

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2022年12月1日(01.12.2022)



(10) 国際公開番号

WO 2022/250074 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 1/13 (2006.01) C12N 15/31 (2006.01)
C12N 1/12 (2006.01) C12P 1/00 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)

慧一(KOJIMA Keiichi); 〒7008530 岡山県岡山市北区津島中一丁目1番1号 国立大学法人岡山大学内 Okayama (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2022/021364

(22) 国際出願日: 2022年5月25日(25.05.2022)

(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 2021-089800 2021年5月28日(28.05.2021) JP

(71) 出願人: 国立大学法人岡山大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION OKAYAMA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒7008530 岡山県岡山市北区津島中一丁目1番1号 Okayama (JP).

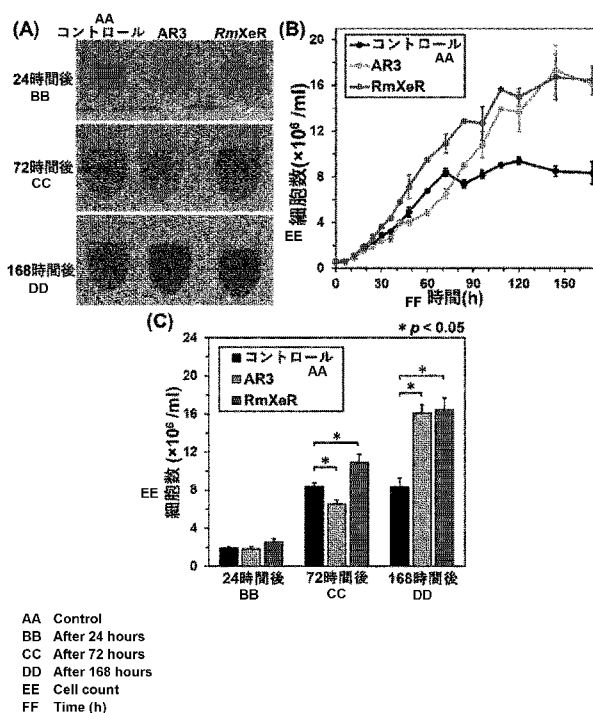
(72) 発明者: 須藤 雄気(SUDO Yuki); 〒7008530 岡山県岡山市北区津島中一丁目1番1号 国立大学法人岡山大学内 Okayama (JP). 小島

(74) 代理人: 特許業務法人須磨特許事務所(SUMA PATENT OFFICE, P.C.); 〒1050004 東京都港区新橋5丁目19番15-501 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(54) Title: PHOTOSYNTHETIC ORGANISM TRANSFORMANT AND USE THEREOF

(54) 発明の名称: 光合成生物の形質転換体及びその用途



(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing a novel method that can control the growth of a photosynthetic organism and providing a use of said method. This problem is solved by providing a photosynthetic organism transformant that expresses a proton pump rhodopsin, and providing a method for controlling the growth of a photosynthetic organism, the method comprising (1) a step of obtaining a transformant that expresses a proton pump rhodopsin and (2) a step of driving the proton pump rhodopsin by exposing the transformant to light.

(57) 要約: 光合成生物の生育を制御することができる新たな方法とその用途を提供することを課題とし、光合成生物の形質転換体であって、プロトンポンプロドプシンを発現する形質転換体、及び、光合成生物の生育を制御する方法であって、(1) プロトンポンプロドプシンを発現する形質転換体を得る工程、及び、(2) 前記形質転換体に光を照射することにより、前記プロトンポンプロドプシンを駆動する工程、を含む方法を提供することにより上記課題を解決する。

(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))

明 細 書

発明の名称：光合成生物の形質転換体及びその用途

技術分野

[0001] 本発明は、光合成生物の形質転換体及びその用途に関する。

背景技術

[0002] 植物や藻類をはじめとする光合成生物に由来するバイオマス資源は再生可能な資源、特に、化石燃料に代わる再生可能なエネルギー源として注目を集めており、例えば、サトウキビやトウモロコシなどの植物から得られるでん粉をアルコール発酵して得られるバイオエタノール、トウモロコシやナタネなどの植物から得られる油脂を変換して得られるバイオディーゼルなどは、バイオ燃料の主たる原料として利用されている。しかしながら、トウモロコシやサトウキビのように、従来、バイオ燃料の原料として利用されてきた植物の多くは、主に食用としても消費される作物であるところ、近年重要性を増しつつある食糧危機の問題の観点からすれば、食用の作物をバイオ燃料の原料とすることは必ずしも好ましいとは言えない。

[0003] これに対して、植物と同じく、光合成生物の一種である藻類は、バイオ燃料への利用が期待されるトリアシルグリセロールやでん粉などの様々な有用物質を産生し、且つ、サトウキビやトウモロコシなどとは異なり、主に食用として用いられないことから、有力なバイオマスの供給源として期待されている。例えば、藻類の一種であるクラミドモナスは、窒素欠乏条件やリン欠乏条件で培養すると、バイオ燃料の原料となる油脂（トリアシルグリセロール）を蓄積することが知られている。他方、スピルリナ、クロレラ、ユーグレナなどの藻類に見られるように、いくつかの藻類は、種々の生理機能を発揮する生理活性物質を産生することが明らかとなっており、藻類のバイオマス資源としての利用は、エネルギー分野に限らず、健康食品分野や化粧品分野においても重要性を増してきている。

[0004] しかしながら、多くの藻類は、単位細胞あたりに蓄積できる油脂、でん粉

、生理活性物質などのバイオマスの蓄積量が高くなく、また、増殖速度が遅いため、バイオマスの産生効率が高いとは言えない。そこで、藻類におけるバイオマスの産生効率を高めるための様々な試みが為されており、特に、藻類の品種改良が頻繁に行われている。例えば、特許文献 1 及び非特許文献 1 には、緑藻の一種であるクラミドモナスの形質転換体が開示されている。当該形質転換体は、トリアシルグリセロール合成酵素である D G T T 4 の遺伝子のプロモーター部位に、リン欠乏条件下で発現が上昇することが知られる他の遺伝子である S Q D 2 遺伝子のプロモーターが付加された遺伝子を含む形質転換体であり、リン欠乏条件下において、通常のクラミドモナスよりも多くのトリアシルグリセロールを蓄積することが報告されている。一方、非特許文献 2 には、同じく、クラミドモナスの形質転換体であって、でん粉の生合成に関わる酵素である A D P - グルコースピロホスホリラーゼを欠損させたクラミドモナスの形質転換体が開示されており、当該形質転換体は、窒素欠乏条件において、単位細胞当たりのトリアシルグリセロールの産生量が高いことが開示されている。

[0005] 以上のような形質転換体は、単位細胞当たりのバイオマスの産生量を高めて、バイオマスの産生効率を高めようとするものであるが、バイオマスの産生効率が大きく依存する細胞の生長速度や、単位体積当たりに生育可能な細胞の数の上限、すなわち、飽和細胞密度を高めるものではない。バイオマスの生産に用いることができる時間及び空間は有限であり、光合成生物によるバイオマスの産生効率を高めるためには、単位細胞当たりのバイオマスの産生量を高めるだけでなく、限られた時間の中で可能な限り速く、且つ、限られた空間の中で可能な限り多くの光合成生物を栽培又は培養できる技術の開発が極めて重要である。

[0006] このような課題に対して、細胞の生長速度を増加させ、また、単位体積当たりに生育可能な細胞の数の上限、すなわち、飽和細胞密度を増加させようとする試みも種々為されている。例えば、非特許文献 3 には、クラミドモナスを培養する培地の微量金属イオンの組成を調整することによって、クラミ

ドモナスの細胞数の増加速度及び細胞数の増加が定常状態に達した増殖定常期における単位体積当たりの細胞の数、すなわち飽和細胞密度が高まることが報告されている。しかしながら、培地への物質添加、特に金属イオンの添加は、廃棄物処理・環境問題等への影響が懸念されるとともに、コストの増大にもつながってしまうという課題がある。

[0007] ところで、光合成生物に限らず、生物を構成する最小単位は細胞であり、細胞は細胞膜により内外が隔てられている。細胞内外の物質やイオンの濃度は、膜に埋まったタンパク質（膜タンパク質）によって厳密に制御されており、イオンの濃度のバランスが崩れると、細胞の恒常性（分裂、発生、成長など）が大きく変化する。多種多様なイオンのうち、特に、プロトン（水素イオン： H^+ ）は、地球上で最も多く存在するイオンであり、細胞内外や細胞小器官内のpHを決定づけ、ほぼ全ての生物における生命機能の維持・発現に重要な役割を果たしている。

[0008] 細胞膜を介したプロトン輸送に関与する光受容性の膜タンパク質の一つがロドプシンであり、ヒト等の脊椎動物や細菌などの微生物に分布している。中でも、光を受容して活性化し、細胞の内側から外側へ、又は細胞の外側から内側へ一方向的にプロトンを輸送する働きをするロドプシンは、プロトンポンプロドプシンと呼ばれ、更に詳細には、細胞内から細胞外へプロトンを輸送する働きをするプロトンポンプロドプシンは外向きプロトンポンプロドプシン、細胞外から細胞内へプロトンを輸送する働きをするプロトンポンプロドプシンは内向きプロトンポンプロドプシンと呼ばれる。例えば、高度好塩古細菌由来の膜タンパク質であるアーキロドプシン3（AR3）、及び、海洋真正細菌由来の膜タンパク質であるルブリコッカスマリナスゼノロドプシン（RmXeR）は、レチナールを発色団とし、波長550nm付近に吸収極大を有する緑色の光を受けると、それぞれ細胞内から細胞外へ（AR3を用いた場合）又は細胞外から細胞内へ（RmXeRを用いた場合）プロトンを輸送するプロトンポンプとして機能する（非特許文献4、5）。

[0009] 本出願人及び本発明者らは、プロトンポンプロドプシンを介するプロトン

輸送による細胞内pH制御により、細胞の生命機能を制御できるのではないかという着想に基づき、プロトンポンプロドプシンを発現させたがん細胞において、光を照射してプロトンポンプロドプシンを駆動すると、当該がん細胞の細胞死が惹起又は抑制されることを見出し、特願2020-196718号においてこの知見を開示した。しかしながら、プロトンポンプロドプシンが植物や藻類などの光合成生物の生育に如何なる影響を及ぼすかについては一切知られていない。

[0010] また、上述したとおり、プロトンポンプロドプシンの多くは緑色の光を吸収して活性化し、細胞の内側から外側へ、又は細胞の外側から内側へ一方向的にプロトンを輸送する働きをする膜タンパク質であるが、植物や藻類などの光合成生物の多くは、その外観が緑色であることから分かるとおり、主に、緑色以外の光、より具体的には、青色（波長400～500nm）や赤色（波長600nm～700nm）の光を吸収して生体活動に用いている。このような知見に基づいて、例えば、特許文献2乃至4に見られるとおり、青色や赤色の光を選択的に光合成生物に照射して、その生長を促進しようとする試みは数多く為されているが、本発明者らが知る限りにおいて、緑色（波長500nm～600nm）の光を利用して、光合成生物の生長を促進、又は生育を制御しようとする試みはほとんど為されていない。

先行技術文献

特許文献

[0011] 特許文献1：特開2014-68638号公報

特許文献2：特開2001-86860号公報

特許文献3：特開2020-18210号公報

特許文献4：特開2015-128448号公報

非特許文献

[0012] 非特許文献1：Masako Iwai et al., Plant Biotechnology Journal 2014, 12:808-819.

非特許文献2：Zi Teng Wang et al., EUKARYOT

I C C E L L 2009, 8:1856-1868.

非特許文献3: Janette Kropat et al., The Plant Journal 2011, 66:770-780.

非特許文献4: Yuki Sudo et al., Journal of Biological Chemistry 2013, 288:20624-20632.

