

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6316316号
(P6316316)

(45) 発行日 平成30年4月25日 (2018. 4. 25)

(24) 登録日 平成30年4月6日 (2018. 4. 6)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 1/00 (2006. 01)	C 1 2 N 1/00 T
C 1 2 Q 1/06 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/06
G O 1 N 33/48 (2006. 01)	G O 1 N 33/48 M
C 1 2 M 1/34 (2006. 01)	C 1 2 M 1/34 B
C 1 2 M 1/00 (2006. 01)	C 1 2 M 1/00 E

請求項の数 18 (全 19 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-553650 (P2015-553650)	(73) 特許権者	510273880
(86) (22) 出願日	平成26年1月14日 (2014. 1. 14)		コリア ユニバーシティ リサーチ アン ド ビジネス ファウンデーション
(65) 公表番号	特表2016-505269 (P2016-505269A)		KOREA UNIVERSITY RE SEARCH AND BUSINESS
(43) 公表日	平成28年2月25日 (2016. 2. 25)		FOUNDATION
(86) 国際出願番号	PCT/KR2014/000373		大韓民国、1 3 6 - 7 0 1 ソウル、ソン ブク-グ、アナム-ロ 1 4 5
(87) 国際公開番号	W02014/112762	(74) 代理人	100139594
(87) 国際公開日	平成26年7月24日 (2014. 7. 24)		弁理士 山口 健次郎
審査請求日	平成27年7月17日 (2015. 7. 17)	(74) 代理人	100185915
(31) 優先権主張番号	10-2013-0006466		弁理士 長山 弘典
(32) 優先日	平成25年1月21日 (2013. 1. 21)	(74) 代理人	100194973
(33) 優先権主張国	韓国 (KR)		弁理士 尾崎 祐朗

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 突然変異が誘発された単細胞生物体の選別方法及びこれに用いられる微細流体装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 微細藻類に光を照射して走光性を誘発する工程と、
 (b) 前記微細藻類の光反応性または光感受性の走光性指標及び光合成指標を算出する工程と、
 (c) 対照群と比較して、前記微細藻類の走光性指標が増加した場合、光合成効率または、光転換効率が改善された突然変異が誘発された微細藻類として選別する工程と、を含む走光性を利用した光合成効率または、光転換効率が改善された突然変異微細藻類の選別方法。

【請求項 2】

前記方法は、前記 (a) 工程の前に微細藻類を持続的光条件で培養した後、前記微細藻類を暗条件で培養する前処理工程をさらに含むことを特徴とする請求項 1 に記載の突然変異微細藻類の選別方法。

【請求項 3】

前記持続的光条件は、540～600nmまたは430～500nmの波長を持つ20～50μmol photon m⁻² s⁻¹強度の光を、12～24時間照射することを特徴とする請求項 2 に記載の突然変異微細藻類の選別方法。

【請求項 4】

前記前処理工程の培養は、対数増殖期 (exponential phase) まで培養することを特徴とする請求項 2 に記載の突然変異微細藻類の選別方法。

10

20

【請求項 5】

前記微細藻類は、単一コロニー由来または多数コロニー由来であることを特徴とする請求項 1 に記載の突然変異微細藻類の選別方法。

【請求項 6】

前記走光性は、陽性または陰性走光性であることを特徴とする請求項 1 に記載の突然変異微細藻類の選別方法。

【請求項 7】

前記走光性は、陰性走光性であり、 $540 \sim 600 \text{ nm}$ または $430 \sim 500 \text{ nm}$ の波長の光を、 $20 \sim 50 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 強度の光によって誘発されることを特徴とする請求項 6 に記載の突然変異微細藻類の選別方法。

10

【請求項 8】

前記走光性指標は、(i) 用いられた総微細藻類数に対する走光性に反応して単位時間当たり移動した微細藻類数の比；(ii) 単位時間当たり移動した微細藻類数の分布を基にしたヒストグラム頂点分析；または (iii) 前記方法に用いられた微細藻類の単位距離当たり移動に所要された平均時間、または速度またはその偏差を含むことを特徴とする請求項 1 に記載の突然変異微細藻類の選別方法。

【請求項 9】

前記走光性指標は、光合成効率、または光転換効率を含むことを特徴とする請求項 1 に記載の突然変異微細藻類の選別方法。

【請求項 10】

20

前記微細藻類は、緑藻類、ケイ藻類、紅藻類、淡緑藻類、茶色鞭毛藻類、黄緑色藻類、渦鞭毛藻類、または、藍藻類であることを特徴とする請求項 1 に記載の突然変異微細藻類の選別方法。

【請求項 11】

前記茶色鞭毛藻類は、*Chlamydomonas* spp.、*Rhodomonas* spp.、及び *Chroomonas* spp. の中の一つ以上であることを特徴とする請求項 10 に記載の突然変異微細藻類の選別方法。

【請求項 12】

前記 *Chlamydomonas* spp. は、*Chlamydomonas reinhardtii* であることを特徴とする請求項 11 に記載の突然変異微細藻類の選別方法。

30

【請求項 13】

前記走光性を利用した光合成効率または、光転換効率が改善された突然変異微細藻類の選別は微細流体光反応装置を利用して行われて、前記微細流体光反応装置は光透過性個体流入部と、前記個体流入部とは別に形成される個体到達部と、前記個体流入部及び前記個体到達部に流体疎通可能に連結されたチャンネル部と、前記チャンネル部の両末端の間に形成された計測部と、を含むことを特徴とする請求項 1 ～ 12 のいずれか一項に記載の突然変異微細藻類の選別方法。

【請求項 14】

前記計測部は、前記チャンネル部の径と同等または小さく形成されることを特徴とする請求項 13 に記載の突然変異微細藻類の選別方法。

40

【請求項 15】

前記計測部の径は、前記個体流入部に導入された個体の運動の個別的観察が可能な大きさで形成されることを特徴とする請求項 14 に記載の突然変異微細藻類の選別方法。

【請求項 16】

前記計測部の径は、 $10 \sim 100 \mu\text{m}$ であることを特徴とする請求項 14 に記載の突然変異微細藻類の選別方法。

【請求項 17】

前記微細流体光反応装置は、光源を追加で含むことを特徴とする請求項 13 に記載の突然変異微細藻類の選別方法。

50

【請求項 18】

前記光源は、LED (Light Emitting Diode) またはレーザーダイオードであることを特徴とする請求項 17 に記載の突然変異微細藻類の選別方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、突然変異が誘発された単細胞生物体の選別方法及びこれに用いられる微細流体装置に関し、より詳しくは走光性を利用した突然変異単細胞生物体の選別方法で、前記方法は、単細胞生物体に光を照射して走光性を誘発する工程と、前記単細胞生物体の走光性指標を算出する工程と、対照群と比較して、前記単細胞生物体の走光性指標が変化した場合、これを目的する突然変異が誘発された単細胞生物体として選別する工程と、を含む。

10

【背景技術】

【0002】

バクテリア、酵母、及び微細藻類を含む様々な単細胞生物体は、農業、畜産、水産、医薬及び資源分野で多様な目的に利用される。例えば、バクテリア及び酵母は、医薬用タンパク質発現に広く用いられ、特に微細藻類は、光エネルギーと二酸化炭素及び無機物質からバイオディーゼルに転換が可能な中性脂質を多量生産できる能力があって、近年化石燃料使用量の急増によるエネルギー資源枯渇問題及び温室ガス排出による地球温暖化問題を解決できる代案の一つとして注目されている。

【0003】

20

微細藻類は、クロロフィル、カロチノイド、フィコビリンスなどといった色素を含有していて、光合成を介して細胞成長及びこれに必要な有機物質を合成できる単細胞性藻類を微細藻類 (microalgae) といい、多くの植物性プランクトンがこれに属する。現在まで数十万種を越える微細藻類が淡水及び海洋生態系に存在すると報告されていて、様々な目的のために研究開発が試みられているが、遺伝子操作の限界等によって生産性向上のための菌株改良などに多くの困難に直面している。

