

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-529902

(P2013-529902A)

(43) 公表日 平成25年7月25日(2013.7.25)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/12 (2006.01)	C 1 2 N 1/12 Z N A A	2 B O 2 2
C 1 2 N 1/13 (2006.01)	C 1 2 N 1/13	2 B O 3 0
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 O 1	4 B O 2 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 H O 4 5

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 29 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-511653 (P2013-511653)
 (86) (22) 出願日 平成23年5月24日 (2011. 5. 24)
 (85) 翻訳文提出日 平成25年1月9日 (2013. 1. 9)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2011/058464
 (87) 国際公開番号 W02011/147826
 (87) 国際公開日 平成23年12月1日 (2011. 12. 1)
 (31) 優先権主張番号 10382143.5
 (32) 優先日 平成22年5月25日 (2010. 5. 25)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 512305785
 バイオマス プースター, エス. エル.
 スペイン国, E-26144 ギャリレア
 -ラ リオジャ, 10, エンリケ マロ
 (74) 代理人 100090343
 弁理士 濱田 百合子
 (74) 代理人 100105647
 弁理士 小栗 昌平
 (74) 代理人 100105474
 弁理士 本多 弘徳
 (74) 代理人 100108589
 弁理士 市川 利光

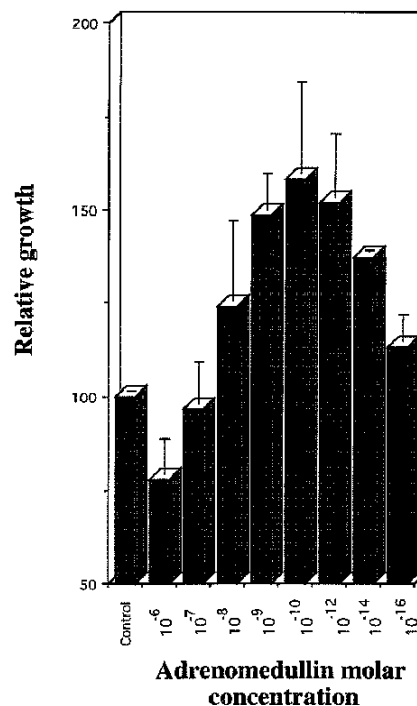
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 植物バイオマスの増量方法

(57) 【要約】

本発明は2個のシステイン間のジスルフィド結合により形成される6員環を含むペプチドの、光合成生物バイオマスの増量における使用であって、木材産業、再生可能源由来のエネルギーの取得、および農業に適用される。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

光合成生物のバイオマスの増量方法であって、以下を含むペプチドの存在下に当該光合成生物を培養することを特徴とする方法：

(i) アミノ酸配列：

C y s - X a a ₁ - X a a ₂ - X a a ₃ - X a a ₄ - C y s [配列番号：1]

(X a a ₁、X a a ₂、X a a ₃ および X a a ₄ は独立してアミノ酸を表す) および

(ii) (i) において示されるアミノ酸配列のシステイン残基がそれらの間でジスルフィド架橋を形成する。

【請求項 2】

10

前記ペプチドが、アミノ酸配列：

X ₁ - C y s - X a a ₁ - X a a ₂ - X a a ₃ - X a a ₄ - C y s - X ₂

(X ₁ は、該ペプチドのアミノ末端側のアミノ酸配列を表わし；また

X ₂ は、該ペプチドのカルボキシル末端側のアミノ酸配列を表わす)

を含む請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

前記 X ₂ のアミノ酸配列が、配列 G R R R R (配列番号：7) を含む請求項 2 記載の方法。

【請求項 4】

アミノ酸配列 G R R R R (配列番号：7) が、配列 C y s - X a a ₁ - X a a ₂ - X a a ₃ - X a a ₄ - C y s の最末端 C y s から 10 個ないし 50 個のアミノ酸を隔てた位置にある請求項 3 記載の方法。

20

【請求項 5】

X ₂ の C - 末端がアミド化されている請求項 1 記載の方法。

【請求項 6】

X ₁ が 1 個ないし 250 個のアミノ酸からなる長さを有し、および/または X ₂ が 1 個ないし 250 個のアミノ酸からなる長さを有する請求項 2 ないし 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

前記ペプチドがアドレノメジュリンである請求項 1 記載の方法。

30

【請求項 8】

前記ペプチドが、アミノ酸配列の配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10 および配列番号：11 で示されるペプチド、およびその組合せからなる群より選択されるものである請求項 1 記載の方法。

【請求項 9】

前記光合成生物が植物または藻類である請求項 1 ないし 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

前記光合成生物が植物であり、当該ペプチドが水耕栽培システムにおいて当該植物に供すべき栄養溶液を補強するための添加剤として投与されるか、または当該植物の灌水に投与されるものである請求項 1 ないし 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 11】

前記植物が、再生可能エネルギーの生産に使用する植物、ヒトもしくは動物の栄養のための植物、木材種、および観賞用植物から選択されるものである請求項 9 に記載の方法。

【請求項 12】

遺伝子構築物であって、以下の (a) および (b) を含む遺伝子構築物：

(a) 下記 (i) および (ii) を含むペプチドをエンコードする核酸：

(i) アミノ酸配列：

C y s - X a a ₁ - X a a ₂ - X a a ₃ - X a a ₄ - C y s [配列番号：1]

50

(X a a ₁、X a a ₂、X a a ₃ および X a a ₄ は独立してアミノ酸を表す) および
 (ii) (i) で示されるアミノ酸配列のシステイン残基がそれらの間でジスルフィド架橋を形成する ; および

(b) 光合成生物においてその発現を制御する制御要素 ;

ただし、当該核酸配列 (a) が配列番号 : 4、配列番号 : 5 および配列番号 : 6 で示されるアミノ酸配列のタンパク質からなる群より選択されるタンパク質をエンコードする場合には、当該核酸配列 (a) は植物中のその発現を調節する制御要素の制御下にあるが、その制御要素はアラビドプシス (Arabidopsis sp.) 中で当該タンパク質の発現を天然で調節する制御要素とは異なる ;

ただし、当該核酸配列 (a) が配列番号 : 8、配列番号 : 9 および配列番号 : 10 で示されるアミノ酸配列のタンパク質からなる群より選択されるタンパク質をエンコードする場合には、当該核酸配列 (a) は植物中のその発現を調節する制御要素の制御下にあるが、その制御要素はイネ (Oryza sativa sp.) 中で当該タンパク質の発現を天然で調節する制御要素とは異なる ;

ただし、当該核酸配列 (a) が配列番号 : 11 で示されるアミノ酸配列のタンパク質をエンコードする場合には、当該核酸配列 (a) は藻類中のその発現を調節する制御要素の制御下にあるが、その制御要素はタラシオシラ・シュードナナ (Thalassiosira pseudonana ; 珪藻) 中で当該タンパク質の発現を天然で調節する制御要素とは異なる。

【請求項 13】

前記ペプチドが、アミノ酸配列 :

X₁ - Cys - X a a₁ - X a a₂ - X a a₃ - X a a₄ - Cys - X₂

(X₁ は、該ペプチドのアミノ末端側のアミノ酸配列を表わし ; また

X₂ は、該ペプチドのカルボキシル末端側のアミノ酸配列を表わす)

を含む請求項 12 記載の遺伝子構築物。

【請求項 14】

前記 X₂ のアミノ酸配列が、配列 G R R R R (配列番号 : 7) を含む請求項 13 記載の遺伝子構築物。

【請求項 15】

アミノ酸配列 G R R R R (配列番号 : 7) が、配列 Cys - X a a₁ - X a a₂ - X a a₃ - X a a₄ - Cys の最末端 Cys から 10 個ないし 50 個のアミノ酸を隔てた位置にある請求項 12 記載の遺伝子構築物。

【請求項 16】

前記ペプチドがアドレノメジュリンである請求項 12 記載の遺伝子構築物。

【請求項 17】

当該ペプチドが、アミノ酸配列の配列番号 : 2、配列番号 : 3、配列番号 : 4、配列番号 : 5、配列番号 : 6、配列番号 : 8、配列番号 : 9、配列番号 : 10 および配列番号 : 11 で示されるペプチドからなる群より選択されるものである請求項 12 記載の遺伝子構築物。

【請求項 18】

請求項 12 ないし 17 のいずれか 1 項に記載の遺伝子構築物を含むベクター。

【請求項 19】

宿主細胞であって、アミノ酸配列 : Cys - X a a₁ - X a a₂ - X a a₃ - X a a₄ - Cys [配列番号 : 1] (X a a₁、X a a₂、X a a₃ および X a a₄ は独立してアミノ酸を表わし、該アミノ酸配列のシステイン残基はそれらの間でジスルフィド架橋を形成する) を含むペプチドをエンコードする核酸、または請求項 13 ないし 17 のいずれか 1 項に記載の遺伝子構築物または請求項 18 記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 20】

トランスジェニック光合成生物細胞であって、アミノ酸配列 : Cys - X a a₁ - X a a₂ - X a a₃ - X a a₄ - Cys [配列番号 : 1] (X a a₁、X a a₂、X a a₃ および X a a₄ は独立してアミノ酸を表わし、該アミノ酸配列のシステイン残基はそれらの

10

20

30

40

50

間でジスルフィド架橋を形成する)を含むペプチドをエンコードする核酸、または請求項 12 ないし 17 のいずれか 1 項に記載の遺伝子構築物をそのゲノムに組み込んで含むトランスジェニック光合成生物細胞。

【請求項 21】

請求項 20 に記載の少なくとも 1 つのトランスジェニック光合成生物細胞を含むトランスジェニック光合成生物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、生物学の分野、取り分け植物バイオマスの生産において成立する。本発明は、従って、2 つのシステイン間のジスルフィド結合により形成される 6 員環を含むペプチドの、植物バイオマスの増量における使用に関する；本発明は、木材産業、再生可能資源に由来するエネルギーの取得、および農業において利用価値を有する。

10

【背景技術】

【0002】

植物および動物双方における細胞増殖は、ホルモンまたは成長因子として知られる一連の細胞外シグナルにより組織化されており（非特許文献 1）、それらは特異的な膜受容体を介して作用する（非特許文献 2、3）。これらのホルモン類は植物内で合成されるか、またはそれらの共生植物の生長を促進する根粒バクテリアの場合同様に、外部生物に由来し得る（非特許文献 4）。