非特許文献5: Saki Inoue et al., Physical Chemistry Chemical Physics 2018, 20:3172-3183.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0013] 本発明は、上記従来技術の諸課題を解決するために為されたものであり、光合成生物の生育を制御するための新たな方法とその用途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

- [0014] 本発明者らは、上記課題を解決しようと鋭意研究努力を重ねる過程において、細胞外から細胞内へプロトンを送る働きをする内向きプロトンポンプロドプシンの一種であるルブリコッカスマリナスゼノロドプシン (RmXeR) を、光合成生物のモデルとして斯界で広く用いられているクラミドモナスの葉緑体に発現させ、RmXeRを駆動する光を照射したところ、驚くべきことに、RmXeRを発現させたクラミドモナスの生長が顕著に促進されることを見出した。そこで、本発明者らは、RmXeRとは反対に、細胞内から細胞外へプロトンを送る働きをする外向きプロトンポンプロドプシンの一種であるアーキロドプシン3 (AR3) をクラミドモナスの葉緑体に発現させ、AR3を駆動する光を照射したところ、RmXeRを発現させた場合とは反対に、AR3を発現させたクラミドモナスの生長が顕著に抑制されることを見出した。さらに驚くべきことに、RmXeR又はAR3を発現させた、いずれのクラミドモナスにおいても、その増殖が定常状態に達し

た増殖定常期における単位体積当たりの細胞の数、すなわち飽和細胞密度が、プロトンポンプロドプシンを発現していない通常のクラミドモナスを同じ条件で培養した場合と比較して遥かに高まっていた。これらの結果は、光合成生物にプロトンポンプロドプシンを発現させ、プロトンポンプロドプシンを駆動する光を照射して、細胞内pH環境、より好適には葉緑体内のpH環境を操作することにより、光合成生物の生育を制御できることを物語っており、今までに例を見ない画期的な知見である。

[0015] すなわち、本発明は、以上のような本発明者らが新たに見出した知見に基づくものであり、光合成生物の形質転換体であって、光によって駆動するプロトンポンプロドプシンを発現する形質転換体を提供することにより上記課題を解決するものである。プロトンポンプロドプシンを発現する光合成生物の形質転換体に、プロトンポンプロドプシンを駆動する光を照射することによって、その生育を制御することができる。

[0016] 好適な一態様において、形質転換体が発現する前記プロトンポンプロドプシンは、細胞外から細胞内へプロトンを輸送する内向きプロトンポンプロドプシンである。後述する実験例に示すとおり、内向きプロトンポンプロドプシンを発現する光合成生物の形質転換体に前記内向きプロトンポンプロドプシンを駆動する光を照射して、内向きプロトンポンプロドプシンを駆動すると、当該形質転換体の生長を促進、すなわち、生長速度を速めることができる。また、単位体積当たりに生育可能な細胞の数の上限、すなわち飽和細胞密度を高めることができる。

[0017] 一方、本発明の他の好適な一態様において、前記プロトンポンプロドプシンは、細胞内から細胞外へプロトンを輸送する外向きプロトンポンプロドプシンである。後述する実験例に示すとおり、外向きプロトンポンプロドプシンを発現する光合成生物の形質転換体に前記外向きプロトンポンプロドプシンを駆動する光を照射して、外向きプロトンポンプロドプシンを駆動すると、当該形質転換体の生長を抑制、すなわち、生長速度を遅くすることができる。また、単位体積当たりに生育可能な細胞の数の上限、すなわち飽和細胞

密度を高めることができる。

[0018] また、好適な更に他の一態様において、前記形質転換体は、細胞内から細胞外へプロトンを送る外向きプロトンポンププロドプシンと、細胞外から細胞内へプロトンを送る内向きプロトンポンププロドプシンの双方を発現する形質転換体である。形質転換体に内向きプロトンポンププロドプシン及び外向きプロトンポンププロドプシンの双方を発現させた場合には、照射する光の波長を適宜選択することによって、形質転換体の生長の促進又は抑制を自在に行い得るという利点が得られる。すなわち、内向きプロトンポンププロドプシンを駆動する波長の光を照射すれば形質転換体の生長を促進することができるし、一方、外向きプロトンポンププロドプシンを駆動する波長の光を照射すれば形質転換体の生長を抑制することができる。

[0019] 以上のとおり、光合成生物を、プロトンポンププロドプシンを発現可能に形質転換し、該プロトンポンププロドプシンを駆動する光を照射することによって、光合成生物の生育を制御することができる。すなわち、本発明は他の一側面において、光合成生物の生育を制御する方法であって、

(1) 光合成生物の形質転換体であって、プロトンポンププロドプシンを発現する形質転換体を得る工程、及び、

(2) 前記形質転換体に光を照射することにより、前記プロトンポンププロドプシンを駆動する工程、

を含むことを特徴とする方法を提供することにより、上記課題を解決するものである。

[0020] また、本発明に係る形質転換体又は光合成生物の生育を制御する方法によれば、有用なバイオマスを生産する光合成生物の生長を促進又は抑制することができるとともに、光合成生物の高密度培養が可能となるので、光合成生物を利用したバイオマスの製造の効率化が期待できる。すなわち、本発明は、更に他の一側面において、バイオマスの製造方法であって、

(A) 光合成生物の生育を制御する上記方法を用いて光合成生物を培養又は栽培する工程、及び

(B) 前記光合成生物からバイオマスを回収する工程、
を含む、バイオマスの製造方法をも提供するものである。

発明の効果

[0021] 本発明の形質転換体又は光合成生物の生育を制御する方法によれば、光合成生物の生長を光により促進又は抑制することができるとともに、光合成生物の高密度培養が可能となる。また、本発明のバイオマスの製造方法によれば、光合成生物に由来するバイオマスを効率的に製造することができる。

図面の簡単な説明

[0022] [図1]実施例で用いたクラミドモナスの細胞における、プロトンポンプロドプシン遺伝子導入のための葉緑体ゲノム改変方法の模式図である。

[図2]クラミドモナス細胞における各ロドプシンの発現を示す図である。

[図3]可視光依存的なクラミドモナス細胞の細胞数とその経時変化を示す図である。

[図4]可視光照射によるクラミドモナス細胞の形態への影響を調べた結果を示す図である。なお、図4 Aにおいて、スケールバーは12.5 μm を示す。

[図5]可視光照射によるクラミドモナスの乾燥重量への影響を調べた結果を示す図である。

[図6]可視光照射によるクラミドモナスの油滴（脂肪滴）形成能への影響を調べた結果を示す図である。なお、図6 Aにおいて、スケールバーは12.5 μm を示す。

[図7]海洋真正細菌 *Rubricoccus marinus* 由来の RmXeR のアミノ酸配列と、当該 RmXeR をコードするクラミドモナスの葉緑体ゲノムのコドン使用頻度に最適化した塩基配列を示す図である。

[図8]古細菌 *Halorubrum sodomense* 由来の AR3 のアミノ酸配列と、当該 AR3 をコードするクラミドモナスの葉緑体ゲノムのコドン使用頻度に最適化した塩基配列を示す図である。

[図9]波長500nm付近に吸収極大波長を有するAR3の変異体のアミノ酸配列を示す図である。なお、アミノ酸配列中の下線は、図8及び配列表の配

列番号 2 に示されるアミノ酸配列を有する野生型の A R 3 から変異したアミノ酸を示している。

発明を実施するための形態

- [0023] 以下、本発明について、より詳細に説明する。
- [0024] 本発明に係る形質転換体は、光合成生物の形質転換体であって、光によって駆動するプロトンポンプロドプシンを発現する形質転換体である。まず、本発明に係る形質転換体が発現するプロトンポンプロドプシンについて説明する。
- [0025] 本明細書において、「プロトンポンプロドプシン」とは、細胞膜に存在する膜タンパク質であり、光を受容することによって駆動され、細胞内から細胞外へ又は細胞外から細胞内へ、一方向にプロトンを輸送する働きをする膜タンパク質である。プロトンポンプロドプシンのうち、細胞内から細胞外へプロトンを輸送する働きをするプロトンポンプロドプシンを外向きプロトンポンプロドプシンといい、反対に、細胞外から細胞内へプロトンを輸送する働きをするプロトンポンプロドプシンを内向きプロトンポンプロドプシンという。本明細書において、「プロトンポンプロドプシン」という場合には、特に断らない限り、「外向きプロトンポンプロドプシン」及び「内向きプロトンポンプロドプシン」の双方を意味する。
- [0026] 後述する実験例に示すとおり、光合成生物、好ましくは、光合成生物の葉緑体に内向きプロトンポンプロドプシンを発現させた状態で、当該光合成生物に、その内向きプロトンポンプロドプシンを駆動する光を照射することにより、当該光合成生物の生長を促進、すなわち、生長速度を速めることができ、また、単位体積あたりに生育可能な細胞の数の上限、すなわち、飽和細胞密度を高めることができる。本発明に用いることができる内向きプロトンポンプロドプシンの種類に特段の制限はないが、光合成生物による吸収及び／又は利用が少ないと考えられる波長 4 5 0 n m 乃至 6 5 0 n m、好ましくは波長 4 7 0 n m 乃至 6 2 0 n m、より好ましくは波長 4 9 0 n m 乃至 5 9 0 n m の波長領域に吸収極大波長を有する内向きプロトンポンプロドプシン

であることが好ましい。このような内向きプロトンポンプロドプシンとしては、例えば、海洋真正細菌 *Rubricoccus marinus* 由来のルブリコッカスマリナスゼノロドプシン (RmXeR) を好適に用いることができる。

[0027] なお、本明細書において、ルブリコッカスマリナスゼノロドプシン (RmXeR) とは、配列表の配列番号 1 及び図 7 で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質、および、配列表の配列番号 1 及び図 7 で表されるアミノ酸配列と実質的に同一なアミノ酸配列を有するタンパク質のことである。ここで、配列表の配列番号 1 及び図 7 で表されるアミノ酸配列と実質的に同一なアミノ酸配列を有するタンパク質とは、配列表の配列番号 1 及び図 7 で表されるアミノ酸配列と配列上の相違する点が比較的少ないアミノ酸配列を有するタンパク質であり、配列表の配列番号 1 及び図 7 で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質と同様に、レチナールを発色団とし、吸収極大波長が可視光領域（およそ 400～600 nm）にあり、このような可視光を受容して駆動され、細胞外から細胞内にプロトンを輸送する性質を示すタンパク質を意味する。例えば、配列表の配列番号 1 及び図 7 のアミノ酸配列を構成する全アミノ酸のうち、1 個もしくは複数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加された変異が生じたアミノ酸配列を有するタンパク質をいう。ここで、複数個とはアミノ酸配列を構成する全アミノ酸の数の例えば 10 %以内の数であり、より好ましくは 5 %以内の数、さらに好ましくは 3 %以内の数、よりさらに好ましくは 1 %以内の数である。上記アミノ酸配列の置換、欠失、挿入および／または付加は、タンパク質をコードする核酸に元々存在した変異であってもよく、また、該核酸を当該技術分野で公知の手法によって改変することによって新たに導入したものであってもよい。

[0028] 他方、後述する実験例に示すとおり、光合成生物、より好ましくは光合成生物の葉緑体に外向きプロトンポンプロドプシンを発現させた状態で、当該光合成生物に、その外向きプロトンポンプロドプシンを駆動する光を照射することにより、当該光合成生物の生長を抑制、すなわち、生長速度を遅くす

ることができ、また、単位体積あたりに生育可能な細胞の数の上限、すなわち、飽和細胞密度を高めることができる。本発明に用いることができる外向きプロトンポンプロドプシンの種類に特段の制限はないが、光合成生物による吸収及び／又は利用が少ないと考えられる波長450nm乃至650nm、好ましくは波長470nm乃至620nm、より好ましくは波長490nm乃至590nmの波長領域に吸収極大波長を有する外向きプロトンポンプロドプシンであることが好ましい。このような外向きプロトンポンプロドプシンとしては、例えば、古細菌*Halorubrum sodomense*の持つアーキロドプシン3（AR3）を好適に用いることができる。

[0029] なお、本明細書において、「アーキロドプシン3（AR3）」とは、配列表の配列番号2及び図8で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質、および、配列表の配列番号2及び図8で表されるアミノ酸配列と実質的に同一なアミノ酸配列を有するタンパク質を意味する。ここで、配列表の配列番号2及び図8で表されるアミノ酸配列と実質的に同一なアミノ酸配列を有するタンパク質とは、配列表の配列番号2及び図8で表されるアミノ酸配列と配列上相違する点が比較的少ないアミノ酸配列を有するタンパク質であり、配列表の配列番号2及び図8で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質と同様に、レチナールを発色団とし、吸収極大波長が可視光領域（約400～600nm）にあり、このような波長域の可視光を受容して駆動され、細胞内から細胞外にプロトンを輸送する性質を示すタンパク質を意味する。例えば、配列表の配列番号2及び図8で表されるアミノ酸配列を構成する全アミノ酸のうち、1個もしくは複数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加された変異が生じたアミノ酸配列を有するタンパク質をいう。ここで、複数個とはアミノ酸配列を構成する全アミノ酸の数の例えば10%以内の数であり、より好ましくは5%以内の数、さらに好ましくは3%以内の数、よりさらに好ましくは、1%以内の数である。上記アミノ酸配列の置換、欠失、挿入および／または付加は、タンパク質をコードする核酸に元々存在した変異であってもよく、また、該核酸を当該技術分野で公知の手法によって改変

することによって新たに導入したものであってもよい。

[0030] なお、配列表の配列番号2及び図8で表されるアミノ酸配列と実質的に同一なアミノ酸配列を有するタンパク質としては、例えば、Yuki Sudo et al., Journal of Biological Chemistry 2013, 288(28), 20624-20632に記載されている、配列表の配列番号5及び図9で表されるアミノ酸配列を有するAR3変異体（同文献において、「the mutant AR3」）が例示される。当該AR3変異体は、波長500nm付近に吸収極大波長を有する外向きプロトンポンプロドプシンであり、波長550nm付近に吸収極大波長を有する野生型のAR3やRmXeRよりも短波長側の光によって駆動されるという特徴を有するものである。