【0004】

このような微細藻類の効率的利用のために、目的に合う最適な菌株開発、培地最適化、最適反応器設計、代謝工程と生産物精製などのための研究が必要である。

【0005】

30

この中最適な菌株を開発する方法中一つが、微細藻類のゲノムに特定または無作為突然変異を誘発した後、目的する性質、例えば光合成効率増大、高い脂質生産量または迅速な生長速度のような特徴を示す菌株を発掘することである。

【0006】

米国公開特許公報第 2008-00254493 号は、タンパク質分解酵素を発現しない突然変異微生物菌株の選別方法に関し、突然変異が発生した菌株をタンパク質分解酵素の気質が含まれたゲル上で培養して、気質の分解の可否を介した突然変異菌株を選別することに対して開示している。

【0007】

大韓民国公開特許公報第 2011-0018798 号は、微細流体細胞チップ、これを利用した細胞死滅定量分析法及び細胞映像分析装置に関し、微細流体システムを利用して細胞死滅をリアルタイムで分析及び映像化できる装置及び方法を開示している。

40

【0008】

しかし、これは多くの場合、複雑な生化学的及び分子生物学的分析が伴う数万個の菌株に対するスクリーニングが求められる。従って、スクリーニング初期段階で菌株を高速選別できる方法の開発が求められる。

そこで、本発明者等は、前記問題を解決して効率的に単細胞生物体を選別するための方法を開発するために鋭意努力した結果、微細流体光反応装置を利用して、走光性をベースに改良された単細胞生物体を効果的に選別できることを確認して、本発明を完成することになった。

50

【先行技術文献】

【特許文献】

【0009】

【特許文献1】 米国特許出願公開第2008/00254493号明細書

【特許文献2】 韓国特許第2011-0018798号公報

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明の目的は、改良された光反応性等の特徴を有する遺伝子変異が誘発された最適な単細胞生物体を迅速かつ効率的に選別できる方法及び装置を提供するところにある。

10

【0011】

前記目的を達成するために本発明は、(a) 単細胞生物体に光を照射して走光性を誘発する工程と、(b) 前記単細胞生物体の走光性指標を算出する工程と、(c) 対照群と比較して、前記単細胞生物体の走光性指標が変化した場合、これを目的する突然変異が誘発された単細胞生物体として選別する工程と、を含む走光性を利用した突然変異単細胞生物体の選別方法及び前記方法によって選別された突然変異単細胞生物体を提供する。

【0012】

本発明はまた、光透過性個体流入部と、前記個体流入部とは別に形成される個体到達部と、前記個体流入部及び前記個体到達部に流体疎通可能に連結されたチャンネル部と、前記チャンネル部の両末端の間に形成された計測部と、を含む微細流体光反応装置を提供する。

20

本発明はまた、以下の項目を提供する。

(項目1)

(a) 単細胞生物体に光を照射して走光性を誘発する工程と、

(b) 前記単細胞生物体の走光性指標を算出する工程と、

(c) 対照群と比較して、前記単細胞生物体の走光性指標が変化した場合、これを目的する突然変異が誘発された単細胞生物体として選別する工程と、を含む走光性を利用した突然変異単細胞生物体の選別方法。

(項目2)

前記方法は、前記(a)工程の前に単細胞生物体を持続的光条件で培養した後、前記単細胞生物体を暗条件で培養する前処理工程をさらに含むことを特徴とする項目1に記載の突然変異単細胞生物体の選別方法。

30

(項目3)

前記持続的光条件は、 $540 \sim 600 \text{ nm}$ または $430 \sim 500 \text{ nm}$ の波長を持つ $20 \sim 50 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 強度の光を、 $12 \sim 24$ 時間照射することを特徴とする項目2に記載の突然変異単細胞生物体の選別方法。

(項目4)

前記前処理工程の培養は、対数増殖期(exponential phase)まで培養することを特徴とする項目2に記載の突然変異単細胞生物体の選別方法。

(項目5)

前記単細胞生物体は、単一コロニー由来または多数コロニー由来であることを特徴とする項目1に記載の突然変異単細胞生物体の選別方法。

40

(項目6)

前記走光性は、陽性及び陰性走光性であることを特徴とする項目1に記載の突然変異単細胞生物体の選別方法。

(項目7)

前記走光性は、陰性走光性であり、 $540 \sim 600 \text{ nm}$ または $430 \sim 500 \text{ nm}$ の波長の光を、 $20 \sim 50 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 強度の光によって誘発されることを特徴とする項目6に記載の突然変異単細胞生物体の選別方法。

(項目8)

前記走光性指標は、光反応性または光感受性の中の一つ以上の測定を解して算出されるこ

50

とを特徴とする項目 1 に記載の突然変異単細胞生物体の選別方法。

(項目 9)

前記目的する突然変異が誘発された単細胞生物体は、対照群と比較して、光合成色素を含む光合成機構の変化、光合成効率、または光転換効率を含む光合成指標、及び成長速度の中の一つ以上のが改善されたことを特徴とする項目 1 に記載の突然変異単細胞生物体の選別方法。

(項目 10)

前記走光性指標は、(i) 用いられた総単細胞生物体数に対する走光性に反応して単位時間当たり移動した単細胞生物体数の比；(ii) 単位時間当たり移動した単細胞生物体数の分布を基にしたヒストグラム頂点分析；または(iii) 前記方法に用いられた単細胞生物体の単位距離当たり移動に所要された平均時間、または速度またはその偏差を含むことを特徴とする項目 1 に記載の突然変異単細胞生物体の選別方法。

10

(項目 11)

前記選別された突然変異単細胞生物体に対して光合成指標を追加で分析する工程を含むことを特徴とする項目 1 に記載の突然変異単細胞生物体の選別方法。

(項目 12)

前記走光性指標は、光合成色素を含む光合成機構の変化、光合成効率、または光転換効率を含むことを特徴とする項目 11 に記載の突然変異単細胞生物体の選別方法。

(項目 13)

前記単細胞生物体は、微細藻類であることを特徴とする項目 1 に記載の突然変異単細胞生物体の選別方法。

20

(項目 14)

前記微細藻類は、緑藻類、珪藻類、紅藻類、鞭毛類、淡緑藻類、茶色鞭毛藻類、黄緑色藻類、渦鞭毛藻類、または、藍藻類であることを特徴とする項目 13 に記載の突然変異単細胞生物体の選別方法。

(項目 15)

前記茶色鞭毛藻類は、*Chlamydomonas* spp., *Rhodomonas* spp., 及び *Chroomonas* spp. の中の一つ以上であることを特徴とする請求項 14 に記載の突然変異単細胞生物体の選別方法。

(項目 16)

前記 *Chlamydomonas* spp. は、*Chlamydomonas reinhardtii* であることを特徴とする項目 15 に記載の突然変異単細胞生物体の選別方法。

30

(項目 17)

項目 1～16 の中一項に記載の方法によって選別された突然異単細胞生物体。

(項目 18)

光透過性個体流入部と、前記個体流入部とは別に形成される個体到達部と、前記個体流入部及び前記個体到達部に流体疎通可能に連結されたチャネル部と、前記チャネル部の両末端の間に形成された計測部と、を含む微細流体光反応装置。

(項目 19)

前記計測部は、前記チャネル部の径と同等または小さく形成されることを特徴とする項目 18 に記載の微細流体光反応装置。

40

(項目 20)

前記計測部の径は、前記個体流入部に導入された個体の運動の個別的観察が可能な大きさで形成されることを特徴とする項目 19 に記載の微細流体光反応装置。

(項目 21)

前記計測部の径は、10～100 μm であることを特徴とする項目 19 に記載の微細流体光反応装置。

(項目 22)