20

【0003】

植物では 5 つのグループの成長因子が確立されている：オーキシン類、ジベレリン類、サイトカイニン類、アブシシン酸およびその誘導体、およびエチレン。これらの物質は広く分布しており、実際に、すべての高等植物に見出し得る。それらはそれらの作用の面で特異的であり、極めて低い濃度でその活性を発揮して、細胞増殖、細胞分裂と分化、並びに器官形成、老化および休眠状態を調節する。余り頻度は高くないが、全く未知というものでもない事例として、成長因子の構造が保存されており、植物および動物の双方において、当該成長因子が機能的であるような場合が見出される。典型的な例は、グラヌリンとして知られる糖タンパク質であるが、このものは真菌から哺乳動物に至るまで発現されて、植物においては栄養成長の調節因子として、また動物においては癌の制御因子として様々な機能を発揮する（非特許文献 5）。

30

【0004】

植物の生長を調節し、植物バイオマスの増殖を目的として、化学化合物を使用することによりその増殖を制御する多くの試みがなされてきた；例えば、特許文献 1 に記載されているもの、または肥料などである。特許文献 2 は、植物の種子と花の数を増加させる方法であって、グルタミン酸塩の存在下に植物を栽培する方法について記載している。特許文献 3 は、(i) 微粉化した天然方解石鉱物；(ii) 微粉化ゼオライト；および (iii) 1 種以上の添加物を含む植物の成長を刺激し、収穫量を改善するための組成物について記載している。しかし、鉱物の施肥は農業生産に否定的な影響を及ぼす；その理由は、高濃度の肥料が土壌を損ない、収穫量という意味での所望の結果がいつも得られるとは限らないからである。

40

【0005】

近年、また遺伝子操作の進歩によって、新しい戦略が植物バイオマス増量のために開発されており、その戦略は、植物の細胞代謝を制御することが確定された遺伝子の発現を制御することからなる。その意味で、特許文献 4 は、植物バイオマスの増量法であって、WD40 ドメインを 6 コピー有するタンパク質 (FEV) をエンコードする fve 遺伝子の発現を操作することからなる方法について記載している。FEV 発現の阻害は、植物に農学上の性質の改善を提供するが、取り分け、該植物により生産されるバイオマスの収率は、対照植物に比較して向上している。さらに、特許文献 5 は、植物の形態、生理作用および成長の制御に有用なタンパク質を発現する組換え DNA の使用について記載している。

50

当該組換えDNAは、Pfamファミリーのタンパク質の少なくとも1つのドメインを有するタンパク質をエンコードするヌクレオチド配列に共有結合した植物機能プロモーターを含む。特許文献6は、植物におけるバイオマス生産を調節する方法であって、ckil遺伝子の発現またはそのオルソログもしくは相同体の発現を修飾することからなる方法について記載している。特許文献7は、ホスホリパーゼD (PLD)をエンコードする遺伝子の植物における過剰発現により、植物バイオマスの増量、およびそれと共に、高浸透圧ストレス下に植物の収量を増量することについて記載している。それにも拘わらず、植物の遺伝子操作は通常費用が嵩み、社会が受け容れない。

【0006】

特許文献8は、E2Fa/DPaを過剰発現するトランスジェニック植物において上方制御されるか、または下方制御される遺伝子の同定について、また植物の特性を変えるためのその使用について記載している；特に、配列番号：1848のタンパク質は、開示されてはいるが、植物成長因子としての実際の使用については示されていない。

10

【0007】

さらに、特許文献8は、対応する野生型植物に比較して収率の上昇した植物を生産する方法であって、配列番号4659および4660のタンパク質を含む一群のタンパク質の活性を少なくとも増大させることからなる方法を一般的に開示しているが、植物バイオマスを増量する当該タンパク質の能力については開示していない。

【0008】

それ故、技術の現況に照らして、既存の方法に変わり得る方法であって、植物バイオマスを増量し、それとともに収穫収率を増大させて、上記のような欠点は有しない方法を開発する必要がある。

20

【0009】

ここでこれまでに見出されたことは、植物および藻類にアドレノメジュリンを投与すると、それらのバイオマスが増量することである。アドレノメジュリン(AM)、およびプロアドレノメジュリン(PAMP)のN-末端領域の20個のアミノ酸のペプチドは、adm遺伝子によりエンコードされる同じタンパク質、プレプロアドレノメジュリンの翻訳後のプロセッシングに由来するものである。何ら構造上の類似性がないにも拘わらず、両方のペプチドは同種のまた多数の生理的応答を生じる。中でも、血管拡張作用、気管支拡張作用、細胞運動と増殖の制御因子作用、他のホルモン類の分泌に対する修飾因子作用、および腸内吸収調節作用である(非特許文献6)。癌細胞に関しては、AMが成長因子同様に作用し、細胞運動を促進し、アポトーシスを低下させ、そして血管形成を誘発する(非特許文献7)。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0010】

【特許文献1】欧州特許出願公開第0934951号明細書

【特許文献2】米国特許出願公開第2010/0016166号明細書

【特許文献3】国際公開第2010/001184号

【特許文献4】米国特許出願公開第2009/0094716号明細書

40

【特許文献5】国際公開第2007/027866号

【特許文献6】国際公開第2009/003429号

【特許文献7】米国特許出願公開第2010/0037351号明細書

【特許文献8】国際公開第2004/035798号

【非特許文献】

【0011】

【非特許文献1】Galinha et al., 2009, Semin Cell Dev Biol. 20: 1149-1156

【非特許文献2】Santner and Estelle 2009, Nature 459: 1071-1078

【非特許文献3】De, I et al., 2009, Nat Cell Biol 11: 1166-1173

【非特許文献4】Lugtenberg and Kamilova 2009, Annu Rev Microbiol 63: 541-556

50

【非特許文献5】Bateman and Bennett 2009, Bioessays 31: 1245-1254

【非特許文献6】Lopez, J and Martinez, A. 2002, Int Rev Cytol 221: 1-92

【非特許文献7】Martinez et al., 2002, J Natl Cancer Inst 94: 1226-1237

【発明の概要】

【0012】

本発明の著者らは、驚くべきことに、アドレノメジュリンを植物および藻類（微細藻類を含む）、一般的には“光合成生物”に投与すると、当該生物においてそれらのバイオマスの増殖を生じることを発見し、その結果、植物と藻類における成長因子としての当該タンパク質の新規利用を発見した。

【0013】

実施例1に示すように、ニンジンとタバコのカルスを濃度の増大するアドレノメジュリンの存在下に置き、対照サンプルと比較すると、用量依存的応答に続いてカルス成長の上昇の起こることが観察された（図1）。さらに、実施例2はアドレノメジュリンで処理した微細藻類（クロレラ）が、未処理の微細藻類よりもより早く成長することを示す。

【0014】

それ故、これらの発見に基づき、本発明は、ホルモン（ジベレリン、オーキシン、サイトカインなど）または農薬製品を投与することなしに、植物または藻類の植物バイオマスの増量を可能とする。さらに、それが光合成生物に無関係の因子（すなわち、植物または藻類により天然に産生されるものではない）であるため、それは植物生理（スナッフフロー、気孔開口、膨張、共生真菌との関係など）または藻類生理に副作用を示さないであろうし、また観察されたように植物もしくは藻類の成長にのみ影響することになる。さらに、それが植物または藻類において自然に産生されるものではないという事実が、環境上の制御と遺伝的に修飾した物質の拡散の制御を容易なものとする。

【0015】

他方、アドレノメジュリンは、受容体の認識に関与するそのアミノ酸配列に特徴的なモチーフ（または同一と認められる特徴）を有し、2つのシステイン間のジスルフィド結合によって形成される6個のアミノ酸の環から構成される[Cys - Xaa₁ - Xaa₂ - Xaa₃ - Xaa₄ - Cys]。それ故、いかなる理論にも拘束されることを望むものではないが、アミノ酸配列中に当該モチーフをもつ任意のタンパク質は、その受容体を認識し、当該光合成生物（例えば、植物または藻類）のバイオマスを増量に導くプロセスの弾きがねを引き、成長因子としてのその役割を遂行すると考えられる。

【0016】

従って、光合成生物（例えば、植物または藻類）に対するアドレノメジュリンのこの新しい作用に基づき、またそのアミノ酸配列に存在するモチーフを考慮に入れて、以下の本発明の態様が展開された：

- 光合成生物、例えば、植物または藻類のバイオマスの増量方法であって、以下を含むペプチドの存在下に当該光合成生物を培養することを特徴とする方法：

(i) アミノ酸配列：

Cys - Xaa₁ - Xaa₂ - Xaa₃ - Xaa₄ - Cys [配列番号：1]

(式中、Xaa₁、Xaa₂、Xaa₃およびXaa₄は独立してアミノ酸を表す)および

(ii) (i)において示されるアミノ酸配列のシステイン残基がそれらの間でジスルフィド架橋を形成する。

【0017】

- 以下を含む遺伝子構築物：

(a) 以下を含むペプチドをエンコードする核酸：

(i) アミノ酸配列：

Cys - Xaa₁ - Xaa₂ - Xaa₃ - Xaa₄ - Cys [配列番号：1]

(Xaa₁、Xaa₂、Xaa₃およびXaa₄は独立してアミノ酸を表す)および

(ii) (i)において示されるアミノ酸配列のシステイン残基がそれらの間でジスル

10

20

30

40

50

フィド架橋を形成する；および

(b) 光合成生物においてその発現を調節する制御要素。

【0018】

- ベクター、宿主細胞、トランスジェニック光合成生物細胞、およびトランスジェニック光合成生物（例えば、植物または藻類）であって、上記定義のものなどの遺伝子構築物、またはペプチドをエンコードする核酸を含んでなり、該ペプチドは、(i) アミノ酸配列：Cys - Xaa₁ - Xaa₂ - Xaa₃ - Xaa₄ - Cys [配列番号：1]（式中、Xaa₁、Xaa₂、Xaa₃ および Xaa₄ は独立してアミノ酸を表す）を含んでなり、(ii) (i) において示されるアミノ酸配列のシステイン残基はそれらの間でジスルフィド架橋を形成する。

10

【0019】

これらの本発明の態様並びに異なる特定の実施形態については、下記の発明を実施するための形態において詳細に説明する。

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1】媒体中に存在するアドレノモジュリンのモル濃度に依存する植物バイオマスの相対成長を示す棒グラフである。各棒は8回の独立繰返しの統計平均および標準偏差を示す。

