

(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6月8日(08.06.2017)



(10) 国際公開番号
WO 2017/094785 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 1/12 (2006.01) *C12P 7/64* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/085585
- (22) 国際出願日: 2016年11月30日(30.11.2016)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2015-234736 2015年12月1日(01.12.2015) JP
- (71) 出願人: 学校法人中央大学(CHUO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1920393 東京都八王子市東中野7-4-2 Tokyo (JP). 株式会社デンソー(DENSO CORPORATION) [JP/JP]; 〒4488661 愛知県刈谷市昭和町1丁目1番地 Aichi (JP).
- (72) 発明者: 原山 重明(HARAYAMA Shigeaki); 〒1128551 東京都文京区春日1-13-27 中央大学後楽園キャンパス内 Tokyo (JP). 早川 准平(HAYAKAWA Jumpei); 〒1128551 東京都文京区春日1-13-27 中央大学後楽園キャンパス内 Tokyo (JP). 井出 曜子(IDE Yoko); 〒1128551 東京都文京区春日1-13-27 中央大学後楽園キャンパス内 Tokyo (JP). 田中 佑樹(TANAKA Yuki); 〒1128551 東京都文京区春日1-13-27 中央大学後楽園キャンパス内 Tokyo

(JP). 小松 さと子(KOMATSU Satoko); 〒4488661 愛知県刈谷市昭和町1丁目1番地 株式会社デンソー内 Aichi (JP). 倉田 稔(KURATA Minoru); 〒4488661 愛知県刈谷市昭和町1丁目1番地 株式会社デンソー内 Aichi (JP).

(74) 代理人: 平木 祐輔, 外(HIRAKI Yusuke et al.); 〒1056232 東京都港区愛宕2丁目5番1号 愛宕グリーンヒルズMORIタワー32階 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, IR, IS, KE, KG, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

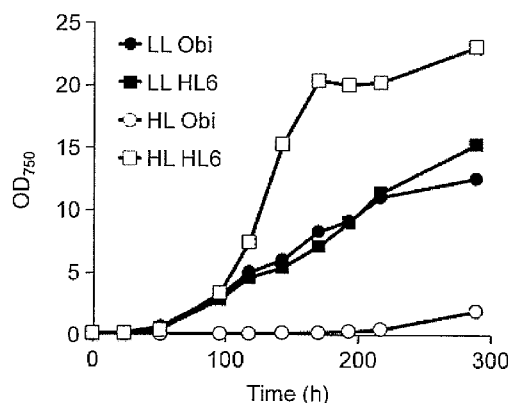
(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,

[続葉有]

(54) Title: GREEN ALGAE MUTANT EXHIBITING RESISTANCE TO INTENSE LIGHT, AND USE THEREOF

(54) 発明の名称: 強光に耐性を示す緑藻突然変異体及びその利用

【図1】



(57) Abstract: Although promising as feedstock for biomass fuel, green algae is inhibited by intense light during mass culturing outdoors in the summer, leading to a reduction in biomass productivity. The purpose of the present invention is to isolate a green algae mutant that is resistant to intense light and provide said green algae mutant for outdoor culturing in the summer in order to solve the above-mentioned problem. Specifically, the present invention pertains to a green algae mutant in which the functioning or expression of proteins, which have a response regulatory domain in the N-terminal and a WD40 domain in the C-terminal, is reduced in comparison to wild-type strains. Furthermore, said green algae mutant proliferates more rapidly than wild-type strains when cultured at a light intensity represented by a photosynthetically active radiation (PAR) of 1,000, 1,500 or 2,000 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

(57) 要約:

[続葉有]

WO 2017/094785 A1



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))

— 規則 13 の 2 に基づいて明細書とは別に提出された、寄託された生物材料に関する表示 (規則 13 の 2.4(d)(i) 及び 48.2(a)(viii))

— 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))

緑藻は、バイオマス燃料の原料として有望視されているが、夏季の屋外での大量培養においては強光阻害を受け、バイオマス生産性が減少する。本発明は、この問題を解決するために、強光耐性となった緑藻突然変異体を分離し、夏季の屋外培養に提供することを目的とし、具体的には、N-末端に Response regulatory ドメインを有し、且つ C-末端に WD40 ドメインを有するタンパク質の機能又は発現が野生株より低下した緑藻突然変異体であって、PAR(Photosynthetically Active Radiation)で表した光強度が 1,000、1,500 又は 2,000 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ のいずれかで培養した時、野生株よりも速い増殖を示す、前記緑藻突然変異体に関する。

明 細 書

発明の名称：強光に耐性を示す緑藻突然変異体及びその利用

技術分野

[0001] 本発明は、強光に耐性を示す緑藻突然変異体及びその利用に関する。

背景技術

[0002] 酸素発生型の光合成を行う光合成生物には2つの光化学系、PSIとPSIIとが備わっている。PSIIの光化学反応は、PSIIの反応中心（reaction center）にあるクロロフィルa分子が励起されて、電子を初期電子受容体（ Q_A ）に伝達することによって開始される。この反応中心のクロロフィルaを効率よく励起するために、アンテナ色素と呼ばれるクロロフィルa/bタンパク質複合体が反応中心を囲み、アンテナ色素が捕獲した光エネルギーを効率よく反応中心に渡す構造がチラコイド膜上に作られている。光強度が増加すると、アンテナ色素が単位時間あたりに受容する光量子数が増加し、それに伴って光合成速度も増加する。しかし、 Q_A が単位時間あたりに受け取ることが出来る電子の数が限られているため、光合成速度は光飽和点と呼ばれる光強度でほぼ最大となり、それ以上光強度を増加させても光合成速度は増大しなくなる。さらに光強度を大きく増加させると、むしろ光合成速度の低下が見られる。この強光による光合成速度の低下は、光阻害と呼ばれている。

[0003] 光阻害は、主に、PSIIを構成するタンパク質の1つであるD1タンパク質の損傷によってPSII活性が減少することによって起こる。このD1タンパク質の損傷は、同じくPSIIを構成するマンガクラスター中のマンガンに吸収された光エネルギーによって引き起こされる。このD1タンパク質損傷反応は、弱光下でも観察される。しかし弱光下では、損傷したD1タンパク質は速やかに除去され、新たに合成されたD1タンパク質に置き換えられる。このすみやかなD1タンパク質修復反応の結果、弱光下ではPSII活性の減少は認められない。一方、強光下では、アンテナ色素に吸収された光エネルギーが過剰となり、余剰な還元力によって一重項酸素などの活性酸素種が作られる。この活性酸素

