

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2016 年 10 月 13 日(13.10.2016)



(10) 国際公開番号

WO 2016/163382 A1

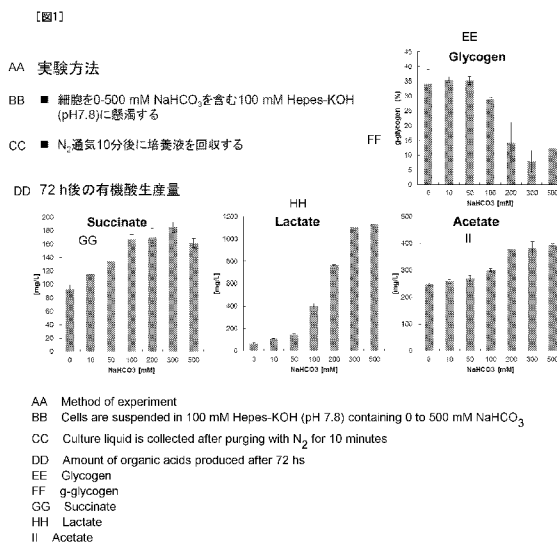
- (51) 国際特許分類:
C12P 7/40 (2006.01) C12P 7/46 (2006.01)
C12N 1/13 (2006.01) C12N 1/21 (2006.01)
C12P 7/44 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/061216
- (22) 国際出願日: 2016 年 4 月 6 日(06.04.2016)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2015-078889 2015 年 4 月 8 日(08.04.2015) JP
特願 2015-228518 2015 年 11 月 24 日(24.11.2015) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人神戸大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION KOBE UNIVERSITY)
[JP/JP]; 〒6578501 兵庫県神戸市灘区六甲台町 1 番 1 号 Hyogo (JP).
- (72) 発明者: 蓮沼 誠久(HASUNUMA, Tomohisa); 〒6578501 兵庫県神戸市灘区六甲台町 1-1 国立大学法人神戸大学内 Hyogo (JP).
- (74) 代理人: 庄司隆, 外(SHOJI, Takashi et al.); 〒5320011 大阪府大阪市淀川区西中島五丁目 6 番 13 号 御幸ビル 307 号 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING ORGANIC ACID

(54) 発明の名称: 有機酸の製造方法



(57) Abstract: Provided is a method for producing an organic acid, whereby it becomes possible to produce the organic acid from a microalga effectively. An organic acid can be produced effectively by allowing carbon dioxide and an optical energy to be utilized directly by a microalga and then collecting the organic acid, which is an intercellular metabolite of the microalga, from the microalga. Specifically, an organic acid is produced by culturing a microalga in an aqueous medium containing carbonate ions and/or bicarbonate ions and then collecting the organic acid which is an intercellular metabolite of the microalga. Alternatively, an organic acid is produced by culturing a microalga, in which the function of a NADPH-O₂ oxidoreductase and/or the function of a rate-controlling enzyme in the glycolytic system from glycogen to the citric acid cycle is enhanced, in an aqueous medium and then collecting the organic acid which is an intercellular metabolite of the microalga. For example, succinic acid, among organic acids, has been produced utilizing petroleum or the like as a raw material. According to the method of the present invention, an organic acid can be produced by effectively utilizing a biomass. The organic acid produced by the method can be used effectively in

foods, medicines and other various fields.

(57) 要約:

[続葉有]

WO 2016/163382 A1



微細藻から、効果的に有機酸を産生しうる、有機酸の製造方法を提供する。微細藻から二酸化炭素と光エネルギーを直接資源化して、細胞内代謝物である有機酸を回収することで効果的に有機酸を産生することによる。具体的には、微細藻を炭酸イオン及び／又は重炭酸イオンを含む水性媒体中で培養し、細胞内代謝物である有機酸を回収することによる。さらに、NADPH-O₂オキシドレダクターゼの機能及び／又はグリコーゲンからクエン酸回路に至る解糖系での律速酵素の機能が增強された微細藻を水性媒体中で培養し、細胞内代謝物である有機酸を回収することによる。例えば有機酸のうちコハク酸は石油等を原料として産生されていたが、本発明の方法によりバイオマスを有効活用して有機酸を産生することができる。産生された有機酸は、食品、医薬品、その他各種分野において有効に利用される。

明 細 書

発明の名称：有機酸の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、微細藻による有機酸の製造方法に関する。

[0002] 本出願は、参照によりここに援用されるところの日本出願特願 2015-78889 号及び 2015-228518 号優先権を請求する。

背景技術

[0003] コハク酸は有機酸に属し、ポリエステル、ポリアミド等のポリマー原料として用いられる。また、乳酸やコハク酸等の有機酸は、食品、医薬品、その他化学品の合成原料として広く用いられている。これら有機酸は、現在、化石燃料資源由来の原料より、工業的に製造されているが、近年の化石燃料資源枯渇への危惧や大気中の二酸化炭素 (CO_2) 増加という地球規模での環境問題の背景から、再生可能エネルギーの 1 つとして、デンプン及びセルロースなどの糖質系バイオマスからの生産が期待されている。

[0004] 微細藻類は、水生生物であり、光を利用して CO_2 から糖質エネルギーを生産することが可能である。水生であることから、食糧や土地利用との競合を回避することができ、バイオエネルギー生産に有望な生体システムとして注目されている。しかし、バイオベース化学品の製造に共通する課題は、大量生産を可能にし、そして価格を安くすることにある。このため、生産性効率向上が求められているが、微細藻類を利用する場合の大きな課題の 1 つが、細胞密度が低い点である。微細藻類の光合成評価システムが本発明者らにより開発され（非特許文献 1 及び 2）、微細藻類の増殖性を決定する因子を特定及び強化することにより、細胞密度を増大させる方法を模索しており、各種検討が進められている。

[0005] 微細藻類の増殖性に関し、シアノバクテリアの 1 種であるシネコシスティス PCC6803 種 (*Synechocystis* sp. PCC6803) において、フラボジアイロンタンパク質 (Flavodiiron protein) である Flv1 及び Flv3 のそれぞれを欠損させ

た場合、変動光下での細胞増殖及び光合成が阻止されたことが報告されている（非特許文献3）。

[0006] 水性媒体中で微生物又はその処理物の存在下で、有機原料をコハク酸に変換する工程を含むコハク酸の製造方法について開示がある（特許文献1）。ここでは、水性媒体中のコハク酸アルカリ金属塩の濃度を特定の範囲とし、次いでアンモニア及び／又はアンモニウム塩を添加することにより、コハク酸の産生速度が高まることが開示されている。しかしながら、微細藻を用いた方法については検討されていない。

[0007] 化石燃料資源を用いず、環境に優しい方法でより効率的に有機酸を製造する方法の開発が望まれている。例えば微細藻について、コハク酸を含む有機酸について、細胞外産生はほとんど知られておらず、微細藻についての代謝物についても十分に解明されていない。

先行技術文献

非特許文献

[0008] 非特許文献1：Hasunuma Tら，2010，J Exp Bot 61：1041-1051

非特許文献2：Hasunuma Tら，2013，J Exp Bot 64：2943-2954

非特許文献3：Allahverdiyeva Yら，2013，PNAS 110：4111-4116

特許文献

[0009] 特許文献1：国際公開W02013/69786号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0010] 本発明は、化石燃料資源を用いず、環境に優しく効果的な有機酸の製造方法を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0011] 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討を重ねた結果、微細藻からCO₂と光エネルギーを直接資源化して、細胞内代謝物である有機酸を回収することで効果的に有機酸を産生可能となり、その結果環境に優しく効果的

な有機酸の製造方法を提供しうることを見出し、本発明を完成した。具体的には、微細藻を炭酸イオン及び／又は重炭酸イオンを含む水性媒体中で培養し、細胞内代謝物である有機酸を回収することによる。さらに、NADPH- O_2 オキシドレダクターゼの機能及び／又はグリコーゲンからクエン酸回路に至る解糖系での律速酵素の機能が增強された微細藻を水性媒体中で培養し、細胞内代謝物である有機酸を回収することによる。

[0012] 即ち、本発明は以下よりなる。

1. 以下の（A）及び（B）の工程を含む、微細藻からの有機酸の製造方法：

（A）炭酸イオン及び／又は重炭酸イオンの含有量が20～2000 mMの水性媒体中で微細藻を培養する工程；

（B）前記（A）の微細藻から産生された有機酸を回収する工程。

2. 炭酸イオン及び／又は重炭酸イオンの含有量が20～2000 mMの水性媒体が、（1）二酸化炭素の充填、及び／又は、（2）炭酸ナトリウム、重炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、重炭酸カリウム、炭酸マグネシウムより選択されるいずれか1種又は2種以上の炭酸塩の添加、による水性媒体である、前項1に記載の製造方法。

3. （1）二酸化炭素の充填、及び／又は、（2）炭酸ナトリウム、重炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、重炭酸カリウム、炭酸マグネシウムより選択されるいずれか1種又は2種以上の炭酸塩の添加が、微細藻の培養の嫌気培養条件下で行われる、前項2に記載の製造方法。

4. 二酸化炭素の充填が、水性媒体中で飽和状態になるまで行われる、前項2又は3に記載の製造方法。

5. 前記微細藻がシアノバクテリア、ユーグレナ及びクラミドモナスから選択されるいずれか1種又は2種以上である、前項1～4のいずれかに記載の有機酸の製造方法。

6. シアノバクテリアが、シネコシスティスである、前項5に記載の有機酸の製造方法。

7. 前記有機酸が、脂肪族ジカルボン酸である、前項 1～6 のいずれかに記載の有機酸の製造方法。

8. 前記有機酸が、コハク酸、乳酸、酢酸、フマル酸、2-ケトグルタル酸、リンゴ酸、クエン酸から選択されるいずれか 1 種又は 2 種以上である、前項 1～6 のいずれかに記載の有機酸の製造方法。

9. 微細藻が、PEPカルボキシラーゼの機能が增強された微細藻である、前項 1～8 のいずれかに記載の有機酸の製造方法。

10. 以下の (a) 及び (b) の工程を含む、微細藻からの有機酸の製造方法：

(a) PEPカルボキシラーゼの機能が增強された微細藻を水性媒体中で培養する工程；

(b) 前記 (a) の微細藻から産生された有機酸を回収する工程。

11. 微細藻が、ピルビン酸フェレドキシン酸化還元酵素の機能が增強された微細藻である、前項 1～8 のいずれかに記載の有機酸の製造方法。

12. 以下の (c) 及び (d) の工程を含む、微細藻からの有機酸の製造方法：

(c) ピルビン酸フェレドキシン酸化還元酵素の機能が增強された微細藻を水性媒体中で培養する工程；

(d) 前記 (c) の微細藻から産生された有機酸を回収する工程。

13. 微細藻が、ホスフォグルコムターゼの機能が增強された微細藻である、前項 1～8 のいずれかに記載の有機酸の製造方法。

14. 以下の (e) 及び (f) の工程を含む、微細藻からの有機酸の製造方法：

(e) ホスフォグルコムターゼの機能が增強された微細藻を水性媒体中で培養する工程；

(f) 前記 (e) の微細藻から産生された有機酸を回収する工程。

15. 微細藻を炭酸イオン及び／又は重炭酸イオンの含有量が 20～2000 mM の水性媒体中で培養することを特徴とする、微細藻内のクエン酸回路の活性化

方法。

16. 微細藻が、NADPH- O_2 オキシドレダクターゼの発現又は発現増強するように形質転換された微細藻である、前項1～8のいずれかに記載の有機酸の製造方法。

17. 以下の(C)及び(D)の工程を含む、微細藻からの有機酸の製造方法：

(C) NADPH- O_2 オキシドレダクターゼの機能が増強された微細藻を水性媒体中で培養する工程；

(D) 前記(C)の微細藻から産生された有機酸を回収する工程。

18. 以下の(g)～(i)の工程を含む、微細藻からの有機酸の製造方法：

(g) NADPH- O_2 オキシドレダクターゼが発現又は発現増強するように微細藻を形質転換する工程；

(h) 前記(g)のNADPH- O_2 オキシドレダクターゼを発現又は発現増強された微細藻を水性媒体中で培養する工程；

(i) 前記(h)の微細藻から産生された有機酸を回収する工程。

19. 前記NADPH- O_2 オキシドレダクターゼが、フラボジアイロンタンパク質である、前項16～18のいずれかに記載の有機酸の製造方法。

20. 前記フラボジアイロンタンパク質がFlv3である、前項19に記載の有機酸の製造方法。

21. PEPカルボキシラーゼ、ピルビン酸フェレドキシン酸化還元酵素、ホスフォグルコムターゼ、及びNADPH- O_2 オキシドレダクターゼから選択されるいずれか1種又は複数種のタンパク質が発現増強するように形質転換された、有機酸の製造用微細藻。

22. 前記NADPH- O_2 オキシドレダクターゼがFlv3である、前項21に記載の有機酸の製造用微細藻。

23. 前記微細藻がシアノバクテリアである、前項21又は22の有機酸の製造用微細藻。

発明の効果

[0013] 微細藻を炭酸イオン及び／又は重炭酸イオンを含む水性媒体中で培養することで微細藻内のクエン酸回路を活性化することができる。本発明の有機酸の製造方法によれば、微細藻の光合成によって合成されたグリコーゲンと、水性媒体から取り込まれた炭素源とを有効活用して細胞内代謝物である有機酸を効果的に産生しうる。さらに、NADPH- O_2 オキシドレダクターゼの機能及び／又はグリコーゲンからクエン酸回路に至る解糖系での律速酵素の機能が増強された微細藻を水性媒体中で培養することで、より効果的に有機酸を産生することができる。その結果、化石燃料資源を用いず、環境に優しく効果的に有機酸を製造することができる。

図面の簡単な説明

- [0014] [図1]微細藻（シネコシスティス）による有機酸の産生結果を示す図である。（実施例1）
- [図2]微細藻（シネコシスティス）による有機酸の産生結果を示す図である。（実施例1）
- [図3]微細藻（ユーグレナ）による有機酸の産生結果を示す図である。（実施例2）
- [図4]微細藻（クラミドモナス）による有機酸の産生結果を示す図である。（実施例3）
- [図5] CO_2 通気条件下での微細藻（シネコシスティス）による有機酸の産生結果を示す図である。（実施例4）
- [図6]微細藻によるコハク酸の産生経路を示す図である。（実施例5）
- [図7]PEPカルボキシラーゼを過剰発現させた微細藻（シネコシスティス）による有機酸の産生結果を示す図である。（実施例5）
- [図8]PGMを過剰発現させたPCC6803（PGMox）の作製方法を示す図である。（実施例6）
- [図9]PCC6803（PGMox）による有機酸の産生結果を示す図である。（実施例6）

[図10]PF0を過剰発現させたPCC6803 (PF0Rox) の作製方法を示す図である。
(実施例7)

[図11]PCC6803 (PF0Rox) による有機酸の産生結果を示す図である。(実施例7)

[図12]Flv3過剰発現微細藻の培養による乳酸及びコハク酸の産生を確認した結果図である。(実施例8)

[図13]Flv3過剰発現微細藻の培養によるグリコーゲン及びATPの細胞内蓄積量を確認した結果図である。(実施例9)

[図14]微細藻(シネコシスティス)細胞内代謝物質の¹³C標識率の経時変化を示す図である。(参考例1)

[図15]微細藻(シネコシスティス)の細胞内代謝経路を示す図である。(参考例1)

[図16]微細藻の培養による、細胞密度及びグリコーゲンの細胞内蓄積量を経時的に測定した結果図である。(参考例2)

[図17]微細藻の培養による、酢酸、乳酸及びコハク酸の細胞内蓄積量を経時的に測定した結果図である。(参考例3)

[図18]微細藻の培養による細胞内代謝プロファイル調べた結果を示す図である。クエン酸回路のうち、ホスフォエノールピルビン酸、ピルビン酸、乳酸の細胞内蓄積量を経時的に測定した結果を示す図である。(参考例4)。

[図19]微細藻の培養による細胞内代謝プロファイル調べた結果を示す図である。クエン酸回路のうち、ホスフォエノールピルビン酸、リンゴ酸、フマル酸及びコハク酸の細胞内蓄積量を経時的に測定した結果を示す図である。
(参考例4)

[図20]微細藻の培養による有機酸の産生に伴うATPの利用を確認した図である。即ちATP、ADP及びAMPの経時変化を測定することで、ATPの利用を確認した結果を示す図である。(参考例5)

発明を実施するための形態

[0015] 本発明は、有機酸の製造方法に関し、特に以下の工程を含む、微細藻から

の有機酸の製造方法に関する。

(A) 炭酸イオン及び／又は重炭酸イオンを20～2000 mM含む水性媒体中で微細藻を培養する工程；

(B) 前記(A)の微細藻から産生された有機酸を回収する工程。

[0016] 1. 微細藻

本明細書において、「微細藻」とは、葉緑素（クロロフィル）を持ち、光合成を行う微生物をいう。微細藻は、光合成によって大気中のCO₂を固定化して糖類（例えば、グリコーゲン）を合成し、他方、水（H₂O）から酸素（O₂）を発生させ得る（「酸素発生型光合成」ともいう）。微細藻は、単細胞形態を有するものであってもよく、又はコロニー形態（例えば、フィラメント、シート又はボール）を有するものであってもよい。微細藻は、海洋又は淡水のいずれで繁殖するものであってもよい。

