

(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
2023年10月12日(12.10.2023)



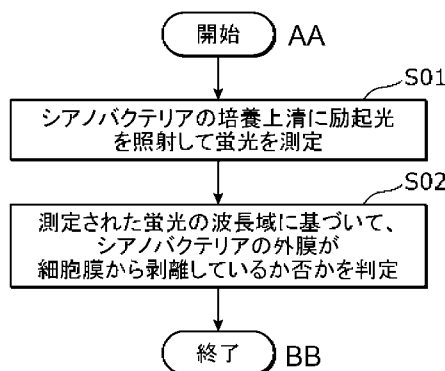
(10) 国際公開番号
WO 2023/195367 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 21/64 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2023/012104
- (22) 国際出願日: 2023年3月27日(27.03.2023)
- (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:
63/328,833 2022年4月8日(08.04.2022) US
特願 2022-117053 2022年7月22日(22.07.2022) JP
- (71) 出願人: パナソニックIPマネジメント株式会社(PANASONIC INTELLECTUAL PROPERTY MANAGEMENT CO., LTD.) [JP/JP]; 〒5406207 大阪府大阪市中央区城見2丁目1番61号 Osaka (JP).
- (72) 発明者: 草間 翔子 (KUSAMA Shoko), 児島 征司(KOJIMA Seiji).
- (74) 代理人: 鎌田 健司, 外 (KAMATA Kenji et al.); 〒5406207 大阪府大阪市中央区城見2丁目1番61号 パナソニックIPマネジメント株式会社内 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, CV, 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, MG, MK, MN, MU, 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.
- (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, CV, GH, GM, KE, LR, LS,

(54) Title: METHOD FOR DETERMINING OUTER MEMBRANE DETACHMENT IN CYANOBACTERIUM, DEVICE FOR DETERMINING OUTER MEMBRANE DETACHMENT IN CYANOBACTERIUM, AND PROGRAM

(54) 発明の名称: シアノバクテリアの外膜剥離の判定方法、シアノバクテリアの外膜剥離の判定装置、及び、プログラム

[図2]



S01... Irradiate culture supernatant of cyanobacterium with excitation light and measure fluorescent light obtained therefrom

S02... Determine whether or not outer membranes of cyanobacterium have been detached from cell walls, on basis of wavelength band of measured fluorescent light

AA ... Start

BB ... End

(57) Abstract: This method for determining outer membrane detachment in a cyanobacterium comprises: a measurement step (S01) for irradiating a culture supernatant of a cyanobacterium with excitation light and measuring fluorescent light obtained therefrom; and a determination step (S02) for determining whether or not outer membranes of the cyanobacterium have been detached from cell walls, on the basis of the wavelength band of the measured fluorescent light.

(57) 要約: シアノバクテリアの外膜剥離の判定方法は、シアノバクテリアの培養上清に対する励起光の照射時に蛍光を測定する測定ステップ(S01)と、測定された蛍光の波長域に基づいて、シアノバクテリアの外膜が細胞壁から剥離しているか否かを判定する判定ステップ(S02)と、を含む。

MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, 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：

- 一 国際調査報告 (条約第21条(3))

明 細 書

発明の名称：

シアノバクテリアの外膜剥離の判定方法、シアノバクテリアの外膜剥離の判定装置、及び、プログラム

技術分野

[0001] 本開示は、シアノバクテリアの外膜剥離の判定方法、シアノバクテリアの外膜剥離の判定装置、及び、プログラムに関する。

背景技術

[0002] シアノバクテリア及び藻類等の光合成微生物は、低環境負荷な次世代の物質生産系を実現するためのツールとして注目を集めている。光合成微生物による物質生産は、常温常圧の環境下で行われ、光をエネルギー源として水と空気中の二酸化炭素（CO₂）とを利用して行われる。さらに、近年の遺伝子操作技術の発展によって、遺伝子組み換え光合成微生物を用いて幅広い化合物種の生産が可能になったことから、光合成微生物による物質生産は、カーボンニュートラルを実現可能な次世代の技術として期待されている。

[0003] このような光合成微生物による物質生産として、例えば、光合成微生物の代謝又は物質の生合成に関与する遺伝子を改変した遺伝子改変株による物質の生産性を向上させる技術が開示されている。当該技術により、例えば、スクロース（非特許文献1）、イソブタノール（非特許文献2）、脂肪酸（非特許文献3）、アミノ酸（非特許文献4）、及び、タンパク質（非特許文献5）等の生産性が向上される。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：国際公開第2021/100640号

非特許文献

[0005] 非特許文献1：Daniel C Ducat et al., “Rerouting Carbon Flux To Enhance Photosynthetic Productivity”, Applied and Environmental Microbiology

gy, American Society for Microbiology, April 2012, Vol.78, No.8, pp.2660-2668

非特許文献2: Shota Atsumi et al., "Direct photosynthetic recycling of carbon dioxide to isobutyraldehyde", Nature Biotechnology, Nature Publishing Group, November 2009, Vol.27, No.12, pp.1177-1180

非特許文献3: Xinyao Liu et al., "Fatty acid production in genetically modified cyanobacteria", The Proceedings of the National Academy of Sciences(PNAS), National Academy of Sciences, April 2011, Vol.108, No.17, pp.6899-6904

非特許文献4: Arnav Deshpande et al., "Combining random mutagenesis and metabolic engineering for enhanced tryptophan production in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803", Applied Environmental Microbiology, May 2020, Vol.86, No.9, e02816-19

非特許文献5: James A. Gregory et al., "Alga-Produced Cholera Toxin-Pfs25 Fusion Proteins as Oral Vaccines", Applied and Environmental Microbiology, American Society for Microbiology, June 2013, Vol.79, No.13, pp.3917-3925

発明の概要

[0006] 例えば、シアノバクテリアの外膜を細胞壁から剥離させた遺伝子改変株によるタンパク質の生産性を向上させる技術（特許文献1）は、光合成微生物による物質生産に非常に重要である。しかしながら、特許文献1に記載の技術では、シアノバクテリアの外膜が細胞壁から剥離しているか否かを、例えば、細胞の電子顕微鏡観察、又は、煩雑な生化学的分析手法を用いて判定する必要があるため、手間がかかる。

[0007] そこで本開示は、外膜が細胞壁から剥離しているか否かを簡便に判定することができるシアノバクテリアの外膜剥離の判定方法、シアノバクテリアの外膜剥離の判定装置、及び、プログラムを提供する。

[0008] 本開示の一態様に係るシアノバクテリアの外膜剥離の判定方法は、シアノ

バクテリアの培養上清に対する励起光の照射時に蛍光を測定する測定ステップと、測定された前記蛍光の波長域に基づいて、前記シアノバクテリアの外膜が細胞壁から剥離しているか否かを判定する判定ステップと、を含む。

[0009] また、本開示の一態様に係るシアノバクテリアの外膜剥離の判定装置は、シアノバクテリアの培養上清に対する励起光の照射時に蛍光を測定する測定部と、前記測定部により測定された前記蛍光の波長域に基づいて、前記シアノバクテリアの外膜が細胞壁から剥離しているか否かを判定する判定部と、を備える。

[0010] また、本開示の一態様に係るプログラムは、シアノバクテリアの培養上清に対する励起光の照射時に測定された蛍光の波長域に基づいて、前記シアノバクテリアの外膜が細胞壁から剥離しているか否かを判定する方法を、コンピュータに実行させるためのプログラムである。

[0011] これら包括的又は具体的な態様は、システム、集積回路、コンピュータ読み取り可能な記録媒体で実現されてもよく、装置、システム、方法、集積回路、コンピュータプログラム及びコンピュータ読み取り可能な記録媒体の任意な組み合わせで実現されてもよい。コンピュータ読み取り可能な記録媒体は、例えばCD-ROM (Compact Disc-Read Only Memory) 等の不揮発性の記録媒体を含む。

[0012] 本開示のシアノバクテリアの外膜剥離の判定方法、シアノバクテリアの外膜剥離の判定装置、及び、プログラムによれば、シアノバクテリアの外膜が剥離しているか否かを簡便に判定することができる。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]図1は、実施の形態に係るシアノバクテリアの外膜剥離の判定装置の機能構成の一例を示すブロック図である。

[図2]図2は、実施の形態に係るシアノバクテリアの外膜剥離の判定方法のフローの一例を示すフローチャートである。

[図3]図3は、外膜剥離株の培養上清の蛍光測定の結果を示す図である。

[図4]図4は、培養上清に照射された励起光の波長と、測定された波長の蛍光

との組み合わせを示す図である。

[図5]図5は、野生株の培養上清の蛍光測定の結果を示す図である。

[図6]図6は、外膜剥離株の培養上清、及び、野生株の培養上清の蛍光測定の結果を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0014] (本開示の基礎となった知見)

シアノバクテリア及び藻類などの光合成微生物は、低環境負荷な次世代の物質生産系を実現するためのツールとして注目を集めている。中でも、シアノバクテリアを用いた物質生産においては、効率的に、かつ、簡便に、シアノバクテリアの細胞、及び、その培養の状態を評価及び管理する手法が求められている。

[0015] そこで本発明者は、物質の生産に使用する光合成微生物として、シアノバクテリアに着目した。シアノバクテリア（藍色細菌又は藍藻とも呼ばれる）は、真正細菌の一群であり、光合成により水を分解して酸素を産生し、得たエネルギーにより空気中のCO₂を固定する。なお、シアノバクテリアは、種によっては、空気中の窒素（N₂）も固定できる。また、シアノバクテリアの特性として、生育が早く光利用効率が高いことが知られており、加えてその他の藻類種と比較して遺伝子操作が容易であるため、光合成微生物の中でもシアノバクテリアの利用に関して活発な研究開発が行われている。上述のように、シアノバクテリア（より具体的には、改変シアノバクテリア）による物質生産の例として、スクロース（非特許文献1）、イソブタノール（非特許文献2）、脂肪酸（非特許文献3）、及び、アミノ酸（非特許文献4）等の生産が報告されている。

[0016] 例えば、非特許文献1には、*Synechococcus elongatus*のスクロース生合成経路に関与する遺伝子が改変された遺伝子改変株によるスクロースの生産性が野生株よりも向上したことが開示されている。

[0017] また、例えば、非特許文献2には、*Synechococcus elongatus* PCC7942を遺伝子操作して作製された、リブローサー1，5-ビスリン酸カルボキシラー