前記微細流体光反応装置は、光源を追加で含むことを特徴とする項目 18 に記載の微細流

50

体光反応装置。

(項目 2 3)

前記光源は、LED (Light Emitting Diode) またはレーザーダイオードであることを特徴とする項目 2 2 に記載の微細流体光反応装置。

(項目 2 4)

前記装置は、項目 1 ～ 1 7 の中いずれか一項に記載の方法に用いられることを特徴とする項目 1 8 に記載の微細流体光反応装置。

【図面の簡単な説明】

【0013】

10

【図 1】光合成微細藻類菌株を本発明の一実現例に係る微細流体システム内で走光性を利用して光反応が特異的な菌株を選別する全体的な過程を図式化した概略図である。

【図 2 A】本発明に用いられる様々な例示的微細流体光反応装置の平面図である。

【図 2 B】本発明の一実現例で用いられた微細流体光反応装置の平面図（上段）、斜視図（下段）である。

【図 3 A】走光性を介した微細藻類選別に効果的な光の波長を決めるために、本発明一実現例により様々な波長の LED を用いて微細藻類の光反応を測定したグラフである。

【図 3 B】図 2 A に図示されたそれぞれの微細流体光反応装置を利用して、走光性による微細藻類の光反応を測定したグラフで、グラフ上の 1、2、3、4 は、図 2 A の各装置に記載された番号に相応するものである。

20

【図 4】本発明の一実現例で用いたれた微細藻類菌株内クロロフィル a とクロロフィル b の比 (a/b ratio) を示したグラフである。

【図 5】本発明の一実現例に係る微細流体光反応装置を利用して、光反応を示す微細藻類菌株の時間に伴う分布を細胞数でしめしたヒストグラムで、対照群として用いた野生型 (wild type) と突然変異菌株群集 (colony) の光反応程度を示す。

【図 6 A】対照群及び突然変異菌株それぞれにおいて全細胞数に対する光反応を見せた細胞数の比率を介して光反応性を分析したグラフである。

【図 6 B】対照群と突然変異菌株が走光性によって一定距離 (3 cm) を移動するのに必要とされた平均所要時間の偏差を示したグラフで、突然変異菌株の間の光感受性を示す。

【図 7 A】クロロフィル a/b 比率と NPQ との相関を示したグラフで、クロロフィル a/b 比率が高いほど NPQ (non-photochemical quenching) 値が低い逆比例相関を示して光合成効率が低いことを示す。

30

【図 7 B】クロロフィル a/b 比率と qP (Photochemical quenching) の相関を示すグラフで、クロロフィル a/b 比率が高いほど qP 値が高い相関を示した光合成効率が低いことを示す。

【図 8 A】本発明の一実施例に係る走光性指標で平均到達時間と光合成効率測定指標である NPQ との相関グラフで、走光性を介して平均到達時間が速くなった突然変異菌株は、光合成効率測定指標である NPQ 値が低い相関を示して光感受性が増加した菌株は光合成効率が低いことを示す。

【図 8 B】本発明の一実施例に係る走光性指標で平均到達時間と光合成効率測定指標である qP との相関グラフで、走光性を介して平均到達時間が速くなった突然変異菌株は光合成効率測定指標である qP と高い相関を示して NPQ と同様に光感受性が増加した菌株は光合成効率が低いことを示す。

40

【図 9】走光性を介して一定時間 (5 分) の間一定距離 (3 cm) を移動する細胞数を対照群の細胞数で分けた値を示した移動細胞個体数比率と NPQ との相関を比較したグラフである。これは、値が 1 以上である突然変異菌株は、一定時間の間対照群菌株に対比してより多くの細胞数が移動したことで、光感受性及び光反応性が優れた突然変異が誘発された菌株を示して、このような菌株は、NPQ 値が低い相関を示すので、光合成効率が増加した菌株であることを示す。

【図 10】本発明の一実現例に係る微細流体光反応装置を利用して走光性による微細藻類

50

の実際の動きを見せる光学顕微鏡（×４０）イメージである。

【発明を実施するための形態】

【００１４】

他の方式で定義されない限り、本明細書において使用されたあらゆる技術的・科学的用語は、本発明が属する技術分野に熟練した専門家によって通常理解されるものと同じ意味を有する。通常、本明細書において使用された命名法は、本技術分野において周知であり、しかも汎用されるものである。

【００１５】

本発明は、運動性を有する光合成単細胞生物体から改良された光反応性を有する突然変異体を走光性の差を通じて効果的に選別することができるとの発見に基づいたもので、具体的に単細胞生物体が有する光感受性及び/または、光反応性の差を利用して微細流体システム内で突然変異が誘発された細胞の個体別運動の統計的分析を介して光に対する光反応が特異的に変化した特徴を持つ突然変異が誘発された菌株を迅速かつ効率的に選別する可能性があることを発見した。

10

【００１６】

従って、一観点において、本発明は、（a）単細胞生物体に光を照射して走光性を誘発する工程と、（b）前記単細胞生物体の走光性指標を算出する工程と、（c）対照群と比較して、前記単細胞生物体の走光性指標が変化した場合、これを目的する突然変異が誘発された単細胞生物体として選別する工程と、を含む走光性を利用した突然変異単細胞生物体の選別方法に関する。

20

【００１７】

本発明で用いられた用語「単細胞生物体」、「細胞」または「菌株」は、相互交換的に用いられて、これは運動性がある光に対して反応、走光性を示す多様な単細胞生物を称するもので、例えば光合成細菌またはバクテリア、光合成ができるユーグレナのような原生動物または微細藻類を含む。一実現例では、特に代表的に微細藻類であるコナミドリムシ（*Chlamydomonas reinhardtii*）が用いられる。

【００１８】

本発明で用いられた用語「走光性」とは、光に反応した単細胞生物体の運動で光に沿って移動する陽性走光性または、光を避けて移動する陰性走光性を全部含むものであり、特定光量では陽性走光性を示す場合でも、光の光度が一定強度を越える場合、陰性走光性を示す場合もある。

30

【００１９】

本発明で用いられた用語「突然変異」とは、変異が誘発されなかった対照群と比較して、遺伝子水準で変異が発生して、このような変異によって表現型、特に走光性、光反応性及び/または、光感受度等の特徴に差が誘発されたもので、自然界で発見される突然変異はもちろん人為的に導入された突然変異を全部含むものである。突然変異は、無作為または特定位置で発生した突然変異、遺伝子を成すヌクレオチドの付加、欠如、及び/または、置換などによる突然変異を全部含むものである。

【００２０】

本発明で用いられた用語「目的する突然変異」または「目的する特性を持つ」、「目的する特徴が誘発された突然変異」とは、前記のような遺伝的変化によって単細胞生物体で改良しようとする一つ以上の特性が変化、例えば改善、向上したもので、単細胞生物体の最終用途に応じて多様な特性が含まれる。例えば、単細胞生物体として微細藻類が用いられる場合、光合成に関連した特性または指標、例えば、光合成色素を含む光合成機構の変化、光合成効率、光転換効率を含み、その他成長速度の変化、脂質含有量及び/または脂質成分の変化等を含むが、これに制限するものではない。改善された程度を把握するために、突然変異が誘発された単細胞生物体で相応する特性と比較することができ、当業者ならば、改善された特徴を考慮して適切な基準を選択できて、例えば、対照群と対比して、例えば、約５％以上、約１０％以上、約２０％以上、約３０％以上、約４０％以上、約５０％以上、約６０％以上、約７０％以上、約８０％以上、約９０％以上、約１００％以上

