

(別添様式)

ゲノム編集技術の利用により得られた生物であってカルタヘナ法に規定された「遺伝子組換え生物等」に該当しない生物を拡散防止措置の執られていない環境中で使用するに当たっての情報提供

令和 3年 9月 1日

経済産業省商務・サービスグループ

生物化学産業課生物多様性・生物兵器対策室長 殿

提出者 氏名 株式会社ユーグレナ
代表取締役 出雲 充
住所 東京都港区芝五丁目 29 番 11 号

ゲノム編集技術を利用して得られた生物であってカルタヘナ法に規定された「遺伝子組換え生物等」に該当しない生物を拡散防止措置の執られていない環境中（いわゆる「開放系」）で使用するので、使用等に先立ち次のとおり情報提供します。

ゲノム編集技術の利用により得られた生物の使用等に関する情報提供書

ゲノム編集生物の名称	<i>Euglena gracilis</i> GSL2 欠失変異体 (GSL2 KO #28 株)	
使用する場所についての情報	名称	株式会社ユーグレナ 藻類エネルギー研究所
	所在地	三重県多気郡多気町西山 649-17 (多気クリスタルタウン内)
改変した生物の分類学上の種*	宿主の属名及び種名	<i>Euglena gracilis</i> 本ゲノム編集生物の元となった株は、Z株から派生し、株式会社ユーグレナにおいて継代保存されている eu029 株である。元々は、東京大学分子細胞生物学研究所 (IAM) カルチャーコレクションから IAM E-6 として取り寄せたものであり、その際に <i>E. gracilis</i> Z 株と表記があった。また、16S rRNA 及び、18S rRNA 配列がドイツゲッチンゲン大学藻類カルチャーコレクション (SAG) で SAG 1224-5/25 として保存されている Z 株と一致するため、同一由来株と判断した。
	宿主の自然環境における分布状況に関する情報	国内外の淡水湖沼で広く分布し、生息する種である。国内では北海道以外の全国で採取例があり、比較的水が澄んでいなく、流れが淀んでいる平野部の湖沼、水田等で採取例が多い。春から秋にかけて個体数が増えるが、冬場でも採取された例はある。 国外では、 <i>E. gracilis</i> に限定した自然環境での分布を調査した例はない。
	宿主の使用の歴史及び現状	1950 年にドイツ、もしくはイギリス (詳細不明) にて Pringsheim により採取された <i>E. gracilis</i> Z 株が元となる。Z 株はその後、基礎研究用の基準株として広く使用されてきたが、凍結保存が難しいため、世界中の各研究施設にて継代されてきており、株の性質が均一でない。Z 株から派生した eu029 株は、株式会社ユーグレナにより沖縄県石垣島において屋内外で培養され、食品用途で利用されている。
	宿主の生理学的及び生態学的特性	体長 0.05 mm 程度の真核微細藻類。酸性の条件 (pH3.5 程度) を含む広範な環境に対応できる反面、本種 (<i>E. gracilis</i>) が自然湖沼の優占種となる例の報告はない。また、NaCl 濃度が 1.5% を超える汽水域では生息できない。有性生殖を示す証拠は発見されたことはなく、単純な細胞分裂によってのみ増殖する。また、他生