[0017] 本発明の微細藻は、原核生物のシアノバクテリア（ラン藻類）及び真核生物（例えば、緑藻類、珪藻類、渦鞭毛藻、紅藻、プラシノ藻、ユーグレナ藻、真正眼点藻など）の何れであってもよい。シアノバクテリア（ラン藻類）としては、例えばシネコシスティス属（*Synechocystis*）、アルスロスピラ属（*Arthrospira*）、スピルリナ属（*Spirulina*）、アナベナ属（*Anabaena*）、シネココッカス属（*Synechococcus*）、サーモシネココッカス属（*Thermosynechococcus*）、ノストック属（*Nostoc*）、プロクロロコッカス属（*Prochlorococcus*）、ミクロシスティス属（*Microcystis*）、グロエオバクター属（*Gloeobacter*）などが挙げられる。真核生物としては、例えばクラミドモナス属（*Chlamydomonas*）、クロレラ属（*Chlorella*）、ドナリエラ属（*Dunaliella*）、ヘマトコッカス属（*Hematococcus*）、ボルボックス属（*Volvox*）、ボトリオコッカス属（*Botryococcus*）などの緑藻類；リゾソレニア属（*Rhizosolenia*）、ケトセロス属（*Chaetoceros*）、シクロテラ属（*Cyclotella*）、シリンドロテカ（*Cylindrotheca*）、ナビクラ属（*Navicula*）、フェオダクチラム属（*Phaeodactylum*）、タラシオシラ属（*Thalassiosira*）、フィッツリフェラ属（*Fistulifera*）などの珪藻類；アンフィジニウム属（*Amphidinium*）、シン

ビोजニウム属 (*Symbiodinium*) などの渦鞭毛藻；シアニディオシゾン属 (*Cyanidioschyzon*)、ポルフィリジウム属 (*Porphyridium*) などの紅藻；オストレオコッカス属 (*Ostreococcus*) などのプラシノ藻；ユーグレナ属 (*Euglena*) などのユーグレナ藻；ナンノクロロプシス属 (*Nannochloropsis*) などの真正眼点藻などが挙げられる。例えば、微細藻類の微生物種としては、シネコシスティスPCC6803種 (*Synechocystis* sp. PCC6803)、シネココッカスPCC7002種 (*Synechococcus* sp. PCC7002)、アルスロルピラ・プラテンシス (*Arthrospira platensis*) (「スピルリナ (*Spirulina*) 」とも称される)、スピルリナ・マキシマ (*Spirulina maxima*)、スピルリナ・サブサルサ (*Spirulina subsalsa*)、アナベナPCC7120種 (*Anabaena* sp. PCC7120)、クラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii*)、クラミドモナス種 (*Chlamydomonas* sp.)、クロレラ・ブルガリス (*Chlorella vulgaris*)、クロレラ・ピレノイドーサ (*Chlorella pyrenoidosa*)、ドナリエラ・サリナ (*Dunaliella salina*)、ドナリエラ種 (*Dunaliella* sp.)、ヘマトコッカス・プルビアリス (*Hematococcus pluvialis*)、ボルボックス・カルテリ (*Volvox carteri*)、ボトリオコッカス・ブラウニイ (*Botryococcus braunii*)、シクロテラ・クリプティカ (*Cyclotella cryptica*)、シリンドロテカ・フジフォルミス (*Cylindrotheca fusiformis*)、ナビクラ・サプロフィラ (*Navicula saprophila*)、フェオダクチラム・トリコルヌツム (*Phaeodactylum tricornutum*)、タラシオシラ・シュードナナ (*Thalassiosira pseudonana*)、フィッツリフェラ種 (*Fistulifera* sp.)、アンフィジニウム種 (*Amphidinium* sp.)、シンビオジニウム・ミクロアドリアチクム (*Symbiodinium microadriaticum*)、シアニディオシゾン・メロレ (*Cyanidioschyzon merolae*)、ポルフィリジウム種 (*Porphyridium* sp.)、オストレオコッカス・タウリ (*Ostreococcus tauri*)、ユーグレナ・グラシリス (*Euglena gracilis*)、ナンノクロロプシス・オキュラタ (*Nannochloropsis oculata*) などが挙げられる。

[0018] 本発明の方法に使用可能な微細藻は、野生型であってもよいし、有機酸を効果的に産生するように改変された微細藻であってもよい。改変の方法は、

自体公知の方法や今後開発されるあらゆる方法を適用することができ、例えば遺伝子組換え等の手法により改変することができる。そのような微細藻として、例えば有機酸の産生を増強しうる酵素を過剰発現しうる遺伝子組換え微細藻が挙げられる。例えば、NADPH- O_2 オキシドレダクターゼの機能及び／又はグリコーゲンからクエン酸回路に至る解糖系での律速酵素の機能が增強された微細藻を利用することができる。

[0019] 本明細書において「NADPH- O_2 オキシドレダクターゼ」とは、還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリリン酸（NADPH）を酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリリン酸（NADP⁺）に変換し、かつ O_2 から H_2O を生成することを触媒する酵素をいう。当該酵素は、微細藻類が保有する光合成光化学系Ⅰにおいて、還元型フェレドキシンからの電子伝達によりNADP⁺からの変換により生じたNADPHを再度NADP⁺に変換し、かつ酸素から水を生成し得る。

[0020] 本発明のNADPH- O_2 オキシドレダクターゼとしては、例えば、フラボジオイロンタンパク質（以下「Flv」ともいう。）が挙げられる。フラボジオイロンタンパク質としては、例えば、Flv3、Flv1などが挙げられ、特に好適にはFlv3である。フラボジオイロンタンパク質は、上記微細藻に由来するものが挙げられる。Flv3及びFlv1は、光合成光化学系Ⅰにおける O_2 の光還元に関与している。例えば、Flv3としては、上記微細藻に由来するものが挙げられる。例えば、微細藻の形質転換のために、シネコシスティスPCC6803種（*Synechocystis* sp. PCC6803）由来のflv3遺伝子（sl10550：コード領域の塩基配列及びアミノ酸配列を配列番号1及び2に示す）が用いられ得る。本明細書において、例えばFlv3又はFlv1は、Flv3又はFlv1についてデータベースにて開示されたアミノ酸配列で特定されるほか、前記開示されたアミノ酸配列のうち1又は数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、本発明において必要な酵素活性を有するアミノ酸配列でも特定することができる。あるいはFlv3又はFlv1についてデータベースにて開示されたアミノ酸配列と例えば、70%以上の配列同一性を有し、本発明において必要な酵素活性を有するアミノ酸配列でも特定することができる。

[0021] 本発明で用いられるNADPH- O_2 オキシドレダクターゼに係る遺伝子は、上記フラボジオイロンタンパク質を発現しうる遺伝子をいい、具体的にはFlv3又はFlv1を発現しうる遺伝子をいい、特に好適にはFlv3を発現しうる遺伝子をいう。具体的には、データベースにて開示される塩基配列からなるDNAであっても良いし、当該DNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズする遺伝子が挙げられる。ストリンジェントな条件とは、例えばMolecular Cloning, 2nd. Ed., Cold Spring Harbor Laboratory 1989, New Yorkの1.101~1.104頁に開示される条件をいう。前記DNAにハイブリダイズしうる限り、配列特異的な結合がもたらされるので、このような機能性オリゴヌクレオチドも本発明のNADPH- O_2 オキシドレダクターゼに係る遺伝子に包含される。

[0022] このような遺伝子は、例えば、開示される又は公知の塩基配列に基づいて設計したプライマーを用いて、各種生物から抽出したDNA、各種cDNAライブラリー又はゲノムDNAライブラリー等由来の核酸を鋳型とし、例えばPCR増幅を行うことにより、核酸断片として得ることができる。また、上記ライブラリーなどに由来する核酸を鋳型とし、本発明で発現又は発現しようとする酵素をコードする遺伝子の一部であるDNA断片をプローブとしてハイブリダイゼーションを行うことにより、核酸断片として得ることができる。あるいは遺伝子は、化学合成法等の当技術分野で公知の各種の核酸配列合成法によって、核酸断片として合成してもよい。遺伝子は、宿主微生物での発現を最適にするように、コドンが最適化されてもよい。コドンの最適化は、当業者が通常用いる任意の手段、装置を用いて実施することができる。

[0023] 本明細書において、「NADPH- O_2 オキシドレダクターゼの機能が增強された微細藻」とは、「NADPH- O_2 オキシドレダクターゼの発現又は発現增強するように形質転換された微細藻」をいう。本明細書において、「NADPH- O_2 オキシドレダクターゼの発現又は発現增強する」とは、NADPH- O_2 オキシドレダクターゼに係る遺伝子の発現が增強されることをいう。本明細書において、NADPH- O_2 オキシドレダクターゼに係る遺伝子の発現が增強される形態は、発明の微細藻にお

いてこれら遺伝子の発現を増強する改変が行われる前に比べて、当該NADPH- O_2 オキシドレダクターゼの生産量又は活性の増大が確認される形態であればよく、特に限定されない。遺伝子の発現を増強する改変は、自体公知の方法によっても良いし、今後開発されるあらゆる方法によっても良い。遺伝子の発現が増強されている実施形態としては、例えば、内因性のいずれかの遺伝子がより強力なプロモーター（構成的プロモーター又は誘導性プロモーターのいずれであってもよい）の制御下に連結された実施形態が挙げられる。また、追加的に内因性及び／又は外因性のいずれかの遺伝子が導入されている実施形態が挙げられる。追加的に導入されたいずれかの遺伝子は、好ましくは構成的プロモーターなど強力なプロモーターで作動可能に保持されている。発現の増強について、本明細書中においては「過剰発現」ともいう。

[0024] プロモーターとしては、微細藻にて機能する任意のプロモーターを使用することができる。例えば、微細藻がシアノバクテリア（ラン藻類）の場合、ラン藻に由来し得るsbDII、psbA3、psbA2、nirA、petE、nrsRS、nrsABCD、ndhF3、rbcL、rbcX、glnA、atp1、atp2、petF1などのプロモーターが挙げられる。

[0025] 上記遺伝子を微細藻に導入するためのプラスミドベクターの一例は、pTCP2031Vベクターである。pTCP2031Vベクターは、psbA2 (slr1311) プロモーター、並びにslr2030及びslr2031のコード領域の一部（相同組換え用プラットフォームとして）、及びクロラムフェニコール耐性カセットを含む組換えプラスミドなどが挙げられる（Sato Sら, 2001, J. Biol. Chem. 276, 4293-4297; Horiuchi Mら, 2010, Biochem. J. 431, 135-140）。

[0026] 組換え用構築物、例えば、上記のように作製された発現ベクター又は染色体組込み型ベクターを、宿主微細藻に導入し、形質転換微細藻を作製することができる。

[0027] 形質転換微細藻（特にシアノバクテリア）の形質転換には、多くの場合、遺伝子相同組換え法が用いられ得る。遺伝子相同組換え法のために、例えば、pTCP2031Vベクターが好適に用いられ得る。形質転換のための発現ベクター

又は複製可能なプラスミドの導入は、自体公知の方法又は今後開発されるあらゆる方法を適用することができる。例えば、エレクトロポレーション法、プロトプラスト-PEG法、マイクロインジェクション法、パーティクル・ガン法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法、カルシウムイオン法などが挙げられる。

[0028] 形質転換株は、遺伝子導入に用いられた発現ベクター又は染色体組込み型ベクターが有する選択マーカーなどを利用して選択される。宿主微生物それぞれに適した培地に、選択マーカーに応じた抗生物質又は薬剤を添加することができる。このような選択用培地として、微細藻の生育に適した任意の培地を使用することができる。例えば、BG-11寒天培地（例えば、Rippka Rら、1979, J Gen Microbiol 111: 1-61に記載される：シアノバクテリアに用いられ得る）；HSM寒天培地及びTAP寒天培地（これらは、例えば、福澤ら、2009, 低温科学, 67:17-21に記載される：緑藻などの真核生物に用いられ得る）などが挙げられる。まずこの選択マーカーに基づき形質転換体の選抜を行い、次いで、目的とする遺伝子（すなわち、NADPH- O_2 オキシドレダクターゼ遺伝子）又はその産物の発現を解析することにより、形質転換体の選抜を行うことができる。NADPH- O_2 オキシドレダクターゼ発現産物は、例えば、ウエスタンブロット法によって確認することができる。

[0029] 本明細書における解糖系での律速酵素の例として、ホスフォエノールピルビン酸カルボキシラーゼ（PEPカルボキシラーゼ：PEPC）、ホスフォグルコムターゼ（PGM：phosphoglucomutase）、ピルビン酸フェレドキシン酸化還元酵素（PF0）が挙げられる（図6参照）。

[0030] 本明細書において、PEPカルボキシラーゼとは、炭酸固定経路の C_4 経路でホスフォエノールピルビン酸と CO_2 からオキサロ酢酸を合成する酵素をいう。本明細書において、ホスフォグルコムターゼ（PGM：phosphoglucomutase）とは、グリコーゲンの代謝において、グルコース-1-リン酸（G1P）とグルコース-6-リン酸（G6P）とを相互変換する酵素である。本明細書において、ピルビン酸フェレドキシン酸化還元酵素（PF0）とは、酸化還元酵素に分類され、解糖

系におけるピルビン酸とアセチルCoAとを相互変換する酵素である。

[0031] 2. 水性媒体

上記において「水性媒体」とは、種培養及び／又は本培養に用いられる水溶液をいう。後述するように窒素源、無機塩などを含む水溶液であることが好ましい。具体的には、微細藻に応じて、人工又は天然の海水、あるいは淡水（例えば、蒸留水）を用いてもよい。例えば、BG-11培地（J Gen Microbiol 111: 1-61 (1979)）；HSM培地及びTAP培地（低温科学, 67:17-21 (2009)）、Cramer-Myers培地（CM培地）等を使用することができる。具体的には、以下の表1に示す組成の培地を用いてもよい。

[0032]

[表1]

培地 (mg L ⁻¹)	改変 Basal	改変 Bristol	BG-11	改変 Bold 3N	改変 HSM
NaNO ₃		375	375	375	
KNO ₃	420				
NH ₄ Cl					250
K ₂ HPO ₄	1440	75	30	38.3	1440
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1000	75	75	75	20
KH ₂ PO ₄		175		88	740
NaCl		25		25	
無水クエン酸			6		
Na ₂ CO ₃			20		
CaCl ₂ ·2H ₂ O	110.6	25	36	25	10
FeCl ₃ ·6H ₂ O		5		1.77	0.15978
FeSO ₄ ·7H ₂ O	49.8				
クエン酸鉄アンモニウム			6		
Na ₂ ·EDTA·2H ₂ O	500		1	5.53	0.3
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	88.2	0.287	0.222	0.073	
ZnCl ₂					0.00328
CoSO ₄ ·7H ₂ O				0.016	
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	4.9		0.0049		
CoCl ₂ ·6H ₂ O					0.0026
MnSO ₄ ·5H ₂ O		0.169		0.584	
MnCl ₂ ·4H ₂ O	14.4		1.81		0.415
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	11.9		0.39	0.00148	0.00726
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O		0.00124			
Na ₂ SeO ₃				0.00173	
NiCl ₂ ·6H ₂ O				0.00149	
H ₃ BO ₃	114.2	0.061	2.86		0.1855
CuSO ₄ ·5H ₂ O	15.7	0.0025	0.0079		
CuCl ₂ ·2H ₂ O					0.000012
海水塩	20g	20g	20g	20g	20g

[0033] 培養での有機酸の生産反応を効率的に行うために、水性媒体には、前記培地に炭素源として有機原料を添加しても良い。本培養に用いる有機原料は、前記微細藻が資化して増殖し得るものであれば特に限定されないが、通常、ガラクトース、ラクトース、グルコース、フルクトース、スクロース、サッカロース、デンプン、セルロース等の炭水化物；グリセロール、マンニトール、キシリトール、リビトール等のポリアルコール類等の発酵性糖質が用いられ、目的とする有機酸に応じて選択可能であり、一般的な有機原料から選

択できる。例えば、グルコース、スクロース、又はフルクトースが好ましく、特にグルコース又はスクロースが好ましい。また、前記発酵性糖質を含有する澱粉糖化液、糖蜜なども使用され、前記発酵性糖質がサトウキビ、甜菜、サトウカエデ等の植物から搾取した糖液であってもよい。これらの有機原料は、単独でも組み合わせても使用できる。水性媒体には炭酸イオン、重炭酸イオン又 CO_2 を含有させることができる。

[0034] 3. 培養条件

微細藻の培養温度は、通常 $15\sim 40^\circ\text{C}$ 、好ましくは $20\sim 37^\circ\text{C}$ であり、より好ましくは $25^\circ\text{C}\sim 35^\circ\text{C}$ である。水性媒体のpHは、微細藻の増殖に適した任意のpH、例えば、pH 5 $\sim$ 10、好ましくは、pH 6 $\sim$ 9、より好ましくは、pH 6 $\sim$ 8に調整することができる。pHは、炭酸ナトリウム、重炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、重炭酸カリウム、炭酸マグネシウム、水酸化ナトリウム、水酸化カルシウム、水酸化マグネシウム等を添加することによって適宜調整することができる。

[0035] 本発明の有機酸の製造方法に関し、微細藻は予め前培養することができる。例えば、(1) 前々培養、(2) 前培養、(3) 本培養(光独立栄養)、(4) 本培養(嫌気、暗所)等のステップを経て培養することができる。(1) $\sim$ (3) の培養では、通気培養を行うことができ、培養期間としては、好ましくは各々3日 $\sim$ 14日、より好ましくは3日 $\sim$ 5日である。通気培養のために、空気や CO_2 を混合した空気を水性媒体に通気することができる。