[0031] 一方、本明細書において「光合成生物」とは光合成を行う生物、すなわち、光のエネルギーを生物学的に利用できるエネルギーに変換する光合成を行う生物を意味し、主として、酸素発生型の光合成を行う光合成生物を指す。酸素発生型の光合成を行う光合成生物とは、具体的には陸上植物と藻類であり、陸上植物には、コケ植物門の植物、シダ植物門の植物、裸子植物門の植物、被子植物門の植物が含まれる。一方、藻類とは、酸素発生型の光合成を行う光合成生物のうち、陸上植物を除いたものの総称であり、そのほとんどが水生の光合成生物である。藻類には、核と葉緑体を有する真核藻類と核と葉緑体を持たない原核藻類が含まれ、真核藻類としては、例えば、緑藻、紅藻、不等毛藻、ユーグレナ藻、渦鞭毛藻、灰色藻、クリプト藻、ハプト藻、クロララクニオン藻等が挙げられる。他方、原核藻類としては、例えば、藍藻（シアノバクテリア）が挙げられる。なお、真核生物に取り込まれた藍藻（シアノバクテリア）が葉緑体の起源となり、真核藻類を含む真核光合成生物が誕生したと考えられている。このように真核藻類と原核藻類は、分類上異なるものの共通する性質を有している。

[0032] 本発明に用いられる光合成生物は、以上説明したような光合成生物であれば基本的にどのようなものであっても良く、その種類に特段の制限はないが

、形質転換のし易さや、栽培・培養のし易さという観点からは、微細藻類が特に好適に用いられる。ここで「微細藻類」とは、上記藻類のうち、大きさが数 μm ～数十 μm 程度の小さな藻類であり、主として単細胞性のものを指す。微細藻類の中には生長速度が速く、培養が容易なものが多い。また、高等植物よりも高い効率でバイオマスを生産するものが多いため、バイオマスの生産に特に好適に用いられる。

[0033] 緑藻に属する微細藻類の具体例としては、例えば、コナミドリムシ (*Chlamydomonas reinhardtii*) 等のクラミドモナス属 (*Chlamydomonas*)、デスモデスムス属 (*Desmodesmus Scenedesmus*) 及びセネデスムス属 (*Scenedesmus*) を含む所謂イカダモ、ボルボックス属 (*Volvox*)、テトラセルミス属 (*Tetraselmis*)、クロロコックム属 (*Chlorococcum*)、ドラニエラ属 (*Dunaliella*)、ネオクロリス属 (*Neochloris*)、及び、トレボキシア藻綱 (*Trebouxioophyceae*) に属する微細藻類が含まれるが、これらに限定されない。トレボキシア藻綱に属する微細藻類の具体例としては、ボツリオコッカス・ブラウニー (*Botryococcus braunii*) 等のボトリオコッカス属 (*Botryococcus*)、クロレラ属 (*Chlorella*)、コッコミクサ属 (*Coccomyxa*)、シュードコッコミクサ属 (*Pseudococcomyxa*)、トレボキシア属 (*Trebouxia*) に属する微細藻類が含まれるが、これらに限定されない。

[0034] 一方、不等毛藻に属する微細藻類としては、珪藻や真正眼点藻に属する微細藻類が挙げられる。珪藻に属する微細藻類の具体例としては、シクロテラ属 (*Cyclotella*)、シリンドロテカ属 (*Cylindrotheca*)、フィストウリフェラ属 (*Fistulifera*)、マヤマエア属 (*Mayamaea*)、フェオダクチラム属 (*Phaeodactylum*)、スケルトネマ属 (*Skeletonema*)、及びタラシオシラ属 (*Thalassiosira*) などに属する微細藻類を挙げることができるが、

これらに限定されない。他方、真正眼点藻に属する微細藻類の具体例としては、ナンノクロロプシス属 (*Nannochloropsis*) に属する微細藻類を挙げることができるが、これに限定されない。

[0035] また、渦鞭毛藻に属する微細藻類の具体例としては、アンフィジニウム属 (*Amphidinium*)、シンビオジニウム属 (*Symbiodinium*) に属する微細藻類、紅藻に属する微細藻類の具体例としては、シアニディオシゾン属 (*Cyanidioschyzon*)、ポルフィリジウム属 (*Porphyridium*) に属する微細藻類、ユーグレナ藻に属する微細藻類の具体例としては、ユーグレナ・グラシリス (*Euglena gracilis*) などのユーグレナ属 (*Euglena*) に属する微細藻類が挙げられるが、これらに限定されない。

[0036] 藍藻 (シアノバクテリア) に分類される微細藻類の具体例としては、アナバ属 (*Anabaena*)、アルスロスピラ属 (*Arthrospira*)、グロエオバクター属 (*Gloeobacter*)、ミクロシスティス属 (*Microcystis*)、ノストック属 (*Nostoc*)、プロクロコッカス属 (*Prochlorococcus*)、シネコシスティス属 (*Synechocystis*)、スピルリナ属 (*Spirulina*)、シネココッカス属 (*Synechococcus*)、サーモシネココッカス属 (*Thermosynechococcus*) などの微細藻類が挙げられるが、これらに限定されない。

[0037] 本発明の形質転換体は、以上のような光合成生物を形質転換して得られる形質転換体であり、光により駆動するプロトンポンプロドプシンを発現する、すなわち、光により駆動するプロトンポンプロドプシンをコードする遺伝子を含む形質転換体である。ちなみに、形質転換とは、宿主が本来発現しない遺伝子を宿主内で発現させることにより宿主の本来の形質が変化することを言い、形質転換体とは形質転換した宿主を意味する。上述したとおり、本発明に係る形質転換体の宿主としては、例えば、陸上植物や藻類などの光合成生物が用いられる。これらの宿主にとって、主に、脊椎動物や細菌類に分

布するプロトンポンプロドプシンは、本来発現しない外来の遺伝子である。

[0038] プロトンポンプロドプシンを発現する光合成生物の形質転換体を得る方法に特段の制限はなく、当業者であれば適宜の方法を用いることができるが、例えば、プロトンポンプロドプシンを光合成生物内で発現させることができる核酸構築物を光合成生物に導入すれば良い。プロトンポンプロドプシンを光合成生物内で発現させることができる核酸構築物とは、具体的には、プロトンポンプロドプシンの全部又はその一部をコードする配列（DNA配列又はRNA配列）を含む核酸構築物であり、例えば、プロトンポンプロドプシンの全部又はその一部をコードするDNA配列やRNA配列を含む発現ベクターであり得る。このような核酸構築物を光合成生物に導入することにより、その光合成生物においてプロトンポンプロドプシンを発現させることができる。

[0039] 形質転換に用いられる核酸構築物は、プロトンポンプロドプシンをコードする配列に加えて、当該核酸構築物を導入する宿主においてプロトンポンプロドプシンを発現させるために必要な種々の配列を含み得る。このような配列としては、例えば、プロモーター配列、ターミネーター配列、選択マーカー遺伝子をコードする配列などが含まれる。なお、宿主において発現させたい目的タンパク質をコードする遺伝子配列に加え、その配列の5'末端側と3'末端側に、それぞれプロモーター配列とターミネーター配列が連結された遺伝子断片は発現カセットと呼ばれる。前記核酸構築物は1又は2以上の発現カセットを含んだ発現ベクターであり得、例えば、宿主において発現させたい目的タンパク質であるプロトンポンプロドプシンをコードする配列と選択マーカー遺伝子をコードする配列は、一つのプロモーター配列とターミネーター配列の間に配置されたバイシストロニックな発現カセットとして発現ベクターに含まれていても良い。また、それぞれ別々のプロモーター配列及びターミネーター配列の間に配置されたモノシストロニックな二つの発現カセットとして発現ベクターに含まれていても良い。

[0040] プロモーター配列は、通常、コード領域、すなわち宿主において発現させ

たい目的タンパク質をコードする配列の5'末端側の非翻訳領域(5' UTR)に存在し、当該目的タンパク質をコードする配列の転写開始反応に関与する配列である。プロモーター配列は、核酸構築物を導入する宿主で機能するプロモーター配列である限りにおいてどのようなプロモーター配列であっても良い。一方、宿主が、核と葉緑体を有する真核光合成生物である場合、安定な形質転換体の得やすさという観点からは、宿主の葉緑体ゲノムに目的遺伝子を導入することが好ましく、このような場合には、核酸構築物が有するプロモーター配列は、宿主の葉緑体で機能するプロモーター配列であることが好ましい。葉緑体で機能するプロモーター配列としては、葉緑体遺伝子の5'非翻訳領域に存在するプロモーター配列を用いることができるが、必ずしも葉緑体遺伝子由来のものでなくても良いし、また、光合成生物由来のものでなくても良い。核酸構築物に用いられ得る葉緑体遺伝子のプロモーター配列としては、例えば、光化学系Ⅰ反応中心蛋白質遺伝子(psaA、psaB)、光化学系Ⅱ反応中心蛋白質遺伝子(psbA)、16SリボソームRNA遺伝子(16S rDNA)、リブロース1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ遺伝子(rbcL)、及び、葉緑体ATP合成酵素遺伝子(atpA)のプロモーター配列が挙げられるが、これらに限定されない。当業者であれば、核酸構築物を導入する光合成生物、オルガネラの種類に応じて、適宜のプロモーター配列を選択できる。

[0041] ターミネーター配列は、通常、コード領域、すなわち宿主において発現させたい目的タンパク質をコードする遺伝子配列の3'末端側の非翻訳領域(3' UTR)に存在し、当該目的タンパク質をコードする配列の転写終結反応に関与する配列である。ターミネーター配列は、上述したプロモーター配列が関与して開始される転写を終結することができるものであれば、基本的にどのようなものであっても良い。一方、宿主が、核と葉緑体を有する真核光合成生物である場合、安定な形質転換体の得やすさという観点からは、宿主の葉緑体ゲノムに目的遺伝子を導入することが好ましく、このような場合には、プロモーター配列同様、核酸構築物が有するターミネーター配列は、

宿主の葉緑体で機能するターミネーター配列であることが好ましい。葉緑体で機能するターミネーター配列としては、葉緑体遺伝子のターミネーター配列を用いることができるが、必ずしも葉緑体遺伝子由来のものでなくても良いし、光合成生物由来のものでなくても良い。核酸構築物に用いられ得る葉緑体遺伝子のターミネーター配列としては、例えば、リブロース 1, 5-ビスリン酸カルボキシラーゼ遺伝子 (rbcL) の 3' 非翻訳領域の配列を用いることができるが、これに限定されない。当業者であれば、核酸構築物を導入する光合成生物、オルガネラの種類に応じて、適宜のターミネーター配列を選択できる。

[0042] また、核酸構築物は、選択マーカー遺伝子を含んでいても良い。選択マーカー遺伝子は、当該選択マーカー遺伝子が発現する個体（すなわち、形質転換）を形質転換されていない個体（すなわち、非形質転換体）から識別することができるものである限りにおいて、どのようなものであっても良く、緑色蛍光蛋白質 (GFP) や赤色蛍光蛋白質 (RFP) などの蛍光蛋白質をコードする遺伝子、ルシフェラーゼなどの発光酵素をコードする遺伝子、及び、選択薬物に対する耐性遺伝子などが好適に用いられる。例えば、選択薬物に対する耐性遺伝子を選択マーカー遺伝子として用いる場合には、当該選択マーカー遺伝子を含む核酸構築物を導入することにより形質転換された形質転換体は、当該選択薬物に対して耐性を示すので、形質転換体と非形質転換体の双方を含む集団を当該選択薬物を含む培地等で培養することによって、非形質転換体を死滅させ、形質転換された形質転換体を効率的に選別することができる。なお、選択マーカー遺伝子として用いられる選択薬物に対する耐性遺伝子に特段の制限はないが、敢えて例示するのであれば、例えば、アミノグリコシドアダニルトランスフェラーゼ遺伝子 (aadA) (Z. Svab and P. Maliga, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1993, 90, 913-917.) などのスペクチノマイシン及びストレプトマイシン耐性遺伝子、アミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ遺伝子 (aphA-6) (J. M. Bateman an

d S. Purton, Molecular and General Genetics 2000, 263, 404-410.) やネオマイシンホストランスフェラーゼ遺伝子 (nptII) (H. Carrer et al., Molecular and General Genetics 1993, 241, 49-56.) などのカナマイシン耐性遺伝子を用いることができる。当業者であれば、前記核酸構築物を導入する光合成生物、オルガネラの種類などに応じて、適宜の選択マーカー遺伝子を選択できる。

[0043] なお、選択マーカー遺伝子は形質転換後に形質転換体から取り除いても良い。形質転換後に選択マーカー遺伝子を形質転換体から取り除く方法は、例えば、Anil Day et al. (Plant Biotechnology Journal 2011, 9, 540-553.) や特開2015-171358号公報に記載されているが、これらに限定されない。