		<p>物の捕食、及び寄生が認められた例はない。病原性を持つ、もしくは有害物質を産生する、との報告はなく、食品原料としての産業利用の実績がある。</p> <p>実験室環境においては、窒素欠乏条件で貯蔵多糖として結晶性の 1,3-β-D-グルカン(別名：パラミロン(炭水化物の一種))を細胞内に蓄積することが知られており、これが蓄積した状態で貧酸素条件に移行することにより、無酸素下での糖代謝結果生じるピルビン酸を利用して、ワックスエステル形態で油脂を蓄積することが知られている。</p>
ゲノム編集生物の作出方法	使用したゲノム編集ツール(人工ヌクレアーゼ)	人工ヌクレアーゼは CRISPR-Cas9 を用いた。
	人工ヌクレアーゼを細胞内に移入した方法及び人工ヌクレアーゼ又はその発現系の全体の構成等	<p>標的遺伝子 <i>GSL2</i> の一部と相補的な配列を持つガイド RNA (sgRNA) と Cas9 タンパク質の複合体(リボヌクレオタンパク質)をエレクトロポレーションで宿主細胞に移入し、標的遺伝子をノックアウトした。この際、DNA 断片は導入していない。</p> <p>(RNP 複合体の構成、欠失導入イメージ、方法概略については別紙資料 1 参照)</p>
カルタヘナ法に規定される細胞外で加工した核酸又はその複製物が残存していないことの確認とその根拠		<p>ゲノム上の確認される変化は、変異導入部位の 240 bp の欠失のみである。周辺部分を含めた染色体領域を PCR で増幅し、シーケンシングすることにより、一種類の欠失配列だけが存在し、元の配列が残存していないことを確認した。</p> <p>RNA 以外の核酸を用いないため、RNA 依存性 RNA ポリメラーゼによる RNA の増幅維持、もしくは逆転写酵素を利用したゲノムへの組み込みがなければ、残存していることはないと考えられる。</p> <p>別紙資料 2 の通り、PCR 法でも RNA、DNA の双方が検出されない。</p> <p>オフターゲット効果(対象とする部位以外への変異誘導)の検討については、株式会社ユーグレナと理化学研究所が合同で実施した <i>E. gracilis</i> eu029 株のドラフトゲノム解析において、ターゲット配列 c が、対象遺伝子のみが存在することを確認している。</p>
改変した遺伝子及び当該遺伝子の機能		<i>GSL2</i> (Glucan synthase like 2) 遺伝子

	<p>パラミロン合成に關与する グルカン合成酵素 これを欠損した株はパラミロンを蓄積しないため、パラミロンを含まないことが望まれる製品の生産に利用することが可能。</p>
<p>当該改変により生じた形質の変化*</p>	<p>GSL2 は 1,3 グルカン合成酵素のオルソログとしてユーグレナには2種のCDS配列 (GSL1, GSL2) が報告されているが、GSL2はノックダウンにより、パラミロン合成に關与していることが明らかになった(文献)。また、UDP-グルコース(ウリジンニリン酸グルコース(糖ヌクレオチドの一種))から 1,3 グルカン合成する反応に必要であることが生化学的に示されている(文献)。このため GSL2欠損株ではパラミロンが蓄積しない。その結果、基質となるUDP-グルコースは細胞内に蓄積するか、解糖により消費されて代謝物が蓄積するか、もしくは細胞外に放出されるものと推測される。増殖の速さには変化がなく、光・糖がない条件で貯蔵多糖がないために早く死ぬ傾向にある。</p> <p>参考文献 Tanaka, Yuji, et al. FEBS letters 591.10 (2017): 1360-1370.</p>
<p>上記以外に生じた形質の変化の有無(ある場合はその内容)</p>	<p>無 有</p>
<p>当該生物の用途*</p>	<p>製品評価技術基盤機構が経済産業省及び環境省の監督の下実施している遺伝子組換え微細藻類の第一種使用に係る生物多様性影響評価ガイダンス策定に当たっての実験に使用し、評価手法の検討や妥当性の確認を行う。</p> <p>実験では、レースウェイ式オープンポンド(10m²培養槽(約1600L))を用い、2021年9~11月中旬に4週間の飛散試験を実施する。</p> <p>パラミロンを蓄積しないことにより、宿主とは見た目が異なる(パラミロンの蓄積が視認できない)ゲノム編集株として、基礎的な研究用途に利用可能であり、上記遺伝子組換え生物の開放系利用における審査支援体制整備事業の開放系試験での利用にも適切である。</p> <p>GSL2 K0#28株の見た目は、別紙資料3参照。</p>