[0036] 本明細書の(3) 本培養(光独立栄養)において、「光独立栄養」とは一般的な意味で使用され、微細藻が光合成によって CO_2 と水から糖を作り、これをエネルギー源として成長する仕組みをいう。光独立栄養時の光照射条件は自然光又は人工光のいずれであってもよく、その強さは、水性媒体中の藻体密度及び培養槽の深さ等によって、適宜調節することができる。例えば、 $30\sim 2000\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ 、好ましくは、 $30\sim 1000\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ 、より好ましくは、 $50\sim 600\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ の自然光又は人工光が用いられ得る。上記範囲であると、微細藻が光合成を行って順調に増殖し得る。光

照射は、連続的であっても周期的であってもよい。屋外の大規模培養については、コストを最小限にし、かつ人工照明の追加費用を回避するために、明／暗周期を設けてもよい。

[0037] 本明細書の(4)本培養(嫌気、暗所)において、「嫌気培養」とは、溶液中の溶存酸素濃度を低く抑えて培養することをいう。嫌気的条件とするために、例えば容器を密閉して無通気で反応させる、窒素ガス(N_2)等の不活性ガスを供給して反応させる、又は CO_2 含有の不活性ガスを通気する等の方法を用いることができる。嫌気・暗所条件の工程で、有機酸は水性媒体中に排出される。

[0038] 本明細書の(4)本培養(嫌気、暗所)において、炭酸イオン、重炭酸イオン及び／又は CO_2 が含有されていることが重要である。炭酸イオン、重炭酸イオンは、20～2000 mM、好ましくは20～500 mM、さらに好ましくは20～150 mMが含有されているのが好適である。水性媒体への炭酸イオン及び／又は重炭酸イオンの導入は、(1) CO_2 の充填、及び／又は、(2)炭酸ナトリウム、重炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、重炭酸カリウム、炭酸マグネシウムより選択されるいずれか1種又は2種以上の炭酸塩の添加によることができる。 CO_2 を充填する場合は、飽和状態になるまで充填することができる。 CO_2 が飽和状態になることで、炭酸イオン濃度は20～2000 mMとなる。

[0039] 4. 微細藻から産生された有機酸の回収

以上の様な方法で産生された有機酸は、必要に応じて、水性媒体から、自体公知の方法又は今後開発されるあらゆる分離、精製方法により分離、精製することができる。具体的には、限外ろ過膜分離、遠心分離、濃縮等により微細藻及びその産生物と分離した後、カラム法、晶析法等の公知の方法で精製し、乾燥させる事により、結晶として採取する方法等が挙げられる。本発明で、製造の対象となる有機酸としては、特に限定されるものではないが、クエン酸回路において産生される細胞内代謝有機酸であり、具体的には有機カルボン酸である。有機カルボン酸として、例えばコハク酸、乳酸、酢酸、フマル酸、2-ケトグルタル酸、リンゴ酸、クエン酸等が挙げられる。有機酸

のうちコハク酸、フマル酸、2-ケトグルタル酸、リンゴ酸等の脂肪族ジカルボン酸が好適であり、特にコハク酸が好適である。

[0040] 5. 有機酸の製造

上記方法で微細藻から産生された有機酸を回収することで、化石燃料資源を用いず、環境に優しく効果的に有機酸を製造することができる。すなわち、微細藻の光合成と微細藻に取り込まれた炭素源によりバイオマスから有機酸を産生可能となり、環境に優しく効果的に有機酸を製造することができる。水性媒体への炭酸イオン及び／又は重炭酸イオンの供給は、例えば電気や鉄鋼等の製造工程において産業的に排出された大気中のCO₂を利用し、有効活用することができる。大気中のCO₂を有効活用できる点で、自然環境に対して優れた効果を有する。さらに、本発明の微細藻によれば、バイオマスとして使用される水性媒体は淡水のみならず海水を活用することができ、水資源の枯渇や耕作地の限界に左右されず安定的に有効活用することができる。

[0041] 6. クエン酸回路

本発明は、微細藻を炭酸イオン及び／又は重炭酸イオンの含有量が20~2000 mMの水性媒体中で培養することを特徴とする、微細藻内クエン酸回路の活性化方法にも及ぶ。本発明の方法によれば、クエン酸回路が活性化され、その結果、細胞内代謝物である有機酸の産生が増強される。

実施例

[0042] 以下に実施例を挙げて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

[0043] (実施例1) 微細藻(シネコシスティス)による有機酸の産生

本実施例において、微細藻類の微生物種としてシネコシスティスPCC6803種(*Synechocystis* sp. PCC6803) グルコース耐性(GT) (Williams JGK, 1988, *Methods Enzymol* 167: 766-778) (以下、本実施例及び各実施例において「PCC6803 (GT)」という。)を用いた。

[0044] (1) 前々培養

BG-11寒天培地(1.5% Agarを含むBG-11)上で生育したPCC6803 (GT) のコ

ロニーを白金耳でとり、水性媒体（70 mL）に加え、pH7.8にて通気条件下、 $50 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ で 30°C にて4～5日間培養した。ここでは水性媒体として、BG-11液体培地（Rippka Rら, 1J Gen Microbiol 111: 1-61 (1979))に17.6 mM NaNO_3 , 20 mM Hepes-KOHを含む培養液を用いた。藻体密度は、Shimadzu UV mini spectrophotometer（紫外可視分光光度計：株式会社島津製作所製）を用いて OD_{750} により測定した。培養後の OD_{750} は1～1.5であった。通気とは、特に言及しない場合は空気による通気を意味する。以下の実施例についても同様である。

[0045] （2）前培養

上記（1）で前々培養したPCC6803（GT）を、 OD_{750} が0.1になるように水性媒体（150 mL）に加え、pH7.8にて通気条件下、 $50 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ で 30°C にて4～5日間培養した。ここでは水性媒体として、BG-11液体培地に17.6 mM NaNO_3 , 20 mM Hepes-KOHを含む培養液を用いた。培養後の OD_{750} は1～1.5であった。

[0046] （3）本培養（光独立利用）

上記（2）で前培養したPCC6803（GT）を、 OD_{750} が0.4になるように水性媒体（70 mL）に加え、pH7.8にて CO_2 通気条件下、 $120 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ で 30°C にて3日間培養した。ここでは、水性媒体としてBG-11液体培地に5 mM NH_4Cl , 50 mM Hepes-KOHを含む培養液を用いた。培養後の OD_{750} は6～7であった。培養後、フィルター（polytetrafluoroethylene膜、孔径 $1 \mu\text{m}$ ）濾過にてPCC6803（GT）を回収した。

[0047] （4）本培養（嫌気・暗所）

上記（3）で回収したPCC6803（GT）を、 OD_{750} が20になるように水性媒体（10 mL）に加えた。ここでは水性媒体として100 mM Hepes-KOH（pH7.8）を用いた。0～500 mMの炭酸水素ナトリウム（ NaHCO_3 ）を水性媒体に添加し、10分間の N_2 通気後、嫌気条件下で培養を開始し、72時間後にPCC6803（GT）を含む水性媒体を回収した。

[0048] 上記（4）で回収した水性媒体を、各々14000g、 4°C にて5分間遠心分離し

、上清を回収し、 $0.45\mu\text{m}$ 孔径Mini-UniPrep (GEヘルスケア・ジャパン株式会社製) を用いて濾過した。濾過液について、コハク酸、乳酸、酢酸及びグリコーゲンの産生量を、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) カラム (Aminex HPX-87H ; Bio-Rad社製) 及び屈折率検出器 (RID-10A ; 株式会社島津製作所製) を備えたHPLCにより測定した。フマル酸、2-ケトグルタル酸、リンゴ酸、クエン酸の産生量は非特許文献2に記載の通り、細胞内代謝物を抽出し、そしてキャピラリー電気泳動/質量分析 (CE/MS) システム (CE : Agilent G7100 ; MS, Agilent G6224AA LC/MSD TOF ; Agilent Technologies社製) 及びMass Hunter Workstation Data Acquisitionソフトウェア (Agilent Technologies社製) により制御される液体クロマトグラフィートリプル四重極質量分析 (LC/QqQ-MS) システム (LC : Agilent 1200 series ; MS, Agilent 6460 with Jet Stream Technology ; Agilent Technologies社製) を用いて分析し、測定した。その結果、 NaHCO_3 濃度の増加に伴って、有機酸 (コハク酸、乳酸、酢酸、フマル酸、2-ケトグルタル酸、リンゴ酸、クエン酸) の産生量は増加の傾向を示した (図1、2)。 NaHCO_3 濃度を調節することで、PCC6803 (GT) によりコハク酸、乳酸及び酢酸を効果的に産生可能であることが確認された。

[0049] (実施例2) 微細藻 (ユーグレナ) による有機酸の産生

本実施例において、微細藻類の微生物種としてユーグレナ (*Euglena gracilis* (NIES-48)) 株を用いた。以下「NIES-48」という。

[0050] (1) 前々培養

Cramer-Myers寒天培地 (1.5% Agarを含むCM培地) 上で生育したNIES-48のコロニーを白金耳でとり、水性媒体 (70 mL) に加え、 $\text{pH}7.8$ にて通気条件下、 $50\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ で 30°C にて4~5日間培養した。ここでは水性媒体として、表2に示す組成のCM培地に $7.5\text{mM } (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ を含む培養液を用いた。培養後の OD_{750} は1~1.5であった。

[0051]

[表2]

Cramer-Myers培地 (CM培地)	組成
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	1 g
KH_2PO_4	1 g
$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.8 g
$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	3 mg
H_3BO_3	2.48 mg
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	26.49 mg
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2 g
金属塩	
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.8 mg
$\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.5 mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.4 mg
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.2 mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.02 mg
オートクレーブ後に添加	
Thiamine HCl (Vitamin B ₁)	0.5 mg
Vitamin B ₁₂	0.02 mg
1 L	

[0052] (2) 前培養

上記(1)で前々培養したNIES-48を、 OD_{750} が0.1になるように水性媒体(150 mL)に加え、pH3.5にて通気条件下、 $50 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ で30℃にて4～5日間培養した。ここでは水性媒体として、CM培地に7.5 mM $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ を含む培養液を用いた。培養後の OD_{750} は1～1.5であった。

[0053] (3) 本培養(光独立利用)

上記(2)で前培養したNIES-48を、 OD_{750} が0.4になるように水性媒体(70 mL)に加え、pH3.5にて CO_2 通気条件下、 $120 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ で30℃にて5日間培養した。ここでは、水性媒体としてCM培地に3 mM $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ を含む培養液を用いた。培養後の OD_{750} は6～7であった。培養後、遠心分離(3000g、5分、4℃)によりNIES-48を回収した。

[0054] (4) 本培養(嫌気・暗所)

上記(3)で回収したNIES-48を、 OD_{750} が20になるように水性媒体(10 mL)

に加えた。ここでは水性媒体として100 mM Hepes-KOH (pH7.8) を用いた。そして、0、100、200 mMとなるように NaHCO_3 を水性媒体に添加し、10分間の N_2 通気後、嫌気条件下で170rpmで攪拌しながら30℃で培養を開始し、72時間培養した。密閉状態を維持したままNIES-48を含む水性媒体を回収した。

[0055] 上記(4)で培養したNIES-48を含む水性媒体を、各々14000g、4℃にて5分間遠心分離し、上清を回収し、実施例1と同手法により濾過した。さらに実施例1と同手法により、コハク酸、乳酸、酢酸及びクエン酸の産生量を測定した。その結果、 NaHCO_3 濃度が100 mMでコハク酸、乳酸及び酢酸の産生量は各々増加し、200 mMでは、乳酸及び酢酸の産生量は減少の傾向を示した(図3)。一方、クエン酸は NaHCO_3 濃度の増加に伴って、産生量は増加の傾向を示した(図3)。 NaHCO_3 濃度を調節することで、ユーグレナにより有機酸(コハク酸、乳酸、酢酸、クエン酸)を効果的に産生可能であることが確認された。

[0056] (実施例3) 微細藻(クラミドモナス)による有機酸の産生

本実施例において、微細藻類の微生物種としてクラミドモナス(*Chlamydomonas reinhardtii*)株を用いた。以下「*C. reinhardtii*」という。

[0057] (1) 前々培養

TAP寒天培地(1.5%Agarを含むTAP培地)上で生育した*C. reinhardtii*のコロニーを白金耳でとり、水性媒体(70 mL)に加え、pH7.8にて CO_2 通気条件下、 $100 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ で30℃にて4~5日間培養した。ここでは水性媒体としてMB6N培地を用いた。培養後の OD_{750} は2.5~3.5であった。TAP培地及びMB6N培地の組成は表3に示した。

[0058]

[表3]

	TAP	MB6N
NH ₄ Cl	375 mg L ⁻¹	
Acetic Acid	1.05 mL L ⁻¹	
1M potassium phosphate	1 mL L ⁻¹	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	100 mg L ⁻¹	75 mg L ⁻¹
CaCl ₂ ·7H ₂ O	50 mg L ⁻¹	25 mg L ⁻¹
Tris	2420 mg L ⁻¹	
NaNO ₃		750 mg L ⁻¹
K ₂ HPO ₄		75 mg L ⁻¹
KH ₂ PO ₄		175 mg L ⁻¹
NaCl		25 mg L ⁻¹
EDTA		50 mg L ⁻¹
KOH		31 mg L ⁻¹
FeSO ₄ ·7H ₂ O		4.98 mg L ⁻¹
H ₃ BO ₃		11.42 mg L ⁻¹
ZnSO ₄ ·7H ₂ O		17.64 mg L ⁻¹
MnCl ₂ ·4H ₂ O		2.88 mg L ⁻¹
MoO ₃		1.42 mg L ⁻¹
CuSO ₄ ·5H ₂ O		3.14 mg L ⁻¹
CoNO ₃ ·6H ₂ O		0.98 mg L ⁻¹
bacto-peptone		1000 mg L ⁻¹
sucrose		5000 mg L ⁻¹
EDTA	43.46 mg L ⁻¹	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	22 mg L ⁻¹	
CuSO ₄ ·5H ₂ O	1.57 mg L ⁻¹	
MnCl ₂ ·4H ₂ O	5.06 mg L ⁻¹	
CoCl ₂ ·6H ₂ O	1.61 mg L ⁻¹	
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	1.1 mg L ⁻¹	
FeSO ₄ ·7H ₂ O	4.99 mg L ⁻¹	
H ₃ BO ₃	11.4 mg L ⁻¹	

[0059] (2) 前培養

上記(1)で前々培養した*C. reinhardtii*を、OD₇₅₀が0.1になるように水性媒体(150 mL)に加え、pH7.8にてCO₂通気条件下、120 μmol photons m⁻² s⁻¹で30℃にて3日間培養した。ここでは水性媒体としてMB6N培地を用いた。培養

後のOD₇₅₀は2.5～3.5であった。

[0060] (3) 本培養（光独立利用）

上記（2）で前培養した*C. reinhardtii*を、OD₇₅₀が0.4になるように水性媒体（70 mL）に加え、pH7.8にてCO₂通気条件下、120 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ で30℃にて5日間培養した。ここでは水性媒体としてMB6N培地を用いた。培養後のOD₇₅₀は3.5～4.5であった。培養後、遠心分離（14000g、5分、4℃）で*C. reinhardtii*を回収した。

[0061] (4) 本培養（嫌気・暗所）

上記（3）で回収した*C. reinhardtii*を、OD₇₅₀が20になるように水性媒体（10 mL）に加えた。ここでは水性媒体として50 mM Hepes-KOH（pH7.8）を用いた。また、0、100 mMとなるようにNaHCO₃を添加し、10分間のN₂通気後、嫌気条件下170rpmで攪拌しながら、30℃で培養を開始し、72時間培養した。密閉状態を維持したまま*C. reinhardtii*を含む水性媒体を回収した。

[0062] 上記（4）で回収した水性媒体を、各々14000g、4℃にて5分間遠心分離し、実施例1と同手法により上清を回収し、0.45 μm 孔径Mini-UniPrep（GEヘルスケア・ジャパン株式会社製）を用いて濾過した。濾過液について、さらに実施例1と同手法により、コハク酸、乳酸及び酢酸の産生量を測定した。その結果、NaHCO₃濃度が100 mMの場合にコハク酸、乳酸及び酢酸の産生量は各々増加した（図4）。NaHCO₃濃度を調節することで、クラミドモナスにより有機酸（コハク酸、乳酸、酢酸）を効果的に産生可能であることが確認された。

[0063] (実施例4) 微細藻（シネコシスティス）による有機酸の産生

本実施例では、微細藻類を飽和状態のCO₂条件下で培養したときの有機酸の産生について確認した。本実施例では、実施例1と同様にPCC6803（GT）を用いた。

[0064] (1) 前々培養

BG-11寒天培地（1.5% Agarを含むBG-11）上で生育したPCC6803（GT）のコロニーを白金耳でとり、水性媒体（70 mL）に加え、pH7.8にて通気条件下、50 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ で30℃にて4～5日間培養した。ここでは水性媒体とし

て、BG-11液体培地 (Rippka Rら, 1J Gen Microbiol 111: 1-61 (1979)) に 17.6 mM NaNO_3 , 20 mM Hepes-KOHを含む培養液を用いた。藻体密度は、Shimadzu UV mini spectrophotometer (紫外可視分光光度計: 株式会社島津製作所製) を用いて OD_{750} により測定した。培養後の OD_{750} は 1~1.5 であった。通気とは、特に言及しない場合は空気による通気を意味する。以下の実施例についても同様である。

[0065] (2) 前培養

上記 (1) で前々培養した PCC6803 (GT) を、 OD_{750} が 0.1 になるように水性媒体 (150 mL) に加え、pH7.8 にて通気条件下、 $50 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 30°C にて 4~5 日間培養した。ここでは水性媒体として、BG-11 液体培地に 17.6 mM NaNO_3 , 20 mM Hepes-KOH を含む培養液を用いた。培養後の OD_{750} は 1~1.5 であった。

