

(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
2017年7月20日(20.07.2017)



(10) 国際公開番号

WO 2017/122368 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 1/12 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/058004
- (22) 国際出願日: 2016年3月14日(14.03.2016)
- (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 2016-006440 2016年1月15日(15.01.2016) JP
- (71) 出願人: 三島光産株式会社(MISHIMA KOSAN CO., LTD.) [JP/JP]; 〒8058503 福岡県北九州市八幡東区枝光2丁目1番15号 Fukuoka (JP). シキソンプワー株式会社(SIXONPOWER CO., LTD.) [JP/JP]; 〒8140001 福岡県福岡市早良区百道浜1丁目3番70号 Fukuoka (JP). 国立大学法人九州工業大学(KYUSHU INSTITUTE OF TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒8048550 福岡県北九州市戸畑区仙水町1-1 Fukuoka (JP).
- (72) 発明者: 木寺 啓二(KIDERA Keiji); 〒8058503 福岡県北九州市八幡東区枝光2丁目1番15号 三島光産株式会社内 Fukuoka (JP). 谷口 史樹(TANIGUCHI Shiki); 〒8058503 福岡県北九州市八幡東区枝光2丁目1番15号 三島光産株式会社内 Fukuoka (JP). 東島 敦弘(HIGASHIJIMA At-

suhiro); 〒8058503 福岡県北九州市八幡東区枝光2丁目1番15号 三島光産株式会社内 Fukuoka (JP). 中 利明(ATARI Toshiaki); 〒8058503 福岡県北九州市八幡東区枝光2丁目1番15号 三島光産株式会社内 Fukuoka (JP). 福留 裕文(FUKUTOME Hirofumi); 〒8140001 福岡県福岡市早良区百道浜1丁目3番70号 シキソンプワー株式会社内 Fukuoka (JP). 脇坂 港(WAKI-SAKA Minato); 〒8080196 福岡県北九州市若松区ひびきの2-4 国立大学法人九州工業大学内 Fukuoka (JP). 野上 礼次郎(NOGAMI Reijiro); 〒8080196 福岡県北九州市若松区ひびきの2-4 国立大学法人九州工業大学内 Fukuoka (JP).

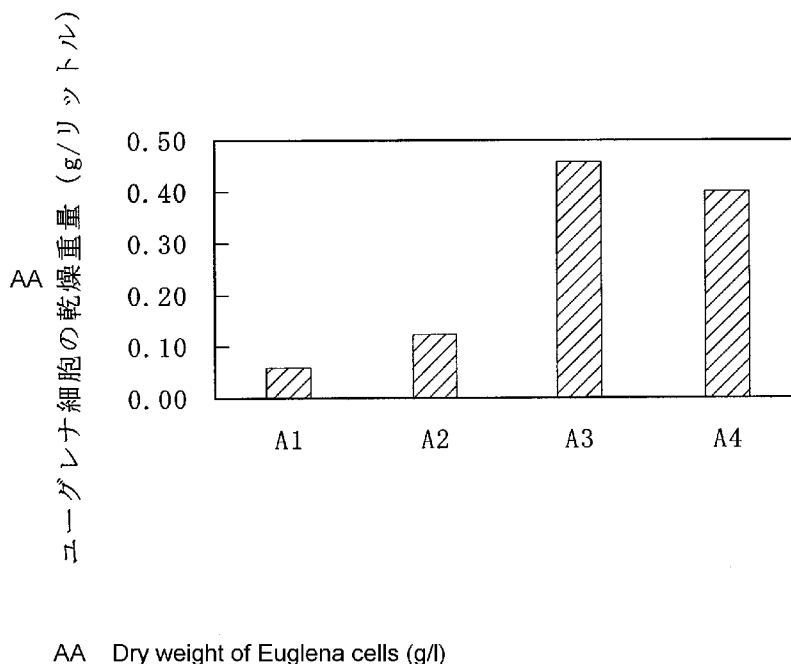
(74) 代理人: 中前 富士男(NAKAMAE Fujio); 〒8028691 福岡県北九州市小倉北区浅野2丁目13番23号 幹線ビル401号 中前国際特許商標事務所 Fukuoka (JP).

(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,

[続葉有]

(54) Title: GROWTH PROMOTION METHOD FOR OXYGEN-GENERATING PHOTOSYNTHETIC ORGANISM

(54) 発明の名称: 酸素発生型光合成を行う生物の増殖促進方法



(57) Abstract: A culture promoter comprising a pyrrole compound is added to a medium in which an oxygen-generating photosynthetic organism is grown and then the medium is kept under the growth conditions of the organism. The aforesaid pyrrole compound preferably comprises a tetrapyrrole compound and an alga is usable as the oxygen-generating photosynthetic organism. Thus, a growth promotion method for an oxygen-generating photosynthetic organism, which can be carried out by an economical, safe and simple procedure, is provided.