【図2】微細藻類（クロレラ）に対するアドレノモジュリンの作用を示すグラフである；アドレノモジュリンで処理した微細藻類は、未処理微細藻類よりも早く成長することを示す。

20

【発明を実施するための形態】

【0021】

本発明方法

一態様において、本発明は光合成生物のバイオマスを増量する方法であって（以下、本発明方法という）、以下を含むペプチド（以下、本発明の成長因子という）の存在下に当該光合成生物を培養することを特徴とする方法に関する：

(i) アミノ酸配列：

Cys - Xaa₁ - Xaa₂ - Xaa₃ - Xaa₄ - Cys [配列番号：1]

(Xaa₁、Xaa₂、Xaa₃ および Xaa₄ は独立してアミノ酸を表す) および

30

(ii) (i) において示されるアミノ酸配列のシステイン残基がそれらの間でジスルフィド架橋を形成する。

【0022】

アミノ酸、Xaa₁、Xaa₂、Xaa₃ および Xaa₄ は、互いに同一であっても、または異なってもよい。特定の実施形態において、Xaa₁、Xaa₂、Xaa₃ および/または Xaa₄ は、Cys とは異なるアミノ酸である。

【0023】

本明細書にて使用する場合、“光合成生物”という用語は、光合成を遂行し得るすべての生物、すなわち、太陽光からのエネルギーを使用して、二酸化炭素を有機化合物、特に糖類に変換する工程を有する生物を包含する。光合成は、植物、藻類、および多くの種のバクテリア（例えば、シアノバクテリアなど）で起こるが、古生細菌では起こらない。光合成生物は自らの食物を創生し得るので、光合成独立栄養生物とも称される。

40

【0024】

本明細書にて使用する場合、“植物”という用語は、植物界に属する生物、例えば、樹木、花、草本、灌木、芝草、蔓性植物、シダ類、コケ類、緑藻類などである。現在、植物は3つのグループに分類される：すなわち、(i) 陸上植物または有胚植物、より正式には有胚植物または多細胞植物であって、これらは最もよく知られた植物群を構成し、非維管束陸上植物またはコケ植物類、種子植物または顕花植物である維管束植物類（トラキオファイツ；tracheophytes）を含む；(ii) 緑色植物 - ビリディプランテ（Viridiplantae）、ビリディフィタ（Viridiphyta）またはクロロビオン（Chlorobiont）としても知ら

50

れる；および (iii) アーケプラスチダ (Archaeplastida)、プラスチダ (Plastida) または一次植物。

【0025】

本明細書にて使用する場合、“藻類”という用語は、単純な典型的に独立栄養性の生物の大きく多様な一群であり、単細胞型から多細胞型までに及ぶ。特定の実施形態において、該藻類は微細藻類、すなわち、淡水系および海水系に一般に見出される微視的藻類である。

【0026】

本明細書にて使用する場合、“シアノバクテリア”という用語は、一般的にラン藻類をいい、古い教科書では伝統的に藻類に含まれていたが、これらは現在ではバクテリアとみなされているので、現今の多くの原典はこれを時代遅れとみなしている。

10

【0027】

本発明との関連では、“光合成生物のバイオマス”とは、光合成生物体を構成する生体物質もしくは有機体の量、および生物学的過程において自然発生的に、または非自発的に（すなわち、誘発されて）生成する生体物質もしくは有機体の両方であると理解される。一実施形態において、バイオマスはエネルギー源として使用可能な、例えば、木材、廃棄物、（水素）ガス、アルコール燃料などである。

【0028】

一実施形態において、光合成生物が維管束植物である場合、当該植物のバイオマスは植物中に存在する生体物質もしくは有機体の量、すなわち、該植物の気生部分、すなわち、茎、幹、葉、枝、果実、花頭など（気生バイオマス）、およびその地下部分、すなわち、根、カルス、塊茎など（地下バイオマス）の両方を構成する生体物質もしくは有機体の量である。該“植物バイオマス”は植物の乾燥質量または重量（または適切な場合には“新鮮物重量”）として多くの場合測定される。

20

【0029】

本発明において、“光合成生物のバイオマスの増量”という表現は、成長率（GR）を式：

$$GR = \text{最終重量} / \text{初期重量}$$

と定義した場合に、1よりも大きい成長率を得る光合成生物に対する効果と理解される。

【0030】

光合成生物のバイオマスの増量を測定する別の方法は、相対成長率（RGR）またはバイオマスと時間の単位当たりのバイオマス得量を計算することに基づくものであり、式：

$$RGR = (Ln W_2 - Ln W_1) / (t_1 - t_2)$$

（式中、 W_1 および W_2 は時間 2 および 1（それぞれ $t_2 - t_1$ ）における植物の重量である）[Valladares, F. 2004, Ecologia del bosque mediterraneo en un mundo cambiante, pp. 191-227. Ministerio de Medio Ambiente（環境省）, EGRAF, S.A., マドリッド]

によって定義される。

【0031】

当業者も理解するように、維管束植物の場合には、現在の技術水準において GR に直接もしくは間接に関連した他のパラメータが存在し、このパラメータは、当該植物の植物バイオマスの増殖を決定するために使用することができる。当該パラメータを説明する非制限的例は以下のとおりである：

40

【0032】

- 葉面積比（LAR）または葉の面積と全植物重量比。これは m^2 （葉） kg^{-1} （植物）で表される。葉の面積はいくつもの方法で測定し得る。自動葉面積測定装置が存在するが、この装置は、ビデオカメラ、デジタルカードとコンピュータ画像分析ソフトウェアを備え、多数の葉の正しく迅速な面積測定（幅、長さなどの他の寸法も加わる）を可能とする。別のシステムは葉を写真複写または走査し、画像分析ソフトウェアにより表面を見積もることからなる。別の簡単な代替法は、写真複写した葉の輪郭を切り取り、重量/面

50

積比を換算するために、既知面積をもつ同じ紙の切片を用いて、それらの重量を測定することからなる。葉の表面を測定した後、識別できる紙の封筒に葉を保存し、オープン上で乾燥し、重量測定して“乾燥重量”を得る；

【0033】

- 比葉面積 (SLA) または葉面積と葉重量との比。 $m^2 (葉) kg^{-1} (植物)$ で表される；

- 葉の平均フラクション (LMF) または葉バイオマスと全植物バイオマスとの比。 $kg (葉) kg^{-1} (植物)$ で表される；または

- 純同化率 (NAR) または葉面積単位当たりの植物重量の増加率。 $kg (植物) m^{-2} (葉) 日^{-1}$ で表される。相対成長率は NAR 掛ける LAR の積に等しい。

10

【0034】

その他の成長分析パラメータは以下のとおりである；

- 茎質量分率 (SMF) または茎バイオマスと全植物バイオマスの比。 $kg (茎) kg^{-1} (植物)$ で表される；

- 根質量分率 (RMF) または根バイオマスと全植物バイオマスの比。 $kg (根) kg^{-1} (植物)$ で表される；

- 乾燥物 (DM) または乾燥植物重量と採集したての植物重量の比。 $kg (乾燥重量) kg^{-1} (採集したての重量)$ 。

【0035】

本発明方法は、いかなる型の光合成生物にも適用可能である；例えば、植物、藻類などである。それ故、本発明によると、実際にいずれかの光合成生物を本発明の成長因子と接触させた場合、当該光合成生物のバイオマスの増量が達成される。

20

【0036】

本明細書の初めに述べたように、本発明の成長因子はモチーフ [Cys - Xaa₁ - Xaa₂ - Xaa₃ - Xaa₄ - Cys] を含むペプチドである。しかし、特定の実施形態において、本発明の成長因子はモチーフ [Cys - Xaa₁ - Xaa₂ - Xaa₃ - Xaa₄ - Cys] を含むペプチドではあるが、条件として、当該ペプチドは配列番号：4 のペプチドまたは配列番号：6 のペプチドではない。

【0037】

当業者も理解するように、任意選択で当該モチーフの末端に、他のアミノ酸配列をつなげたものも本発明の成長因子とみなされる。

30

【0038】

従って、特定の実施形態において、当該ペプチド (本発明の成長因子) は、アミノ酸配列：



(X₁ は、該ペプチドのアミノ末端側のアミノ酸配列を表わし；また

X₂ は、該ペプチドのカルボキシル末端側のアミノ酸配列を表わす)

を含む。

【0039】

本明細書にて使用される場合、“ペプチド”という用語は、ペプチド結合によるアミノ酸の結合によって形成される分子に関し、分かりやすくするために、ペプチド、ポリペプチド、およびタンパク質とするが、一般的に、安定なコンホメーションをもつ完全な生物分子には“タンパク質”という用語を適用することが受け容れられている；一方、安定な三次元構造をしばしば欠く短鎖アミノ酸オリゴマーについては“ペプチド”という用語が一般に使用される；同様に、“ポリペプチド”という用語は、アミノ酸のいずれもの側鎖について、(一般に)それらの長さに関係なく、しばしば確たるコンホメーションを欠く場合に典型的に使用される。

40

【0040】

ペプチドのアミノ末端側のアミノ酸配列 (X₁) の長さは広い範囲で変わり得るが、特定の実施形態において、X₁ は1個ないし250個のアミノ酸からなる長さ、またはさら

50

により典型的には1個ないし175個のアミノ酸、通常は1個ないし100個のアミノ酸、より一般的には1個ないし50個のアミノ酸、さらにより一般的には2個ないし40個のアミノ酸、なおさらにより一般的には5個ないし35個のアミノ酸からなる長さを有する。

【0041】

同様に、ペプチドのC-末端側（またはカルボキシル末端）のアミノ酸配列（ X_2 ）の長さは広い範囲で変わり得るが、特定の実施形態において、 X_2 は1個ないし250個のアミノ酸からなる長さ、またはさらにより典型的には1個ないし175個のアミノ酸、通常は1個ないし100個のアミノ酸、より一般的には1個ないし50個のアミノ酸、さらにより一般的には2個ないし40個のアミノ酸からなる長さを有する。

10

【0042】

特定の実施形態において、ペプチド（ X_2 ）のC-末端側のアミノ酸配列は、アミノ酸配列GRRRR（配列番号：7）を含んでなり、このものはさらに特定の実施形態において、配列Cys-Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Xaa₄-Cysの最後のCysから10個ないし50個のアミノ酸だけ隔てられて位置する；すなわち、当該配列の最後のアミノ酸（Cys）と配列GRRRR（配列番号：7）の最初のアミノ酸（G）との間に10個ないし50個のアミノ酸が存在する。