種がD1タンパク質の新規合成を阻害することによって、活性を持つD1タンパク質の量が減少し、光阻害が引き起こされると考えられている（非特許文献1）。

[0004] 光合成生物は、上記の余剰な還元力の発生を防ぐため、過剰な光エネルギーを熱エネルギーに変換する仕組み（NPQ: non-photochemical quenching）を持っている。緑色植物亜界・緑藻植物門（以下、「緑藻」と記す）の場合、LHCSRと呼ばれるタンパク質がNPQの一端を担っている。LHCSRは、クロロフィルa/bとキサントフィルとを結合し、アンテナ色素に接触している。LHCSRに結合しているクロロフィルに吸収された光エネルギーはキサントフィルに渡され、熱放散される。LHCSRは、近傍のアンテナ色素が受け取った光エネルギーも熱放散することができる。LHCSRのC-末端はチラコイド膜内側のルーメン内に露出している。光合成反応によってチラコイド膜で電子伝達が起こると、それに伴って H^+ がチラコイド膜外側（ストロマ）より内側（ルーメン）に移動し、葉緑体チラコイド膜に局在するATP合成酵素を通して、ATPを合成しつつ再びストロマに戻る。強光照射下では、光合成電子伝達に伴ってルーメンに流入する H^+ が、ATP合成酵素を通して排出される H^+ の量よりも多くなり、ルーメンのpHが酸性側にシフトする。LHCSRのC-末端アミノ酸配列が低いpHにさらされるとLHCSRの活性が増加し、LHCSRによる熱放散の効率が增加する。さらに、LHCSR遺伝子は強光下で誘導され、LHCSR含量が増加する。この含量の増加に比例してNPQの能力も増加する。弱光下ではLHCSRの量が少なくルーメンのpHも低くないので、アンテナ色素が捕獲した光エネルギーの大部分は反応中心に渡される。しかし、強光下では、LHCSRの活性と量とが共に増加するので、アンテナ色素が捕獲した光エネルギーのかなりの部分が、熱放散されることになる（非特許文献2）。

[0005] 微細藻類は、バイオマス燃料の原料として、昨今注目を浴びている。微細藻類は、陸上生物とは異なり、水中で生活し増殖する。夏の太陽光が降り注ぐ水面近くでは、微細藻類も強光阻害を受ける。ただ、光阻害を受ける光強度は、微細藻類の種類によって異なっている（非特許文献3）。

- [0006] この光阻害は、微細藻類を屋外で培養する際の障害となる。例えば、屋外でクロレラ (*chlorella*) を、非常に浅い培養池で培養した場合、クロレラ細胞の密度が低い時に特に増殖阻害が見られた。クロレラ細胞の密度が低い時、クロレラ細胞の多くは太陽からの直射光を受容し、その結果、光阻害による増殖障害が起こる（非特許文献4）。
- [0007] トレボキシア藻 (*Trebouxiophyceae*) 綱に属する単細胞性緑藻であるシェードコリスチス・エリプソイディア (*Pseudochoricystis ellipsoidea*; *P. ellipsoidea*) 0bi株(以下、「0bi株」と呼ぶ)は、pH3.5以下で増殖でき、特許文献1に示された開放系培養システムで培養できるため、バイオマス燃料生産への利用の研究が進んでいる（非特許文献5, 6）。しかし、夏季、0bi株を屋外のレースウェイ型培養施設で培養した時には、上記クロレラの場合と同様、細胞密度が低い場合に強く増殖阻害が観察された。
- [0008] これらの光阻害から起こる問題の解決法の1つとして、光阻害に耐性の突然変異体を分離することが考えられる。光阻害に耐性の微細藻の分離は、過去に1例報告されている。クラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii*) 細胞にUV照射し突然変異を誘起させたあと、強光 ($2,500 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$) 下で増殖できる突然変異体を選抜し、2株を分離した。いずれの突然変異体も、gene IDがCre02.g085050である遺伝子に突然変異を持っていた。そのため、この遺伝子をLRS1 (putative Light Response Signaling protein 1)と命名した。LRS1のN-末端のアミノ酸配列にはRINGドメイン、C-末端にはWD40ドメインという、進化的に保存されたドメイン配列が存在した。この2つのドメインを持つタンパク質としては、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) に存在するCOP1タンパク質などが挙げられる。このCOP1アミノ酸配列とLRS1アミノ酸配列とを比べると、N-末端およびC-末端のドメイン部分では配列のホモロジーが高かったが、中央部分では顕著なホモロジーは観察されなかった（非特許文献7）。シロイヌナズナにおいて、COP1はSPA1というタンパク質と複合体を作り、CUL4、RBX1、DDB1などのタンパク質とともにユビキチン転移酵素 (E3 ubiquitin ligase) を構成する。SPA1は、N-末端にキナーゼド

メインを持ち、C-末端にWD40ドメインを持っている。COP1とSPA1のWD40ドメインは、共同で、ユビキチン転移酵素の標的タンパク質を認識すると考えられている（非特許文献8）。SPA1はユビキチン転移酵素を構成するタンパク質であるが、多くの光シグナルによってSPA1自身もユビキチン化され、プロテアソームで分解される（非特許文献9）。すなわち、シロイヌナズナのCOP1/SPA1複合体の活性は、自身の活性調節を通して多くの光シグナルの伝達に関わっている。このことから、クラミドモナスのLRS1も、強光ストレスのシグナル伝達に関わるタンパク質であることが予想される。

先行技術文献

特許文献

[0009] 特許文献1：特開2014-117202号公報

非特許文献

[0010] 非特許文献1：Takahashi, S., & Badger, M. R. (2011). Photoprotection in plants: a new light on photosystem II damage. *Trends in plant science*, 16(1), 53-60.

非特許文献2：Tokutsu, R., & Minagawa, J. (2013). Energy-dissipative supercomplex of photosystem II associated with LHCSR3 in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(24), 10016-10021.

非特許文献3：Singh, S. P., & Singh, P. (2015). Effect of temperature and light on the growth of algae species: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 50, 431-444.

非特許文献4：Masojidek, J., Kopecky, J., Giannelli, L., & Torzillo, G. (2011). Productivity correlated to photobiochemical performance of *Chlorella* mass cultures grown outdoors in thin-layer cascades. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 38(2), 307-317.

非特許文献5：Kasai, Y., Oshima, K., Ikeda, F., Abe, J., Yoshimitsu, Y., & Harayama, S. (2015). Construction of a self-cloning system in th

e unicellular green alga *Pseudochoricystis ellipsoidea*. *Biotechnology for biofuels*, 8(1), 1-12.

非特許文献6: Matsuwaki, I., Harayama, S., & Kato, M. (2015). Assessment of the biological invasion risks associated with a massive outdoor cultivation of the green alga, *Pseudochoricystis ellipsoidea*. *Algal Research*, 9, 1-7.

非特許文献7: Schierenbeck, L., Ries, D., Rogge, K., Grewe, S., Weisshaar, B., & Kruse, O. (2015). Fast forward genetics to identify mutations causing a high light tolerant phenotype in *Chlamydomonas reinhardtii* by whole-genome-sequencing. *BMC genomics*, 16(1), 57.

非特許文献8: Biedermann, S., & Hellmann, H. (2011). WD40 and CUL4-based E3 ligases: lubricating all aspects of life. *Trends in plant science*, 16(1), 38-46.

非特許文献9: Chen, S., Lory, N., Stauber, J., & Hoecker, U. (2015). Photoreceptor Specificity in the Light-Induced and COP1-Mediated Rapid Degradation of the Repressor of Photomorphogenesis SPA2 in *Arabidopsis*. *PLoS Genet*, 11(9), e1005516.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0011] 上述のように、緑藻は、バイオマス燃料の原料として有望視されているが、夏季の屋外での大量培養においては強光阻害を受け、バイオマス生産性が減少する。この問題を解決するために、強光耐性となった緑藻突然変異体を分離し、夏季の屋外培養に提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

- [0012] 上記課題を解決するため鋭意研究を行った結果、強光耐性となったObi株由来の突然変異体を複数株分離することに成功した。これらの突然変異体の全ゲノム配列を決定し、突然変異遺伝子を解析したところ、すべての強光突然変異体において、配列番号1で示される塩基配列から成る遺伝子に変異を有