(57) 要約: ピロール化合物を含む培養促進剤を、酸素発生型光合成を行う生物が生育する培地に添加し、培地を生物の増殖条件に保持する。ここで、ピロール化合物はテトラピロール化合物を含むことが好ましく、酸素発生型光合成を行う生物として藻類を用いることができる。これによって、安価、安全かつ簡便な手法により達成することが可能な酸素発生型光合成を行う生物の増殖促進方法を提供する。



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

発明の名称 : 酸素発生型光合成を行う生物の増殖促進方法

技術分野

[0001] 本発明は、酸素発生型光合成を行う生物の増殖促進方法に関する。

背景技術

[0002] 酸素発生型光合成を行う生物から、コケ植物、シダ植物、及び種子植物を除いたもの（従って、水中に存在する酸素発生型光合成を行う生物）を藻類といい、その中で顕微鏡サイズ（ミクロン単位の大きさ）の藻類は微細藻類と呼ばれ、約10万種が多様な環境中に生息している。近年、微細藻類は、光合成による二酸化炭素固定能力が高いこと、食品、医薬品、更にバイオ燃料等の原料となる有用物質（例えば、脂質）の生産能力が高いこと、通年での収穫が可能であること等の理由から、バイオマス資源として注目されている。

[0003] ここで、微細藻類による有用物質の生産量は、個々の微細藻類に含まれる有用物質の含有量と微細藻類の個体数との積に比例する。しかしながら、自然条件下では微細藻類の増殖速度は遅く、有用物質の生産効率も低いという問題がある。このため、微細藻類による有用物質生産の実用化（商業ベースで利用）に向けては、微細藻類による有用物質の生産効率向上と微細藻類の増殖速度向上（大量培養）を人工的に図る必要があり、特に微細藻類の大量培養の効率化（即ち、培養工程の経済性改善）が大きな課題となっている。

[0004] 微細藻類の大量培養による有用物質生産の実用化に向けては、微細藻類のスクリーニングや微細藻類の遺伝子組換え等の様々な取り組みが国内外において報告されている。しかしながら、スクリーニングにより増殖速度の大きな微細藻類の有望種を選抜するには長い時間と多くの費用を要するという問題がある。一方、遺伝子組換え株を屋外で培養する場合は種々の制約が伴うと共に、遺伝子組換え株が培養地外に飛散した際の環境に及ぼす影響には不明な点が多いという問題がある。

そこで、有用物質の生産効率が高いと期待されている微細藻類を用いて、その培地に増殖を促進する化学物質を添加して微細藻類を大量培養して、有用物質生産の実用化を図ることが提案されている（例えば、非特許文献1～3参照）。

先行技術文献

非特許文献

[0005] 非特許文献1：野上礼次郎、脇坂港、「アルギン酸オリゴマーの添加によるスピルリナの増殖促進」、第17回マリンバイオテクノロジー学会大会講演要旨集、2015年5月30日、p. 109

非特許文献2：野上礼次郎、脇坂港、「アルギン酸オリゴマーの添加によるユーグレナの増殖促進」、第16回マリンバイオテクノロジー学会大会講演要旨集、2014年5月31日、p. 61

非特許文献3：野上礼次郎、脇坂港、CHE MAAIL Che Mohd Hakiman「アルギン酸オリゴマーの添加によるボトリオコッカスの増殖促進」、2014年生態工学会年次大会発表論文集、p. 83－84

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 微細藻類の大量培養により有用物質生産の実用化を図るには、微細藻類の増殖率を、現状の増殖率に対して少なくとも2～3倍に向上させる必要があるとされており、非特許文献1～3に記載された方法では、微細藻類の増殖を更に向上させるには至っていない。このため、微細藻類の増殖速度を高位に維持し安定して培養できる培養条件が見出された際に、微細藻類の増殖速度を更に促進する作用を示す安価で安全（環境に及ぼす影響がなく）、かつ使用方法が簡便となる新たな化学物質が求められている。