40

50

改善されるのを目的する突然変異が誘発された単細胞生物体として選別することができるはずである。

【0021】

改善された特徴を示す突然変異が誘発された個体を選別する本発明の方法に用いられる単細胞生物体は、自然的または人為的突然変異が誘発されて、ゲノムに一つ以上の突然変異を持つと予測される多様な単細胞生物体を含む突然変異ライブラリ由来であってもよい。また、本発明の方法には、一種類の突然変異を含むと予測される、一つの細胞から由来した単一コロニーまたはそれぞれ同じまたは異なる一つ以上の突然変異を含む多数の細胞から由来した多数コロニー由来であってもよい。例えば、単一コロニー由来の場合、特性確認、または単一コロニーの個別的な特性確認を介した最適な特性を示す突然変異単細胞生物体の選別、または多数のコロニー混合物が用いられる場合、突然変異ライブラリから所望の特性を持つ遺伝子変異が誘発された目的する突然変異を効率的選別に用いられることができる。

10

【0022】

本発明方法は、走光性を利用した迅速かつ簡単な分析で、自然界で発見される変異体、または人為的に突然変異が誘発された突然変異ライブラリに含まれた数個～数万個の突然変異中、所望の突然変異が誘発された個体の選別に効果的に用いられることができる。特に、後者の場合、本発明の方法を繰り返し行って、多量の突然変異が誘発された単細胞生物体を迅速かつ効率的に選別することができる。

【0023】

本発明で用いられた用語「光反応性」とは、単細胞生物体に光が照射される場合、走光性によって光の反対側に移動する特性を示すもので、これは一定時間、例えば30分間、一定の光度、例えば $30 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ が照射された場合、導入した総細胞、例えば約3,000個の細胞のうちに走光性によって反対側に到達した細胞数の水で測定されることができる。

20

【0024】

本発明で用いられた用語「光敏感性」とは、単細胞生物体に光が照射される場合、走光性によって光の反対側もどれだけ迅速に移動するのかわかを示したもので、一定の光度、例えば $30 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の光が照射された場合、一定距離、例えば3cmを走光性によって到達するのにかかる時間で測定されることができる。

30

【0025】

本発明に係る方法は、光に対する単細胞生物体の反応を基本とするもので、本発明で用いられた走光性反応指標または走光性指標は、光に反応した単細胞生物体の特徴変化を示すことができる指標で、多様な数値を含むことができ、光反応性または光敏感性の中の一つ以上の測定を解して算出されることができる。このような走光性指標は、対照群と比較して、光に対する反応に関連した変化を測定できることならいずれも含むことができ、(i) 本発明の方法に用いられた総単細胞生物体数に対する走光性に反応して単位時間当たり移動した単細胞生物体数の比；(ii) 単位時間当たり移動した単細胞生物体数の分布を基にしたヒストグラム頂点分析；または(iii) 前記方法に用いられた単細胞生物体の単位距離当たり移動に所要された平均時間、または速度またはその偏差を含む。例えば、本発明の実施例及び図3乃至9に記載された多様な方式で算出されることができる。例えば、図5の頂点分析を介して野生型菌株と突然変異菌株の反応到達時間の頂点移動を観察することができて、頂点分析を介して細胞の最大反応時間と反応した細胞の比率分析などが可能である。

40

【0026】

本発明に係る一実現例で、本方法が後述する本発明に係る装置に用いられる場合は、例えば、前記方法に(i) 用いられた総細胞数対比前記チャネルを介して一定時間前記到達部に移動した総細胞数の比；(ii) 一定数の細胞が前記到達部に移動するのに所要された平均時間またはその偏差；(iii) 前記方法に用いられた細胞の前記到達部までの移動速度；及び(iv) 前記方法に用いられた細胞が前記到達部まで移動するのにかかる時間による

50

細胞数分布を含むが、これに制限するものではない。

【0027】

本発明の方法に用いられることができる単細胞生物体は、前述した通りであり、例えば走光性及び運動性を示す光合成単細胞生物体、好ましくは微細藻類が用いられる。一実現例で、微細藻類は、緑藻類、硅藻類、紅藻類、鞭毛類、淡緑藻類、茶色鞭毛藻類、黄緑色藻類、渦鞭毛藻類、または、藍藻類である、例えば緑藻類 (*Chlorella*、*Dunaliella*、*Scenedesmus*、*Haematococcus*、*Nannochloris* など)、硅藻類 (*Skeletonema*、*Thalassiosira*、*Phaeodactylum*、*Chaetoceros* など)、紅藻類 (*Porphyridium cruentum*、*Galdieria* など)、鞭毛類 (*Isochrysis*、*Pavlova* など)、淡緑藻類 (*Tetraselmis*、*Pyramimonas*)、茶色鞭毛藻類 (*Chlamydomonas*、*Rhodomonas*、*Chroomonas* など)、黄緑色藻類 (*Olistodiscus* など)、渦鞭毛藻類 (*Cryptothecodinium*、*Alexandrium*、*Gymnodinium*、*Chattonella*、*Karenia* など)、藍藻類 (*Spirulina*、*Synechococcus*、*Synechocystis*、*Cyanidium* など) が挙げられるが、これらに制限するのではない。一実現例では、茶色鞭毛藻類、好ましくは *Chlamydomonas* spp.、*Rhodomonas* spp.、*Chroomonas* spp.、さらに好ましくはコナミドリムシ (*Chlamydomonas reinhardtii*) が用いられるか、これに制限されない。

10

20

【0028】

本発明の方法で、前記 (a) 工程の前に単細胞生物体を持続的光条件で培養した後、前記単細胞生物体を暗条件で培養する前処理工程を追加で含んでもよい。前処理工程は、持続的な光条件で培養することによって細胞の活性が最も優れた対数期状態で維持するためのものであって、走光性測定直前に暗条件で培養するのは、光に対する感受性を増加させて、走光性による細胞の光反応性を増加させるためである。

【0029】

すなわち、前処理工程は、持続的光条件は、光合成を介して成長する微細藻類が活動性が最も優れた対数期状態になれる光量なら十分であり、特に限定されるのではない。また、対数期により迅速な到達のために、光が持続的に照射される。このような条件を満たす限り、光量及び照射時間は限定されないが、例えば持続的光条件は、例えば約 $20 \sim 50 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 強度の光を、好ましくは約 $40 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 強度の光を約 12 ～ 24 時間照射するが、これに制限されない。

30

【0030】

前記目的を達成する限り様々な範囲の光度及び時間が用いられてもよい。用いられる波長は、実験対象単細胞生物体の具体的種類によって異なってもよい。光合成が可能な単細胞生物体別に、効率的に認知する光の波長があつて、当業者ならばこのような事項を考慮して適切な波長を選択できるはずである。例えば、微細藻類クラミドモナスの場合、眼点 (eyespot) という光を感知する部分があるが、この部分が認知する光波長が一般的に $540 \sim 600 \text{ nm}$ または約 $430 \sim 500 \text{ nm}$ の波長を持つ光を認知するので、この波長領域帯の光を用いることが好ましい。

40

【0031】

また、前処理工程の培養は、細胞生長周期の最適な状態である対数増殖期 (exponential phase) まで培養した後、次の工程で用いられる。単細胞生物体の生長は、大きく誘導期 (lag phase: induction phase); 対数増殖期 (exponential phase, log phase, growth phase); 停止期 (stationary phase); 及び死滅期 (death phase) で構成され、当業者ならば対数増殖期を判別できるはずである。

【0032】

本発明の方法による走光性は、陽性及び陰性走光性を全部含む。走光性に関しては、先に

50

説明した通りであり、本発明に係る実現例では、陰性走光性が誘発される。通常の光の強度では、陽性走光性を誘発する単細胞生物体で陰性走光性を誘発するために、強い強度の光が照射されなければならない。すなわち、陰性走光性を誘発できる光の強度は、目的する対象生物体に応じて異なり、このような効果を達成できる多様な光度の光が用いられ、当業者ならば走光性程度を基準に適切な範囲の強度を選択できるはずである。本発明に係る実現例では、微細藻類、特にコナミドリムシ (*Chlamydomonas reinhardtii*) が用いられて、この場合、光の強度は約 $30 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1} \text{cm}^{-1}$ であってもよいが、これに制限されない。光の波長に関しては、前述したとおりである。