[0044] また、安定的にプロトンポンプロドプシンを発現する形質転換体を得るという観点からは、プロトンポンプロドプシンをコードする配列は相同組換えにより宿主である光合成生物のゲノムに組み込まれることが好ましい。したがって、好適な一態様において、上記核酸構築物は、相同組換えにより宿主のゲノムに組み込まれる配列、すなわち目的タンパク質であるプロトンポンプロドプシンをコードする配列又は当該配列を含む発現カセットの5'末端側と3'末端側に、当該配列又は発現カセットを挟み込む一対の相同組換え配列を有している。一対の相同組換え配列は、宿主のゲノムの所定の領域の塩基配列と同一性を有する一対の塩基配列であり、具体的には、宿主のゲノムの所定の領域の上流に存在する塩基配列と同一性を有する配列と、同じ領域の下流に存在する塩基配列と同一性を有する配列の組み合わせを一対の相同組換え配列とすることができる。一対の相同組換え配列と、宿主のゲノムのうち当該一対の相同組換え配列と同一性を有する配列とが交叉することで、当該一対の相同組換え配列の間に存在する目的タンパク質をコードする配

列、本発明においては、プロトンポンプロドプシンをコードする配列又は当該配列を含む発現カセットが宿主のゲノムに組み込まれる。

[0045] なお、宿主である光合成生物が核と葉緑体を有する真核光合成生物である場合には、宿主が有する葉緑体ゲノムは核ゲノムと比較して相同組換え効率が高いため、葉緑体ゲノムを標的とすれば、より効率的に相同組換えにより目的遺伝子を導入することができる。したがって、好適な一態様において、前記一对の相同組換え配列は、葉緑体ゲノムの一部と相同組換え可能な一对の配列、すなわち、宿主の葉緑体ゲノムの所定の領域の塩基配列と相同性を有する一对の塩基配列であることが好ましく、具体的には、宿主の葉緑体ゲノムの所定の領域の上流に存在する塩基配列と相同性を有する配列と、同じ領域の下流に存在する塩基配列と相同性を有する配列の組み合わせを一对の相同組換え配列として用いることができる。なお、相同組換えを効率的に起こすという観点からは、一对の相同組換え配列の長さは、それぞれ500bp以上であることが好ましく、通常1kb～3kb程度のものが用いられる。

[0046] 以上説明した核酸構築物は、形質転換の対象となる宿主に応じて、物理的方法、化学的方法、生物的方法を問わず適宜の方法により導入することができる。核酸構築物の導入方法としては、例えば、パーティクルガン法、アグロバクテリウム法、プロトプラスト法が挙げられるが、これらに限られることなく、当業者であれば適宜の導入方法を用いることができる。例えば、アルファルファモザイクウイルス（AIMV）、タバコモザイクウイルス（TMV）、プラムポックスウイルス（PPV）、ジャガイモXウイルス（PVX）、キュウリモザイクウイルス（CMV）、ズッキーニイエローモザイクウイルス（ZYMV）などのウイルスベクターを用いても良いし、細胞膜透過性ペプチドを用いても良い。細胞膜透過性ペプチドを用いた光合成生物への核酸構築物の導入については、例えば、Keiji Numata et al. (Scientific Reports 8, Article number: 10966 (2018))に記載されている。なお、核酸構

築物の導入効率や形質転換体効率の観点から、アグロバクテリウム法やパーティクルガン法が一般的に用いられている。

[0047] パーティクルガン法とは、粒子銃法ともいわれ、核酸構築物でコーティングした粒径0.1～2.0 μm 程度のマイクロパーティクル（タングステン粒子や金粒子）を宿主に直接打ち込むことにより核酸構築物を導入する方法である（J. E. Boynton et. al., Science 1988, 240, 1534–1538.）。パーティクルガン法は、葉緑体やミトコンドリアなどの細胞内オルガネラに直接的に核酸構築物を導入できるため、葉緑体ゲノムへの遺伝子導入に特に好適に用いられる。

[0048] 一方、アグロバクテリウム法とは、植物に感染する土壌細菌である *Agrobacterium* 属の細菌、例えば、アグロバクテリウム・ツメファシエンス (*A. tumefaciens*) やアグロバクテリウム・リゾゲネス (*A. rhizogenes*) が植物細胞に感染する際に、自身が持つDNAを植物細胞に導入する性質を利用した形質転換法である。形質転換体に導入したい目的遺伝子をアグロバクテリウムに導入し、得られたアグロバクテリウムを宿主に感染させることによって、宿主に目的遺伝子を導入することができる。

[0049] プロトプラスト法とは、細胞壁分解酵素液（例えば、セルラーゼとペクチナーゼの混合物）等によって細胞を処理し、細胞壁を除去することでプロトプラスト化した後に、当該プロトプラストに対して目的遺伝子を導入する方法である。プロトプラストに目的遺伝子を導入する方法としては、電ロポレーション法、マイクロインジェクション法、ポリエチレングリコール法又はガラスビーズ法等が知られている。電ロポレーション法とは、プロトプラストに電気パルスをかけ、瞬間的に細胞膜に穴をあけることで、目的遺伝子をプロトプラスト内に導入する方法である。一方、マイクロインジェクション法は、微小ガラス管等を用いて目的遺伝子をプロトプラスト内に直接導入する方法である。また、ポリエチレングリコール法は、プロトプラストにポリエチレングリコールを作用させてプロトプラストに目的遺伝子

を導入する方法である。そして、ガラスビーズ法とは、プロトプラストの懸濁液に直径0.5 mm程度のガラスビーズと核酸構築物とを加え、ボルテックスミキサー等で攪拌・混合することにより目的遺伝子をプロトプラストに導入する方法である。

[0050] 以上に例示されたような適宜の導入方法を用いて、核酸構築物を導入した後は、プロトンポンプロドプシンを発現する形質転換体を、導入した核酸構築物に含まれる選択マーカー遺伝子の種類に応じて、適宜の手法により選択すれば良い。一方、導入した核酸構築物に選択マーカー遺伝子が含まれていない場合には、例えば、PCR法等によって目的遺伝子の導入を直接確認することにより形質転換体を選択しても良い。

[0051] なお、多細胞性の光合成生物、例えば、多細胞性の植物又は藻類の形質転換体を調製する場合には、核酸構築物を当該多細胞性の光合成生物を構成する1又は複数の細胞に導入した上で、当該細胞を分化させ、光合成生物全体を再生すれば良い。より具体的には、例えば、適宜の手法により核酸構築物を植物又は藻類を構成する細胞に導入した後に、所定の植物ホルモン（オーキシンやサイトカイニン）を所定量含む培地で培養することにより脱分化（カルス化）し、得られたカルスを所定の植物ホルモン（オーキシンやサイトカイニン）を所定量含む培地で培養して分化させ、植物又は藻類を形成させればよい。また、前もってカルス化した細胞に核酸構築物を導入して、得られたカルスを分化させることによって、形質転換体された多細胞性の植物又は藻類を得ることができる。しかしながら、多細胞性の光合成生物の形質転換体を調製する方法は以上に限られず、当業者であれば適宜の方法を用いて多細胞性の光合成生物の形質転換体を得ることができる。その他の方法としては、例えば、植物組織の一部を形質転換する *in planta* 法が含まれる。

[0052] 以上のように、光合成生物に核酸構築物を導入し、形質転換体を適宜選択し、必要であれば脱分化・分化させることによって、プロトンポンプロドプシンを発現する光合成生物の形質転換体を得ることができるが、形質転換の

具体的方法は、上述したものに限られず、当業者であれば適宜の方法で形質転換体を作製し得る。なお、光合成生物の形質転換方法は、例えば、「日本化学会編、実験化学講座 29 バイオテクノロジーの基本技術 第5版、丸善株式会社、平成18年7月25日発行」にも記載されている。

[0053] 以下、本発明の光合成生物の生育を制御する方法について説明する。

[0054] 本明細書において、光合成生物の「生育を制御する」とは、光合成生物の生長を促進又は抑制すること、及び、単位体積あたりに生育可能な細胞の数の上限、すなわち、飽和細胞密度を増加又は減少させることを含んで意味する概念である。なお、本明細書において、光合成生物の「生長」とは、光合成生物の細胞数が増加することを意味し、生長の促進とは、細胞数の増加速度が上昇すること、生長の抑制とは、細胞数の増加速度が減少することをそれぞれ意味する。なお、光合成生物が微細藻類である場合には、生長の促進又は抑制は、対数増殖期における細胞増殖速度の増加又は減少として観察され得る。また、単位体積あたりに生育可能な細胞の数の上限の増加又は減少は、細胞増殖が定常状態に達した増殖定常期における単位体積あたりの細胞の数、すなわち飽和細胞密度の増加又は減少として観察され得る。

[0055] 上述したとおり、本発明者らが見出した知見によれば、プロトンポンプロドプシンを発現可能に形質転換された光合成生物の形質転換体に、光を照射してプロトンポンプロドプシンを駆動すると、当該形質転換体の生長が促進又は抑制されるとともに、単位体積あたりに生育可能な細胞の数の上限を増加させることができる。すなわち、本発明に係る光合成生物の生育を制御する方法は、

(1) 光合成生物の形質転換体であって、プロトンポンプロドプシンを発現する形質転換体を得る工程、及び、

(2) 前記形質転換体に光を照射することにより、前記プロトンポンプロドプシンを駆動する工程、

を含む。以下、各工程について、更に詳細に説明する。

[0056] 工程(1) 光合成生物の形質転換体を得る工程

光合成生物を形質転換体することにより、プロトンポンプロドプシンを発現する光合成生物の形質転換体を得る工程である。形質転換体及びその作製方法については既に述べたとおりであり、光合成生物にプロトンポンプロドプシンをコードする配列を含む核酸構築物を導入し、その後、形質転換された個体（プロトンポンプロドプシンを発現する個体）を選択することにより、プロトンポンプロドプシンを発現する形質転換体を得ることができる。すなわち、好適な一態様において、上記工程（１）は、光合成生物にプロトンポンプロドプシンをコードする配列を含む核酸構築物を導入する工程、及び、前記プロトンポンプロドプシンを発現する形質転換体を選択する工程を含み得る。なお、プロトンポンプロドプシンを発現する光合成生物の形質転換体が市販されている場合には、市販されているものを用いても良いことは言うまでもない。

[0057] なお、プロトンポンプロドプシンを発現する形質転換体を得られる限りにおいて、光合成生物にプロトンポンプロドプシンをコードする核酸構築物を導入する方法は基本的にどのようなものであっても良く、既に述べたとおり、例えば、プロトプラス法、パーティクルガン法、アグロバクテリウム法、ウイルスベクター法などを用いて核酸構築物を光合成生物に導入することができる。

[0058] 一方、プロトンポンプロドプシンを発現する形質転換体を選択する方法に特段の制限はなく、適宜の方法を用いてプロトンポンプロドプシンを発現する形質転換体を選択すれば良いが、典型的には選択マーカー遺伝子を含む核酸構築物を用いて形質転換を行うことにより、容易に形質転換体を選択することができる。例えば、選択マーカー遺伝子として蛍光蛋白質を含む核酸構築物を用いる場合には、当該核酸構築物を導入することにより形質転換された形質転換体は所定の蛍光を発するため、蛍光を発する個体を選別することにより形質転換体を選択することができる。一方、選択マーカー遺伝子として、選択薬物に対する耐性遺伝子をコードする配列を含む核酸構築物を用いる場合には、当該核酸構築物を導入することにより形質転換された形質転換

体は、所定の選択薬物に対する耐性遺伝子を発現する一方で、形質転換されていない個体は当該耐性遺伝子を発現しないため、形質転換された個体と形質転換されていない個体の双方を含む集団を選択薬物を含む培地等で処理することにより、形質転換された個体のみを選択的に取得することができる。なお、形質転換体を選択できる限りにおいて、どのような選択マーカー遺伝子を用いても良い。また、必ずしも選択マーカー遺伝子を用いる必要はなく、例えば、PCR法等によって目的遺伝子の導入を直接確認することにより、形質転換体を選択しても良い。

[0059] なお、光合成生物が多細胞性の光合成生物、例えば、多細胞性の植物や藻類である場合には、核酸構築物を多細胞性の光合成生物の1又は複数の細胞に導入した上で、当該細胞をカルス化、再分化させ、光合成生物を再生すれば良い。すなわち、上記工程(1)は、プロトンポンプロドプシンをコードする配列を含む核酸構築物を光合成生物に導入する工程、核酸構築物を導入した光合成生物からカルスを獲得する工程、及び、得られたカルスを分化させて形質転換体を得る工程を含み得る。なお、カルスとは脱分化した状態にある植物又は藻類の細胞であり、典型的には、植物又は藻類の細胞の一部を所定の植物ホルモンの存在下で培養することにより形成される。カルスに接触させる植物ホルモンの濃度や種類を調節することにより、一度形成したカルスは植物又は藻類の個体へと再分化させることができ、このようにして形質転換された植物又は藻類の個体を得ることができる。ちなみに、カルスを得た後に、プロトンポンプロドプシンをコードする配列を含む核酸構築物を導入し、核酸構築物を導入したカルスを再分化させても良いことは言うまでもない。