していることが明らかになった。当該遺伝子がコードするアミノ酸配列は、クラミドモナスの強光耐性に関わっているLRS1のアミノ酸配列とは明らかに異なっていたため、配列番号1で示される塩基配列から成る遺伝子をLRS2と命名し、また以下では、LRS2遺伝子のコードするタンパク質をLRS2タンパク質と呼ぶこととした。LRS2タンパク質のN-末端には、Response regulatoryドメインが存在し、またC-末端には、WD40ドメインが存在した。N-末端にResponse regulatoryドメインを持ち、C-末端にWD40ドメインを持つタンパク質は、UniProtデータベース中に10以下しか検出できなかった（後述）が、トレボキシア藻やプラシノ藻などの緑藻には、LRS2タンパク質と全長にわたってホモロジーを示すタンパク質が見つかった。このことから、緑藻等に存在するLRS2タンパク質に近縁なタンパク質は、新しいプロテイン・ファミリーであり、Obi株のLRS2タンパク質と同様な機能を有していると考えられる。このことから、緑藻に存在するLRS2ファミリータンパク質に変異を導入することで、当該緑藻から強光耐性の株を取得できることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0013] すなわち、本発明は以下を包含する。

(1) N-末端にResponse regulatoryドメインを有し、且つC-末端にWD40ドメインを有するタンパク質（以下RR-WDタンパク質と呼ぶ）の機能又は発現が野生株より低下した緑藻突然変異体であって、PAR(Photosynthetically Active Radiation)で表した光強度が1,000、1,500又は2,000 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ のいずれかで培養した時、野生株よりも速い増殖を示す、前記緑藻突然変異体。

(2) 野生株のRR-WDタンパク質とは異なるアミノ酸配列を有するRR-WDタンパク質を合成する、(1)記載の緑藻突然変異体。

(3) RR-WDタンパク質をコードする遺伝子の発現を低下させることで、RR-WDタンパク質の機能を低下させた、(1)記載の緑藻突然変異体。

(4) RR-WDタンパク質をコードする遺伝子の翻訳効率を低下させることで、RR-WDタンパク質の活性を低下させた、(1)記載の緑藻突然変異体。

(5) トレボキシア藻綱に属する、(1)～(4)のいずれか1記載の緑藻突然変異体。

(6) シュードコッコミクサ(Pseudococcomyxa)属に属する、(5)記載の緑藻突然変異体。

(7) (1)～(6)のいずれか1記載の緑藻突然変異体を培養する工程を含む、脂質生産方法。

[0014] 本明細書は本願の優先権の基礎となる日本国特許出願番号2015-234736号の開示内容を包含する。

発明の効果

[0015] 本発明により、強光耐性が向上した緑藻を作出することが可能となる。また、本発明に係る緑藻突然変異体を培養することにより、夏季におけるバイオ燃料等に供する脂質の生産性を改良することが可能となる。

図面の簡単な説明

[0016] [図1]実施例2における強光および弱光下での0bi株及びHL6株の増殖を示すグラフである。縦軸は、培養液の OD_{750} 、横軸は培養時間(h)である。LLは、弱光($200 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)、HLは強光($2,000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)での培養である。

[図2]実施例3における異なる光強度での0bi株及びHL6株の増殖と脂質含量を示すグラフである。光強度は、200、1,000、1,500 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ であった。

[図3]実施例4における、0bi株およびHL6株における強光照射時間と光合成活性との関係を示すグラフである。光強度が2,000 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ であるLEDで細胞を照射した。

[図4]実施例5におけるPAMで測定したクロロフィル蛍光の変化を示すグラフである。(A)が0bi株、(B)がHL6株である。横軸上、白抜きボックスで示した時間帯で、1,300 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の励起光を照射した。

[図5]実施例6における、強光を照射した時のDe-epoxidation state(DES)指標の変化を示すグラフである。0bi株及びHL6株で、同様な変化を示した。

[図6]実施例7における、強光下で培養した0bi株（A）及びHL6株（B）のクロロフィル蛍光変化を示すグラフである。

[図7]LRS2遺伝子の構造と、0bi株由来の強光耐性株の突然変異箇所を示す模式図である。遺伝子の非翻訳領域を白抜きの長方形で、翻訳領域を黒塗りの長方形で示した。線で示した部分がエキソンである。突然変異はこの遺伝子の5'末端に集中していたので、その部分を拡大して示している。

発明を実施するための形態

[0017] 本発明は、N-末端にresponse regulatoryドメインが存在し、C-末端にWD40ドメインが存在するタンパク質(RR-WDタンパク質)の機能又は発現が野生株より低下した結果、強光耐性を獲得し、強光下において(例えば、PAR(Photosynthetically Active Radiation)で表した光強度が1,000、1,500又は2,000 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ のいずれかで培養した時)野生株よりも増殖が速い緑藻突然変異体に関する。緑藻由来の脂質を原料としたバイオ燃料等を生産する場合、特に夏季の強い太陽光下では光阻害による増殖速度の低下が起こる。本発明者等は、0bi株由来の配列番号3で示されるアミノ酸配列から成るLRS2タンパク質(DNA塩基配列：配列番号1、mRNA塩基配列：配列番号2)の機能を欠損させることにより、この緑藻の強光下での増殖が改良されることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0018] 配列番号3で示されるLRS2タンパク質は、N-末端には、response regulatoryドメインを持ち、またC-末端にはWD40ドメインを持つタンパク質である。これらのドメインを持つタンパク質を検出するには、InterProサイトにおいて、「By Domain architecture」(<https://www.ebi.ac.uk/interpro/search/domain-organisation>) 機能を用いれば良い。この際、response regulatoryドメインの検出には、IPR001789又はIPR011006で定義されたモチーフを使用すれば良い。また、WD40ドメインの検出には、IPR001680、IPR015943、IPR017986、IPR019775のいずれかで定義されたモチーフを使用すれば良い。

[0019] 具体的に、RR-WDタンパク質としては、0bi株由来のLRS2タンパク質における配列番号4に示すresponse regulatoryドメインおよび配列番号5に示すWD

40ドメインのアミノ酸配列それぞれと少なくとも40%、好ましくは、少なくとも45%、特に好ましくは、少なくとも50%、最も好ましくは、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%の同一配列を有するアミノ酸配列から成り、且つRR-WDタンパク質機能を有するタンパク質が挙げられる。

[0020] RR-WDタンパク質をコードする遺伝子(以下、「RR-WDタンパク質コード遺伝子」と呼ぶ)としては、配列番号3に示すアミノ酸配列と少なくとも40%、好ましくは、少なくとも45%、特に好ましくは、少なくとも50%、最も好ましくは、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列から成り、且つRR-WDタンパク質機能を有するタンパク質をコードする遺伝子が挙げられる。

[0021] ここで、RR-WDタンパク質機能としては、例えばユビキチン転移酵素の構成成分としての機能が挙げられる。

[0022] 多くの緑藻においては、複数のRR-WDタンパク質コード遺伝子、例えば対立遺伝子、同義遺伝子等が存在する場合があるが、本発明においては、これらのうち少なくとも1つ又は複数のRR-WDタンパク質コード遺伝子を意味する。

[0023] 本発明において、緑藻(緑藻植物門: Chlorophyta)に属する生物としては、例えばトレボキシア藻綱に属するクロレラ(*Chlorella*)属やシュードコックミクサ(*Pseudococcomyxa*)属に属する緑藻が挙げられる。トレボキシア藻綱に属する具体的な株としては、Obi株(受託番号FERM BP-10484; 特許第4748154号公報(当該特許では、「シュードコリスチス エリプソイディア セキグチ エト クラノ ジェン エト エスピー ノブ(*Pseudochoricystis ellipsoidea* Sekiguchi et Kurano gen. et sp. nov.) MBIC11204株」と称される))が挙げられる。Obi株は、平成17年(2005年)2月15日付で独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター(〒305-8566日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6)に受託番号FERM P-20401として寄託され、さらに受託番号FERM BP-10484としてブダペスト条約に基づく国際寄託へ移管されている。またプラシノ藻綱に属するオストレオロコッカス(*Ostreococcus*)属やミクロモ