ゼ／オキシダーゼ (Rubisco) を過剰発現させた遺伝子改変株によるイソブタノールの生産性が野生株よりも向上したことが開示されている。

[0018] また、例えば、非特許文献3には、*Synechocystis* sp. PCC6803にアシルーアシル輸送タンパク質チオエステラーゼ遺伝子を導入した遺伝子改変株による脂肪酸の生産性が野生株よりも向上したことが開示されている。

[0019] また、非特許文献4には、*Synechocystis* sp. PCC 6803株の野生株にランダム突然変異誘発及びアミノ酸類自体を使用した選択に供して単離されたトリプトファン過剰産生株によるトリプトファンの生産性が野生株よりも向上したことが開示されている。

[0020] また、非特許文献5では、藻類の一種である*Chlamydomonas reinhardtii*の葉緑体を遺伝子操作して、コレラ毒素 (CtxB) の β サブユニットに融合した25 kDaの*Plasmodium falciparum*表面タンパク質 (Pfs25) からなるキメラタンパク質 (CtxB-Pfs25) を細胞内で産生させた遺伝子改変藻類を、マラリア用の経口ワクチンとして使用可能なことが開示されている。

[0021] しかしながら、上述した従来技術では、光合成微生物の遺伝子改変株の細胞内で目的の物質が産生されても、細胞外に分泌されずに蓄積する、又は、細胞外に分泌されにくいため、細胞を破碎して目的の物質を回収する必要がある、物質の生産に手間がかかる。また、細胞内には様々な物質が存在するため、それらの物質を除去して、目的の物質を精製することが必要となる場合があり、目的の物質の回収率が低くなる。また、目的の物質の生産の度に、新たな遺伝子改変株を準備する必要があるため、手間がかかり、生産コストも高む。このように、上述した従来技術では、光合成微生物による物質の生産効率は未だ低いレベルであり、より生産効率の高い技術の開発が望まれている。

[0022] シアノバクテリアの細胞壁及び細胞膜の構造は、細胞内で産生された物質の透過性が低く、細胞膜及び細胞壁の構造を人為的に改変して物質の分泌生産能力を向上させることは容易ではない。特に、タンパク質などの分子量の大きい物質（高分子化合物ともいう）は、アミノ酸などの比較的分子量の小

さい物質（低分子化合物ともいう）とは異なり、細胞外に分泌されにくい。

[0023] しかしながら、シアノバクテリアの外膜と細胞壁との接着に関与し、かつ、細胞表層の構造的安定性に寄与するslr1841遺伝子又はslr0688遺伝子を欠損させると、シアノバクテリア細胞の増殖能力が失われることが記載されている（非特許文献6：木幡光, Studies on molecular basis of cyanobacterial outer membrane function and its evolutionary relationship with primitive chloroplasts, 博士論文,[オンライン], 2018.03.27, インターネット:<URL: <http://hdl.handle.net/10097/00122689>>、及び、非特許文献7：児島征司, 葉緑体表層膜で機能する細菌由来の膜安定化機構と物質透過機構の解明と応用, 科研費, [オンライン], 2018.04.23, インターネット:<URL: <https://kaken.nii.ac.jp/grant/KAKENHI-PROJECT-18H02117>>）。

[0024] 上記課題を解決する技術として、特許文献1には、シアノバクテリアの外膜と細胞壁との結合に関与するタンパク質（以下、結合関連タンパク質ともいう）の機能が抑制又は喪失された改変シアノバクテリア及び当該改変シアノバクテリアによるタンパク質の製造方法が開示されている。特許文献1に記載の技術では、当該改変シアノバクテリアは、細胞の増殖能力を維持したまま、シアノバクテリアの外膜が細胞壁から剥離しているため、細胞を培養することで、細胞内で産生されたタンパク質が細胞外へ分泌され、効率良くタンパク質を製造することができる。

[0025] しかしながら、シアノバクテリアの外膜が細胞壁から剥離すると物質の生産性が向上することがわかっているが、外膜が剥離しているか否かについては、電子顕微鏡観察、及び、煩雑な生化学的分析手法を用いて判定する必要があり、現時点で簡便な手法は開発されていない。

[0026] そこで、本発明者は、シアノバクテリアの細胞の状態が効率的な物質生産に適した状態であるか否かの評価指標として、外膜が細胞壁から剥離しているか否かを簡便に判定する方法を鋭意検討した。その結果、シアノバクテリアの培養上清に励起光を照射して測定された蛍光の波長域に基づいて、シアノバクテリアの外膜が細胞壁から剥離しているか否かを簡便に判定すること

ができることを見出した。

[0027] したがって、本開示によれば、シアノバクテリアの培養上清の蛍光測定結果に基づいて、シアノバクテリアの外膜が細胞壁から剥離しているか否かを簡便に判定することができる。そのため、本開示によれば、シアノバクテリアの外膜が細胞壁から剥離しているか否かを判定することにより、物質生産に適したシアノバクテリアであるか否かを判定することができるため、シアノバクテリアによる物質の生産性の向上に貢献することができる。

[0028] (本開示の概要)

本開示の一態様の概要は、以下の通りである。

[0029] 本開示の一態様に係るシアノバクテリアの外膜剥離の判定方法は、シアノバクテリアの培養上清に対する励起光の照射時に蛍光を測定する測定ステップと、測定された前記蛍光の波長域に基づいて、前記シアノバクテリアの外膜が細胞壁から剥離しているか否かを判定する判定ステップと、を含む。

[0030] これにより、シアノバクテリアの外膜剥離の判定方法は、シアノバクテリアの培養上清の蛍光測定結果に基づいて、シアノバクテリアの外膜が細胞壁から剥離しているか否かを簡便に判定することができる。そのため、シアノバクテリアの外膜剥離の判定方法によれば、シアノバクテリアの外膜が細胞壁から剥離しているか否かを判定することにより、物質生産に適したシアノバクテリアであるか否かを判定することができるため、シアノバクテリアによる物質の生産性の向上に貢献することができる。

[0031] 例えば、本開示の一態様に係るシアノバクテリアの外膜剥離の判定方法は、前記測定ステップでは、予め定められた波長域の前記励起光の前記培養上清に対する照射時に前記蛍光を測定し、前記判定ステップでは、前記予め定められた波長域に対応する波長域において前記蛍光が測定された場合に、前記シアノバクテリアの前記外膜が前記細胞壁から剥離していると判定してもよい。

[0032] これにより、シアノバクテリアの外膜剥離の判定方法は、予め定められた波長域の励起光を照射して、当該波長域に対応する波長域の蛍光が測定され

るか否かによって、シアノバクテリアの外膜が細胞壁から剥離しているか否かを判定することができる。そのため、シアノバクテリアの外膜剥離の判定方法は、より簡便に、かつ、精度良く、シアノバクテリアの外膜剥離を判定することができる。

[0033] 例えば、本開示の一態様に係るシアノバクテリアの外膜剥離の判定方法は、前記励起光の前記予め定められた波長域は、 $620\text{ nm} \pm 10\text{ nm}$ であり、前記励起光の前記予め定められた波長域に対応する前記蛍光の波長域は、 $645\text{ nm} \pm 10\text{ nm}$ であってもよい。

[0034] これにより、シアノバクテリアの外膜剥離の判定方法は、予め定められた波長域の励起光を照射して、当該波長域に対応する波長域の蛍光が測定された場合に、シアノバクテリアの外膜が剥離していると判定し、蛍光が測定されない場合、シアノバクテリアの外膜が剥離していないと判定することができる。そのため、シアノバクテリアの外膜剥離の判定方法は、より簡便に、かつ、精度良く、シアノバクテリアの外膜剥離を判定することができる。

[0035] 例えば、本開示の一態様に係るシアノバクテリアの外膜剥離の判定方法は、前記測定ステップでは、予め定められた波長域の前記励起光の前記培養上清に対する照射時に前記蛍光を測定し、前記判定ステップでは、前記予め定められた波長域に対応する波長域における前記蛍光の強度が閾値以上である場合に、前記シアノバクテリアの前記外膜が前記細胞壁から剥離していると判定してもよい。

[0036] これにより、シアノバクテリアの外膜剥離の判定方法は、予め定められた波長域の励起光を照射して、当該波長域に対応する波長域の蛍光の強度が閾値以上である場合に、シアノバクテリアの外膜が剥離していると判定し、蛍光の強度が閾値未満である場合に、シアノバクテリアの外膜が剥離していないと判定することができる。そのため、シアノバクテリアの外膜剥離の判定方法は、より簡便に、かつ、精度良く、シアノバクテリアの外膜剥離を判定することができる。

[0037] 例えば、本開示の一態様に係るシアノバクテリアの外膜剥離の判定方法は

、前記判定ステップでは、前記励起光の前記予め定められた波長域と、前記励起光の前記予め定められた波長域に対応する前記蛍光の波長域との組み合わせが、下記の(1)～(3)の少なくとも1つである場合、前記シアノバクテリアの前記外膜が前記細胞壁から剥離していると判定してもよい。

(1) 励起光の波長域：280 nm ± 10 nm、蛍光の波長域：335 nm ± 10 nm

(2) 励起光の波長域：275 nm ± 10 nm、蛍光の波長域：450 nm ± 10 nm

(3) 励起光の波長域：360 nm ± 10 nm、蛍光の波長域：455 nm ± 10 nm

これにより、シアノバクテリアの外膜剥離の判定方法は、予め定められた波長域の励起光を照射して、当該波長域に対応する波長域の蛍光の強度が閾値以上である場合に、シアノバクテリアの外膜が剥離していると判定し、蛍光の強度が閾値未満である場合に、シアノバクテリアの外膜が剥離していないと判定することができる。そのため、シアノバクテリアの外膜剥離の判定方法は、より簡便に、かつ、精度良く、シアノバクテリアの外膜剥離を判定することができる。

[0038] また、本開示の一態様に係るシアノバクテリアの外膜剥離の判定装置は、シアノバクテリアの培養上清に対する励起光の照射時に蛍光を測定する測定部と、前記測定部により測定された前記蛍光の波長域に基づいて、前記シアノバクテリアの外膜が細胞壁から剥離しているか否かを判定する判定部と、を備える。

[0039] これにより、シアノバクテリアの外膜剥離の判定装置は、シアノバクテリアの培養上清の蛍光測定結果に基づいて、シアノバクテリアの外膜が細胞壁から剥離しているか否かを簡便に判定することができる。そのため、シアノバクテリアの外膜剥離の判定装置は、シアノバクテリアの外膜が細胞壁から剥離しているか否かを判定することにより、物質生産に適したシアノバクテリアであるか否かを判定することができるため、シアノバクテリアによる物