[0060] 工程(2) プロトンポンプロドプシンを駆動する工程

工程(1)において得られた光合成生物の形質転換体に光を照射することにより、当該形質転換体に発現させたプロトンポンプロドプシンを駆動する工程である。後述する実験例に示すとおり、光合成生物にプロトンポンプロドプシンを発現させた状態、好ましくは、光合成生物の細胞膜、更に好まし

くは、光合成生物の葉緑体にプロトンポンプロドプシンを発現させた状態において、プロトンポンプロドプシンが駆動されると、光合成生物の生長が促進又は抑制される。また、プロトンポンプロドプシンを駆動する光が照射される環境下で栽培又は培養することにより、単位体積あたりに生育可能な細胞数の上限、すなわち、飽和細胞密度を高めることができる。

[0061] プロトンポンプロドプシンを駆動するために形質転換体に照射される光の波長は、プロトンポンプロドプシンを活性化して、プロトンポンプロドプシンを駆動することができる波長の光を含んでいる限りにおいて、特段の制限はなく、プロトンポンプロドプシンの吸収波長や、用いる光合成生物の生育環境等に応じて適宜選択すれば良い。なお、プロトンポンプロドプシンは、発色団としてレチナールを結合しており、典型的には波長約400nm～600nmの領域に吸収極大波長を有し、当該領域の波長を有する光を受容すると、レチナールの光異性を介して活性化され、細胞膜内外のプロトン輸送が起こる。したがって、用いられるプロトンポンプロドプシンの種類にもよるが、形質転換体に照射する光の波長は約400nm～600nmの波長の光を含んでいることが好ましい。このような波長を含む光には、波長500nm乃至600nm程度の緑色の光が含まれる。このように本発明に係る光合成生物の生育を制御する方法は、現在までに光合成生物の生育制御に、あまり活用されてこなかった緑色の光を主として用いるものである。なお、様々な波長の光を組み合わせても良いことは勿論であり、例えば、緑色の光とともに、青色の光（波長400～500nm）や赤色の光（波長600nm～700nm）を組み合わせても良い。

[0062] 照射される光の光源は特に限定されず、例えば、LEDランプ、蛍光ランプ、高圧ナトリウムランプ、メタルハライドランプ等の人工光源を用いても良いし、太陽光などの自然光を用いても良い。また、それらの組み合わせであっても良い。なお、照射される光は、点滅光、連続光、或いはそれらの組み合わせであってもよい。

[0063] 一方、本発明は、更に他の一側面において、バイオマスの製造方法であっ

て、

(A) 光合成生物の生育を制御する上記方法を用いて光合成生物を培養又は栽培する工程、及び

(B) 前記光合成生物からバイオマスを回収する工程、
を含む、バイオマスの製造方法を提供するものである。本発明に係る形質転換体、本発明に係る光合成生物の生育を制御する方法によれば、光合成生物の生長を促進又は抑制することができ、また、単位体積当たりに生育可能な細胞の数の上限、すなわち飽和細胞密度を高めることができるので、光合成生物に由来する様々なバイオマスを効率的に製造することができる。

[0064] なお、本明細書において「バイオマス」とは、光合成生物に由来する材料を意味し、光合成生物そのもの、及び、光合成生物の処理物が含まれる。光合成生物の処理物には、光合成生物から得られる有用物質、及び、前記有用物質を採取した後に残る光合成生物の残滓が含まれる。光合成生物から得られる有用物質としては、例えば、油脂、脂肪酸、炭化水素、でん粉などが挙げられるが、これらに限定されない。なお、緑藻の一種であるクラミドモナスは、バイオ燃料の原料となるでん粉やトリアシルグリセロールを産生することが知られている。

[0065] バイオマスを回収する方法に特段の制限はなく、光合成生物の種類、回収するバイオマスの種類に応じて、適宜の手法を用いれば良い。敢えて例示するのであれば、例えば、バイオマスが油脂や炭化水素などの有機溶媒に可溶性物質である場合には、光合成生物を乾燥、破砕した後、有機溶媒を用いて抽出することにより回収することができる。回収物は、クロマトグラフィーや蒸留などの操作により更に精製しても良い。

[0066] 本明細書において引用されたすべての文献の開示内容は、全体として明細書に参照により組み込まれる。また、本明細書全体において、単数形の「a」、「an」、および「the」の単語が含まれる場合、文脈から明らかにそうでないことが示されていない限り、単数のみならず複数のものを含むものとする。

[0067] 以下、実施例を示してさらに本発明の説明を行うが、実施例は、あくまでも本発明の実施形態の例示にすぎず、本発明の範囲を何ら限定するものではない。

実施例

[0068] 実験1. クラミドモナス細胞発現用プラスミドの作製

緑藻の一種であるクラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii*) (以下、単に「クラミドモナス」という。) に発現させる形質転換用プラスミドを作製した。具体的な構成は図1に示すとおりである。クラミドモナス葉緑体形質転換用ベクターである pSXY246A の制限酵素 SbfI 部位には、クラミドモナスの葉緑体ゲノムのコドン使用頻度に最適化した配列を有する AR3 をコードする遺伝子 (Genbank accession number: WP_092921078) 又は RmXeR をコードする遺伝子 (Genbank accession number: WP_094549673) が挿入されており、その 5' 末端又は 3' 末端側には、AR3 又は RmXeR の発現を検出するための HA (ヘマグルチニン) タグ配列をコードする遺伝子が付加されている。図1において「psaA」と「rbcL」は、それぞれ psaA 遺伝子のプロモーター配列、rbcL 遺伝子のターミネーター配列を示し、プロトンポンプロドプシン遺伝子 (AR3 遺伝子又は RmXeR 遺伝子) をコードする配列の前後に配置されている。また、相同組み換え用に、プロトンポンプロドプシン遺伝子をコードする配列の 5' 末端側には葉緑体タンパク質である psbA の遺伝子配列 (光化学系 II の反応中心である D1 タンパク質をコードする遺伝子であり 5 つのエキソン: E1 ~ E5 を含む) を、他方、3' 末端側には、rrn5 (リボソーム合成遺伝子) の遺伝子配列、及び、rrnL (リボソーム合成遺伝子) の遺伝子配列が配置されており、これらが本明細書でいうところの一对の相同組換え配列に相当する。また、形質転換体を選抜/選択するための選択マーカー遺伝子として、スペクチノマイシンとストレプトマイシンへの耐性を与えるアミノグリコシドアダニル転移酵素 (AAD) をコードす

る大腸菌遺伝子 (a a d A) と A T P a s e C F 1 遺伝子 (a t p A) をコードする配列が組み込まれている。なお、形質転換に用いたクラミドモナス (C h l a m y d o m o n a s r e i n h a r d t i i) の細胞株である F u d 7 株の葉緑体ゲノムには、上記形質転換用プラスミドの発現カセットの 5' 末端側と 3' 末端側に配置された配列と同一性を有する配列が含まれており、これらの配列を介して相同組み換えが起きることで、プロトンポンプロドプシン遺伝子が宿主であるクラミドモナス (C h l a m y d o m o n a s r e i n h a r d t i i) の葉緑体ゲノムに取り込まれる。上述したとおり、プロモーター配列としては、葉緑体で機能するプロモーター配列として、光化学系 I の反応中心蛋白質をコードする p s a A 遺伝子のプロモーター配列が使用されている。すなわち、上記プラスミドは相同組み換えにより葉緑体ゲノムに取り込まれ、また上記プラスミドにコードされる A R 3 又は R m X e R は葉緑体内で発現されるようになっている。

なお、本実験に用いたクラミドモナス葉緑体形質転換体用ベクターである p S X Y 2 4 6 A は国立大学法人岡山大学高橋裕一郎博士より譲渡を受けたものであり、その調製は Y u i c h i r o T a k a h a s h i e t a l . , P l a n t C e l l P h y s i o l 3 7 (2) : 1 6 1 - 1 6 8 (1 9 9 6) 、又は M i c h e l e t L a u r e e t a l . , P l a n t B i o t e c h n o l g y J o u r n a l , 9 (5) : 5 6 5 - 5 7 4 (2 0 1 1) に準じて行うことができる。

[0069] 実験 2. クラミドモナス細胞の葉緑体のゲノム組換え

常法に従って、クラミドモナス (C h l a m y d o m o n a s r e i n h a r d t i i) の細胞株である F u d 7 株の葉緑体ゲノムの組換えを行った。具体的な手順は以下のとおりである。なお、単細胞性の真核光合成生物であり、緑藻の一種であるクラミドモナス (C h l a m y d o m o n a s r e i n h a r d t i i) は、光合成生物の最もシンプルなモデルとして、植物学分野をはじめとした生命科学分野で広く用いられている。

[0070] まず、以下の表 1 に示す組成を有する T A P 培地に懸濁したクラミドモナ

スFud7に対して、上記実験1で調製したAR3プラスミド又はRmXeRプラスミドをキャリアパーティクル（粒径1.0～1.3 μm のタングステン粒子）に結合させ、パーティクル遺伝子導入装置（製品名：IDERA、型式：GIE-III、株式会社タナカ）を用いてクラミドモナスへと打ち込み、葉緑体に遺伝子を導入した。遺伝子導入後の細胞は、常法に従って、スペクチノマイシン（終濃度：150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ）を含むTAPプレートに塗布し、植物培養用インキュベーター（製品名「ミニプラントインキュベーター 3in1 LED照明育成棚装備タイプ」、株式会社日本医化器械製作所）内で温度25°C、照射光波長660 nm、光量子量85 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{sec}^{-1}$ の条件で、19日間培養した。

[0071] [表1]

TAP培地の組成	
100×TAP salt	10 mL
40×Beijerinck's solution (TAP培地用)	25 mL
100×Hutner's trace element	10 mL
+ 滅菌水	1000 mL

[0072] [表2]

100×TAP saltの組成	
Trishydroxyaminoethane (Tris)	242 g L^{-1}
K_2HPO_4	1.08 g L^{-1}
KH_2PO_4	0.56 g L^{-1}
(酢酸でpH7.0に調整)	

[0073] [表3]

40×Beijerinck's solution (TAP培地用) の組成	
NH_4Cl	16 g L^{-1}
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2.0 g L^{-1}
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4.0 g L^{-1}

[0074]

[表4]

100×Hutner's trace element の組成	
Ethylendiamine tetraacetic acid (EDTA)	5.0 gL ⁻¹
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	2.2 gL ⁻¹
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.16 gL ⁻¹
MnCl ₂ · 6H ₂ O	0.51 gL ⁻¹
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.16 gL ⁻¹
(NH ₄) ₆ (Mo ₇ O ₂₄) ₄ · 4H ₂ O	0.11 gL ⁻¹
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.50 gL ⁻¹
H ₃ BO ₃	1.14 gL ⁻¹
(1N KOHでpH6.7に調整)	

[0075] 実験3. クラミドモナス細胞におけるAR3又はRmXeRの発現の確認

クラミドモナス細胞におけるAR3又はRmXeRの発現は、AR3のN末端又はRmXeRのC末端に付加したHAタグ配列に対するウェスタンブロッティング法により確認した。具体的には、上記実験2で作製したクラミドモナス細胞のコロニーをTAP培地へと移し、植物培養用インキュベーター内で温度25°C、照射光波長660nm、光量子量20～30 μmol photons m⁻²sec⁻¹、100rpmの条件で振盪培養した。その後、遠心分離にてクラミドモナス細胞を回収し、ショ糖密度勾配遠心法を用いてチラコイド膜画分を取得した。得られたチラコイド膜画分をクロロフィル量が1 μg（以下、「1 μg Chl」と表記する。）となるように適宜希釈し、5%アクリルアミドゲルを濃縮ゲル、12%アクリルアミドゲルを分離ゲルとした電気泳動用のゲルにアプライした。電気泳動後、転写膜であるImmunobilon (R)-FL PVDF膜 (Merck KGaA, Germany) へ転写し、抗HAタグ抗体 (Anti-HA-tag mAb monoclonal、アイソタイプ: Mouse IgG2b κ、株式会社医学生物学研究所) を一次抗体として3時間免疫抗体反応を行った。次に、PBS-Tween (Tween濃度: 0.1%) で6,000倍希釈したHRP標識anti-mouse IgG (GEヘルスケア・ジャパン株式会社) を二次抗体として1時間免疫抗体反応を行った後、ECL prime (GEヘルスケア・ジャパン株式会社) を用いて化学発光を検出した。化学発光の検出は市販のイメージアナライザー（製品名「Ima

geQuant LAS 4000 mini」、GEヘルスケア・ジャパン株式会社）を用いて行った。

[0076] 得られた結果を図2に示す。図2に示すとおり、非形質転換体（図2において「コントロール」）と比べて、AR3遺伝子導入細胞（図2において「AR3」）又はRmXeR遺伝子導入細胞（図2において「RmXeR」）では、両ロドプシンの推定質量である28.8 kDa（AR3）又は26.1 kDa（RmXeR）付近に、強いシグナルが観察された（図2）。また、葉緑体チラコイド膜分画においても同様の位置に強いシグナル強度を有するバンドが観察された（図2）。これらの結果から、両ロドプシンが、主として、クラミドモナス細胞の葉緑体チラコイド膜に発現していることが確認された。