ナス (*Micromonas*) 属、バチコッカス (*Bathycoccus*) 属に属する緑藻が挙げられる。さらに緑藻綱 (*Chlorophyceae*) に属するクラミドモナス属が挙げられる。

[0024] 本発明に係る緑藻突然変異体は、上述のRR-WDタンパク質の機能又は発現を低下させる方法に供することで得られた緑藻突然変異体である。本発明においては、以上に説明したRR-WDタンパク質コード遺伝子を有する緑藻に対して、RR-WDタンパク質コード遺伝子によりコードされるRR-WDタンパク質の機能又は発現を低下させる方法に供することで、本発明に係る緑藻突然変異体を得ることができる。

[0025] ここで、RR-WDタンパク質機能(若しくは活性)又は発現を低下させる方法としては、例えば

(1) RR-WDタンパク質コード遺伝子配列を置換し、アミノ酸配列の一部が置換した、野生株のRR-WDタンパク質とは異なるアミノ酸配列を有するRR-WDタンパク質を合成させる；

(2) RR-WDタンパク質コード遺伝子の転写を抑制し、該遺伝子の発現を低下させる；

(3) RR-WDタンパク質コード遺伝子の翻訳を抑制し、該遺伝子の翻訳効率を低下させる；

方法が挙げられる。

[0026] (1) RR-WDタンパク質コード遺伝子配列を置換する方法

本発明において、RR-WDタンパク質コード遺伝子配列に置換を持つ緑藻突然変異体とは、本来的には対立遺伝子、同義遺伝子等の複数のRR-WDタンパク質コード遺伝子を有するが、これらのうち少なくとも1つ又は複数のRR-WDタンパク質コード遺伝子の配列を置換した緑藻突然変異体を意味する。

[0027] RR-WDタンパク質コード遺伝子配列を置換する方法としては、緑藻のゲノムDNA上のRR-WDタンパク質コード遺伝子領域又はその上流にあるプロモーター領域のDNAに塩基の置換、欠失、挿入及び/又は付加を伴う変異を導入する方法が挙げられる。

[0028] (2) RR-WDタンパク質コード遺伝子の転写を抑制し、該遺伝子の発現を低下させる方法

RR-WDタンパク質コード遺伝子の転写を抑制する方法としては、対象となる緑藻における該遺伝子の転写プロモーター領域に変異を導入する方法が挙げられる。

[0029] また、該遺伝子の正の発現制御に関わる遺伝子あるいはDNA配列に変異を導入し、それらの機能を低下させる方法が挙げられる。あるいは、該遺伝子の負の発現制御に関わる遺伝子あるいはDNA配列に変異を導入し、負の発現制御が常時働くようにする方法が挙げられる。

[0030] (3) RR-WDタンパク質コード遺伝子の翻訳を抑制し、該遺伝子の翻訳効率を低下させる方法

RR-WDタンパク質コード遺伝子の翻訳を抑制する方法としては、いわゆるRNA干渉法(Cerutti H et al., 2011, Eukaryot Cell, 10, 1164)が挙げられる。

[0031] 具体的に、本発明に係るRR-WDタンパク質の機能又は発現を低減した緑藻突然変異体は、実施例に示した手順に従って作出できる。すなわち、親株の緑藻に突然変異誘起物質を作用させたあと、強光耐性となった変異体をスクリーニングし、得られた変異体においてRR-WDタンパク質コード遺伝子配列あるいは発現に変異が起きていることを確認することによって作出できる。

[0032] なお、本発明に係る緑藻突然変異体の例として、実施例に示すObi株に由来するHL6株が、平成27年(2015年)11月27日付で独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許生物寄託センター(NITE-IPOD)(〒292-0818日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 120号室)に受託番号FERM P-22299として寄託され、さらに受託番号FERM BP-22299としてブダペスト条約に基づく国際寄託へ移管されている。

[0033] さらに、本発明は、以上に説明した本発明に係る緑藻突然変異体を(大量)培養し脂質を生産するという、脂質生産方法を含む。大量培養法としては、既に確立されている特許文献1(発明の名称：微細藻類の培養方法及び培養

システム）に記載の培養法等を用いることができる。具体的には、pHが4以下であり、アンモニア態窒素を含む培養液を用いて、緑藻を培養する方法である。この培養方法によれば、溶液のpHが4以下であるので、他の緑藻や原生生物の増殖が生じにくく、特に、培養液がアンモニア態窒素（例えば尿素）を含むことにより、他の微細藻類や原生生物の増殖が一層生じにくい。これらの効果により、屋外における大量培養を容易に実現することができる。また、培養液中にCO₂を導入しても、重炭酸イオンが生じないので、培養液のpHが変動しにくい特徴もある。更に、窒素源を尿素とすることで、培養前後における培地pHの変動は生じず、緑藻の培養に用いた培養液から緑藻の全部又は一部を回収し、回収後の培養液を用いて新たな緑藻を培養することができる。この場合、培養液を再利用できるので、緑藻の培養コストを大幅に低減することができる。

[0034] 培養後、例えば培養物からヘキサン抽出等によって、脂質を得ることができる。

実施例

[0035] 以下、実施例を用いて本発明をより詳細に説明するが、本発明の技術的範囲はこれら実施例に限定されるものではない。

〔実施例1〕 強光耐性変異株の分離

MA5培地 (Imamura et al., 2012, J Gen Appl Microbiol, 58, 1) で培養した0bi株を遠心して細胞を回収し、クエン酸緩衝液 (pH6.0) に懸濁した。この懸濁液に、突然変異誘起剤であるNTG (1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine) を500 $\mu\text{g/ml}$ 加え、1時間、緩やかに攪拌した。この処理後、処理した細胞をMA5培地で1週間、1% (v/v) CO₂をバブリングさせながら、蛍光灯下、PAR光強度で50 $\mu\text{mol photons photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (以下光強度はすべてPAR値で示す) で培養した。その後、細胞をMA5固形寒天培地上に10⁸ cells/plateで塗布し、LED (455 nm、660 nm) を光源とし、強光 (2000 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) 下で2週間、培養した。その後、この寒天培地を蛍光灯下 (50 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) に移し、さらに1週間培養した。このようにして、強光下での生存

性の高いと思われる株を4株単離し、HL6株、HL7株、HL9株、HL13株と命名した。

[0036] 〔実施例2〕強光耐性変異株の評価

HL6株、HL7株、HL9株およびHL13株を、MA5培地で $OD_{750} = 0.1$ に合わせ、 $2,000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ の光強度下、1% (v/v) CO_2 をバブリングさせながら培養を行った。野生株である0bi株の生育は強光下で阻害されたが、分離した変異株はいずれも生育可能であった。HL6株について、200および $2,000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ の光強度における培養を定量的に評価した。 $200 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ の条件下では0bi株およびHL6株において生育の差は見られなかった。一方、 $2,000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ においてはHL6株のみ生育可能であった（図1）。

