

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7668465号
(P7668465)

(45)発行日 令和7年4月25日(2025.4.25)

(24)登録日 令和7年4月17日(2025.4.17)

(51)国際特許分類		F I		
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	Z N A
C 1 2 N	15/31 (2006.01)	C 1 2 N	15/31	
H 0 1 M	8/16 (2006.01)	H 0 1 M	8/16	
C 1 2 N	1/13 (2006.01)	C 1 2 N	1/13	
請求項の数 1 (全43頁)				
(21)出願番号	特願2021-558359(P2021-558359)	(73)特許権者	314012076	
(86)(22)出願日	令和2年11月16日(2020.11.16)		パナソニックIPマネジメント株式会社	
(86)国際出願番号	PCT/JP2020/042553		大阪府門真市元町2番6号	
(87)国際公開番号	WO2021/100643	(74)代理人	100109210	
(87)国際公開日	令和3年5月27日(2021.5.27)		弁理士 新居 広守	
審査請求日	令和5年11月1日(2023.11.1)	(74)代理人	100137235	
(31)優先権主張番号	特願2019-210255(P2019-210255)		弁理士 寺谷 英作	
(32)優先日	令和1年11月21日(2019.11.21)	(74)代理人	100131417	
(33)優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)		弁理士 道坂 伸一	
		(72)発明者	草間 翔子	
			日本国大阪府門真市大字門真1006番	
			地 パナソニックホールディングス株式	
			会社内	
		(72)発明者	児島 征司	
			日本国大阪府門真市大字門真1006番	
			最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 改変シアノバクテリア

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】
外膜のタンパク質透過性を向上させるチャンネルタンパク質が発現されている改変シアノバクテリアであって、
前記改変シアノバクテリアは、外部に電子を供給することをを行い、
前記外膜のタンパク質透過性を向上させるチャンネルタンパク質は、
配列番号13で示されるアミノ酸配列からなるCpPS、
配列番号14で示されるアミノ酸配列からなるCpPF、又は、
これらのいずれかのチャンネルタンパク質とアミノ酸配列が90%以上同一であるタンパク質である、
電子伝達体として機能する改変シアノバクテリア。

【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【0001】
本開示は、改変シアノバクテリアを含む電子伝達体、電子伝達体の製造方法、及び、電子伝達方法に関する。
【背景技術】
【0002】
微生物細胞が細胞外環境と電子伝達を行う現象を利用する技術開発が近年注目されている。例えば、グラム陰性細菌のShewanella属又はGeobacter属の細菌は、有機物を細胞

内で異化するときに生じる電子を、シトクロムなどの電子伝達機能を持つ生体分子を介して細胞外へ放出することが知られている（非特許文献1）。このような現象を、例えば污水处理技術に導入して、有機性排水から資源の回収を実現できる生物電気化学システム（例えば、発電装置）が期待されている（特許文献1）。また、光合成により細胞内で生じる電子を微生物太陽電池として利用可能である（非特許文献3）。また、例えば、電極表面の改質（非特許文献5、及び、非特許文献6）、又は、メディエータ化合物（非特許文献7）により、シアノバクテリアと電極との間の電子伝達効率が向上することが報告されている。なお、シアノバクテリアは、細胞外電子伝達の他に、光合成により種々の有用物質（例えば、アルコール類、アルカン類、及び、脂肪酸等）を生産することも知られている（特許文献2、及び、非特許文献4）。

10

【0003】

一方、細胞外から微生物細胞に電子を送り込み、微生物細胞の代謝を活性化して物質生産の効率向上を狙う技術開発も進められている（例えば、非特許文献2）。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【文献】特開2018-142408号公報

【文献】特許第6341676号公報

【非特許文献】

【0005】

20

【文献】J. A. Gralnick and D. K. Newman, "Extracellular respiration", *Molecular Microbiology*, Wiley-Blackwell, 2007, Vol.65, pp.1-11

【文献】Junling Guo et al., "Light-driven fine chemical production in yeast bio hybrids", *Science*, American Association for the Advancement of Science, 2018, Vol.362, Issue 6416, pp.813-816

【文献】Alistair J. McCormick et al., "Photosynthetic biofilms in pure culture harness solar energy in a mediatorless bio-photovoltaic cell (BPV) system", *Energy & Environmental Science*, Royal Society of Chemistry, 2011, Vol.4, pp. 4699-4709

【文献】Ducat DC et al., "Engineering cyanobacteria to generate high-value products", *Trends in Biotechnology*, Elsevier BV, 2011, Vol.29, pp.95-103

30

【文献】Hasan K et al., "Photo-electrochemical communication between cyanobacteria (*Leptolyngbia* sp.) and osmium redox polymer modified electrodes", *Physical Chemistry Chemical Physics*, Royal Society of Chemistry, 2014, Vol. 16, pp.24676-24680

【文献】Jenny Z. Zhang et al., "Photoelectrochemistry of Photosystem II in Vitro vs in Vivo", *Journal of American Chemical Society*, American Chemical Society, 2018, Vol.140, pp.6-9

【文献】Nishio K et al., "Electrochemical detection of circadian redox rhythm in cyanobacterial cells via extracellular electron transfer", *Plant and Cell Physiology*, Japanese Society of Plant Physiologists, 2015, Vol.56, pp.1053-1058

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

しかしながら、上記の従来技術では、シアノバクテリアの細胞外電子伝達効率は低く、細胞外電子伝達効率の向上が望まれている。

【0007】

そこで、本開示は、細胞外電子伝達効率が向上した改変シアノバクテリアを含むことにより、外部との電子伝達効率が向上した電子伝達体、電子伝達体の製造方法、及び、電子伝達方法を提供する。

50

【課題を解決するための手段】

【0008】

本開示の一態様に係る電子伝達体は、(i)シアノバクテリアにおいて外膜と細胞壁との結合に関与するタンパク質の機能が抑制又は喪失されている、及び、(ii)前記外膜のタンパク質透過性を向上させるチャンネルタンパク質が発現されている、の少なくとも1つである改変シアノバクテリアを含み、前記改変シアノバクテリアは、外部に電子を供給すること、及び、外部から電子を取り込むことの少なくとも1つを行う。

【発明の効果】

【0009】

本開示の電子伝達体、及び、電子伝達体の製造方法によれば、外部との電子伝達効率が向上した電子伝達体を提供することができる。また、本開示の電子伝達方法によれば、電子伝達体から外部への電子の供与、及び、外部からの電子伝達体の電子の受容の少なくとも1つの効率が向上する。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】図1は、シアノバクテリアの細胞表層を模式的に示した図である。

【図2】図2は、本実施の形態に係る電子伝達体の一例を示す模式図である。

【図3】図3は、実施例1の改変シアノバクテリアの超薄切片の透過型電子顕微鏡観察像である。

【図4】図4は、図3の破線領域Aの拡大像である。

【図5】図5は、実施例2の改変シアノバクテリアの超薄切片の透過型電子顕微鏡像である。

【図6】図6は、図5の破線領域Bの拡大像である。

【図7】図7は、比較例1の改変シアノバクテリアの超薄切片の透過型電子顕微鏡像である。

【図8】図8は、図7の破線領域Cの拡大図である。

【図9】図9は、実施例1、実施例2、実施例3及び比較例1の改変シアノバクテリアの培養液中のタンパク質量 ($n=3$ 、エラーバー=SD) を示すグラフである。

【図10】図10は、電気化学測定装置の構成の一例を概略的に示す分解斜視図である。

【図11】図11は、図10のX I - X I 断面線における概略断面図である。

【図12】図12は、比較例1の改変シアノバクテリアの培養液に光を照射した際に流れる電流を測定した結果を示す図である。

【図13】図13は、実施例2の改変シアノバクテリアの培養液に光を照射した際に流れる電流を測定した結果を示す図である。

【図14】図14は、実施例3の改変シアノバクテリアの培養液に光を照射した際に流れる電流を測定した結果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0011】

(本開示の基礎となった知見)

微生物細胞が細胞外環境と電子伝達を行う現象を利用する技術開発が近年注目されている。例えば、グラム陰性細菌の *Shewanella* 属又は *Geobacter* 属の細菌は、有機物を細胞内で異化するとき生じる電子を、シトクロムなどの電子伝達機能を持つ生体分子を介して細胞外へ放出することが知られている(非特許文献1)。このように、微生物から放出された電子を外部電極で受容すれば、有機物を燃料とした微生物燃料電池として利用でき、例えば有機物を含む污水处理過程に導入して発電装置として利用するなどの応用が期待されている(特許文献1)。

【0012】

一方で、細胞外から微生物細胞に向けて電子を送り込み、細胞の代謝を活性化して物質生産の効率向上を狙う技術開発も進められている。例えば、非特許文献2では、リン化インジウムのナノ粒子を酵母細胞に接着させ、当該ナノ粒子の光電変換反応で発生した電子

10

20

30

40

50

を細胞内に取り込ませることで細胞内代謝に利用される還元力を補充し、グルコース原料からのシキミ酸生産効率を向上できることが報告されている。

【0013】

上記のように、微生物の利用は、化学燃料に依存せず、かつ、環境低負荷なエネルギー生産及び物質生産を実現できる。中でも、シアノバクテリア及び藻類などの光合成微生物は、光をエネルギー源として空気中の二酸化炭素（ CO_2 ）を炭素原料として利用できるため、カーボンニュートラルな次世代の物質生産系として特に期待が持たれている。

【0014】

シアノバクテリア（藍色細菌又は藍藻とも呼ばれる）は、真正細菌の一群であり、光合成により水を分解して酸素を産生し、得たエネルギーにより空気中の CO_2 を固定する。なお、シアノバクテリアは、種によっては、空気中の窒素（ N_2 ）も固定できる。また、シアノバクテリアの特性として、生育が早く光利用効率が高いことが知られており、加えてその他の藻類種と比較して遺伝子操作が容易であるため、光合成微生物の中でもシアノバクテリアの利用に関して活発な研究開発が行われている。

【0015】

例えば、シアノバクテリアが細胞外電子伝達を行う性質を利用して、光合成による水の電解時にシアノバクテリアの細胞内で発生する電子を外部電極で受容すれば、水と、シアノバクテリアと、一対の電極とを備える簡単な構成で、微生物太陽電池として利用できる（非特許文献3）。

【0016】

また、シアノバクテリアを用いた物質生産の例として、アルコール類、アルカン類、及び、脂肪酸等が報告されている（特許文献2及び非特許文献4）。シアノバクテリアは高い光合成能力を有するものの、例えば、夜間又は夕方、雨天若しくは曇天時などの弱光時に十分な光エネルギーを得ることができない。そのため、シアノバクテリアの細胞外から細胞内に電子を送り込むことができれば、夜間又は弱光時に不足する細胞内の還元力を外部から補充できるため、物質生産効率の向上につながると期待されている。

【0017】

なお、シアノバクテリアと外部電極との電子伝達効率を向上させる手段としては、電極表面の改質（非特許文献5及び非特許文献6）、及び、メディエータ化合物（非特許文献7）が報告されている。

【0018】

以上のように、シアノバクテリアの細胞外電子伝達を応用する技術開発が期待されているが、その電子伝達効率は未だ低いレベルであり、細胞外電子伝達効率をより高める技術の開発が望まれている。

【0019】

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意検討した結果、シアノバクテリアの外膜を細胞壁から部分的に脱離させる、又は、外膜の物質透過性を向上させることにより、改変シアノバクテリアが細胞と外部電極との間の電子伝達効率が向上することを見出した。より具体的には、シアノバクテリアの外膜の脱離又は物質透過性の向上により、改変シアノバクテリアが細胞内の電子伝達体を細胞外に分泌すること、及び、細胞外の電子伝達体を細胞内に取り込むことの少なくとも1つを行うことができることを見出した。これにより、改変シアノバクテリアの細胞外電子伝達効率が向上するため、改変シアノバクテリアを含む電子伝達体は、外部との電子伝達を効率良く行うことができる。

【0020】

そこで、本開示は、外部との電子伝達効率が向上した電子伝達体、及び、電子伝達体の製造方法を提供する。また、本開示は、電子伝達体から外部への電子の供与、及び、電子伝達体の外部からの電子の受容の少なくとも1つの効率が向上する電子伝達方法を提供する。

【0021】

（本開示の概要）

本開示の一態様の概要は、以下の通りである。

【0022】

本開示の一態様に係る電子伝達体は、(i)シアノバクテリアにおいて外膜と細胞壁との結合に関与するタンパク質の機能が抑制又は喪失されている、及び、(ii)前記外膜のタンパク質透過性を向上させるチャンネルタンパク質が発現されている、の少なくとも1つである改変シアノバクテリアを含み、前記改変シアノバクテリアは、外部に電子を供給すること、及び、外部から電子を取り込むことの少なくとも1つを行う。

【0023】

上記(i)により、改変シアノバクテリアでは、細胞壁と外膜との結合(例えば、結合量及び結合力)が部分的に低減するため、外膜が細胞壁から部分的に脱離しやすくなる。そのため、細胞内で生成した電子又は電子を有する物質若しくは分子が外膜の外、つまり、細胞外に漏出しやすくなる。また、上記(ii)により、改変シアノバクテリアでは、外膜のタンパク質透過性が向上するため、外膜の物質透過性が向上する。これにより、改変シアノバクテリアは、細胞内で生成した電子又は電子を有する物質若しくは分子を細胞外に分泌すること、及び、細胞外の電子又は電子を有する物質若しくは分子を細胞内に取り込むこと、の少なくとも1つを行うことができる。そのため、改変シアノバクテリアでは、細胞外電子伝達効率が向上する。したがって、本開示の一態様に係る電子伝達体は、外部との電子伝達効率が向上する。

【0024】

なお、外部とは、電子伝達体と別の個体として存在する物質又は分子であり、例えば、物質間の電子の移動に関わる酸化還元物質、又は、酸化還元反応基を有する分子などである。

【0025】

例えば、本開示の一態様に係る電子伝達体では、前記改変シアノバクテリアは、光を受けて電子を生成し、生成した前記電子を前記外膜の外に放出してもよい。

【0026】

これにより、改変シアノバクテリアは光を受けると細胞の外に電子又は電子を有する物質若しくは分子を放出する。そのため、本開示の一態様に係る電子伝達体は、光を照射されると内部で電子を生成し、外部に電子又は電子を有する物質若しくは分子を供給することができる。

【0027】

例えば、本開示の一態様に係る電子伝達体では、前記改変シアノバクテリアは、前記外膜の外側に存在する電子を前記細胞壁の内側に取り込み、前記細胞壁の内側で前記電子を利用してよい。

【0028】

これにより、改変シアノバクテリアは、細胞外に存在する電子又は電子を有する物質若しくは分子を細胞内(細胞質内)に取り込んで、例えば、光合成電子伝達系を流れる過程の中でエネルギー(ATP: adenosine triphosphate)を生成する。そして、改変シアノバクテリアは、このエネルギーを利用して二酸化炭素を基に有機物を産生する。そのため、本開示の一態様に係る電子伝達体は、外部から内部に電子を取り込んでエネルギーを生成し、タンパク質などの有機物を産生することができる。

【0029】

例えば、本開示の一態様に係る電子伝達体では、前記(i)において、前記外膜と前記細胞壁との結合に関与するタンパク質は、SLH(Surface Layer Homology)ドメイン保持型外膜タンパク質、及び、細胞壁-ピルビン酸修飾酵素の少なくとも1つであってもよい。

【0030】

これにより、改変シアノバクテリアでは、例えば、(a)細胞壁と結合するSLHドメイン保持型外膜タンパク質及び細胞壁の表面の結合糖鎖をピルビン酸修飾する反応を触媒する酵素(つまり、細胞壁-ピルビン酸修飾酵素)の少なくとも1つの機能が抑制若しく

10

20

30

40

50

は喪失されている、又は、(b) S L Hドメイン保持型外膜タンパク質、及び、細胞壁ーピルビン酸修飾酵素の少なくとも1つの発現が抑制されている。そのため、外膜中のS L Hドメイン保持型外膜タンパク質のS L Hドメインと、細胞壁の表面の共有結合型の糖鎖との結合（つまり、結合量及び結合力）が低減する。その結果、外膜と細胞壁との結合が弱まった部分において外膜が細胞壁から脱離しやすくなる。これにより、改変シアノバクテリアは、細胞内の電子又は電子を有する物質若しくは分子を細胞外に分泌すること、及び、細胞外の電子又は電子を有する物質若しくは分子を細胞内に取り込むことの少なくとも1つを行うことができるため、細胞外電子伝達効率が向上する。したがって、本開示の一態様に係る電子伝達体は、外部との電子伝達効率が向上する。

【0031】

例えば、本開示の一態様に係る電子伝達体では、前記S L Hドメイン保持型外膜タンパク質は、配列番号1で示されるアミノ酸配列からなるSlr1841、配列番号2で示されるアミノ酸配列からなるNIES970_09470、配列番号3で示されるアミノ酸配列からなるAnacy_3458、または、これらのいずれかのS L Hドメイン保持型外膜タンパク質とアミノ酸配列が50%以上同一であるタンパク質であってもよい。

【0032】

これにより、改変シアノバクテリアでは、例えば、(a) 上記の配列番号1～3で示されるいずれかのS L Hドメイン保持型外膜タンパク質又はこれらのいずれかのS L Hドメイン保持型外膜タンパク質とアミノ酸配列が50%以上同一であるタンパク質の機能が抑制若しくは喪失されている、又は、(b) 上記の配列番号1～3で示されるいずれかのS L Hドメイン保持型外膜タンパク質又はこれらのいずれかのS L Hドメイン保持型外膜タンパク質とアミノ酸配列が50%以上同一であるタンパク質の発現が抑制されている。そのため、改変シアノバクテリアでは、(a) 外膜中のS L Hドメイン保持型外膜タンパク質若しくはS L Hドメイン保持型外膜タンパク質と同等の機能を有するタンパク質の機能が抑制若しくは喪失される、又は、(b) 外膜中のS L Hドメイン保持型外膜タンパク質若しくはS L Hドメイン保持型外膜タンパク質と同等の機能を有するタンパク質の発現量が低減する。その結果、改変シアノバクテリアでは、外膜の結合ドメイン（例えばS L Hドメイン）が細胞壁と結合する結合量及び結合力が低減するため、外膜が細胞壁から部分的に脱離しやすくなる。したがって、本開示の一態様に係る電子伝達体は、外部との電子伝達効率が向上する。