<p>当該生物を使用した場合に生物多様性影響が生ずる可能性に関する考察*</p>	<p>他の微生物を減少させる性質</p>	<p>実験室内での培養環境下において、宿主と比較して増殖が若干遅く、最終到達密度も低い（別紙資料3参照）。宿主には抗生物質など他の微生物の生育を阻害する物質の生産は知られていない。また、今回導入した変異により、代謝されない過剰 UDP-グルコース（糖ヌクレオチドであり、糖代謝の中間体となる）が新たな阻害物質の生産につながる報告例はない。</p>
	<p>病原性</p>	<p>宿主にはこれまでに知られている病原性は存在しない。また、標的遺伝子はUDP-グルコースから 1,3 グルカン合成する酵素をコードすることが生化学的に示されているため（文献1）、その欠失変異体においては、パラミロンが生成しなくなり、グルコースもしくはその代謝物が蓄積するものと考えられる。グルコースを過剰投与して培養した宿主も同様に病原性がないことが示されているため（文献2）、対象遺伝子の欠損による新たな病原性は生じていないと推測される。</p> <p>参考文献：</p> <p>1 .Tanaka, Yuji, et al. FEBS letters 591.10 (2017): 1360-1370.</p> <p>2 .Symonds et al. Toxicology Research and Application 2 (2018): 2397847318761672.</p>
	<p>有害物質の産生性</p>	<p>宿主にはこれまでに知られている有害物質の産生性はない。また、標的遺伝子はUDP-グルコースから 1,3 グルカン合成する酵素をコードすることが生化学的に示されているため（文献1）、その欠失変異体においては、パラミロンが生成しなくなり、グルコースもしくはその代謝物が蓄積するものと考えられる。グルコースを過剰投与して培養した宿主も同様に有害物質の産生性が報告されていないため（文献2）、対象遺伝子の欠損による新たな有害物質産生性は生じていないと推測される。</p> <p>参考文献：</p> <p>1 .Tanaka, Yuji, et al. FEBS letters 591.10 (2017): 1360-1370.</p> <p>2 .Symonds et al. Toxicology Research and Application 2 (2018): 2397847318761672.</p>

	<p>核酸を水平伝達する性質</p>	<p>作出の過程で人工ヌクレアーゼ遺伝子、およびベクターを使用していないため、異種核酸DNAが水平伝達することはない。RNAが残存していた場合も個体間で水平伝達する例は報告されていない。</p>
	<p>その他の性質</p>	<p>上記のほかに、生物多様性に影響を与え得る性質はないと判断した。</p>
	<p>上記に基づく生物多様性影響が生じる可能性に関する考察</p>	<p>パラミロンが合成できない株であり、それ以外に特筆すべき効果は現れない。パラミロンを合成できないことにより、一般的な野生株と比較して環境変化に弱いと予想され、一方で、増殖も宿主と比較して特に速くなく（むしろ環境によっては遅い）、余剰なグルコースを細胞分裂のエネルギーとして効率的に利用できるようになるわけではない様子である。代謝改変による影響も、パラミロン材料となるグルコースが細胞内に残存する以上の効果は推定されず、以上の検討結果から、観察された形質は生物多様性に影響を及ぼさないと考察できる。</p>

別紙資料1 ゲノム編集に利用した sgRNA、及び編集後の欠失部位

・ *Euglena gracilis* eu029 株 (宿主) における *GSL2* 遺伝子ゲノム編集箇所周辺配列

同一遺伝子内 2 箇所に対する CRISPR/Cas9 RNP 導入による欠失誘導。

```
TGGGGCATTGGAGGGTTATGAAGTCTTCTGGCTCGTAGCCCTCATAGGGCTACTTGCCACACAAGTCTTGT  
CGTTGCACGGGAAATGCCATCGGCTCCACGGAGTACCGTGTGAGGGGCACCAGCATTGAATATAGATATGGAGG  
AGGTGTGGATTTTATCCCTTTTTCATTTTCTCTTTTTTTTCATTTTCCGAACAGATGAATCCTGGACgaggattt  
tcatccgtagcatgggctactcgcagcaccaccaccttggcccaatccgaaaagccatatggggattactac  
accaccaatttcagacaccttcataaagagatctgcccctcatccgaaaaatgggtgccaacgccctccgcct  
ttggaactggaactacatggaacatctgtgggcaatcatgctgacttctcgccttcttgggaacaacaact  
ctcaaccactGAGGTTTTTCATTCCTTTTACCTTGGTCCGTGGTCCCTTTCAGGTGATCGTCAATTTTTTT  
TTGAGTCGGACGATACCCTGGACCTGACGGTGTCCCTCGTGTACCGGATCTGTCAAATGCACAAACAAGGCGGG  
CAGTGGTCTCAGACTGGGCCACCTCATTGATCAGTATTGGCGGCACCCAGCTGTATGGGATGG
```