【0033】

10

本発明の方法により選別された単細胞生物体は、対照群、すなわち突然変異が誘発されなかった菌株、または、参照として使う比較対象菌株と比較して、光反応性及び光敏感性が増加しており、このような特徴の変化は、前述した走光性指標で測定でき、走光性指標が改善されることを目的する突然変異が誘発された菌株として選別することができる。走光性指標の改善程度は、分析対象または指標の種類によって異なるが、例えば対照群と比較して約5%以上、約10%以上、約20%以上、約30%以上、約40%以上、約50%以上、約60%以上、約70%以上、約80%以上、約90%以上、約100%以上改善されたことを目的する突然変異が誘発された単細胞生物体として選別することができるはずである。

【0034】

20

本発明の方法は、突然変異菌株を製作する目的に応じて追加の工程を含んでもよい。例えば、突然変異の選別が、光合成特徴の改質、脂質生産の改質、成長速度改善のためのものならば、それぞれの特徴分析のための追加の工程を含む。例えば、光合成指標、好ましくは光合成色素を含む光合成機構の変化、光合成効率、光転換効率を追加で分析する工程を含んでもよいが、これに制限されない。このような分析方法は、当業界に公示されていて、当業者ならば適切なものを選択でき、例えば本発明の実施例及び図3乃至9に記載された多様な指標、例えばNPQ (non-photochemical quenching)、またはqP (Photochemical quenching) 及び/またはクロロフィルa/b比等を含むか、これに制限されない。

【0035】

30

他の観点において、本発明は、前記走光性を利用した突然変異単細胞生物体の選別方法によって選別された突然変異単細胞生物体に関する。

【0036】

前記菌株は、突然変異の様態に合わせて様々な分野で有用物質の生産などのために応用されることができる。例えば、コナミドリムシ (*Chlamydomonas reinhardtii*) は、現在まで微細藻類のうち最も多くの研究が進行された種であり、他の菌株に比べて形質転換等の遺伝子操作が容易に関連道具が開発されていると共に、ゲノム配列も明らかになっていて、微細藻類のモデル生物体とされている。従って、光合成機序が改善された突然変異菌株を選別して、これをバイオディーゼル生産のための脂質関連研究、水素生産研究などに活用することができる。

40

【0037】

本発明方法により選別された菌株は、実施例及び図7乃至9に記載された通り、クロロフィルa/b比率と光合成効率測定指標であるNPQとqPが、相関の分析を介して、目的する突然変異が誘発されて、これは本方法の優秀性を示している。

【0038】

また他の観点において、本発明は、光透過性個体流入部と、前記個体流入部とは別に形成される個体到達部と、前記個体流入部及び前記個体到達部に流体疎通可能に連結されたチャンネル部と、前記チャンネル部の両末端の間に形成された計測部と、を含む微細流体光反応装置に関する。

【0039】

50

本発明の方法は、本発明の方法を達成する限り様々な装置に用いられるのは、当業者に明らかである。すなわち、本発明の装置はもちろん、本発明の装置の各構成と相応する部位を持つこのような目的を達成できる他の装置が用いられてもよい。以下、本発明の装置に含まれた構成及びそれによる名称を例に挙げて説明するか、これに限定されるのではなく、発明を理解して解釈するに当たり相応する構成と解釈されなければならない。

【0040】

図2A及び2Bを参照すると、本発明の装置は、一定間隔を置いて形成された個体流入部110及び個体到達部120を含み、その間に様々な形のチャンネル130が位置する。前記個体流入部110及び個体到達部120は、分析対象である単細胞生物体を入れることができる空間、形及び大きさで形成され、対象個体、例えば単細胞生物体の大きさ、特性及び用いられる個体数に応じて多様な形、大きさ及び/または材質で形成されることができ

10

【0041】

前記チャンネルは、個体流入部及び個体到達部と流体が疎通できるように形成される。前記チャンネルを介して、個体流入部に単細胞生物体と共に導入された培養液及び単細胞生物体

20

【0042】

前記チャンネルの両末端の間の一部に計測部140が形成される。図10を参照すると、前記計測部は、移動する単細胞生物体を単一細胞レベルで顕微鏡的方法を利用して観察する部位で、単細胞生物体の運動の個別的観察が可能な構造及び大きさで形成される。例えば、本装置に使用しようとする細胞の径を基準に、例えば1個乃至約5個の細胞が通過できる程度の大きさで製作され、用いられる対象単細胞生物体の具体的大きさに応じて変わる。例えば、約100µm乃至200µm、例えば特に微細藻類クラミドモナスが用いられる場合、径は約50µm乃至100µmであってもよいが、これに制限されない。

30

【0043】

本発明の微細流体光反応装置に含まれる各構成は、光透過性がある透明な材質で用いられる単細胞生物体に対する毒性がなく、多孔性で生物活性に必要な物質伝達が容易で、単細胞生物体の移動を邪魔しない材質、または前記特徴を有するように前処理された材質で製作されることが好ましい。このような物質としては、例えばPMMA (Poly (methyl methacrylate))、PS (Polystyrene)、またはPDMS (polydimethylsiloxane) 等が挙げられるが、これに制限されない。

【0044】

図1を参照すると、本発明の微細流体光反応装置は、光源を追加で含んでもよい。本発明の装置に用いられる単細胞生物体に目的する最適な走光性を誘発できる光源及び波長が選択されて、このような効果を示す限り、分析する対象及び目的に合わせて多様な光源及び波長の光が用いられる。

40

【0045】

光源の種類では、一定波長を放出できるものなら可能で、例えばレーザーダイオード、またはLED (Light Emitting Diode) が用いられる。本発明の一実現例では、分析対象に微細藻類が用いられて、特にコナミドリムシ (Chlamydomonas reinhardtii) の場合、緑色と青色波長を出すLED光源が利用される。

【0046】

50

図1は、本発明の装置及びこれを利用した突然変異単細胞生物体、すなわち菌株選別方法を例示的に示した模式図である。本発明に係る微細流体光反応装置は、走光性を示す運動性のある単細胞生物体の走光性を利用して、光に反応する特徴が変異された生物体の選別に用いられる。例えば、本発明に係る装置の細胞流入部に一定量の走光性及び運動性を持つ単一または多数コロニー由来の単一細胞生物体、例えば微細藻類を導入した後、特定強度の強い光を照射すると、これに反応して、細胞が光源が照射される方向から遠ざかる方向にチャンネルを介して移動する。チャンネルを介して移動する細胞は、計測部を通過する際に、顕微鏡的観察を介して、走光性指標算定のための各種データ、例えば一定距離移動時間、移動細胞数等、様々なデータが収集されて、これに関しては、前述した記載を参照することができる。本発明に係る実現例で、走光性を利用した突然変異が誘発された単細胞生物体として、微細藻類が用いられる場合、次の工程を含んでもよい。

10

【0047】

例えば、一実現例で、本発明の装置を利用した方法は、例えば（a）単細胞生物体を持続的光条件で培養した後、前記単細胞生物体を暗条件で培養する前処理工程；（b）前記前処理された単細胞生物体を前記光反応装置の細胞流入部に導入する工程；（c）細胞流入部に導入された前記単細胞生物体の走光性を誘発できるよう、前記細胞流入部に光源を照射する工程；（d）前記走光性によって前記チャンネルを介して前記到達部に移動する前記単細胞生物体を前記計測部で観察して、走光性反応指標を収集する工程；及び（e）対照群と比較して、前記走光性指標が変化した場合、これを突然変異が誘発された細胞と選別する工程を含むが、これに制限されない。前記前処理工程は、選択的に含んでもよい。本方法に用いられる各用語及び説明は先に説明した本発明方法に関連して言及したのを参照することができる。