特定の実施形態において、 X_2 のC-末端側はアミド化されている。

【0043】

当該モチーフ[Cys-Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Xaa₄-Cys]を含むペプチドを説明する例は、限定されるものではないが、アドレノメジュリン、アラビドプシス（*Arabidopsis*）タンパク質類（そのアミノ酸配列は、配列番号：4；配列番号：5および配列番号：6で示される）、イネ（コメ）タンパク質（そのアミノ酸配列は、配列番号：8；配列番号：9および配列番号：10で示される）、およびタラシオシラ・シュードナナ（*Thalassiosira pseudonana*；海洋性珪藻）タンパク質（そのアミノ酸配列は、配列番号：11で示される）である。

20

【0044】

それ故、本発明方法の特定の実施形態において、本発明の成長因子は、アドレノメジュリン、アミノ酸配列が配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10および配列番号：11で示されるペプチド、およびその組合せからなる群より選択される。その詳細は下記に示す。

30

【0045】

アドレノメジュリン

アドレノメジュリン（AM）は、当初ヒトの褐色細胞腫に見出された52個のアミノ酸からなる降圧ペプチドであって、分子内ジスルフィド架橋（Cys-Cys）を有し、カルシトニン遺伝子関連ペプチドと高い相同性を有する。前駆体タンパク質、プレプロアドレノメジュリン（配列番号：2）は、細胞内で処理された後に、52個のアミノ酸をもつ成熟タンパク質（アドレノメジュリンであろう）を生成する185個のアミノ酸鎖長を有する（GenBank受託番号AAC60642.1）。本発明方法の特定の実施形態において、AMは配列番号：3により定義されるヒトのアドレノメジュリンである。いずれの理論にも拘束されることを望むものではないが、ヒトのAMが植物組織上で活性を示すという事実は、植物に、またはそれらと関連する微生物に同様の因子が存在するためであると考えられる。

40

【0046】

配列番号：2（プレプロアドレノメジュリン）

【0047】

【化1】

MKLVSV~~ALMY~~ LGSLAFLGAD TARLDVASEF RKKW~~NKWALS~~ RGKREL~~RMSS~~
 SYPTGLADVK AGPAQTLIRP QDMKGASRSP EDSSPDAARI RVKRYRQSMN
 NFQGLRSFGC RFGTCTVQKL AHQIYQFTDK DKDNVAPRSK ISPQGYGRRR
RRSLPEAGPG RTL~~VSSKPQA~~ HGAPAPPSGS APHFL

【0048】

[アドレノメジュリンのアミノ酸配列に下線を付し、またモチーフGRRRRのアミノ酸配列には二重下線を付し、太字とした]

【0049】

配列番号：3 (ヒトのアドレノメジュリン)

【0050】

【化2】

YRQSMN~~NFQGLRSFG~~CRFGTCTVQKL~~AHQIYQFTDK~~DKDNVAPRSKISPQGY-NH₂

【0051】

[アドレノメジュリンの特徴的なモチーフ (C y s - X a a ₁ - X a a ₂ - X a a ₃ - X a a ₄ - C y s) を太字とした ; ジスルフィド架橋を形成する2個のシステインに下線を付す]

【0052】

当業者も理解するように、光合成生物のバイオマスを増量する能力を有する配列番号：3のいずれの変異体も、本発明の範囲に包含される。

【0053】

本明細書にて使用される場合、“配列番号：3の変異体”という用語は、アミノ酸配列の保存的アミノ酸置換により配列番号：3から得られるペプチドであって、得られた変異体が上記のパラメータのいずれかの測定により、光合成生物のバイオマスを増量する能力を有することの確認されるいずれものペプチドに関係する。保存的アミノ酸置換は、類似の側鎖をもつ残基の互換性に関係する。例えば、脂肪族側鎖をもつ一群のアミノ酸は、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、およびイソロイシンからなり；脂肪族ヒドロキシル側鎖をもつ一群のアミノ酸は、セリンおよびスレオニンからなり；アミド基含有側鎖をもつ一群のアミノ酸は、アスパラギンおよびグルタミンからなり；芳香族側鎖をもつ一群のアミノ酸は、フェニルアラニン、チロシンおよびトリプトファンからなり；塩基性側鎖をもつ一群のアミノ酸は、リジン、アルギニン、およびヒスチジンからなり；またイオウ含有側鎖をもつ一群のアミノ酸は、システインおよびメチオニンからなる。好適な保存的アミノ酸置換群は、バリン - ロイシン - イソロイシン、フェニルアラニン - チロシン、リジン - アルギニン、アラニン - バリン、およびアスパラギン - グルタミンである。

【0054】

アドレノメジュリンの機能的に等価の変異体の例は、天然のアドレノメジュリンに実質的に相同であるポリペプチドである (配列番号：3)。本明細書にて使用される場合、“実質的に相同”という表現は、配列番号：3に示されるアミノ酸配列に関して、少なくとも50%、有利には少なくとも60%、好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも85%、さらにより好ましくは少なくとも95%の同一性度を有するアミノ酸配列のいずれかに関する。2つのペプチド間の同一性度は、コンピュータアルゴリズムおよび当業者周知の方法により決定し得る。2つのペプチドの2つのアミノ酸配列間の同一性は、好ましくは、BLASTPアルゴリズムにより決定する (BLASTマニュアル、Altschul, S., et al., NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul, S., et al., J., 1990, Mol. Biol. 215: 403-410)。

【0055】

他方、アドレノメジュリンはそのアミノ酸配列に特徴的なモチーフ (または確認可能な特徴) を有し、そのアミノ酸配列はアドレノメジュリン受容体の認識に関与し、また2個

10

20

30

40

50

のシステイン間のジスルフィド結合により形成される6個のアミノ酸の環からなる [C y s - X a a ₁ - X a a ₂ - X a a ₃ - X a a ₄ - C y s]。さらに、アドレノメジュリンは約20~40個のアミノ酸によりモチーフから隔てられて、アミド化されたカルボキシル末端 (C O N H ₂) を有する。そのアミノ酸配列中に C y s - X a a ₁ - X a a ₂ - X a a ₃ - X a a ₄ - C y s モチーフを有するアドレノメジュリン変異体はいずれもがアドレノメジュリン受容体を認識し、光合成生物のバイオマスを増量に導く過程の弾きがねを引くと考えられる。従って、本発明は2個のシステイン間のジスルフィド結合により形成される当該6個のアミノ酸の環を含んでなり、光合成生物のバイオマスを増量させる能力をもつそれらのアドレノメジュリンをも意図するものである。配列番号：3の変異体は、

10

【0056】

最終的に、アドレノメジュリンの、または先に定義したその変異体のフラグメントも、それらが光合成生物のバイオマスを増量する能力を維持する限り、本発明の範囲に含まれる。当該能力は先の段落で説明したパラメータにより決定し得る。

【0057】

アラビドプシス (Arabidopsis) タンパク質

本発明の成長因子の他の特定の実施形態は、配列番号：4、配列番号：5および配列番号：6に記載したアラビドプシス (Arabidopsis) タンパク質を含む。

【0058】

配列番号：4

20

【0059】

【化3】

[MLDTLIGGIVGGIAGAIIGTVDFGARGIGICPDSYQSCTRTDCEEHKKKLPTNLSRNGGAAAV
KAKENGRRRRQKDRE-NH₂]

【0060】

にて同定されるタンパク質は、GenBank受託番号NP__564910をもつ名称未知のタンパク質である。

【0061】

配列番号：5

30

【0062】

【化4】

[MDPKSCENSDDVKGQTSDSVSKKVLIEEEEDVKKPQQGKENDSRMAKDVVSCSSNISAHVVHE
EVADNVTAVSCNEAESDISKAKAKEFHTIDLSGVGERICRICHFSGSDQSPEASGDDKSVSPELI
EIGCKCKNELGLAHFHCAEAWFKLRGNSVCEICGCTAKNVTVRLMEDWSGERDNTLDGRRRRGR
GQSCCIFMVLLTILLHWFKKISGYQNT-NH₂]

【0063】

にて同定されるタンパク質は、GenBank受託番号NP__180967をもつ亜鉛フィンガーファミリー (C 3 H C 4 - 型リングフィンガー) のタンパク質である。

40

【0064】

配列番号：6

【0065】

【化5】

[MGDVILFIDDTKSKVRITRCRICHEEEEEESFFEVPACSGTVKFAHRNCIQRWCNEKGNTTCE
ICLQVYKDGYTAVLKQSKLIEQEVITIRVNGRRRRRSRRLVLSIAESDISQCNSVADRGASFCRSL
TFTLSVFLLMKHTFDVIYGTEEYPFSVFTVLTLLKAIGILLPMFIIIRTISTIQTLLRRRHQYPE
SEEDRLSSDDDDLEEEDEEQQHLLA-NH₂]

50

【 0 0 6 6 】

にて同定されるタンパク質は、GenBank受託番号NP_567222をもつピッチ
 オウン (pitchoun) 1 (PIT1) と称されるタンパク質である。

[すべての事例において、本発明の成長因子の特徴的モチーフ (Cys - Xaa₁ - Xaa₂ - Xaa₃ - Xaa₄ - Cys) は、太字で示し、ジスルフィド架橋を形成する2個のシステインには下線を付し、モチーフGRRRRのアミノ酸配列は二重下線と太字で示す]

【 0 0 6 7 】

当業者も理解するように、当該タンパク質の変異体およびフラグメントもまた、それらが本発明成長因子の特徴的モチーフを保存し、光合成生物に投与したときに、そのバイオマスを増量する限りにおいて、本発明に関連して包含される。光合成生物のバイオマスの増量は上記のパラメータのいずれかにより、例えば、実施例1に記載するような植物バイオマス増量アッセイ法により、または実施例2に記載するような藻類バイオマス増量アッセイ法により確認することができる。本発明に関連しての用語変異体およびその意味については、先の段落に定義したとおりである。

10

【 0 0 6 8 】

オリザ・サティバ (イネ; *Oryza sativa*) タンパク質

該モチーフ [Cys - Xaa₁ - Xaa₂ - Xaa₃ - Xaa₄ - Cys] を含むペプチドの例は、限定されるものではないが、そのアミノ酸配列が配列番号：8、配列番号：9および配列番号：10で示されるオリザ・サティバ (コメ) のタンパク質である。