[0077] 実験4. クラミドモナス細胞の増殖挙動の観察

実験2で得られたクラミドモナスの形質転換体の可視光照射下における増殖挙動を観察した。具体的な手順は以下に示すとおりである。まず、AR3又はRmXeRを発現する形質転換体、及び、コントロールとしてAR3又はRmXeRを発現していないクラミドモナス（ロドプシン非発現細胞）を以下の表5に示す組成を有するHSM培地5 mL中に 0.50×10^6 cells/mLで懸濁し、インキュベーター（製品名：卓上型人工気象器<3 in 1 LED照明搭載タイプ>、型番：LH-80LED-DT、株式会社日本医化器械製作所）内で培養した。なお、培養中の光照射の条件は次の通りである：照射光波長660 nm（赤色LED）、光量子量 $20 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{sec}^{-1}$ 、照射光波長520 nm（緑色LED）、光量子量 $10 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{sec}^{-1}$ 、照射光波長450 nm（青色LED）、光量子量 $20 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{sec}^{-1}$ 。所定の培養時間が経過した後、細胞数をセルアナライザー（製品名「Countess II FL 自動セルカウンター」、Thermo Fisher Scientific K. K.）により測定した。

[0078]

[表5]

HSM培地の組成	
100×リン酸ストック液	10 mL
40×Beijerinck's solution (HSM培地用)	25 mL
100×Hutner's trace element	10 mL
+ 滅菌水	1000 mL

[0079] [表6]

100×リン酸ストック液の組成	
K_2HPO_4	1.08 gL^{-1}
KH_2PO_4	0.56 gL^{-1}

[0080] [表7]

40×Beijerinck's solution (HSM培地用) の組成	
NH_4Cl	20 gL^{-1}
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.4 gL^{-1}
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.8 gL^{-1}

[0081] 得られた結果を図3に示す。細胞が増殖する72時間後（後期対数増殖期）において、ロドプシン非発現細胞（図3において、「コントロール」）では、単位体積当たりの細胞数が $8.40 \pm 0.341 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ であったのに対し、細胞内から細胞外へプロトンを送り出し、もって細胞内のアルカリ化を促進すると考えられる外向きプロトンポンプロドプシンであるAR3を葉緑体に発現するAR3発現細胞（図3において「AR3」）では、単位体積当たりの細胞数が $6.52 \pm 0.427 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ であり、コントロールと比較しておよそ0.78倍になった（図3）。一方で、細胞外から細胞内にプロトンを送り出し、もって細胞内の酸性化を促進すると考えられる内向きプロトンポンプロドプシンであるRmXeRを葉緑体に発現するRmXeR発現細胞（図3において「RmXeR」）では、単位体積当たりの細胞数が $10.9 \pm 0.836 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ であり、コントロールと比較しておよそ1.3倍になった（図3）。このように、クラミドモナス細胞において、外向きプロトンポンプロドプシンであるAR3又は内向きプロトンポンプロドプシンであるRmXeRを発現させ、プロトンポンプロドプシンを駆動する光を照射することで、対数増殖期におけ

るクラミドモナス細胞の生長をそれぞれ促進又は抑制できることが示された。

[0082] 一方、細胞の増殖が定常期に達する168時間後において、ロドプシン非発現細胞（図3において「コントロール」）では、細胞数が $8.32 \pm 0.978 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ であったのに対し、細胞内から細胞外にプロトンを送り出し、もって細胞内のアルカリ化を促進すると考えられる外向きプロトンポンプロドプシンであるAR3を葉緑体に発現するAR3発現細胞（図3において「AR3」）では、単位体積当たりの細胞の数、すなわち、細胞密度が $16.1 \pm 0.881 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ と、コントロールと比較しておよそ1.9倍になった（図3）。一方で、細胞外から細胞内にプロトンを送り出し、もって細胞内の酸性化を促進すると考えられる内向きプロトンポンプロドプシンであるRmXeRを葉緑体に発現するRmXeR発現細胞（図3において「RmXeR」）では、単位体積当たりの細胞の数、すなわち、細胞密度が $16.5 \pm 1.24 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ と、コントロールと比較しておよそ2.0倍になった（図3）。このように、クラミドモナス細胞において、外向きプロトンポンプロドプシンであるAR3又は内向きプロトンポンプロドプシンであるRmXeRを発現させ、プロトンポンプロドプシンを駆動する光を照射した環境で生育させることで、クラミドモナスの細胞増殖定常期における単位体積当たりの細胞の数、すなわち飽和細胞密度の上限が高まることが示された。

[0083] 実験5. クラミドモナス細胞の形態の観察

実験4と同時に、可視光照射によるクラミドモナス細胞の形態への影響を観察した。細胞の形態変化は、正立顕微鏡（型式：CX41N-31、オリンパス株式会社）を用いて観察、より具体的には、細胞を正立顕微鏡のステージにセットし、顕微鏡用CCDカメラ（FULL HD HDMI Camera TrueChrome II Plus高精度モニターセット、バイオツールズ株式会社）を用いて細胞の外観の写真を撮影した。なお、以上の観察は、室温（おおむね15～25℃）で行った。一方、細胞面積は

、セルアナライザー（製品名「Countess II FL 自動セルカウンター」、Thermo Fisher Scientific K. K.）を用いて細胞の写真を撮影し、得られた画像をソフトウェア（ImageJ）によって解析することにより求めた。

[0084] 結果を図4に示す。図4に示すとおり、培養開始から24時間後及び72時間後の対数増殖期、及び168時間後の増殖定常期における細胞面積及び細胞形態は、プロトンポンプロドプシンを発現するAR3発現細胞又はRmXeR発現細胞と、プロトンポンプロドプシンを発現していないコントロールとで変化が見られなかった。この結果は、プロトンポンプロドプシンを発現する形質転換体においては、正常な細胞機能が損なわれることなく、その生長が促進又は抑制されることを示している。

[0085] 実験6. クラミドモナス細胞の乾燥重量の測定

実験4と同時に、可視光照射によるクラミドモナスの形質転換体の乾燥重量への影響を評価した。具体的な手順は以下に示すとおりである。すなわち、実験4において、培養開始から168時間が経過した後、5 mLの培養液を回収し、回収した培養液を遠心分離した後、上清を取り除いた。そして、1 mLの滅菌水を加え、ボルテックスミキサー（製品名『TUBE MIXER TRIO』、アズワン（AS ONE）株式会社製）で十分に懸濁した後、遠心分離を行い、上清を取り除いた。以上のとおりの、滅菌水を用いた洗浄作業を計3回行い、培地成分を取り除いた。そして、80℃に加熱したインキュベーターへ細胞を移し、4時間静置し乾燥させた。その後、分析用電子天びん（製品名『HR-100AZ』、株式会社エー・アンド・デイ製）を用いて、乾燥質量を測定した。

[0086] 結果を図5に示す。図5に示すとおり、培養開始から168時間後の増殖定常期における乾燥重量は、プロトンポンプロドプシンを発現するAR3発現細胞及びRmXeR発現細胞では、プロトンポンプロドプシンを発現していないコントロールと比べて、それぞれ2.0倍および1.3倍上昇した。この結果は、プロトンポンプロドプシンを発現する形質転換体においては、

正常な炭素固定能が損なわれることなく、培養液中の細胞数が増加するにしたがって、培養液中の細胞の合計質量も増加したことを示している。

[0087] 実験7. クラミドモナス細胞の油滴（脂肪滴）形成能の評価

実験4と同時に、実験2で得られたクラミドモナスの形質転換体の可視光照射下における油滴（脂肪滴）形成能を評価した。油滴形成能は、形成された油滴のナイルレッド染色に基づいて評価した。具体的には、実験4において、培養開始から168時間が経過した後、1 mLの培養液を回収し、回収した培養液にナイルレッド（富士フイルム和光純薬株式会社製）を終濃度が $1.0 \mu\text{g/mL}$ となるように添加した。そして、この培養液をスライドガラスへと滴下し、その上にカバーガラスを載置した。細胞の観察は、水銀ランプU-LH100HGAP0（オリンパス株式会社製）を備え付けた倒立型リサーチ顕微鏡（型式：IX71、オリンパス株式会社製）を用いて行った。ナイルレッドが発する蛍光の観察は、波長 $480 \pm 10 \text{ nm}$ の励起光を照射し、波長 $550 \pm 10 \text{ nm}$ の領域の蛍光を検出することで行った。なお、以上の観察は、室温（約 $15 \sim 25^\circ\text{C}$ ）で行った。蛍光画像は、CCDカメラ（ORCA-AG、浜松ホトニクス株式会社製）とMeta Vueソフトウェア（Version 7.5.6.0、Molecular Devices社製、米国）を用いて取得・解析を行った。

[0088] 結果を図6に示す。図6（A）に示すとおり、培養開始から168時間後の増殖定常期において、プロトンポンプロドプシンを発現するAR3発現細胞又はRmXeR発現細胞では、プロトンポンプロドプシンを発現していないコントロールと同様に、油滴形成を示すナイルレッド染色に由来する蛍光シグナルが観察できた。また、油滴形成量の指標として、各細胞におけるナイルレッド染色に由来する蛍光シグナルの蛍光強度を比較したところ、図6（B）に示すとおり、AR3発現細胞ではコントロールと比べて、蛍光強度が1.7倍上昇した。一方、RmXeR発現細胞ではコントロールと比べて、蛍光強度の変化が見られなかった。この結果は、プロトンポンプロドプシンを発現する形質転換体においては、正常な油滴形成能が損なわれていない

こと、及び、外向きプロトンポンプロドプシンであるAR3を発現させた形質転換体（AR3発現細胞）では、むしろ、油滴形成能が上昇したことを示している。

[0089] [配列表の説明]

配列番号1：海洋真正細菌*Rubricoccus marinus*由来のRmXeRのアミノ酸配列

配列番号2：古細菌*Halorubrum sodomense*由来のAR3のアミノ酸配列

配列番号3：海洋真正細菌*Rubricoccus marinus*由来のRmXeRをコードする、クラミドモナスの葉緑体ゲノムのコドン使用頻度に最適化した塩基配列

配列番号4：古細菌*Halorubrum sodomense*由来のAR3をコードする、クラミドモナスの葉緑体ゲノムのコドン使用頻度に最適化した塩基配列

配列番号5：波長500nm付近に吸収極大波長を有するAR3の変異体のアミノ酸配列

産業上の利用可能性

[0090] 本発明の形質転換体又は光合成生物の生育を制御する方法によれば、光という容易にコントロール可能な手段により、光合成生物の生長を促進又は抑制するとともに、単位体積当たりに生育可能な光合成生物の細胞の数の上限、すなわち、飽和細胞密度を増加させることができ、光合成生物の高密度培養が可能となる。このような光合成生物の形質転換体及び光合成生物の生育の制御する方法は、様々なバイオマスの生産の効率化などに資するものであり、特に持続可能な社会の構築へ向けて、幅広い産業分野での応用が期待される。

請求の範囲

- [請求項1] 光合成生物の形質転換体であって、光によって駆動するプロトンポンプロドプシンを発現する形質転換体。
- [請求項2] 前記プロトンポンプロドプシンが、細胞外から細胞内へプロトンを輸送する内向きプロトンポンプロドプシンであることを特徴とする請求項1に記載の形質転換体。
- [請求項3] 前記プロトンポンプロドプシンが、細胞内から細胞外へプロトンを輸送する外向きプロトンポンプロドプシンであることを特徴とする請求項1に記載の形質転換体。
- [請求項4] 前記プロトンポンプロドプシンが、細胞外から細胞内へプロトンを輸送する内向きプロトンポンプロドプシン、及び、細胞内から細胞外へプロトンを輸送する外向きプロトンポンプロドプシンの双方であることを特徴とする請求項1に記載の形質転換体。
- [請求項5] 前記内向きプロトンポンプロドプシンが、ルブリコッカスマリナスゼノロドプシン ($RmXeR$) であることを特徴とする請求項2又は4に記載の形質転換体。
- [請求項6] 前記外向きプロトンポンプロドプシンが、アーキロドプシン3 ($AR3$) であることを特徴とする請求項3又は4に記載の形質転換体。
- [請求項7] 前記光合成生物が微細藻類であることを特徴とする請求項1乃至6のいずれか一項に記載の形質転換体。
- [請求項8] 前記微細藻類が緑藻、紅藻、不等毛藻、ユーグレナ藻、渦鞭毛藻、灰色藻、クリプト藻、ハプト藻、クロララクニオン藻、及び藍藻のいずれかに属する微細藻類であることを特徴とする請求項7に記載の形質転換体。
- [請求項9] 前記微細藻類が緑藻に属する微細藻類であることを特徴とする請求項8に記載の形質転換体。
- [請求項10] 光合成生物の生育を制御する方法であって、
(1) 前記光合成生物の形質転換体であって、請求項1乃至9のいずれ