質の生産性の向上に貢献することができる。

[0040] また、本開示の一態様に係るプログラムは、シアノバクテリアの培養上清に対する励起光の照射時に測定された蛍光の波長域に基づいて、前記シアノバクテリアの外膜が細胞壁から剥離しているか否かを判定する方法を、コンピュータに実行させるためのプログラムである。

[0041] これにより、プログラムは、シアノバクテリアの培養上清の蛍光測定結果に基づいて、シアノバクテリアの外膜が細胞壁から剥離しているか否かをコンピュータに判定させるため、当該コンピュータは、シアノバクテリアの外膜剥離を簡便に判定することができる。

[0042] 以下、実施の形態について、図面を参照しながら具体的に説明する。

[0043] なお、以下で説明する実施の形態は、いずれも包括的又は具体的な例を示すものである。以下の実施の形態で示される数値、材料、ステップ、ステップの順序などは、一例であり、本開示を限定する主旨ではない。また、以下の実施の形態における構成要素のうち、最上位概念を示す独立請求項に記載されていない構成要素については、任意の構成要素として説明される。

[0044] また、各図は、必ずしも厳密に図示したものではない。各図において、実質的に同一の構成については同一の符号を付し、重複する説明は省略又は簡略化される場合がある。

[0045] また、以下において、数値範囲は、厳密な意味のみを表すのではなく、実質的に同等な範囲、例えば、タンパク質の量（例えば、数又は濃度等）又はその範囲を計測することなどを含む。

[0046] また、本明細書では、菌体と細胞とは、いずれも1つのシアノバクテリアの個体を表している。

[0047] （実施の形態）

[1. シアノバクテリアの外膜剥離の判定装置]

まず、本実施の形態に係るシアノバクテリアの外膜剥離の判定装置（以下、単に、判定装置ともいう）について説明する。図1は、本実施の形態に係るシアノバクテリアの外膜剥離の判定装置の機能構成の一例を示すブロック

図である。

- [0048] 図1に示されるように、判定装置100は、例えば、測定部110と、制御部120と、記憶部130と、入力受付部140と、表示部150とを備える。制御部120は、例えば、判定部122を備える。
- [0049] 測定部110は、例えば、蛍光分光光度計である。測定部110の具体的な構成は、一般的な蛍光分光光度計と同様である。測定部110は、例えば、測定用のセルに導入されたシアノバクテリアの培養液に励起光を照射して蛍光を測定する。測定用のセルは、例えば、分光セルであってもよいし、フローセルであってもよい。これらのセルは、石英製であってもよいし、アクリル製であってもよいが、石英製であるのがより好ましい。フローセルは、例えば、シアノバクテリアが培養されている培養槽に配管を通じて連結されてもよい。配管は、希釈部と送液部とを介して培養槽に接続されてもよい。培養上清は、本培養の開始後、所定の間隔（例えば、日単位）でサンプリングされて、測定に供されてもよい。サンプリングは、ユーザにより手作業で行われてもよいし、自動で行われてもよい。
- [0050] 図示していないが、測定部110は、例えば、測定部110の動作を制御する制御部を備えており、制御部は、判定装置100の制御部120から出力される制御信号に従って、測定部110の動作を制御する。図1の例では、判定装置100は、測定部110を備えるが、測定部110を備えなくてもよい。この場合、測定部110は、測定装置であり、判定装置100は、測定装置と通信を介して接続される。
- [0051] 制御部120は、判定装置100の動作の制御を行うための情報処理を行う。制御部120は、例えば、マイクロコンピュータによって実現されるが、プロセッサ又は専用回路によって実現されてもよい。制御部120は、具体的には、判定部122を備える。判定部122は、プロセッサが上記情報処理を行うためのプログラムを実行することにより実現される。
- [0052] 判定部122は、測定部110により測定された蛍光の波長域に基づいて、シアノバクテリアの外膜が細胞壁から剥離しているか否かを判定する。

- [0053] なお、シアノバクテリアの外膜が細胞壁から剥離しているか否かの判定は、測定に供されたシアノバクテリアの培養上清が、外膜が細胞壁から剥離したシアノバクテリアの培養上清であるか否かの判定であってもよい。判定部 122 の具体的な機能については、次項で説明する。
- [0054] 記憶部 130 は、制御部 120 が実行する制御プログラムなどが記憶される記憶装置である。記憶部 130 は、例えば、半導体メモリによって実現される。
- [0055] 入力受付部 140 は、ユーザの操作入力を受け付ける。入力受付部 140 は、具体的には、マウス、マイクロフォン、又は、タッチパネルなどによって実現される。
- [0056] 表示部 150 は、制御部 120 の制御に基づいてユーザに提示する情報を表示する表示装置である。表示部 150 は、液晶パネル又は有機EL (Electro Luminescence) パネルによって実現される。
- [0057] [2. シアノバクテリアの外膜剥離の判定方法]
- 続いて、本実施の形態に係るシアノバクテリアの外膜剥離の判定方法について、図2を参照しながら説明する。図2は、実施の形態に係るシアノバクテリアの外膜剥離の判定方法のフローの一例を示すフローチャートである。
- [0058] 当該判定方法は、判定装置100により実施される。例えば、図2に示されるように、判定装置100の測定部110は、例えば、測定用のセルに導入されたシアノバクテリアの培養上清に励起光を照射して蛍光を測定する(S01)。より具体的には、ステップS01では、例えば、測定部110は、予め定められた波長域の励起光を培養上清に照射して蛍光を測定する。測定部110は、予め定められた1つの波長域の励起光を培養上清に照射してもよいし、予め定められた2以上の波長域の励起光を順番に培養上清に照射してもよい。
- [0059] 次に、判定装置100の判定部122は、測定部110により測定された蛍光の波長域に基づいて、シアノバクテリアの外膜が細胞壁から剥離しているか否かを判定する(S02)。

[0060] ステップS02では、例えば、判定部122は、予め定められた波長域に対応する波長域において蛍光が測定された場合に、シアノバクテリアの外膜が細胞壁から剥離していると判定してもよい。この場合、励起光の予め定められた波長が $620\text{ nm} \pm 10\text{ nm}$ であり、励起光の予め定められた波長域に対応する蛍光の波長域は、 $645\text{ nm} \pm 10\text{ nm}$ である。例えば、シアノバクテリアの外膜が細胞壁から剥離していないシアノバクテリアの培養上清に波長 $620\text{ nm} \pm 10\text{ nm}$ の励起光が照射されても、当該波長域に対応する波長域（例えば、 $645\text{ nm} \pm 10\text{ nm}$ ）の蛍光は測定されない。一方、シアノバクテリアの外膜が細胞壁から剥離している外膜剥離型のシアノバクテリアの培養上清に波長 $620\text{ nm} \pm 10\text{ nm}$ の励起光が照射されると、当該波長域に対応する波長域（例えば、 $645\text{ nm} \pm 10\text{ nm}$ ）の蛍光が測定される。

[0061] また、ステップS02では、例えば、判定部122は、予め定められた波長域に対応する波長域における蛍光の強度が閾値以上である場合に、シアノバクテリアの外膜が細胞壁から剥離していると判定してもよい。この場合、判定部122は、励起光の予め定められた波長域と、励起光の予め定められた波長域に対応する蛍光の波長域との組み合わせが、下記の(1)～(3)の少なくとも1つである場合、シアノバクテリアの外膜が細胞壁から剥離していると判定してもよい。

(1) 励起光の波長域： $280\text{ nm} \pm 10\text{ nm}$ 、蛍光の波長域： $335\text{ nm} \pm 10\text{ nm}$

(2) 励起光の波長域： $275\text{ nm} \pm 10\text{ nm}$ 、蛍光の波長域： $450\text{ nm} \pm 10\text{ nm}$

(3) 励起光の波長域： $360\text{ nm} \pm 10\text{ nm}$ 、蛍光の波長域： $455\text{ nm} \pm 10\text{ nm}$

例えば、シアノバクテリアの外膜が細胞壁から剥離していないシアノバクテリアの培養上清に上記の(1)～(3)の少なくとも1つの波長域の励起光が照射されると、当該波長域に対応する波長域の蛍光がそれぞれ測定され

るが、その蛍光の強度は閾値以下である。また、シアノバクテリアの外膜が細胞壁から剥離している外膜剥離型のシアノバクテリアの培養上清に上記の(1)～(3)の少なくとも1つの波長域の励起光が照射されると、当該波長域に対応する波長域の蛍光がそれぞれ測定される。このとき、上記の(1)～(3)の少なくとも1つの蛍光の強度が閾値以上である場合、シアノバクテリアの外膜が細胞壁から剥離していると判定される。閾値は、上記の(1)～(3)の全ての波長域の蛍光に共通の閾値であってもよく、各波長域の蛍光ごとに設定されてもよい。

[0062] [3. シアノバクテリア]

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

[0063] シアノバクテリアの細胞表層は、内側から順に、原形質膜（内膜ともいう）、ペプチドグリカン、及び細胞最外層を形成する脂質膜である外膜で構成される。ペプチドグリカンにはグルコサミン及びマンノサミンなどで構成される。糖鎖が共有結合しており、また、これらの共有結合型の糖鎖にはピルビン酸が結合している本明細書では、ペプチドグリカンと共有結合型の糖鎖とを含めて細胞壁と呼ぶ。また、原形質膜（つまり、内膜）と外膜との間隙は、ペリプラズムと呼ばれ、タンパク質の分解又は立体構造の形成、脂質又

は核酸の分解、若しくは、細胞外の栄養素の取り込み等に関与する様々な酵素が存在する。

[0064] SLHドメイン保持型外膜タンパク質（例えば、Slr1841）は、脂質膜（外膜ともいう）に埋め込まれたC末端側領域と、脂質膜から突き出したN末端側のSLHドメインから成り、シアノバクテリア及びグラム陰性細菌の一群であるNegativicutes綱に属する細菌において広く分布している。脂質膜（つまり、外膜）に埋め込まれた領域は、親水性物質の外膜透過を可能にするためのチャンネルを形成し、一方でSLHドメインは細胞壁に結合する機能をもつ。SLHドメインが細胞壁に結合するためには、ペプチドグリカンにおける共有結合型の糖鎖がピルビン酸で修飾されている必要がある。SLHドメイン保持型外膜タンパク質をコードする遺伝子の例としては、*Synechocystis* sp. PCC 6803が保持するslr1841若しくはslr1908、又は*Anabaena* sp. 90が保持するoprBなどが挙げられる。

