

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-545461
(P2013-545461A)

(43) 公表日 平成25年12月26日(2013.12.26)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/20 (2006.01)	C 1 2 N 1/20 A	4 B 0 6 4
C 1 2 P 7/04 (2006.01)	C 1 2 P 7/04	4 B 0 6 5
C 1 2 N 1/12 (2006.01)	C 1 2 N 1/12 B	
C 1 2 R 1/145 (2006.01)	C 1 2 N 1/20 A	
	C 1 2 P 7/04	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 30 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-538190 (P2013-538190)
 (86) (22) 出願日 平成23年11月10日 (2011.11.10)
 (85) 翻訳文提出日 平成25年7月9日 (2013.7.9)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2011/069789
 (87) 国際公開番号 W02012/062832
 (87) 国際公開日 平成24年5月18日 (2012.5.18)
 (31) 優先権主張番号 61/412, 162
 (32) 優先日 平成22年11月10日 (2010.11.10)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 10306234.5
 (32) 優先日 平成22年11月10日 (2010.11.10)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 505311917
 メタボリック エクスプローラー
 フランス国サン、ボージュール、ピオボル、
 クレルモン-リマーニュ
 (74) 代理人 100117787
 弁理士 勝沼 宏仁
 (74) 代理人 100091487
 弁理士 中村 行孝
 (74) 代理人 100107342
 弁理士 横田 修孝
 (74) 代理人 100126099
 弁理士 反町 洋
 (72) 発明者 ライナー、フィゲ
 フランス国ル、クレスト、リュ、デュ、ボ
 スケ、4

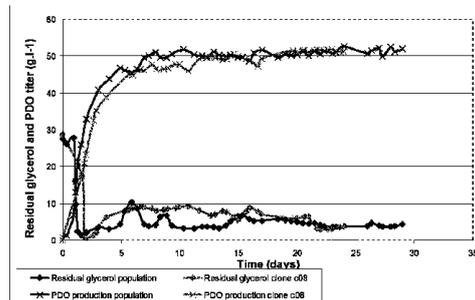
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 高グリセリン濃度を用いる 1, 3-プロパンジオール生産用微生物

(57) 【要約】

本発明は、1, 3-プロパンジオール (PDO) の生産に有用なクロストリジウム・アセトブチリカム (*Clostridium acetobutylicum*) の集団に関し、該集団は、表1で確認された変異体から選択された少なくとも一つのクロストリジウム・アセトブチリカム s p . 菌株を含み、該変異体の相対割合は特異的遺伝子から選択される。

Fig 1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

1, 3 - プロパンジオール (PDO) の生産に有用なクロストリジウム・アセトブチリカム (*Clostridium acetobutylicum*) の集団であって、該集団は表 1 に示される変異体から選択される少なくとも一つのクロストリジウム・アセトブチリカム s p . 菌株を含み、前記変異体には相対割合で以下の遺伝子ファミリーが存在してなる、集団：

【表 1】

遺伝子ファミリーおよび機能	最小 %
転写翻訳制御	12-15
トランスポーター	10-12
仮想タンパク質	8-11
エネルギー代謝	7-10
遺伝子間	7-10
炭水化物代謝	5-7
膜タンパク質	2-5
核酸代謝	2-5
アミノ酸代謝	1-3
細胞分裂	1-3
胞子形成	1-3
細胞接着	0-1
セルラーゼ	0-1
グリセリン代謝	0-1
脂質代謝	0-1
プロテアーゼ/ペプチダーゼ	0-1
細胞運動性	0-1

10

20

30

【請求項 2】

- 受託番号 I-4378 として CNCM に寄託された DG1 pSPD5 PD0001VE05c01 株；
- 受託番号 I-4379 として CNCM に寄託された DG1 pSPD5 PD0001VE05c05 株；
- 受託番号 I-4380 として CNCM に寄託された DG1 pSPD5 PD0001VE05c07 株