上記配列における小文字部分 240bp が欠失。

黄色マーカー部分が gRNA 設計部位、赤色マーカー部分が PAM 配列

・ ゲノム編集に利用した gRNA 配列

gRNA は IDT 社の tracrRNA、及びカスタム合成した crRNA 2 種を使用

crRNA

gaggauuuucauccguagcaGUUUUAGAGCUAUGCU

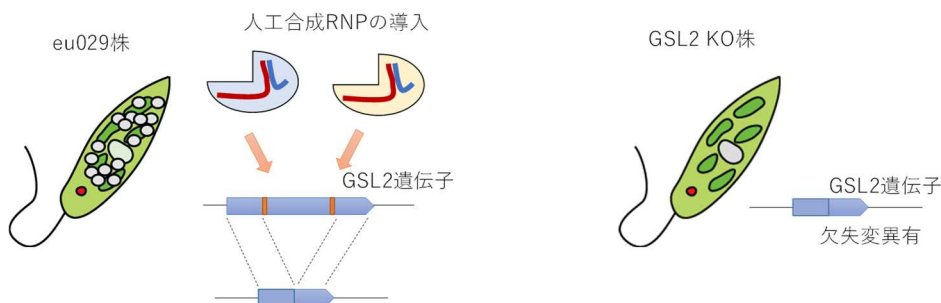
acaacaacucucaaccacugGUUUUAGAGCUAUGCU

tracrRNA

AGCAUAGCAAGUUAUUUUUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUU

・ 欠失導入方法図解

下図の通り、eu029 株 (宿主) の *GSL2* 遺伝子内の近隣配列 2 か所を切断することにより、間の配列が欠失したクローンを選抜。



参考文献の Graphical abstract に方法の概略図有

Nomura, Toshihisa, et al. STAR protocols 1.1 (2020): 100023.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2666166720300101?via%3Dihub>

別紙資料2 GSL2 ゲノム編集株における残存核酸の検出

【背景】

独立行政法人製品評価技術基盤機構 (NITE) で実施される「遺伝子組換え生物の第一種使用 (開放系) における審査支援体制整備事業」において、*Euglena gracilis* ゲノム編集株 GSL2K0 株 #28 (以下 GSL2K0 と表記) の第一種使用をする。

E. gracilis は複数の対立遺伝子を持つが、当該株は下記の単一の欠失配列に集約されており、PCR 法により該当配列を増幅した後に、直接サンガー法で配列を確認することも可能である。

```
TGGGGCATTGGAGGGTTATGAAGTCTTCTGGCTCGTAGCCCTCATAGGGCTACTTGGCCACACAAGTCTCTTGTGCGTTGCACGGAAATGCCATCG  
GCTCCACGGAGTACCGTGTGAGGGGACCAGCATTGAATATAGATATGGAGGAGGTGGATTTTATCCCTTTTCATTTTCTCTTTTTTTCATTT  
TCCGAACAGATGAATCCTGGACgaggattttcattccgtagcatgggctactcgccagcaccacccaccttgccccatccgaaaagccataatgggg  
attactacaccaccaatttcagacaccttcagaaagagatctgccctcatccgaaaaatgggtgccacgcccctccgaccttggaactggaact  
acatgggaacatctgtgggcaatcatgctgacttcctcgatctttgttgaacaacaactctcaaccactGAGGGTTTTTCATTCTTTTGACCTTG  
GTGCCGTGGGTCCCTTTCAGGTGATCGTCAATTTTTTTTGGAGTCGGACGATACCCTGGACCTGACGGTGCCTCGTGTACCCGGATCTGTCAAAT  
GCACAACAAGGGCGGCAGTGGTCTCAGACTGGGCCACCCTCATTGATCAGTATTGGCGGCACCCAGCTGTCATGGGATGG
```

小文字部分が欠失

なお、crRNA、及び tracrRNA は IDT 社より購入した下記配列の物を使用した。

crRNA (カスタム合成)

gaggauuuucauccguagcaGUUUUAGAGCUAUGCU

acaacaacucucaaccacugGUUUUAGAGCUAUGCU

tracrRNA

AGCAUAGCAAGUUAUUUUUAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUU

NITE の事業における第一種使用に際して経済産業省へ届出る。提供する株は、SDN-1 型に該当することに加え、細胞には crRNA, tracrRNA, 及び Cas9 タンパク質の複合体しか導入していないが、RNA 依存性 RNA ポリメラーゼによる維持、もしくは逆転写酵素を介したゲノムへの導入核酸の挿入によって導入核酸が残存する可能性がある。このため、PCR 法による残存核酸の確認を実施する。