[0065] ペプチドグリカンにおける共有結合型の糖鎖のピルビン酸修飾反応を触媒する酵素（以下、細胞壁ーピルビン酸修飾酵素という）は、グラム陽性菌である*Bacillus anthracis*において同定され、CsaBと命名されている。ゲノム塩基配列が公開されているシアノバクテリアにおいて、多くの種がCsaBとアミノ酸配列の同一性が30%以上となる相同タンパク質をコードする遺伝子を保持している。例としては、*Synechocystis* sp. PCC 6803が保持するslr0688又は*Synechococcus* sp. 7502が保持するsynpcc7502_03092などが挙げられる。

[0066] シアノバクテリアでは、光合成により固定されたCO₂は多段階の酵素反応を経て各種アミノ酸に変換される。それらを原料として、シアノバクテリアの細胞質内でタンパク質が合成される。それらのタンパク質の中には、細胞質内で機能するタンパク質もあるし、細胞質からペリプラズムに輸送されてペリプラズム内で機能するタンパク質もある。しかしながら、細胞外にタンパク質を積極的に分泌するケースは、現在までシアノバクテリアにおいては報告されていない。

[0067] シアノバクテリアは、高い光合成能力を有するため、必ずしも有機物を栄養分として外から取り込む必要がない。そのため、シアノバクテリアは、有機物チャネルタンパク質（例えば、Slr1270）のように、有機物を透過させるチャネルタンパク質を外膜に非常にわずかにしか有していない。例えば、*Synechocystis* sp. PCC 6803では、有機物を透過させる有機物チャネルタンパク質は、外膜の総タンパク質量の約4%しか存在しない。一方、シアノバクテリアは、生育に必要な無機イオン類を高効率で細胞内に取り込むために、SLHドメイン保持型外膜タンパク質（例えば、Slr1841）のように、無機イオン類を透過させるイオンチャネルタンパク質を外膜に多く有する。例えば、*Synechocystis* sp. PCC 6803では、無機イオンを透過させるイオンチャネルタンパク質は、外膜の総タンパク質量の約80%を占める。

[0068] このように、シアノバクテリアでは、外膜におけるタンパク質などの有機物を透過させるチャネルが非常に少ないため、菌体内で産生されたタンパク質を菌体外に積極的に分泌することが難しいと考えられている。また、シアノバクテリアの細胞壁及び細胞膜の構造はタンパク質透過性を左右するが、細胞膜及び細胞壁構造を人為的に改変してタンパク質分泌生産能力を向上させることは容易ではない。例えば、非特許文献6及び非特許文献7には、外膜と細胞壁との接着に関与し、細胞表層の構造的安定性に寄与するslr1841遺伝子あるいはslr0688遺伝子を欠損させると、細胞の増殖能力が失われることが記載されている。

[0069] [4. 外膜剥離型のシアノバクテリア]

続いて、外膜が細胞壁から剥離したシアノバクテリア（いわゆる、外膜剥離型のシアノバクテリア）について説明する。

[0070] 外膜が細胞壁から剥離したシアノバクテリア（いわゆる、外膜剥離型のシアノバクテリア）は、例えば、薬剤もしくは外力（例えば、圧力又は温度など）によって外膜が一時的に細胞壁から剥離した状態のシアノバクテリア、又は、外膜が細胞壁から剥離するように遺伝子改変された改変シアノバクテリアでもよい。ここで、改変シアノバクテリアとは、シアノバクテリアにお

いて外膜と細胞壁との結合に関与するタンパク質（いわゆる、結合関連タンパク質）の総量が、親株（いわゆる、親シアノバクテリア）における当該タンパク質の総量の30%以上70%以下に抑制されている改変シアノバクテリアである。例えば、「結合関連タンパク質の総量が、親株における当該タンパク質の総量の30%に抑制されている」とは、親株における当該タンパク質の総量の70%が喪失し、30%に抑制されている状態のことを意味する。このように、改変シアノバクテリアは、シアノバクテリアの外膜と細胞壁との結合に関与するタンパク質の機能が抑制されているため、外膜と細胞壁との結合（例えば、結合量及び結合力）が部分的に低減して、外膜が細胞壁から部分的に離脱しやすくなる。上述したように、例えば、非特許文献6、及び、非特許文献7には、結合関連タンパク質をコードする遺伝子であるslr1841遺伝子又はslr0688遺伝子を欠損させると、細胞の増殖能力が失われることが記載されている。一方、本開示における改変シアノバクテリアは、結合関連タンパク質をコードする遺伝子の発現を抑制しているため、細胞の増殖能力が損なわれない。このように作製された改変シアノバクテリアは、細胞の増殖機能が損なわれることなく、外膜と細胞壁との結合（例えば、結合量及び結合力）が部分的に低減し、外膜が細胞壁から部分的に脱離しやすくなっている。そのため、シアノバクテリアの菌体内（言い換えると、細胞内）で産生された所望の化合物、タンパク質及び代謝産物（以下、菌体内産生物質ともいう）は、外膜の外、つまり、菌体外に漏出しやすくなる。このような改変シアノバクテリアは、菌体を破砕するなどの、菌体内産生物質の抽出操作が不要となるため、菌体内産生物質の生理活性及び収率の低下が起こりにくい。また、改変シアノバクテリアは、細胞の増殖機能が損なわれていないため、菌体外に分泌された菌体内産生物質を回収した後も、改変シアノバクテリアを繰り返し使用することが可能である。

[0071] 以下、SLHドメイン保持型外膜タンパク質及び細胞壁ーピルビン酸修飾酵素の少なくとも1つの結合関連タンパク質の機能が抑制されることにより外膜が部分的に細胞壁から脱離するように改変されたシアノバクテリアにつ

いて説明する。

- [0072] 改変シアノバクテリアの親微生物となる、SLHドメイン保持型外膜タンパク質の発現及び細胞壁ーピルビン酸修飾酵素の発現の少なくとも1つを抑制する前のシアノバクテリア（本明細書において、「親株」又は「親シアノバクテリア」という）の種類は、特に制限はなく、あらゆる種類のシアノバクテリアであってもよい。例えば、親シアノバクテリアは、Synechocystis属、Synechococcus属、Anabaena属、又は、Thermosynechococcus属であってもよく、中でも、Synechocystis sp. PCC 6803、Synechococcus sp. PCC 7942、又は、Thermosynechococcus elongatus BP-1であってもよい。なお、親株は、結合関連タンパク質の総量を30%以上70%以下に抑制する前のシアノバクテリアであれば、野生のものであってもよいし、改変したものであって、野生のものと同等の結合関連タンパク質を有するものであってもよい。
- [0073] これらの親シアノバクテリアにおけるSLHドメイン保持型外膜タンパク質及び細胞壁ーピルビン酸修飾反応を触媒する酵素（いわゆる、細胞壁ーピルビン酸修飾酵素）のアミノ酸配列、それらの結合関連タンパク質をコードする遺伝子の塩基配列、及び、当該遺伝子の染色体DNA又はプラスミド上での位置は、NCBI (National Center for Biotechnology Information) データベース (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 及びCyanobase (<http://genome.microbedb.jp/cyanobase/>) で確認することができる。
- [0074] なお、本実施の形態に係る改変シアノバクテリアにおいて機能が抑制されるSLHドメイン保持型外膜タンパク質及び細胞壁ーピルビン酸修飾酵素は、親シアノバクテリアが保有している限り、いずれの親シアノバクテリアのものであってもよく、それらをコードする遺伝子の存在場所（例えば、染色体DNA上又はプラスミド上）により制限されるものではない。
- [0075] 例えば、SLHドメイン保持型外膜タンパク質は、親シアノバクテリアがSynechocystis属の場合、Slr1841、Slr1908、又は、Slr0042等であってもよく、親シアノバクテリアがSynechococcus属の場合、NIES970_09470等であってもよく、親シアノバクテリアがAnabaena属の場合、Anacy_5815又はAnacy_345

8等であってもよく、親シアノバクテリアがMicrocystis属の場合、A0A0F6U6F8_MICAE等であってもよく、親シアノバクテリアがCyanothece属の場合、A0A3B8XX12_9CYAN等であってもよく、親シアノバクテリアがLeptolyngbya属の場合、A0A1Q8ZE23_9CYAN等であってもよく、親シアノバクテリアがCalothrix属の場合、A0A1Z4R6U0_9CYANが挙げられ、親シアノバクテリアがNostoc属の場合、A0A1C0VG86_9NOSO等であってもよく、親シアノバクテリアがCrocospaera属の場合、B1WRN6_CROS5等であってもよく、親シアノバクテリアがPleurocapsa属の場合、K9TAE4_9CYAN等であってもよい。

[0076] より具体的には、SLHドメイン保持型外膜タンパク質は、例えば、Synechocystis sp. PCC 6803のSlr1841、Synechococcus sp. NIES-970のNIES970_09470、又は、Anabaena cylindrica PCC 7122のAnacy_3458等であってもよい。また、これらのSLHドメイン保持型外膜タンパク質とアミノ酸配列が50%以上同一であるタンパク質であってもよい。

[0077] 一般に、タンパク質のアミノ酸配列が30%以上同一であれば、タンパク質の立体構造の相同性が高いため、当該タンパク質と同等の機能を有する可能性が高いと言われている。そのため、機能が抑制されるSLHドメイン保持型外膜タンパク質としては、例えば、上記のSLHドメイン保持型外膜タンパク質のいずれかのアミノ酸配列と、40%以上、好ましくは50%以上、より好ましくは60%以上、さらに好ましくは70%以上、さらにより好ましくは80%以上、なお好ましくは90%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ、細胞壁の共有結合型の糖鎖と結合する機能を有するタンパク質又はポリペプチドであってもよい。

[0078] また、例えば、細胞壁ーピルビン酸修飾酵素は、親シアノバクテリアがSynechocystis属の場合、Slr0688等であってもよく、親シアノバクテリアがSynechococcus属の場合、Syn7502_03092又はSynpcc7942_1529等であってもよく、親シアノバクテリアがAnabaena属の場合、ANA_C20348又はAnacy_1623等であってもよく、親シアノバクテリアがMicrocystis属の場合、CsaB (NCBIのアクセスID: TRU80220)等であってもよく、親シアノバクテリアがCyanothece属の