[0066] (3) 本培養 (光独立利用)

上記 (2) で前培養した PCC6803 (GT) を、 OD_{750} が 0.4 になるように水性媒体 (70 mL) に加え、pH7.8 にて CO_2 通気条件下、 $120 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で 30°C にて 3 日間培養した。ここでは、水性媒体として BG-11 液体培地に 5 mM NH_4Cl , 50 mM Hepes-KOH を含む培養液を用いた。培養後の OD_{750} は 6~7 であった。培養後、フィルター (polytetrafluoroethylene 膜、孔径 $1 \mu\text{m}$) を濾過にて PCC6803 (GT) を回収した。

[0067] (4) 本培養 (嫌気・暗所)

上記 (3) で回収した PCC6803 (GT) を、 OD_{750} が 20 になるように水性媒体 (10 mL) に加えた。ここでは水性媒体として 100 mM Hepes-KOH (pH7.8) を用いた。72 時間 N_2 を通気する条件及び 72 時間 CO_2 を通気する条件下で培養し、PCC6803 (GT) を含む水性媒体を回収した。この条件により、液体培地において N_2 及び CO_2 は飽和状態となった。

[0068] 上記 (4) で回収した水性媒体を、各々 14000g、 4°C にて 5 分間遠心分離し、上清を回収し、 $0.45 \mu\text{m}$ 孔径 Mini-UniPrep (GEヘルスケア・ジャパン株式会社製) を用いて濾過した。濾過液について、コハク酸、乳酸、酢酸及びグリ

コーゲンの産生量を、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）カラム（Aminex HPX-87H；Bio-Rad社製）及び屈折率検出器（RID-10A；株式会社島津製作所製）を備えたHPLCにより測定した。フマル酸、2-ケトグルタル酸、リンゴ酸、クエン酸の産生量は非特許文献2に記載の通り、細胞内代謝物を抽出し、そしてキャピラリー電気泳動／質量分析（CE/MS）システム（CE：Agilent G7100；MS，Agilent G6224AA LC/MSD TOF；Agilent Technologies社製）及びMass Hunter Workstation Data Acquisitionソフトウェア（Agilent Technologies社製）により制御される液体クロマトグラフィートリプル四重極質量分析（LC/QqQ-MS）システム（LC：Agilent 1200 series；MS，Agilent 6460 with Jet Stream Technology；Agilent Technologies社製）を用いて分析し、測定した。その結果、CO₂での培養条件下で、コハク酸及び酢酸の産生量は増加の傾向を示した（図5）。

[0069] （実施例5）PEPカルボキシラーゼ過剰発現微細藻による有機酸の産生

本実施例ではPEPカルボキシラーゼ過剰発現微細藻による有機酸の産生を確認した。本実施例では実施例1に示すPCC6803（GT）を用いて、遺伝子組換え操作によりPEPカルボキシラーゼ過剰発現株PCC6803（PEPox）を作製した。PCC6803（PEPox）の作製方法は以下のとおりである。微細藻によるコハク酸の産生経路を図6に示し、PEPカルボキシラーゼ作用点を示した。

[0070] 5-1. rbcLターミネーター及びslr0168領域下流のコード領域の一部は、PCC6803（GT）から抽出したゲノムDNAから、プライマーセットとして、配列番号1及び2に示すオリゴヌクレオチド、配列番号3及び4に示すオリゴヌクレオチドを用いて、PCRにより増幅した。得られた増幅断片を、In-Fusion HD Cloning Kit（Clonetechn社製、タカラバイオ株式会社より入手）を用いてPstI及びHindIII消化pBluescript II SK(+)(Agilent Technologies, Palo Alto, CA)に挿入し、pBluescript-TrbcL-slr0168を得た。

[0071] 配列番号3：5'-CCTCTAGAGTCGACCTGCAGGTTACAGTTTTGGCAATTAC-3'

配列番号4：5'-GCCAGCCCCAACACCTGACGCGTTTCCCCACTTAGATAAAAAATCC-3'

配列番号5：5'-TCTAAGTGGGGAAACGCGTCAGGTGTTGGGGCTGGC-3'

配列番号 6 : 5'-TGATTACGCCAAGCTTCTAAGTCAGCGTAAATCTGACAATG-3'

[0072] 5-2. カナマイシン耐性カセット及びrbcLプロモーターはpCRII-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA) 及びPCC6803 (GT) のゲノムDNAからプライマーセットとして配列番号 5 及び 6 に示すオリゴヌクレオチド、配列番号 7 及び 8 に示すオリゴヌクレオチドを用いて、PCRにより増幅した。得られた増幅断片を、In-Fusion HD Cloning Kit (Clonetechn社製、タカラバイオ株式会社より入手) を用いて XhoI及びXbaI消化pBluescript-TrbcL-slr0168に挿入し、pBluescript-Kmr-PrbcL-TrbcL-slr0168を得た。

[0073] 配列番号 7 : 5'-CGGGCCCCCCTCGAGCCGGAATTGCCAGCTGGGGC-3'

配列番号 8 : 5'-TGGACTTTCTAATTAGAGCGGCCGCTCAGAAGAACTCGTCAAGA-3'

配列番号 9 : 5'-TCTTGACGAGTTCTTCTGAGCGGCCGCTCTAATTAGAAAGTCCA-3'

配列番号 10 : 5'-CCGGGGATCCTCTAGACATATGGGTCAGTCCTCCAT-3'

[0074] 5-3. slr0168領域上流のコード領域の一部は、PCC6803 (GT) から抽出したゲノムDNAから、プライマーセットとして配列番号 9 及び 10 に示すオリゴヌクレオチドを用いて、PCRにより増幅した。得られた増幅断片を、In-Fusion HD Cloning Kit (Clonetechn社製、タカラバイオ株式会社より入手) を用いて KpnI及びXhoI消化pBluescript-Kmr-PrbcL-TrbcL-slr0168に挿入し、pBluescript-slr0168-Kmr-PrbcL-TrbcL-slr0168を得た。

[0075] 配列番号 11 : 5'-TATAGGGCGAATTGGGTACCATGACTATTCAATACACCCCCCTAG-3'

配列番号 12 : 5'-TACCGTCGACCTCGAGCACCAGACCAAAGCCGGGAATTTTC-3'

[0076] 5-4. pUC19 (タカラバイオ) のNdeI部位 (CATATG) にAatII及びEcoRIで消化されたCACATGを置き換え、合成DNAを挿入した。pBluescript-slr0168-KMR-PrbcL-TrbcL-slr0168をKpnI及びHindIIIで消化した後、slr0168を含む断片は、上記作製したpUC19ベクターのKpnI/HindIII部位に挿入し、pSKrbcL-slr0168を作製した。

[0077] 5-5. PEPカルボキシラーゼをコードするppc (slr0920) は、PCC6803 (GT) から抽出したゲノムDNAから、プライマーセットとして配列番号 11 及び配列番号 12 に示すオリゴヌクレオチドを用いて、PCRにより増幅した。得られ

た増幅断片を、In-Fusion HD Cloning Kit (Clontech社製、タカラバイオ株式会社より入手) を用いてNdeI/SalI消化pSKtrc-slrl0168に挿入し、pSKtrc-slrl0168/sll0920を得た。

[0078] 配列番号 1 3 : 5' - AGGAAACAGACCCATATGAACTTGGCAGTTCCTGC -3'

配列番号 1 4 : 5' - AACCTGCAGGTCGACTCAACCAGTATTACGCA -3'

[0079] 5 - 6. 得られたプラスミドpSKtrc-slrl0168/sll0920ベクター (sll0920コード領域を含む) によりPCC6803 (GT) を形質転換した。コントロールとして、空ベクター (sll0920コード領域を含まないプラスミドpSKtrc-slrl0168ベクター) での形質転換を行った。上記により形質転換され、sll0920が過剰発現するよう作製されたPCC6803 (GT) をPCC6803 (PEPox) ということとする。また、形質転換されていない野生型のPCC6803 (GT) をPCC6803 (VC) ということとする。

[0080] 5 - 7. 上記作製されたPCC6803 (PEPox) 及びPCC6803 (VC) について、実施例 1 の (1) ~ (3) と同様の培養条件に基づいて、培養した。(4) の嫌気・暗所条件下での本培養において、0又は100 mMのNaHCO₃を水性媒体に添加し、10分間のN₂通気後、嫌気条件下で培養を開始し、72時間後にPCC6803 (PEPox) 又はPCC6803 (VC) を含む水性媒体を回収した。回収した水性媒体について、実施例 1 と同手法によりコハク酸、乳酸及び酢酸の産生量を測定した。その結果、コハク酸及び酢酸は、NaHCO₃添加の有無にかかわらず、PEPカルボキシラーゼ過剰発現株PCC6803 (PEPox) の方が高い産生能を示したのに対し、乳酸はNaHCO₃添加の有無により産生能に変動することが確認された (図 7)。

[0081] (実施例 6) PGM過剰発現微細藻による有機酸の産生

本実施例では、PGM過剰発現微細藻による有機酸の産生を確認した。本実施例では実施例 1 に示すPCC6803 (GT) を用いて、遺伝子組換え操作によりPGM過剰発現株PCC6803 (PGMox) を作製した。PCC6803 (PGMox) の作製方法は、図 8 に示した。微細藻によるコハク酸の産生経路を図 6 に示し、PGM作用点を示した。

[0082] 上記実施例5の5-1. ~ 5-3. と同手法によりpBluescript-slr0168-Kmr-PrbcL-TrbcL-slr0168を作製した。pSKtrc-slr0168/sll0726によりPCC6803 (GT) を形質転換し、sll0726が過剰発現するよう作製されたPCC6803 (GT) を、本実施例においてPCC6803 (PGMox) という。また、形質転換されていない野生型のPCC6803 (GT) を、実施例5-6. と同様にPCC6803 (VC) という。

[0083] 上記作製されたPCC6803 (PGMox) 及びPCC6803 (VC) について、実施例1の(1) ~ (3) と同様の培養条件に基づいて、培養した。(4) の嫌気・暗所条件下での本培養において、10分間のN₂通気後、嫌気条件下で培養を開始し、72時間後にPCC6803 (PGMox) 又はPCC6803 (VC) を含む水性媒体を回収した。回収した水性媒体について、実施例1と同手法によりコハク酸、乳酸及び酢酸の産生量を測定した。その結果いずれについても、PGM過剰発現株PCC6803 (PGMox) の方が高い産生能を示した(図9)。

[0084] (実施例7) PF0R過剰発現微細藻による有機酸の産生

本実施例では、PF0R過剰発現微細藻による有機酸の産生を確認した。本実施例では実施例1に示すPCC6803 (GT) を用いて、遺伝子組換え操作により*Synechococcus* sp. PCC7002由来PF0R遺伝子(A1443)を過剰発現する株PCC6803 (PF0Rox) を作製した。PCC6803 (PF0Rox) の作製方法は、図10に示した。微細藻によるコハク酸の産生経路を図6に示し、PF0の作用点を示した。

[0085] 上記実施例5の5-1. ~ 5-3. と同手法によりpBluescript-slr0168-Kmr-PrbcL-TrbcL-slr0168を作製した。pSKtrc-PF0R (A1443) によりPCC6803 (GT) を形質転換した。PF0R (A1443) が過剰発現するよう作製されたPCC6803 (GT) を本実施例においてPCC6803 (PF0Rox) ということとする。また、形質転換されていない野生型のPCC6803 (GT) を実施例5-6. と同様にPCC6803 (VC) という。

[0086] 上記作製されたPCC6803 (PF0Rox) 及びPCC6803 (VC) について、実施例1の(1) ~ (3) と同様の培養条件に基づいて、培養した。(4) の嫌気・暗所条件下での本培養において、0又は100 mMのNaHCO₃を水性媒体に添加し、1

0分間のN₂通気後、嫌気条件下で培養を開始し、72時間後にPCC6803 (PFORox) 又はPCC6803 (VC) を含む水性媒体を回収した。回収した水性媒体について、実施例1と同手法によりコハク酸、乳酸及び酢酸の産生量を測定した。その結果、コハク酸はNaHCO₃添加の有無にかかわらずPFOR過剰発現株PCC6803 (PFORox) の方が高い産生能を示し、NaHCO₃を添加することでより高く産生されることが確認された。乳酸はNaHCO₃の添加によって高い産生能が確認され、PFOR過剰発現株PCC6803 (PFORox) の方が高い産生能を示した (図11A)。また、細胞密度 (Cell concentration) も、光培養72時間後のOD₇₅₀により測定した。その結果、細胞密度については殆ど差を認めなかった (図11B)。

[0087] (実施例8) Flv3過剰発現微細藻による有機酸の産生

8-1. Flv3過剰発現微細藻の作製

本実施例では実施例1に示すPCC6803 (GT) を用いて、遺伝子組換え操作によりFlv3過剰発現株PCC6803 (Flv3ox) を作製した。PCC6803 (Flv3ox) の作製方法は以下のとおりである。

[0088] PCC6803 (GT) から抽出したゲノムDNAから、フォワードプライマー (5'-GG AATTATAACCATAATGTTCACTACCCCCCTCCC-3' : 配列番号15) 及びリバースプライマー (5'-GGCATGGAGGACATATTAGTAATAATTGCCGACTT-3' : 配列番号16) を用いて、flv3 (sl10550) コード領域をPCRにより増幅した。

[0089] 得られた1.7kb増幅断片を、In-Fusion Cloning Kit (Clonetechn社製、タカラバイオ株式会社より入手) を用いてNdeI消化pTCP2031Vベクターに挿入した。pTCP2031Vベクターは、psbA2 (slr1311) プロモーター、及びslr2030及びslr2031のコード領域の一部 (相同組換え用プラットフォームとして)、及びクロラムフェニコール耐性カセットを含む組換えプラスミドである (Sato S ら, 2001, J. Biol. Chem. 276, 4293-4297 ; Horiuchi M ら, 2010, Biochem. J. 431, 135-140)。

[0090] 得られたプラスミドpTCP2031Vベクター (flv3コード領域を含む) によりPCC6803 (GT) を形質転換し、PCC6803 (Flv3ox) を作製した。コントロールとして、空ベクター (flv3コード領域を含まないプラスミドpTCP2031Vベクター

）での形質転換を行った。また、形質転換されていない野生型のPCC6803（GT）をPCC6803（VC）ということとする。

[0091] 8-2. 有機酸産生プロセスの検討

本実施例では、PCC6803（Flv3ox）を用いて有機酸産生プロセスの検討を行った。

[0092] （1）前々培養

BG11寒天培地（1.5%Agarを含むBG11）上で生育したPCC6803（Flv3ox）のコロニーを白金耳でとり、水性媒体（70 mL）に加え、pH7.8にて通気条件下、 $50 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ で30℃にて4～5日間培養した。ここでは水性媒体として、BG-11液体培地（Rippka Rら, 1979, J Gen Microbiol 111: 1-61）に17.6 mM NaNO_3 , 20 mM Hepes-KOHを含む培養液を用いた。Shimadzu UV mini spectrophotometer（紫外可視分光光度計：株式会社島津製作所製）を用いて OD_{750} により細胞密度を測定した。培養後の OD_{750} は1～1.5であった。

[0093] （2）前培養

上記（1）で前々培養したPCC6803（Flv3ox）を、 OD_{750} が0.1になるように水性媒体（150 mL）に加え、pH7.8にて通気条件下、 $50 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ で30℃にて4～5日間培養した。ここでは水性媒体として、G-11液体培地に17.6 mM NaNO_3 , 20 mM Hepes-KOHを含む培養液を用いた。培養後の OD_{750} は1～1.5であった。

[0094] （3）本培養（光独立利用）

上記（2）で前培養したPCC6803（Flv3ox）を、 OD_{750} が0.4になるように水性媒体（70 mL）に加え、pH7.8にて1% CO_2 通気条件下、 $120 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ で30℃にて3日間培養した。ここでは、水性媒体としてBG-11液体培地に5 mM $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NaNO}_3$, 50 mM Hepes-KOHを含む培養液を用いた。培養後の OD_{750} は6～7であった。培養後、菌体を遠心分離（14000g、5分、4℃）で回収した。

[0095] （4）本培養（嫌気・暗所）

上記（3）で培養したPCC6803（Flv3ox）を、 OD_{750} が20になるように水性媒体（10 mL）に加え、 N_2 通気による嫌気条件下で10分後に170rpmで攪拌し、30

℃で培養を開始した。ここでは水性媒体として50 mM Hepes-KOHを用いた。密閉状態を維持したまま水性媒体を回収し、OD/pHを測定し、有機酸分析、メタボローム解析、グリコーゲン分析を行った。

[0096] 8-3. PCC6803 (Flv3ox) の培養による有機酸の産生

上記8-2の嫌気・暗所条件下で培養したPCC6803 (Flv3ox) 及び比較例としてのPCC6803 (VC) について、コハク酸及び乳酸の産生量を確認した。水性媒体中の窒素源として塩化アンモニウム (NH_4Cl) を用いた。

上記8-2の(4)で培養したPCC6803 (Flv3ox) 培養液及び比較例の培養液を、各々14000g、4℃にて5分間遠心分離し、上清を回収した。0.45 μm 孔径 Mini-uniPrep (GEヘルスケア・ジャパン株式会社製) を用いて濾過し、HPLC カラム (Aminex HPX-87H ; Bio-Rad社製) 及び屈折率検出器 (RID-10A ; 株式会社島津製作所製) を備えた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) (株式会社島津製作所製) を用いて、コハク酸及び乳酸の産生量を測定した。その結果、Flv3過剰発現させたPCC6803 (Flv3ox) がコハク酸及び乳酸のいずれについても高い産生量を示した (図12)。