【0033】

例えば、本開示の一態様に係る電子伝達体では、前記細胞壁ーピルビン酸修飾酵素は、配列番号4で示されるアミノ酸配列からなるSlr0688、配列番号5で示されるアミノ酸配列からなるSynpcc7942_1529、配列番号6で示されるアミノ酸配列からなるAnacy_1623、又は、これらのいずれかの細胞壁ーピルビン酸修飾酵素とアミノ酸配列が50%以上同一であるタンパク質であってもよい。

【0034】

これにより、改変シアノバクテリアでは、例えば、(a) 上記の配列番号4～6で示されるいずれかの細胞壁ーピルビン酸修飾酵素若しくはこれらのいずれかの細胞壁ーピルビン酸修飾酵素とアミノ酸配列が50%以上同一であるタンパク質の機能が抑制又は喪失されている、又は、(b) 上記の配列番号4～6で示されるいずれかの細胞壁ーピルビン酸修飾酵素若しくはこれらのいずれかの細胞壁ーピルビン酸修飾酵素とアミノ酸配列が50%以上同一であるタンパク質の発現が抑制されている。そのため、改変シアノバクテリアでは、(a) 細胞壁ーピルビン酸修飾酵素又は当該酵素と同等の機能を有するタンパク質の機能が抑制若しくは喪失される、又は、(b) 細胞壁ーピルビン酸修飾酵素又は当該酵素と同等の機能を有するタンパク質の発現量が低減する。これにより、細胞壁の表面の共有結合型の糖鎖がピルビン酸で修飾されにくくなるため、細胞壁の糖鎖が外膜中のS L Hドメイン保持型外膜タンパク質のS L Hドメインと結合する結合量及び結合力が低減する。その結果、改変シアノバクテリアでは、細胞壁の表面の共有結合型の糖鎖がピルビン酸で修飾されにくくなるため、細胞壁と外膜との結合力が弱まり、外膜が細胞壁から部分的

10

20

30

40

50

に脱離しやすくなる。したがって、本開示の一態様に係る電子伝達体は、外部との電子伝達効率が向上する。

【0035】

例えば、本開示の一態様に係る電子伝達体では、前記(i)において、前記外膜と前記細胞壁との結合に関与するタンパク質を発現させる遺伝子が欠失又は不活性化されていてもよい。

【0036】

これにより、上記(i)の改変シアノバクテリアでは、細胞壁と外膜との結合に関与するタンパク質の発現が抑制されるため、又は、当該タンパク質の機能が抑制若しくは喪失されるため、細胞壁と外膜との結合（いわゆる、結合量及び結合力）が部分的に低減する。その結果、外膜と細胞壁との結合が弱まった部分において外膜が細胞壁から脱離しやすくなる。これにより、上記(i)の改変シアノバクテリアでは、細胞内の電子又は電子を有する物質若しくは分子を細胞外に分泌すること、及び、細胞外の電子又は電子を有する物質若しくは分子を細胞内に取り込むことの少なくとも1つを行うことができるため、細胞外電子伝達効率が向上する。したがって、本開示の一態様に係る電子伝達体は、外部との電子伝達効率が向上する。

【0037】

例えば、本開示の一態様に係る電子伝達体では、前記外膜と細胞壁との結合に関与するタンパク質を発現させる遺伝子は、SLHドメイン保持型外膜タンパク質をコードする遺伝子、及び、細胞壁ーピルビン酸修飾酵素をコードする遺伝子の少なくとも1つであってもよい。

【0038】

これにより、改変シアノバクテリアでは、SLHドメイン保持型外膜タンパク質をコードする遺伝子、及び、細胞壁ーピルビン酸修飾酵素をコードする遺伝子の少なくとも1つの遺伝子が欠失又は不活性化されている。そのため、改変シアノバクテリアでは、例えば、(a) SLHドメイン保持型外膜タンパク質及び細胞壁ーピルビン酸修飾酵素の少なくとも1つの発現が抑制される、又は、(b) SLHドメイン保持型外膜タンパク質及び細胞壁ーピルビン酸修飾酵素の少なくとも1つの機能が抑制若しくは喪失される。そのため、外膜中のSLHドメイン保持型外膜タンパク質のSLHドメインと、細胞壁の表面の共有結合型の糖鎖との結合（つまり、結合量及び結合力）が低減する。これにより、改変シアノバクテリアでは、外膜と細胞壁との結合が弱まった部分において外膜が細胞壁から脱離しやすくなるため、細胞内の電子又は電子を有する物質若しくは分子が細胞外に漏出しやすくなる。したがって、本開示の一態様に係る電子伝達体は、改変シアノバクテリアにおいて細胞内の電子又は電子を有する物質若しくは分子が細胞外に漏出しやすくなるため、外部との電子伝達効率が向上する。

【0039】

本開示の一態様に係る電子伝達体は、前記SLHドメイン保持型外膜タンパク質をコードする遺伝子は、配列番号7で示される塩基配列からなるslr1841、配列番号8で示される塩基配列からなるnies970_09470、配列番号9で示される塩基配列からなるanacy_3458、又は、これらのいずれかの遺伝子と塩基配列が50%以上同一である遺伝子であってもよい。

【0040】

これにより、改変シアノバクテリアでは、上記の配列番号7～9で示されるいずれかのSLHドメイン保持型外膜タンパク質をコードする遺伝子又はこれらのいずれかの遺伝子の塩基配列と50%以上同一である遺伝子が欠失又は不活性化される。そのため、改変シアノバクテリアでは、(a) 上記のいずれかのSLHドメイン保持型外膜タンパク質若しくはこれらのいずれかのタンパク質と同等の機能を有するタンパク質の発現が抑制される、又は、(b) 上記のいずれかのSLHドメイン保持型外膜タンパク質若しくはこれらのいずれかのタンパク質と同等の機能を有するタンパク質の機能が抑制若しくは喪失される。そのため、改変シアノバクテリアでは、外膜が細胞壁と結合するための結合ドメイン（

10

20

30

40

50

例えばSLHドメイン)が細胞壁と結合する結合量及び結合力が低減する。その結果、外膜が細胞壁から部分的に脱離しやすくなるため、細胞内の電子又は電子を有する物質若しくは分子が細胞外に漏出しやすくなる。これにより、改変シアノバクテリアは、細胞外電子伝達効率が向上するため、本開示の一態様に係る電子伝達体は、外部との電子伝達効率が向上する。

【0041】

例えば、本開示の一態様に係る電子伝達体では、前記細胞壁ーピルビン酸修飾酵素をコードする遺伝子は、配列番号10で示される塩基配列からなるslr0688、配列番号11で示される塩基配列からなるsynpcc7942_1529、配列番号12で示される塩基配列からなるanacy_1623、又は、これらのいずれかの遺伝子と塩基配列が50%以上同一である遺伝子であってもよい。

10

【0042】

これにより、改変シアノバクテリアでは、上記の配列番号10～12で示されるいずれかの細胞壁ーピルビン酸修飾酵素をコードする遺伝子又はこれらのいずれかの酵素をコードする遺伝子の塩基配列と50%以上同一である遺伝子が欠失又は不活性化される。そのため、改変シアノバクテリアでは、(a)上記のいずれかの細胞壁ーピルビン酸修飾酵素若しくはこれらのいずれかの酵素と同等の機能を有するタンパク質の発現が抑制される、又は、(b)上記のいずれかの細胞壁ーピルビン酸修飾酵素若しくはこれらのいずれかの酵素と同等の機能を有するタンパク質の機能が抑制若しくは喪失される。これにより、細胞壁の表面の共有結合型の糖鎖がピルビン酸で修飾されにくくなるため、細胞壁の糖鎖が外膜中のSLHドメイン保持型外膜タンパク質のSLHドメインと結合する結合量及び結合力が低減する。その結果、改変シアノバクテリアでは、細胞壁の表面の共有結合型の糖鎖がピルビン酸で修飾される量が低減するため、細胞壁と外膜との結合力が弱まり、外膜が細胞壁から部分的に脱離しやすくなる。これにより、改変シアノバクテリアでは、細胞内の電子又は電子を有する物質若しくは分子が細胞外に漏出しやすくなるため、細胞外電子伝達効率が向上する。したがって、本開示の一態様に係る電子伝達体では、外部との電子伝達効率が向上する。

20

【0043】

例えば、本開示の一態様に係る電子伝達体では、前記(ii)において、前記外膜のタンパク質透過性を向上させるチャンネルタンパク質は、配列番号13で示されるアミノ酸配列からなるCppS、配列番号14で示されるアミノ酸配列からなるCppF、又は、これらのいずれかのチャンネルタンパク質とアミノ酸配列が50%以上同一であるタンパク質であってもよい。

30

【0044】

これにより、上記(ii)の改変シアノバクテリアでは、外膜のタンパク質透過性を向上させるチャンネルタンパク質であるCppS(配列番号13)又はCppF(配列番号14)、若しくは、これらのいずれかのチャンネルタンパク質と同等の機能を有するタンパク質が発現される。そのため、上記(ii)の改変シアノバクテリアでは、外膜のタンパク質透過性が向上するため、外膜の物質透過性が向上する。その結果、上記(ii)の改変シアノバクテリアは、細胞内の電子又は電子を有する物質若しくは分子を細胞外に分泌すること、及び、細胞外の電子又は電子を有する物質若しくは分子を細胞内に取り込むことの少なくとも1つを行うことができるため、細胞外電子伝達効率が向上する。したがって、本開示の一態様に係る電子伝達体は、外部との電子伝達効率が向上する。

40

【0045】

例えば、本開示の一態様に係る電子伝達体では、前記(ii)において、前記外膜のタンパク質透過性を向上させるチャンネルタンパク質をコードする遺伝子が導入されていてもよい。

【0046】

これにより、上記(ii)の改変シアノバクテリアでは、外膜のタンパク質透過性を向上させるチャンネルタンパク質が発現される。そのため、上記(ii)の改変シアノバクテ

50

リアでは、外膜のタンパク質透過性が向上するため、外膜の物質透過性が向上する。その結果、上記（i i）の改変シアノバクテリアは、細胞内の電子又は電子を有する物質若しくは分子を細胞外に分泌すること、及び、細胞外の電子又は電子を有する物質若しくは分子を細胞内に取り込むことの少なくとも1つを行うことができるため、細胞外電子伝達効率が向上する。したがって、本開示の一態様に係る電子伝達体は、外部との電子伝達効率が向上する。

【0047】

例えば、本開示の一態様に係る電子伝達体では、前記外膜のタンパク質透過性を向上させるチャンネルタンパク質をコードする遺伝子は、葉緑体由来の遺伝子であってもよい。例えば、前記外膜のタンパク質透過性を向上させるチャンネルタンパク質をコードする遺伝子は、配列番号15で示される塩基配列からなるcppS、配列番号16で示される塩基酸配列からなるcppF、又は、これらのいずれかの遺伝子と塩基配列が50%以上同一である遺伝子であってもよい。

【0048】

これにより、上記（i i）の改変シアノバクテリアでは、上記の配列番号15及び配列番号16で示されるいずれかのチャンネルタンパク質をコードする遺伝子又はこれらのいずれかの遺伝子の塩基配列と50%以上同一である遺伝子が導入される。そのため、上記（i i）の改変シアノバクテリアでは、外膜におけるタンパク質透過性を向上させる機能を有するタンパク質又は当該タンパク質と同等の機能を有するタンパク質が発現される。これにより、上記（i i）の改変シアノバクテリアでは、外膜のタンパク質透過性が向上するため、外膜の物質透過性が向上する。その結果、上記（i i）の改変シアノバクテリアは、細胞内の電子又は電子を有する物質若しくは分子を細胞外に分泌すること、及び、細胞外の電子又は電子を有する物質若しくは分子を細胞内に取り込むことの少なくとも1つを行うことができるため、細胞外電子伝達効率が向上する。したがって、本開示の一態様に係る電子伝達体は、外部との電子伝達効率が向上する。

【0049】

また、本開示の一態様に係る電子伝達体の製造方法は、（i）シアノバクテリアにおいて外膜と細胞壁との結合に関与するタンパク質の機能が抑制又は喪失されている、及び、（i i）前記外膜のタンパク質透過性を向上させるチャンネルタンパク質が発現されている、の少なくとも1つである改変シアノバクテリアを製造するステップを含む。

【0050】

これにより、製造された改変シアノバクテリアは、（i）細胞壁と外膜との結合が部分的に弱まるため、外膜が細胞壁から部分的に離脱しやすくなる、及び、（i i）外膜のタンパク質透過性が向上するため、外膜の物質透過性が向上する、の少なくとも1つである。そのため、改変シアノバクテリアは、細胞内の電子又は電子を有する物質若しくは分子を細胞外に分泌すること、及び、細胞外の電子又は電子を有する物質若しくは分子を細胞内に取り込むことの少なくとも1つを行うことができる。その結果、製造された改変シアノバクテリアは、細胞外電子伝達効率が向上する。したがって、本開示の一態様に係る電子伝達体の製造方法によれば、外部との電子伝達効率が向上した電子伝達体を提供することができる。

【0051】

また、本開示の一態様に係る電子伝達方法は、上記のいずれかの電子伝達体を用いる。

【0052】

これにより、電子伝達体は、細胞外電子伝達効率が向上した改変シアノバクテリアを含むため、外部（例えば、外部電極など）に効率良く電子を供与し、外部から電子を効率良く受容することができる。そのため、電子伝達体を用いれば、電子伝達体に含まれる改変シアノバクテリアが細胞内の電子伝達物質を細胞外に放出することにより、例えば外部電極に効率良く電子を供給して電流を発生させることができる。また、例えば、電子伝達体に含まれる改変シアノバクテリアは、外部から、光エネルギーの代わりに電子を受容して、光合成又は呼吸を行うことができる。これにより、電子伝達体に含まれる改変シアノバ

クテリアは、細胞内でタンパク質などの有用物質を産生して細胞外に分泌することもできる。

【0053】

以下、実施の形態について、図面を参照しながら具体的に説明する。

【0054】

なお、以下で説明する実施の形態は、いずれも包括的又は具体的な例を示すものである。以下の実施の形態で示される数値、材料、ステップ、ステップの順序などは、一例であり、本開示を限定する主旨ではない。また、以下の実施の形態における構成要素のうち、最上位概念を示す独立請求項に記載されていない構成要素については、任意の構成要素として説明される。

【0055】

また、各図は、必ずしも厳密に図示したものではない。各図において、実質的に同一の構成については同一の符号を付し、重複する説明は省略又は簡略化される場合がある。

【0056】

また、以下において、数値範囲は、厳密な意味のみを表すのではなく、実質的に同等な範囲、例えば、タンパク質の量（例えば、数又は濃度等）又はその範囲を計測することなどを含む。

【0057】

また、本明細書では、菌体と細胞とは、いずれも1つのシアノバクテリアの個体を表している。

【0058】

（実施の形態）

〔1. 定義〕

本明細書において、塩基配列及びアミノ酸配列の同一性は、BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) アルゴリズムによって計算される。具体的には、NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) のウェブサイトで利用できるBLASTプログラムにてペアワイズ解析を行うことにより算出される。シアノバクテリア及び植物の遺伝子、並びに、これらの遺伝子がコードするタンパク質に関する情報は、例えば上述のNCBIデータベース及びCyanobase (<http://genome.microbedb.jp/cyanobase/>) において公開されている。これらのデータベースから、目的のタンパク質のアミノ酸配列及びそれらのタンパク質をコードする遺伝子の塩基配列を取得することができる。

【0059】

シアノバクテリアは、藍藻又は藍色細菌とも呼ばれ、クロロフィルで光エネルギーを捕集し、得たエネルギーで反応中心クロロフィルの電荷分離を引き起こすことで、水を電解して酸素を発生しながら光合成をおこなう原核生物の一群である。シアノバクテリアは、多様性に富んでおり、例えば、細胞形状では*Synechocystis* sp. PCC 6803のような単細胞性の種及び*Anabaena* sp. PCC 7120のような多細胞が連なった糸状性の種がある。生育環境についても、*Thermosynechococcus elongatus*のような好熱性の種、*Synechococcus elongatus*のような海洋性の種、*Synechocystis*のような淡水性の種がある。また、*Microcystis aeruginosa*のようにガス小胞を持ち毒素を産生する種、及び、チラコイドを持たずに原形質膜に集光アンテナであるフィコビリソームと呼ばれるタンパク質を有する*Gloeobacter violaceus*のように、独自の特徴をもつ種も多数挙げられる。

【0060】

シアノバクテリアにおいて、光合成により水が分解されるときと、光合成により合成した糖などの有機化合物を自らの栄養源として異化するときに、細胞内で電子が発生する。水の分解により発生した電子は、細胞質内の膜構造であるチラコイド膜上に存在する光合成電子伝達鎖を流れ、その過程で生体エネルギー源として利用されるプロトン駆動力を発生させ、最終的には $\text{NADP}^{\pm}$ を還元し、 NADPH を生成する反応に使われる。

【0061】

一方、有機化合物の異化により有機化合物から発生した電子は、細胞質膜上及びチラコイド膜上に存在する呼吸鎖を流れ、その過程で上述のプロトン駆動力を発生させ、最終的には酸素 (O_2) を還元し、水 (H_2O) を生じる反応に使われる。なお、シアノバクテリアにおいて細胞質膜とチラコイド膜とは、連結していることが示されている（非特許文献 8 : van de Meene et al., 2006, Arch. Microbiol., 184(5):259-270）。

【0062】

図 1 は、シアノバクテリアの細胞表層を模式的に示した図である。図 1 に示されるように、シアノバクテリアの細胞表層は、内側から順に、原形質膜（内膜 1 とともいう）、ペプチドグリカン 2、及び細胞最外層を形成する脂質膜である外膜 5 で構成される。ペプチドグリカン 2 にはグルコサミン及びマンノサミンなどで構成される糖鎖 3 が共有結合しており、また、これらの共有結合型の糖鎖 3 にはピルビン酸が結合している（非特許文献 9 : Jurgens and Weckesser, 1986, J. Bacteriol., 168:568-573）。本明細書では、ペプチドグリカン 2 と共有結合型の糖鎖 3 とを含めて細胞壁 4 と呼ぶ。また、原形質膜（つまり、内膜 1）と外膜 5 との間隙は、ペリプラズムと呼ばれ、タンパク質の分解又は立体構造の形成、脂質又は核酸の分解、若しくは、細胞外の栄養素の取り込み等に関与する様々な酵素が存在する。