場合、CsaB (NCBIのアクセスID: WP_107667006.1) 等であってもよく、親シアノバクテリアがSpirulina属の場合、CsaB (NCBIのアクセスID: WP_026079530.1) 等であってもよく、親シアノバクテリアがCalothrix属の場合、CsaB (NCBIのアクセスID: WP_096658142.1) 等であってもよく、親シアノバクテリアがNostoc属の場合、CsaB (NCBIのアクセスID: WP_099068528.1) 等であってもよく、親シアノバクテリアがCrocospaera属の場合、CsaB (NCBIのアクセスID: WP_012361697.1) 等であってもよく、親シアノバクテリアがPleurocapsa属の場合、CsaB (NCBIのアクセスID: WP_036798735) 等であってもよい。

[0079] より具体的には、細胞壁ーピルビン酸修飾酵素は、例えば、Synechocystis sp. PCC 6803のSlr0688、Synechococcus sp. PCC 7942のSynpcc7942_1529、又は、Anabaena cylindrica PCC 7122のAnacy_1623等であってもよい。また、これらの細胞壁ーピルビン酸修飾酵素とアミノ酸配列が50%以上同一であるタンパク質であってもよい。

[0080] また、上述したとおり、タンパク質のアミノ酸配列が30%以上同一であれば、当該タンパク質と同等の機能を有する可能性が高いと言われている。そのため、機能が抑制される細胞壁ーピルビン酸修飾酵素としては、例えば、上記の細胞壁ーピルビン酸修飾酵素のいずれかのアミノ酸配列と、40%以上、好ましくは50%以上、より好ましくは60%以上、さらに好ましくは70%以上、さらにより好ましくは80%以上、なお好ましくは90%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ、細胞壁のペプチドグリカンの共有結合型の糖鎖をピルビン酸で修飾する反応を触媒する機能を有するタンパク質又はポリペプチドであってもよい。

[0081] なお、本明細書において、SLHドメイン保持型外膜タンパク質の機能を抑制するとは、当該タンパク質の細胞壁との結合能力を抑制すること、当該タンパク質の外膜への輸送を抑制する若しくは喪失させること、又は、当該タンパク質が外膜に埋め込まれて機能する能力を抑制することである。

[0082] なお、細胞壁ーピルビン酸修飾酵素の機能を抑制するとは、当該タンパク

質が細胞壁の共有結合型の糖鎖をピルビン酸で修飾する機能を抑制することである。

[0083] これらのタンパク質の機能を抑制する手段としては、タンパク質の機能の抑制に通常使用される手段であれば特に限定されない。当該手段は、例えば、SLHドメイン保持型外膜タンパク質をコードする遺伝子及び細胞壁ーピルビン酸修飾酵素をコードする遺伝子を欠失若しくは不活性化させること、これらの遺伝子の転写を阻害すること、これらの遺伝子の転写産物の翻訳を阻害すること、又はこれらのタンパク質を特異的に阻害する阻害剤を投与することなどであってもよい。

[0084] 本実施の形態では、改変シアノバクテリアは、外膜と細胞壁との結合に関与するタンパク質（いわゆる、結合関連タンパク質）を発現させる遺伝子が欠失又は不活性化されていてもよい。これにより、改変シアノバクテリアでは、細胞壁と外膜との結合に関与するタンパク質の発現が抑制されるため、又は、当該タンパク質の機能が抑制されるため、細胞壁と外膜との結合（いわゆる、結合量及び結合力）が部分的に低減する。その結果、改変シアノバクテリアでは、外膜が細胞壁から部分的に脱離しやすくなる。

[0085] シアノバクテリアにおけるSLHドメイン保持型外膜タンパク質及び細胞壁ーピルビン酸修飾酵素の少なくとも1つの機能を抑制するために、例えば、SLHドメイン保持型外膜タンパク質をコードする遺伝子及び細胞壁ーピルビン酸修飾酵素をコードする遺伝子の少なくとも1つの転写を抑制してもよい。

[0086] 例えば、SLHドメイン保持型外膜タンパク質をコードする遺伝子は、親シアノバクテリアが*Synechocystis*属の場合、slr1841、slr1908、又は、slr0042等であってもよく、*Synechococcus*属の場合、nies970_09470等であってもよく、親シアノバクテリアが*Anabaena*属の場合、anacy_5815又はanacy_3458等であってもよく、親シアノバクテリアが*Microcystis*属の場合、A0A0F6U6F8_MICAE等であってもよく、親シアノバクテリアが*Cyanothece*属の場合、A0A3B8XX12_9CYAN等であってもよく、親シアノバクテリアが*Leptolyngbya*属の場合

、A0A1Q8ZE23_9CYAN等であってもよく、親シアノバクテリアがCalothrix属の場合、A0A1Z4R6U0_9CYAN等であってもよく、親シアノバクテリアがNostoc属の場合、A0A1C0VG86_9NOSO等であってもよく、親シアノバクテリアがCrocospaera属の場合、B1WRN6_CROS5等であってもよく、親シアノバクテリアがPleurocapsa属の場合、K9TAE4_9CYAN等であってもよい。これらの遺伝子の塩基配列は、上述したNCBIデータベース又はCyanobaseから入手できる。

[0087] より具体的には、SLHドメイン保持型外膜タンパク質6をコードする遺伝子は、Synechocystis sp. PCC 6803のslr1841、Synechococcus sp. NIES-970のnies970_09470、Anabaena cylindrica PCC 7122のanacy_3458、又は、これらの遺伝子と塩基配列が50%以上同一である遺伝子であってもよい。

[0088] 上述したように、タンパク質のアミノ酸配列が30%以上同一であれば、当該タンパク質と同等の機能を有する可能性が高いと言われている。そのため、タンパク質をコードする遺伝子の塩基配列が30%以上同一であれば、当該タンパク質と同等の機能を有するタンパク質が発現される可能性が高いと考えられる。そのため、機能が抑制されるSLHドメイン保持型外膜タンパク質をコードする遺伝子としては、例えば、上記のSLHドメイン保持型外膜タンパク質をコードする遺伝子のいずれかの塩基配列と、40%以上、好ましくは50%以上、より好ましくは60%以上、さらに好ましくは70%以上、さらにより好ましくは80%以上、なお好ましくは90%以上の同一性を有する塩基配列からなる遺伝子であり、かつ、細胞壁の共有結合型の糖鎖と結合する機能を有するタンパク質又はポリペプチドをコードする遺伝子であってもよい。

[0089] また、例えば、細胞壁ーピルビン酸修飾酵素をコードする遺伝子は、親シアノバクテリアがSynechocystis属の場合、slr0688等であってもよく、親シアノバクテリアがSynechococcus属の場合、syn7502_03092又はsynpcc7942_1529等であってもよく、親シアノバクテリアがAnabaena属の場合、ana_C20348又はanacy_1623等であってもよく、親シアノバクテリアがMicrocystis属の場合、csaB (NCBIのアクセスID: TRU80220)等であってもよく、親シアノバクテ

リアがCynahothece属の場合、csaB (NCBIのアクセスID: WP_107667006.1) 等であってもよく、親シアノバクテリアがSpirulina属の場合、csaB (NCBIのアクセスID: WP_026079530.1) 等であってもよく、親シアノバクテリアがCalotrix属の場合、csaB (NCBIのアクセスID: WP_096658142.1) 等であってもよく、親シアノバクテリアがNostoc属の場合、csaB (NCBIのアクセスID: WP_099068528.1) 等であってもよく、親シアノバクテリアがCrocospaera属の場合、csaB (NCBIのアクセスID: WP_012361697.1) 等であってもよく、親シアノバクテリアがPleurocapsa属の場合、csaB (NCBIのアクセスID: WP_036798735) 等であってもよい。これらの遺伝子の塩基配列は、上述したNCBIデータベース又はCyanobaseから入手できる。

[0090] より具体的には、細胞壁ーピルビン酸修飾酵素をコードする遺伝子は、Synecocystis sp. PCC 6803のslr0688、Synechococcus sp. PCC 7942のsynpcc7942_1529、又は、Anabaena cylindrica PCC 7122 のanacy_1623であってもよい。また、これらの遺伝子と塩基配列が50%以上同一である遺伝子であってもよい。

[0091] 上述したように、タンパク質をコードする遺伝子の塩基配列が30%以上同一であれば、当該タンパク質と同等の機能を有するタンパク質が発現される可能性が高いと考えられる。そのため、機能が抑制される細胞壁ーピルビン酸修飾酵素をコードする遺伝子としては、例えば、上記の細胞壁ーピルビン酸修飾酵素をコードする遺伝子のいずれかの塩基配列と、40%以上、好ましくは50%以上、より好ましくは60%以上、さらに好ましくは70%以上、さらにより好ましくは80%以上、なお好ましくは90%以上の同一性を有する塩基配列からなり、かつ、細胞壁のペプチドグリカンの共有結合型の糖鎖をピルビン酸で修飾する反応を触媒する機能を有するタンパク質又はポリペプチドをコードする遺伝子であってもよい。

実施例

[0092] 以下の実施例にて本開示のシアノバクテリアの外膜剥離の判定方法、及び、シアノバクテリアの外膜剥離の判定装置について具体的に説明するが、本

開示は以下の実施例にのみ何ら限定されるものではない。

[0093] 以下の実施例では、シアノバクテリアの外膜を細胞壁から部分的に脱離させる方法として、細胞壁-ピルビン酸修飾酵素をコードするslr0688遺伝子の発現抑制を行い、改変シアノバクテリア*Synechocystis dCas9 slr0688_sgRNA*株を作製した（特許文献1の実施例2参照）。以下では、改変シアノバクテリアを外膜剥離株と呼ぶ。なお、本実施例で使用したシアノバクテリア種は、*Synechocystis* sp. PCC 6803（以下、単に、「シアノバクテリア」と呼ぶ）である。以下では、シアノバクテリアにdCas9をコードする遺伝子を導入した*Synechocystis dCas9*株を作製した（特許文献1の比較例1参照）。この*Synechocystis dCas9*株を野生株と呼ぶ。

[0094] （1）シアノバクテリアの培養

作製された外膜剥離株（*Synechocystis dCas9 slr0688_sgRNA*株）及び野生株（*Synechocystis dCas9*株）を、それぞれ、初発菌体濃度 $OD_{730} = 0.1$ となるように、 $1\mu\text{g/mL}$ のアンヒドロテトラサイクリン（aTC）を含むBG-11培地（表1参照）に接種した。この培養液12mLを、125mL容三角フラスコに分注し、光量 $100\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ での光照射及び 30°C の条件下で3日間振盪培養した。

[0095]

[表1]