[0097] (実施例9) PCC6803 (Flv3ox) の培養による細胞内グリコーゲン及びATP

実施例8 (8-2) の嫌気・暗所条件下で培養したPCC6803 (Flv3ox) 及び比較例としてのPCC6803 (VC) について、細胞内グリコーゲン及びATPの蓄積量を測定した。水性媒体中の窒素源として塩化アンモニウム (NH_4Cl) を用いた。その結果、グリコーゲン及びATPのいずれについてもFlv3過剰発現させたPCC6803 (Flv3ox) が高い蓄積量を示した (図13)。

[0098] (1) グリコーゲン定量

1 μm 孔径ポリテトラフルオロエチレン (PTFE) メンブレンフィルター (Milipore ; Millipore社製) を用いて5 mg乾燥重のPCC6803 (Flv3ox) を採取した。濾過直後、細胞を20 mMの予冷した炭酸アンモニウムで洗浄した。すぐに、メンブレンフィルター上のPCC6803 (Flv3ox) を液体窒素中で凍結し、凍結乾燥機 (Labconco社製) 内で凍結乾燥した。既報 (Izumi Yら, 2013, J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 930: 90-97) の通り、細胞からグ

リコーゲンを抽出した後、サイズ排除HPLCカラム（OHpak SB-806M HQ；昭和電工株式会社製）及び屈折率検出器（RID-10A；株式会社島津製作所製）を備えた高速液体クロマトグラフィー（HPLC）（株式会社島津製作所製）を用いて、グリコーゲン含量を測定した。

[0099] （２）ATP定量

ATP量は、非特許文献２に記載の通り、細胞内代謝物を抽出し、そしてキャピラリー電気泳動／質量分析（CE/MS）システム（CE：Agilent G7100；MS, Agilent G6224AA LC/MSD TOF；Agilent Technologies社製）及びMassHunter Workstation Data Acquisitionソフトウェア（Agilent Technologies社製）により制御される液体クロマトグラフィートリプル四重極質量分析（LC/QqQ-MS）システム（LC：Agilent 1200 series；MS, Agilent 6460 with Jet Stream Technology；Agilent Technologies社製）を用いて分析し、測定した。

[0100] （参考例１）微細藻（シネコシスティス）における細胞内代謝物の確認

本参考例では、微細藻として実施例１に示したPCC6803（GT）を用い、細胞内代謝物質の ^{13}C 標識率の経時変化を確認した。PCC6803（GT）を100 mMの $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ を含む100 mM Hepes-KOH水性媒体（pH7.8）に懸濁し、 N_2 通気後嫌気条件下で培養した。ラベル後24時間目に、1 μm 孔径ポリテトラフルオロエチレン（PTFE）メンブレンフィルター（Omnipore；Millipore社製）を用いて5 mg乾燥重のPCC6803（GT）を採取した。濾過直後、細胞を20 mMの予冷した炭酸アンモニウムで洗浄した。すぐに、メンブレンフィルター上のPCC6803（GT）を液体窒素中で凍結し、凍結乾燥機（Labconco社製）内で凍結乾燥した。非特許文献２に記載の通り、細胞内代謝物を抽出し、そしてキャピラリー電気泳動／質量分析（CE/MS）システム（CE：Agilent G7100；MS, Agilent G6224AA LC/MSD TOF；Agilent Technologies社製）及びMassHunter Workstation Data Acquisitionソフトウェア（Agilent Technologies社製）により制御される液体クロマトグラフィートリプル四重極質量分析（LC/QqQ-MS）システム（LC：Agilent 1200 series；MS, Agilent 6460 with Jet Stream Technology；Agilent Technologies社製）を用いて分析し、測定した。その結果を、図14

に示した。細胞内代謝経路は図 15 に示した。上記結果より、PCC6803 (GT) の嫌気条件培養により、微細藻に取り込まれた NaHCO_3 は、有機酸に異化されることが確認された。

[0101] (参考例 2) 微細藻の培養による細胞密度及びグリコーゲン蓄積量の確認

本参考例では微細藻としてPCC6803 (GT) を用い、実施例 8 の嫌気・暗所条件下で培養したときの、細胞密度変化、グリコーゲン蓄積量を確認した。水性媒体中の窒素源として塩化アンモニウム (NH_4Cl) 又は硝酸ナトリウム (NaNO_3) を用いた。

[0102] (1) 細胞密度

上記培養したPCC6803 (GT) について、Shimadzu UV mini spectrophotometer (紫外可視分光光度計：株式会社島津製作所製) を用いて OD_{750} により細胞密度を測定した。

その結果、窒素源の違いによる細胞密度はほとんど差がなかった (図 16 A)。

[0103] (2) グリコーゲン定量

グリコーゲンは、実施例 9) と同手法により測定した。その結果、窒素源の違いによるグリコーゲンの細胞内蓄積量はほとんど差がなかった (図 16 B)。

[0104] (参考例 3) 微細藻の培養による有機酸の定量

本参考例ではPCC6803 (GT) を参考例 2 と同手法にて培養したときの酢酸、乳酸及びコハク酸の産生を確認した。乳酸及びコハク酸の産生量は、非特許文献 2 に記載の通り、細胞内代謝物を抽出し、そしてキャピラリー電気泳動／質量分析 (CE/MS) システム (CE : Agilent G7100 ; MS, Agilent G6224AA LC/MSD TOF; Agilent Technologies社製) 及びMassHunter Workstation Data Acquisitionソフトウェア (Agilent Technologies社製) により制御される液体クロマトグラフィー—トリプル四重極質量分析 (LC/QqQ-MS) システム (LC : Agilent 1200 series ; MS, Agilent 6460 with Jet Stream Technology ; Agilent Technologies社製) を用いて分析し、測定した。

[0105] その結果、自己発酵において酢酸、乳酸及びコハク酸の細胞内蓄積量は、培養時間と共に増加、又はやや増加傾向が認められた。酢酸の細胞内蓄積量は、窒素源の違いによる差はほとんど認められなかったが（図17A）、乳酸及びコハク酸については塩化アンモニウムを窒素源として用いたほうが蓄積量が多いことが観察された（図17B、C）。

[0106] （参考例4）微細藻の培養による細胞内代謝プロファイル

本参考例では、PCC6803（GT）を参考例2と同手法にて培養したときの細胞内代謝プロファイルを調べた。細胞内代謝プロファイルは、非特許文献2に記載の通り、細胞内代謝物を抽出し、そしてキャピラリー電気泳動／質量分析（CE/MS）システム（CE：Agilent G7100；MS，Agilent G6224AA LC/MSD TO F；Agilent Technologies社製）及びMassHunter Workstation Data Acquisitionソフトウェア（Agilent Technologies社製）により制御される液体クロマトグラフィーートリプル四重極質量分析（LC/QqQ-MS）システム（LC：Agilent 1200 series；MS，Agilent 6460 with Jet Stream Technology；Agilent Technologies社製）を用いて分析し、測定した。

[0107] その結果、上記培養によりコハク酸、乳酸及びリンゴ酸等の有機酸の細胞内蓄積が確認された（図18、19）。特に培養開始6～24時間の間に、微細藻内にコハク酸、乳酸及びリンゴ酸の蓄積がピークになることを観察した。

[0108] （参考例5）微細藻の培養によるATPの利用

本参考例では、PCC6803（GT）を参考例2と同手法にて培養したときの細胞内のATP量を調べた。即ち、コハク酸、乳酸及びリンゴ酸等の有機酸の産生に伴うATPの利用を確認した。その結果、有機酸の産生に伴い、ATPがADP及びAMPに分解することが確認された（図20）。即ち、細胞内に蓄積されたATPを有効活用し、コハク酸、乳酸及びリンゴ酸等の有機酸が効果的に産生されることが確認された。即ち、本発明のFlv3が過剰発現するよう作製されたPCC6803（Flv3ox）によれば、より効果的に有機酸が産生されることが示唆された。

産業上の利用可能性

[0109] 以上詳述したように、本発明の方法で微細藻を培養することで、バイオマスを有効活用することができる。微細藻の光合成と微細藻に取り込まれた炭素源によりバイオマスから有機酸を産生することができる。さらに、NADPH- O_2 オキシドレダクターゼの機能及び／又はグリコーゲンからクエン酸回路に至る解糖系での律速酵素の機能が增強された微細藻によれば、より効果的に細胞内代謝物である有機酸を回収することができる。水性媒体への炭酸イオン及び／又は重炭酸イオンの供給は、例えば電気や鉄鋼等の製造工程において産業的に排出された大気中の CO_2 を利用し、有効活用することができる。従来は、有機酸のうち例えばコハク酸等は石油等を原料として産生されていたが、その際に CO_2 が排出されていたのに対し、本発明の方法によれば、有機酸の製造工程で CO_2 を排出しないばかりか、大気中の CO_2 を有効活用できる点で、自然環境に対して優れた効果を有する。さらに、本発明の微細藻によれば、バイオマスとして使用される水性媒体は淡水のみならず海水を活用することができ、水資源の枯渇や耕作地の限界に左右されず安定的に有効活用することができる。

[0110] 製造された有機酸は、食品、医薬品、その他各種分野において有効に利用される。例えばコハク酸では医薬品の賦形剤、pH調整剤、食品として調味料、その他の食品添加物、工業的にはメッキ等にも利用される。また、炭酸ガスを発泡する入浴剤等の成分としても利用される。

請求の範囲

- [請求項1] 以下の（Ａ）及び（Ｂ）の工程を含む、微細藻からの有機酸の製造方法：
- （Ａ）炭酸イオン及び／又は重炭酸イオンの含有量が20～2000mMの水性媒体中で微細藻を培養する工程；
- （Ｂ）前記（Ａ）の微細藻から産生された有機酸を回収する工程。
- [請求項2] 炭酸イオン及び／又は重炭酸イオンの含有量が20～2000mMの水性媒体が、（１）二酸化炭素の充填、及び／又は、（２）炭酸ナトリウム、重炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、重炭酸カリウム、炭酸マグネシウムより選択されるいずれか１種又は２種以上の炭酸塩の添加、による水性媒体である、請求項１に記載の製造方法。
- [請求項3] （１）二酸化炭素の充填、及び／又は、（２）炭酸ナトリウム、重炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、重炭酸カリウム、炭酸マグネシウムより選択されるいずれか１種又は２種以上の炭酸塩の添加が、微細藻の培養の嫌気培養条件下で行われる、請求項２に記載の製造方法。
- [請求項4] 二酸化炭素の充填が、水性媒体中で飽和状態になるまで行われる、請求項２又は３に記載の製造方法。
- [請求項5] 前記微細藻がシアノバクテリア、ユーグレナ及びクラミドモナスから選択されるいずれか１種又は２種以上である、請求項１～４のいずれかに記載の有機酸の製造方法。
- [請求項6] シアノバクテリアが、シネコシスティスである、請求項５に記載の有機酸の製造方法。
- [請求項7] 前記有機酸が、脂肪族ジカルボン酸である、請求項１～６のいずれかに記載の有機酸の製造方法。
- [請求項8] 前記有機酸が、コハク酸、乳酸、酢酸、フマル酸、2-ケトグルタル酸、リンゴ酸、クエン酸から選択されるいずれか１種又は２種以上である、請求項１～６のいずれかに記載の有機酸の製造方法。
- [請求項9] 微細藻が、PEPカルボキシラーゼの機能が增強された微細藻である、

請求項 1 ～ 8 のいずれかに記載の有機酸の製造方法。

[請求項10] 以下の（a）及び（b）の工程を含む、微細藻からの有機酸の製造方法：

（a）PEPカルボキシラーゼの機能が增強された微細藻を水性媒体中で培養する工程；

（b）前記（a）の微細藻から産生された有機酸を回収する工程。

[請求項11] 微細藻が、ピルビン酸フェレドキシン酸化還元酵素の機能が增強された微細藻である、請求項 1 ～ 8 のいずれかに記載の有機酸の製造方法。

[請求項12] 以下の（c）及び（d）の工程を含む、微細藻からの有機酸の製造方法：

（c）ピルビン酸フェレドキシン酸化還元酵素の機能が增強された微細藻を水性媒体中で培養する工程；

（d）前記（c）の微細藻から産生された有機酸を回収する工程。

[請求項13] 微細藻が、ホスフォグルコムターゼの機能が增強された微細藻である、請求項 1 ～ 8 のいずれかに記載の有機酸の製造方法。

[請求項14] 以下の（e）及び（f）の工程を含む、微細藻からの有機酸の製造方法：

（e）ホスフォグルコムターゼの機能が增強された微細藻を水性媒体中で培養する工程；

（f）前記（e）の微細藻から産生された有機酸を回収する工程。

[請求項15] 微細藻を炭酸イオン及び／又は重炭酸イオンの含有量が20～2000mMの水性媒体中で培養することを特徴とする、微細藻内のクエン酸回路の活性化方法。

[請求項16] 微細藻が、NADPH- O_2 オキシドレダクターゼの発現又は発現增強するように形質転換された微細藻である、請求項 1 ～ 8 のいずれかに記載の有機酸の製造方法。

[請求項17] 以下の（C）及び（D）の工程を含む、微細藻からの有機酸の製造方

法：

(C) NADPH- O_2 オキシドレダクターゼの機能が增強された微細藻を水性媒体中で培養する工程；

(D) 前記(C)の微細藻から產生された有機酸を回収する工程。

[請求項18] 以下の(g)～(i)の工程を含む、微細藻からの有機酸の製造方法：

(g) NADPH- O_2 オキシドレダクターゼが発現又は発現增強するように微細藻を形質転換する工程；

(h) 前記(g)のNADPH- O_2 オキシドレダクターゼを発現又は発現增強された微細藻を水性媒体中で培養する工程；

(i) 前記(h)の微細藻から產生された有機酸を回収する工程。

[請求項19] 前記NADPH- O_2 オキシドレダクターゼが、フラボジアイロンタンパク質である、請求項16～18のいずれかに記載の有機酸の製造方法。

[請求項20] 前記フラボジアイロンタンパク質がFlv3である、請求項19に記載の有機酸の製造方法。

[請求項21] PEPカルボキシラーゼ、ピルビン酸フェレドキシン酸化還元酵素、ホスフォグルコムターゼ、及びNADPH- O_2 オキシドレダクターゼから選択されるいずれか1種又は複数種のタンパク質が発現增強するように形質転換された、有機酸の製造用微細藻。

[請求項22] 前記NADPH- O_2 オキシドレダクターゼがFlv3である、請求項21に記載の有機酸の製造用微細藻。

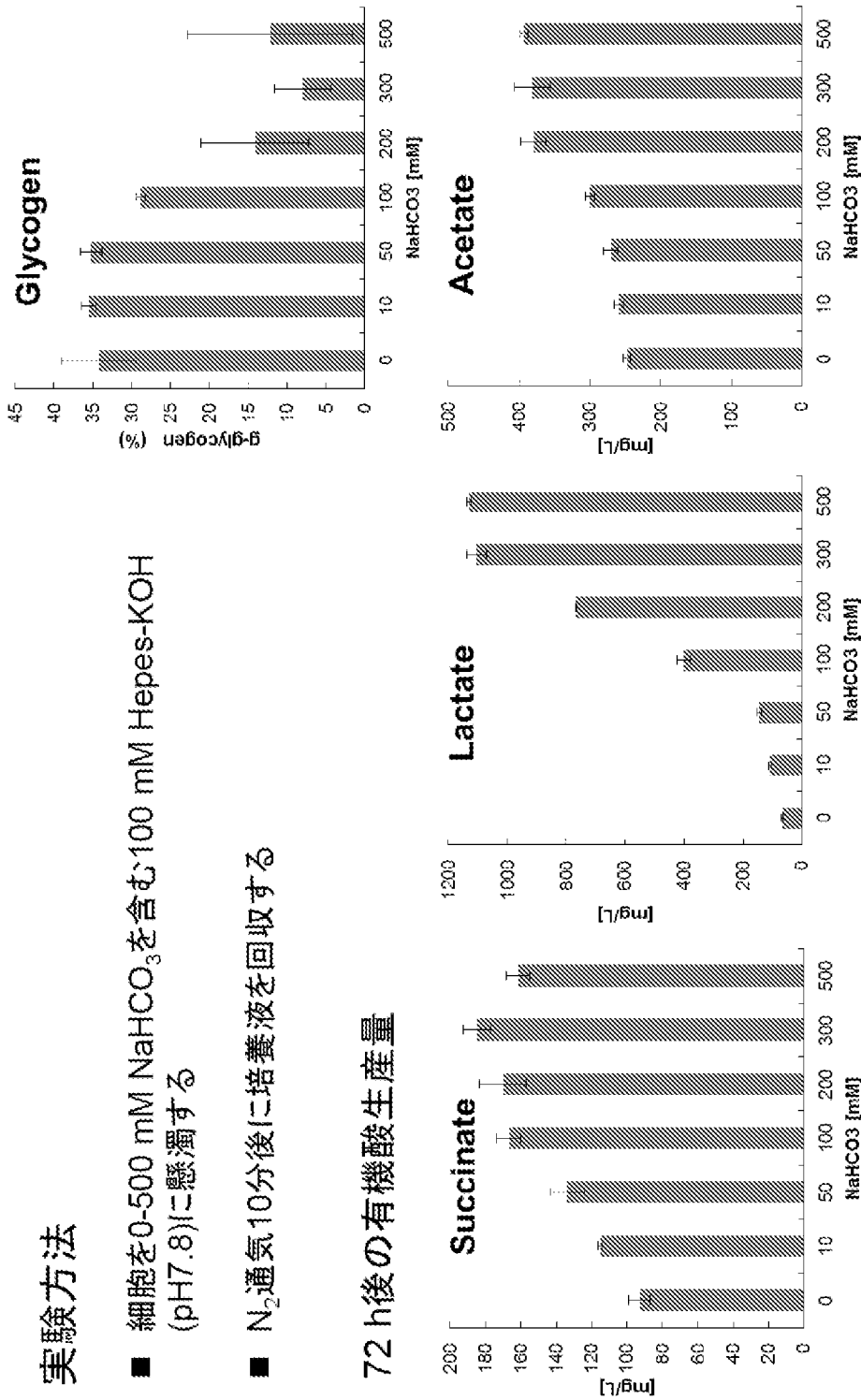
[請求項23] 前記微細藻がシアノバクテリアである、請求項21又は22の有機酸の製造用微細藻。