【目的】

E. gracilis GSL2K0 株において、導入核酸が検出されないことを確認

【方法】

○使用したサンプル

E. gracilis ゲノム編集元株 (宿主) eu029

E. gracilis ゲノム編集株 GSL2K0

それぞれの株を KH3.5 培地により培養。

対数増殖期の培養液を 1 mL をチピタンで 5 秒間遠心して上清を破棄。

沈殿の細胞 (~5 × 10⁶ 個) をそれぞれの核酸抽出に使用。

ポジティブコントロールに用いた crRNA, tracrRNA (ゲノム編集に用いたもの)は原液を 10 μ M に希釈して使用

○ゲノム抽出

Geno Plus(TM) Genomic DNA Extraction Miniprep System (Viogene 社)を使用。
キット説明書の記載に従って処理し、50 μ l の水でゲノムを溶出した。

○RNA 抽出

Isogen(ニッポンジーン社)を使用。
キット説明書に記載に従い抽出した。
乾燥後の RNA は 20 μ l の TE に溶解した。

○逆転写反応

ReverTra Ace @PCR RT Master Mix (Toyobo 社)を使用。
キット説明書に従い逆転写反応を実施した。
ただし、逆転写の際に下記 2 種のプライマーを同時に導入した。

M4-cr-rev GTTTT CCCAG TCACG ACagcatagctctaaaac

M4-tracr-rev GTTTT CCCAG TCACG ACaaagcaccgactcggtgccac

それぞれ crRNA と tracrRNA に後半が相補的になっており、選択的に逆転写可能
これらとは別に、キットにはランダムプライマーとポリ T プライマーが含まれる

primer 0.25 μ l \times 2

RNA 1~3 μ l

5 \times RT 2 μ l

水 x μ l

合計 10 μ l

○PCR 試験

テンプレート

eu029 ゲノム

GSL2K0 ゲノム

crRNA, tracrRNA 逆転写産物

eu029 逆転写産物

GSL2 K0 逆転写産物

プライマー

crRNA

RV-cr-fwd_T1 CAGGA AACAG CTATG ACgaggatTTTTcatccgtagca
M4-cr-rev GTTTT CCCAG TCACG ACagcatagctctaaaac

crRNA

RV-cr-fwd_T2 CAGGA AACAG CTATG ACacaacaactctcaaccactg
M4-cr-rev GTTTT CCCAG TCACG ACagcatagctctaaaac

tracrRNA

RV-tracr-fwd CAGGA AACAG CTATG ACagcatagcaagttaaaataag
M4-tracr-rev GTTTT CCCAG TCACG ACaaagcaccgactcgggtgccac

PNO

PNO F1-2 CCTTTGGTCAGGTTGTGGAT
PNO R1 TGAGAGCCATGTCGTGAGAC

PNO

PNO F2 GTGCACCAGATGCAGAAGAA
PNO R2-2 TTCCGGGAACAAATTCAGAG

遺伝子 PNO を対象としたプライマーは、それぞれ単一 exon 内の配列を対象にしており、ゲノム、及び逆転写産物のいずれからも断片の増幅が可能

それぞれプライマーにより増幅される領域は次ページの通り。

増幅配列

crRNA :

CAGGAAACAGCTATGACgaggat t t t catccgtagcag t t t tagagctatgctGTCGTGACTGGGAAAAC (70 bp)

crRNA :

CAGGAAACAGCTATGACacaacaactctcaaccactggt t t t tagagctatgctGTCGTGACTGGGAAAAC (70 bp)

tracrRNA :

CAGGAAACAGCTATGACagcatagcaagt t aaaa taaggctag tccg t a t caact t gaaaaagtggcaccgag t cgg t g c t t t GTCGTG
ACTGGGAAAAC (101 bp)

PNO :

CCTTTGGTCAGGTTGTGGATGTCCGTGAGATGCAATCTGAGGCTGGAGCCGCAGGCCCTGCATGGGGCACTGGCTGCTGGAGCTATTG
CTACAACCTTCACTGCCTCTCAAGGGTTGTTGTTGATGATCCCAACATGTATAAGATTGCAGGTGAGCTGATGCCCTCTGTCATCCACG
TTGCAGCCCGAGAGCTTGCAGGCCACGCTCTGTCCATTTTTGGAGGACACGCTGATGTCATGGCTGTCCGCAAACAGGATGGGCTATGC
TGTGCTCCCACACAGTGCAGCAGTCTCACGACATGGCTCTCA (312 bp)