からなる群から選択されるクロストリジウム・アセトブチリカムの少なくとも一つの菌株を含んでなる、請求項 1 に記載の集団。

【請求項 3】

前記菌株が、以下の点変異のうち少なくとも一つの変異をさらに有してなる、請求項 1 または 2 に記載の集団：

- 真核性のグルコキナーゼ調節遺伝子 (炭水化物代謝) のホモログである推定糖リン酸イソメラーゼをコードする、クロストリジウム・アセトブチリカムゲノムの CA_C0175 遺伝子座 (locus) 198989 位で C が T に置換される

- RNA ポリメラーゼシグマ因子 RPOD (転写および翻訳制御) をコードする、クロストリジウム・アセトブチリカムゲノムの CA_C1300 遺伝子座 1444099 位で G が A に置換される

- Glu-tRNA^{Gln} アミドトランスフェラーゼのサブユニット A (転写および翻訳制御) をコードする、クロストリジウム・アセトブチリカムゲノムの CA_C2670 遺伝子座 2787387 位で C が T に置換される

40

50

- ABCトランスポーター（2つのATPアーゼドメイン）のATPアーゼ成分をコードする、クロストリジウム・アセトブチリカムゲノムのCA_C3339遺伝子座3512658位でCがTに置換される

- 分岐鎖アミノ酸パーミアーゼ（トランスポーター）をコードする、クロストリジウム・アセトブチリカムゲノムのCA_C1610遺伝子座1752341位でCがTに置換される。

【請求項4】

唯一の炭素源としてグリセリンを含んでなる培養培地中で請求項1～4のいずれか一項に記載の集団を培養し、かつ、培養培地から産生される1,3-プロパンジオールを回収することを含んでなる、1,3-プロパンジオールの産生方法。

【請求項5】

1,3-プロパンジオールがさらに精製される、請求項4に記載の方法。

【請求項6】

培養培地中における前記グリセリン濃度が90と120g/Lグリセリンの間、好ましくは約105g/Lグリセリンである、請求項4または5に記載の方法。

【請求項7】

前記グリセリンが工業用グリセリンにより提供される、請求項4～6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項8】

前記工業用グリセリンが、バイオディーゼル生産の副産物である、請求項7に記載の方法。

【請求項9】

前記培養培地が、有機窒素を添加していない合成培地である、請求項5～8のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、1,3-プロパンジオール生産のための新規に改変された微生物に関する。この微生物は増殖および高グリセリン濃度、特に工業用グリセリンの高濃度、の培地からの1,3-プロパンジオールの生産に適合している。また、本発明は、上記適合された微生物の培養条件および1,3-プロパンジオール生産のための製造プロセスにも関する。最後に、本発明は、改変された微生物により得られた1,3-プロパンジオールおよびその応用に関する。

【背景技術】

【0002】

1,3-プロパンジオール(1,3-propanediol (PDO))は、トリメチレングリコールやプロピレングリコールとも呼ばれ、最も古くから知られている発酵生成物のひとつである。クロストリジウム・パストゥリアナム(*Clostridium pasteurianum*)を含んでいるグリセリン発酵培地中において、オーガストフロイドにより早くも1881年には最初に確認された。PDOはグリセリン発酵の典型的な生成物であり、他の有機基質の嫌気的変換において発見されている。極めて僅かな有機体(それらは全て微生物である)しかそれを生成できない。それらは、クレブシエラ(*Klebsiella*)属(*K.ニューモニエ*(*K. pneumoniae*))、エンテロバクテリウム(*Enterobacter*)属(*E.アグロメラン*(*E. agglomerans*))そしてシトロバクテリア(*Citrobacter*)属(*C.freundli*)、ラクトバシラス(*Lactobacilli*)属(*L.ブレビス*(*L. brevis*)および*L.ブチネリ*(*L. buchneri*))、そして*C.ブチリカム*(*C. butyricum*)および*C.パストゥリアナム*(*C. pasteurianum*)に属するクロストリジウム(*Clostridia*)属を包含する。