20

【 0 0 6 9 】

配列番号：8：

【 0 0 7 0 】

【化6】

MEAAPRDDKPARMNS~~EDDD~~GHRRWGSDGGEAMPRTTSPVRRCDAGGGGGVADS~~AWEE~~EGPTGEI
 PARMERPARHGVP~~AKY~~GRRLDGEDDGVLVPG~~EV~~VATSASAQETRQRRPEAEQWRQRH**CCRRG**
CTSGGV~~R~~GKRRRAGRGRGGDYDAGGGDGTAGRRADAAAGVAGF**GRRRR**RERRSATVWLGRSGR~~GK~~
 TEGEVD*

【 0 0 7 1 】

配列番号：9 (タンパク質受容体様タンパク質キナーゼ2前駆体、推定、発現)：

30

【 0 0 7 2 】

【化7】

MHAA**CLCSTC**CSCRP~~CAARR~~PRRRRRRCSRGRTPCRARRRRR**PASSGR****GRRRR**RSSRTRTPR
 RGARGA~~AWRRR~~VRRRGRRRGAGVAGTLDALDLSSLPGLAALNLSLNSLTGSFSPNVSSPLLS
 LRSIDLSSNLSGPIPAALPALMPNLEHLNLSNQFSGEIPASLAKLTKLQSVVLGNSLLHGGV
 PPVIGNISGLR~~T~~LELSGNPLGGAIPTTLGKLRSL~~EH~~INVS~~LAGLE~~STIPDELSLCANLTVIGLA
 GNKLTGKLPVALARL~~TRV~~REFNVSKNMLS~~GEV~~LDPDYFTAWTNLEVFQADGNRFTGEIPTAITMA
 SRLEFLSLATNNLSGAI~~PPV~~IGTLANLKL~~LD~~LAENKLAGAIPRTIGNLTSLETLR~~LY~~TNKL~~TGR~~
 LPDELGDMAALQRLSVSSNMLEGELPAGLARLPRLVGLVAFDNL~~LSGAI~~PP~~EF~~GRNGQLSIVSM
 ANNRFSGELPRGVCASAPRLRWLGLDDNQFSGTVPACYRNL~~TNL~~VRLRMARNKLAGDVSEILAS
 HPDLYYLDLSGNSFDGELPEHWAQFKSL~~SFL~~HLSGNKIAGAI~~PAS~~YGAMSLQDL~~DL~~SSNRLAGE
 IPPELGSLPLTKLNLRRNALS~~GRV~~PATL~~GNA~~ARMEMLDLSGNALDGGVPVELTKLAEMWYLNLS
 SNNLSGEVPPLLGKM~~RS~~LTTLDLSGNPGLCGHDIAGLNSCSSNTTTGDGHS~~GK~~TRLVLA~~VT~~LSV
 AAALLVSMVAVVCAVSRKARRAAVVVEKAETSASGGGSSTAAAVQAS~~I~~WSKDTTFSFGDILAA
 TEHFNDAYCIGKGSFGTVYRADLGGGRAVAVKRLDASETGDACWGV~~SERS~~FENEV~~RAL~~TRVRHR
 NIVKLHGFCAMGGYMYLVYELAERGLGAVLYGGGGGGCRFDWPARMRAIRGVAHALAYLHHD
 CSPPMIHRDVS~~VNN~~VLLDPDYEP~~RV~~SDFGTARFLV~~PGR~~STCDSIAGSYGYMAPELAYMRVTTKC
 DVYSFGV~~VAM~~EMLMGKYPGLISSLQHS~~PQ~~LSAEGHDGSGGGGGEEASASASRRLLLLKDVVDQ
 RLDAPAGKLAGQVVFVVALSCV~~RT~~SPDARPTMRAVAQELAARRRPILDRPFEMIKIGDLTNS
 HR*

40

50

【 0 0 7 3 】

配列番号： 1 0 :

【 0 0 7 4 】

【 化 8 】

MSRRGTRRQRDNGDRGAASSSSPSTSPSHGPAGGWASQIRCCGAWCGGRTSVAVMLGDGAPVL
LGRRRRRRPPSSLLLMLFFFFFFFHVQNACMPCSLAC*

【 0 0 7 5 】

[すべての事例において、本発明の成長因子の特徴的モチーフ (C y s - X a a ₁ - X a a ₂ - X a a ₃ - X a a ₄ - C y s) は、太字で示し、ジスルフィド架橋を形成する2個のシステインには下線を付し、モチーフ G R R R R のアミノ酸配列は二重下線と太字で示す]

10

【 0 0 7 6 】

タラシオシラ・シュードナナ (*Thalassiosira pseudonana* ; 珪藻) タンパク質

配列番号： 1 1 :

【 0 0 7 7 】

【 化 9 】

MAPALCGDLISTRRSFLALAWTLTLLLSFFSFVAVFLAGRINQQYISMTSGDYAEWYTHEYGN
 DFYDRLLLEEGSGECCRYLEGGEEGGGGEQQREGEDHDRQEGGSNDRNQLDAEFFQSLANANSRS
 LEFAGVYTTVLGIALSLYGSTVVVGFMSLKGEYIIPCFSFRRSMSEEEGEVGVEDADTGPRNL
 WGEKIHRGVFLGCLVIFANLLLLCAVIFGELEVHDNYYNDQQNNDNIFSYRIEKISSVFAITC
IVLACVYVLFVAVIYLSGGMMLDDNDTVQHNTGNWMDHSHSQFELSPRGNGRRRRRGRRDMPDK
 AEPLVSAVGGGITEIGCATRSDEAYVLDEGCIDETT*

20

【 0 0 7 8 】

[本発明の成長因子の特徴的モチーフ (C y s - X a a ₁ - X a a ₂ - X a a ₃ - X a a ₄ - C y s) は、太字で示し、ジスルフィド架橋を形成する2個のシステインには下線を付し、モチーフ G R R R R のアミノ酸配列は二重下線と太字で示す]

【 0 0 7 9 】

30

本発明の成長因子が所望の効果、すなわち、光合成生物のバイオマスを増量する効果をもつためには、当該成長因子を当該光合成生物と接触させる必要がある。技術の現状においては、有効成分 (本発明においては本発明の成長因子) を光合成生物、取り分け植物へ投与することを可能とする多くの方法が存在する。同様に、該有効成分は使用する投与方法に適した方式で製剤化される。

【 0 0 8 0 】

通常、光合成生物へのその投与のために、本発明の成長因子は、固体形状で、または液体形状のいずれかで、例えば、水和剤の形状で、または常套の希釈剤と合体する乳化可能な濃縮物の形状で使用し得る組成物の一部とする。当該組成物は、伝統的な方法で、例えば、本発明の成長因子を希釈剤と、また選択肢として他の成分もしくは組成と混合することにより得られる。特定の実施形態において、光合成生物は植物であり、本発明の成長因子を含む組成物は、常套の手段によって、本発明の成長因子と希釈剤とを、また選択肢としての他の成分もしくは組成とを混合することにより得られる；該成分は通常使用される農業用組成物に使用されるものであり、当業者既知のものである；例えば、限定されるものではないが、溶剤、活性因子もしくは pH 調整剤、肥料などである。特定の実施形態において、本発明の成長因子は水耕栽培システムにおいて植物に供すべき栄養溶液を補強するための添加剤として投与されるか、または当該植物の灌水に投与される。

40

【 0 0 8 1 】

該組成物中の本発明成長因子の濃度は、広い範囲で、典型的には少なくとも 10^{-2} ないし 10^{-16} M、通常少なくとも 10^{-4} ないし 10^{-12} M、さらに一般的には少な

50

くとも 10^{-6} ないし 10^{-11} M、なおさらに一般的には少なくとも 10^{-8} ないし 10^{-10} M である。当該組成物の他の技術的特徴は、例えば、農業にて許容される担体を使用し得ること、さらなる組成を加え得ること、その提示する形状、それを得るための工程などである。

【0082】

本明細書にて使用されるという意味で、“農業にて許容される担体”という用語は、農業部門にて使用し得る任意の物質または物質の組合せを含み、また農業にて許容される液体もしくは固体材料をも含み、それらは、それをより簡単なもしくは改善された適用形状とするためまたは適用可能なもしくは望ましい活性化強度にするために、本発明の成長因子を加え得るか、および/またはそれと混合し得るものである。

10

【0083】

本明細書に記載された組成物は、さらに所望により、農業用組成物に通常使用される他の成分または組成、例えば、限定されるものではないが、溶剤、活性因子もしくは pH 調整剤、肥料などを含み得るが、それらは植物の植物バイオマスを増量する本発明の成長因子の能力を可能とするか、または危険にさらすことがないか、または損なうことのないものとする。農業用組成物に通常使用される当該成分または組成は、一般に当業者既知のものである。

【0084】

本発明が提供する組成物は、一般に、適量の組成物の異なる成分の混合物に基づき、常套の方法により得ることができる。

20

【0085】

上記のように、本発明方法はいずれの光合成生物に対しても使用することができる。特定の実施形態において、本発明方法はバイオマスの増量が特に望ましい光合成生物に適用される；例えば、任意の産業で工業的に使用される植物および藻類である。従って、特定の実施形態において、光合成生物は植物、例えば、エネルギー（例えば、再生可能エネルギー）の生産に使用する植物、ヒトもしくは動物の栄養、木材種、観賞用植物などの植物である。

【0086】

燃料または再生可能エネルギーの生産に使用されるバイオマス用植物の例は、限定されるものではないが、以下のものである：

30

(i) 電気エネルギーの生産に使用する植物：成長の早い木材エネルギー作物、例えば、ポプラ、ヤナギ、ユーカリ、ニセアカシア、針葉樹、アカシア、バナナの木など、および草本植物、例えば、アザミ、ススキ、ダンチュク、トウダイグサ科植物、サボテン類など；および

(ii) バイオ燃料の生産に使用する植物：ビート、トウモロコシ、サトウモロコシ、サトウキビ、ポテト、キウイモなどから得られるバイオアルコールの生産、およびナタネ、ヒマワリ、ダイズなどからのバイオ・オイル。

【0087】

当業者も理解するように、熱エネルギーの取得および燃料ガスの生産に植物バイオマスを使用することも可能である。しかし、これらのプロセスの特性により（熱エネルギーは直接燃焼システムに適用して熱を得ることからなり、また燃料ガスの生産は蒸解ガマ中でバイオマスを分解しガスを得ることからなる）、当該エネルギーの生産に使用されるバイオマスはいずれの植物からのものでもよい。