[0037] 〔実施例3〕異なる光条件下での脂質生産性評価

分離した強光耐性変異株HL6とその親株である0bi株とを、3つの異なる光強度下で培養した。使用した培地は、DENS0培地 [$2.38 \text{ mM } (\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, $863 \mu\text{M } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $405 \mu\text{M MgSO}_4$, $265 \mu\text{M KH}_2\text{PO}_4$, $264 \mu\text{M K}_2\text{HPO}_4$, $61.2 \mu\text{M CaCl}_2$, $1.20 \mu\text{M CuSO}_4$, $1.13 \mu\text{M H}_3\text{BO}_3$, $1.04 \mu\text{M ZnSO}_4$, $0.622 \mu\text{M MnSO}_4$, $0.294 \mu\text{M CoCl}_2$, $12.4 \text{ nM Na}_2\text{MoO}_4$, 0.4% (v/v) Fe solution (3 g/L citric acid, 4.9 g/L ammonium ferric citrate, 0.5 g/L EDTA-2Na)] を2倍希釈した1/2 DENS0培地である。培養開始時の細胞密度は $OD_{750} = 0.5$ とし、光強度は200、1,000、 $1,500 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ であった。その後、培養6日目および12日目でサンプリングを行った。0bi株は光強度の上昇とともにその生育および脂質蓄積量が減少した。HL6株においても増殖、脂質蓄積量の減少は見られるものの、その程度は0bi株と比べ有意に抑えられていた。 $200 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ では0bi株の方が脂質生産性は高いが、 $1,000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ を超える光条件下ではいずれの時点においてもHL6株の方が上回っていた（図2）。

[0038] 〔実施例4〕強光照射下での光化学系IIの強光阻害の評価

0bi株およびHL6株を、蛍光灯下 ($50 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)、MA5培地中で一週間培養し、MA5培地に $OD_{750} = 1.0$ に希釈した後、LED照射下 ($2,000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) に培養した。

photons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) で培養した。照射開始後、所定の時間ごとに光合成活性（酸素発生速度）を酸素電極で測定した。0bi株では照射時間が増すに従い光合成活性の低下がみられ、1 時間照射後では開始時のおよそ25%にまで低下した。一方、HL6では、同様の条件下で65%の光合成活性を保っていた（図3）。

[0039] 〔実施例5〕NPQの測定

Dual-PAM-100 (Waltz, Germany)という装置を用いてクロロフィル蛍光測定することにより、NPQの大きさを評価することができる。蛍光灯下 ($50 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$)、一週間培養した0bi株およびHL6株細胞を、クロロフィル濃度が $10 \mu\text{g chl/ml}$ になるように 5 mM NaHCO_3 を含んだMA5培地に懸濁した。測定開始前に5分間の暗所順応を行い、その後、ごく弱い測定光をパルス照射し、そのパルスに応答した蛍光量の変化を計測した。

[0040] 図4 (A)は、0bi株でのクロロフィル蛍光の変化を示している。測定パルス光のみを間歇的に連続照射すると、それに応答してわずかな蛍光が発せられた（「図4 a」と称する）。この場合、アンテナ色素を構成するクロロフィル（アンテナクロロフィル）がこのパルス光を吸収し、獲得した励起エネルギーを反応中心に渡すが、励起されたアンテナクロロフィルの一部は反応中心に励起エネルギーを渡せずに、蛍光を発したのを測定している。次に、励起光 ($1,300 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) を連続光として照射した。励起光照射下では、測定パルス光に応答して発せられる蛍光の量が増加した（「図4 b」と称する）。これは、励起光照射によってPSIIの初期受容体 (Q_A) の多くが還元され、そのため、励起されたアンテナクロロフィルが、励起エネルギーを反応中心へスムーズに渡せなくなり、より多くの蛍光が発せられたためである。

[0041] しかし、励起光照射開始後時間が経過するに従い、蛍光の量は減少した（蛍光の消光：「図4 c」と称する）。消光は、 Q_A へ電子が流れることによって、あるいはアンテナクロロフィルの励起エネルギーが熱放散されることによって減少する。前者を光化学的消光、後者を非光化学的消光 (NPQ) と呼ぶ。図4中に蛍光のスパイクが見られるが、これは、飽和パルス光照射後の蛍光

量である。飽和パルス光照射によって Q_A は一時的にすべて還元され、その結果、光化学的消光は1次的にゼロとなる。飽和パルス光照射時の蛍光量と、その前後の蛍光量との差が、光化学的消光の大きさとなる。図4 bにおける蛍光量から図4 cにおける蛍光量を引いたものが、励起光照射中におこった消光になるが、その中で、光化学的消光の割合が少ないことがわかる。

[0042] 図4 (B) は、HL6株におけるクロロフィル蛍光の変化を示している。HL6株では、励起光照射後30秒以内に、蛍光が速やかに減少し、すなわちNPQが速やかに増大し、過剰な励起エネルギーを効率よく熱放散させる仕組みが備わっていることが観察された。この効率良い熱放散が強光耐性を獲得した原因と考えられる。

[0043] 〔実施例6〕キサントフィルサイクルの作動の確認

NPQを形成する成分の一つとしてキサントフィルサイクル (xanthophyll cycle) が挙げられる。キサントフィルサイクルとは、アンテナ色素の補助色素である3種類のキサントフィル類が、相互変換する反応である。3種類のキサントフィルのうち最も熱放散効率の低いピオラキサンチン (Violaxanthin) は二つのエポキシ環を持つが、デエポキシダーゼ (de-epoxidase) によって次に熱放散効率が低いアンテラキサンチン (Antheraxanthin) に変換され、さらに最も熱放散効率の高いゼアキサンチン (Zeaxanthin) に変換される (脱エポキシ化)。デエポキシダーゼはチラコイド膜内側のルーメンに存在し、至適pHは5.0である。強光下では、前に述べた理由でルーメンのpHが酸性となり、熱放散効率の高いゼアキサンチンが蓄積される。一方、弱光下では、この反応は抑制され、逆に、チラコイド膜外側のストロマにあるエポキシダーゼによって、熱放散効率の低いピオラキサンチンが蓄積される。このキサントフィルサイクルの作動が0bi株とHL6株との間で差があるかを検討した。

[0044] 蛍光灯下 ($50 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) で培養した0bi株およびHL6株を、MA5培地を用いて $\text{OD}_{750} = 1.0$ に調製し、 $1,300 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ の光を照射した。その後経時的にサンプリングを行い、キサントフィルサイクルの3つのキサントフィル類の含量をHPLCを用いて解析した。この結果から、熱放散の効

率が高い脱エポキシ化キサントフィルがどれ位蓄積しているかの指標である、De-epoxidation state (DES) = $(Z+0.5A)/(Z+A+V)$ を計算した。ここで、Zはゼアキサンチン、Aはアンテラキサンチン、Vはピオラキサンチンの含量である。Obi株およびHL6株において、その値の経時的变化に差は見られなかった(図5)。

[0045] 〔実施例7〕強光に馴化したObi株におけるNPQ

Obi株を $1,000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ の光強度で2日間培養し、その細胞を用いて、NPQの大きさを測定した。弱い光で培養したObi株細胞のNPQ(図4)と異なり、強光に馴化したObi株細胞のNPQは、同じく $1,000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ の光強度で2日間培養したHL6株に近い大きさであった(図6)。このことから、Obi株を強光で育てた時に誘導されるNPQ機構があり、HL6株ではこの機構が常に発現し作動していると結論した。クラミドモナスの研究から、この機構とはLHCSRであると考えられる。