れか一項に記載の形質転換体を得る工程、及び、

(2) 前記形質転換体に光を照射することにより、前記プロトンポン
プロドプシンを駆動する工程、
を含むことを特徴とする方法。

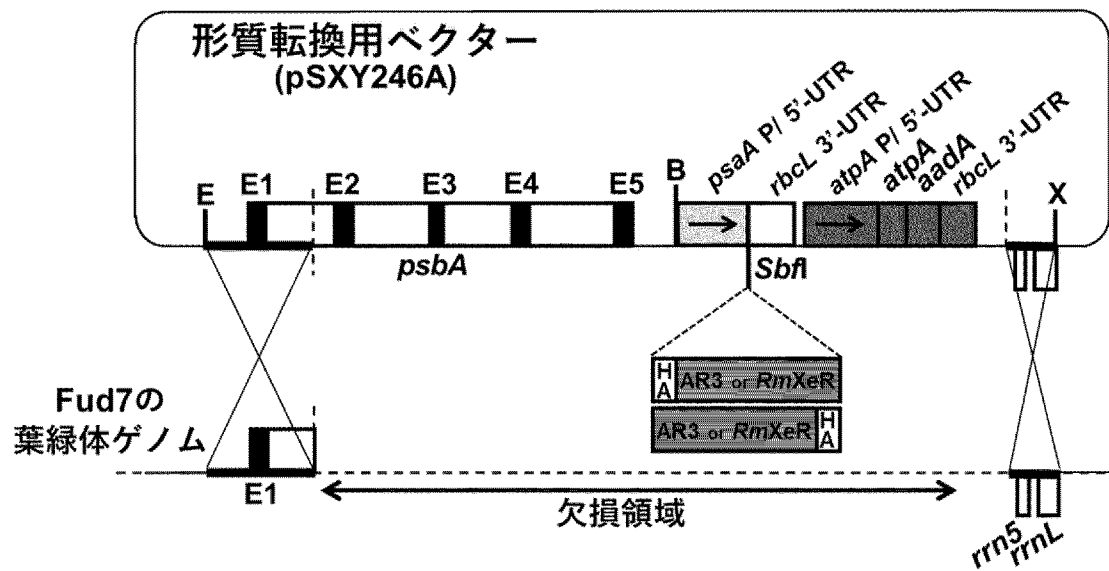
[請求項11]

バイオマスの製造方法であって、

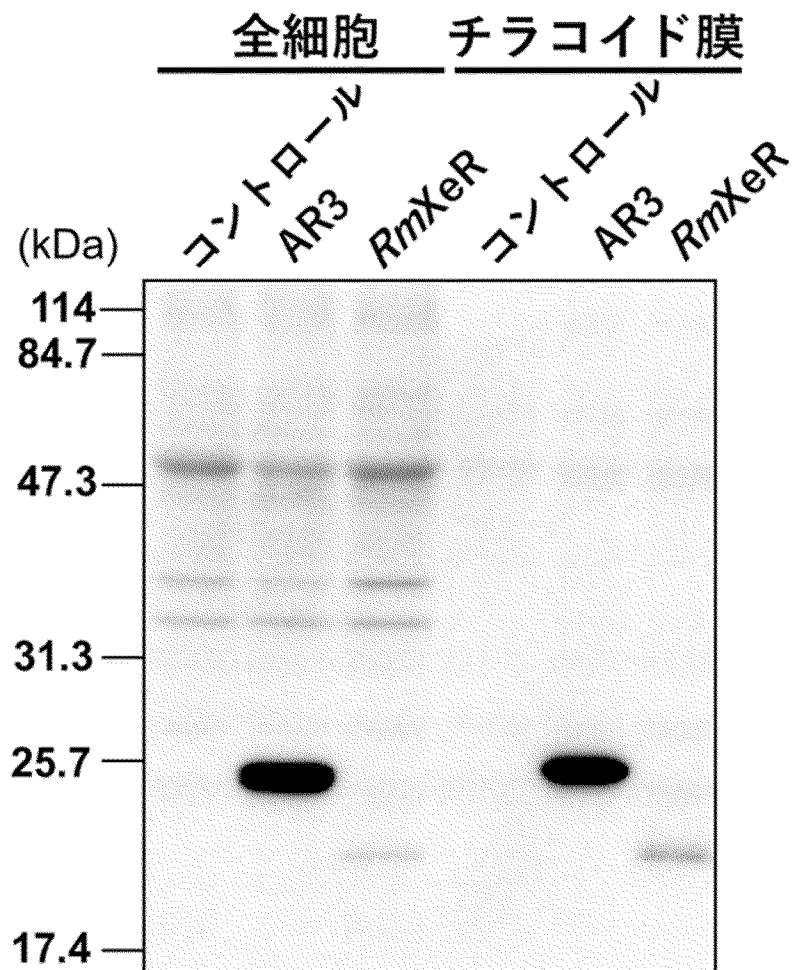
(A) 請求項10に記載の方法を用いて光合成生物を培養又は栽培す
る工程、及び、

(B) 前記光合成生物からバイオマスを回収する工程、
を含む、バイオマスの製造方法。

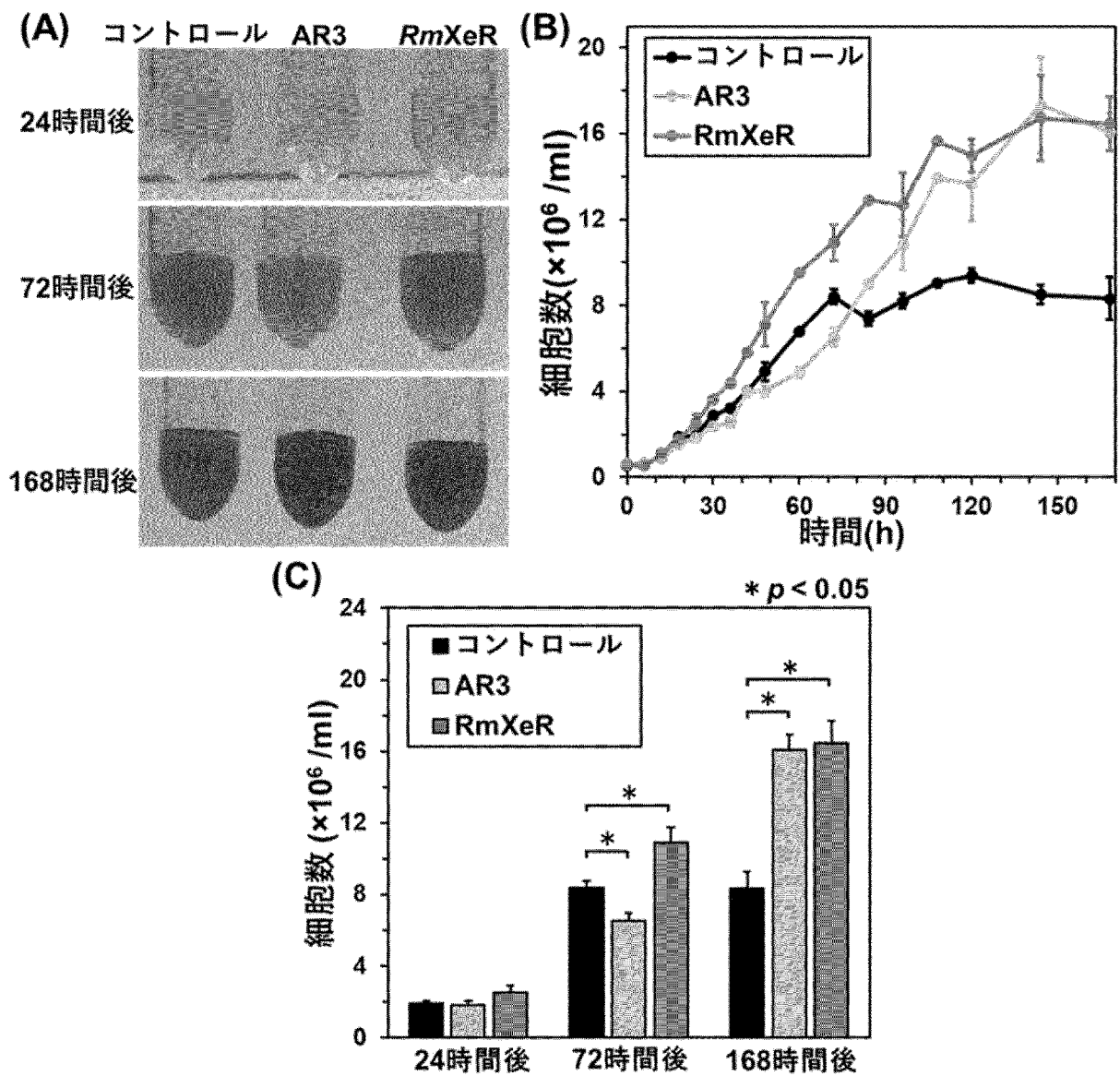
[図1]



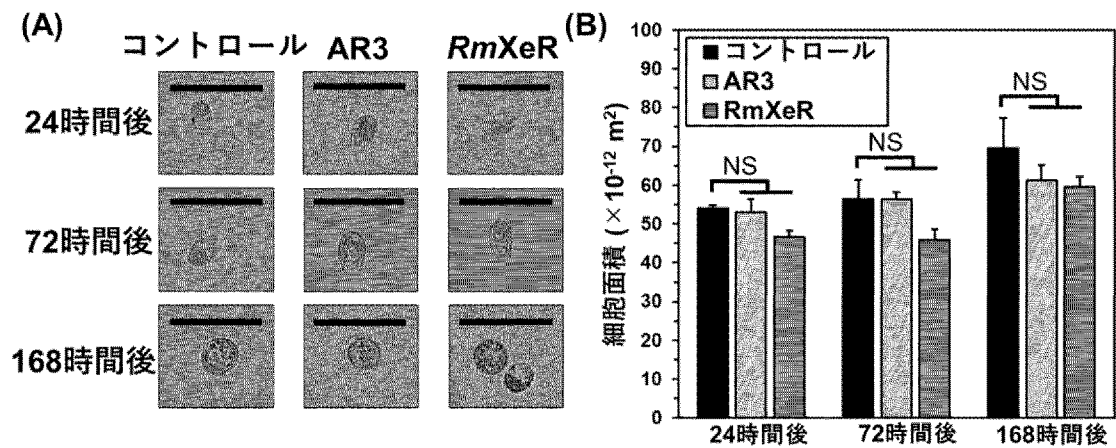
[図2]



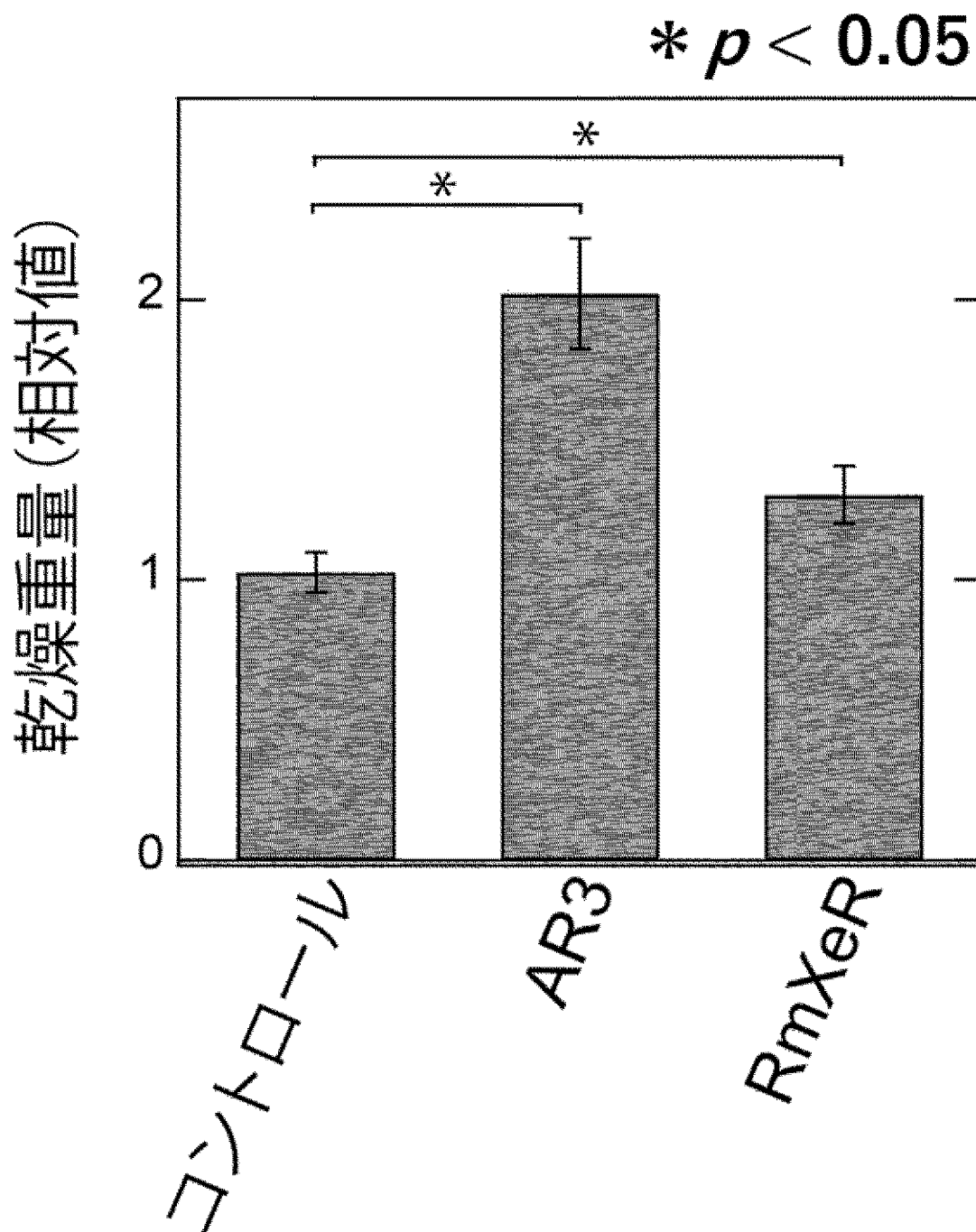
[図3]