【0003】

PDOは、二元機能有機化合物として、多くの合成反応、特にポリエステル、ポリエーテル、ポリウレタン、そして特に、ポリトリメチレンテレフタレート(polytrimethylene terephthalate) (PTT)を生成するための重縮合のためのモノマーとして使用される可能

10

20

30

40

50

性がある。これらの構造と反応特性が、化粧品、繊維製品（衣料繊維や床張り材）およびプラスチック（自動車産業および梱包またはコーティング）での幾つかの応用をもたらす。

【0004】

PDOは種々の化学的経路で生産されうるが、それらは汚染物質を極度に包含する廃液の流れを生成し、製造コストは高価なものとなる。それ故、化学的に生産されたPDOは、石油化学的に利用可能な、1, 2 - エタンジオール、1, 2 - プロパンジオールそして1, 4 - ブタンジオールのようなジオールと競争できない。この競争力を増強するために、1995年に、デュポンはグルコースからPDOへの生物学的変換のための研究プログラムを開始した。このプロセスは環境には優しいものの、i) 非常に高価な補因子であるビタミンB12を用いる、そしてii) 生産株が不安定であるため不連続なプロセスであるというデメリットがある。

10

【0005】

バイオディーゼル産業で製造された大量のグリセリンが利用可能になったため、むしろ、連続的にビタミンB12を必要とせず炭素収率がより高いプロセスが有利である。

【0006】

PDOが、塩と水が混合した約80 - 85%のグリセリンを含むバイオディーゼル生成物の不要な副生成物であるグリセリンから生産され得ることは当技術分野で公知である。

【0007】

C. ブチリカム (C. butyricum) がバッチおよび2段階連続発酵で増殖でき工業グリセリンからPDOを生産できることは従前に記載されていた (Papanikolaou et al., 2000)。しかしながら、グリセリンの最高濃度において、得られた最大PDO力価は 0.02 h^{-1} の希釈率で 48.1 g L^{-1} であり、 $0.9 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ の生産性を意味する。培養は、培地供給中 90 g L^{-1} の最大グリセリン濃度、および酵母エキス、バクテリアの微生物バイオマス生産の増大に役立つと当業者に知られている有機窒素を含有する高価な化合物の存在下で行われた。

20

【0008】

出願WO2006/128381は、クレブシエラ・ニューモニエ (Klebsiella pneumoniae)、C. ブチリカム (C. butyricum) またはC. パストゥリアヌム (C. pasteuricum) のような天然のPDOを生産する微生物を用いてバッチおよび流加バッチ培養でのPDOの生産のためのこのグリセリンの使用を記載している。さらに、WO2006/128381で使用された培地も酵母エキスを含む。この特許出願に記載されているように、達成した最大生産性は 0.8 と $1.1 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ の間であった。

30

【0009】

「C. アセトブチリカム (C. acetobutylicum) DG1 pSPD5」と呼ばれる、C. ブチリカム (C. butyricum) からのビタミンB12非依存性のグリセリン脱水酵素とPDOデヒドロゲナーゼを含むように改変されたC. アセトブチリカム (C. acetobutylicum) の性能がGonzalez-Pajuelo et al., 2005に記載されている。この菌株は、純粋なグリセリンを 120 g l^{-1} まで含有している流加培地において、最初は増殖しPDOを産生する。さらに、最大 60 g l^{-1} の純粋グリセリンまたは工業用グリセリンを含有している流加培地における分析では何の差異も指摘されなかった。これらの結果は酵母エキスの存在下で得られた。その上、 60 g l^{-1} 以上の工業用グリセリンの濃度に関しての試験は行われなかった。野生型のC. ブチリカムと改変された微生物「C. アセトブチリカム (C. acetobutylicum) DG1 pSPD5」を比較すると、全体的に同じような行動が観察された。