【0063】

ペプチドグリカン 2 における共有結合型の糖鎖 3 のピルビン酸修飾反応を触媒する酵素（以下、細胞壁ーピルビン酸修飾酵素 9 という）は、グラム陽性菌である *Bacillus anthracis* において同定され、CsaB と命名されている（非特許文献 10 : Mesnage et al., 2000, EMBO J., 19:4473-4484）。ゲノム塩基配列が公開されているシアノバクテリアにおいて、多くの種が CsaB とアミノ酸配列の同一性が 30% 以上となる相同タンパク質をコードする遺伝子を保持している。例としては、*Synechocystis* sp. PCC 6803 が保持する slr0688 又は *Synechococcus* sp. 7502 が保持する syn7502_03092 などが挙げられる。

【0064】

また、シアノバクテリアの細胞壁には SLH (Surface layer homologous) ドメイン 7 を保持する SLH ドメイン保持型外膜タンパク質 6（図中の slr1841）が結合している（非特許文献 11 : Kowata et al., 2017, J. Bacteriol., 199:e00371-17）。当該外膜タンパク質と細胞壁の結合には、ペプチドグリカン結合型糖鎖がピルビン酸修飾されていることが知られている（非特許文献 12 : Kojima et al., 2016, Biosci. Biotech. Biochem., 10:1954-1959）。

【0065】

チャネルタンパク質とは、所定の物質を脂質膜（例えば、外膜 5）の内側から外側へ、又は、外側から内側へ選択的に透過させるための経路（すなわちチャネル）を形成する膜タンパク質のことをいう。大腸菌及びサルモネラなどの、一般的な従属栄養性のグラム陰性細菌の外膜には、糖及びアミノ酸などの比較的低分子量の栄養素を外膜の外側から内側に選択的に透過させて細胞内に取り込むための、Porin と呼ばれるチャネルタンパク質が多量に存在する（非特許文献 13 : Nikaido, 2003, Microbiol. Mol. Biol. Rev., 67(4):593-656）。一方で、シアノバクテリアの外膜 5 には Porin は存在せず、そのかわりに無機イオンのみを選択的に透過させるイオンチャネルタンパク質（例えば、SLH ドメイン保持型外膜タンパク質 6）が外膜 5 に多量に存在する。当該イオンチャネルタンパク質は、外膜 5 の総タンパク質の約 80% を占めている（非特許文献 11）。そのため、シアノバクテリアにおいては、遺伝子導入などの技術を用いて外膜 5 の性質を大きく変更しない限り、タンパク質のような高分子量の物質が外膜 5 を透過して細胞外（つまり、外膜 5 の外）に拡散することは難しい。

【0066】

植物の葉緑体は、約 15~20 億年前に、原始的な真核細胞の細胞内に共生したシアノバクテリアが起源であり、その後の進化により葉緑体へと変化した（非特許文献 14 : Ponce-Toledo et al., 2017, Curr. Biol., 27(3):386-391）。最も原始的な植物とされる単細胞藻類である灰色藻が保持する葉緑体は、ペプチドグリカンを持っており、シアノバ

10

20

30

40

50

クテリアとよく似た表層構造を残している。一方で、単細胞藻類よりも進化の進んだ種子植物の葉緑体には、ペプチドグリカンが存在しない。また、シアノバクテリアの外膜タンパク質の多くは、進化の過程で、葉緑体の誕生初期には葉緑体の外膜から失われている。そのため、前述の灰色藻の葉緑体の外膜タンパク質は、シアノバクテリアの外膜タンパク質の構成と大きく異なる。例えば、シアノバクテリアの外膜5には、Slr1841（SLHDメイン保持型外膜タンパク質6）などの無機物を透過させるイオンチャネルタンパク質が多量に含まれている。当該イオンチャネルタンパク質は、外膜5の総タンパク質の約80%を占めている。一方、灰色藻の葉緑体の外膜には、CppS及びCppFと名付けられた有機物を透過させるチャネルタンパク質（以下、有機物チャネルタンパク質18ともいう）が外膜に多量に含まれている。当該有機物チャネルタンパク質18は、灰色藻の葉緑体の外膜の総タンパク質の80%以上を占める（非特許文献15：Kojima et al., 2016, J. Biol. Chem., 291:20198-20209）。CppS及びCppFは比較的高分子量の有機物（例えば、タンパク質などの生体分子）を選択的に透過させるチャネル機能を有するチャネルタンパク質であり、植物細胞中の葉緑体の内部と植物細胞の細胞質とをつなぐ物質輸送経路として機能していると考えられている。CppS及びCppFは、灰色藻類に広く分布している。一方で、細菌においてはPlanctomycetes門に属する細菌においてのみCppS及びCppFの類似タンパク質が存在している。なお、シアノバクテリアは、CppS及びCppF並びにこれらの類似タンパク質を保持していない（非特許文献15参照）。

10

【0067】

〔2. 電子伝達体〕

20

続いて、本実施の形態に係る電子伝達体について説明する。図2は、本実施の形態に係る電子伝達体30の一例を示す模式図である。

【0068】

電子伝達体30は、外部に電子を供給し、外部から電子を取り込む機能を有する。外部とは、電子伝達体30と別の個体として存在する物質又は分子であり、例えば、物質間の電子の移動に関わる酸化還元物質、又は、酸化還元反応基を有する分子などである。

【0069】

ここで、電子を供給するとは、電子を供給するだけではなく、電子を有するあらゆる物質又は分子を供給することをいう。また、電子を取り込むとは、電子を取り込むだけでなく、電子を有するあらゆる物質又は分子を取り込むことをいう。

30

【0070】

本実施の形態に係る電子伝達体30は、（i）シアノバクテリア（後述の親シアノバクテリア）において外膜5と細胞壁4との結合に関与するタンパク質の機能が抑制又は喪失されている、及び、（ii）外膜5のタンパク質透過性を向上させるチャネルタンパク質（いわゆる、有機物チャネルタンパク質18）が発現されている、の少なくとも1つである改変シアノバクテリア31を含む。また、上記改変シアノバクテリア31は、電子伝達体30の外部に電子を供給すること、及び、外部から電子を取り込むことの少なくとも1つを行う。

【0071】

例えば、電子伝達体30は、上記（i）の改変シアノバクテリア31であってもよく、上記（ii）の改変シアノバクテリア31であってもよく、上記（i）かつ（ii）の改変シアノバクテリア31であってもよい。

40

【0072】

上記（i）により、改変シアノバクテリア31では、細胞壁4と外膜5との結合（例えば、結合量及び結合力）が部分的に低減するため、外膜5が細胞壁4から部分的に脱離しやすくなる。そのため、改変シアノバクテリア31の細胞内で生成した電子又は電子を有する物質若しくは分子が外膜5の外、つまり、細胞外に漏出しやすくなる。また、上記（ii）により、改変シアノバクテリア31では、外膜5のタンパク質透過性が向上するため、外膜5の物質透過性が向上する。これにより、改変シアノバクテリア31は、細胞内で生成した電子又は電子を有する物質若しくは分子を細胞外に分泌すること、及び、細胞

50

外の電子又は電子を有する物質若しくは分子を細胞内に取り込むこと、の少なくとも1つを行うことができる。その結果、改変シアノバクテリア31は、細胞外電子伝達効率が向上する。したがって、本実施の形態に係る電子伝達体30は、外部との電子伝達効率が向上する。

【0073】

なお、電子伝達体30は、上記(i)及び(ii)の少なくとも1つの改変シアノバクテリア31に加えて、電子伝達物質33、電子メディエータ35、及び、導電性物質37の少なくとも1つを含んでもよい。

【0074】

例えば、図2に示されるように、電子伝達体30は、改変シアノバクテリア31と、電子伝達物質33と、電子メディエータ35と、導電性物質37とを含んでもよい。これにより、電子伝達体30では、改変シアノバクテリア31の細胞外電子伝達効率がさらに向上され得る。

【0075】

ここで、電子伝達物質33とは、電子伝達反応を担う物質であり、電子を受け取る酸化型と、電子を与える還元型の物質とを含む、いわゆる、酸化還元物質である。電子伝達物質33は、細胞内の電子伝達系に関与する酸化還元物質であれば特に限定されず、例えば、ペプチド、タンパク質、フラビン類、キノン類、ヘム鉄、鉄硫黄クラスターなどの非ヘム鉄、又は、銅イオンなどであってもよい。

【0076】

また、電子メディエータ35とは、電子伝達物質33の電子伝達機能を補助する、又は、促進する物質であり、いわゆる酸化還元活性種である。電子メディエータ35は、例えば、キノン類、フェロセン、フェリシアン化物、シトクロム類、ピオロゲン類、フェナジン類、フェノキサジン類、フェノチアジン類、フェレドキシン類及びその誘導体等であってもよいが、電子伝達物質33の種類に応じて適宜物質を選択してもよい。

【0077】

導電性物質37は、当該物質内を電子が移動しやすい性質を有する物質であり、例えば、炭素系物質、導電性ポリマー、半導体及び金属からなる群より選ばれる一種以上の材料から選択してもよい。ここで、炭素系物質とは、炭素を構成成分とする物質をいう。例えば、炭素系物質は、グラファイト、活性炭素、カーボンブラックなどのカーボンパウダー、グラファイトフェルト、カーボンウール、カーボン織布などのカーボンファイバー、カーボンナノチューブ、カーボンプレート、カーボンペーパー又はカーボンディスクであってもよい。

【0078】

また、導電性ポリマーとは、導電性を有する高分子化合物の総称である。導電性ポリマーとしては、例えば、アニリン、アミノフェノール、ジアミノフェノール、ピロール、チオフェン、パラフェニレン、フルオレン、フラン、アセチレン若しくはそれらの誘導体を構成単位とする単一モノマー又は二種以上のモノマーの重合体であってもよい。より具体的には、導電性ポリマーとしては、例えば、ポリアニリン、ポリアミノフェノール、ポリジアミノフェノール、ポリピロール、ポリチオフェン、ポリフラン、ポリアセチレン等

【0079】

また、導電性物質37は、金属又は金属酸化物であってもよく、電流生産量をより高める観点から、タングステン、酸化タングステン、銅、銀、白金、金、ニオブ、鉄、コバルト、チタン、モリブデン、酸化モリブデン、スズ、酸化スズ、ニッケル、酸化ニッケル、若しくは、これらを含む合金、又は、その酸化物であってもよい。

【0080】

なお、これらの構成は、電子伝達体30の設計に応じて適宜選択されてもよい。

【0081】

[3. 改変シアノバクテリア]

続いて、改変シアノバクテリア 31 について説明する。本実施の形態では、改変シアノバクテリア 31 は、電子伝達体 30 に含まれる。

【0082】

改変シアノバクテリア 31 は、例えば、光を受けて電子を生成し、生成した電子を外膜 5 の外に放出する。これにより、改変シアノバクテリア 31 は、光を受けると細胞の外（つまり、外膜 5 の外）に電子又は電子を有する物質若しくは分子を放出する。そのため、電子伝達体 30 は、光を受けると内部で電子を生成し、外部に電子又は電子を有する物質若しくは分子を供給することができる。

【0083】

また、改変シアノバクテリア 31 は、例えば、外膜 5 の外側に存在する電子を細胞壁 4 の内側（つまり、細胞質内）に取り込み、細胞壁 4 の内側で電子を利用する。これにより、改変シアノバクテリア 31 は、細胞外に存在する電子又は電子を有する物質若しくは分子を細胞内（細胞質内）に取り込んで、例えば、光合成電子伝達系を流れる過程の中でエネルギー（ATP: adenosine triphosphate）を生成する。そして、改変シアノバクテリア 31 は、このエネルギーを利用して二酸化炭素を基に有機物を産生する。そのため、電子伝達体 30 は、外部から内部に電子を取り込んでエネルギーを生成し、タンパク質などの有機物を産生することができる。

【0084】

また、当該改変シアノバクテリア 31 は、（i）シアノバクテリアにおいて外膜 5 と細胞壁 4 との結合に関与するタンパク質（以下、結合関連タンパク質ともいう）の機能が抑制又は喪失されている、及び、（ii）外膜 5 のタンパク質透過性を向上させるチャネルタンパク質（いわゆる、有機物チャネルタンパク質 18）が発現されている、の少なくとも 1 つである。

【0085】

まず、上記（i）の改変シアノバクテリア 31 について説明する。

【0086】

上記（i）において、外膜 5 と細胞壁 4 との結合に関与するタンパク質は、例えば、SLHドメイン保持型外膜タンパク質 6 及び細胞壁ーピルビン酸修飾酵素 9 の少なくとも 1 つであってもよい。本実施の形態では、改変シアノバクテリア 31 は、例えば、SLHドメイン保持型外膜タンパク質 6 及び細胞壁ーピルビン酸修飾酵素 9 の少なくとも 1 つのタンパク質の機能が抑制又は喪失されている。例えば、改変シアノバクテリア 31 では、（a）SLHドメイン保持型外膜タンパク質 6 及び細胞壁ーピルビン酸修飾酵素 9 の少なくとも 1 つの機能が抑制又は喪失されてもよく、（b）細胞壁 4 と結合する SLHドメイン保持型外膜タンパク質 6 の発現、及び、細胞壁 4 の表面の結合糖鎖のピルビン酸修飾反応を触媒する酵素（つまり、細胞壁ーピルビン酸修飾酵素 9）の発現の少なくとも 1 つが抑制されてもよい。

【0087】

これにより、改変シアノバクテリア 31 では、例えば、（a）細胞壁と結合する SLHドメイン保持型外膜タンパク質 6 及び細胞壁の表面の結合糖鎖をピルビン酸修飾する反応を触媒する酵素（つまり、細胞壁ーピルビン酸修飾酵素 9）の少なくとも 1 つの機能が抑制若しくは喪失されている、又は、（b）SLHドメイン保持型外膜タンパク質 6、及び、細胞壁ーピルビン酸修飾酵素 9 の少なくとも 1 つの発現が抑制されている。そのため、外膜 5 中の SLHドメイン保持型外膜タンパク質の SLHドメインと、細胞壁 4 の表面の共有結合型の糖鎖 3 との結合（つまり、結合量及び結合力）が低減する。その結果、外膜 5 と細胞壁 4 との結合が弱まった部分において外膜 5 が細胞壁 4 から脱離しやすくなる。これにより、改変シアノバクテリア 31 は、細胞内の電子伝達物質 33 を細胞外に分泌すること、及び、細胞外の電子伝達物質 33 を細胞内に取り込むことの少なくとも 1 つを行うことができるため、細胞外電子伝達効率が向上する。したがって、本実施の形態に係る電子伝達体 30 は、外部との電子伝達効率が向上する。

【0088】

本実施の形態における改変シアノバクテリア31の親微生物となる、(i)外膜5と細胞壁4との結合に關与するタンパク質の機能が抑制又は喪失される前のシアノバクテリア、又は、(ii)外膜5のタンパク質透過性を向上させるチャネルタンパク質(つまり、有機物チャネルタンパク質18)が発現される前のシアノバクテリア(以下、親シアノバクテリアという)の種類は、特に制限されず、あらゆる種類のシアノバクテリアであってもよい。例えば、親シアノバクテリアは、*Synechocystis*属、*Synechococcus*属、*Anabaena*属、又は、*Thermosynechococcus*属であってもよく、中でも、*Synechocystis* sp. PCC 6803、*Synechococcus* sp. PCC 7942、又は、*Thermosynechococcus elongatus* BP-1であってもよい。

【0089】

これらの親シアノバクテリアにおける(i)外膜5と細胞壁4との結合に關与するタンパク質、及び、(ii)外膜5のタンパク質透過性を向上させるチャネルタンパク質(有機物チャネルタンパク質18)のアミノ酸配列、それらの結合関連タンパク質をコードする遺伝子の塩基配列、並びに、当該遺伝子の染色体DNA又はプラスミド上での位置は、上述のNCBIデータベース及びCyanobaseで確認することができる。

【0090】

なお、本実施の形態における改変シアノバクテリア31において機能が抑制又は喪失される外膜と細胞壁との結合に關与するタンパク質は、親シアノバクテリアが保有している限り、いずれの親シアノバクテリアのものであってもよく、それらをコードする遺伝子の存在場所(例えば、染色体DNA上又はプラスミド上)により制限されるものではない。

【0091】

例えば、SLHドメイン保持型外膜タンパク質6は、親シアノバクテリアが*Synechocystis*属の場合、Slr1841、Slr1908、又は、Slr0042等であってもよく、親シアノバクテリアが*Synechococcus*属の場合、NIES970_09470等であってもよく、親シアノバクテリアが*Anabaena*属の場合、Anacy_5815又はAnacy_3458等であってもよく、親シアノバクテリアが*Microcystis*属の場合、A0A0F6U6F8_MICAE等であってもよく、親シアノバクテリアが*Cyanothece*属の場合、A0A3B8XX12_9CYAN等であってもよく、親シアノバクテリアが*Leptolyngbya*属の場合、A0A1Q8ZE23_9CYAN等であってもよく、親シアノバクテリアが*Calothrix*属の場合、A0A1Z4R6U0_9CYANが挙げられ、親シアノバクテリアが*Nostoc*属の場合、A0A1C0VG86_9NOSO等であってもよく、親シアノバクテリアが*Crocospaera*属の場合、B1WRN6_CROS5等であってもよく、親シアノバクテリアが*Pleurocapsa*属の場合、K9TAE4_9CYAN等であってもよい。

【0092】

より具体的には、SLHドメイン保持型外膜タンパク質6は、例えば、*Synechocystis* sp. PCC 6803のSlr1841(配列番号1)、*Synechococcus* sp. NIES-970のNIES970_09470(配列番号2)、又は、*Anabaena cylindrica* PCC 7122のAnacy_3458(配列番号3)等であってもよい。また、これらのSLHドメイン保持型外膜タンパク質6とアミノ酸配列が50%以上同一であるタンパク質であってもよい。

【0093】

これにより、改変シアノバクテリア31では、例えば、(a)上記の配列番号1~3で示されるいずれかのSLHドメイン保持型外膜タンパク質6又はこれらのいずれかのSLHドメイン保持型外膜タンパク質6とアミノ酸配列が50%以上同一であるタンパク質の機能が抑制若しくは喪失されていてもよく、(b)上記の配列番号1~3で示されるいずれかのSLHドメイン保持型外膜タンパク質6又はこれらのいずれかのSLHドメイン保持型外膜タンパク質6とアミノ酸配列が50%以上同一であるタンパク質の発現が抑制されていてもよい。そのため、改変シアノバクテリア31では、(a)外膜5中のSLHドメイン保持型外膜タンパク質6若しくはSLHドメイン保持型外膜タンパク質6と同等の機能を有するタンパク質の機能が抑制若しくは喪失される、又は、(b)外膜5中のSLHドメイン保持型外膜タンパク質6若しくはSLHドメイン保持型外膜タンパク質6と同等の機能を有するタンパク質の発現量が低減する。その結果、改変シアノバクテリア31