40

【0088】

木材植物の例は、限定されるものではないが、マツ、ユーカリ、コルクガシ、レバノンスギ、オーク、セイヨウヒイラギカシなどである。

【0089】

対象となる観賞植物の説明用の非限定例は、エスキナンサス属、カンナ、コルムネア属、アネモネ、アザレア、ペゴニア、キンチャクソウ、カメリア、ナデシコ属、フリージア、ガーベラ、ハイビスカス、ヒポエステス属、カランコエ、タバコ属、ペラルゴニウム

50

属、ツクバネアサガオ、サクラソウ属、キンボウゲ属、イースターカクタス、バラ、セントポーリア、イワタバコ科グロキシニア、ウシノシタ、トラユリ、ビジョザクラ、またはヒャクニチソウ属である。その他の観賞植物としては、ラン（ラン科）および観賞用低木であって、ゲッケイジュ（ローラス・ノビリス）、スイカズラ（ロニセラ・フラグランチッシマ）、シデコブシ（モクレン属）、アジサイ（ヒドランジア・マクロフィラ）、キングサリ（ラブルナム×ウォータエリ）、ノイバラもしくはヤマブキ（ケリス・ヤポニカ）などである。

【0090】

ヒトまたは動物の栄養に使用される植物の説明用の非限定例は、果樹：限定されるものではないが、サクランボの木、プラムの木、モモの木、アンズの木、オリーブの木、マンゴーの木、ナシの木、リンゴの木、ビワの木、マルメロの木、オレンジの木、レモンの木、イチジクの木、パパイアの木、クリの木、オークの木、トキワガシの木、アカミガシの木、ヘーゼルナッツの木、アーモンドの木、クルミの木など；飼料用植物：限定されるものではないが、マメ科植物（例えば、クローバー、アルファルファ、クリトリアス、落花生、ギンゴウカン属、ホタルブクロウ属など）、牧草（例えば、ドクムギ属、フェストゥーカ属、カモガヤ、グラマグラス、アフリカヒゲシバ、プッフェルグラス、ウシクサ属、イネ科ピロードキビ属、牧草とされるギョウギシバ、およびガマ、ネビアグラス、サトウキビ、タイワングラスおよびコーングラス（これらは刈取り牧草である）など）；穀類（例えば、モロコシ属、コムギ、ライムギ、オオムギなど）；ヒトの消費用植物（レタス、キャベツ、ハウレンソウ、フダンソウ、インゲンマメ、トマト植物など）などである。

【0091】

別の特定の実施形態において、光合成生物は藻類である；例えば、微細藻類：クロレラ、ボツリオコッカス（*Botryococcus*）、ナンノクロロプシス（*Nannochloropsis*）、ヘマトコッカス（*Haematococcus*）、ネオクロリス（*Neochloris*）またはテトラセルミス（*Tetraselmis*）属などの微細藻類；さらに、本発明の範囲内の説明用の非限定的藻類の例は、アオノリ（エンテロモルファ・インテスチナリス；*Enteromorpha intestinalis*）（数種の緑藻；モノストローマ（*Monostroma*））（日本）、アレーム海草（エイセニア・ビシクリス；*Eisenia bicyclis*）、バダーロックス *ja p*. サルメン（アラリア・エスキュレンタ；*Alaria esculenta*）、カローラ（カロフィリス・バリエガタ；*Callophyllis variegata*）（南アメリカ）、トチャカコケ（マストカルプス・ステラタス；*Mastocarpus stellatus*）、クロレラ、コンブ属海草（*Laminaria saccharina*）、ダービレア・アンタークチカ（*Durvillea antarctica*）、パルマリア・パルマタ（*Palmaria palmata*）、ユーキマ・コットニイ（*Euchema cottonii*）、カウレルバ・レンティリフェラ（*Caulerpa lentillifera*）、グラマン、グラマン - ダガット（アガードヒーラ・テネラ；*Agardhiella tenera*）、ヒジキ（*Sargassum fusiforme*）、ホンダワラ（*Sargassum enerve*）、コンドラス・クリスパス（*Chondrus crispus*）、ポルフィラ・ラシニアタノポルフィラ・アンビリカリス（*Porphyra laciniata/Porphyra umbilicalis*）、ウルバ・ラクツカ（*Ulva lactuca*）、サルガッサム・エキノカルパム（*Sargassum echinocarpum*）、マコンブ（*Saccharina japonica*）、ミル（*Codium sp.*）、モズク（*Cladosiphon okamuranus*）、ノリ（*Porphyra*；数種の紅藻）、大型褐藻（コンブ）（*Laminaria digitata*）、オゴノリ（*Gracilaria*；数種の紅藻）、ヒバマタ属褐藻（*Fucus vesiculosus*）、シートロン（*Nereocystis luetkeana*）、スラック（*Porphyra purpurea*, syn. *Porphyra laciniata*）、アースロスピラ・プラテンシス（*Arthrospira platensis*）、アースロスピラ・マキシマ（*Arthrospira maxima*）、ソングウイード（*Himantalia elongata*）、ツノマト（*Chondrus*；数種の紅藻）、ワカメ（*Undaris pinnatifida*）など。

【0092】

本発明の遺伝子構築物

本発明の成長因子が光合成生物のバイオマスの増量を達成するために本発明が意図した別の可能性は、当該光合成生物のゲノムに増殖因子をエンコードするヌクレオチド配列を挿入することからなり、それによって当該ヌクレオチド配列が発現されたときに、それが

光合成生物において所望の効果を示すようにすることである。

【0093】

それ故、別の態様において、本発明は遺伝子構築物（以下、本発明の遺伝子構築物という）に関し、該遺伝子構築物は以下の（a）および（b）を含む：

（a）下記（i）および（ii）を含むペプチドをエンコードする核酸：

（i）アミノ酸配列：

C y s - X a a ₁ - X a a ₂ - X a a ₃ - X a a ₄ - C y s [配列番号：1]

（X a a ₁、X a a ₂、X a a ₃ および X a a ₄ は独立してアミノ酸を表す）および

（ii）（i）で示されるアミノ酸配列のシステイン残基がそれらの間でジスルフィド架橋を形成する；および

（b）光合成生物においてその発現を調節する制御要素。

【0094】

特定の実施形態において、当該制御要素は藻類中で当該ペプチドをエンコードする核酸配列の発現を制御するために適している；当該要素は当業者既知である。

【0095】

別の特定の実施形態において、当該制御要素は植物中で当該ペプチドをエンコードする核酸配列の発現を制御するために適している；当該要素は当業者既知である。

【0096】

特定の実施形態において、当該ペプチドをエンコードする核酸配列の発現を調節する制御要素は、当該核酸配列に関して異種である；すなわち、当該核酸配列がアラビドプシス（*Arabidopsis*）タンパク質（例えば、配列番号：4、配列番号：5または配列番号：6）をエンコードする場合には、当該核酸配列は植物中のその発現を調節する制御要素の制御下にあるが、その制御要素は当該植物中では当該アラビドプシス（*Arabidopsis*）タンパク質の発現を天然で調節する制御要素とは異なるということ、または当該核酸配列がイネ（*Oryza sativa*）タンパク質（例えば、配列番号：8、配列番号：9または配列番号：10）をエンコードする場合には、当該核酸配列は植物中のその発現を調節する制御要素の制御下にあるが、その制御要素は当該植物中では当該イネ（*Oryza sativa*）タンパク質の発現を天然で調節する制御要素とは異なるということである；あるいは、当該核酸配列がタラシオシラ・シュードナナ（*Thalassiosira pseudonana*；珪藻）タンパク質（例えば、配列番号：11）をエンコードする場合には、当該核酸配列は藻類中のその発現を調節する制御要素の制御下にあるが、その制御要素は当該藻類中では当該タラシオシラ・シュードナナ（*Thalassiosira pseudonana*；珪藻）タンパク質の発現を天然で調節する制御要素とは異なるということである。

【0097】

該アミノ酸、X a a ₁、X a a ₂、X a a ₃ および X a a ₄ は互いに同一でもよいし、または異なってもよい。特定の実施形態において、X a a ₁、X a a ₂、X a a ₃ および/または X a a ₄ は、C y s とは異なるアミノ酸である。

【0098】

それ故、特定の実施形態において、当該本発明の遺伝子構築物は以下の（a）および（b）を含む：

（a）下記（i）および（ii）を含むペプチドをエンコードする核酸：

（i）アミノ酸配列：

C y s - X a a ₁ - X a a ₂ - X a a ₃ - X a a ₄ - C y s [配列番号：1]

（X a a ₁、X a a ₂、X a a ₃ および X a a ₄ は独立してアミノ酸を表す）および

（ii）（i）で示されるアミノ酸配列のシステイン残基がそれらの間でジスルフィド架橋を形成する；および

（b）光合成生物でのその発現を制御する制御要素；

ただし、当該核酸配列（a）が配列番号：4、配列番号：5および配列番号：6で示されるアミノ酸配列のタンパク質からなる群より選択されるタンパク質をエンコードする場合には、当該核酸配列（a）は植物中のその発現を調節する制御要素の制御下にあるが、

10

20

30

40

50

その制御要素はアラビドプシス (*Arabidopsis* sp.) 中で当該タンパク質の発現を天然で調節する制御要素とは異なる；

【0099】

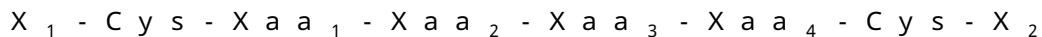
ただし、当該核酸配列 (a) が配列番号：8、配列番号：9および配列番号：10で示されるアミノ酸配列のタンパク質からなる群より選択されるタンパク質をエンコードする場合には、当該核酸配列 (a) は植物中のその発現を調節する制御要素の制御下にあるが、その制御要素はイネ (*Oryza sativa* sp.) 中で当該タンパク質の発現を天然で調節する制御要素とは異なる；

【0100】

ただし、当該核酸配列 (a) が配列番号：11で示されるアミノ酸配列のタンパク質をエンコードする場合には、当該核酸配列 (a) は藻類中のその発現を調節する制御要素の制御下にあるが、その制御要素はタラシオシラ・シュードナナ (*Thalassiosira pseudonana*；珪藻) 中で当該タンパク質の発現を天然で調節する制御要素とは異なる。