[0046] 以上の考察から、図4および図6のクロロフィル蛍光の変化は以下のように解釈できる。まず弱光で育てられたObi株では、励起光照射後、反応中心のクロロフィルから Q_A への電子の流れが制限されるので、蛍光は速やかに増加する。一方、光合成電子伝達系が働くことによってルーメンのpHが酸性にシフトし、デエポキシダーゼが活性化される。その結果ゼアキサンチンの濃度が増加し、それに伴ってNPQも、励起光照射開始後時間と共に増大する。しかし、LHCSRは短時間では誘導されないので、NPQの大きさはHL6株よりも少ない。一方、HL6株および強光に馴化したObi株では、LHCSRが誘導されているので、ルーメンのpHが酸性にシフトすると多く存在しているLHCSRが一斉に活性化され、速やかに熱放散を行うので、蛍光も急速に減少する。

[0047] 屋外培養では、太陽光の強度は雲がある場合などでは速やかに変化する。しかし、SHCSRの誘導には数時間を要するので、Obi株の場合、急な強光に暴露されることにより致命的なダメージを受ける場合がある。そのような状況での培養には、HL6株は適している。

[0048] 〔実施例8〕強光耐性変異株のゲノム解析

強光耐性を示すObi株由来の突然変異体であるHL6株、HL7株、HL9株、HL13株、計4株のゲノム塩基配列をIllumina HiSeq 2000あるいはApplied Biosystems 3730xl DNA analyzerで決定し、変異解析を行った。HL6株のLRS2遺伝子では、コーディング領域（CDS）の213および214番目の2塩基（CとT）が欠失し、その結果、72番目のアミノ酸であるロイシン（L）以降でフレームシフト突然変異が起こっていた（c.213_214delCT, p.L72fs）。HL7株では、CDSの131番目で塩基置換（C→A）が起こり、その結果44番目のアミノ酸であるセリン（S）がストップコドンに変化していた（c.131C>A, p.S44X）。HL9株では、CDSの129および130番目の2塩基（GとT）が欠失し、その結果、44番目のアミノ酸であるセリン（S）以降でフレームシフト突然変異が起こっていた（c.129_130delGT, p.S44fs）。HL13株では、第2エキソンの末端に位置する255番目の塩基の次の塩基（第2イントロンの最初の塩基）で塩基置換（G→A）が起こり、その結果正常なスプライシングができなくなったと考えられた（c.255+1G>A）（図7）。

[0049] 以上を総合して、強光耐性変異は、LRS2遺伝子の変異によって起こされたと結論した。また、ナンセンス変異やフレームシフト変異などでは、機能を部分的に保持したLRS2タンパク質は作られないと考えられるので、LRS2タンパク質は、生存には必須ではないことが予想された。

[0050] LRS2タンパク質のアミノ酸配列を、ScanInterProで解析したところ、N-末端にはresponse regulatoryドメインを持ち、またC-末端にはWD40ドメインを持つタンパク質であることがわかった。そこで、これらのドメインを持つタンパク質を検出するため、InterProサイト（<https://www.ebi.ac.uk/interpro/search/domain-organisation>）において、「By Domain architecture」機能を用い解析を行った。この際、response regulatoryドメインの検出には、IPR001789あるいはIPR011006で定義されたモチーフを使用した。また、WD40ドメインの検出には、IPR001680、IPR015943、IPR017986、IPR019775のいずれかで定義されたモチーフを使用した。そして、N-末端にresponse regulatoryドメインを持ち、またC-末端にWD40ドメインを持つタンパク質（RR-WDタン

パク質)を検索すると、6タンパク質がヒットし、それらはすべて緑藻門に属する生物に分布していた。このことから、RR-WDタンパク質は、緑藻に分布する非常に小さなタンパク質ファミリーを構成し、同等の機能を持っていると結論した。さらに、クラミドモナスのゲノムについて詳細に解析を行い、Gene IDがCre13.g602700である遺伝子から作られると予測されたタンパク質は、LRS2タンパク質のアミノ酸配列と高いホモロジーを示すRR-WDタンパク質であることを見出した。さらに、シュードココミクサと近縁であるココミクサ (*Coccomyxa*) C-169株においても、このRR-WDタンパク質をコードしている配列が存在するが、おそらく塩基配列編集の誤りの結果、2つのペプチドに切断されて登録されていた。実際には、C-169株においてもRR-WDタンパク質が作られていると思われる。

[0051] これらのRR-WDタンパク質の役割は、シロイヌナズナのSPA1に似て、COP1と複合体を形成しユビキチン転移酵素の構成成分となる可能性が考えられる。また、このユビキチン転移酵素の標的タンパク質のユビキチン化を通して強光シグナルの伝達に関与している可能性が考えられる。

[0052] RR-WDタンパク質の生理学的機能は不明であるものの、このファミリーに属するタンパク質を持つ緑藻において、突然変異などによってこのタンパク質の機能あるいは発現を減少させることによって、強光耐性の株を創出できること、また強光耐性の株を強い光が降り注ぐ環境で培養することにより、バイオ燃料等に供する脂質の生産性を向上させることが本発明によって可能となった。

受託番号

[0053] FERM BP-10484

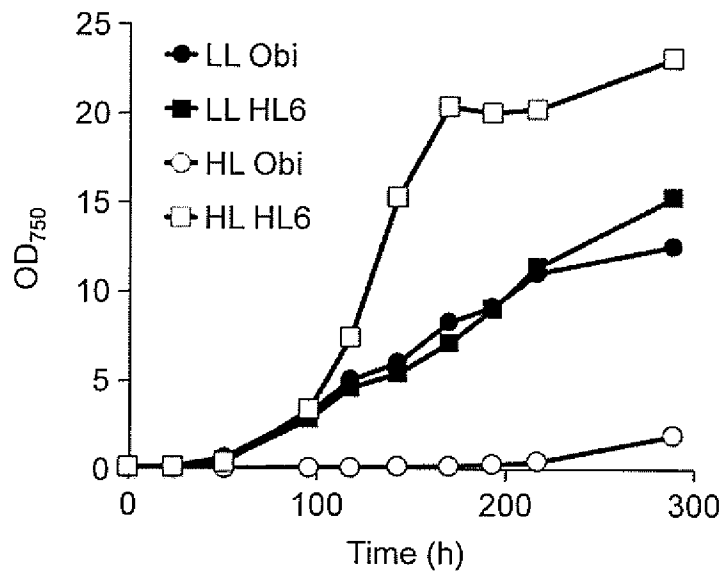
FERM BP-22299

本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願はそのまま引用により本明細書に組み入れられるものとする。