10

20

30

40

50

では、外膜5の結合ドメイン（例えば、SLHドメイン7）が細胞壁4と結合する結合量及び結合力が低減するため、外膜5が細胞壁4から部分的に脱離しやすくなる。そのため、本実施の形態に係る電子伝達体30は、外部との電子伝達効率が向上する。

【0094】

一般に、タンパク質のアミノ酸配列が30%以上同一であれば、タンパク質の立体構造の相同性が高いため、当該タンパク質と同等の機能を有する可能性が高いと言われている。そのため、機能が抑制又は喪失されるSLHドメイン保持型外膜タンパク質6としては、例えば、上記の配列番号1～3で示されるSLHドメイン保持型外膜タンパク質6のいずれかのアミノ酸配列と、40%以上、好ましくは50%以上、より好ましくは60%以上、さらに好ましくは70%以上、さらにより好ましくは80%以上、なお好ましくは90%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ、細胞壁4の共有結合型の糖鎖3と結合する機能を有するタンパク質又はポリペプチドであってもよい。

10

【0095】

また、例えば、細胞壁ーピルビン酸修飾酵素9は、親シアノバクテリアが*Synechocystis*属の場合、Slr0688等であってもよく、親シアノバクテリアが*Synechococcus*属の場合、Syn7502_03092又はSynpcc7942_1529等であってもよく、親シアノバクテリアが*Anabaena*属の場合、ANA_C20348又はAnacy_1623等であってもよく、親シアノバクテリアが*Microcystis*属の場合、CsaB (NCBIのアクセスID: TRU80220)等であってもよく、親シアノバクテリアが*Cynaothece*属の場合、CsaB (NCBIのアクセスID: WP_107667006.1)等であってもよく、親シアノバクテリアが*Spirulina*属の場合、CsaB (NCBIのアクセスID: WP_026079530.1)等であってもよく、親シアノバクテリアが*Calothrix*属の場合、CsaB (NCBIのアクセスID: WP_096658142.1)等であってもよく、親シアノバクテリアが*Nostoc*属の場合、CsaB (NCBIのアクセスID: WP_099068528.1)等であってもよく、親シアノバクテリアが*Crocospaera*属の場合、CsaB (NCBIのアクセスID: WP_012361697.1)等であってもよく、親シアノバクテリアが*Pleurocapsa*属の場合、CsaB (NCBIのアクセスID: WP_036798735)等であってもよい。

20

【0096】

より具体的には、細胞壁ーピルビン酸修飾酵素9は、例えば、*Synechocystis* sp. PCC 6803のSlr0688（配列番号4）、*Synechococcus* sp. PCC 7942のSynpcc7942_1529（配列番号5）、又は、*Anabaena cylindrica* PCC 7122のAnacy_1623（配列番号6）等であってもよい。また、これらの細胞壁ーピルビン酸修飾酵素9とアミノ酸配列が50%以上同一であるタンパク質であってもよい。

30

【0097】

これにより、改変シアノバクテリア31では、例えば、（a）上記の配列番号4～6で示されるいずれかの細胞壁ーピルビン酸修飾酵素9若しくはこれらのいずれかの細胞壁ーピルビン酸修飾酵素9とアミノ酸配列が50%以上同一であるタンパク質の機能が抑制若しくは喪失されている、又は、（b）上記の配列番号4～6で示されるいずれかの細胞壁ーピルビン酸修飾酵素9若しくはこれらのいずれかの細胞壁ーピルビン酸修飾酵素9とアミノ酸配列が50%以上同一であるタンパク質の発現が抑制されている。そのため、改変シアノバクテリア31では、（a）細胞壁ーピルビン酸修飾酵素9若しくは当該酵素と同等の機能を有するタンパク質の機能が抑制若しくは喪失される、又は、（b）細胞壁ーピルビン酸修飾酵素9若しくは当該酵素と同等の機能を有するタンパク質の発現量が低減する。これにより、細胞壁4の表面の共有結合型の糖鎖3がピルビン酸で修飾されにくくなるため、細胞壁4の糖鎖3が外膜5中のSLHドメイン保持型外膜タンパク質6のSLHドメイン7と結合する結合量及び結合力が低減する。その結果、改変シアノバクテリア31では、細胞壁4の表面の共有結合型の糖鎖3がピルビン酸で修飾されにくくなるため、細胞壁4と外膜5との結合力が弱まり、外膜5が細胞壁4から部分的に脱離しやすくなる。そのため、本実施の形態に係る電子伝達体30は、外部との電子伝達効率が向上する。

40

【0098】

また、上述したとおり、タンパク質のアミノ酸配列が30%以上同一であれば、当該タ

50

ンパク質と同等の機能を有する可能性が高いと言われている。そのため、機能が抑制又は喪失される細胞壁ーピルビン酸修飾酵素 9 としては、例えば、上記の配列番号 4～6 で示される細胞壁ーピルビン酸修飾酵素 9 のいずれかのアミノ酸配列と、40%以上、好ましくは50%以上、より好ましくは60%以上、さらに好ましくは70%以上、さらにより好ましくは80%以上、なお好ましくは90%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ、細胞壁 4 のペプチドグリカン 2 の共有結合型の糖鎖 3 をピルビン酸で修飾する反応を触媒する機能を有するタンパク質又はポリペプチドであってもよい。

【0099】

なお、本明細書において、SLHドメイン保持型外膜タンパク質 6 の機能を抑制する又は喪失させるとは、当該タンパク質の細胞壁 4 との結合能力を抑制する若しくは喪失させること、当該タンパク質の外膜 5 への輸送を抑制する若しくは喪失させること、又は、当該タンパク質が外膜 5 に埋め込まれて機能する能力を抑制する若しくは喪失させることである。

【0100】

なお、細胞壁ーピルビン酸修飾酵素 9 の機能を抑制する又は喪失するとは、当該タンパク質が細胞壁 4 の共有結合型の糖鎖 3 をピルビン酸で修飾する機能を抑制する又は喪失させることである。

【0101】

これらのタンパク質の機能を抑制する又は喪失させる手段としては、タンパク質の機能の抑制又は喪失に通常使用される手段であれば特に限定されない。当該手段は、例えば、SLHドメイン保持型外膜タンパク質 6 をコードする遺伝子及び細胞壁ーピルビン酸修飾酵素 9 をコードする遺伝子を欠失若しくは不活性化させること、これらの遺伝子の転写を阻害すること、これらの遺伝子の転写産物の翻訳を阻害すること、又はこれらのタンパク質を特異的に阻害する阻害剤を投与することなどであってもよい。

【0102】

本実施の形態では、上記(i)において、改変シアノバクテリア 31 では、外膜 5 と細胞壁 4 との結合に関与するタンパク質を発現させる遺伝子が欠失又は不活性化されていてもよい。

【0103】

これにより、上記(i)の改変シアノバクテリア 31 では、細胞壁 4 と外膜 5 との結合に関与するタンパク質の発現が抑制されるため、又は、当該タンパク質の機能が抑制若しくは喪失されるため、細胞壁 4 と外膜 5 との結合（いわゆる、結合量及び結合力）が部分的に低減する。その結果、外膜 5 と細胞壁 4 との結合が弱まった部分において外膜 5 が細胞壁 4 から脱離しやすくなる。これにより、上記(i)の改変シアノバクテリア 31 では、細胞内の電子又は電子を有する物質若しくは分子を細胞外に分泌すること、及び、細胞外の電子又は電子を有する物質若しくは分子を細胞内に取り込むことの少なくとも1つを行うことができるため、細胞外電子伝達効率が向上する。したがって、本実施の形態に係る電子伝達体 30 は、外部との電子伝達効率が向上する。

【0104】

外膜 5 と細胞壁 4 との結合に関与するタンパク質を発現させる遺伝子は、SLHドメイン保持型外膜タンパク質 6 をコードする遺伝子、及び、細胞壁ーピルビン酸修飾酵素 9 をコードする遺伝子の少なくとも1つであってもよい。改変シアノバクテリア 31 では、SLHドメイン保持型外膜タンパク質 6 をコードする遺伝子、及び、細胞壁ーピルビン酸修飾酵素 9 をコードする遺伝子の少なくとも1つの遺伝子が欠失又は不活性化されている。そのため、改変シアノバクテリア 31 では、例えば、(a) SLHドメイン保持型外膜タンパク質 6 及び細胞壁ーピルビン酸修飾酵素 9 の少なくとも1つの発現が抑制される、又は、(b) SLHドメイン保持型外膜タンパク質 6 及び細胞壁ーピルビン酸修飾酵素 9 の少なくとも1つの機能が抑制若しくは喪失される。そのため、外膜 5 中の SLHドメイン保持型外膜タンパク質 6 の SLHドメイン 7 と、細胞壁 4 の表面の共有結合型の糖鎖 3 との結合（つまり、結合量及び結合力）が低減する。これにより、改変シアノバクテリア 3

1では、外膜5と細胞壁4との結合が弱まった部分において外膜5が細胞壁4から脱離しやすくなるため、細胞内の電子又は電子を有する物質若しくは分子が細胞外に漏出しやすくなる。したがって、本実施の形態に係る電子伝達体30は、改変シアノバクテリア31において細胞内の電子又は電子を有する物質若しくは分子が細胞外に漏出しやすくなるため、外部との電子伝達効率が向上する。

【0105】

本実施の形態では、シアノバクテリアにおけるSLHドメイン保持型外膜タンパク質6及び細胞壁ーピルビン酸修飾酵素9の少なくとも1つの機能を抑制する又は喪失させるために、例えば、SLHドメイン保持型外膜タンパク質6をコードする遺伝子及び細胞壁ーピルビン酸修飾酵素9をコードする遺伝子の少なくとも1つの転写を抑制してもよい。

10

【0106】

例えば、SLHドメイン保持型外膜タンパク質6をコードする遺伝子は、親シアノバクテリアが*Synechocystis*属の場合、slr1841、slr1908、又は、slr0042等であってもよく、*Synechococcus*属の場合、nies970_09470等であってもよく、親シアノバクテリアが*Anabaena*属の場合、anacy_5815又はanacy_3458等であってもよく、親シアノバクテリアが*Microcystis*属の場合、A0A0F6U6F8_MICAE等であってもよく、親シアノバクテリアが*Cynahotheca*属の場合、A0A3B8XX12_9CYAN等であってもよく、親シアノバクテリアが*Leptolyngbya*属の場合、A0A1Q8ZE23_9CYAN等であってもよく、親シアノバクテリアが*Calothrix*属の場合、A0A1Z4R6U0_9CYAN等であってもよく、親シアノバクテリアが*Nostoc*属の場合、A0A1C0VG86_9NOSO等であってもよく、親シアノバクテリアが*Crocospaera*属の場合、B1WRN6_CROS5等であってもよく、親シアノバクテリアが*Pleurocapsa*属の場合、K9TAE4_9CYAN等であってもよい。これらの遺伝子の塩基配列は、上述したNCBIデータベース又はCyanobaseから入手できる。

20

【0107】

より具体的には、SLHドメイン保持型外膜タンパク質6をコードする遺伝子は、*Synechocystis* sp. PCC 6803のslr1841（配列番号7）、*Synechococcus* sp. NIES-970のnies970_09470（配列番号8）、*Anabaena cylindrica* PCC 7122のanacy_3458（配列番号9）、又は、これらの遺伝子と塩基配列が50%以上同一である遺伝子であってもよい。

【0108】

これにより、改変シアノバクテリア31では、上記の配列番号7～9で示されるいずれかのSLHドメイン保持型外膜タンパク質6をコードする遺伝子又はこれらのいずれかの遺伝子の塩基配列と50%以上同一である遺伝子が欠失又は不活性化される。そのため、改変シアノバクテリア31では、（a）上記のいずれかのSLHドメイン保持型外膜タンパク質6若しくはこれらのいずれかのタンパク質と同等の機能を有するタンパク質の発現が抑制される、又は、（b）上記のいずれかのSLHドメイン保持型外膜タンパク質6若しくはこれらのいずれかのタンパク質と同等の機能を有するタンパク質の機能が抑制若しくは喪失される。そのため、改変シアノバクテリア31では、外膜5が細胞壁4と結合するための結合ドメイン（例えばSLHドメイン7）が細胞壁4と結合する結合量及び結合力が低減する。その結果、外膜5が細胞壁4から部分的に脱離しやすくなるため、細胞内の電子伝達物質33が細胞外に漏出しやすくなる。これにより、改変シアノバクテリア31は、細胞外電子伝達効率が向上するため、本実施の形態に係る電子伝達体30は、外部との電子伝達効率が向上する。

30

40

【0109】

上述したように、タンパク質のアミノ酸配列が30%以上同一であれば、当該タンパク質と同等の機能を有する可能性が高いと言われている。そのため、タンパク質をコードする遺伝子の塩基配列が30%以上同一であれば、当該タンパク質と同等の機能を有するタンパク質が発現される可能性が高いと考えられる。そのため、機能が抑制又は喪失されるSLHドメイン保持型外膜タンパク質6をコードする遺伝子としては、例えば、上記の配列番号7～9で示されるSLHドメイン保持型外膜タンパク質6をコードする遺伝子のい

50

いずれかの塩基配列と、40%以上、好ましくは50%以上、より好ましくは60%以上、さらに好ましくは70%以上、さらにより好ましくは80%以上、なお好ましくは90%以上の同一性を有する塩基配列からなる遺伝子であり、かつ、細胞壁4の共有結合型の糖鎖3と結合する機能を有するタンパク質又はポリペプチドをコードする遺伝子であってもよい。

【0110】

また、例えば、細胞壁ーピルビン酸修飾酵素9をコードする遺伝子は、親シアノバクテリアが*Synechocystis*属の場合、slr0688等であってもよく、親シアノバクテリアが*Synechococcus*属の場合、syn7502_03092又はsynpcc7942_1529等であってもよく、親シアノバクテリアが*Anabaena*属の場合、ana_C20348又はanacy_1623等であってもよく、親シアノバクテリアが*Microcystis*属の場合、csaB (NCBIのアクセスID: TRU80220)等であってもよく、親シアノバクテリアが*Cynahotheca*属の場合、csaB (NCBIのアクセスID: WP_107667006.1) 等であってもよく、親シアノバクテリアが*Spirulina*属の場合、csaB (NCBIのアクセスID: WP_026079530.1) 等であってもよく、親シアノバクテリアが*Calothrix*属の場合、csaB (NCBIのアクセスID: WP_096658142.1) 等であってもよく、親シアノバクテリアが*Nostoc*属の場合、csaB (NCBIのアクセスID: WP_099068528.1) 等であってもよく、親シアノバクテリアが*Crocospaera*属の場合、csaB (NCBIのアクセスID: WP_012361697.1) 等であってもよく、親シアノバクテリアが*Pleurocapsa*属の場合、csaB (NCBIのアクセスID: WP_036798735) 等であってもよい。これらの遺伝子の塩基配列は、上述したNCBIデータベース又はCyanobaseから入手できる。

【0111】

より具体的には、細胞壁ーピルビン酸修飾酵素9をコードする遺伝子は、*Synechocystis* sp. PCC 6803のslr0688 (配列番号10)、*Synechococcus* sp. PCC 7942のsynpcc7942_1529 (配列番号11)、又は、*Anabaena cylindrica* PCC 7122のanacy_1623 (配列番号12) であってもよい。また、これらの遺伝子と塩基配列が50%以上同一である遺伝子であってもよい。

【0112】

これにより、改変シアノバクテリア31では、上記の配列番号10~12で示されるいずれかの細胞壁ーピルビン酸修飾酵素9をコードする遺伝子又はこれらのいずれかの酵素をコードする遺伝子の塩基配列と50%以上同一である遺伝子が欠失又は不活性化される。そのため、改変シアノバクテリア31では、(a) 上記のいずれかの細胞壁ーピルビン酸修飾酵素9若しくはこれらのいずれかの酵素と同等の機能を有するタンパク質の発現が抑制される、又は、(b) 上記のいずれかの細胞壁ーピルビン酸修飾酵素9若しくはこれらのいずれかの酵素と同等の機能を有するタンパク質の機能が抑制若しくは喪失される。これにより、細胞壁4の表面の共有結合型の糖鎖3がピルビン酸で修飾されにくくなるため、細胞壁4の糖鎖3が外膜5中のSLHドメイン保持型外膜タンパク質6のSLHドメイン7と結合する結合量及び結合力が低減する。その結果、改変シアノバクテリア31では、細胞壁4の表面の共有結合型の糖鎖3がピルビン酸で修飾される量が低減するため、細胞壁4と外膜5との結合力が弱まり、外膜5が細胞壁4から部分的に脱離しやすくなる。これにより、改変シアノバクテリア31では、細胞内の電子又は電子を有する物質若しくは分子が細胞外に漏出しやすくなるため、細胞外電子伝達効率が向上する。したがって、本実施の形態に係る電子伝達体30は、外部との電子伝達効率が向上する。

【0113】

上述したように、タンパク質をコードする遺伝子の塩基配列が30%以上同一であれば、当該タンパク質と同等の機能を有するタンパク質が発現される可能性が高いと考えられる。そのため、機能が抑制又は喪失される細胞壁ーピルビン酸修飾酵素9をコードする遺伝子としては、例えば、上記の配列番号10~12で示される細胞壁ーピルビン酸修飾酵素9をコードする遺伝子のいずれかの塩基配列と、40%以上、好ましくは50%以上、より好ましくは60%以上、さらに好ましくは70%以上、さらにより好ましくは80%

以上、なお好ましくは90%以上の同一性を有する塩基配列からなり、かつ、細胞壁4のペプチドグリカン2の共有結合型の糖鎖3をピルビン酸で修飾する反応を触媒する機能を有するタンパク質又はポリペプチドをコードする遺伝子であってもよい。

【0114】

続いて、上記(i i)の改変シアノバクテリア31について説明する。

【0115】

上記(i i)の改変シアノバクテリア31は、外膜5のタンパク質透過性を向上させる有機物チャネルタンパク質18が発現されている。

【0116】

ここで、有機物チャネルタンパク質18をシアノバクテリアの外膜5に発現させるとは、有機物チャネルタンパク質18をコードする遺伝子をシアノバクテリアの染色体DNA又はプラスミドに挿入し、当該遺伝子の転写及び翻訳を経て合成された有機物チャネルタンパク質18が外膜5に輸送され、シアノバクテリアの外膜5においてタンパク質を選択的に透過させるチャネル機能を発現することである。当該遺伝子の挿入及び発現の手段は、通常使用される手段であれば特に限定されず、転写活性化のためのプロモーターの塩基配列及び翻訳のためのリボソーム結合配列、並びに、外膜5への輸送のためのシグナル配列の種類により制限されるものではない。