20

【実施例】

【0048】

以下、本発明を実施例を挙げて詳述する。これらの実施例は単に本発明をより具体的に説明するためのものであり、本発明の範囲がこれらの実施例に制限されないことは当業者において通常の知識を有する者にとって自明である。

【0049】

実施例1：突然変異が誘発された菌株の製造

本実施例に用いられた菌株は、漢陽（ハンヤン）大学のチンオンソン教授研究室で入手したもので、種は *Chlamydomonas reinhardtii* である。

30

前記菌株は、野生型（wild type）菌株 J L 4 2 8 で、野生型菌株に挿入突然変異誘発法（insertional mutation）で無作為突然変異を誘発した後、通常知られているクロロフィル a / b 比率が高い菌株が光合成効率が高い可能性が高い点（Anastasiou Melis（2012）Vol.158 930-945）を利用して、一次的にクロロフィル a / b 比率が野生型菌株より高い菌株を選別して、本発明方法の効能検証のために用いた。

微細藻類培養に用いられた培地は、TAP培地で、これらの構成成分は〔表1〕に示した。

【0050】

実施例2：微細藻類培養及び微細流体装置製作

40

微細流体装置は、シリコン基板に陰性感光剤SU-8 50を回転塗布した後、デザインされたマスクを覆って紫外線露光機を利用して紫外線に露出させてフォトリソグラフィ（photolithography）を介して製作され、高分子PDMS（Polydimethylsiloxane）と硬化剤を10：1の割合で混合して、フォトリソグラフィで製作されたSU-8モールドの上に製作した。完成されたPDMS微細流体装置はプラズマ処理を介してスライドガラスと結合させた。製作された装置は図2Bのとおりである。

【0051】

前記装置は、図2Aで見られるように、最適なチャンネル構造を選別するために、チャンネルの幅及び形態に応じた細胞の運動性を下記の実施例3のように分析した。要約すると、緑色LED光源（540nm）を細胞をいれた入口細胞流入部の部分に照らしながら一定距

50

離に位置する反対側部位、すなわち細胞到達部に到達する細胞数をそれぞれの装置で測定して、その結果を比較した結果、図3Bで見られるように、微細流体装置内細胞流入部と近接したチャネルの幅によって細胞の走光性による運動が影響を受ける現象を確認した。従って、細胞の運動に対する抵抗性を最小化しながら、計測部での個別細胞の観察及び統計的分析を容易にするために、図2Bのようにチャネル入口の幅が4mmから出口の幅が100μmに一定に減る形態のチャネルが含まれた装置デザインを選定して、上述した通り製作した。

【0052】

実施例3:光の波長に応じた微細藻類の光反応分析

光に対する細胞の光反応性及び光感受性を効率的に一定に調節するための適応するための前処理過程で、人為的突然変異が誘発されなかった*Chlamydomonas reinhardtii*野生型菌株(JL428)及び実施例1の突然変異菌株をTAP agar培地で種培養(seed culture)した。具体的に、TAP液体培地に40μmol photon m⁻² s⁻¹強度の24時間持続的な光条件及び23℃温度条件で2日間培養した。2日間培養した後、対数成長段階に入ると、7.5×10³ cell ml⁻¹に希釈して暗室条件で1時間保管した。

【0053】

以後、暗室条件で1時間保管した細胞を下記の図2Bの細胞流入口の部分に40μl入れて、細胞到達部には40μl TAP培地を入れた後、計測部で倒立光学顕微鏡で走光性による微細藻類細胞の動きを観察した。

【0054】

光の波長別微細藻類の光反応を分析するために、細胞濃度と条件を前記条件のように一定に維持した後、用いるLED光源の波長を異なるように調節した。緑色(540nm)、赤色(650nm)、青色(470nm)、白色(全波長)、そして暗室条件の計五つの条件で微細藻類の走光性を介した光反応分析を実施した。

【0055】

その結果、図3Aで見られるように、微細藻類は、特定波長で敏感な反応を示したが、緑色(540nm)と青色(470nm)で反応性が大きく示され、赤色(650nm)では光に対する反応を示さなかった。これらの結果から、本発明で基本的に用いられる光の波長は540nmの緑色LED光源を用いた。

【0056】

実施例4:野生型及び突然変異菌株の走光性による光反応パターン分析及び選別

緑色LED光源(540nm)を30μmol photon m⁻² s⁻¹の強度で細胞流入部に光を照らして、計測部に到達する細胞数を30分間分単位で測定した。結果は、図5で見られるように、光反応による各菌株別時間に応じた移動個体数を分析した結果、一定の形態のヒストグラムを得た。突然変異菌株のヒストグラムを対照群のヒストグラムと比較した結果、突然変異1、2、3の場合、対照群に比べて光反応ヒストグラムの頂点が左に移動したのを確認した。それに対して、突然変異4、5の場合、対照群と大きな差を見せなかった。この結果は、光合成効率と間接的に関連するクロロフィルa/b比率と関連して、一般的にクロロフィルa/b比率が高い菌株が光合成効率が高い菌株である確率が高いが、走光性によって得たヒストグラムを分析してみると、対照群に比べてクロロフィルa/b比率が増加した菌株が、光によって移動する細胞数が増加して、対照群とクロロフィルa/b比率が大きい差を見せない突然変異菌株は、走光性による移動細胞数が差が殆どないことから、図5のヒストグラムのパターン分析だけでも、光合成効率が増加した突然変異が誘発された菌株を走光性反応で容易で効率的な観測が可能であることが分かる。

【0057】

また、図6Aで見られるように、全細胞数対比光反応に移動した個体数の比率から、対照群菌株と突然変異菌株の光反応性を比較した結果、対照群菌株の場合、全体細胞の65%が光反応を見せたことに比べて、突然変異1は85%が光反応を見せて移動して、突然変

10

20

30

40

50

異2、3も80%ほどの細胞が光反応を見せた。それに対して、突然変異4、5は、光反応比率においても対照群と類似する比率を見せた。この結果は、クロロフィルa/b比率の増加による光合成効率が増加した突然変異菌株は、同じ光の強度に対して反応する程度が、対照群に比べてより大きいことを意味して、対照群に比べてクロロフィルa/b比率の増加が大きい突然変異菌株は、光合成効率の程度が対照群と似ていることを意味して、このような菌株は同じ光の強度に対する光反応性も対照群と似ていることを意味する。

【0058】

対照群と突然変異菌株の光に対する走光性によって、一定時間内に細胞個体の移動にかかる平均時間の偏差を分析することによって、光に対する感受性を比較分析でき、これを介して簡単に光反応が特異的な菌株を選別することが可能である。突然変異1、2、3の場合、図6Bで見られるように対照群に比べて平均時間が減少したのを確認できて、突然変異4、5は、対照群に比べて大きく減少しない結果を見せた。この結果は、クロロフィルa/b比率が増加することによって光合成効率が増加した突然変異菌株は、一定の光の強度に対して対照群菌株より敏感であることを意味して、これは細胞の移動速度と関連して示される。同じ光の強度に対して光に対する感受性が増加した菌株は、さらにはやい反応に移動して一定距離(3cm)を行くのにかかる所用時間が減ることを示す。相対的に対照群菌株とクロロフィルa/b比率が差が殆どない菌株の場合には、一定の光の強度に対する感受性が似ていて、一定の距離を行くのにかかる時間が対照群菌株と比較して殆ど差がないことを示す。

【0059】

一方、図5、6A、6Bで見られるように、微細藻類対照群及び突然変異菌株の走光性による光反応性は、図4に示されたクロロフィルa/bの比率と非常に類似するパターンを見せて、これは、本発明で適用した菌株の個体別光反応性に対する統計的分析法によって得た各種指標(ヒストグラムの頂点、移動平均時間、光反応細胞の比率等)が、走光性による光反応性、光感受性だけでなく突然変異によって発生するクロロフィル等光合成機構の変化とも関連性を持つ可能性があることを示す。