[図1]

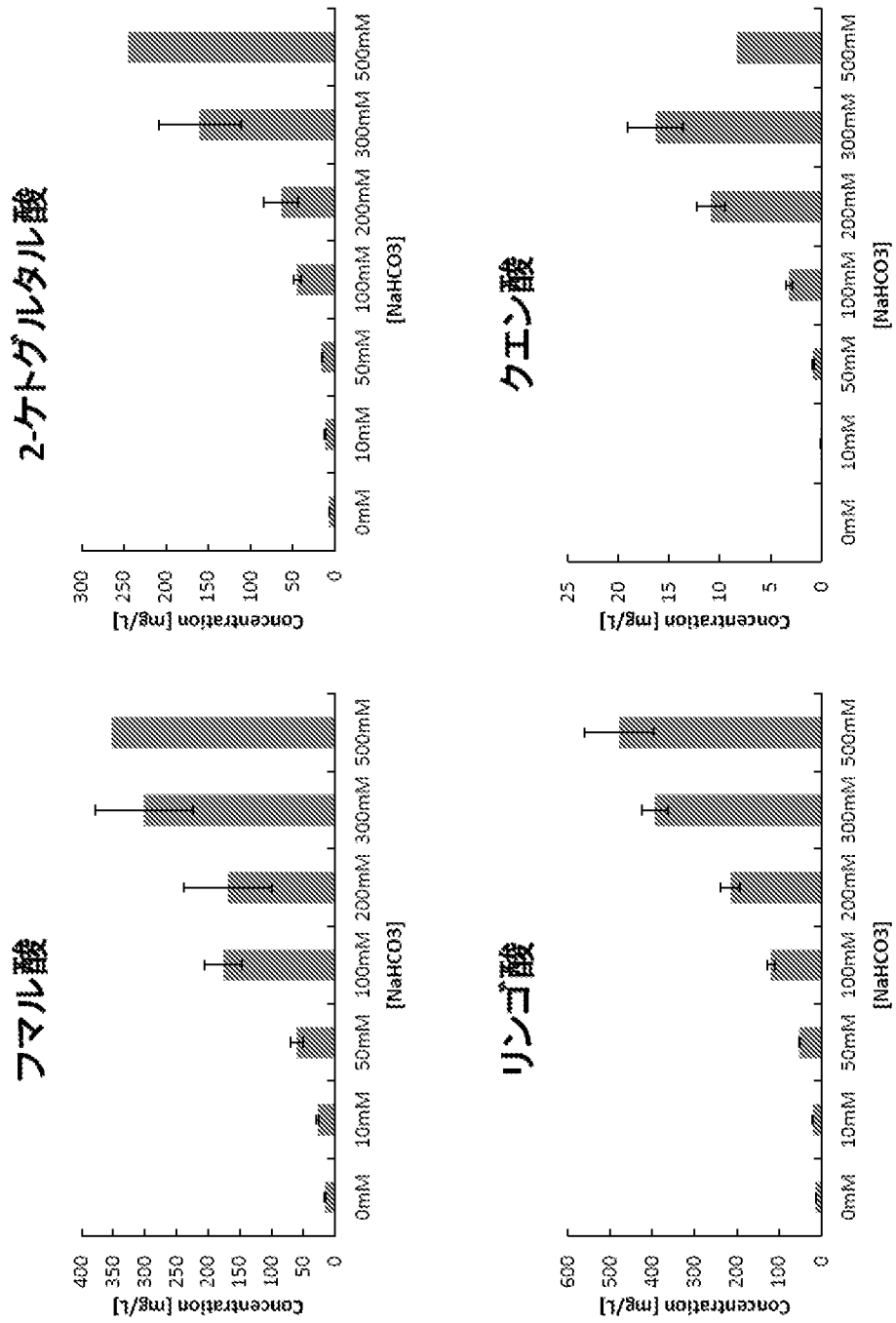
実験方法

- 細胞を0-500 mM NaHCO₃を含む100 mM Hepes-KOH (pH7.8)に懸濁する
- N₂通気10分後に培養液を回収する

72 h後の有機酸生産量

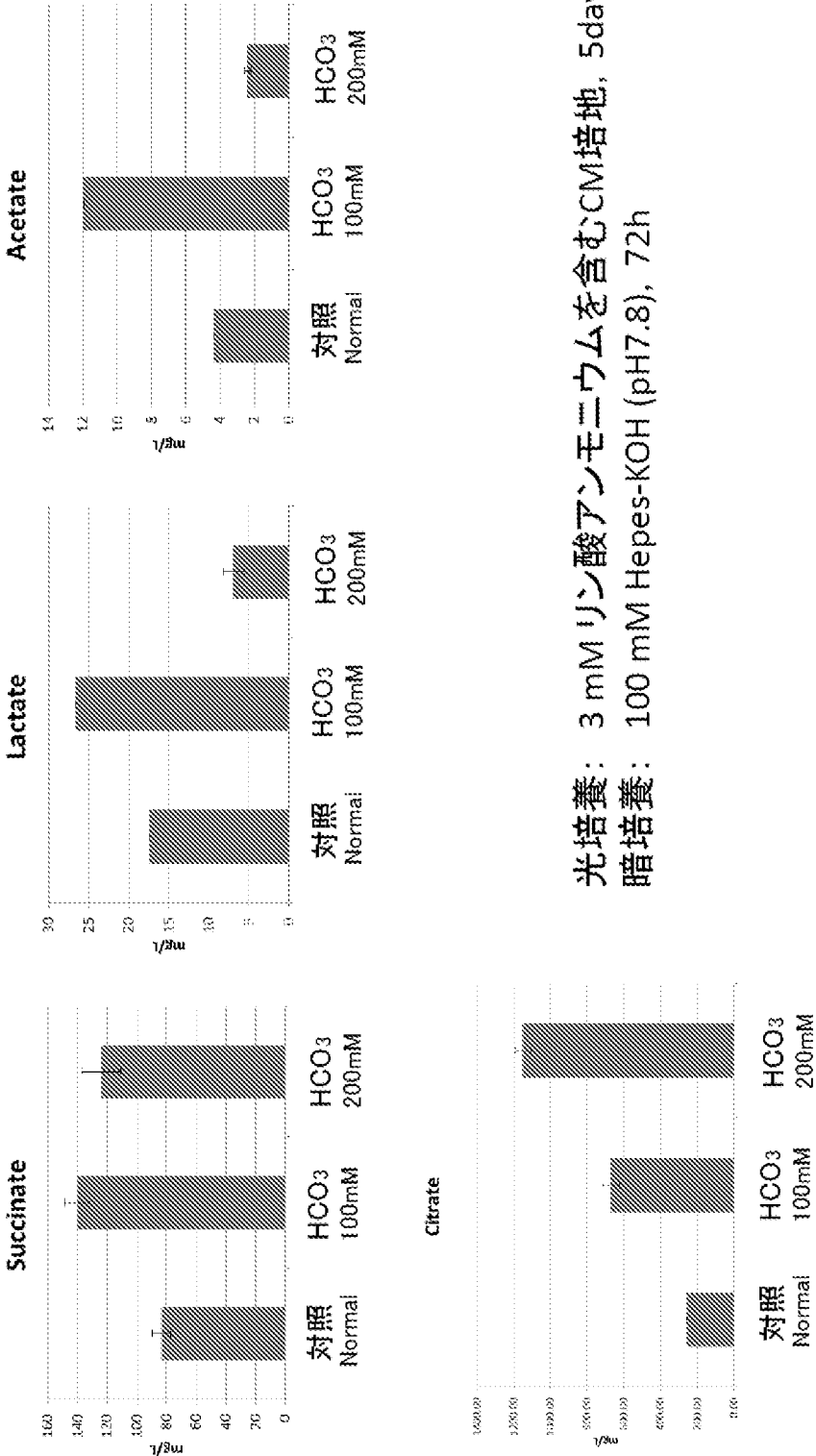


[図2]



[図3]

ユーグレナでの有機酸生産

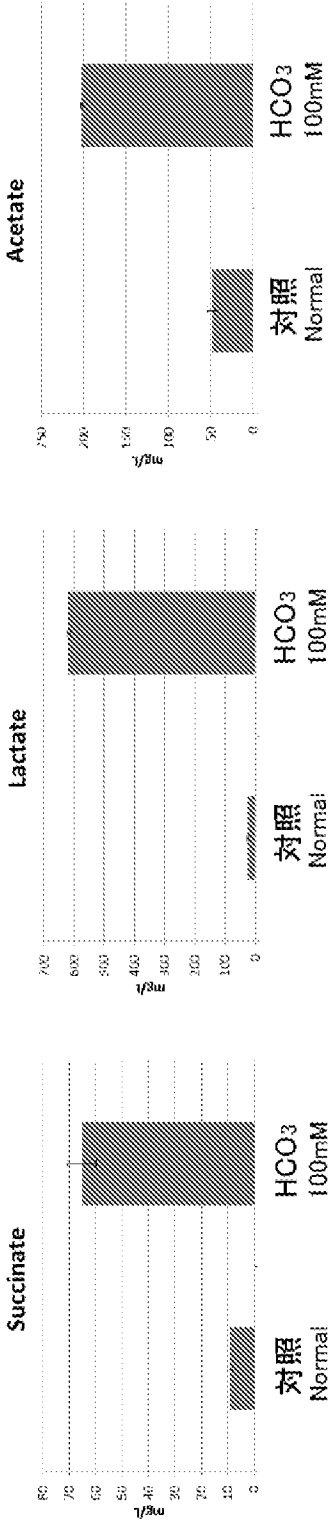


光培養: 3 mM リン酸アンモニウムを含むCM培地, 5day
暗培養: 100 mM HEPES-KOH (pH7.8), 72h

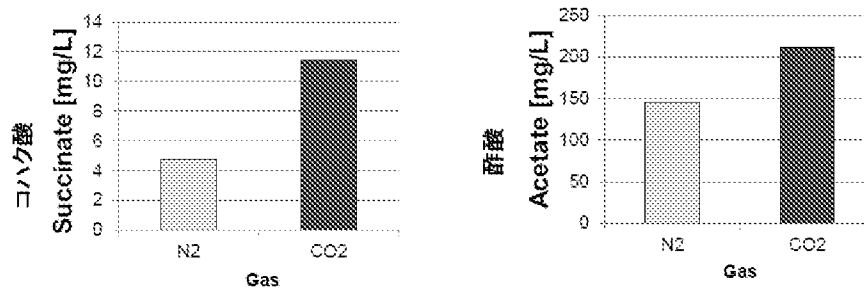
[図4]

クラミドモナスでの有機酸生産

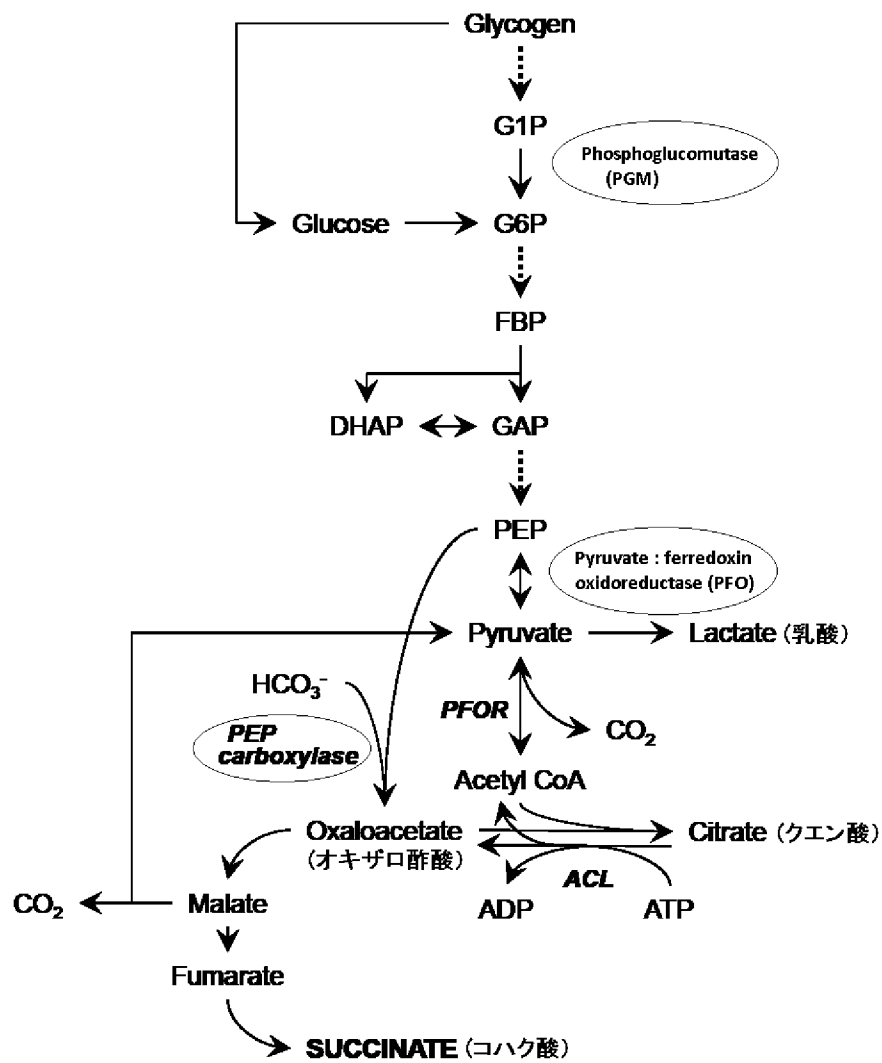
光培養: 8.1 mM 硝酸ナトリウムを含むMB6N培地, 5 day
暗培養: 100 mM Hepes-KOH (pH7.8), 72h



[図5]

CO₂からの有機酸生産

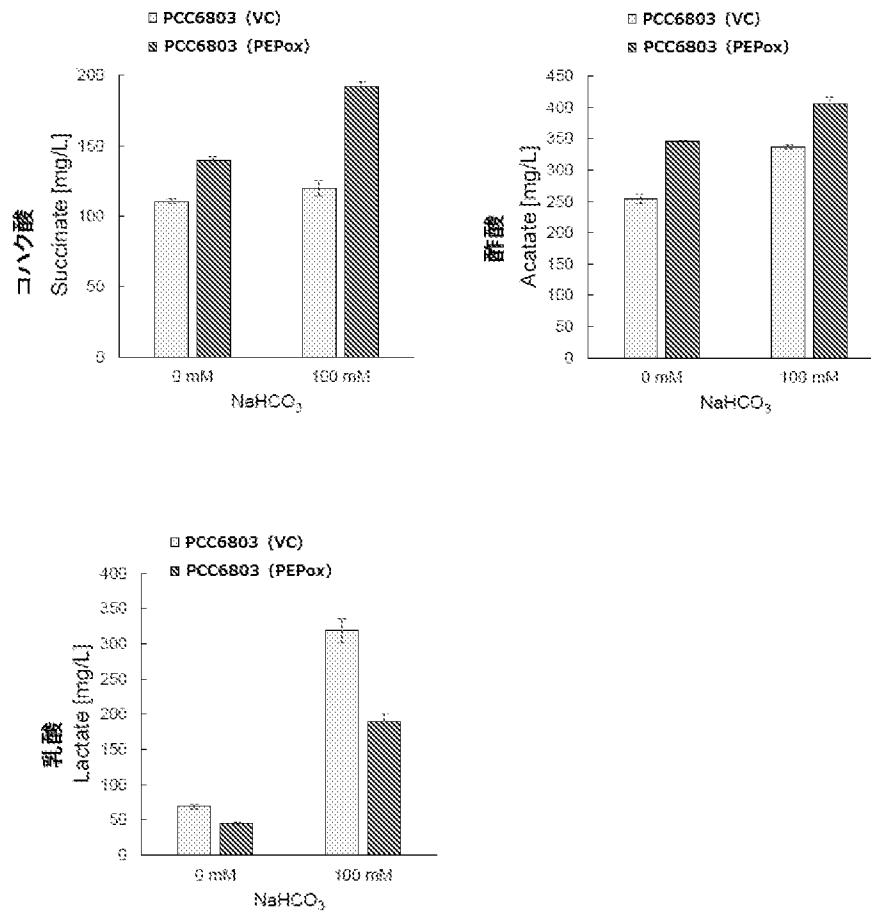
[図6]



コハク酸生産の代謝経路

[図7]