[図4]

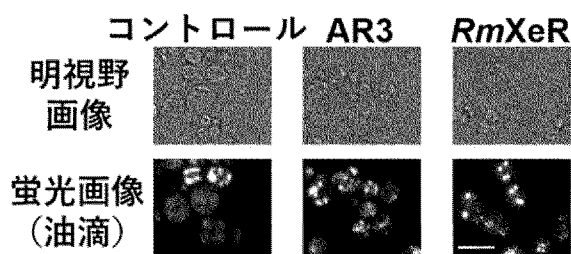


[図5]

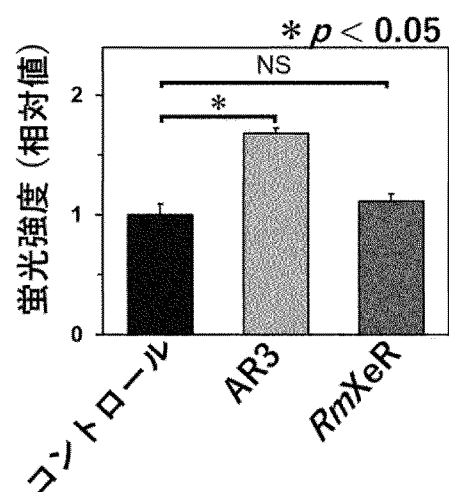


[図6]

(A)



(B)



[図7]

塩基配列	アミノ酸配列
ATGAGTCTTGAAACGCTTCTTTACACTGTTTAT	MSLETLLYTVYIASMAAGALLFLSWMRDPKGV
ATTGCCAGTATGGCGGCAGGTGCTCTTCTATTT	PVWEYIVAALIPVWSGLAYLAMALGLGTAEIA
TTAAGTTGGATGCGCGACCCTAAGGGCGTTCCT	GQTTYWARYADWVVTTPLLLTALWMTAVTRSD
GTTTGGGAATACATTGTTGCTGCGCTTATCCCT	KSKHVPPLLGLVSADIIMILCGLVGDLSGPA
GTTTGGTCTGGTCTTGCTTACCTTGCTATGGCG	RYVYFGIGVAALVVVFALTWGPLRRVAEQDPE
CTTGGTTTAGGCACTGCCGAAATTGCTGGCCAA	IGGIYRKVAAYLALFWIGYPLTWILGPSGLGI
ACTACATACTGGGCGAGATATGCCGATTGGGTT	VGQTVDTTLFILLPIFSKVGFSIVDLGMLRAA
GTTACTACACCTCTTTTACTTACAGCTTTATGG	GGTGCAAHE
ATGACTGCCGTTACACGTTCTGATAAGTCTAAG	
CATGTTCCCTCTTCTTTTAGGTCTTGTTTCTGCG	
GATATTATCATGATCCTTTGCGGTTTAGTTGGC	
GATCTTTCTTCTGGCCCTGCCAGATACGTTTAT	
TTTGGTATAGGCGTTGCCGCTCTTGTTGTTGTT	
TTTGCCCTTACTTGGGGTCCTTTAAGACGTGTT	
GCTGAACAAGATCCTGAAATAGGTGGCATCTAC	
CGTAAAGTTGCGGCCTATCTTGCGTTATTTTGG	
ATAGGTTACCCCTCTTACTTGGATTTTAGGCCCT	
TCTGGTCTTGGCATCGTTGGTCAAACAGTTGAT	
ACTACACTTTTATTCTTCTTCCTATATTTTCT	
AAGGTTGGCTTTTCTATAGTTGACCTGGGTATG	
CTAAGAGCGGCGGGTGGTACGGGCTGTGCTGCT	
CACGAGTAG	

[図8]

塩基配列	アミノ酸配列
ATGGACCCTATTGCGCTACAGGCGGGCTATGAC	MDPIALQAGYDLLGDGRPETLWLGIGTLLMLI
CTACTTGCGGACGGCAGACCTGAGACACTTTGG	GTFYFLVRGWGVTDKDAREYYAVTILVPGIAS
CTTGGTATCGGCACTTTACTGATGCTTATAGGT	AAYLSMFFGIGLTEVTVGGEMLDIYYARYADW
ACTTTTACTTTCTTGTTAGAGGTTGGGGCGTT	LFTTPLLLLLDLALLAKVDRVTIGTLVGVDALM
ACAGATAAAGATGCGCGTGAATACTATGCCGTT	IVTGLIGALSHTAIARYSWWLFSTICMIVVLY
ACTATCTTAGTTCCTGGCATAGCTTCTGCTGCG	FLATSLRSAAKERGPEVASTFNTLTALVVLW
TACTTATCTATGTTTTTTCGGTATCGGCCTTACT	TAYPILWIIIGTEGAGVVGLGIETLLFMVLDVT
GAAGTTACAGTTGGTGGCGAAATGCTTGATATA	AKVGFGFILLRSRAILGDTEAPEPSAGADVSA
TACTACGCTAGATACGCGGATTGGCTTTTTACT	AD
ACACCTCTTCTTCTTCTTGATCTTGCCCTTTTA	
GCTAAGGTTGATCGTGTTACTATAGGTACATTA	
GTTGGCGTTGATGCTCTTATGATTGTTACTGGT	
TTAATCGGCGCGCTTTCTCATACAGCGATCGCC	
AGATACTCTTGGTGGTTATTTTCTACAATATGC	
ATGATTGTTGTTCTTTATTTTCTTGC GACTTCT	
CTTAGATCTGCCGCTAAAGAACGTGGTCCTGAA	
GTTGCTTCTACTTTTAACACTTTAACAGCGCTT	
GTTTTAGTTCTTTGGACTGCCTATCCTATTCTT	
TGGATTATCGGCACAGAAGGTGCTGGCGTTGTT	
GGTTTAGGCATCGAAACTCTTCTTTTATGGTT	
CTTGATGTTACAGCCAAGGTTGGTTTTGGCTTT	
ATACTTTTAAGATCTCGTGCTATTCTTGGCGAC	
ACAGAAGCCCCTGAGCCTAGTGCTGGTGCGGAT	
GTTAGTGCTGCGGATTAG	

[図9]

アミノ酸配列
MDPIALQAGYDLLGDGRPETLWLGIGTLLMLI
GTFYFLVRGWGVTDKDAREYYAVTILVPGIAS
AAYLSMFFGIGLTEVTVGGEMLDIYYARYADW
LFTTPLLLLLDLALLAKVDRVTIGTLVGVDALA
IVTGLIGALSHTAIARYSWWLF <u>A</u> TICMIVVLY
FLATSLRSAAKERGPEVASTFNTLTALVVLW
TAYPILWIIIGTEGAGVVGLGIETLLFMVLDVT
<u>T</u> KVGFGFILLRSRAILGDTEAPEPSAGADVSA
AD

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/021364

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 1/13(2006.01)i; *C12N 1/12*(2006.01)i; *C12N 5/10*(2006.01)i; *C12N 15/31*(2006.01)i; *C12P 1/00*(2006.01)i
FI: C12N1/13; C12N1/12 A; C12N5/10 ZNA; C12N15/31; C12P1/00 Z

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)

C12N1/13; C12N1/12; C12N5/10; C12N15/31; C12P1/00

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

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2022
Registered utility model specifications of Japan 1996-2022
Published registered utility model applications of Japan 1994-2022

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NAGASE, Yurie et al. Expression of proton pump rhodopsins in the chloroplast of the alga <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> for optical control of proton gradient. 生物物理, 2018, vol. 58, supplements 1-2, p. S412, 3Pos044 abstract	1-11
Y	abstract, (Seibutsu Butsuri)	1-11
X	NAGASE, Yurie et al. Optical control of non-photochemical quenching (NPQ) in the alga <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> by light-driven proton pump rhodopsins. 生物物理, 2019, vol. 59, supplements 1-2, p. S293, 1Pos234 abstract	1-3, 7-11
Y	abstract, (Seibutsu Butsuri)	1-11
X	JP 2011-516029 A (JOULE UNLIMITED, INC.) 26 May 2011 (2011-05-26) abstract, claims, paragraphs [0064], [0156]-[0163]	1, 3, 7-11
Y	abstract, claims, paragraphs [0064], [0156]-[0163]	1-11



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

02 August 2022

Date of mailing of the international search report

16 August 2022

Name and mailing address of the ISA/JP

**Japan Patent Office (ISA/JP)
3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915
Japan**

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/021364

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	神取秀樹, ロドプシンの作動メカニズム, 生化学, 2019, vol. 91, no. 4, pp. 472-481 p. 473, left column, 2nd paragraph, p. 475, left column, 2nd paragraph, (KANDORI, Hideki. Mechanism of Rhodopsin Function. SEIKAGAKU.)	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/021364

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2022/021364

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP	2011-516029	A	26 May 2011	US 2009/0203070 A1 abstract, claims, paragraphs [0072], [0167]-[0174] WO 2009/062190 A2 EP 2217695 A2	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12N 1/13(2006.01)i; C12N 1/12(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; C12N 15/31(2006.01)i; C12P 1/00(2006.01)i FI: C12N1/13; C12N1/12 A; C12N5/10 ZNA; C12N15/31; C12P1/00 Z		
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）） C12N1/13; C12N1/12; C12N5/10; C12N15/31; C12P1/00		
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 1971-2022年 日本国実用新案登録公報 1996-2022年 日本国登録実用新案公報 1994-2022年		
国際調査で利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)		
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	NAGASE Yurie et al., Expression of proton pump rhodopsins in the chloroplast of the alga Chlamydomonas reinhardtii for optical control of proton gradient, 生物物理, 2018, Vol.58, SUPPLEMENT 1-2, p.S412, 3Pos044	1-11
Y	要約	1-11
X	NAGASE Yurie et al., Optical control of non-photochemical quenching (NPQ) in the alga Chlamydomonas reinhardtii by light-driven proton pump rhodopsins, 生物物理, 2019, Vol.59, SUPPLEMENT 1-2, p.S293, 1Pos234	1-3, 7-11
Y	要約	1-11
X	JP 2011-516029 A (ジュール アンリミテッド インコーポレイテッド) 26.05.2011 (2011-05-26)	1, 3, 7-11
Y	[要約][特許請求の範囲][0064][0156]-[0163] [要約][特許請求の範囲][0064][0156]-[0163]	1-11
☒ 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、一般の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抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “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 02.08.2022		国際調査報告の発送日 16.08.2022
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		権限のある職員（特許庁審査官） 原 大樹 4B 5278 電話番号 03-3581-1101 内線 3488

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
A	神取秀樹, ロドプシンの作動メカニズム, 生化学, 2019, Vol.91, No.4, p.472-481 473頁左欄第2段落・475頁左欄第2段落	1-11

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

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

- a. ☒ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
 ☒ 附属書C/ST.25テキストファイル形式
 ☐ 紙形式又はイメージファイル形式
- b. ☐ 国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c. ☐ 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
 ☐ 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))
 ☐ 紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)

2. ☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:

國際出願番号
PCT/JP2022/021364

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP	2011-516029	A	26.05.2011	US 2009/0203070 A1 [要約][特許請求の範囲] [0072][0167]－[0174] WO 2009/062190 A2 EP 2217695 A2	