamentous cells and encapsulated within the filamentous scaffold, Para. [0214]) wherein the biocapsule comprises a biomaterial scaffold comprising: (i) a filamentous fungus, and (ii) a plurality of yeast cells (the non-filamentous organism is a ...yeast, Para. [0071]; co-cultured with yeast cells, Para. [0207]; non-filamentous cells and encapsulated within the filamentous scaffold, Para. [0214]; prepared that is appropriate for cultivation of both the filamentous and non-filamentous organisms, Para. [0050]; the filamentous organism is a saprobic fungus of the phylum Basidiomycota, Ascomycota, Zygomycota, Para. [0062]).

The inventions listed in Groups I and II therefore lack unity under Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical features.

フロントページの続き

(51)国際特許分類			FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*15/31*	*(2006.01)*	Ａ２３Ｌ	13/00	Ｚ	
Ｃ１２Ｎ	*15/12*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/31		
			Ｃ１２Ｎ	15/12		

,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(74)代理人　100156982
弁理士　秋澤 慈
(72)発明者　ルー ミッシェル セイコ
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ９４７０２ バークリー サン パブロ アヴェニュー ２９８８
(72)発明者　マーシャル マリア ニエヴェス マルティネス
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ９４７０２ バークリー サン パブロ アヴェニュー ２９８８

Ｆターム（参考）　4B042　AC10 AD36 AK16 AP30
4B065　AA57X AA63X AA80X AA90X AA90Y AA91X AB01 AC14 BA01 BB06 BB12 BB15 BB19 BB25 BB29 BB31 BB37 BC03 BC07 BC11 BC26 BC32 BC41 BD06 BD14 BD44 CA24 CA41