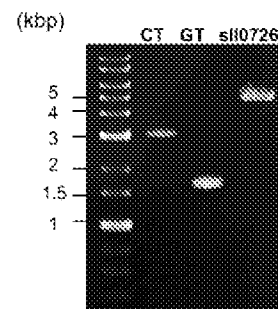
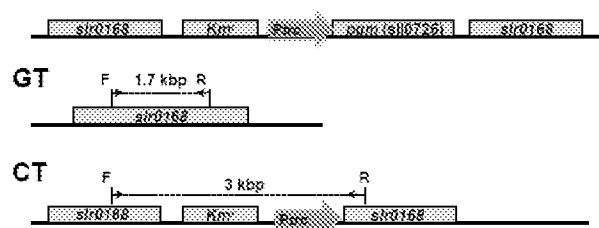
PEP carboxylase過剰発現株における有機酸生産



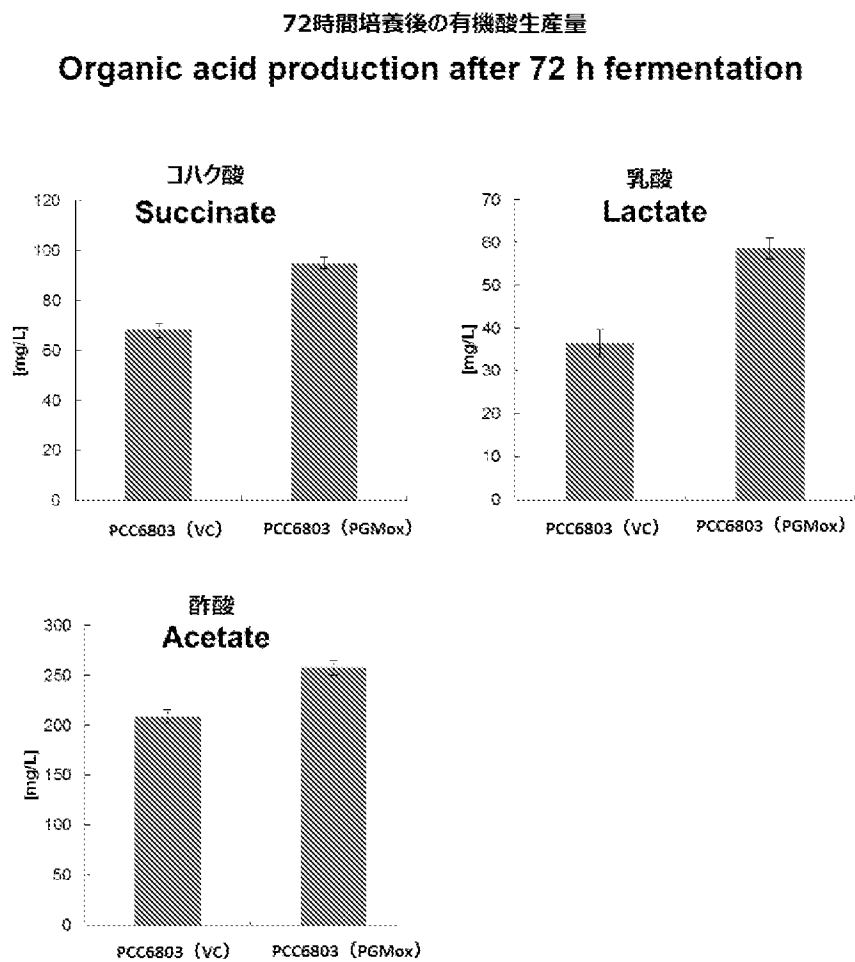
[図8]

*pgm*遺伝子 (*sl10726*) を過剰発現する組換え体 (*Synechocystis* sp. PCC6803)

PCC6803 (PGMox) の作製方法

Pgm (*sl10726*)-ox

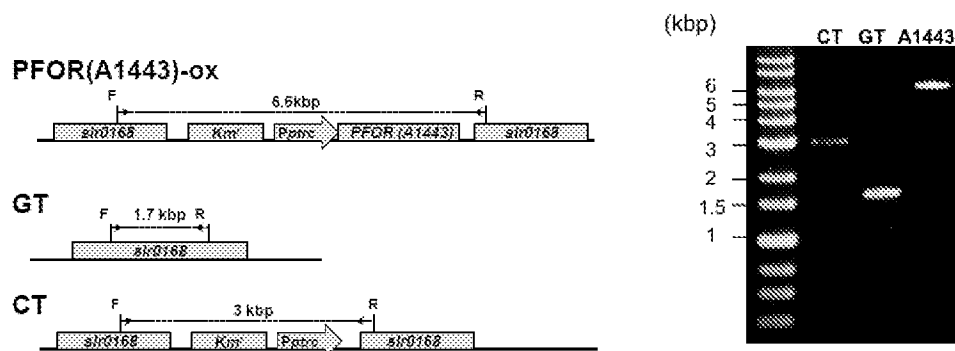
[図9]



[図10]

Synechococcus sp. PCC7002由来PFOR遺伝子(A1443)を過剰発現する組換え体
(*Synechocystis* sp. PCC6803)

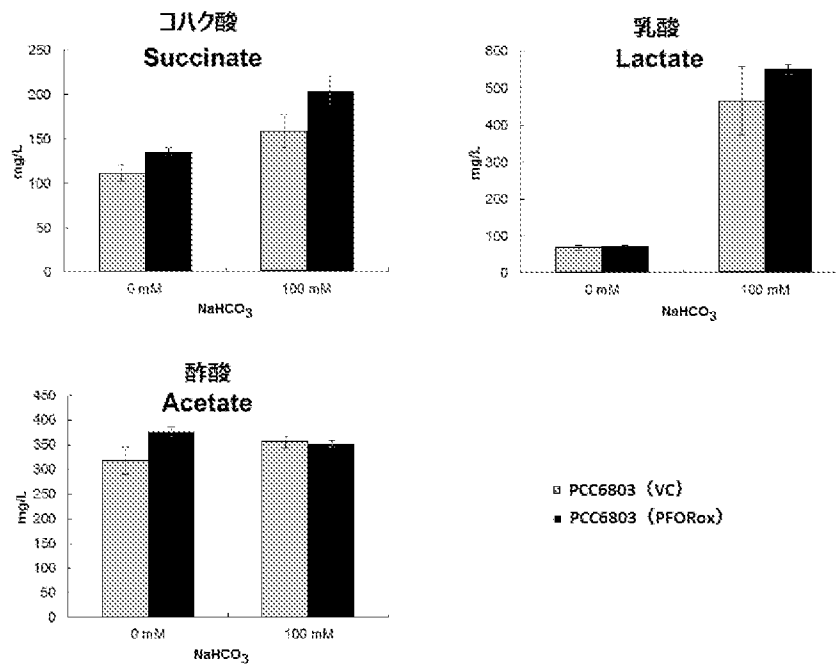
PCC6803 (PFORox) の作製方法



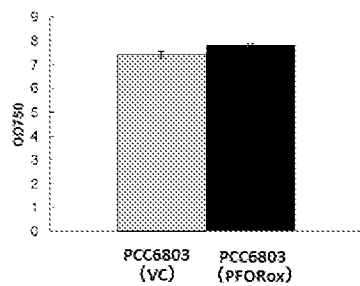
[図11]

72時間培養後の有機酸生産量

(A) Organic acid production after 72 h fermentation

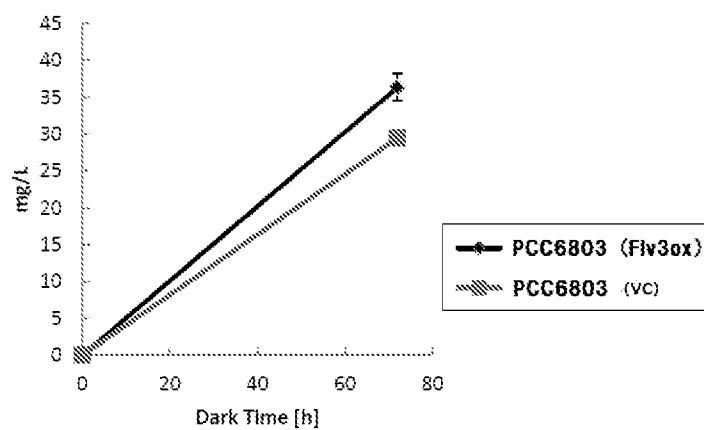


(B) Cell concentration

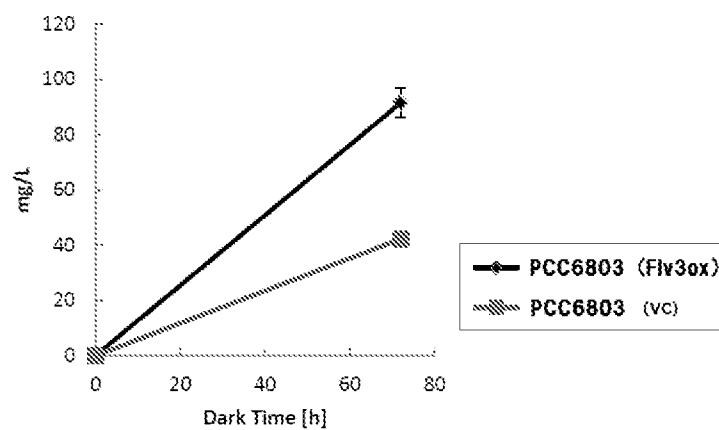


[図12]

乳酸 Lactate

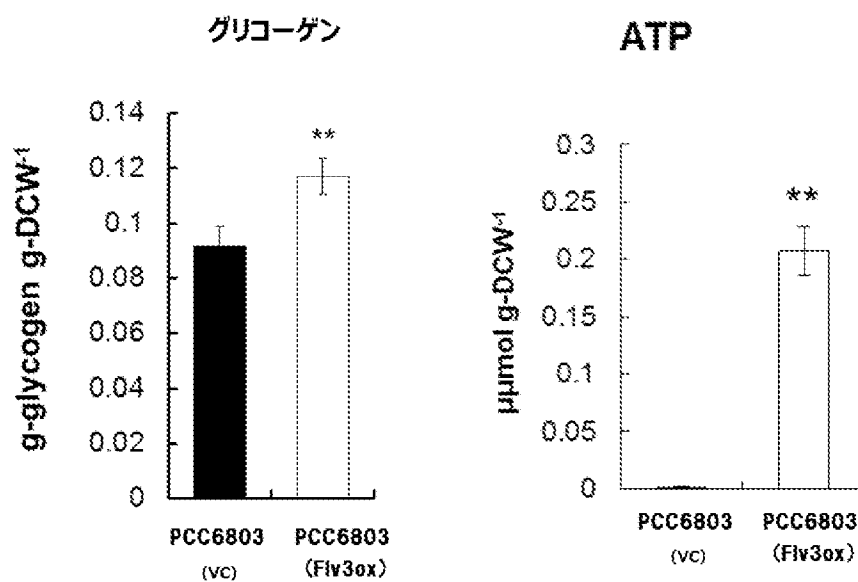


コハク酸 Succinate

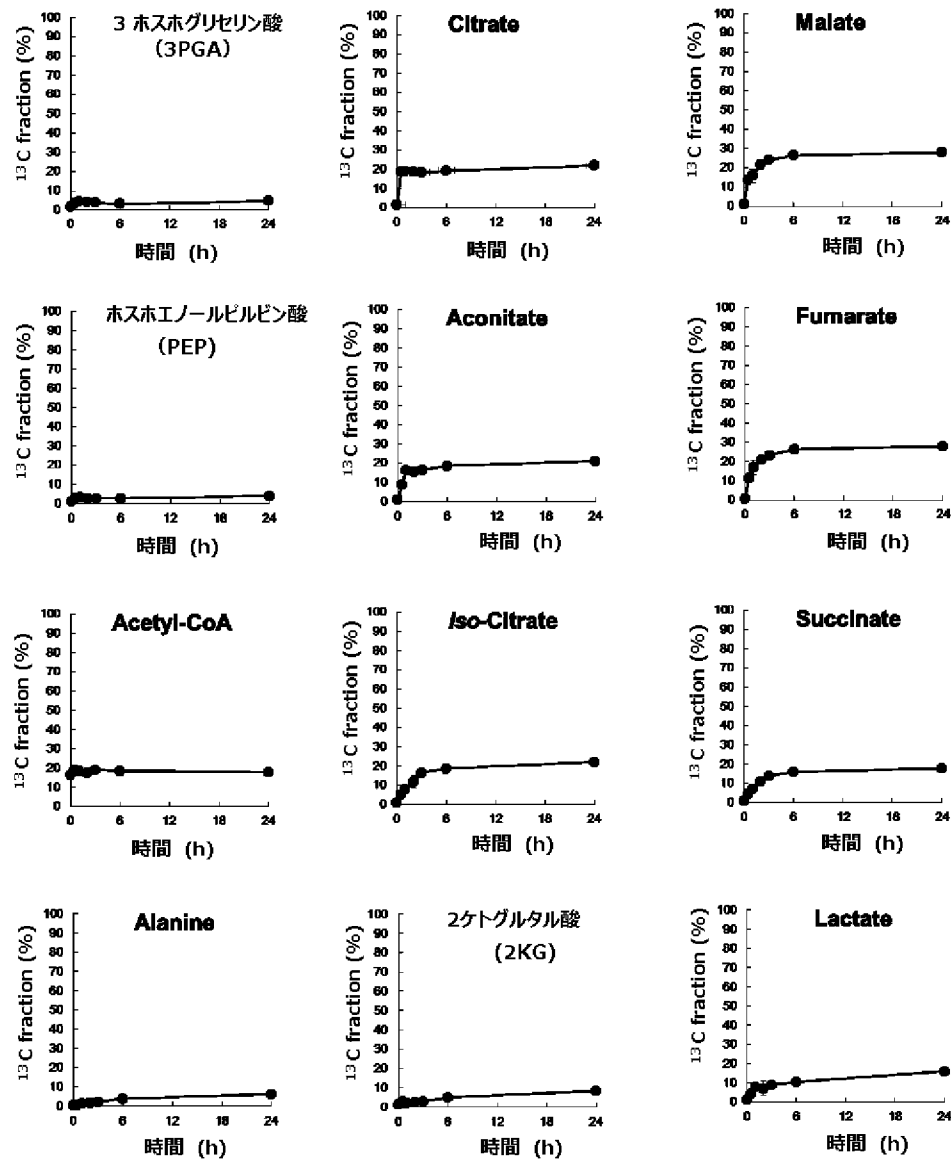


[図13]

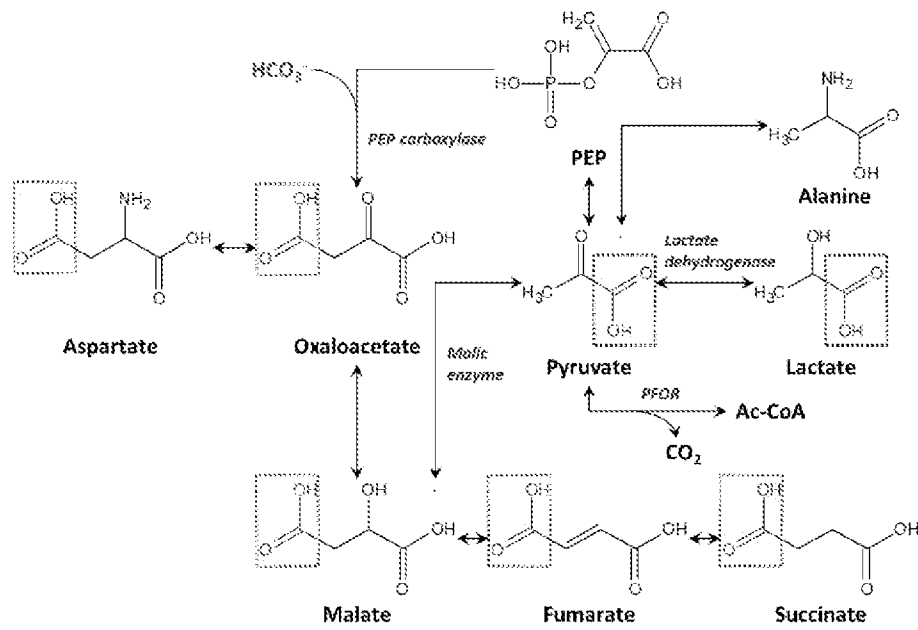
Flv3 過剰発現によるグリコーゲン及びATP蓄積量



[図14]

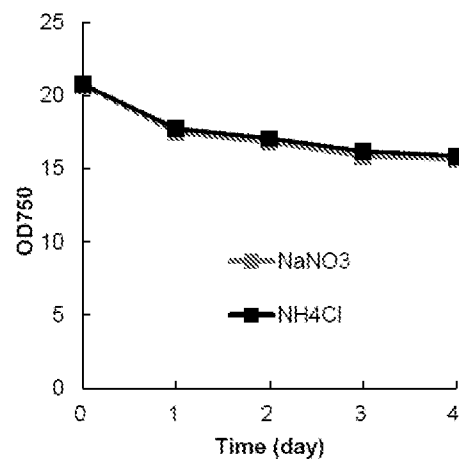


[図15]

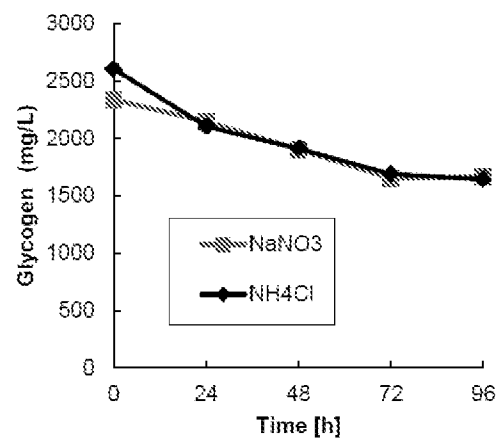


[図16]

(A) 細胞密度 Cell conc.