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

[0096] (2) シアノバクテリアの培養上清の蛍光測定

(2-1) 外膜剥離株の培養上清について

上記(1)で得られた3日目の外膜剥離株の培養液を、室温にて2,500 gで10分間遠心分離し、培養上清をMillex-GV Syringe Filter Unit, 0.22 μm(Millipore)でろ過した。このろ過上清200 μlをBG-11培地1800 μlに添加することで10倍希釈し、石英製の分光セルに入れて蛍光測定に供した。蛍光測定には、FP-8500 蛍光分光光度計(日本分光社製)を用い、波長260~735nmの範囲内で、5nm刻みで励起光を照射し、各波長の励起光照射時の蛍光強度を波長275~750nmの範囲で記録した。

[0097] 測定結果を図3に示す。図3は、外膜剥離株の培養上清の蛍光測定の結果を示す図である。図3では、縦軸は、励起光の波長(nm)を示し、横軸は蛍光の波長(nm)を示す。また、蛍光強度は、高いほど黒色に近づき、低いほど白色に近づくように色分けされている。測定を3回行い、3回の測定のうち、代表的なデータを示している。また、図4は、培養上清に照射された励起光の

波長と、測定された波長の蛍光との組み合わせを示す図である。

[0098] 図3に示されるように、外膜剥離株*Synechocystis dCas9 slr0688_sgRNA*株の培養上清は、以下の(A)～(D)に記載の波長域の励起光を照射したときに、各波長域の励起光に対応する波長域の蛍光が測定された。

(A) 励起光の波長域 280 ± 10 nm、蛍光の波長域 335 ± 10 nm

(B) 励起光の波長域 275 ± 10 nm、蛍光の波長域 450 ± 10 nm

(C) 励起光の波長域 360 ± 10 nm、蛍光の波長域 455 ± 10 nm

(D) 励起光の波長域 620 ± 10 nm、蛍光の波長域 645 ± 10 nm

(2-2) 野生株の培養上清について

上記(1)で得られた3日目の野生株の培養液を使用した点以外、上記(2-1)と同様に行った。測定結果を図5に示す。図5は、野生株の培養上清の蛍光測定の結果を示す図である。

[0099] 図5に示されるように、野生株*Synechocystis dCas9*株の培養上清は、下記の(A)～(C)に記載の波長域の励起光を照射したときに、各波長域の励起光に対応する波長域の蛍光が測定された。

(A) 励起光の波長域 280 ± 10 nm、蛍光の波長域 335 ± 10 nm

(B) 励起光の波長域 275 ± 10 nm、蛍光の波長域 450 ± 10 nm

(C) 励起光の波長域 360 ± 10 nm、蛍光の波長域 455 ± 10 nm

(D) 励起光の波長域 620 ± 10 nm、蛍光の波長域 645 ± 10 nm

しかしながら、上記の(A)～(C)の蛍光強度は、非常に低かった。また、上記(D)に記載の波長域の励起光を照射したときには、蛍光が測定されなかった。

[0100] (2-3) 測定結果の比較

続いて、上記(2-2)及び(2-3)で測定された外膜剥離株の培養上清及び野生株の培養上清の蛍光測定の結果を比較する。図6は、外膜剥離株の培養上清、及び、野生株の培養上清の蛍光測定の結果を示すグラフである。測定は3回行い、グラフには平均値±標準偏差を示している。

[0101] 図6に示されるように、外膜剥離株の培養上清は、上記の(A)～(D)

のいずれの波長域の励起光を照射しても、各波長域に対応する波長域の蛍光が測定され、上記の（A）～（C）で測定された蛍光の強度が野生株の培養上清よりも少なくとも3倍の強度で検出された。上記（D）について、外膜剥離株の培養上清は、蛍光が測定されたが、野生株の培養上清は、蛍光が測定されなかった。つまり、上記の（A）～（D）のいずれの励起波長及び蛍光波長の組み合わせにおいても野生株の培養上清で測定された蛍光の強度は外膜剥離株の培養上清に比べて有意に低かった。

[0102] （3）考察

蛍光測定の結果、図6に示されるように、外膜剥離株の培養上清は、上記の（A）～（C）に記載の波長域の励起光が照射されると、励起光の波長域に対応する波長域の蛍光は、野生株の培養上清に比べて少なくとも3倍の蛍光強度で検出された。したがって、例えば、上記（A）の場合、測定された蛍光の強度が閾値（例えば、1500AU）以上であれば、シアノバクテリアの外膜が細胞壁から剥離していると判定してもよいと考えられる。上記（B）の場合、測定された蛍光の強度が閾値（例えば、2000AU）以上であれば、シアノバクテリアの外膜が細胞壁から剥離していると判定してもよいと考えられる。また、上記（C）の場合、測定された蛍光の強度が閾値（例えば、1500AU）以上であれば、シアノバクテリアの外膜が細胞壁から剥離していると判定してもよいと考えられる。

[0103] また、外膜剥離株の培養上清は、上記（D）の場合、蛍光が測定されれば、シアノバクテリアの外膜が細胞壁から剥離していると判定してもよいと考えられる。

[0104] したがって、上記の4つの少なくともいずれかの条件を満たす場合に、シアノバクテリアの外膜が細胞壁から剥離していると判定してもよいことが示唆される。

[0105] なお、上記の閾値の例示は、あくまでも本実施例における閾値であり、この例に限定されない。各波長域の蛍光強度の閾値は、使用されるシアノバクテリア種、培養条件などの違いによって、適宜設定されてもよい。

[0106] (他の実施の形態)

以上、本開示に係るシアノバクテリアの外膜剥離の判定方法、シアノバクテリアの外膜剥離の判定装置及びプログラムについて、実施の形態に基づいて説明したが、本開示は、これらの実施の形態に限定されるものではない。本開示の主旨を逸脱しない限り、当業者が思いつく各種変形を実施の形態に施したものと、実施の形態における一部の構成要素を組み合わせる構築される別の形態も、本開示の範囲に含まれる。

[0107] 上記の実施の形態では、シアノバクテリアにおける外膜と細胞壁との結合に関与するタンパク質の総量が、親株における当該タンパク質の総量の30%以上70%以下に抑制させることにより、外膜と細胞膜との結合を弱めて菌体内で産生されたタンパク質を菌体外に漏出させる例について説明したが、本開示は、これに限られない。例えば、シアノバクテリアに外力を加えることにより、外膜と細胞壁との結合を弱めてもよく、外膜を脆弱化させてもよい。また、シアノバクテリアの培養液に酵素又は薬剤を添加することにより、外膜を脆弱化させてもよい。

[0108] 上記の実施の形態では、判定ステップは、測定された蛍光の波長域に基づいて、シアノバクテリアの外膜が細胞壁から剥離しているか否かを判定するが、判定ステップは、測定に供されたシアノバクテリアの培養上清が、外膜が剥離したシアノバクテリアの培養液であるか否かを判定してもよい。

[0109] なお、判定ステップは、測定された蛍光の波長域に基づいて、シアノバクテリアにおける外膜剥離の適否を判定してもよい。シアノバクテリアにおける外膜剥離の適否の判定では、例えば、シアノバクテリアの外膜が細胞壁から剥離していることを適と判定し、シアノバクテリアの外膜が細胞壁から剥離していないことを否と判定してもよい。また、シアノバクテリアにおける外膜剥離の適否の判定では、シアノバクテリアの外膜が細胞壁から剥離している剥離度合いを蛍光強度が閾値以上であれば適と判定し、蛍光強度が閾値未満であれば剥離度合いを否と判定してもよい。なお、剥離度合いとは、親株（いわゆる、親シアノバクテリアともいう）における外膜と細胞壁との結

合に関与するタンパク質（いわゆる、結合関連タンパク質ともいう）の総量に対する、シアノバクテリアにおける当該タンパク質の総量の比で示されてもよい。剥離度合いに対応する蛍光強度を算出して、閾値として設定してもよい。

[0110] また、上記の実施の形態では、測定ステップでは、予め定められた波長域の励起光を培養上清に照射して蛍光を測定し、判定ステップでは、予め定められた波長域に対応する波長域において蛍光が測定された場合に、シアノバクテリアの外膜が細胞壁から剥離していると判定するが、判定ステップでは、測定に供された培養上清が、外膜が剥離したシアノバクテリアの培養液であるか否かを判定してもよいし、シアノバクテリアにおける外膜剥離の適否を判定してもよい。この場合、励起光の予め定められた波長域は、 $620\text{ nm} \pm 10\text{ nm}$ であり、励起光の予め定められた波長域に対応する蛍光の波長域は、 $645\text{ nm} \pm 10\text{ nm}$ である。

[0111] また、上記の実施の形態では、測定ステップでは、予め定められた波長域の励起光を培養上清に照射して蛍光を測定し、判定ステップでは、予め定められた波長域に対応する波長域における蛍光の強度が閾値以上である場合に、シアノバクテリアの外膜が細胞壁から剥離していると判定するが、判定ステップでは、測定に供された培養上清が、外膜が剥離したシアノバクテリアの培養液であるか否かを判定してもよいし、シアノバクテリアにおける外膜剥離の適否を判定してもよい。この場合、判定ステップでは、励起光の予め定められた波長域と、励起光の予め定められた波長域に対応する蛍光の波長域との組み合わせが、下記の（１）～（３）の少なくとも１つである場合、シアノバクテリアの外膜が細胞壁から剥離していると判定するが、判定ステップでは、測定に供された培養上清が、外膜が剥離したシアノバクテリアの培養液であるか否かを判定してもよいし、シアノバクテリアにおける外膜剥離の適否を判定してもよい。

（１）励起光の波長域： $280\text{ nm} \pm 10\text{ nm}$ 、蛍光の波長域： $335\text{ nm} \pm 10\text{ nm}$

(2) 励起光の波長域：275 nm ± 10 nm、蛍光の波長域：450 nm ± 10 nm

(3) 励起光の波長域：360 nm ± 10 nm、蛍光の波長域：455 nm ± 10 nm

上記の実施の形態では、シアノバクテリアの外膜剥離の判定装置100は、判定部122は、測定部110により測定された蛍光の波長域に基づいて、シアノバクテリアの外膜が細胞壁から剥離しているか否かを判定するが、測定に供されたシアノバクテリアの培養上清が、外膜が細胞壁から剥離したシアノバクテリアの培養上清であるか否かの判定であってもよいし、シアノバクテリアにおける外膜剥離の適否を判定してもよい。