[0007] 本発明はかかる事情に鑑みてなされたもので、安価、安全かつ簡便な手法により達成することが可能な酸素発生型光合成を行う生物の増殖促進方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、酸素発生型光合成を担う葉緑素クロロフィルは、分子式 C_4H_5N の五員環構造（ピロール環構造）4個が炭素原子を1個ずつ挟んで結合したテトラピロール環構造の一つであるクロリン環を有する化合物であるため、葉緑素クロロフィルの原料となるピロール化合物を含む培地で微細藻類を培養すれば、光合成が促進されることによって微細藻類の増殖も促進されるとの仮設に基づき種々研究を重ねた結果、WO2009/069806号公報に記載の大腸菌によるバイオ生産で得られたテトラピロール化合物を含むピロール化合物を微細藻類の培地に加えることにより、微細藻類の増殖の促進を安価、安全かつ簡便な手法により達成できることを見出し、本発明を完成するに至った。

即ち、本発明に係る酸素発生型光合成を行う生物の増殖促進方法は、ピロール化合物を含む培養促進剤を、酸素発生型光合成を行う生物が生育する培地に添加し、該培地を前記生物の増殖条件に保持することにより行っている。

発明の効果

[0009] 本発明に係る酸素発生型光合成を行う生物の増殖促進方法においては、培養促進剤に含まれるピロール化合物は、葉緑素クロロフィルのクロリン環の構造の一部であるため安全である。即ち、自然界に存在している物質であるため、環境に与える影響はない。

そして、培養促進剤を酸素発生型光合成を行う生物の培地に添加し、培養促進剤が添加された培地を酸素発生型光合成を行う生物の増殖条件下に保持するだけなので、簡便な手法により酸素発生型光合成を行う生物の増殖を行うことができる。その結果、酸素発生型光合成を行う生物の大量増殖を、安価、安全かつ簡便な方法で行うことが可能になる。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]実験例1におけるユーグレナの培養結果の説明図である。

[図2]実験例2におけるボトリオコッカスの培養結果の説明図である。

[図3]実験例3におけるスピルリナの培養結果の説明図である。

発明を実施するための形態

[0011] 本発明の一実施例に係る酸素発生型光合成を行う生物の増殖促進方法は、例えば、遺伝子 $y p j D (b 2 6 1 1)$ が変異により発現できなくなった大腸菌によるバイオ生産で得られたピロール化合物を、酸素発生型光合成を行う生物の一例である微細藻類が生育する培地に添加し、培地を微細藻類の増殖条件に保持する。

なお、大腸菌によるバイオ生産ではピロール化合物が安価かつ大量に得られるので、培養促進剤を安価に製造することが可能になる。

[0012] 本発明の方法で培養される微細藻類（藻類の一例）は、酸素発生型光合成を行い、主要な光合成色素としてクロロフィルを含有するものが好ましく、例えば、原核生物であるラン藻類、真核生物のスーパーグループにおける灰色植物、緑色植物、クリプト藻類、不等毛植物、ハプト藻類、渦鞭毛藻類、ユーグレナ藻類、クロララクニオン藻類、クロメラ藻類等が挙げられる。

また、微細藻類の増殖条件とは、微細藻類毎に従来から推奨されている一般的な増殖条件（増殖速度を高位に維持し安定して培養できる条件）であればよい。

[0013] 大腸菌は貧栄養培地中で培養する。このとき、大腸菌を貧栄養培地以外の適当な培地、例えば、LB培地等の培地中で前培養し（15～40℃の温度で6～24時間培養した後）、得られた前培養物を貧栄養培地に接種して本培養（20℃～40℃の温度で12時間～96時間かけて培養）することが好ましい。大腸菌の培養条件は、大腸菌に対する一般的な条件であればよい。

なお、貧栄養培地として、例えば、脱イオン水1リットル中に、 KH_2PO_4 を9g、 K_2HPO_4 を21g、 $(NH_4)_2SO_4$ を2g、クエン酸二水和物を1g、グルコースを3.6g、及び $MgSO_4$ を100mg溶解させた水溶液を使用することができる。

[0014] 大腸菌の培養中に、大腸菌からはテトラピロール化合物、テトラピロール化合物前駆体等のピロール化合物（培養物）が菌体外に排出され、排出されたピロール化合物は貧栄養培地中に混入する。このため、大腸菌の培養が終了

した貧栄養培地を遠心分離機にかけて懸濁物（大腸菌細胞の凝集体）を沈殿させ、得られた上澄液をフィルター（ポアサイズ0.22 μm ）で濾過することにより、大腸菌が除去された状態のピロール化合物を含む培養促進剤を得ることができる。

なお、培養促進剤中の水分量を調整することにより、培養促進剤中のピロール化合物の濃度を任意の値に調整することができる。これにより、培地に培養促進剤を添加した際における培地中のピロール化合物の含有量（より詳細には、ピロール化合物を含む窒素化合物の含有量）の調整（例えば、16～560ミリグラム／リットルに調整）が容易にできる。