【0101】

本発明の遺伝子構築物の特定の実施形態において、当該ペプチドはアミノ酸配列：



(-X₁ は、該ペプチドのアミノ末端側のアミノ酸配列を表わし；また
-X₂ は、該ペプチドのカルボキシル末端側のアミノ酸配列を表わす)
を含む。

【0102】

ペプチドのアミノ末端側のアミノ酸配列 (X₁) の長さは広範囲に変わり得るものであるが、特定の実施形態においては、X₁ が1個ないし250個のアミノ酸からなる長さ、またはさらにより典型的には1個ないし175個のアミノ酸、通常は1個ないし100個のアミノ酸、より一般的には1個ないし50個のアミノ酸、さらにより一般的には2個ないし40個のアミノ酸、なおさらにより一般的には5個ないし35個のアミノ酸からなる長さを有する。

【0103】

同様に、ペプチドのC-末端側 (またはカルボキシル末端) のアミノ酸配列 (X₂) の長さは広い範囲で変わり得るが、特定の実施形態において、X₂ は1個ないし250個のアミノ酸からなる長さ、またはさらにより典型的には1個ないし175個のアミノ酸、通常は1個ないし100個のアミノ酸、より一般的には1個ないし50個のアミノ酸、さらにより一般的には2個ないし40個のアミノ酸からなる長さを有する。

【0104】

特定の実施形態において、該ペプチドのC-末端側のアミノ酸配列 (X₂) は、アミノ酸配列 G R R R R を含んでなり (配列番号：7)、さらに特定の実施形態において、このものは配列 C y s - X a a ₁ - X a a ₂ - X a a ₃ - X a a ₄ - C y s の最後の C y s から10個ないし50個のアミノ酸を隔てた位置にある。

特定の実施形態において、X₂ のC-末端側はアミド化されている。

【0105】

別の特定の実施形態において、当該ペプチドは、アドレノメジュリン、およびアミノ酸配列が配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、および配列番号：11の配列で示されるタンパク質、並びにそれらの機能的に等価の変異体およびフラグメントからなる群より選択される。

【0106】

本発明の遺伝子構築物は、現在の技術において周知の技法により取得し得る [サムブルークラ (Sambrock et al.) 2001、 “モレキュラークローニング；実験室マニュアル” (“Molecular cloning: a Laboratory Manual”)、第3版、コールドスプリングハーバーラボラトリープレス (Cold Spring Harbor Laboratory Press)、ニューヨーク、第1～3巻]。当該本発明の遺伝子構築物は、光合成生物でのその発現を調節する制御要素

を機能的に結合して組み込んでいる。本明細書にて使用される場合、“機能的に結合”という表現は、本発明の成長因子[すなわち、アミノ酸配列 C y s - X a a ₁ - X a a ₂ - X a a ₃ - X a a ₄ - C y s を含むペプチド]をエンコードする核酸が制御調節要素または発現調節配列の制御のもとで、正しい読み枠で発現されることを意味する。制御調節要素は転写を制御調節し、適切な場合にはタンパク質の翻訳をも制御する配列であり、プロモーター配列、転写制御因子をエンコードする配列、リボソーム-結合配列(RBS)および/または転写終結配列を含む。

【0107】

本発明の遺伝子構築物は、光合成生物の細胞(例えば、植物細胞もしくは組織、または藻類細胞)のゲノム中に、形質転換光合成生物を得るための適切な方法により、挿入することができる。当該方法は、例えば、リボソームの使用、エレクトロポレーション、拡散、粒子衝撃、マイクロインジェクション、遺伝子銃、遊離DNA摂取を増加する化合物(例えば、リン酸カルシウム共沈殿)、ウイルスベクターなどを含み得る。

10

【0108】

従って、別の態様において、本発明は本発明の遺伝子構築物を含むベクターに関する。

特定の実施形態において、当該ベクターは藻類の形質転換に適するベクターである；当該ベクターは当業者既知である(例えば、国際公開第2009149470号は、ベクター-形質転換藻類細胞用の方法と組成物について開示しており、その場合のベクターは藻類細胞において抗生物質耐性遺伝子の発現を駆動するVcpプロモーターを含む)。

20

【0109】

別の特定の実施形態において、当該ベクターは植物の形質転換に適するベクターである；当該ベクターもまた当業者既知である。さらに特定の実施形態において、植物の形質転換に適するベクターは、欧州特許EP120516に記載されているようなアグロバクテリウム・ツメファシエンス(Agrobacterium tumefaciens)Tiプラスミドに由来するベクターを包含する。アグロバクテリウムTiまたはRiプラスミドに由来する形質転換ベクターに加えて、それに替り得る方法が植物細胞もしくは組織に遺伝子構築物を挿入するために使用し得る；例えば、限定されるものではないが、真空浸透プロトコールによる方法である。

【0110】

他方、(i)アミノ酸配列 C y s - X a a ₁ - X a a ₂ - X a a ₃ - X a a ₄ - C y s [配列番号：1](X a a ₁、X a a ₂、X a a ₃、およびX a a ₄は独立してアミノ酸を表す)および(ii)それらの間でジスルフィド架橋を形成する(i)に示すアミノ酸配列のシステイン残基を含むペプチドをエンコードする核酸(以下、核酸(a)という)、および本発明の構築物の両方もまた原核生物レプリコンを含む1つのベクターに取り込むことができる；すなわち、該レプリコンは自律性の複製を指向し、バクテリアなどの原核宿主細胞に導入されたときに、組換えDNA分子を染色体外に保持することができるものである。該レプリコンは技術上既知である。原核生物レプリコンを含むベクターは、さらに一般に、遺伝子構築物挿入のための制限部位を含む。これらのベクターは、例えば、米国特許US6,268,552に記載されているように、現在の技術水準において既知である。

30

40

【0111】

同様に、該ベクターはまた、形質転換された光合成生物、例えば、植物細胞および/または組織、または藻類細胞中に、異種DNAの存在をチェックするためのマーカーを含み得る。当該光合成生物、例えば、植物細胞中の異種DNAの選択を可能とする遺伝子マーカーの例は、抗生物質(例えば、アンピシリン、テトラサイクリン、カナマイシン、ハイグロマイシン、ゲンタマイシンなど)に対する耐性を付与する遺伝子である。ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子は、原核細胞と真核細胞の両方で発現され得る利点を有する。このマーカーは、条件を満たして形質転換された光合成生物、例えば、植物の選択を可能とする；当該生物は、それらが適切な耐性遺伝子を取り込んでいるために、相当する抗生物質を含有する培地中でも増殖し得る。

50

【0112】

光合成生物（例えば、植物細胞もしくは組織、または藻類細胞）を形質転換し、トランスジェニック光合成生物（例えば、トランスジェニック植物またはトランスジェニック藻類）を生成させるための当該核酸（a）の導入並びに当該遺伝子構築物の導入は、上に述べたように、現在の技術水準において既知の手段により実施し得る；例えば、限定されるものではないが、A. ツメファシエンス（*A. tumefaciens*）が仲介するDNA転移、好ましくは、非武装化T-DNAベクター、エレクトロポレーション、直接的DNA転移、粒子衝撃などによって実施し得る（これらのトピックスに関する改訂版については、例えば、以下を参照：Marta Izquierdo Rojo in “Ingenieria Genetica y Transferencia Genetica”, 1999, Ediciones Piramide, S.A. Madrid）。

10

【0113】

別の態様において、本発明は、当該核酸（a）、本発明による遺伝子構築物または上記したようなベクターを含む宿主細胞に関する。本発明による遺伝子構築物または上に記載のベクターを含有するために適する宿主細胞は、限定されるものではないが、原核生物細胞、酵母または真核生物細胞、例えば、昆虫細胞などである。当業者も理解するように、形質転換すべき宿主細胞により、本発明の遺伝子構築物またはそれを含有するベクターは、原核生物細胞および生物体（例えば、バクテリアなど）において機能的であり得るか、または真核生物細胞および生物体（例えば、昆虫細胞、哺乳動物細胞など）において機能的であり得る発現制御配列を含み得る。

20

【0114】

別の態様において、本発明は、当該核酸（a）、または本発明の当該遺伝子構築物をそのゲノムに組み込んで含むトランスジェニック植物細胞または藻類に関する。形質転換植物細胞もしくは組織、または藻類を培養し、トランスジェニック植物または藻類を再生するための技術は、当該植物または藻類の培養および増殖条件と同じく、現在の技術水準で周知である（参照例：上記のMarta Izquierdo（1999））。

【0115】

このように、本発明の遺伝子構築物で形質転換した植物細胞から得られるトランスジェニック植物、または本発明の遺伝子構築物で形質転換した藻類は、本発明のさらなる発明の態様を構成する。

30

【0116】

本発明成長因子の使用

光合成生物のバイオマスを増量する本発明の成長因子の能力は、光合成生物に依存する異なる産業での利用性を有する。従って、先の発明の態様にて述べたように、本発明の成長因子は、エネルギーの生産において、木材の取得において、ヒトもしくは動物の栄養において、または草花栽培において観賞植物の外観改善法として使用されつつある珪藻または植物のバイオマスを増量する際に使用し得る。

【実施例】

【0117】

以下の実施例は、本発明を説明するものであって、本発明の範囲を限定するものと見做してはならない。

40

【0118】

[実施例1]

ニンジンおよびタバコ植物における植物バイオマスの増量

材料と方法

ニンジン（ダウカス・カロタ；*Daucus carota*）およびタバコ（ニコチアナ・タバクム；*Nicotiana tabacum*）のカルスは、カロライナ・バイオロジカル・サプライ・カンパニー（Carolina Biological Supply Company）（パーリントン、ノースカロライナ、米国）から供給され、それぞれについてニンジンまたはタバコ用の固体カルス開始培地（同様に、カロライナ・バイオロジカルから調達）にて、無菌状態で保存された。その特定の組成物は同社のカタログにて入手し得る。

50

【 0 1 1 9 】

無菌条件下に1個のカルスを小片に分割して重量を測定し、合成ペプチド・ヒトアドレノメジュリン (AM) (フェニックス・ファーマシューティカルス (Phoenix Pharmaceuticals)、バーリンゲーム、カリフォルニア、米国) を異なる濃度で含む新鮮な培地 (カロライナ・バイオロジカルから調達した固体カルス開始培地) に播種した。暗所での増殖の30日後に、カルスを再度秤量し、成長率は最終重量を開始重量で割って得た商として計算した。