【0060】

従って、本発明で用いられた微細流体システム内微細藻類の走光性に対する分析方法を利用して一次選別された菌株を対象に光合成効率が向上した菌株をより効率的に探索することができる。

【0061】

実施例5:選別された突然変異菌株の光合成指標分析

本実施例では、前記の通りに走光性によって選別された突然変異菌株の光合成効率を測定した。指標として、NPQとqPを用いた。NPQは、光合成のために受けた光エネルギー中光合成に使用できず消滅するエネルギーで、NPQ値が低いほど光合成効率が高いことを意味して、qPは光合成に用いられるエネルギーを意味して、qP値が高いほど光合成効率が高いことを意味する。

【0062】

5-1 選別された菌株のクロロフィルa/b比率とNPQ、qPと相関分析

選別された菌株のクロロフィルa/b比率とNPQ、qPと相関を次の通り分析した。クロロフィル測定法は、吸光度測定を基本とする公示された方法(Hartumut K. LichtenthalerとClaus Buschmann (2001) F4.3.1-F4.3.8)で測定した。

【0063】

要約すると、フラスコで光度 $40 \mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ で3日間培養した後、対数成長期に入った時、クロロフィル測定を実施した。フラスコをよく振って1mlを1.5mlチューブに移して、15,000rpmで1分間遠心分離した。遠心分離後、上澄み液を除去して、メタノール1mlを入れた後、ボルテックスを行って、クロロフィルを抽出した。引き続き15,000rpmで1分間遠心分離した後、上澄み液に対してA663.2、A646

． 8 波長で吸光度を測定した。その後、下記の式に代入して、クロロフィル a と b を測定してクロロフィル a / b 比率を測定した。

$$\text{Chl } a \text{ (g/ml)} = 16.72 \times A_{665} - 9.16 \times A_{652} \quad 4$$

$$\text{Chl } b \text{ (g/ml)} = 34.09 \times A_{652} - 15.28 \times A_{665} \quad 2$$

$$\text{Chl } a/b = \text{Chl } a \div \text{Chl } b$$

【0064】

N P Q 及び q P は、TAP 培地に寒天を含む寒天培地で 23 で菌株を培養した後、Imaging-PAM クロロフィル蛍光分析装置 (Heinz Walz GmbH, Germany) を利用して測定した。

【0065】

10

以後、実施例 3 乃至 5 と同様の分析を介して取得したデータ、すなわち平均移動時間、単位時間到達した細胞群集の細胞比率などと、クロロフィル a / b 比率、N P Q そして q P との分析を実施した。

【0066】

結果は、図 7 A 及び 7 B に記載されている。これに示された通り、クロロフィル a / b 比率が高いほど N P Q 値が低い相関を示して、q P 値は高い相関を示して、光合成効率が高いことを示した。

【0067】

5-2 選別された菌株の平均到達時間と N P Q との相関分析

実施例 4 に記載された通り、各菌株に対して得た走光性指標のうち平均到達時間と実施例 5 に記載された光合成効率測定指標との分析を実施した。

20

【0068】

結果は、図 8 A 及び 8 B に記載されている。これに示された通り、二つの指標間の相関性を示す r^2 値が 1 に近いほど相関性が高く、従来に用いられたクロロフィル a / b 比率よりは、本発明の方法による走光性を介して得た指標が、光合成効率が増加した突然変異菌株を選別するのに有用であることを示している。

【0069】

5-3 選別された菌株の対照群対比移動細胞数の比と N P Q との相関分析

実施例 4 に記載された通り、各菌株に対して得た走光性指標のうち、対照群対比移動細胞数の比と実施例 5 に記載された光合成効率測定指標との分析を実施した。

30

【0070】

結果は、図 9 に記載されている。これに示された通り、その比率が 1 以上である突然変異菌株は、一定時間対照群菌株に対比してより多くの細胞数が移動したことで、これは、光敏感性及び光反応性が優れた突然変異菌株を意味して、このような菌株が、N P Q 値が低い相関を示すので、これは、光合成効率が増加した菌株であることを示す。従って、このような結果は、走光性を利用した本発明方法を利用する場合、光合成効率が高い菌株の選別が可能であることを示す。

【産業上の利用可能性】

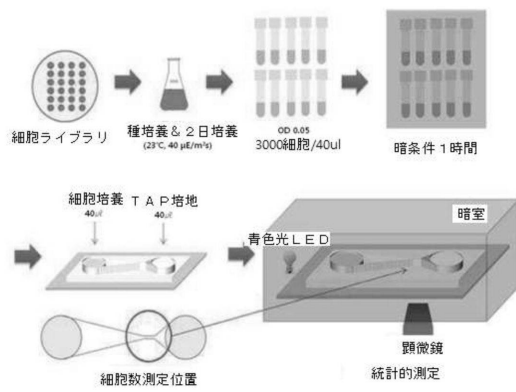
【0071】

本発明は、走光性を利用して改良された単細胞生物体を微細流体システムを利用して効果的に選別できるもので、細胞単位で容易なモニタリングが可能で、収集した結果の統計的分析を含んだ様々な分析を介して、変化した光反応性及び/または光敏感性を持つ突然変異菌株を容易にまたは高速で選別できて、走光性及び光転換効率の相関解明、光転換効率が向上した改良された単細胞生物体選別に有用に活用できる。

40

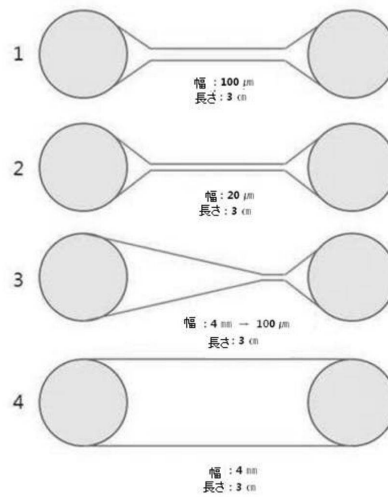
【図 1】

【図 1】



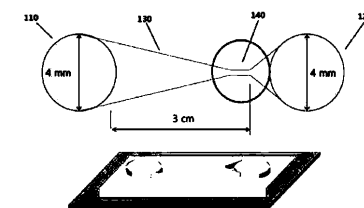
【図 2 A】

【図 2 A】



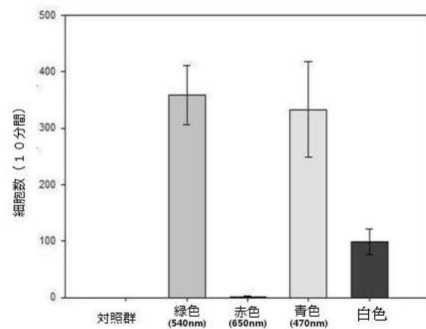
【図 2 B】

[Fig. 2b]