40

【0010】

特許出願PCT/EP2010/056078において、発明者らはGonzalez-Pajuelo et al. (2005)で記載されたような「C. アセトブチリカム (C. acetobutylicum) DG1 pSPD5」の菌株を高濃度の工業用グリセリンの存在下および酵母エキスの非存在下の培地で生育させるために適用するプロセスを記載している。結果として生じた菌株は 120 g l^{-1} までの工業用グリセリンを含む培地でPDOを生産でき、 $53.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ のPDO力価

50

、 $0.53 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ までの収率および $2.86 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ までの生産性を示す。

【0011】

今回の特許出願において、本発明者らは、高濃度の工業用グリセリンの存在下での適用後に得られるようなPDOの産生に有用な、適合した微生物の主な遺伝的変化にハイライトを当てる。

【発明の概要】

【0012】

本発明は1, 3-プロパンジオール (PDO) の生産に有用なクロストリジウム・アセトブチリカム (*Clostridium acetobutylicum*) の集団に関し、該集団は、表1に示される変異体から選択される少なくとも一つのクロストリジウム・アセトブチリカム s p . 菌株を含み、前記変異体の相対割合は以下の遺伝子ファミリーから選択される。

【表1】

遺伝子ファミリーおよび機能	最小%
転写翻訳制御	12-15
トランスポーター	10-12
仮想タンパク質 (Hypothetical proteins)	8-11
エネルギー代謝	7-10
遺伝子間 (Intergenic)	7-10
炭水化物代謝	5-7
膜タンパク質	2-5
核酸代謝	2-5
アミノ酸代謝	1-3
細胞分裂	1-3
胞子形成	1-3
細胞接着	0-1
セルラーゼ	0-1
グリセリン代謝	0-1
脂質代謝	0-1
プロテアーゼ/ペプチダーゼ	0-1
細胞運動性	0-1

【0013】

具体的には、本発明の集団は、

- 受託番号 I-4378 として CNCM に寄託された DG1 pSPD5 PD0001VE05c01 株；
- 受託番号 I-4379 として CNCM に寄託された DG1 pSPD5 PD0001VE05c05 株；
- 受託番号 I-4380 として CNCM に寄託された DG1 pSPD5 PD0001VE05c07 株

からなる群から選択されるクロストリジウム・アセトブチリカムの少なくとも一つの菌株を含んでなる。

CNCMは、パリ・パスツール研究所の“国立微生物培養物コレクション (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes)”を意味する。

【0014】

特に、本発明の詳細な態様によれば、上記集団は以下のうち少なくとも一つの点変異をさらに有してなる株を含んでなる：

- 真核性のグルコキナーゼ調節遺伝子（炭水化物代謝）のホモログである、推定糖リン酸イソメラーゼをコードする、クロストリジウム・アセトブチリカムゲノムのCA_C0175遺伝子座（locus）198989位でCがTに置換される

- RNAポリメラーゼシグマ因子RPOD（転写および翻訳制御）をコードする、クロストリジウム・アセトブチリカムゲノムのCA_C1300遺伝子座1444099位でGがAに置換される

- Glu-tRNA^{Gln}アミドトランスフェラーゼのサブユニットAをコードする、クロストリジウム・アセトブチリカムゲノムのCA_C2670遺伝子座2787387位でCがTに置換される

- ABCトランスポーターのATPアーゼ成分をコードする、クロストリジウム・アセトブチリカムゲノムのCA_C3339遺伝子座3512658位でCがTに置換される

- 分岐鎖アミノ酸パーミアーゼ（トランスポーター）をコードする、クロストリジウム・アセトブチリカムゲノムのCA_C1610遺伝子座1752341位でCがTに置換される。

10

【0015】

本願発明はまた、1, 3 - プロパンジオールの生産方法であって、唯一の炭素源としてグリセリンを含んでなる培養培地中で本発明にしたがって1, 3 - プロパンジオール（PDO）の産生に有用なクロストリジウム・アセトブチリカムの集団を培養し、かつ、培養培地から産生された1, 3 - プロパンジオールを回収することを含んでなる方法にも関する。