[0112] 上記の実施の形態では、プログラムは、シアノバクテリアの培養上清に励起光を照射して測定された蛍光の波長域に基づいて、シアノバクテリアの外膜が細胞壁から剥離しているか否かを判定する方法を、コンピュータに実行させるためのプログラムであるが、シアノバクテリアの培養上清に励起光を照射して測定された蛍光の波長域に基づいて、測定に供された培養上清が、外膜が細胞壁から剥離したシアノバクテリアの培養上清であるか否かを判定する方法を、コンピュータに実行させるためのプログラムであってもよいし、シアノバクテリアの培養上清に励起光を照射して測定された蛍光の波長域に基づいて、シアノバクテリアにおける外膜剥離の適否を判定する方法を、コンピュータに実行させるためのプログラムであってもよい。

[0113] (その他)

本開示の一態様は、下記の様な方法であってもよい。

[0114] 培養上清に励起光を照射し、前記照射に基づく蛍光を測定し、

前記測定された蛍光に基づいて、前記培養上清に含まれる一または複数のシアノバクテリアにおいて、一または複数の外膜と一または複数の細胞壁は分離しているかどうかを判定し、

第1波長域に対する前記励起光の強度は第1強度以上であり、

第2波長域に対する前記蛍光の強度は第2強度以上である、方法。

- [0115] 前記第1波長域は620nm±10nm、前記第2波長域は645nm±10nmであってもよい。前記第1波長域は280nm±10nm、前記第2波長域は335nm±10nmであってもよい。前記第1波長域は275nm±10nm、前記第2波長域は450nm±10nmであってもよい。前記第1波長域は360nm±10nm、前記第2波長域は455nm±10nmであってもよい。
- [0116] 本開示の一態様は、下記の様な装置であってよい。
- [0117] 培養上清に励起光を照射し、前記照射に基づく蛍光を測定する測定部と、前記測定された蛍光に基づいて、前記培養上清に含まれるシアノバクテリア(cyanobacteria)の外膜(outer membranes)が前記シアノバクテリアの細胞壁(cell walls)から剥離しているかどうかを判定する判定部とを含み、第1波長域に対する前記励起光の強度は第1強度以上であり、第2波長域に対する前記蛍光の強度は第2強度以上である、装置。
- [0118] 前記第1波長域は280nm±10nm、前記第2波長域は335nm±10nmであってもよい。前記第1波長域は275nm±10nm、前記第2波長域は450nm±10nmであってもよい。前記第1波長域は360nm±10nm、前記第2波長域は455nm±10nmであってもよい。前記第1波長域は620nm±10nm、前記第2波長域は645nm±10nmであってもよい。
- [0119] 前記第1強度は1500AUであってもよい。

産業上の利用可能性

- [0120] 本開示によれば、シアノバクテリアの外膜が細胞壁から剥離しているか否かを簡便に判定することができるため、シアノバクテリアが物質生産に適した状態であるか否か、及び、培養過程でも物質生産に適した状態を維持しているか否かを迅速に把握することができる。

符号の説明

- [0121] 100 判定装置

- 1 1 0 測定部
- 1 2 0 制御部
- 1 2 2 判定部
- 1 3 0 記憶部
- 1 4 0 入力受付部
- 1 5 0 表示部

請求の範囲

- [請求項1] シアノバクテリアの培養上清に対する励起光の照射時に蛍光を測定する測定ステップと、
測定された前記蛍光の波長域に基づいて、前記シアノバクテリアの外膜が細胞壁から剥離しているか否かを判定する判定ステップと、
を含む、
シアノバクテリアの外膜剥離の判定方法。
- [請求項2] 前記測定ステップでは、予め定められた波長域の前記励起光の前記培養上清に対する照射時に前記蛍光を測定し、
前記判定ステップでは、前記予め定められた波長域に対応する波長域において前記蛍光が測定された場合に、前記シアノバクテリアの前記外膜が前記細胞壁から剥離していると判定する、
請求項1に記載のシアノバクテリアの外膜剥離の判定方法。
- [請求項3] 前記励起光の前記予め定められた波長域は、 $620\text{ nm} \pm 10\text{ nm}$ であり、
前記励起光の前記予め定められた波長域に対応する前記蛍光の波長域は、 $645\text{ nm} \pm 10\text{ nm}$ である、
請求項2に記載のシアノバクテリアの外膜剥離の判定方法。
- [請求項4] 前記測定ステップでは、予め定められた波長域の前記励起光の前記培養上清に対する照射時に前記蛍光を測定し、
前記判定ステップでは、前記予め定められた波長域に対応する波長域における前記蛍光の強度が閾値以上である場合に、前記シアノバクテリアの前記外膜が前記細胞壁から剥離していると判定する、
請求項1に記載のシアノバクテリアの外膜剥離の判定方法。
- [請求項5] 前記判定ステップでは、前記励起光の前記予め定められた波長域と、前記励起光の前記予め定められた波長域に対応する前記蛍光の波長域との組み合わせが、下記の(1)～(3)の少なくとも1つである場合、前記シアノバクテリアの前記外膜が前記細胞壁から剥離してい

ると判定する、

(1) 励起光の波長域：280 nm ± 10 nm、蛍光の波長域：335 nm ± 10 nm

(2) 励起光の波長域：275 nm ± 10 nm、蛍光の波長域：450 nm ± 10 nm

(3) 励起光の波長域：360 nm ± 10 nm、蛍光の波長域：455 nm ± 10 nm

請求項4に記載のシアノバクテリアの外膜剥離の判定方法。

[請求項6]

シアノバクテリアの培養上清に対する励起光の照射時に蛍光を測定する測定部と、

前記測定部により測定された前記蛍光の波長域に基づいて、前記シアノバクテリアの外膜が細胞壁から剥離しているか否かを判定する判定部と、

を備える、

シアノバクテリアの外膜剥離の判定装置。

[請求項7]

シアノバクテリアの培養上清に対する励起光の照射時に測定された蛍光の波長域に基づいて、前記シアノバクテリアの外膜が細胞壁から剥離しているか否かを判定する方法を、コンピュータに実行させるための、

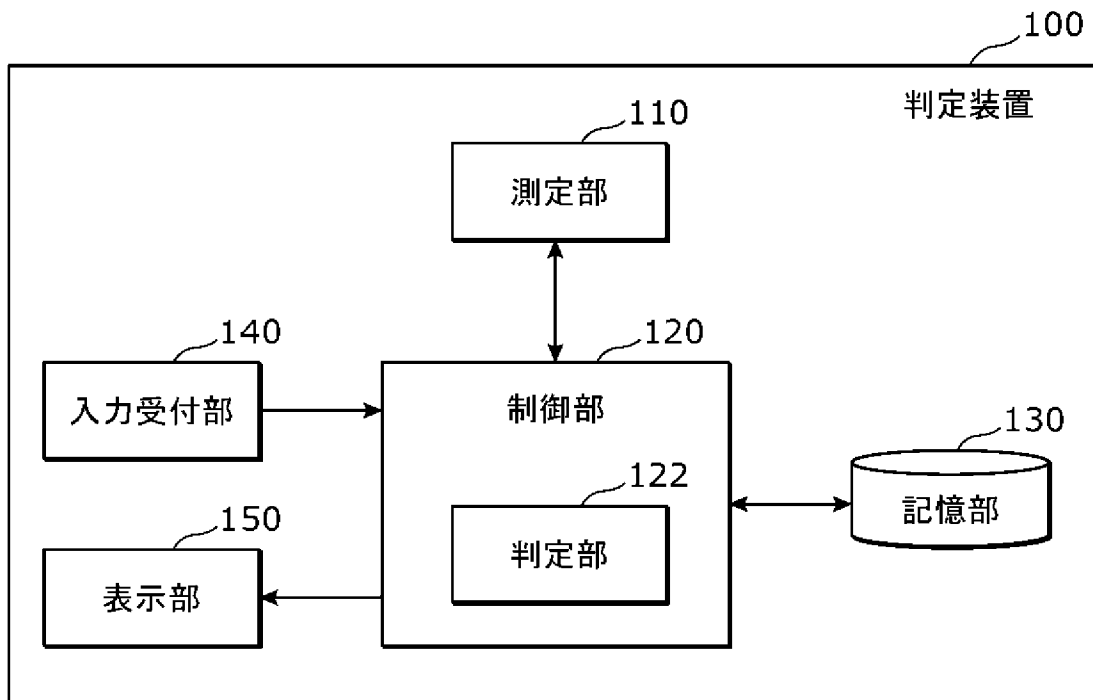
プログラム。

[請求項8]

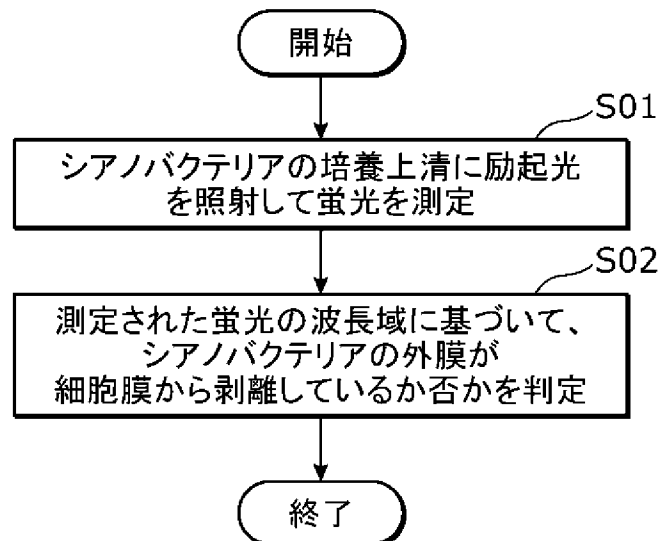
シアノバクテリアの培養上清に対する励起光の照射時に測定された蛍光の波長域に基づいて、前記シアノバクテリアの外膜が細胞壁から剥離しているか否かを判定する判定ステップを含む、