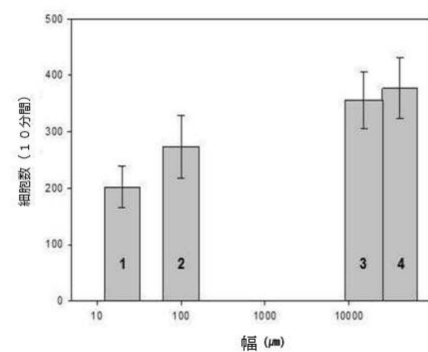
【図 3 A】

【図 3 A】



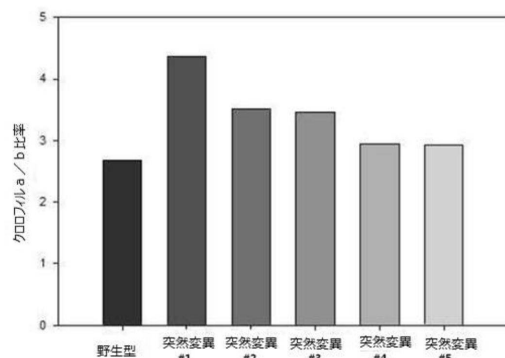
【図 3 B】

【図 3 B】



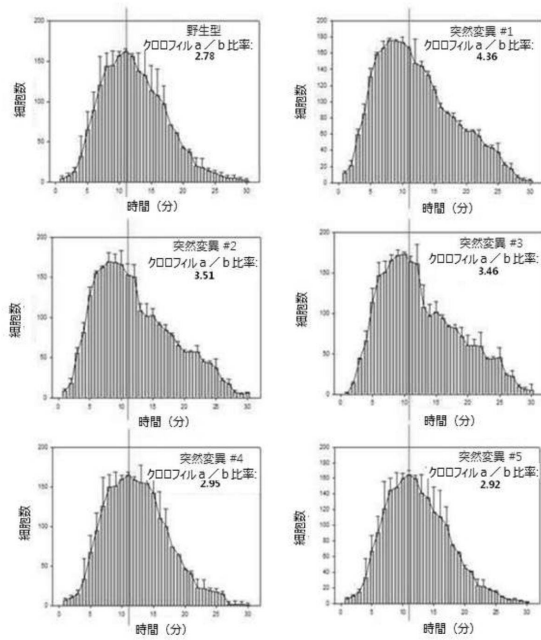
【図 4】

【図 4】



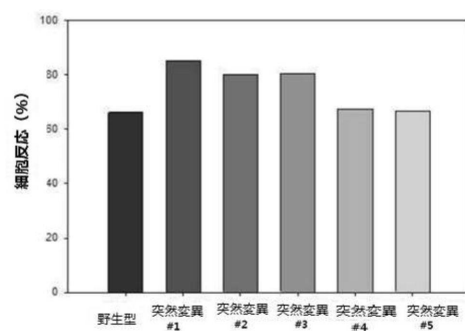
【図 5】

【図 5】



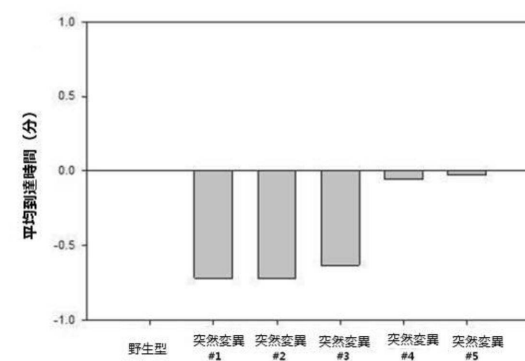
【図 6 A】

【図 6 A】



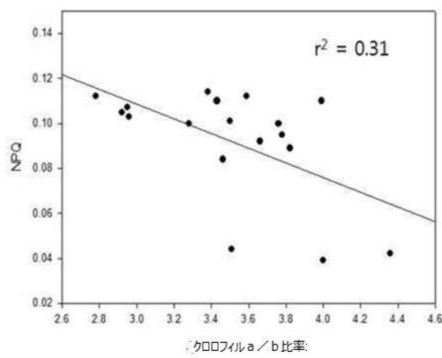
【図 6 B】

【図 6 B】



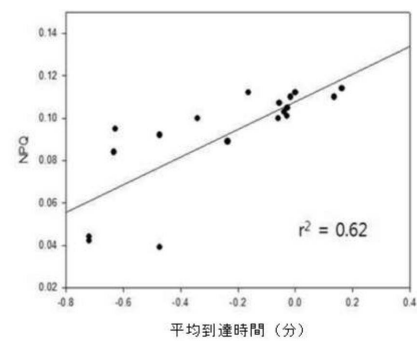
【図 7 A】

【図 7 A】



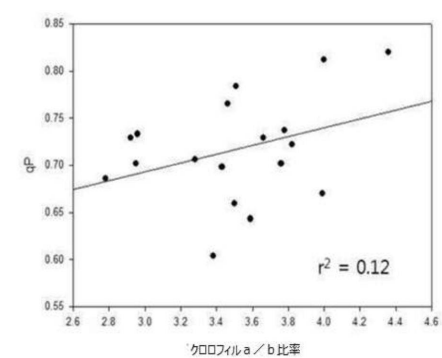
【図 8 A】

【図 8 A】



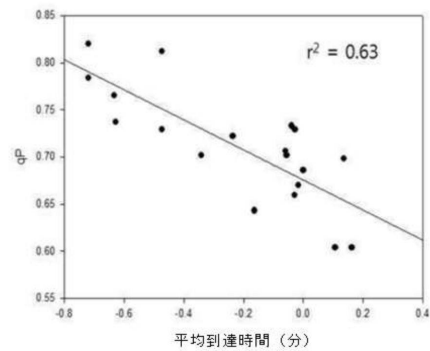
【図 7 B】

【図 7 B】



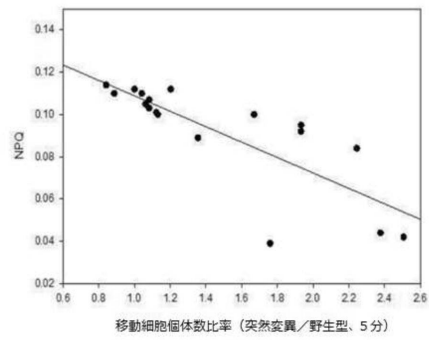
【図 8 B】

【図 8 B】



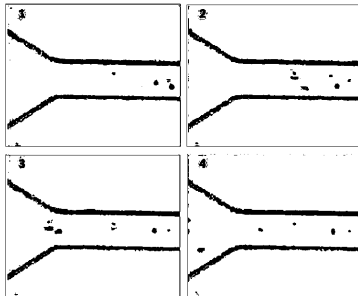
【図 9】

【図 9】



【図 10】

【Fig. 10】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 N 1/12 (2006.01) C 1 2 N 1/12 C

(74)代理人 100090251

弁理士 森田 憲一

(72)発明者 シム, サン ジュン

大韓民国 135-506 ソウル, ガンナムーグ, ソルルンーロ, ドゴク レクスル ア
パートメント 217, 301-803

(72)発明者 キム, ヨン フワン

大韓民国 136-701 ソウル, ソンブクーグ, アナムーロ, 145, コリア ユニ
バーシティ, アナム キャンパス, イノベーション ビルディング, ナンバー513

(72)発明者 クwak, ホ ソク

大韓民国 136-701 ソウル, ソンブクーグ, アナムーロ, 145, コリア ユニ
バーシティ, アナム キャンパス, イノベーション ビルディング, ナンバー513

審査官 野村 英雄

(56)参考文献 特表2006-501860 (JP, A)

米国特許出願公開第2012/0225475 (US, A1)

HIRSCHBERG, R. et al., "Phototaxis mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*.", J. BACTERIO
L., 1977年 2月, Vol.129, No.2, P.803-808

PAZOUR, G.J. et al., "Mutational analysis of the phototransduction pathway of *Chlamydo
monas reinhardtii*.", J. CELL BIOL., 1995年10月, Vol.131, No.2, P.427-440

TAKAHASHI, T. et al., "Diversion of the sign of phototaxis in a *Chlamydomonas reinhard
tii* mutant incorporated with retinal and its analogs.", FEBS LETT., 1992年12月,
Vol.314, No.3, P.275-279

WEIBEL, D.B. et al., "Microoxen: microorganisms to move microscale loads.", PROC. NATL
. ACAD. SCI. USA, 2005年 8月23日, Vol.102, No.34, P.11963-11967

天野正章、外3名, 「単細胞緑藻類クラミドモナス変異株における走光性の符号に与える光合成
の影響」, 生物物理, 1995年 8月, Vol.35, No.Supplement, p.S38, [1E03]欄

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 15/00-15/90

C 1 2 N 1/00-7/08

C 1 2 M 1/00-3/10

C 1 2 Q 1/00-3/00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

PubMed