【0117】

本実施の形態では、シアノバクテリアの外膜5に発現させる有機物チャネルタンパク質18は、葉緑体由来の外膜チャネルタンパク質であってもよい。当該有機物チャネルタンパク質18は、例えば、灰色藻*Cyanophora paradoxa*（以下、*C. paradoxa*ともいう）のCpsS（配列番号13）又はCpsF（配列番号14）などであってもよい。また、有機物チャネルタンパク質18は、CpsS又はCpsFとアミノ酸配列が50%以上同一であるタンパク質であってもよい。なお、CpsS又はCpsFとアミノ酸配列が50%以上同一であるタンパク質は、葉緑体由来のタンパク質に限られず、例えば、細菌などの微生物由来のCpsS又はCpsFの類似タンパク質であってもよい。

【0118】

これにより、上記(i i)の改変シアノバクテリア31では、外膜5のタンパク質透過性を向上させる有機物チャネルタンパク質18であるCpsS（配列番号13）又はCpsF（配列番号14）、若しくは、これらのいずれかの有機物チャネルタンパク質18と同等の機能を有するタンパク質が発現される。そのため、上記(i i)の改変シアノバクテリア31は、外膜5のタンパク質透過性が向上するため、外膜5の物質透過性が向上する。その結果、上記(i i)の改変シアノバクテリア31は、細胞内の電子又は電子を有する物質若しくは分子を細胞外に分泌すること、及び、細胞外の電子又は電子を有する物質若しくは分子を細胞内に取り込むことの少なくとも1つを行うことができるため、細胞外電子伝達効率が向上する。したがって、本実施の形態に係る電子伝達体30は、外部との電子伝達効率が向上する。

【0119】

一般に、タンパク質のアミノ酸配列が30%以上同一であれば、タンパク質の立体構造の相溶性が高いため、当該タンパク質と同等の機能を有する可能性が高いと言われている。そのため、有機物チャネルタンパク質18としては、例えば、上記の配列番号13及び配列番号14で示されるタンパク質のいずれかのアミノ酸配列と、40%以上、好ましくは50%以上、より好ましくは60%以上、さらに好ましくは70%以上、さらに好ましくは80%以上、なお好ましくは90%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ、外膜5のタンパク質の透過性を向上させる機能を有するタンパク質又はポリペプチドであってもよい。

【0120】

また、本実施の形態では、上記(i i)において、改変シアノバクテリア31は、外膜5のタンパク質透過性を向上させる有機物チャネルタンパク質18をコードする遺伝子が導入されていてもよい。これにより、上記(i i)の改変シアノバクテリア31では、外

10

20

30

40

50

膜5のタンパク質透過性を向上させる有機物チャネルタンパク質18が発現される。そのため、上記(i i)の改変シアノバクテリア31では、外膜5のタンパク質透過性が向上するため、外膜5の物質透過性が向上する。その結果、上記(i i)の改変シアノバクテリア31は、細胞内の電子又は電子を有する物質若しくは分子を細胞外に分泌すること、及び、細胞外の電子又は電子を有する物質若しくは分子を細胞内に取り込むことの少なくとも1つを行うことができるため、細胞外電子伝達効率が向上する。したがって、本実施の形態に係る電子伝達体30は、外部との電子伝達効率が向上する。

【0121】

上記遺伝子は、例えば、葉緑体由来の遺伝子であってもよい。葉緑体由来の有機物チャネルタンパク質18をコードする遺伝子は、例えば、灰色藻*Cyanophora paradoxa*のcp pS（配列番号15）又はcppF（配列番号16）であってもよい。また、有機物チャネルタンパク質18は、これらのいずれかの遺伝子と塩基配列が50%以上同一である遺伝子であってもよい。これにより、上記(i i)の改変シアノバクテリア31では、上記の配列番号15及び配列番号16で示されるいずれかの有機物チャネルタンパク質18をコードする遺伝子又はこれらのいずれかの遺伝子の塩基配列と50%以上同一である遺伝子が導入される。そのため、上記(i i)の改変シアノバクテリア31では、外膜5におけるタンパク質透過性を向上させる機能を有するタンパク質又は当該タンパク質と同等の機能を有するタンパク質が発現される。これにより、上記(i i)の改変シアノバクテリア31では、外膜5のタンパク質透過性が向上するため、外膜5の物質透過性が向上する。その結果、上記(i i)の改変シアノバクテリア31は、細胞内の電子又は電子を有する物質若しくは分子を細胞外に分泌すること、及び、細胞外の電子又は電子を有する物質若しくは分子を細胞内に取り込むことの少なくとも1つを行うことができるため、細胞外電子伝達効率が向上する。したがって、本実施の形態に係る電子伝達体30は、外部との電子伝達効率が向上する。

【0122】

なお、有機物チャネルタンパク質18をコードする遺伝子としては、葉緑体由来の遺伝子に限られない。有機物チャネルタンパク質18をコードする遺伝子としては、例えば、上記遺伝子cp pS（配列番号15）及びcppF（配列番号16）のいずれかの塩基配列と、40%以上、好ましくは50%以上、より好ましくは60%以上、さらに好ましくは70%以上、さらに好ましくは80%以上、なお好ましくは90%以上の同一性を有する塩基配列からなり、かつ、外膜5のタンパク質透過性を向上させる機能を有するタンパク質又はポリペプチドをコードする遺伝子であってもよい。

【0123】

[4. 電子伝達体の製造方法]

続いて、本実施の形態に係る電子伝達体30の製造方法について説明する。電子伝達体30の製造方法は、(i)シアノバクテリアにおいて外膜5と細胞壁4との結合に関与するタンパク質の機能が抑制又は喪失されている、及び、(i i)外膜5のタンパク質透過性を向上させる有機物チャネルタンパク質18が発現されている、の少なくとも1つである改変シアノバクテリア31を製造するステップ（以下、改変シアノバクテリア31の製造ステップという）を含む。

【0124】

以下、改変シアノバクテリア31の製造ステップについて説明する。改変シアノバクテリア31の製造ステップは、(i)シアノバクテリアにおいて外膜5と細胞壁4との結合に関与するタンパク質の機能を抑制又は喪失させるステップ、及び、(i i)外膜5のタンパク質透過性を向上させる有機物チャネルタンパク質18を発現させるステップの少なくとも1つを含む。

【0125】

上記(i)では、外膜5と細胞壁4との結合に関与するタンパク質は、例えば、SLHドメイン保持型外膜タンパク質6及び細胞壁ーピルビン酸修飾酵素9の少なくとも1つであってもよい。

【0126】

なお、タンパク質の機能を抑制する又は喪失させる手段としては、特に限定されないが、例えば、SLHドメイン保持型外膜タンパク質6をコードする遺伝子及び細胞壁ーピルビン酸修飾酵素9をコードする遺伝子を欠失若しくは不活性化させること、これらの遺伝子の転写を阻害すること、これらの遺伝子の転写産物の翻訳を阻害すること、又はこれらのタンパク質を特異的に阻害する阻害剤を投与することなどであってもよい。

【0127】

上記遺伝子を欠失又は不活性化させる手段は、例えば、該当遺伝子の塩基配列上の1つ以上の塩基に対する突然変異の導入、該当塩基配列に対する他の塩基配列への置換若しくは他の塩基配列の挿入、又は、該当遺伝子の塩基配列の一部若しくは全部の削除などであってもよい。

10

【0128】

上記遺伝子の転写を阻害する手段は、例えば、該当遺伝子のプロモーター領域に対する変異導入、他の塩基配列への置換若しくは他の塩基配列の挿入による当該プロモーターの不活性化、又は、CRISPR干渉法（非特許文献16：Yao et al., ACS Synth. Biol., 2016, 5:207-212）等であってもよい。上記の変異導入、又は塩基配列の置換若しくは挿入の具体的な手法は、例えば、紫外線照射、部位特異的変異導入、又は、相同組換え法などであってもよい。

【0129】

また、上記遺伝子の転写産物の翻訳を阻害する手段は、例えば、RNA (ribonucleic acid) 干渉法などであってもよい。

20

【0130】

以上のいずれかの手段を用いることにより、シアノバクテリアにおける外膜5と細胞壁4との結合に関与するタンパク質の機能を抑制又は喪失させて、改変シアノバクテリア31を製造してもよい。これにより、上記(i)のステップで製造された改変シアノバクテリア31は、細胞壁4と外膜5との結合（つまり、結合量及び結合力）が部分的に低減するため、外膜5が細胞壁4から部分的に離脱しやすくなる。そのため、改変シアノバクテリア31では、細胞内の電子又は電子を有する物質若しくは分子が細胞外に漏出しやすくなるため、細胞外電子伝達効率が向上する。

【0131】

上記(ii)では、外膜5のタンパク質透過性を向上させる有機物チャネルタンパク質18は、例えば、葉緑体由来のチャネルタンパク質であり、具体的には、配列番号13で示されるアミノ酸配列からなるCpPS、配列番号14で示されるアミノ酸配列からなるCpPFであってもよい。また、有機物チャネルタンパク質18は、これらのいずれかのチャネルタンパク質とアミノ酸配列が50%以上同一であるタンパク質であってもよい。

30

【0132】

有機物チャネルタンパク質18を発現させるステップでは、まず、外膜5のタンパク質透過性を向上させる有機物チャネルタンパク質18をコードする遺伝子がシアノバクテリアの染色体DNA又はプラスミドに挿入される。そして、当該遺伝子の転写及び翻訳を経て合成された有機物チャネルタンパク質18は、外膜5に輸送され、シアノバクテリアの外膜5においてチャネル機能を発現する。なお、遺伝子の挿入及び発現の手段は、通常使用される手段であれば特に限定されず、転写活性化のためのプロモーターの塩基配列及び翻訳のためのリボソーム結合配列、並びに、外膜5への輸送のためのシグナル配列の種類により制限されるものではない。

40

【0133】

以上により、外膜5のタンパク質透過性を向上させる有機物チャネルタンパク質18を発現させて、改変シアノバクテリア31を製造してもよい。これにより、上記(ii)のステップで製造された改変シアノバクテリア31は、外膜5のタンパク質透過性が向上するため、外膜5の物質透過性が向上する。その結果、改変シアノバクテリア31は、細胞内の電子又は電子を有する物質若しくは分子を細胞外に分泌すること、及び、細胞外の電

50

子又は電子を有する物質若しくは分子を細胞内に取り込むことの少なくとも1つを行うことができるため、細胞外電子伝達効率が向上する。

【0134】

以上の手順で、(i)シアノバクテリアにおいて外膜5と細胞壁4との結合に関与するタンパク質の機能が抑制又は喪失されている、及び、(ii)外膜5のタンパク質透過性を向上させる有機物チャネルタンパク質18が発現されている、の少なくとも1つである改変シアノバクテリア31を製造してもよい。

【0135】

これにより、上記方法により製造された改変シアノバクテリア31は、細胞内の電子又は電子を有する物質若しくは分子を細胞外に分泌すること、及び、細胞外の電子又は電子を有する物質若しくは分子を細胞内に取り込むことの少なくとも1つを行うことができるため、細胞外電子伝達効率が向上する。したがって、本実施の形態に係る電子伝達体30の製造方法によれば、外部との電子伝達効率が向上した電子伝達体30を提供することができる。

【0136】

[5. 電子伝達方法]

本実施の形態に係る電子伝達方法は、上記のいずれかの改変シアノバクテリア31を含む電子伝達体30を用いる。

【0137】

電子伝達体30は、上記の(i)シアノバクテリアにおいて外膜5と細胞壁4との結合に関与するタンパク質の機能が抑制又は喪失されている、及び(ii)外膜5のタンパク質透過性を向上させる有機物チャネルタンパク質18が発現されている、の少なくとも1つである改変シアノバクテリア31を含み、当該改変シアノバクテリア31は、(I)外部に電子を供給すること、及び、(II)外部から電子を取り込むことの少なくとも1つを行う。

【0138】

上述したように、本実施の形態では、電子は、電子又は電子を有する物質若しくは分子である。また、電子を供給するとは、電子を供給するだけではなく、電子を有するあらゆる物質又は分子を供給することをいう。また、電子を取り込むとは、電子を取り込むだけでなく、電子を有するあらゆる物質又は分子を取り込むことをいう。

【0139】

また、電子伝達体30は、上記の(i)及び(ii)の少なくとも1つである改変シアノバクテリア31であってもよく、図2に示されるように、当該改変シアノバクテリア31に加えて、電子伝達物質33、電子メディエータ35、及び、導電性物質37の少なくとも1つを含んでもよい。

【0140】

まず、上記の(I)外部に電子を供給する場合について説明する。改変シアノバクテリア31が外部に電子を供給するとは、例えば、改変シアノバクテリア31が光を受けて電子又は電子を有する物質若しくは分子を生成することである。電子を有する物質若しくは分子は、例えば、電子伝達物質33であってもよい。

【0141】

また、改変シアノバクテリア31は、生成した電子又は電子を有する物質若しくは分子を外膜の外に放出してもよい。例えば、改変シアノバクテリア31は、光合成電子伝達鎖に関与する電子伝達物質33の一部を細胞外(つまり、外膜5の外)に放出してもよい。細胞外に放出された電子伝達物質33は、例えば、他の改変シアノバクテリア31の細胞内に取り込まれて生体エネルギー源の生成に関与してもよく、他の複数の改変シアノバクテリア31を介して電子の移動が起こってよい。そして、放出された電子伝達物質33は、外部(例えば、外部電極)との酸化還元反応より電極に電子を供給してもよい。電子の移動は、電流値を測定することにより確認できる。例えば、改変シアノバクテリア31を培養し、細胞懸濁液(いわゆる、培養液)中に電極を配置し外部より電位を印加すれば、

10

20

30

40

50

細胞と電極との間の電子伝達が高効率で起こるため、電流が発生する。

【0142】

続いて、上記の（ⅠⅠ）外部から電子を取り込む場合について説明する。改変シアノバクテリア31が外部から電子を取り込むとは、例えば、改変シアノバクテリア31が外膜の外側に存在する電子又は電子を有する物質若しくは分子を細胞壁4の内側に取り込むことである。さらに、改変シアノバクテリア31は、細胞壁4の内側（細胞質内）で電子又は電子を有する物質若しくは分子を利用してもよい。従来技術で説明したように、一般に、シアノバクテリアは、高い光合成能を有し、細胞内で様々な有機物を産生している。改変シアノバクテリア31もシアノバクテリアと同様に、細胞内（細胞壁内及びチラコイド内）で様々な有機物を産生する。このとき、改変シアノバクテリア31は、外膜5の外側に存在する電子又は電子を有する物質若しくは分子（なお、電子伝達物質33の一部であってもよい）を細胞壁4の内部に取り込み、細胞壁4の内側（つまり、細胞質中）で電子伝達物質33から電子を受容して、物質産生に利用してもよい。さらに、改変シアノバクテリア31は、外部から取り込んだ電子を呼吸（有機物の異化）に利用してもよい。このように、改変シアノバクテリア31は、光エネルギーの代わりに電気エネルギーを利用することができるため、太陽光の照射が不十分な環境においても、細胞内の還元力が不足しにくくなる。そのため、改変シアノバクテリア31は、光エネルギーと電気エネルギーとの両方を利用することができるため、細胞内での物質生産効率が向上する。

10

【0143】

また、例えば、電子伝達体30に含まれる改変シアノバクテリア31は、光エネルギーの代わりに電気エネルギーを利用して、安定的に、細胞内で必要なエネルギー及び還元力の生成、物質の異化、並びに、物質の産生を行うことができる。

20

【0144】

以上より、本実施の形態に係る電子伝達体30は、細胞外電子伝達効率が向上した改変シアノバクテリア31を含むため、外部（例えば、外部電極など）に効率良く電子を供与し、外部から電子を効率良く受容することができる。そのため、例えば、電子伝達体30を用いれば、電子伝達体30に含まれる改変シアノバクテリア31が細胞内の電子伝達物質を細胞外に放出することにより、例えば外部電極に効率良く電子を供給して電流を発生させることができる。

【実施例】

30

【0145】

以下、実施例にて本開示の電子伝達体、電子伝達体の製造方法及び電子伝達方法について具体的に説明するが、本開示は以下の実施例のみに何ら限定されるものではない。

【0146】

以下の実施例では、シアノバクテリアにおいて（i）外膜と細胞壁との結合に関するタンパク質の機能を抑制又は喪失させることにより、シアノバクテリアの外膜を細胞壁から部分的に脱離させた改変シアノバクテリアを作製し（実施例1及び実施例2）、（ii）外膜にタンパク質透過性を向上させるチャネルタンパク質を発現させることにより、外膜の物質透過性を向上した改変シアノバクテリアを作製した（実施例3）。これらの3種類の改変シアノバクテリアが細胞内の電子伝達物質33を分泌し、外部に電子を供給すること、及び、細胞外から細胞内に電子を取り込むことの少なくとも1つを行うか否か、つまり、細胞と外部電極との間の細胞外電子伝達効率を向上させるか否かを評価した。評価は、これらの改変シアノバクテリアが細胞外に分泌したタンパク質の定量及び同定、並びに、光合成により発生した細胞内電流値の測定により行った。

40

【0147】

なお、本実施例で使用したシアノバクテリア種は、*Synechocystis* sp. PCC 6803（以下、単に、「シアノバクテリア」と呼ぶ）である。

【0148】

（実施例1）

実施例1では、SLHドメイン保持型外膜タンパク質をコードするslr1841遺伝子（配

50

列番号 7) の発現が抑制された改変シアノバクテリアを製造した。

【0149】

(1) slr1841 遺伝子の発現が抑制されたシアノバクテリア改変株の構築

遺伝子抑制法として、CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat) 干渉法を用いた。本方法では、dCas9 タンパク質をコードする遺伝子 (以下、dCas9 遺伝子という) と、slr1841_sgRNA (single-guide Ribonucleic Acid) 遺伝子とを、シアノバクテリアの染色体 DNA に導入することにより、slr1841 遺伝子 (配列番号 7) の発現を抑制することができる。

【0150】

本方法による遺伝子発現抑制の仕組みは次の通りである。

【0151】

まず、ヌクレアーゼ活性を欠損した Cas9 タンパク質 (dCas9) と、slr1841 遺伝子 (配列番号 7) の塩基配列に相補的に結合する sgRNA (slr1841__sgRNA) とが、複合体を形成する。