実験例

[0015] 以下に、微細藻類として、ユーグレナ、ボトリオコッカス、スピルリナを用いた実験例について説明する。

（実験例1）

ユーグレナ（NIES-48株）の培養を行った。培養は、30ミリリットルのスクリーキャップ試験管内に注入した10ミリリットルの培地に一定重量のユーグレナを加え、スクリーキャップ試験管をインキュベーター庫内に静置し、空気を通気しながら温度を22～26℃、白色蛍光灯を用いて照度を6000～6500 Lux、白色蛍光灯の点灯時間と消灯時間をそれぞれ12時間とする明暗サイクルの条件下で、35日間行った。なお、スクリーキャップ試験管は、1日おきに振盪させた。

[0016] 培地は、A1（AF-6培地が10ミリリットル）、A2（AF-6培地9ミリリットルと培養促進剤1ミリリットルの混合物）、A3（AF-6培地5ミリリットルと培養促進剤5ミリリットルの混合物）、及びA4（培養促進剤10ミリリットル）の4種類である。なお、AF-6培地1リットル当たりの組成は、 NaNO_3 が140mg、 NH_4NO_3 が22mg、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ が30mg、 KH_2PO_4 が10mg、 K_2HPO_4 が5mg、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ が10mg、Fe-citrateが2mg、Citric acidが2mg、Biotinが2 μg 、Thiamine HClが2 μg 、VitaminB₆が10 μg 、Vitamin

B₁₂が1 μ g、Na₂EDTA・2H₂Oが5mg、FeCl₆・6H₂Oが0.98mg、MnCl₂・4H₂Oが180 μ g、ZnCl₂が52 μ g、CoCl₂・6H₂Oが20 μ g、Na₂MoO₄・2H₂Oが12.5 μ g、Distilled Waterが1リットルである。また、培養促進剤中のピロール化合物を含む窒素化合物の含有量は560mg／リットルであり、その中にはポルフィリン環構造を持つピロール化合物16mg／リットルも含まれる。

[0017] 培養が終了したA1～A4からそれぞれ5ミリリットルの細胞懸濁液をスウィネスフィルターホルダーに挿入した ϕ 25のGF／Cフィルターを用いて濾過し、濾過後にGF／Cフィルターから取り出した使用済み濾紙をシャーレ内に入れて、105℃の乾燥庫で5時間乾燥させた。乾燥後、使用済み濾紙を収容したシャーレをデシケータ内に移して冷却し、冷却後に使用済み濾紙を収容したシャーレの重量を測定した。そして、使用済み濾紙を収容したシャーレの重量から、予め求めておいた濾紙乾燥重量とシャーレ乾燥重量を差し引くことにより、5ミリリットルの細胞懸濁液中に存在していたユーグレナの乾燥重量を算出した。図1に、A1～A4より採取した5ミリリットルの細胞懸濁液中にそれぞれ含まれていたユーグレナの乾燥重量を示す。

[0018] 図1に示すように、A1（AF－6培地のみ）で増殖させる場合の増殖速度に対して、培養促進剤を添加したすべての培地A2～A4では大きな増殖速度を示すことが確認でき、培養促進剤を10倍希釈した培地（A2）では2倍、培養促進剤を2倍希釈した培地（A3）では7.7倍、培養促進剤のみの培地（A4）では6.7倍となった。

また、図1は、ユーグレナの増殖速度を増大させる培地中に含まれる培養促進剤の希釈率（ピロール化合物を含む窒素化合物の含有量）には最適値が存在することを示しており、ピロール化合物を含む窒素化合物を過剰に添加することは、培養促進剤のコスト増加につながり好ましくない。

[0019] （実験例2）

ボトリオコッカス（NIES－2199株）の培養を行った。培養は、30ミリリットルのスクリーキャップ試験管内に注入した10ミリリットルの

培地に一定重量のボトリオコッカスを加え、スクリーキャップ試験管をインキュベーター庫内に静置し、空気を通気しながら温度を22～26℃、白色蛍光灯を用いて照度を6000～6500 Lux、白色蛍光灯の点灯時間と消灯時間をそれぞれ12時間とする明暗サイクルの条件下で、65日間行った。なお、スクリーキャップ試験管は、1日おきに振盪させた。