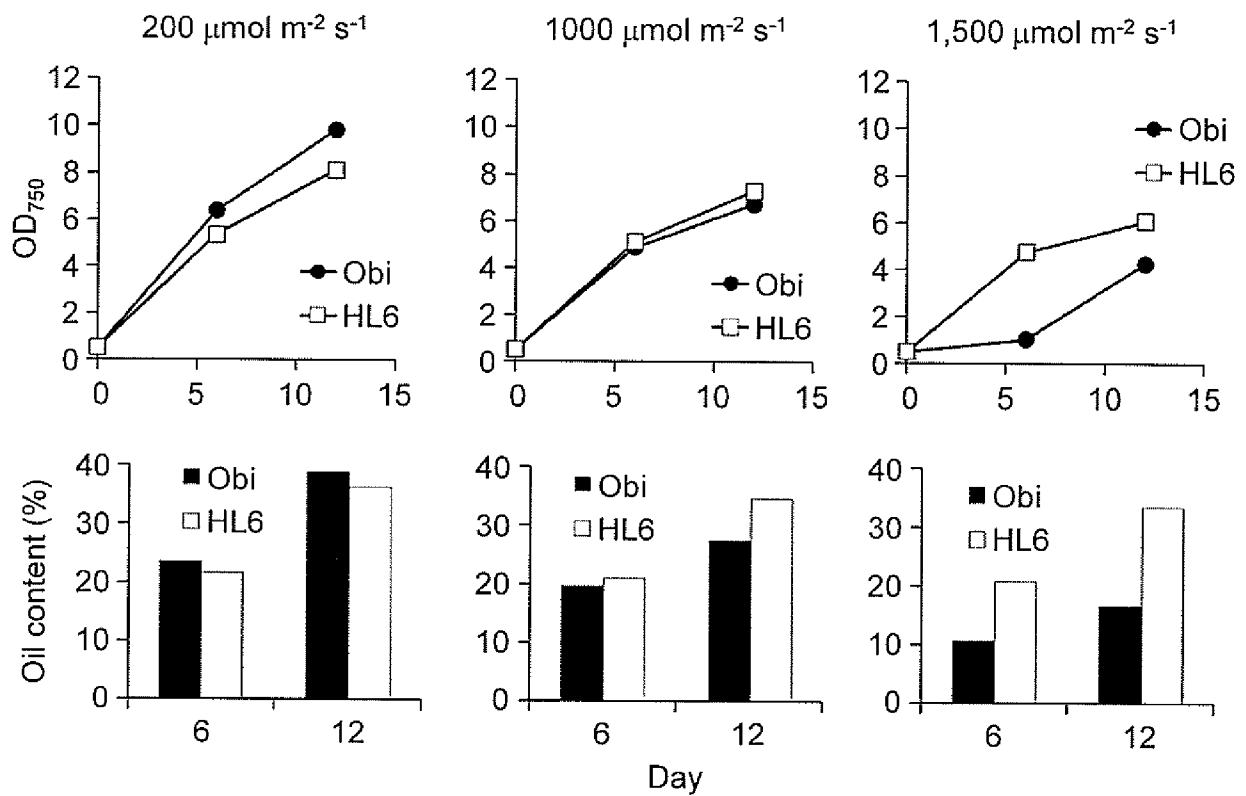
請求の範囲

- [請求項1] N-末端にResponse regulatoryドメインを有し、且つC-末端にWD40ドメインを有するタンパク質の機能又は発現が野生株より低下した緑藻突然変異体であって、PAR(Photosynthetically Active Radiation)で表した光強度が1,000、1,500又は2,000 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ のいずれかで培養した時、野生株よりも速い増殖を示す、前記緑藻突然変異体。
- [請求項2] 野生株の前記タンパク質とは異なるアミノ酸配列を有する前記タンパク質を合成する、請求項1記載の緑藻突然変異体。
- [請求項3] 前記タンパク質をコードする遺伝子の発現を低下させることで、前記タンパク質の機能を低下させた、請求項1記載の緑藻突然変異体。
- [請求項4] 前記タンパク質をコードする遺伝子の翻訳効率を低下させることで、前記タンパク質の活性を低下させた、請求項1記載の緑藻突然変異体。
- [請求項5] トレボキシア藻綱に属する、請求項1～4のいずれか1項記載の緑藻突然変異体。
- [請求項6] シュードコッコミクサ(Pseudococcomyxa)属に属する、請求項5記載の緑藻突然変異体。
- [請求項7] 請求項1～6のいずれか1項記載の緑藻突然変異体を培養する工程を含む、脂質生産方法。

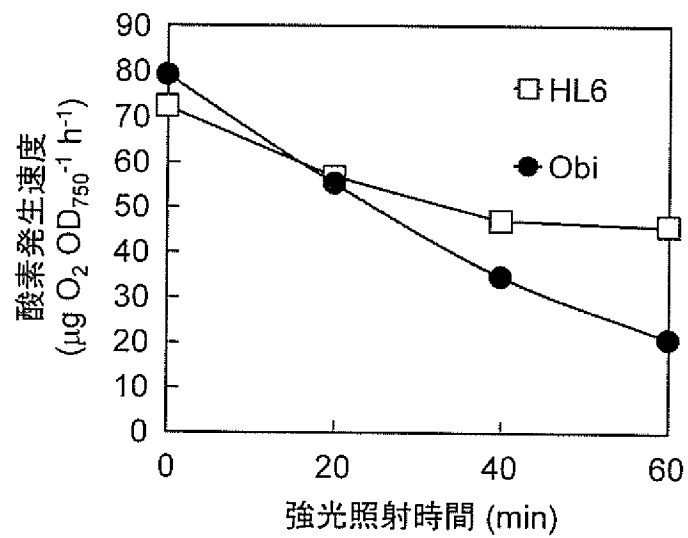
[図1]



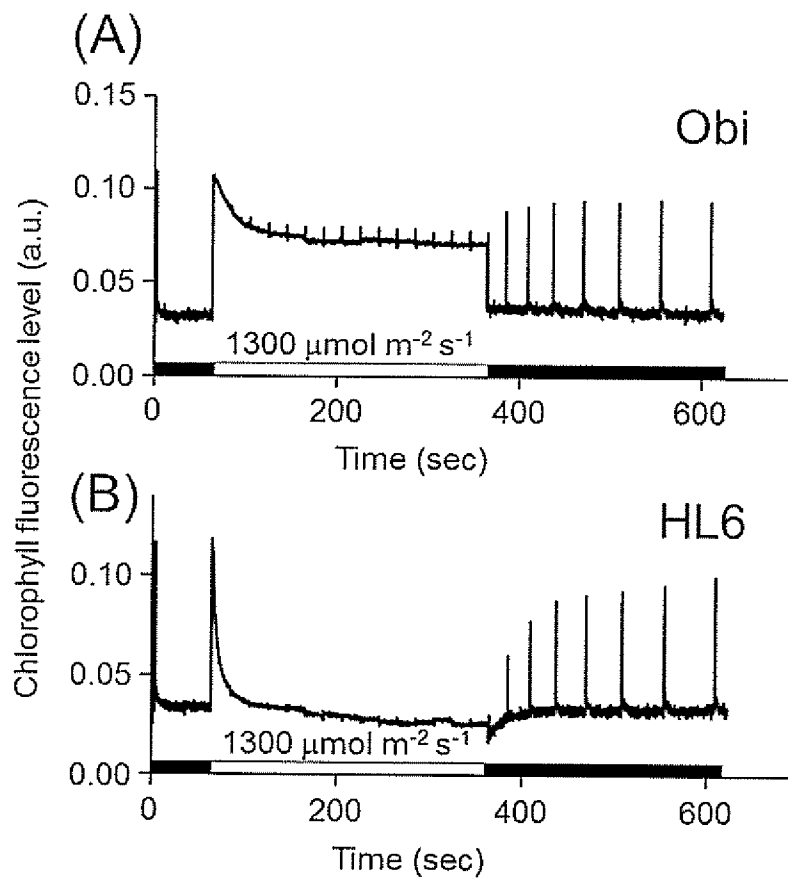
[図2]