【0152】

次に、この複合体がシアノバクテリアの染色体 DNA 上の slr1841 遺伝子を認識し、slr1841 遺伝子と特異的に結合する。この結合が立体障害となることにより、slr1841 遺伝子の転写が阻害される。その結果、シアノバクテリアの slr1841 遺伝子の発現が抑制される。

【0153】

以下、上記の 2 つの遺伝子の各々をシアノバクテリアの染色体 DNA に導入する方法を具体的に説明する。

【0154】

(1-1) dCas9 遺伝子の導入

Synechocystis LY07 株 (以下、LY07 株ともいう) (非特許文献 16 参照) の染色体 DNA を鋳型として、dCas9 遺伝子及び dCas9 遺伝子の発現制御のためのオペレーター遺伝子、並びに、遺伝子導入の目印となるスペクチノマイシン耐性マーカー遺伝子を、表 1 に記載のプライマー psbA1-Fw (配列番号 17) 及び psbA1-Rv (配列番号 18) を用いて PCR (Polymerase chain reaction) 法により増幅した。なお、LY07 株では、上記の 3 つの遺伝子が連結した状態で染色体 DNA 上の psbA1 遺伝子に挿入されているため、1 つの DNA 断片として PCR 法により増幅することができる。ここでは、得られた DNA 断片を「psbA1::dCas9 カセット」と表記する。In-Fusion PCR クローニング法 (登録商標) を用いて、psbA1::dCas9 カセットを pUC19 プラスミドに挿入し、pUC19-dCas9 プラスミドを得た。

【0155】

10

20

30

40

50

【表 1】

プライマー名	塩基配列	配列番号
psbA1-Fw	5' -CAGTGAATTCGAGCTCGGTATATAGCGTTGCAGTCCCTGG-3'	17
psbA1-Rv	5' -GATTACGCCAAGCTTGCAATGACCGGGTCACTTCAACG-3'	18
slr2030-Fw	5' -CAGTGAATTCGAGCTCGGTAAATACCGTTGTCCCTTTTGTTCATCG-3'	19
sgRNA_slr1841-Rv	5' -TGTTAGTGAGCCCTGCTGTTAGCTCCCGATCTCTCTATCACTGAT-3'	20
sgRNA_slr1841-Fw	5' -ACAGCAGGGCTCACAACAGTTTTAGAGCTAGAAAATAGCAAGTTAAATAA-3'	21
slr2031-Rv	5' -GATTACGCCAAGCTTGCAATGCGGAAACAAGCTGAATCTGGGCAATC-3'	22
sgRNA_slr0688-Rv	5' -TTTTAGTCTGTTTGTGCTGCAATAGCTCCCGATCTCTCTATCACTGAT-3'	23
sgRNA_slr0688-Fw	5' -TGCAGCAACAGACTAAAAGTTTTAGAGCTAGAAAATAGCAAGTTAAATAA-3'	24
slr0042-Fw	5' -TAGATATAATGTTGTGTTAAATTAGAGGAATTCATCGCA-3'	25
slr0042-Rv	5' -CGCTCTTCCGATCTGATTTAAATGTGAACGTCGTCCGTAG-3'	26
PL22-Rv	5' -TGTTAGTGAGCCCTGCTGTTAGCTCCCGATCTCTCTATCACTGAT-3'	27
KmR-Fw	5' -ACAGCAGGGCTCACAACAGTTTTAGAGCTAGAAAATAGCAAGTTAAATAA-3'	28
cppS-Fw	5' -TCCCTGGTTCCGCTGGGGCTATGGCCCGGAGTGCACCGT-3'	29
cppS-Rv	5' -ATTTGATGCCCTGGCTCTAGTTTACAGAAAGCTCGATCTCGA-3'	30
tetR-Rv	5' -TAGCAGGTACTGCAACGCTATGCCGCTCCCGGTGTTCCGC-3'	31
tetR-Fw	5' -TTAGAACTGGTAAACGATACTTACTGATCGATAACGAGCG-3'	32

【0156】

得られたpUC19-dCas9プラスミド1 µgとシアノバクテリア培養液（菌体濃度OD730 = 0.5程度）を混合し、自然形質転換によりpUC19-dCas9プラスミドをシアノバクテリアの細胞内に導入した。形質転換された細胞を20 µg/mLのスペクチノマイシンを含むBG-11寒天培地上で生育させることにより、選抜した。選抜された細胞では、染色体DNA上のpsbA1遺伝子と、pUC19-dCas9プラスミド上のpsbA1上流断片領域及びpsbA1下流断片領域との間で相同組み換えが起こっている。これにより、psbA1遺伝子領域にdCas9カセットが挿入されたSynechocystis dCas9株を得た。なお、用いたBG-11培地の組成は表2の通りである。

【0157】

10

20

30

40

50

【表 2】

成分	含有量 (mg/L)
EDTA-Na	1
Ammonium Iron Citrate	6
NaNO ₃	1500
MgSO ₄	75
K ₂ HPO ₄	39
CaCl ₂	28.6
H ₃ BO ₄	2.8
MnCl ₂	1.8
ZnSO ₄	0.2
CuSO ₄	0.08
Na ₂ MoO ₄	0.02
Co(NO ₃) ₂	0.005
TES-KOH (pH 7.5)	4580

10

20

【0158】

(1-2) slr1841_sgRNA遺伝子の導入

CRISPR干渉法では、sgRNA遺伝子上のprotospacerと呼ばれる領域に、標的配列と相補的な約20塩基の配列を導入することにより、sgRNAが標的遺伝子に特異的に結合する。本実施例で用いたprotospacer配列は表3に示される。

【0159】

【表 3】

Protospacer標的遺伝子	塩基配列	配列番号
slr1841	5' -ACAGCAGGGCTCACTAACA-3'	33
slr0688	5' -TGCAGCAAACAGACTAAAA-3'	34

30

【0160】

Synechocystis LY07株では、sgRNA遺伝子（protospacer領域を除く）とカナマイシン耐性マーカー遺伝子とが連結した形で、染色体DNA上のslr2030-slr2031遺伝子に挿入されている。従って、当該sgRNA遺伝子をPCR法により増幅する際に用いるプライマーに、slr1841遺伝子（配列番号7）と相補的なprotospacer配列（配列番号33）を付与することにより、slr1841を特異的に認識するsgRNA (slr1841_sgRNA)を容易に得ることができる。

40

【0161】

まず、LY07株の染色体DNAを鋳型とし、表1に記載のプライマーslr2030-Fw（配列番号19）及びsgRNA_slr1841-Rv（配列番号20）のセット、並びに、sgRNA_slr1841-Fw（配列番号21）及びslr2031-Rv（配列番号22）のセットを用いて2つのDNA断片をPCR法により増幅した。

【0162】

続いて、上記のDNA断片の混合溶液を鋳型として、表1に記載のプライマーslr2030-Fw（配列番号19）とslr2031-Rv（配列番号22）とを用いてPCR法により増幅すること

50

により、(i) slr2030遺伝子断片、(ii) slr1841_sgRNA、(iii) カナマイシン耐性マーカー遺伝子、(iv) slr2031遺伝子断片が順に連結したDNA断片 (slr2030-2031::slr1841_sgRNA) を得た。In-Fusion PCRクローニング法（登録商標）を用いて、slr2030-2031::slr1841_sgRNAをpUC19プラスミドに挿入し、pUC19-slr1841_sgRNAプラスミドを得た。

【0163】

上記（1-1）と同様の方法でpUC19-slr1841_sgRNAプラスミドをSynechocystis dCas9株に導入し、形質転換された細胞を30 µg/mLカナマイシンを含むBG-11寒天培地上で選抜した。これにより、染色体DNA上のslr2030-slr2031遺伝子にslr1841_sgRNAが挿入された形質転換体Synechocystis dCas9 slr1841_sgRNA株（以下、slr1841抑制株ともいう）を得た。

【0164】

（1-3）slr1841遺伝子の抑制

上記dCas9遺伝子及びslr1841_sgRNA遺伝子は、アンヒドロテトラサイクリン（aTc）の存在下で発現誘導されるようにプロモーター配列が設計されている。本実施例では、培地中に終濃度1 µg/mL aTc を添加することによりslr1841遺伝子の発現を抑制した。

【0165】

（実施例2）

実施例2では、下記の手順により、細胞壁ーピルビン酸修飾酵素をコードするslr0688遺伝子の発現が抑制された改変シアノバクテリアを得た。

【0166】

（2）slr0688遺伝子の発現が抑制されたシアノバクテリア改変株の構築

上記（1-2）と同様の手順により、slr0688遺伝子（配列番号10）と相補的なprotospacer配列（配列番号34）を含むsgRNA遺伝子をSynechocystis dCas9株に導入し、Synechocystis dCas9 slr0688_sgRNA株を得た。なお、表1に記載のプライマーslr2030-Fw（配列番号19）及びsgRNA_slr0688-Rv（配列番号23）のセット、並びに、sgRNA_slr0688-Fw（配列番号24）及びslr2031-Rv（配列番号22）のセットを用いたことと、(i) slr2030遺伝子断片、(ii) slr0688_sgRNA、(iii) カナマイシン耐性マーカー遺伝子、(iv) slr2031遺伝子断片が順に連結したDNA断片 (slr2030-2031::slr0688_sgRNA) をIn-Fusion PCRクローニング法（登録商標）を用いて、pUC19プラスミドに挿入し、pUC19-slr0688_sgRNAプラスミドを得たこと以外は、上記（1-2）と同様の条件で行った。

【0167】

さらに、上記（1-3）と同様の手順により、slr0688遺伝子の発現を抑制した。

【0168】

（比較例1）

比較例1では、実施例1の（1-1）と同様の手順により、Synechocystis dCas9株を得た。

【0169】

続いて、実施例1、実施例2及び比較例1で得られた菌株について、それぞれ、細胞表層の状態の観察を行った。以下、詳細について説明する。

【0170】

（3）菌株の細胞表層の状態の観察

実施例1で得られた改変シアノバクテリアSynechocystis dCas9 slr1841_sgRNA株（いわゆる、slr1841抑制株）、実施例2で得られた改変シアノバクテリアSynechocystis dCas9 slr0688_sgRNA株（以下、slr0688抑制株ともいう）、及び、比較例1で得られた改変シアノバクテリアSynechocystis dCas9株（以下、Control株という）のそれぞれの超薄切片を作製し、電子顕微鏡を用いて細胞表層の状態（言い換えると、外膜構造）を観察した。

【0171】

10

20

30

40

50

(3-1) 菌株の培養

初発菌体濃度 $OD_{730} = 0.05$ となるように、実施例1のslr1841抑制株を、 $1 \mu\text{g/mL}$ aTcを含むBG-11培地に接種し、光量 $100 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ 、 30°C の条件下で5日間振盪培養した。なお、実施例2のslr0688抑制株及び比較例1のControl株も実施例1と同様の条件で培養した。

【0172】

(3-2) 菌株の超薄切片の作製

上記(3-1)で得られた培養液を、室温にて $2,500 \text{ g}$ で10分間遠心分離し、実施例1のslr1841抑制株の細胞を回収した。次いで、細胞を -175°C の液体プロパンで急速凍結した後、2%グルタルアルデヒド及び1%タンニン酸を含むエタノール溶液を用いて -80°C で2日間固定した。固定後の細胞をエタノールにより脱水処理し、脱水した細胞を酸化プロピレンに浸透させたあと、樹脂(Quetol-651)溶液中に沈めた。その後 60°C で48時間静置し、樹脂を硬化させて、細胞を樹脂で包埋した。樹脂中の細胞を、ウルトラミクロトーム(Ultracut)を用いて 70 nm の厚さに薄切し、超薄切片を作成した。この超薄切片を、2%酢酸ウラン及び1%クエン酸鉛溶液を用いて染色して、実施例1のslr1841抑制株の透過型電子顕微鏡の試料を準備した。なお、実施例2のslr0688抑制株及び比較例1のControl株についてもそれぞれ同様の操作を行い、透過型電子顕微鏡の試料を準備した。

【0173】

(3-3) 電子顕微鏡による観察

透過型電子顕微鏡(JEOL JEM-1400Plus)を用いて、加速電圧 100 kV 下で、上記(3-2)で得られた超薄切片の観察を行った。観察結果を図3～図8に示す。

【0174】

まず、実施例1のslr1841抑制株について説明する。図3は、実施例1のslr1841抑制株のTEM(Transmission Electron Microscope)像である。図4は、図3の破線領域Aの拡大像である。図4の(a)は、図3の破線領域Aの拡大TEM像であり、図4の(b)は、図4の(a)の拡大TEM像を描写した図である。

【0175】

図3に示されるように、実施例1のslr1841抑制株では、外膜が細胞壁から部分的に剥離し(つまり、外膜が部分的に剥がれ落ち)、かつ、外膜が部分的に撓んでいた。

【0176】

細胞表層の状態をより詳細に確認するために、破線領域Aを拡大観察したところ、図4の(a)及び図4の(b)に示されるように、外膜が部分的に剥がれ落ちた部分(図中の一点破線領域a1及びa2)を確認できた。また、一点破線領域a1の傍に外膜が大きく撓んだ部分を確認できた。この部分は、外膜と細胞壁との結合が弱められた部分であり、培養液が外膜からペリプラズム内に浸透したため、外膜が外側に膨張されて、撓んだと考えられる。

【0177】

続いて、実施例2のslr0688抑制株について説明する。図5は、実施例2のslr0688抑制株のTEM像である。図6は、図5の破線領域Bの拡大像である。図6の(a)は、図5の破線領域Bの拡大TEM像であり、図6の(b)は、図6の(a)の拡大TEM像を描写した図である。

【0178】

図5に示されるように、実施例2のslr0688抑制株では、外膜が細胞壁から部分的に剥離し、かつ、外膜が部分的に撓んでいた。また、slr0688抑制株では、外膜が部分的に細胞壁から脱離していることが確認できた。

【0179】

細胞表層の状態をより詳細に確認するために、破線領域Bを拡大観察したところ、図6の(a)及び図6の(b)に示されるように、外膜が大きく撓んだ部分(図中の一点破線領域b1)、及び、外膜が部分的に剥がれ落ちた部分(図中の一点破線領域b2及びb3)を確認できた。また、一点破線領域b1、b2及びb3それぞれの近傍に外膜が細胞壁

10

20

30

40

50

から脱離している部分を確認できた。

【0180】

続いて、比較例1のControl株について説明する。図7は、比較例1のControl株のTEM像である。図8は、図7の破線領域Cの拡大像である。図8の(a)は、図7の破線領域Cの拡大TEM像であり、図8の(b)は、図8の(a)の拡大TEM像を描写した図である。

【0181】

図7に示されるように、比較例1のControl株の細胞表層は整っており、内膜、細胞壁、外膜、及びS層が順に積層された状態を保っていた。つまり、Control株では、実施例1及び2のように外膜が細胞壁から脱離した部分、外膜が細胞壁から剥離した（つまり、剥がれ落ちた）部分、及び、外膜が撓んだ部分は見られなかった。

【0182】

（実施例3）

実施例3では、下記の手順により、灰色藻*Cyanophora paradoxa*が保持する葉緑体の外膜チャンネルタンパク質CpS（配列番号13）を、シアノバクテリアの外膜に導入した*Synechocystis cpS tetR*株（以下、cpS導入株ともいう）を得た。

【0183】

（4）葉緑体外膜チャンネルタンパク質CpSのシアノバクテリア外膜への導入

（4-1）cpS遺伝子発現カセットの構築

cpS遺伝子と、cpS遺伝子の発現制御のためのプロモーター領域（PL22）と、シアノバクテリアにおける外膜移行シグナル配列（slr0042-signal）と、遺伝子導入の目印となるカナマイシン耐性マーカー遺伝子（KmR）と、が連結した遺伝子カセットを、以下の手順で作製した。

【0184】

まず、シアノバクテリアの染色体DNAを鋳型とし、表1に記載のプライマーslr0042-Fw（配列番号25）及びslr0042-Rv（配列番号26）を用いてPCR法により増幅し、slr0042遺伝子を得た。続いて、*Synechocystis* LY07株（非特許文献16）の染色体DNAを鋳型として、表1に記載のプライマーslr2030-Fw（配列番号19）及びPL22-Rv（配列番号27）のセット並びにKmR-Fw（配列番号28）及びslr2031-Rv（配列番号22）のセットを用いてPCR法により増幅し、PL22及びKmRを得た。なお、LY07株では、これらが染色体上のslr2030-slr2031遺伝子中に挿入されて存在しているため、上記の4つのプライマーを用いてPCR法により増幅すると、PL22の5'末端側にslr2030遺伝子断片が連結した形で増幅され、KmRの3'末端側にslr2031遺伝子断片が連結した形で増幅される。次に、上記手順で得られたslr0042遺伝子、PL22、及びKmRの混合溶液を鋳型とし、表1に記載の4つのプライマー（配列番号19、22、27、28）を用いてPCR法により増幅することにより、5'末端側から、slr2030遺伝子断片、PL22、slr0042遺伝子、KmR、及びslr2031遺伝子断片が順に連結した遺伝子カセット（slr2030-2031::slr0042-KmRカセット）を得た。In-Fusion PCRクローニング法（登録商標）を用いて、slr2030-2031::slr0042-KmRカセットをpUC19プラスミドに挿入し、pUC19-slr0042プラスミドを得た。

【0185】

上記手順と並行して、灰色藻*C. paradoxa* NIES-547よりSMART cDNA ライブラリー合成キット(Clontech)を用いてtotal cDNAを調製した。このcDNAを鋳型に、表1に記載のプライマーcpS-Fw（配列番号29）及びcpS-Rv（配列番号30）を用いてPCR法により増幅し、cpS遺伝子（配列番号13）を得た。In-Fusion PCRクローニング法（登録商標）を用いて、cpS遺伝子（配列番号13）をpUC19-slr0042プラスミドに挿入し、pUC19-CpSプラスミドを得た。なお、この手順により、cpS遺伝子はslr0042遺伝子の外膜移行シグナル配列の3'末端側に連結した形で挿入され、slr0042遺伝子の外膜移行シグナル配列以外の領域は、cpSのコード領域と入れ替わる形で除去される。

【0186】

10

20

30

40

50

(4-2) PL22のプロモーター活性制御カセット (tetR) の構築

上記PL22のプロモーター活性は、TetRリプレッサーを介した制御により、アンヒドロテトラサイクリン (aTc) の存在下でのみ誘導される。従ってPL22の活性制御のためのtetR遺伝子を改変シアノバクテリアに導入する必要がある。