[0020] 培地は、B1（BG11培地が10ミリリットル）、B3（BG11培5ミリリットルと培養促進剤5ミリリットルの混合物）、及びB4（培養促進剤10ミリリットル）の3種類である。なお、BG11培地1リットル当たりの組成は、 NaNO_3 が1500mg、 $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ が40mg、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ が75mg、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ が36mg、Ferric ammonium citrateが6mg、Citric acidが6mg、 $\text{Na}_2\text{EDTA-Mg}$ が1mg、 Na_2CO_3 が20mg、 H_3BO_3 が2.86mg、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ が1.81mg、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ が0.222mg、 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ が0.39mg、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ が79μg、 $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ が49μg、Distilled Waterが1リットルである。また、培養促進剤中のピロール化合物を含む窒素化合物の含有量は560mg／リットルであり、その中にはポルフィリン環構造を持つピロール化合物16mg／リットルも含まれる。

[0021] 培養が終了したB1、B3、B4からそれぞれ5ミリリットルの細胞懸濁液をスウィネスフィルターホルダーに挿入したφ25のGF/Cフィルターを用いて濾過し、実験例1と同様の方法で、5ミリリットルの細胞懸濁液中に存在していたボトリオコッカスの乾燥重量を算出した。図2に、B1、B3、B4より採取した5ミリリットルの細胞懸濁液中にそれぞれ含まれていたボトリオコッカスの乾燥重量を示す。

[0022] 図2に示すように、B1（BG11培地のみ）で増殖させる場合の増殖速度に対して、培養促進剤を添加した培地B3、B4では大きな増殖速度を示すことが確認でき、培養促進剤を2倍希釈した培地（B3）では23倍、培養促進剤のみの培地（B4）では5倍となった。

また、図2は、ボトリオコッカスの増殖速度を増大させる培養促進剤の希釈率（ピロール化合物を含む窒素化合物の含有量）には最適値が存在することを示しており、ピロール化合物を含む窒素化合物を過剰に添加することは、培養促進剤のコスト増加につながり好ましくない。

[0023] （実験例3）

スピルリナ（NIES-39株）の培養を行った。培養は、30ミリリットルのスクリーキャップ試験管内に注入した10ミリリットルの培地に一定重量のスピルリナを加え、スクリーキャップ試験管をインキュベーター庫内に静置し、空気を通気しながら温度を22～26℃、白色蛍光灯を用いて照度を6000～6500Lux、白色蛍光灯の点灯時間と消灯時間をそれぞれ12時間とする明暗サイクルの条件下で行った。なお、スクリーキャップ試験管は、1日おきに振盪させた。

[0024] 培地は、S1（SOT培地が10ミリリットル）、S2（SOT培地9ミリリットルと培養促進剤1ミリリットルの混合物）、S3（SOT培地5ミリリットルと培養促進剤5ミリリットルの混合物）、及びS4（培養促進剤10ミリリットル）の4種類である。なお、SOT培地1リットル当たりの組成は、 NaHCO_3 が16800mg、 K_2HPO_3 が500mg、 NaNO_3 が2500mg、 K_2SO_4 が1000mg、 NaCl が1000mg、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ が200mg、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ が40mg、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ が10mg、 $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ が80mg、 H_3BO_3 が2.86mg、 $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ が2.5mg、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ が0.22mg、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ が80μg、 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ が20μg、Distilled Waterが1リットルである。また、培養促進剤中のピロール化合物を含む窒素化合物の含有量は560mg／リットルであり、その中にはポルフィリン環構造を持つピロール化合物16mg／リットルも含まれる。

[0025] 培養を開始してから14日経過したS1～S4からそれぞれ5ミリリットルの細胞懸濁液をスウィネスフィルターホルダーに挿入したφ25のGF/Cフィルターを用いて濾過し、実験例1と同様の方法で、5ミリリットルの細

胞懸濁液中に存在していたスピルリナの乾燥重量を算出した。図3に、S1～S4より採取した5ミリリットルの細胞懸濁液中にそれぞれ含まれていたスピルリナの乾燥重量を示す。

[0026] 図3に示すように、S1（SOT培地のみ）で増殖させる場合の増殖速度に対して、

培養促進剤を10倍希釈した培地（S2）では1.04倍、培養促進剤を2倍希釈した培地（S3）では1.7倍となったが、培養促進剤のみの培地（S4）では増殖が見られず、個体数の減少が生じた。

このことから、ピロール化合物を培地に加えてスピルリナの増殖速度を増大させる場合、培養促進剤の希釈率（ピロール化合物を含む窒素化合物の含有量）の最適値はかなり狭い範囲に存在することが分かった。

[0027] 以上、本発明を、実施例を参照して説明してきたが、本発明は何ら上記した実施例に記載した構成に限定されるものではなく、請求の範囲に記載されている事項の範囲内で考えられるその他の実施例や変形例も含むものである。例えば、本実施例では、ピロール化合物を含む培養促進剤は、大腸菌の培地からの抽出物を用いて作製した（A法）が、大腸菌を除去した培地を用い、水分量を調整することにより作製する（B法）こともできる。B法は処理の簡略化が可能で安価に培養できるが、A法はピロール化合物の含有率が高くなる。