PNO :

GTGCACCAGATGCAGAAGAAGTGACAGTGCTCATGGGTTCTGGTGCAACCACAGTCAACGAGGCAGTGGACCTTCTTGTGAAGCGTGAA
AGAAGGTTGGTGCAGTCTTGGTGCACCTCTACCGACCATGGTCAACAAAGGCATTTGAAAAGGTCTGCCAAGACAGTGAAGCGCATTG
CTGCTCTGGATCGCTGCAAGGAGGTGACTGCACTGGGTGAGCCTCTGTATCTGGATGTGTCGGCAACTCTGAATTTGTTCCCGGAA
(266 bp)

PCR

GoTaq [®]reen Master Mix (プロメガ社)を使用。

2×GoTaq	5 μ l
primer	0.2 μ l ×2
template	1 μ l
水	3.6 μ l
合計	10 μ l

反応サイクル ; 98 1分 (98 30秒 54 30秒 72 1分) 35 cycle 72 1分 4

○電気泳動

Agarose XP(ニッポンジーン社)を使用。

TAE を緩衝液として 3%濃度でゲルを作製し、電気泳動を実施し、PCR 断片の増幅を確認した。
Gene ladder 100 をサイズマーカーとして使用

【結果と考察】

○抽出された核酸の量

ゲノム (DNA)

eu029 1330 ng/ μ l

GSL2 KO 1500 ng/ μ l

RNA

eu029 878 ng/ μ l

GSL2KO 1040 ng/ μ l

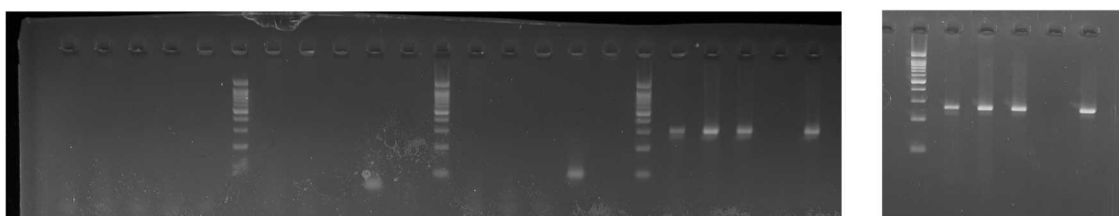
逆転写反応には、それぞれの抽出 RNA 1 μ l を反応に使用し、逆転写産物は 10 倍に希釈して、1 μ l を PCR テンプレートとして使用。

ただし、ポジティブコントロールの crRNA、及び tracrRNA は、各溶液を 10 μ M に希釈し、1 μ l ずつ計 3 μ l を PCR テンプレートとして使用。

ゲノムは、抽出液を 10 倍に水で希釈し、1 μ l を PCR テンプレートとして使用。

○泳動結果

増幅断片	crRNA①					crRNA②					tracrRNA					PNO①					PNO②								
テンプレート	A	B	C	D	E	m	A	B	C	D	E	m	A	B	C	D	E	m	A	B	C	D	E	m	A	B	C	D	E



A. eu029 ゲノム, B. GSL2 KO ゲノム, C. eu029 逆転写産物, D. crRNA&tracrRNA 逆転写産物, E. GSL2KO 逆転写産物

crRNA ではポジティブコントロールである D でも PCR 産物が確認できなかったが、crRNA , 及び tracrRNA については、それぞれ D でのみ PCR 産物が確認できた。crRNA において PCR 増幅ができなかったのは、IDT 社のカスタム RNA における修飾 (詳細非開示) の影響を受けた可能性がある。