【発明の具体的説明】

【0016】

1, 3 - プロパンジオール（PDO）の生産に有用なクロストリジウム・アセトブチリカム（Clostridium acetobutylicum）の集団

20

1, 3 - プロパンジオールの生産に有用なクロストリジウム・アセトブチリカムの集団とは、単一炭素源としてグリセリンから1, 3 - プロパンジオールを生産するために改変されたクロストリジウム・アセトブチリカムの一以上の株を意味する。前記菌株は当技術分野で公知であり、特に、出願WO 200104324およびWO 2008052595に開示されている。本発明の上記集団は幾つかの菌株の組み合わせでもよく、その大多数は、単一の株と同様、本発明に関する変異体、特に、それぞれ寄託番号 I-4378、I-4379、I-4380としてCNCMに登録されたDG1 pSPD5 PD0001VE05c01、DG1 pSPD5 PD0001VE05c05またはDG1 pSPD5 PD0001VE05c07、若しくは、DG1 pSPD5 PD0001VE05c08株を含む。

30

【0017】

変異は、母株であるDG1 pSPD5 PD0001VTと比較したときに前記株のゲノム中のヌクレオチド、より詳しくはSNPs（「一塩基変異多型（Single Nucleotide Polymorphisms）」）と確認される変化である。前記株はWO 200104324に開示されており、ゲノムシークエンスが公開されているATCC824株に由来する（Nolling et al., 2001）。

【0018】

変異はコーディングまたは非コーディング配列で生じうる。これらの変異は対応するアミノ酸の改変がない場合には同義であり得、また、対応するアミノ酸が変化される場合には非同義であり得る。同義変異は翻訳されたタンパク質の機能に何の影響も及ぼさないが、変異された配列が制御因子の結合部位に位置している場合には、対応する遺伝子や他の遺伝子にさえも、その制御に影響を及ぼす可能性がある。非同義変異は、変異配列の性質に依存した制御と同様、その翻訳されたタンパク質の機能に影響を及ぼしうる。

40

【0019】

1, 3 - プロパンジオールの生産に有用なクロストリジウム・アセトブチリカムの集団は、好ましくは付加的な改変、少なくとも以下の改変を含んでなる：

- 真核性のグルコキナーゼ調節遺伝子（炭水化物代謝）のホモログである、推定糖リン酸イソメラーゼをコードしている、クロストリジウム・アセトブチリカムゲノムの、CA_C0175遺伝子座（locus）、198989位でCがTに置換される

- RNAポリメラーゼシグマ因子RPOD（転写および翻訳制御）をコードしている、クロストリジウム・アセトブチリカムゲノムのCA_C1300遺伝子座、1444099位でGがAに置換される

50

- Glu-tRNA^{Gln}アミドトランスフェラーゼのサブユニットA(転写および翻訳制御)をコードしている、クロストリジウム・アセトブチリカムゲノムのCA_C2670遺伝子座、2787387位でCがTに置換される

- ABCトランスポーター(2つのATPアーゼドメイン)のATPアーゼ成分をコードしている、クロストリジウム・アセトブチリカムゲノムのCA_C3339遺伝子座、3512658位でCがTに置換される

- 分岐鎖アミノ酸パーミアーゼ(トランスポーター)をコードしている、クロストリジウム・アセトブチリカムゲノムのCA_C1610遺伝子座、1752341位でCがTに置換される。

好ましくは、これらの変異体の1、2、3、4または5を含んでなり、これらの変異体の幾つかの組み合わせを含みうる。

本発明の菌株の集団は120g・L⁻¹までのグリセリン、そして特に工業用グリセリンを含んでなる培地で増殖しうる。

【0020】

本発明の集団の菌株はクロストリジウムにおける突然変異生成および/または遺伝置換の標準的な手法で得られ、それは出願WO2008040387に開示されるような手法であって、その内容は引用することにより本明細書の一部とされる。