なお、本発明において、酸素発生型光合成を行う生物として微細藻類を例に挙げて説明したが、培地で培養でき酸素発生型光合成を行う生物（水中で生存可能な藻類がより好ましい）であれば、本発明に適用できる。

産業上の利用可能性

[0028] 本発明に係る酸素発生型光合成を行う生物の増殖促進方法において、培地に添加する培養促進剤に含まれるピロール化合物は、葉緑素クロロフィルのクロリン環の構造の一部であり、自然界に存在している物質であるため、環境に与える影響はない。

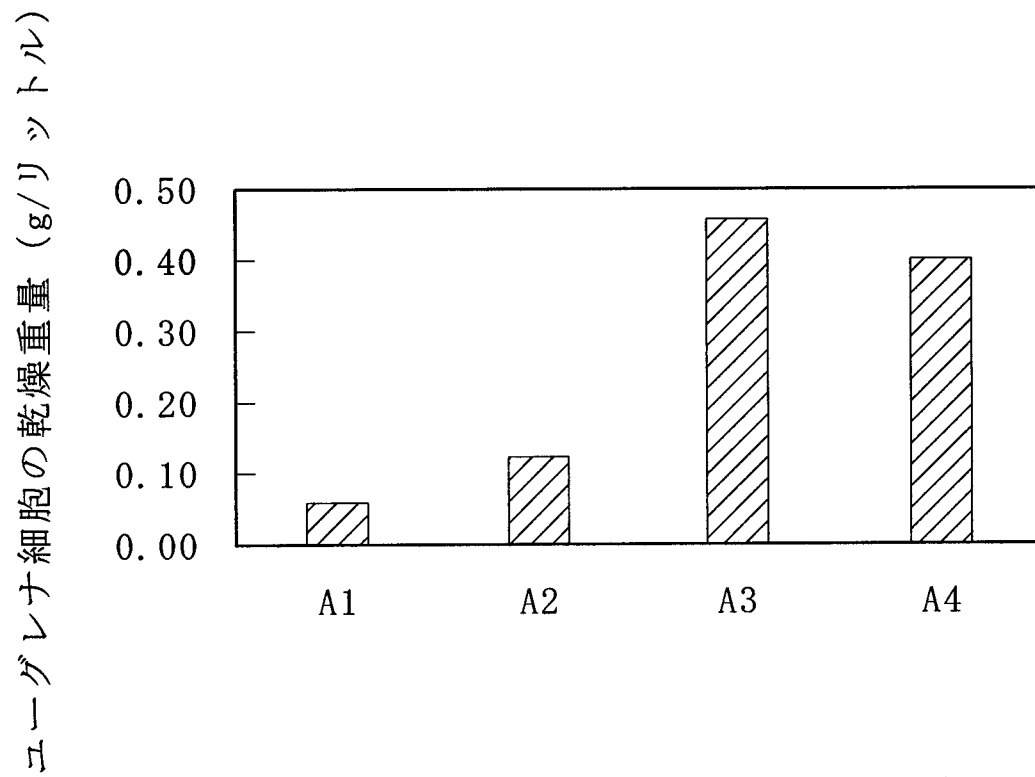
そして、簡便な手法により酸素発生型光合成を行う生物の増殖を行うことが

できる。その結果、酸素発生型光合成を行う生物の大量増殖を、安価、かつ自然界に悪影響を与えることなく、安全かつ簡便な方法で行うことが可能になる。

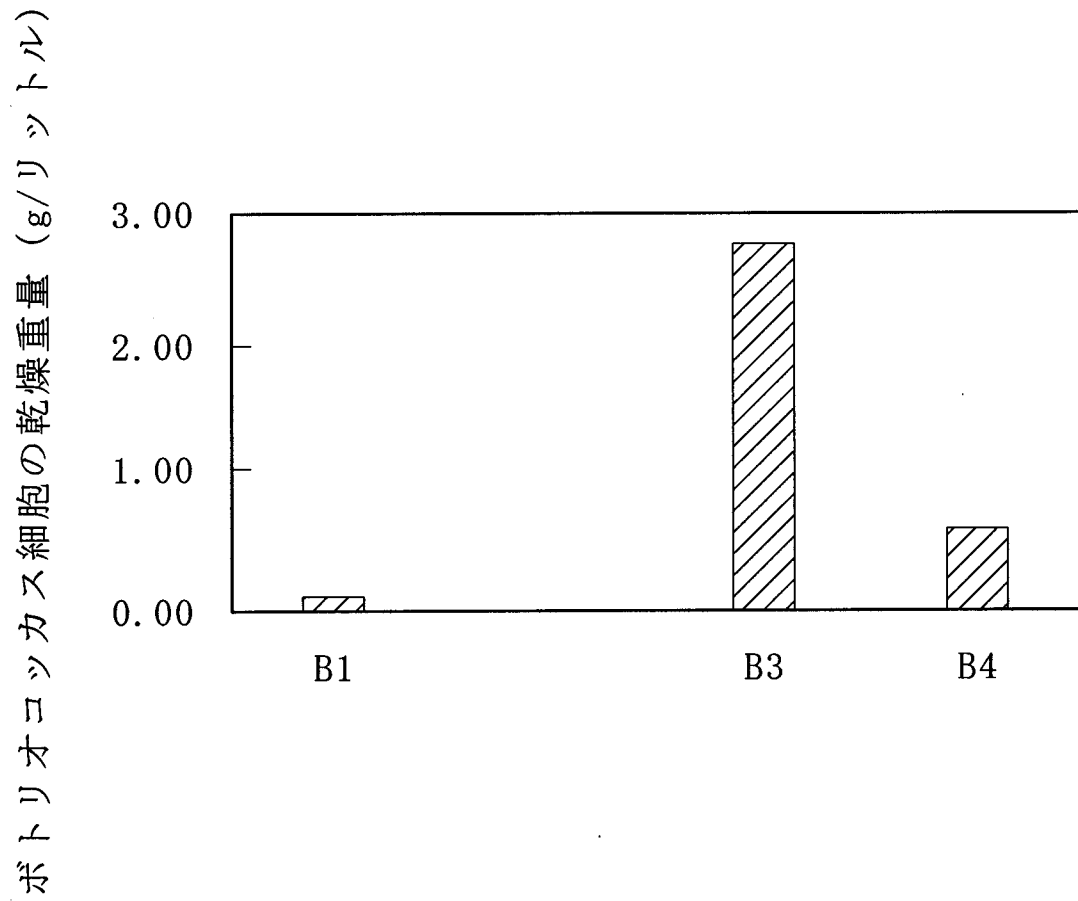
請求の範囲

- [請求項1] ピロール化合物を含む培養促進剤を、酸素発生型光合成を行う生物が生育する培地に添加し、該培地を前記生物の増殖条件に保持することを特徴とする酸素発生型光合成を行う生物の増殖促進方法。
- [請求項2] 請求項1記載の酸素発生型光合成を行う生物の増殖促進方法において、前記ピロール化合物はテトラピロール化合物を含むことを特徴とする酸素発生型光合成を行う生物の増殖促進方法。
- [請求項3] 請求項1又は2記載の酸素発生型光合成を行う生物の増殖促進方法において、前記生物は藻類であることを特徴とする酸素発生型光合成を行う生物の増殖促進方法。
- [請求項4] 請求項3記載の酸素発生型光合成を行う生物の増殖促進方法において、前記培地に含まれる前記ピロール化合物を含む窒素化合物の濃度を16～560ミリグラム／リットルに調整することを特徴とする酸素発生型光合成を行う生物の増殖促進方法。