また、PNO 領域については、D 以外のテンプレート全てから PCR 産物が確認できており、テンプレートの網羅性が確認できた。

【結論】

ゲノム編集株 GSL2KO の全ゲノム、及び転写産物内において導入核酸は残存していない。

補足：使用した培地成分

KH

	mg/L
Arginine HCl	500
Aspartic acid	300
glucose	12000
Glutamic acid	4000
Glycine	300
histidine HCl·H ₂ O	50
Malic acid	6500
Na ₃ citrarte·H ₂ O	500
Na ₂ Succinate·H ₂ O	100
(NH ₄) ₂ SO ₄	500
NH ₄ HCO ₃	250
KH ₂ PO ₄	250
MgCO ₃	600
CaCO ₃	120
Vitamin B1(Thiamin)	2.5
Vitamin B12	0.005
EDTA-Na ₂	50
FeSO ₄ (NH ₄) ₂ SO ₄ ·6H ₂ O	50
MnSO ₄ ·H ₂ O	18
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	25
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	4
CuSO ₄	1.2
NH ₄ VO ₃	0.5
CoSO ₄ ·7H ₂ O	0.5
H ₃ BO ₃	0.6
NiSO ₄ ·6H ₂ O	0.5

pH3.5 or pH5.5

別紙資料3 GSL2K0 株の性質評価

【評価項目】

フラスコ培養（従属栄養）での増殖速度、細胞サイズの変化、パラミロン蓄積

【方法】

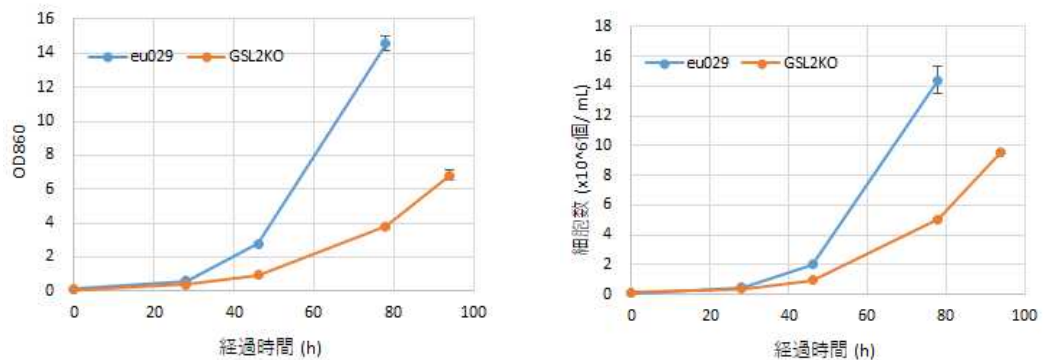
eu029 株（宿主）と GSL2K0 株を KH3.5 培地で 3 日間前培養
下記条件で本培養を実施。

条件	
培養容器	100 mL 容三角フラスコ
培養液	KH3.5 50 mL
培養開始濃度	0.1 (OD860)
本数	3 本ずつ
振盪	100 rpm (回転)
温度	室温 (26)
光照射	恒常光 (100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$)
曝気	なし

eu029、及び GSL2K0 をそれぞれ培養 3 日目、4 日目に回収し、パラミロン含量定量。

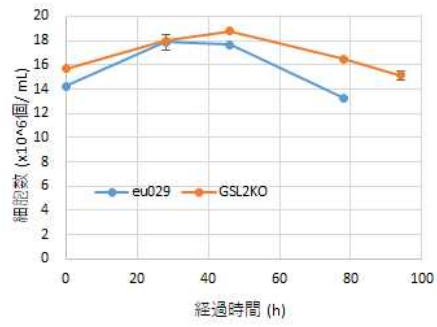
【結果】

860 nm での培養液の吸光(OD860)、及び細胞濃度の増加は、それぞれ下図の通り（エラーバーは SD）。



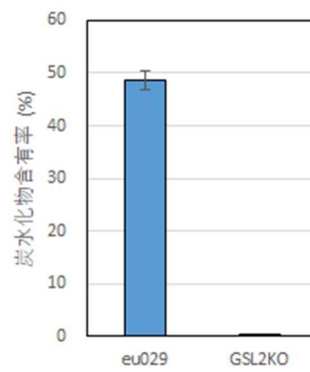
GSL2K0 の増殖速度は eu029 よりやや劣る。

粒度計で測定した平均粒子径は下図の通り（エラーバーは SD）。



EgGSL2KO 株の方が、細胞サイズがやや大きい。

eu029 と EgGSL2KO それぞれのパラミロン蓄積量は下記の通り (エラーバーは SD)。



eu029 と GSL2KO それぞれのパラミロン蓄積条件での細胞写真は下記の通り。

eu029



GSL2KO



以上