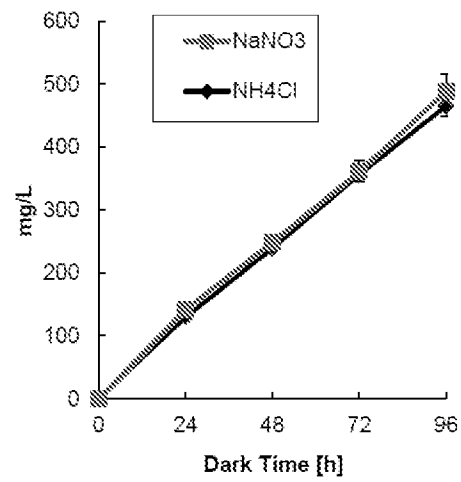


(B) グリコーゲン Glycogen

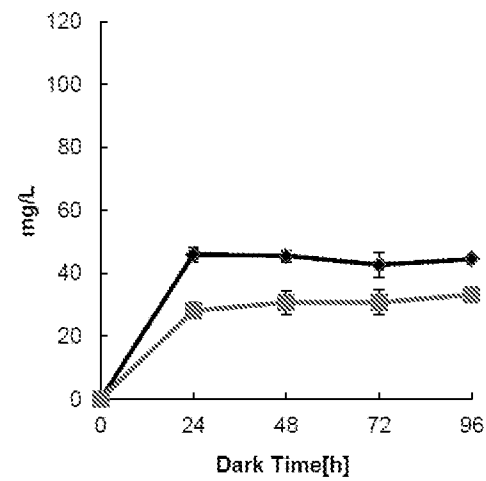


[図17]

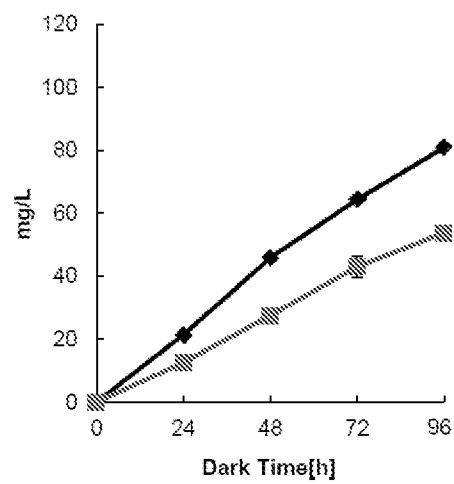
(A) 酢酸 Acetate



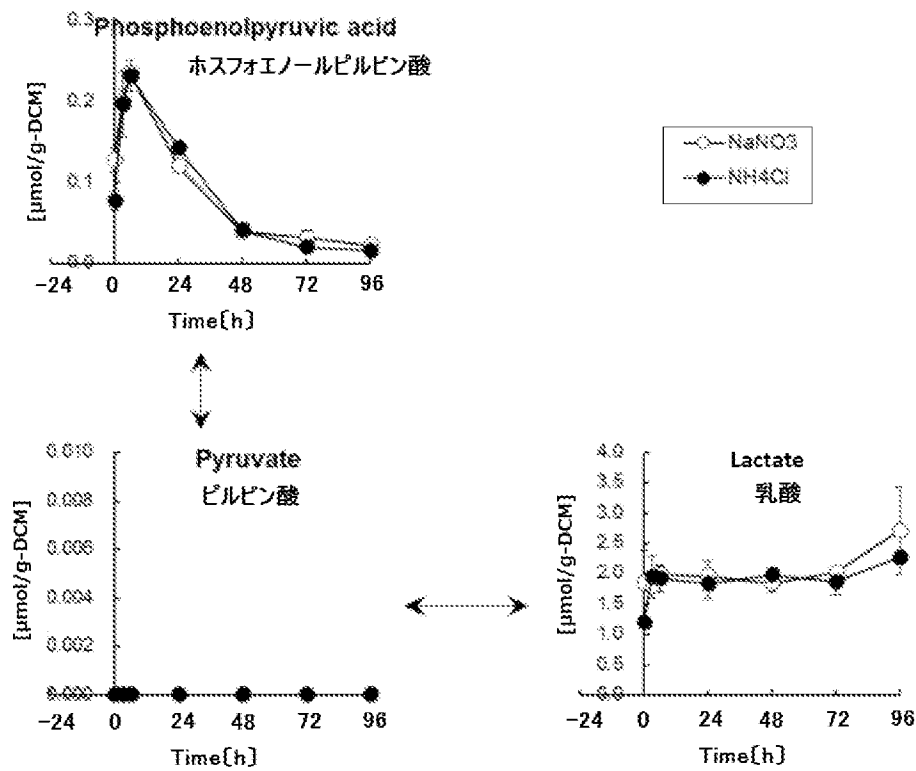
(B) 乳酸 Lactate



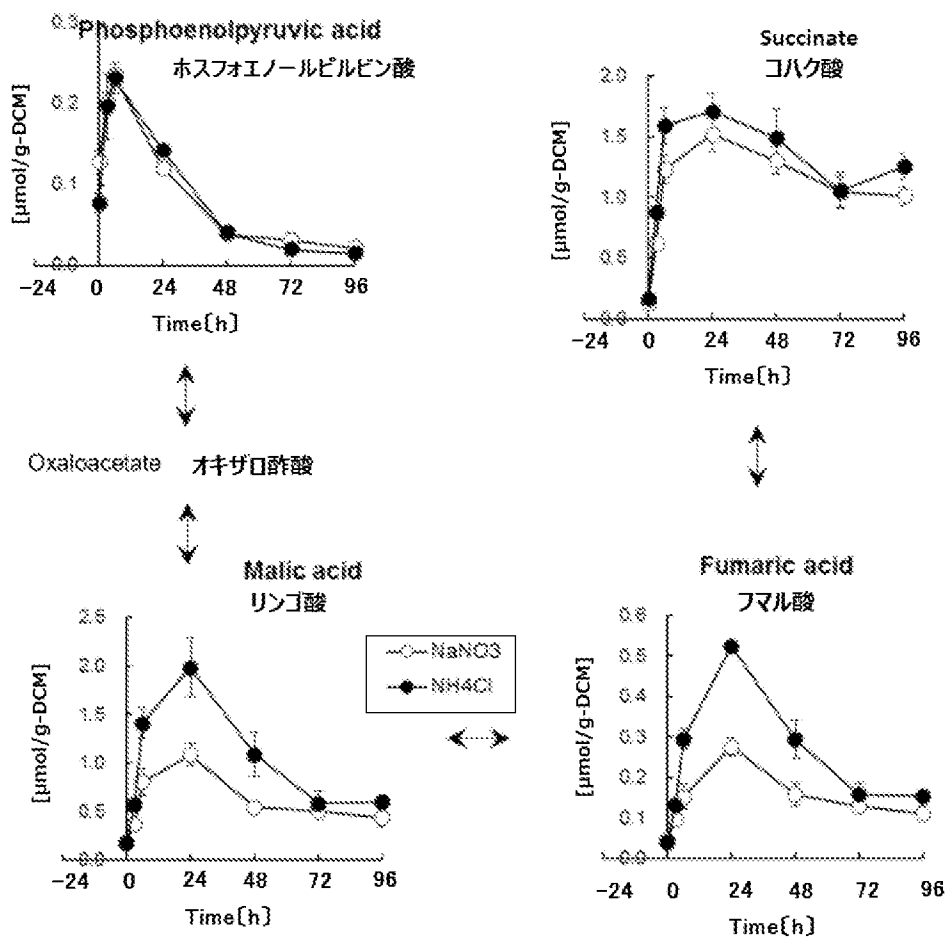
(C) コハク酸 Succinate



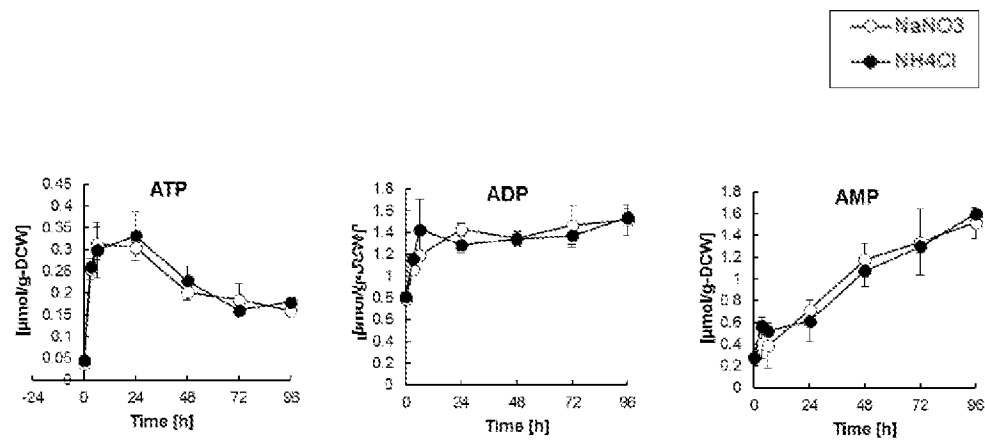
[図18]



[図19]



[図20]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/061216

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P7/40(2006.01)i, C12N1/13(2006.01)i, C12P7/44(2006.01)i, C12P7/46
(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)n, C12N15/09(2006.01)n

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12P7/40, C12N1/13, C12P7/44, C12P7/46, C12N1/21, C12N15/09

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2016	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2016

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), PubMed, WPIDS/WPIX(STN), DWPI(Thomson Innovation)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	HASUNUMA T., et al., Overexpression of <i>flv3</i> improves photosynthesis in the cyanobacterium <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803 by enhancement of alternative electron flow, Biotechnology for Biofuels, 2014.12.31, 7:493, pp. 1-10, Abstract, Fig. 6, p. 8 ' ¹³ C-labeling experiment'	1-3, 5-8, 15-23/1-9, 11, 13, 15, 16
P, X/P, Y	JP 2015-073469 A (Kobe University), 20 April 2015 (20.04.2015), examples; fig. 5 (Family: none)	1-3, 5-8, 15-23/1-9, 11, 13, 15, 16

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

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
29 June 2016 (29.06.16)

Date of mailing of the international search report
12 July 2016 (12.07.16)

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

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/061216

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	HOLLINSHEAD W. D., et al., Boosting D-lactate production in engineered cyanobacteria using sterilized anaerobic digestion effluents, Bioresource Technology, 2014.07.10, Vol. 169, pp. 462-467, Abstract, pp. 463-464 '2.4. Validation of organic carbon utilization by the engineered strain'	1-3,5-8,15/ 1-9,11,13, 15,16
X/Y	JP 2010-507369 A (Arizona Board of Regents, for and on behalf of Arizona State University), 11 March 2010 (11.03.2010), abstract; claims 1, 2, 14, 15, 39; paragraph [0022] & US 2011/0053216 A1 abstract; claims 1, 2, 14, 15, 39; paragraph [0022] & WO 2008/130437 A2 & EP 2087096 A & CN 101617039 A & KR 10-2009-0129393 A	10,21,23/ 1-9,11,13, 15,16
X/Y	GUTEKUNST K., et al., The bidirectional NiFe-hydrogenase in <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803 is reduced by flavodoxin and ferredoxin and is essential under mixotrophic, nitrate-limiting conditions, J Biol Chem., 2013.12.05, Vol. 289, No. 4, pp. 1930-1937, Fig. 4, Fig. 5A, Fig. 5B	12,21,23/ 1-9,11,13, 15,16
X/Y	LIAN L., et al., Role of two phosphohexomutase genes in glycogen synthesis in <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803, Chin Sci Bull., 2013.12, Vol. 58, No. 36, pp. 4616-4621, Abstract, Fig. 5	14,21,23/ 1-9,11,13, 15,16
Y	CHI Z., et al., Selection of microalgae and cyanobacteria strains for bicarbonate-based integrated carbon capture and algae production system, Appl Biochem Biotechnol., 2013.10.04, Vol. 172, pp. 447-457, Abstract, Introduction, Results	1-9,11,13, 15,16
Y	CHI Z., et al., Bicarbonate-based integrated carbon capture and algae production system with alkalihalophilic cyanobacterium, Bioresource Technology, 2013.02.09, Vol. 133, pp. 513-521, entire text, particularly, Abstract	1-9,11,13, 15,16
Y	CHI Z., et al., Bicarbonate produced from carbon capture for algae culture, Trends in Biotechnology, 2011.11, Vol. 29, No. 11, pp. 537-541, entire text, particularly, Abstract	1-9,11,13, 15,16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/061216

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, Y	OSANAI T., et al., Genetic manipulation of a metabolic enzyme and a transcriptional regulator increasing succinate excretion from unicellular cyanobacterium, <i>Frontiers in Microbiology</i> , 2015.10.06, Vol. 6, Article 1064 (pp. 1-10), Figs. 1-7	1-9, 11, 13, 15, 16
Y	ANGER MAYR S. A., et al., Exploring metabolic engineering design principles for the photosynthetic production of lactic acid by <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803, <i>Biotechnology for Biofuels</i> , 2014.06, 7:99, pp. 1-15, Abstract	1-9, 11, 13, 15, 16
A	WO 2012/040698 A2 (MONTANA STATE UNIVERSITY), 29 March 2012 (29.03.2012), entire text & US 2013/0295623 A1 & EP 2619304 A	1-23

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12P7/40(2006.01)i, C12N1/13(2006.01)i, C12P7/44(2006.01)i, C12P7/46(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)n, C12N15/09(2006.01)n

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12P7/40, C12N1/13, C12P7/44, C12P7/46, C12N1/21, C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2016年
日本国実用新案登録公報	1996-2016年
日本国登録実用新案公報	1994-2016年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), PubMed, WPIDS/WPIX (STN), DWPI (Thomson Innovation)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X / Y	HASUNUMA T., et al., Overexpression of <i>flv3</i> improves photosynthesis in the cyanobacterium <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803 by enhancement of alternative electron flow, Biotechnology for Biofuels, 2014.12.31, 7:493, pp. 1-10, Abstract, Fig. 6, p. 8 「 ¹³ C-labeling experiment」等	1-3, 5-8, 15-23/ 1-9, 11, 13, 15, 16

☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

29.06.2016

国際調査報告の発送日

12.07.2016

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鈴木 崇之

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

4 B

4 1 5 2

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
P, X / P, Y	JP 2015-073469 A (国立大学法人神戸大学) 2015.04.20, 実施例、図5等 (ファミリーなし)	1-3, 5-8, 15-23/ 1-9, 11, 13, 15, 16
X/ Y	HOLLINSHEAD W. D., et al., Boosting D-lactate production in engineered cyanobacteria using sterilized anaerobic digestion effluents, Bioresource Technology, 2014.07.10, Vol. 169, pp. 462-467, Abstract, pp. 463-464 「2.4. Validation of organic carbon utilization by the engineered strain」等	1-3, 5-8, 15/ 1-9, 11, 13, 15, 16
X/ Y	JP 2010-507369 A (アリゾナ ボード オブ リージェンツ フォー ー アンド オン ビハーフ オブ アリゾナ ステイト ユニバー シティ) 2010.03.11, 要約、請求項1、2、14、15及び39、[0022]等 & US 2011/0053216 A1, Abstract, Claims 1, 2, 14, 15, and 39, [0022], etc. & WO 2008/130437 A2 & EP 2087096 A & CN 101617039 A & KR 10-2009-0129393 A	10, 21, 23/ 1-9, 11, 13, 15, 16
X/ Y	GUTEKUNST K., et al., The bidirectional NiFe-hydrogenase in <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803 is reduced by flavodoxin and ferredoxin and is essential under mixotrophic, nitrate-limiting conditions, J Biol Chem., 2013.12.05, Vol. 289, No. 4, pp. 1930-1937, Fig. 4, Fig. 5A, Fig. 5B 等	12, 21, 23/ 1-9, 11, 13, 15, 16
X/ Y	LIAN L., et al., Role of two phosphohexomutase genes in glycogen synthesis in <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803, Chin Sci Bull., 2013.12, Vol. 58, No. 36, pp. 4616-4621, Abstract, Fig. 5	14, 21, 23/ 1-9, 11, 13, 15, 16
Y	CHI Z., et al., Selection of microalgae and cyanobacteria strains for bicarbonate-based integrated carbon capture and algae production system, Appl Biochem Biotechnol., 2013.10.04, Vol. 172, pp. 447-457, Abstract, Introduction, Results 等	1-9, 11, 13, 15, 16

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	CHI Z., et al., Bicarbonate-based integrated carbon capture and algae production system with alkalihalophilic cyanobacterium, Bioresource Technology, 2013.02.09, Vol. 133, pp. 513-521, 全文、特に Abstract	1-9, 11, 13, 15, 16
Y	CHI Z., et al., Bicarbonate produced from carbon capture for algae culture, Trends in Biotechnology, 2011.11, Vol. 29, No. 11, pp. 537-541, 全文、特に Abstract	1-9, 11, 13, 15, 16
P, Y	OSANAI T., et al., Genetic manipulation of a metabolic enzyme and a transcriptional regulator increasing succinate excretion from unicellular cyanobacterium, Frontiers in Microbiology, 2015.10.06, Vol. 6, Article 1064 (pp. 1-10), Figs. 1-7 等	1-9, 11, 13, 15, 16
Y	ANGER MAYR S. A., et al., Exploring metabolic engineering design principles for the photosynthetic production of lactic acid by <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803, Biotechnology for Biofuels, 2014.06, 7:99, pp. 1-15, Abstract 等	1-9, 11, 13, 15, 16
A	WO 2012/040698 A2 (MONTANA STATE UNIVERSITY) 2012.03.29, 全文 & US 2013/0295623 A1 & EP 2619304 A	1-23