【0021】

当事者であれば、出願WO200104324およびWO2008052595で開示された菌株の一つから開始し、同様にCNCMにそれぞれ受託番号I-4378、I-4379、I-4380として寄託されたc01、c05またはc07のうちの一つを使用し、さらなる変異体を誘導しうる。

【0022】

好ましい実施形態によれば、本発明の集団は、表1で認識される変異体である、DG1 pSPD5 PD0001VE05c08株を含んでなる。当業者は、CNCMにそれぞれ受託番号I-4378、I-4379、I-4380として寄託されたDG1 pSPD5 PD0001VE05c01、DG1 pSPD5 PD0001VE05c05またはDG1 pSPD5 PD0001VE05c07株の一つから開始し、標準的な遺伝子置換と組換え技術を用いて、DG1 pSPD5 PD0001VE05c08に類似の菌株を作り出すために、クロストリジウム菌株にどのように変異を誘導するか理解する。

【0023】

グリセリンを含んでなる培養培地

「適切な培養培地」または「培養培地」とは、クロストリジウム菌株や集団の増殖およびデオール産生に最適化された培養培地を指す。発酵工程は、一般的に、クロストリジウム種への使用に適合したことが既知の確定した組成の、グリセリンを含有している、合成、特に無機の培養培地を用いて、リアクター中で行われる。

【0024】

「合成培地」との用語は微生物が成長するように化学的に確定した組成を含んでなる培養培地を意味する。本発明の培養培地では、有利には、グリセリンが唯一の炭素源である。

【0025】

「グリセリン」と「グリセロール」の用語は同義であり、本発明においては同一分子を指し相互交換可能に使用される。

特定の実施態様によれば、グリセリンは、少なくとも50%のグリセリン、好ましくは少なくとも85%のグリセリンを含んでなるグリセリン組成物の形で培地に添加される。

【0026】

有利には、本発明の培養培地で使用されるグリセリンは工業用グリセリンである。「工業用グリセリン」は実質的に精製することなく工業過程から得られるグリセリン製品を意味する。工業用グリセリンはまた「粗製グリセリン」とも呼ばれることもある。工業用グリセリンは70%より多い、好ましくは80%より多いグリセリン、水、および無機塩や脂肪酸のような不純物を含んでなる。工業用グリセリンにおけるグリセリンの最大含量は一般的に90%であり、より一般的には約85%である。

10

20

30

40

50

【0027】

工業用グリセリンが得られる工業プロセスは、とりわけ、脂肪および油、特に植物由来の脂肪および油が、洗剤または潤滑剤のような工業製品へと加工される製造方法である。そのような製造方法では、工業用グリセリンは副産物と考えられる。

【0028】

特定の実施態様によれば、工業用グリセリンは、バイオディーゼル製品からの副産物であり、バイオディーゼル製品から得られたグリセリンの既知の不純物を含んでなり、約80～85%のグリセリン、塩、水、および脂肪酸のような幾つかの他の有機化合物を含んでなる。バイオディーゼル生産から得られた工業用グリセリンは、さらなる精製工程に付されていない。

10

【0029】

好ましくは、培養培地は高濃度のグリセリンを含んでなる。

【0030】

「高グリセリン含量」や「高濃度のグリセリン」という用語は、培養培地中のグリセリンが $90 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ より多いことを意味する。好ましい実施態様によれば、上記濃度は、 $90 \sim 200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ の間のグリセリンを含み、より詳しくいうと、 $90 \sim 140 \text{ g} / \text{L}$ の間のグリセリン、好ましくは約 $120 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ のグリセリンである。

【0031】

好ましくは、培養培地は有機窒素を添加していない合成培地である。

【0032】

前記培養培地は当技術分野、特に、2010年5月5日に出願されたPCT/EP2010/056078、2010年10月5日に出願されたPCT/EP2010/064825、で開示されており、その内容は引用することにより本明細書の一部とされる。