【0187】

まず、LY07株の染色体DNAを鋳型とし、表1に記載のプライマーpsbA1-Fw (配列番号17) 及びtetR-Rv (配列番号31) のセット、並びにtetR-Fw (配列番号32) 及びpsbA1-Rv (配列番号18) のセットを用いてPCR法により増幅してtetR遺伝子と、遺伝子導入の目印となるスペクチノマイシン耐性マーカー遺伝子 (SpcR) を得た。なお、LY07株ではこれらが染色体上のpsbA1遺伝子中に挿入されて存在しているため、上記プライマーを用いてPCR法により増幅すると、tetR遺伝子の5'末端側にpsbA1遺伝子の上流側断片が連結した形で増幅され、SpcRの3'末端側にpsbA1遺伝子の下流側断片が連結した形で増幅される。次に、tetR遺伝子とSpcRの混合溶液を鋳型とし、表1に記載のプライマーpsbA1-Fw (配列番号17) 及びpsbA1-Rv (配列番号18) を用いてPCR法により増幅することにより、5'末端側から、psbA1遺伝子上流側断片、tetR、SpcR、psbA1遺伝子下流側断片が順に連結した遺伝子カセット (psbA1::tetRカセット) を得た。In-Fusion PCRクローニング法 (登録商標) を用いて、psbA1::tetRカセットをpUC19プラスミドに挿入し、pUC19-tetRプラスミドを得た。

【0188】

(4-3) cppS遺伝子発現カセットとtetRカセットの導入

上記手順により得られたpUC19-cppSプラスミド1 µgと、シアノバクテリア培養液 (菌体濃度OD730 = 0.5程度) とを混合し、自然形質転換によりプラスミドを細胞内に導入した。形質転換された細胞を30 µg/mLのカナマイシンを含むBG-11寒天培地上で生育させることにより、選抜した。選抜された細胞では、染色体上のslr2030-2031遺伝子と、pUC19-cppSプラスミド上のslr2030遺伝子断片領域およびslr2031遺伝子断片領域との間で相同組み換えが起こる。これにより、slr2030-2031遺伝子領域にcppS遺伝子発現カセットが挿入されたSynechocystis cppS株を得た。なお、用いたBG-11培地の組成は表2の通りである。

【0189】

次に、pUC19-tetRプラスミド1 µgとSynechocystis cppS培養液 (菌体濃度OD730 = 0.5程度) とを混合し、自然形質転換によりプラスミドを細胞内に導入した。形質転換された細胞を30 µg/mLのカナマイシンおよび20 µg/mLのスペクチノマイシンを含むBG-11寒天培地上で生育させることにより選抜し、Synechocystis cppS tetR株を得た。上記と同様に、同株では染色体DNA上のpsbA1遺伝子にtetRカセットが挿入されている。

【0190】

(4-4) cppS遺伝子の発現誘導

上記Synechocystis cppS tetR株のcppS遺伝子は、アンヒドロテトラサイクリン (aTc) の存在下で発現誘導される。本実施例では、BG-11培地中に終濃度1 µg/mL aTc を添加して培養することによりcppS遺伝子を発現誘導した。

【0191】

(5) タンパク質の分泌生産性試験

以下の方法により、ペリプラズム (外膜と内膜との間隙) に存在するタンパク質が細胞外に分泌しているか否かを確認した。

【0192】

より具体的には、実施例1のslr1841抑制株、実施例2のslr0688抑制株、実施例3のcppS導入株、及び、比較例1のControl株をそれぞれ培養し、細胞外に分泌されたタンパク質量 (以下、分泌タンパク質量ともいう) を測定した。培養液中のタンパク質量により、上記の菌株それぞれのタンパク質の分泌生産性を評価した。なお、タンパク質の分泌生産性とは、細胞内で産生されたタンパク質を細胞外に分泌することにより、タンパク質を生産する能力をいう。以下、具体的な方法について説明する。

【0193】

(5-1) 菌株の培養

実施例1のslr1841抑制株を上記(3-1)と同様の方法で培養した。培養は、独立して3回行った。なお、実施例2、実施例3及び比較例1の菌株についても実施例1の菌株と同様の条件で培養した。

【0194】

(5-2) 細胞外に分泌されタンパク質の定量

上記(5-1)で得られた培養液を、室温にて2,500 gで10分間遠心分離し、培養上清を得た。得られた培養上清を、ポアサイズ0.22 μm のメンブレンフィルターを用いてろ過し、実施例1のslr1841抑制株の細胞を完全に除去した。ろ過後の培養上清に含まれる総タンパク質量をBCA (Bicinchoninic acid) 法により定量した。この一連の操作を、独立して培養した3つの培養液のそれぞれについて行い、実施例1のslr1841抑制株の細胞外に分泌されたタンパク質量の平均値及び標準偏差を求めた。なお、実施例2、実施例3及び比較例1の菌株についても、それぞれ、同様の条件で、上記(5-1)で得られた3つの培養液のタンパク質量の定量を行い、3つの培養液中のタンパク質量の平均値及び標準偏差を求めた。

【0195】

結果を図9に示す。図9は、実施例1～3及び比較例1の改変シアノバクテリアの培養液中のタンパク質量 ($n = 3$ 、エラーバー = SD) を示すグラフである。

【0196】

図9に示されるように、実施例1のslr1841抑制株、実施例2のslr0688抑制株、及び、実施例3のcppS導入株のいずれも、比較例1のControl株と比較して培養上清中に分泌されたタンパク質量 (mg/L) が約25倍向上していた。

【0197】

データの記載を省略するが、培養液の吸光度(730nm)を測定し、菌体乾燥重量1 gあたりの分泌タンパク質量 (mg protein/g cell dry weight) を算出したところ、実施例1のslr1841抑制株、実施例2のslr0688抑制株及び実施例3のcppS導入株のいずれも、菌体乾燥重量1 gあたりの分泌タンパク質量 (mg protein/g cell dry weight) は、比較例1のControl株と比較して、約36倍向上していた。

【0198】

また、図9において、実施例1及び実施例2の「シアノバクテリアの外膜を細胞壁から部分的に脱離させた改変シアノバクテリア」の分泌タンパク質量 (mg/L) を比較すると、SLHドメイン保持型外膜タンパク質をコードする遺伝子 (slr1841) の発現を抑制した実施例1のslr1841抑制株よりも、細胞壁-ピルビン酸修飾酵素をコードする遺伝子 (slr0688) の発現を抑制した実施例2のslr0688抑制株の方が、培養上清中に分泌されたタンパク質量が多かった。これは、外膜中のSLHドメイン保持型外膜タンパク質 (Slr1841) の数よりも細胞壁表面の共有結合型の糖鎖の数の方が多いたことが関係していると考えられる。つまり、実施例2のslr0688抑制株の方が、実施例1のslr1841抑制株よりも外膜と細胞壁との結合量及び結合力がより低下したため、分泌されたタンパク質量が実施例1のslr1841抑制株よりも多くなったと考えられる。

【0199】

また、図9において、実施例2のslr0688抑制株の分泌タンパク質量 (mg/L) と、シアノバクテリアの外膜に有機物チャネルタンパク質CpsSをコードする遺伝子 (cpsS) を発現させた実施例3のcpsS導入株の分泌タンパク質量 (mg/L) とを比較すると、実施例2のslr0688抑制株の方が実施例3のcpsS導入株よりもわずかに (約20mg/L) 多かった。

【0200】

以上の結果から、外膜と細胞壁との結合に関連するタンパク質の機能を抑制することにより、シアノバクテリアの外膜と細胞壁との結合が部分的に弱められ、外膜が細胞壁から部分的に脱離することが確認できた。また、外膜と細胞壁との結合が弱まることにより、

シアノバクテリアの細胞内で産生されたタンパク質が細胞外に分泌されやすくなることも確認できた。したがって、本開示における改変シアノバクテリアによれば、タンパク質の分泌生産性が大きく向上することが示された。

【0201】

(5-3) 分泌されたタンパク質の同定

続いて、上記(5-2)で得られた培養上清中に含まれるタンパク質を、LC-MS/MSにより同定した。方法を以下に説明する。

【0202】

(5-3-1) 試料調製

培養上清の液量に対して8倍量の冷アセトンを加え、20℃で2時間静置後、20,000 gで15分間遠心分離し、タンパク質の沈殿物を得た。この沈殿物に100 mM Tris pH 8.5、0.5%ドデカン酸ナトリウム(SDoD)を加え、密閉式超音波破碎機によってタンパク質を溶解した。タンパク質濃度1 µg/mLに調整後、終濃度10 mMのジチオスレイトール(DTT)を添加して50℃で30分間静置した。続いて、終濃度30 mMのヨードアセトアミド(IAA)を添加し、室温(遮光)で30分間静置した。IAAの反応を止めるために、終濃度60 mMのシステインを添加して室温で10分間静置した。トリプシン400 ngを添加して37℃で一晩静置し、タンパク質をペプチド断片化した。5% TFA (Trifluoroacetic Acid)を加えた後、室温にて15,000 gで10分間遠心分離し、上清を得た。この作業によりSDoDが除去された。C18スピンカラムを用いて脱塩後、遠心エバポレーターにより試料を乾固した。その後、3%アセトニトリル、0.1% formic acidを加え、密閉式超音波破碎機を用いて試料を溶解した。ペプチド濃度200 ng/µLになるように調整した。

【0203】

(5-3-2) LC-MS/MS分析

上記(5-3-1)で得られた試料をLC-MS/MS装置(UltiMate 3000 RSLCnano LC System)を用いて以下の条件で解析を実施した。

【0204】

試料注入量：200 ng

カラム：CAPCELL CORE MP 75 µm × 250 mm

溶媒：A溶媒は0.1%ギ酸水溶液、B溶媒は0.1%ギ酸+80%アセトニトリル

グラジエントプログラム：試料注入4分後にB溶媒8%、27分後にB溶媒44%、28分後にB溶媒80%、34分後に測定終了

【0205】

(5-3-3) データ解析

得られたデータは以下の条件で解析し、タンパク質及びペプチドの同定ならびに定量値の算出を行った。

【0206】

ソフトウェア：Scaffold DIA

データベース：UniProtKB/Swiss Prot database (Synechocystis sp. PCC 6803)

Fragmentation：HCD

Precursor Tolerance：8 ppm

Fragment Tolerance：10 ppm

Data Acquisition Type：Overlapping DIA

Peptide Length：8-70

Peptide Charge：2-8

Max Missed Cleavages：1

Fixed Modification：Carbamidomethylation

Peptide FDR：1%以下

【0207】

同定されたタンパク質のうち相対定量値が最も大きかったものから順に10種類のタンパク質を表4に示す。

【0208】

【表4】

	タンパク質名	Uniprot Accession ID	遺伝子名
1	Carboxyl-terminal protease	P73458	prc
2	SlI0314 protein	Q55648	slI0314
3	SlI0470 protein	Q55847	slI0470
4	Ssr1853 protein	P72639	ssr1853
5	SlI0319 protein	P74789	slI0319
6	Slr0581 protein	Q55408	slr0581
7	Carbon dioxide-concentrating mechanism	P72761	ccmK2
8	protein CcmK homolog 2	Q55386	slr0924
9	Slr0924 protein	Q59991	slr0042
10	Slr0042 protein	P73817	slI1951

10

【0209】

10種類のタンパク質は、全て、実施例1～実施例3の培養上清のそれぞれに含まれていた。これらのタンパク質の全てにおいて、ペリプラズム（外膜と内膜との間隙を指す）移行シグナルが保持されていた。この結果により、実施例1のslr1841抑制株及び実施例2のslr0688抑制株では、外膜と細胞壁との結合が弱まるため、外膜が細胞壁から部分的に脱離することによって、ペリプラズム内のタンパク質が外膜の外（つまり、菌体外）に漏出しやすくなることが確認できた。また、実施例3のcppS導入株では、cppS遺伝子の発現により外膜のタンパク質透過性が向上し、ペリプラズム内のタンパク質がチャネルタンパク質CppSを透過して外膜の外（つまり、菌体外）に分泌されやすくなることが確認できた。したがって、実施例1～3の改変株は、外膜の物質透過性が向上していることが示された。

20

【0210】

（6）改変シアノバクテリアの細胞外電子伝達効率の評価

実施例2のslr0688抑制株、実施例3のcppS導入株及び比較例1のControl株について、細胞外電子伝達効率の評価を行った。より具体的には、これらの改変株の培養液にそれぞれ光を照射し、光合成による水の分解により発生した細胞内電流を外部電極で検出することにより、細胞外電子伝達効率を評価した。使用した装置及び電流の測定手順を以下に説明する。

30

【0211】

（6-1）電気化学測定装置

まず、電気化学測定装置100の構成について図面を参照しながら説明する。図10は、電気化学測定装置100の構成の一例を概略的に示す分解斜視図である。図11は、図10のX I - X I 断面線における概略断面図である。

40

【0212】

図10及び図11に示されるように、電気化学測定装置100は、測定部10と、光照射部20とを備える。測定部10は、シアノバクテリアの培養液40を収容するための収容部11を有する反応槽12と、収容部11内の培養液40に接するように反応槽12の内部に設置された第一電極13と、収容部11内の培養液40に接するように反応槽12の内部に設置された第二電極14と、第一電極13の電位を制御するためのポテンショスタット15と、収容部11内の培養液40に接するように反応槽12の内部に設置された参照電極16と、を備える。

【0213】

50

反応槽 12 は、電氣的絶縁性を有し、培養液 40 を透過しない。また、反応槽 12 は、培養液 40 によって腐食又は破損が起きない材料であり、例えば、プラスチック又はセラミック等から構成されてもよい。

【0214】

測定部 10 は、例えば、第一電極 13 と第二電極 14 との間に電圧を印加し、又は、電流を流し、その電圧又は電流に対応した電流又は電位を測定する。ここでは、測定部 10 は、第一電極 13 と第二電極 14 との間に電圧を印加し、電流を測定する。

【0215】

第一電極 13 は、いわゆる、作用極であり、電極表面での培養液 40 中の微量な物質に敏感に電気化学応答をする電極である。第二電極 14 は、いわゆる、対向電極であり、作用極（第一電極 13）との間に電位差を設定する、又は、電流を流すための電極である。

【0216】

第一電極 13、及び、第二電極 14 は、導電性物質から構成される。導電性物質としては、例えば、炭素材料、導電性ポリマー材料、半導体、又は、金属等であってもよい。例えば、炭素材料としては、カーボンナノチューブ、ケッチェンブラック、グラッシーカーボン、グラフェン、フラーレン、カーボンファイバー、カーボンファブリック、又は、カーボンエアロゲル等であってもよい。また、例えば、導電性ポリマー材料としては、ポリアニリン、ポリアセチレン、ポリピロール、ポリ（3，4-エチレンジオキシチオフェン）、ポリ（p-フェニレンビニレン）、ポリチオフェン、又は、ポリ（p-フェニレンスルフィド）等であってもよい。また、例えば、半導体としては、シリコン、ゲルマニウム、酸化インジウムスズ（ITO：Indium Tin Oxide）、酸化チタン、酸化銅、又は、酸化銀等であってもよい。また、例えば、金属としては、金、白金、銀、チタン、アルミニウム、タングステン、銅、鉄、又は、パラジウム等であってもよい。ここでは、第一電極 13 は、酸化インジウムスズ（ITO）電極であり、第二電極 14 は、白金電極である。なお、導電性物質は、導電性物質が自身の酸化反応によって分解されないものであればよく、特に限定されない。

【0217】

参照電極 16 は、培養液 40 中の物質と反応せず、一定電位を維持する電極であり、ポテンショスタット 15 で第一電極 13 と参照電極 16 との間の電位差を一定に制御するために使用される。ここでは、参照電極 16 は、銀／塩化銀電極である。

【0218】

ポテンショスタット 15 は、第一電極 13 と第二電極 14 との間に電圧を印加し、第一電極 13 と参照電極 16 との間の電位を所定の値に制御する。

【0219】

光照射部 20 は、光源 21 と、光源 21 を保持する筐体 22 とを備える。細かな構成の図示は省略するが、光源 21 は、例えば、1つ又は2以上の発光体（例えば、LED（light emitting diode）など）と、発光体を囲む反射面とを備えている。なお、光照射部 20 は、測定部 10 から Z 軸プラス方向に所定の距離離れて配置されてもよい。

【0220】

なお、図 11 では、第一電極 13、第二電極 14 及び参照電極 16 は、それぞれ、反応槽 12 の下方（つまり、Z 軸マイナス方向）に引き出し電極がある構成を例示しているが、ポテンショスタット 15 と電氣的に接続できれば、反応槽 12 から飛び出さない形態であってもよい。また、第一電極 13、第二電極 14 及び参照電極 16 は、それぞれ反応槽 12 の側面に引き出される形態であってもよい。

【0221】

（6-2）電流の測定

比較例 1 の Control 株、実施例 2 の slr0688 抑制株、及び、実施例 3 の cppS 導入株について、以下の手順で、上記の 3 つの菌株それぞれの電流生成量を測定した。

【0222】

使用した電気化学測定装置 100 の構成は、以下の通りである。

【0223】

第一電極13：酸化インジウムスズ電極（表面積：3.14cm²）

第二電極14：白金電極

参照電極16：銀／塩化銀電極

光源21：約120 μmol/m²/sの白色光を発する光源

【0224】

（6-2-1）培養液の準備

まず、比較例1のControl株を、初発菌体濃度OD730 = 0.1となるように1 μg/mL aTcを含むBG-11培地に接種し、光量100 μmol/m²/s、30 °Cの条件下で3日間振盪培養した。なお、実施例2のslr0688抑制株及び実施例3のcppS導入株についても、それぞれ、同様の条件で培養した。

10

【0225】

（6-2-2）電流の測定

上記（6-2-1）で得られた比較例1のControl株の培養液40を、反応槽12に4mL注入した後、参照電極16に対する第一電極13の電位が+0.0Vとなるようにポテンシオスタット15により制御した。そして、光照射部20から収容部11内の培養液40に約120 μmol/m²/sの白色光を一定時間照射し、第一電極13と第二電極14との間に流れる電流を測定した。続いて、参照電極16に対する第一電極13の電位を+0.1V、+0.2V、+0.25V、及び、+0.3Vの順に変えて、それぞれの電位に制御した場合において、同様に、第一電極13と第二電極14との間に流れる電流を測定した。結果を図12に示す。図12は、比較例1のControl株の培養液40に光を照射した際に流れる電流を測定した結果を示す図である。