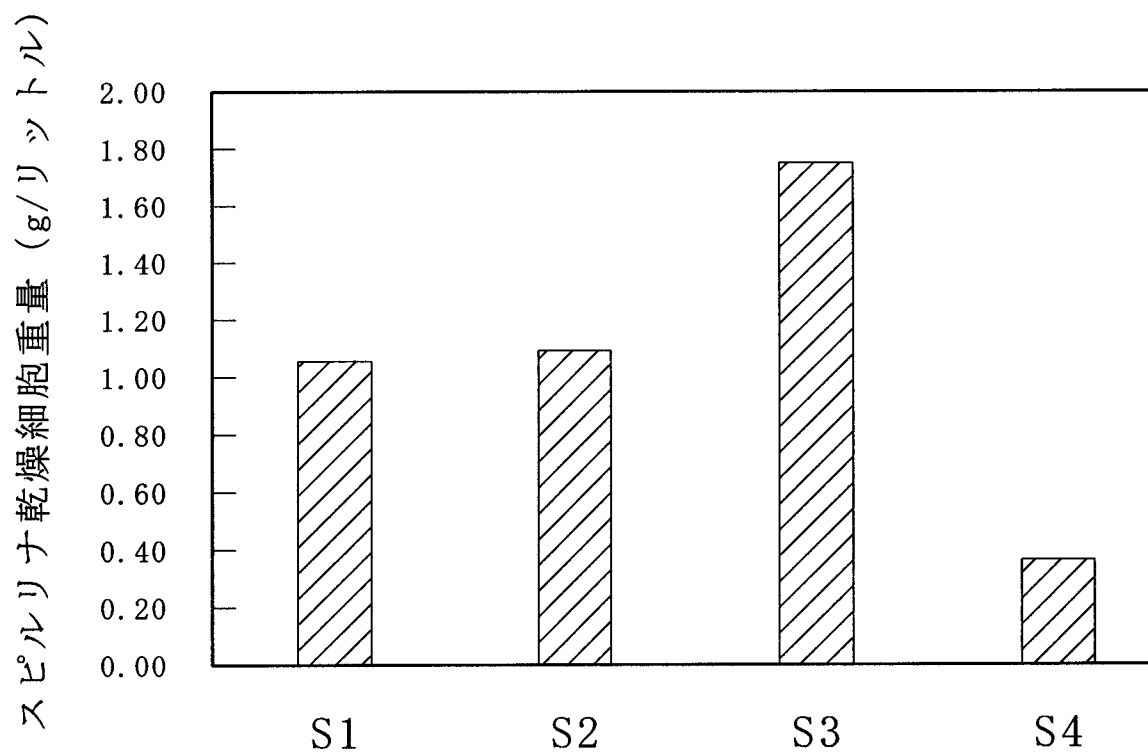
[図1]



[図2]



[図3]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/058004

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N1/12(2006.01) i

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)

C12N1/12

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/BIOSIS/MEDLINE/EMBASE/WPIDS/WPIX/REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CROFT, M.T. et al., Algae acquire vitamin B ₁₂ through a symbiotic relationship with bacteria, Nature, (2005) Vol.438, pp.90-93, ISSN: 0028-0836, page 90, abstract, table 1, fig. S3	1-4
X	JP 05-056777 A (Shiro NAGAI), 09 March 1993 (09.03.1993), claims; paragraphs [0011], [0016], [0023]; examples 1, 3 (Family: none)	1-4
X	JP 2014-108101 A (University of Tsukuba), 12 June 2014 (12.06.2014), claims; paragraph [0017]; examples (Family: none)	1-4

☒ 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
01 June 2016 (01.06.16)

Date of mailing of the international search report
14 June 2016 (14.06.16)

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/JP2016/058004

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2004-509625 A (BASF AG.), 02 April 2004 (02.04.2004), paragraph [0033] & US 2003/0170775 A1 paragraph [0035] & EP 1322766 A2 & WO 2002/024917 A2	1-4
A	WO 2010/092997 A1 (Mie University), 19 August 2010 (19.08.2010), paragraph [0008] & US 2011/0319609 A1 paragraph [0021] & EP 2397557 A1	1-4
A	WO 2009/069806 A1 (Hirofumi FUKUTOME), 04 June 2009 (04.06.2009), entire text & US 2010/0280236 A1 entire text & EP 2216411 A1	1-4

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N1/12 (2006.01) i

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. C12N1/12

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/BIOSIS/MEDLINE/EMBASE/WPIDS/WPIX/REGISTRY (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	CROFT, M.T. et al., Algae acquire vitamin B ₁₂ through a symbiotic relationship with bacteria, Nature, (2005) Vol.438, pp.90-93, ISSN: 0028-0836 第90頁 要約, 表1, 図S3	1-4

☒ 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

01.06.2016

国際調査報告の発送日

14.06.2016

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)

坂崎 恵美子

4 B

5802

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

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
X	JP 05-056777 A (永井 史郎), 1993. 03. 09, 特許請求の範囲, 【0011】, 【0016】, 【0023】, 実施例1及び3, (ファミリーなし)	1-4
X	JP 2014-108101 A (国立大学法人 筑波大学), 2014. 06. 12, 特許請求の範囲, 【0017】, 実施例 (ファミリーなし)	1-4
A	JP 2004-509625 A (ビーエーエスエフ アクチェンゲセルシャフト), 2004. 04. 02, 【0033】 & US 2003/0170775 A1, [0035] & EP 1322766 A2 & WO 2002/024917 A2	1-4
A	WO 2010/092997 A1 (国立大学法人三重大大学), 2010. 08. 19, [0008] & US 2011/0319609 A1, [0021] & EP 2397557 A1	1-4
A	WO 2009/069806 A1 (福留 裕文), 2009. 06. 04, 全文 & US 2010/0280236 A1, 全文 & EP 2216411 A1	1-4