20

【0033】

微生物の培養

本発明の方法では、生産はバッチ、流加バッチまたは連続プロセスで有利に行われる。1,3-プロパンジオールの生産のための工業的スケールでの微生物の培養は当技術分野で公知であり、特に、2010年5月5日に出願されたPCT/EP2010/056078、2010年10月5日に出願されたPCT/EP2010/064825で開示されており、その内容は引用することにより本明細書の一部とされる。

30

【0034】

1,3-プロパンジオールの回収

発酵培地から1,3-プロパンジオールを回収し、最終的に精製する方法は当業者に公知である。1,3-プロパンジオールは蒸留により単離されうる。ほとんどの実施態様によれば、1,3-プロパンジオールは発酵培地から酢酸のような副産物と共に蒸留され、そしてさらに公知の方法で精製される。

特に精製方法は出願WO2009/068110およびWO2010/037843で開示されており、その内容は引用することにより本明細書の一部とされる。

【図面の簡単な説明】

【0035】

【図1】集団とクローンc08の、植菌から $D = 0.06 \text{ h}^{-1}$ までのケモスタット培養の間の1,3-プロパンジオールの産生とグリセリンの消費の漸進的变化を示す。

40

【実施例】

【0036】

実施例1 発生した集団からのクローンの単離

クローンの単離はクロストリジウム・アセトブチリカムDG1 pSPD5 PD0001VE05菌集団株の成育フラスコ培養から開始し寒天培地上で行われた。フラスコ培養に使用された合成培地は、脱イオン水1リットル当たり：グリセリン、30g； KH_2PO_4 、0.5g； K_2HPO_4 、0.5g； $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.2g； $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0.01g；酢酸、99.8%、2.2ml； NH_4Cl 、1.65g；MOPS、23.03

50

g、ピオチン、0.16 mg ; p - アミノ安息香酸、32 mg ; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 、0.028 g ; レザズリン、1 mg およびシステイン、0.5 g を含有するものであった。培地の pH は NH_4OH 6 N で 6.5 に調整された。

【0037】

異なる培地が寒天培地での単離のために用いられた：市販のグリセリンまたは粗製グリセリンを含む合成寒天培地（上述と同じもの）と CGM（クロストリジウム成育培地（Clostridial Growth Medium））寒天培地は、脱イオン水 1 リットル当たり：市販または粗製グリセリン、30 g ; 酵母エキス、5 g ; KH_2PO_4 、0.75 ; K_2HPO_4 、0.75 g ; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、0.4 g ; アスパラギン、2 g ; $(NH_4)_2SO_4$ 、2 g ; NaCl、1 g ; $MnSO_4 \cdot H_2O$ 、10 mg ; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 、10 mg ; MOPS、23.03 g ; レザズリン、1 mg およびシステイン、15 g を含有するものである。培地の pH は NH_4OH 3 N で 6.6 に調整された。

10

【0038】

細胞は 4 つの異なる方法でフラスコ培養（表 2）から平板培養された：

- 市販のグリセリンを含む合成培地の寒天平板培養；
- 粗製グリセリンを含む合成培地の寒天平板培養；
- 市販のグリセリンを含む富栄養培地の寒天平板培養；
- 粗製グリセリンを含む富栄養培地の寒天平板培養。

【0039】

単離されたクローンは、寒天平板培地上で 3 回連続の継代培養の後に純粋と考えられた。さらに、純粋なクローンは市販または粗製グリセリンのいずれかを含んだ液体富栄養培地に移された（表 2）。続いて、成育液体培地はさらなる特性解析までグリセリン 20%、80 で保存された。

20

【0040】

クローンは、その後、以下の方法で特徴付けられた：

- 保存後の生存能力の測定：合成培地での成長率の評価；
- 増殖と代謝の評価：培養の間の OD_{620nm} および合成培地における PDO / グリセリン収率の測定
- 遺伝的評価：菌株の遺伝子型の確認のための PCR 解析；
- 単離されたクローンと集団との能力を比較するためのケモスタット培養（実施例 2）；
- クローンの配列解析のための gDNA 抽出（実施例 3）。