各サンプルの乾燥重量は、カルスを250 で24時間、オープン乾燥工程に付すことにより算出した。

【 0 1 2 0 】

結果

ニンジンおよびタバコの両方において、用量依存的応答に続いてカルスの成長増量が認められた (図1)。細胞増殖を促進するAMの最も有効な濃度は 10^{-10} Mであった。より緩やかな増殖の増加はより低いか、またはより高い濃度で起こった。対照と比較した場合、バイオマスの60%増量が、AMの最適用量で得られた。

【 0 1 2 1 】

この質量の増加が組織の水和増加によるものではないことを証明するために、組織の乾燥重量を測定し、その差が維持されていることを見出し、バイオマスの増加が関係する組織の正味の増殖に相当することを示した。

【 0 1 2 2 】

カルス細胞に観察される効果は、カルス細胞成長 (細胞増殖) の増加からなり、全植物に完全に伝達される。時には、細胞増殖の増加が植物の感応受容性または物理的性質に影響するであろう。しかし、バイオマスの増量はそれがカルス細胞にて生じるように、植物においても生じるであろう。

【 0 1 2 3 】

[実施例 2]

クロレラ属の微細藻類における藻類バイオマスの増量

材料と方法

ギラード (Guillard) F / 2 培地中、2つの同一のクロレラ培養物 [Guillard, R.R.L. 1975. 海洋無脊椎動物の飼育用植物プランクトンの培養、pp 26-60; In Smith W.L. and Chanley M.H (Eds.), 海洋無脊椎動物の培養。Plenum Press, New York, USA; Guillard, R.R.L. and Ryther, J.H. 1962. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve. Can. J. Microbiol. 8: 229-239] (それぞれ250 ml) を2つの別個のガラスフラスコにて調製した。次いで、当該ギラードF / 2 培地100 μ l を1つのフラスコに加え、他方のフラスコには最終濃度 10^{-8} Mとなる十分な量の合成ペプチド・ヒトアドレノメジュリン (AM) (フェニックス・ファーマシューティカルス、バーリンゲーム、カリフォルニア、米国) を含むギラードF / 2 培地を加えた。

【 0 1 2 4 】

5% CO₂ 含有空気を連続的に培養液に吹き込んだ。フラスコには12時間の光 / 12時間の暗所の光周期で光照射した。

【 0 1 2 5 】

培地の一部を定期的に採取し、微細藻類の増殖を評価した。吸光度はパーキンエルマー・ラムダ35 UV / 可視スペクトロホトメーターにより680 nmにて測定した。

【 0 1 2 6 】

結果

AM - 処理した微細藻類は未処理の微細藻類よりもより急速に増殖し、より早く定常期に到達する。

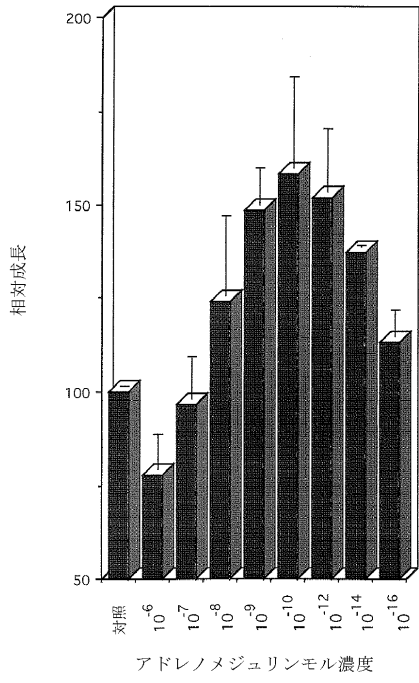
10

20

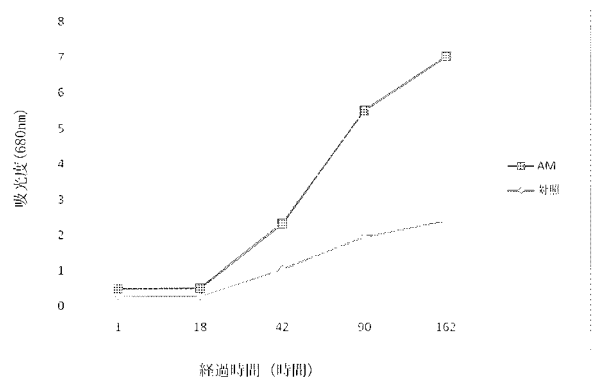
30

40

【 図 1 】



【 図 2 】



【 配 列 表 】

2013529902000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2011/058464

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A01H3/04 C07K14/415 C07K14/435 C12N15/82 ADD.		
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) A01H C07K C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBL, FSTA, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2004/035798 A2 (CROPDESIGN NV [BE]; INZE DIRK [BE]; DE VEYLDER LIEVEN [BE]; VLIEGHE KO) 29 April 2004 (2004-04-29) claim 4; sequence 1848 -----	1,2,5-8, 11-13, 16-21
X	WO 2010/046221 A1 (BASF PLANT SCIENCE GMBH [DE]; SCHOEN HARDY [DE]; THIMM OLIVER [DE]; RI) 29 April 2010 (2010-04-29) claims 1,2,11,31; table 1; sequences 4659,4660 -----	1,2, 10-13, 18-21
A	DATABASE UniProt [Online] 2 March 2010 (2010-03-02), XP002599053, Database accession no. P43145 the whole document ----- -/--	1-21
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document 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 12 July 2011		Date of mailing of the international search report 28/07/2011
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Obel, Nicolai

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2011/058464

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>DATABASE UniProt [Online]</p> <p>9 February 2010 (2010-02-09), XP002599054, Database accession no. Q84RF4 the whole document</p> <p>-----</p>	1-21
A	<p>DATABASE UniProt [Online]</p> <p>20 April 2010 (2010-04-20), XP002599055, Database accession no. Q9XF50 the whole document</p> <p>-----</p>	1-21
X	<p>US 2006/235213 A1 (ALEXANDROV NICKOLAI [US] ET AL) 19 October 2006 (2006-10-19)</p> <p>paragraph [0008]; claim 2; sequence 2</p> <p>-----</p>	1,2,6, 10-13, 20,21
X,P	<p>WO 2011/044254 A1 (CERES INC [US]; APUYA NESTOR [US]) 14 April 2011 (2011-04-14)</p> <p>claim 2; sequences 19,1338,2352,2777,2822,2823</p> <p>-----</p>	1-6,9, 11-15, 18-21
A	<p>DONATO GIANNINO ET AL: "The overexpression of asparagine synthetase A from E. coli affects the nitrogen status in leaves of lettuce (Lactuca sativa L.) and enhances vegetative growth", EUPHYTICA, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, DO, vol. 162, no. 1, 9 August 2007 (2007-08-09), pages 11-22, XP019603821, ISSN: 1573-5060 the whole document</p> <p>-----</p>	1-15
A	<p>SUZUKI NOBUHIRO ET AL: "Enhanced tolerance to environmental stress in transgenic plants expressing the transcriptional coactivator multiprotein bridging factor 1c 1[W]", PLANT PHYSIOLOGY, AMERICAN SOCIETY OF PLANT PHYSIOLOGISTS, ROCKVILLE, MD, US LNKD- DOI:10.1104/PP.105.070110, vol. 139, no. 3, 1 November 2005 (2005-11-01), pages 1313-1322, XP002455481, ISSN: 0032-0889 abstract; table 1</p> <p>-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2011/058464

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>GORR SVEN-ULRIK: "Antimicrobial peptides of the oral cavity.", PERIODONTOLOGY 2000 2009 LNKD- PUBMED:19878474, vol. 51, 2009, pages 152-180, XP002599056, ISSN: 1600-0757 page 154, column 2, line 9 - line 25; table 4A</p> <p>-----</p>	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2011/058464**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.:
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 additional sheet

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 an 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.:

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 Application No. PCT/ EP2011/ 058464

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 3, 4, 14, 15(completely); 1, 2, 5-13, 16-21(partially)

Regards SEQ ID NO 7

2. claims: 1, 2, 5-13, 16-21(all partially)

Regards SEQ ID NO 2

3. claims: 1, 2, 5-13, 16-21(all partially)

Regards SEQ ID NO 3

4. claims: 1, 2, 5-13, 16-21(all partially)

Regards SEQ ID NO 4

5. claims: 1, 2, 5-13, 16-21(all partially)

Regards SEQ ID NO 5

6. claims: 1, 2, 5-13, 16-21(all partially)

Regards SEQ ID NO 6

7. claims: 1, 2, 5-13, 16-21(all partially)

Regards SEQ ID NO 8

8. claims: 1, 2, 5-13, 16-21(all partially)

Regards SEQ ID NO 9

9. claims: 1, 2, 5-13, 16-21(all partially)

Regards SEQ ID NO 10

10. claims: 1, 2, 5-13, 16-21(all partially)

Regards SEQ ID NO 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2011/058464

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004035798	A2	29-04-2004	
		AU 2003298095 A1	04-05-2004
		EP 1551983 A2	13-07-2005
		EP 2302062 A1	30-03-2011
		EP 2316953 A2	04-05-2011
		US 2006021088 A1	26-01-2006
		US 2011162107 A1	30-06-2011

WO 2010046221	A1	29-04-2010	
		AU 2009306575 A1	29-04-2010
		CA 2740257 A1	29-04-2010

US 2006235213	A1	19-10-2006	NONE

WO 2011044254	A1	14-04-2011	NONE

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
A 0 1 H 5/00 (2006.01)	A 0 1 H 5/00	A
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A
C 1 2 N 5/04 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	2 0 3
A 0 1 G 7/06 (2006.01)	A 0 1 G 7/06	A
C 0 7 K 14/47 (2006.01)	C 0 7 K 14/47	

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

(72) 発明者 マルチネス ラミレス, アルフレッド
 スペイン国, E - 2 6 1 4 4 ギャリレア - ラ リオジャ, 1 0, エンリケ マロ, バイオマス
 ブースター, エス . エル .

(72) 発明者 アレナス バイダル, ジョルジュ コンラッド
 スペイン国, E - 2 6 1 4 4 ギャリレア - ラ リオジャ, 1 0, エンリケ マロ, バイオマス
 ブースター, エス . エル .

F ターム(参考) 2B022 EA01

2B030 AA02 AB03 AD07 CA14 CD17

4B024 AA08 AA17 BA79 BA80 DA01 FA02 GA11 GA17

4B065 AA84X AA89X AB01 BA01 BB34 BC48 CA53

4H045 BA09 CA40 CA41 DA30 EA05