20

【0226】

図12に示されるように、比較例1のControl株の培養液40では、参照電極16に対する第一電極13の電位が+0.0V、+0.1V、+0.2V、+0.25V、及び、+0.3Vのそれぞれの場合において、測定された電流値（ベースライン補正後の最大値）は、約+0.0nA、約+0.0nA、約+0.0nA、約+0.0nA、及び、約+1.0nAであった。

【0227】

続いて、実施例2のslr0688抑制株及び実施例3のcppS導入株についても、比較例1と同様に、電流値の測定を行った。結果を図13及び図14に示す。図13は、実施例2のslr0688抑制株の培養液40に光を照射した際に流れる電流を測定した結果を示す図である。図14は、実施例3のcppS導入株の培養液40に光を照射した際に流れる電流を測定した結果を示す図である。

30

【0228】

図13に示されるように、実施例2のslr0688抑制株の培養液40では、参照電極16に対する第一電極13の電位が+0.0V、+0.1V、+0.2V、+0.25V、及び、+0.3Vのそれぞれの場合において、測定された電流値（ベースライン補正後の最大値）は、約+90nA、約+250nA、約+560nA、約+750nA、及び、約+1100nAであった。

【0229】

また、図14に示されるように、実施例3のcppS導入株の培養液40では、参照電極16に対する第一電極13の電位が+0.0V、+0.1V、+0.2V、+0.25V、及び、+0.3Vのそれぞれの場合において、測定された電流値（ベースライン補正後の最大値）は、約+10nA、約+20nA、約+70nA、約+150nA、及び、約+260nAであった。

40

【0230】

図13及び図14に示されるように、電流値は電位依存的に上昇した。

【0231】

以上より、参照電極16に対する第一電極13の電位を+0.3Vに制御した場合に、上記の3株全ての培養液40の電流値が測定できたため、これらの電流値を表5に抜き出して比較した。

【0232】

50

【表 5】

	測定に用いた株	+0.3V印加時の光電流 (μ A)
比較例 1	Synechocystis dCas9株	<0.001
実施例 2	Synechocystis dCas9 slr0688_sgRNA株	1.1
実施例 3	Synechocystis cppS tetR株	0.26

【0233】

表 5 に示されるように、培養液 40 に光が照射されることにより培養液 40 において流れる電流（以下、光電流と呼ぶ）は、参照電極 16 に対する第一電極 13 の電位を+0.3V になるように制御した場合、実施例 2 のslr0688抑制株の培養液 40 では、比較例 1 のControl株の培養液 40 の1000倍向上した。また、実施例 3 のcppS導入株の培養液 40 では、参照電極 16 に対する第一電極 13 の電位を+0.3Vになるように制御した場合の光電流は、比較例 1 のControl株の培養液 40 の約300倍向上した。

【0234】

以上の結果から、本実施の形態における改変シアノバクテリアは、シアノバクテリアの外膜を細胞壁から部分的に脱離させること、又は、シアノバクテリアの外膜の物質透過性を向上させることにより、細胞外電子伝達効率が約300～1000倍に向上することが示された。

【0235】

(7) 考察

以上の結果から、実施例 1 及び実施例 2 のように、シアノバクテリアの外膜と細胞壁との結合を弱めて細胞内のタンパク質が漏出しやすくなるように改変した改変シアノバクテリアでは、外膜が破れて剥がれ落ちることにより、タンパク質以外の有機物（例えば、キノンなど）も細胞外に漏出しやすくなったと考えられる。そのため、実施例 3 のように、シアノバクテリアの外膜のタンパク質透過性を向上した改変シアノバクテリアよりも光電流が約 5 倍高かったと考えられる。

【0236】

したがって、改変シアノバクテリアと外部との電子伝達効率をより向上させるためには、外膜の一部が剥離している状態の方が有機物チャネルタンパク質を発現させるよりも、より効果的であることが分かった。

【0237】

なお、本開示の電子伝達体は、改変シアノバクテリアのタンパク質産生効率も向上しており、タンパク質を回収したあとも改変シアノバクテリアを繰り返し使用できるため、適度に外膜を離脱及び剥離させることができている点で非常に有益である。また、上記のタンパク質の同定の結果から、ペリプラズム内のタンパク質をコードする遺伝子を改変することにより、所望のタンパク質を改変シアノバクテリアに分泌させることも可能である。このような有用物質の生産において、本開示の電子伝達体を用いれば、太陽光以外に電気エネルギーを与えることにより、有用物質を安定的に、かつ、効率的に生産することができる。

【0238】

以上、本開示に係る電子伝達体、電子伝達体の製造方法、及び、電子伝達方法について、実施の形態に基づいて説明したが、本開示は、これらの実施の形態に限定されるものではない。本開示の主旨を逸脱しない限り、当業者が思いつく各種変形を実施の形態に施したもののや、実施の形態における一部の構成要素を組み合わせる別の形態も、本開示の範囲に含まれる。

【0239】

上記の実施の形態では、シアノバクテリアにおける外膜と細胞壁との結合に関与するタンパク質の機能を抑制又は喪失させることにより、外膜と細胞壁との結合を弱めて細胞外

電子伝達効率を向上させる例について説明したが、本開示は、これに限られない。例えば、シアノバクテリアに外力を加えることにより、外膜と細胞壁との結合を弱めてもよく、外膜を脆弱化させてもよい。また、シアノバクテリアの培養液に酵素又は薬剤に添加することにより、外膜を脆弱化させてもよい。

【産業上の利用可能性】

【0240】

本開示の電子伝達体、電子伝達体の製造方法、及び、電子伝達方法によれば、電子伝達体の外部に電子を効率良く供与することができるため、汚泥又は汚水などの処理と発電とを同時に行うことができる。また、本開示によれば、外部から電子伝達体が電子を効率良く授受することができるため、電子伝達体は、太陽光の光量が足りない場合に、電気エネルギーを利用することができる。そのため、本開示によれば、食品、医薬、若しくは、化学分野における有用物質の製造、土壌改良、排水処理、又は、発電などを効率良く行うことができる。

【符号の説明】

【0241】

- 1 内膜
- 2 ペプチドグリカン
- 3 糖鎖
- 4 細胞壁
- 5 外膜
- 6 SLHドメイン保持型外膜タンパク質
- 7 SLHドメイン
- 8、18 有機物チャネルタンパク質
- 9 細胞壁－ピルビン酸修飾酵素
- 10 測定部
- 11 収容部
- 12 反応槽
- 13 第一電極
- 14 第二電極
- 15 ポテンショスタット
- 16 参照電極
- 20 光照射部
- 21 光源
- 22 筐体
- 30 電子伝達体
- 31 改変シアノバクテリア
- 33 電子伝達物質
- 35 電子メディエータ
- 37 導電性物質
- 40 培養液
- 100 電気化学測定装置

10

20

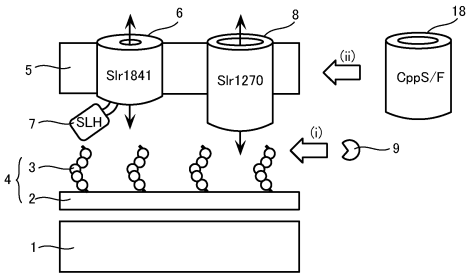
30

40

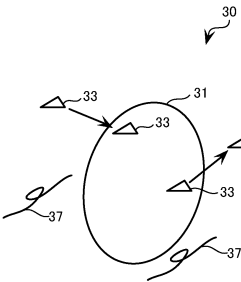
50

【図面】

【図 1】

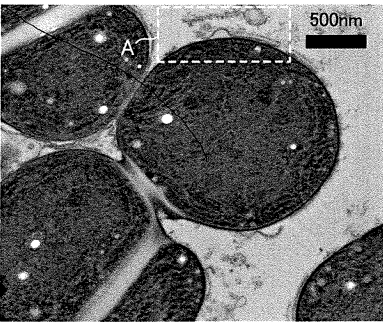


【図 2】

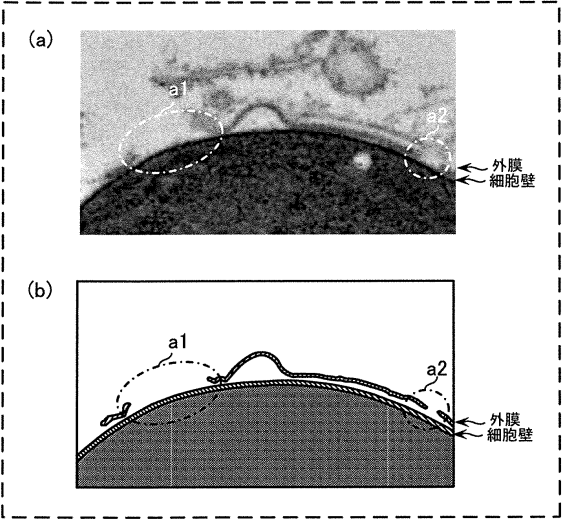


10

【図 3】



【図 4】



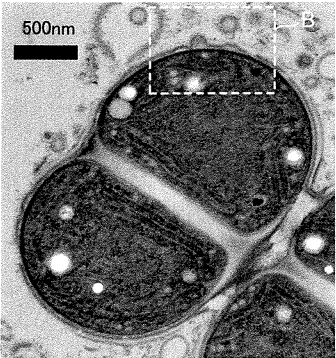
20

30

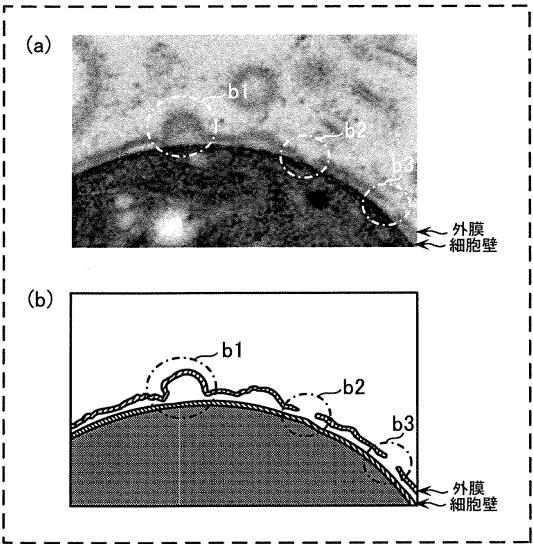
40

50

【図 5】

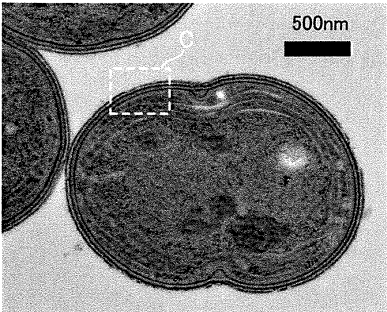


【図 6】

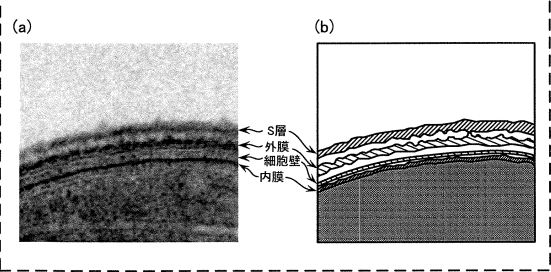


10

【図 7】



【図 8】



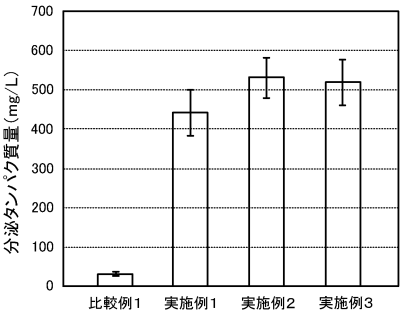
20

30

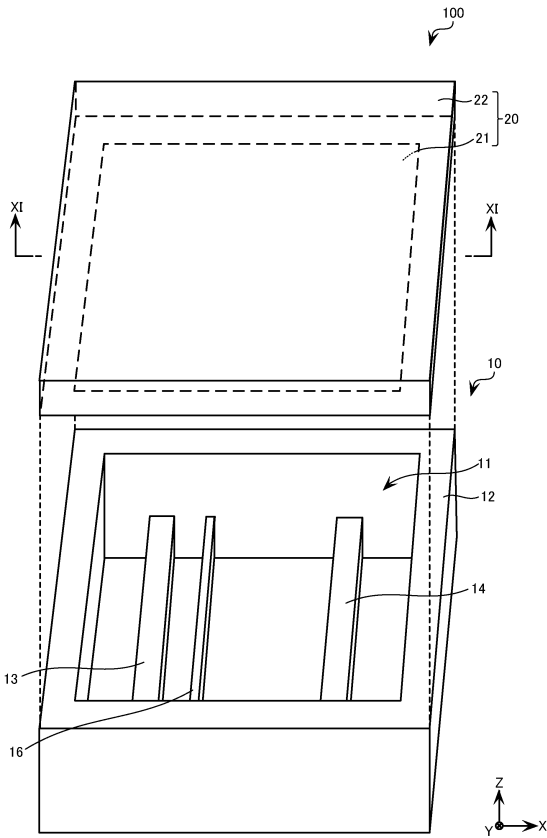
40

50

【図 9】



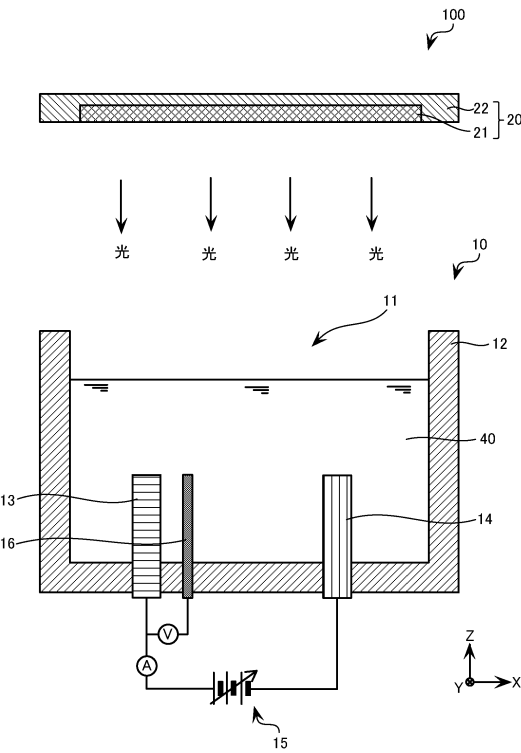
【図 1 0】



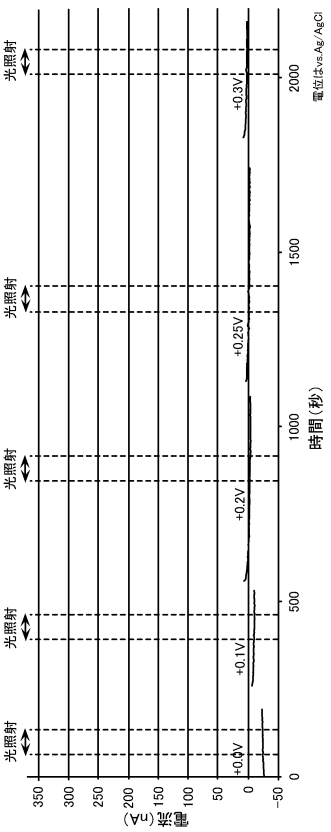
10

20

【図 1 1】



【図 1 2】

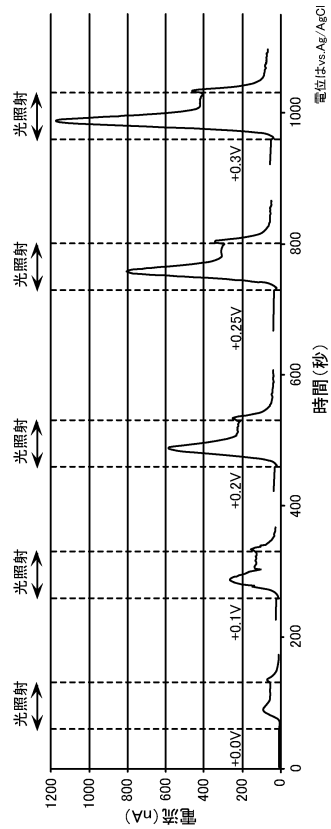


30

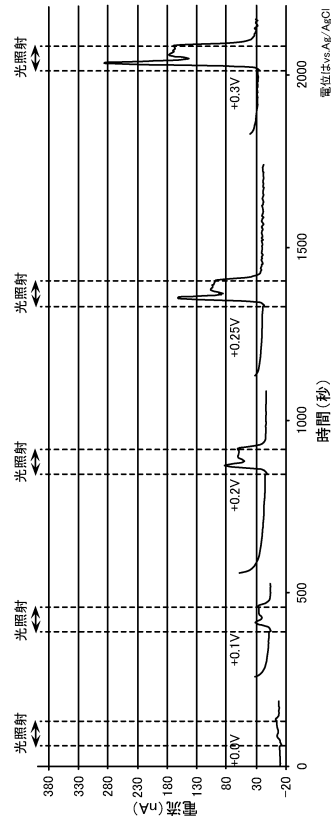
40

50

【図 1 3】



【図 1 4】



【配列表】

0007668465000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

地 パナソニックホールディングス株式会社内

審査官 藤澤 雅樹

- (56)参考文献 木幡光, Studies on molecular basis of cyanobacterial outer membrane function and its evolutionary relationship with primitive chloroplasts, 博士論文(要約) [オンライン], 東北大学, 2017年, pp.1-11, インターネット 〈URL: <http://hdl.handle.net/10097/00122689>〉, [検索日 2020.12.24]
 児島征司, 葉緑体表層膜で機能する細菌由来の膜安定化機構と物質透過機構の解明と応用, 科研費 [オンライン], 2018年04月23日, pp.1-2, インターネット 〈URL: <https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-18H02117/>〉, [検索日2020.12.24]
 Journal of Biological Chemistry, 2016年, Vol.291, No.38, pp.20198-20209
 Biotechnology and Bioengineering, 2016年, Vol.113, No.3, pp.675-679, ISSN:0006-3592
 Frontiers in Microbiology, 2019年, Vol.10, No.866, pp.1-19, ISSN:1664-302X
 Biochimica et Biophysica Acta, 2016年, Vol.1857, pp.247-255, ISSN:0005-2728
 J. Bacteriol., 2017年, Vol.199, e00371-17, pp.1-11
- (58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)
 C 1 2 N 1 / 0 0
 C 1 2 N 1 5 / 0 0
 C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)
 G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q
 U n i P r o t / G e n e S e q
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)