シアノバクテリアの外膜剥離の判定方法。

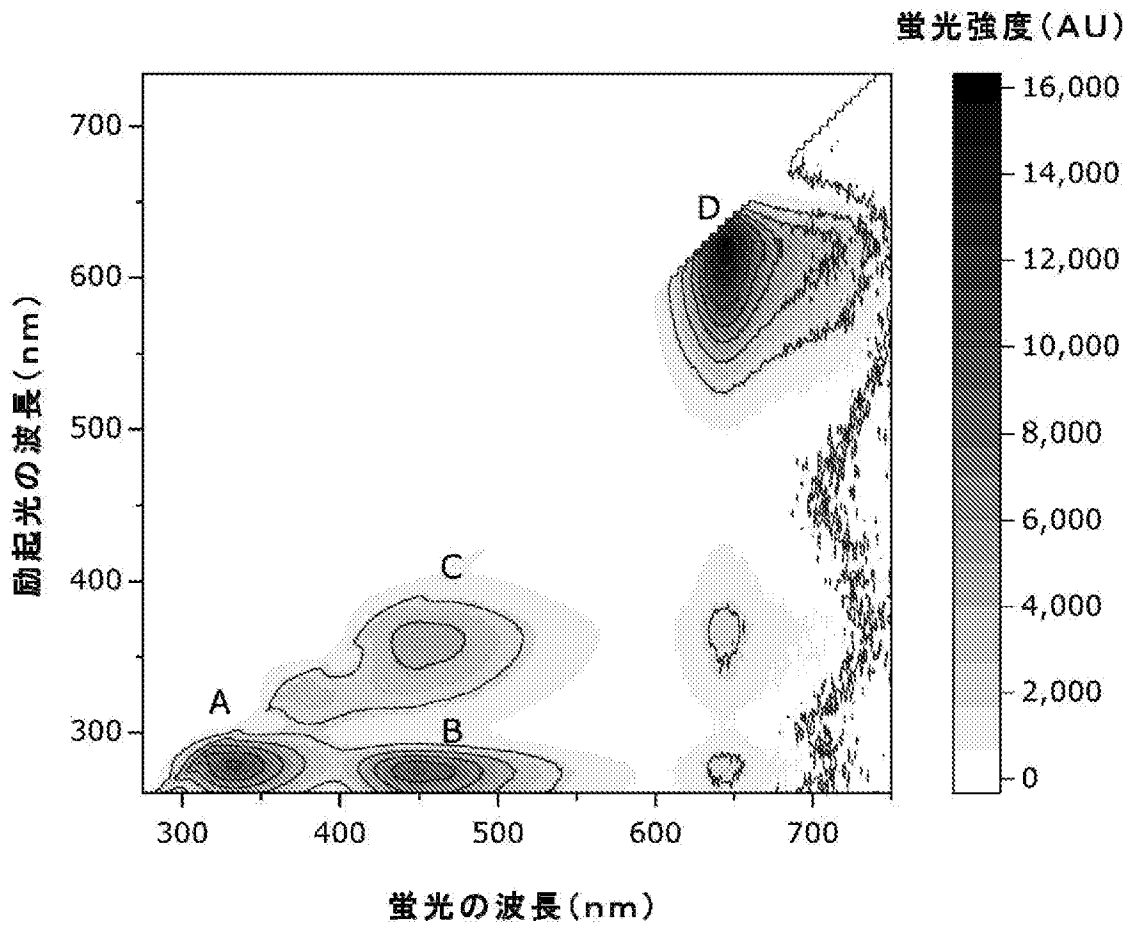
[図1]



[図2]



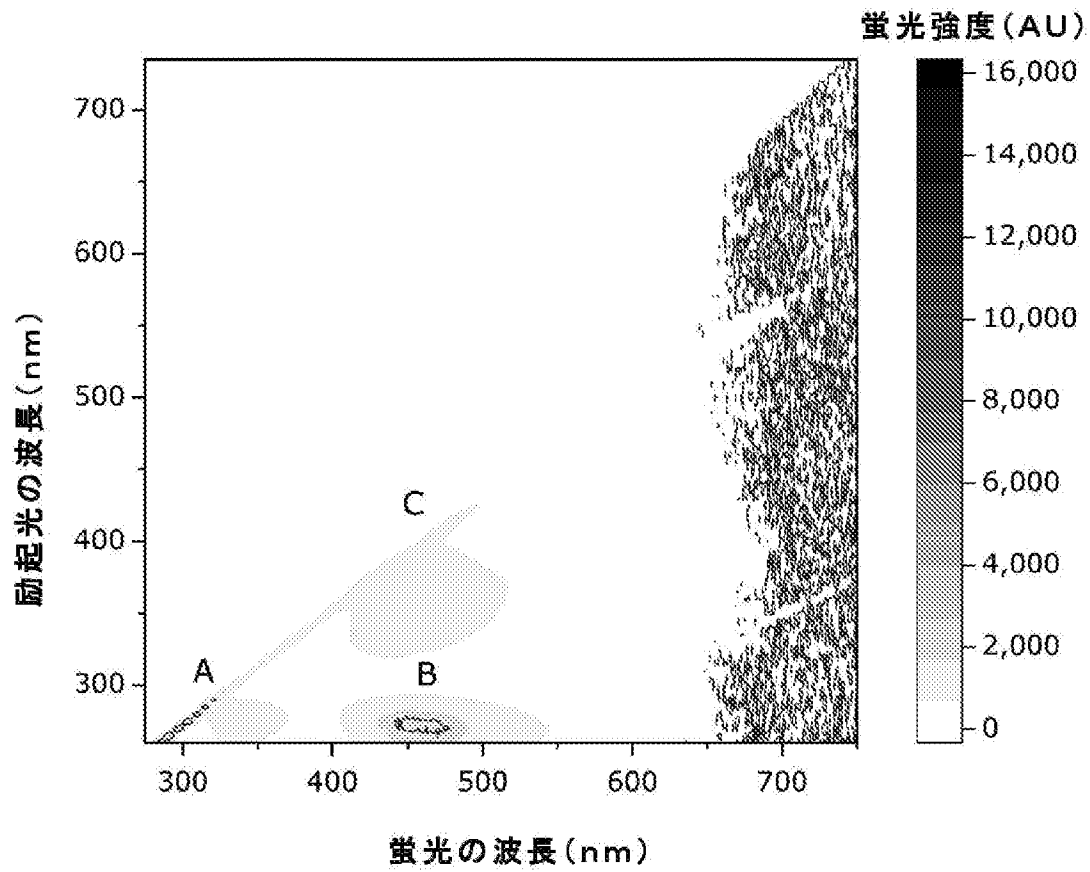
[図3]



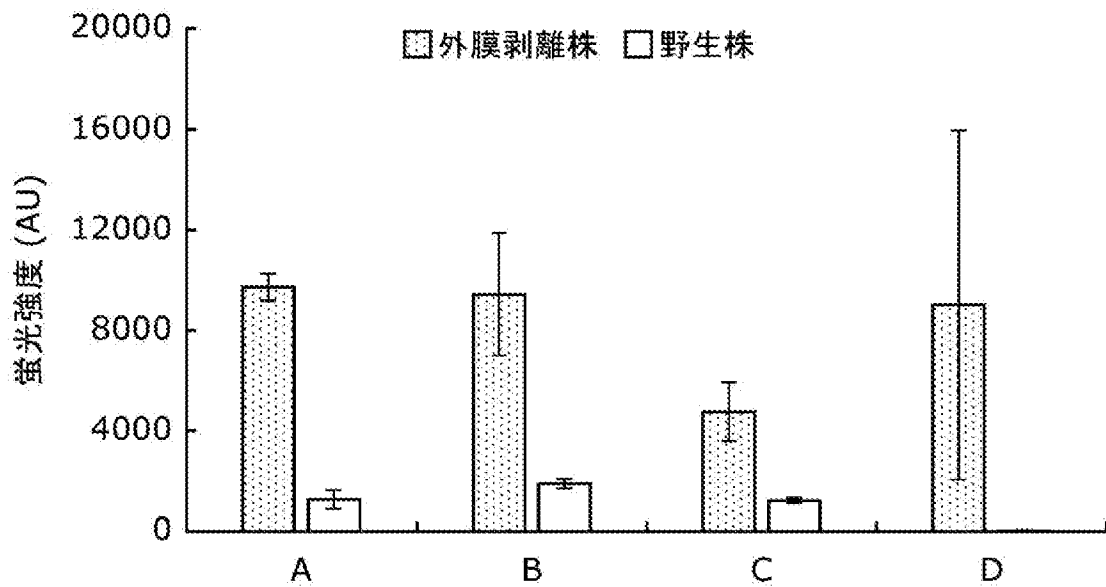
[図4]

	励起波長 (nm)	蛍光波長 (nm)
A	280	335
B	275	450
C	360	455
D	620	645

[図5]



[図6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/012104

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>G01N 21/64</i> (2006.01)i FI: G01N21/64 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) G01N21/64		
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 1971-2023 Registered utility model specifications of Japan 1996-2023 Published registered utility model applications of Japan 1994-2023		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CPlus (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2022-16077 A (AZBIL CORP) 21 January 2022 (2022-01-21)	1-8
A	JP 2017-209073 A (AZBIL CORP) 30 November 2017 (2017-11-30)	1-8
A	WO 2021/100640 A1 (PANASONIC INTELLECTUAL PROPERTY MANAGEMENT CO., LTD.) 27 May 2021 (2021-05-27)	1-8
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier 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 30 May 2023		Date of mailing of the international search report 13 June 2023
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
Information on patent family members

International application No. PCT/JP2023/012104

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
JP	2022-16077	A	21 January 2022	US	2022/0010260	A1	
JP	2017-209073	A	30 November 2017	(Family: none)			
WO	2021/100640	A1	27 May 2021	US	2022/0325312	A1	
				EP	4063483	A1	
				CN	114651060	A	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） G01N 21/64(2006.01)i FI: G01N21/64 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）） G01N21/64 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 - 2023年 日本国実用新案登録公報 1996 - 2023年 日本国登録実用新案公報 1994 - 2023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 (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
A	JP 2022-16077 A (アズビル株式会社) 21.01.2022 (2022 - 01 - 21)	1-8
A	JP 2017-209073 A (アズビル株式会社) 30.11.2017 (2017 - 11 - 30)	1-8
A	WO 2021/100640 A1 (パナソニックIPマネジメント株式会社) 27.05.2021 (2021 - 05 - 27)	1-8
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> 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、一般的な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	30.05.2023	国際調査報告の発送日 13.06.2023
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） 吉田 将志 2W 4636 電話番号 03-3581-1101 内線 3258	

国際調査報告
特許ファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2023/012104

引用文献	公表日	特許ファミリー文献	公表日
JP 2022-16077 A	21.01.2022	US 2022/0010260 A1	
JP 2017-209073 A	30.11.2017	(ファミリーなし)	
WO 2021/100640 A1	27.05.2021	US 2022/0325312 A1	
		EP 4063483 A1	
		CN 114651060 A	