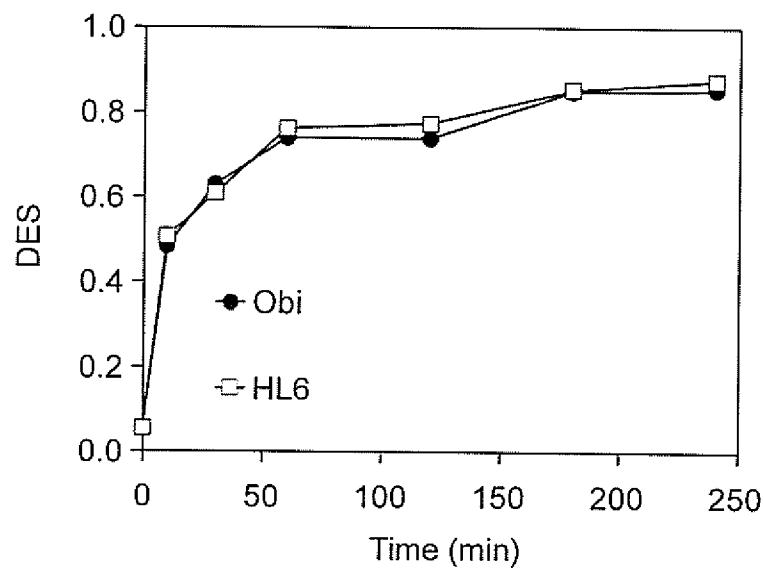
[図3]



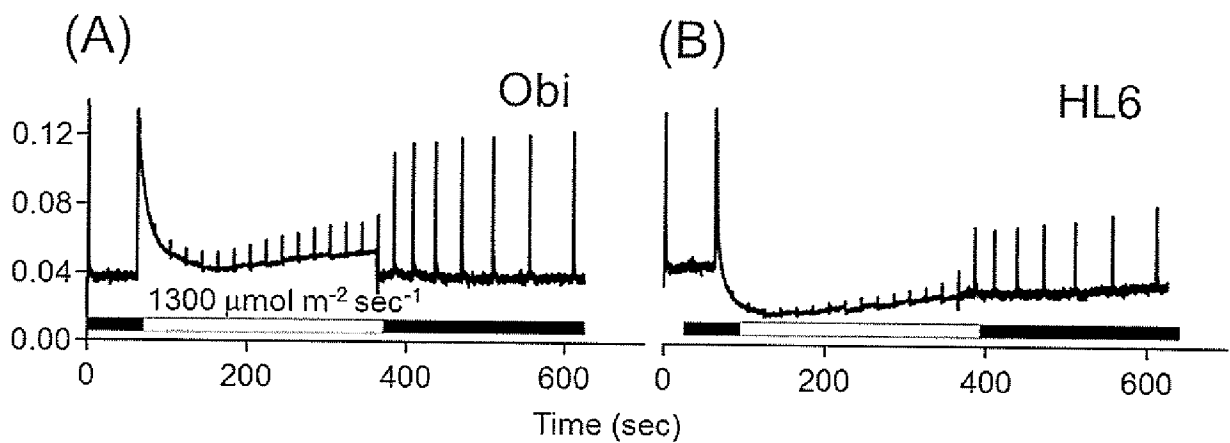
[図4]



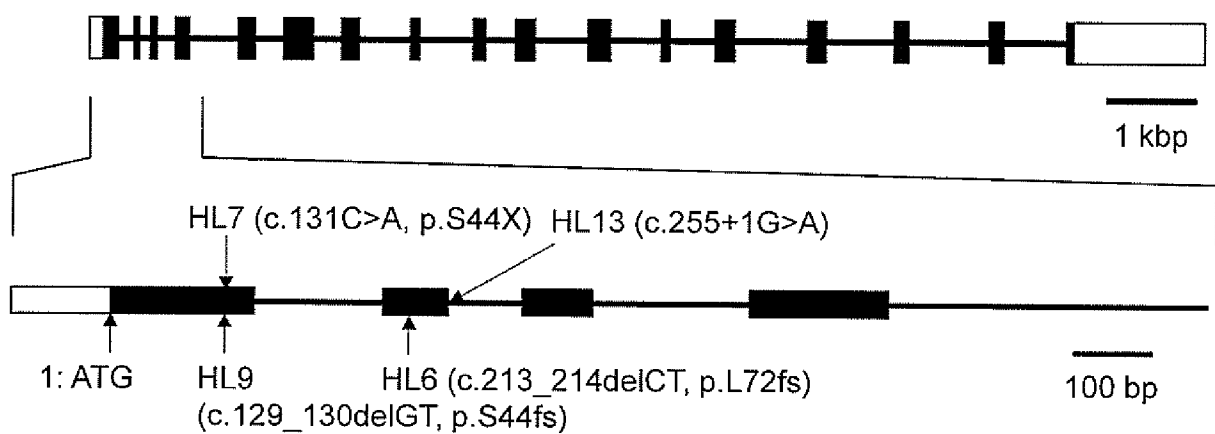
[図5]



[図6]



[図7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/085585

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N1/12(2006.01)i, C12P7/64(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, C12P7/64

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	1996-2017
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2017	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2017

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAPplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS/WPIX(STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MUSSGUG Jan H., et. al., "Engineering photosynthetic light capture: impacts on improved solar energy to biomass conversion", Plant Biotechnology Journal, 2007, Vol.5, pp.802-814, Summary, Fig. 6	1-7
A	ANANDARAJAH Kandiah, et al, "Characterization of microalga Nannochloropsis sp. mutants for improved production of biofuels", Applied Energy, 2012, Vol.96, pp.371-377, Abstract, Table1	1-7
A	WO 2015/075881 A1 (Denso Corp.), 28 May 2015 (28.05.2015), claims 1 to 7 & JP 2015-97504 A & US 2016/0273061 A	1-7

☒ 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
10 February 2017 (10.02.17)

Date of mailing of the international search report
28 February 2017 (28.02.17)

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/JP2016/085585

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 2015-027287 A (Tokyo Institute of Technology), 12 February 2015 (12.02.2015), claims 1 to 10 (Family: none)	1-7
A	LEDFOORD H. K., et al., "Comparative profiling of lipid-soluble antioxidants and transcripts reveals two phases of photo-oxidative stress in a xanthophyll-deficient mutant of Chlamydomonas reinhardtii", Mol. Gen. Genomics, 2004, Vol.272, pp.470-479, Abstract, Fig. 1A-D	1-7

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, C12P7/64(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, C12P7/64

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	1971-2017年
日本国実用新案登録公報	1996-2017年
日本国登録実用新案公報	1994-2017年

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/ WPIDS/WPIX (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq

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	MUSSGNUG Jan H., et. al., "Engineering photosynthetic light capture: impacts on improved solar energy to biomass conversion", Plant Biotechnology Journal, 2007, Vol.5, pp.802-814, Summary, Fig.6	1-7
A	ANANDARAJAH Kandiah, et al, "Characterization of microalga Nannochloropsis sp. mutants for improved production of biofuels", Applied Energy, 2012, Vol.96, pp.371-377, Abstract, Table1	1-7

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

10.02.2017

国際調査報告の発送日

28.02.2017

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)

鳥居 敬司

4 B

4045

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
A	WO 2015/075881 A1 (株式会社デンソー) 2015.05.28, 請求項1～7 & JP 2015-97504 A & US 2016/0273061 A	1-7
A	JP 2015-027287 A (国立大学法人東京工業大学) 2015.02.12, 請求項1～10 (ファミリーなし)	1-7
A	LEDFOORD H. K., et al., "Comparative profiling of lipid-soluble antioxidants and transcripts reveals two phases of photo-oxidative stress in a xanthophyll-deficient mutant of Chlamydomonas reinhardtii", Mol. Gen. Genomics, 2004, Vol.272, pp.470-479, Abstract, Fig.1A-D	1-7