例 2）；

30

【0041】

【表 2】

表 2：集団からの 4 クローンの単離のために用いられる合成寒天培地および液体培地

クローン ナンバー	単離用寒天培地	保存前のクローン培養のための液体 培地
c01	市販のグリセリンを含む合成培地	市販のグリセリンを含む富栄養培地
c05	粗製グリセリンを含む富栄養培地	市販のグリセリンを含む富栄養培地
c07	市販のグリセリンを含む合成培地	粗製グリセリンを含む富栄養培地
c08	市販のグリセリンを含む富栄養培地	粗製グリセリンを含む富栄養培地

40

【0042】

実施例 2 粗製グリセリンを高濃度で含むケモスタット培養におけるクローン c08 の性能

微生物の菌株

単離されたクローン C . アセトブチリカム株 DG1 pSPD5 PD0001VE05（菌株は 1 / p S O L

50

1 から保存可能な状態になり、2 / dhaB1、dhaB2 および dhaT 遺伝子、すなわち、1, 3 - プロパンジオール・オペロン、が含まれているプラスミド pSPD5 で形質転換され、そして、3 / 高濃度の粗製グリセリンに移行される)。この単離プロトコールは実施例 1 に記載した。

【0043】

培養培地

クロストリジウムのバッチ培養に用いられる合成培地は、脱イオン水 1 リットル当たり：グリセリン、30 g； KH_2PO_4 、0.5 g； K_2HPO_4 、0.5 g； $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.2 g； $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0.01 g； H_2SO_4 、0.1 ml； NH_4Cl 、1.5 g；ビオチン、0.16 mg；p - アミノ安息香酸、32 mg および $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.028 g を含有するものであった。培地の pH は NH_4OH 3 N で 6.3 に調整された。シグマから購入された市販のグリセリン（純度 99.5%）がバッチ培養に用いられた。

連続培養の添加培地は、水道水 1 リットル当たり：粗製グリセリン、105 g； KH_2PO_4 、0.5 g； K_2HPO_4 、0.5 g； $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.2 g； $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0.026 g； NH_4Cl 、1.5 g；ビオチン、0.16 mg；p - アミノ安息香酸、32 mg； $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.04 g；消泡剤、0.05 ml； $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、8 mg； $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、4 mg； $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、40 mg； H_3BO_3 、2 mg； $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.8 mg を含有するものであった。この場合には培地の pH は調整しなかった。バイオディーゼルのためのエステル交換から得られる粗製グリセリンは、Novance (Venette, France) から供給され、以下の純度を有していた。：グリセリン 84.8% (w/w)。

【0044】

実験設定：

連続培養は 5 l バイオリアクター Tryton (Pierre Guerin, France) で、作業容量 2000 ml で行われた。培養容量は培養レベルの自動制御により 2000 ml で一定に保たれた。培養は 200 RPM で攪拌され、温度は 35 に設定され、 NH_4OH 5.5 N の自動添加により pH は 6.5 に一定に維持された。POR 測定 (mV) は全培養に渡って制御された。嫌気性条件を作り出すために、容器中の滅菌された培地は 60 で 1 時間、滅菌無酸素室素でフラッシュされ、さらに、35 に達するまでフラッシュされた (2 時間の間のフラッシュ)。バイオリアクターのガス出口はピロガロールを準備することにより酸素から保護された (Vasconcelos et al, 1994)。滅菌後、添加培地もまた室温に到達するまで滅菌無酸素室素でフラッシュされ、酸素が入らないように 200 mbar の室素圧下で維持された。

【0045】

バッチおよび連続培養プロセス：

評価のためのプロセスは特許出願 PCT/EP2010/056078 (実施例 2) に記載されている。

合成培地 (上記のバッチ培養培地と同じものに酢酸、 $2.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ および MOPS、 $23.03 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ の添加を行ったもの) において 100 ml フラスコ中で増殖中の培養物で対数増殖期終了時に採取されたものが接種材料 (5% v/v) として用いられた。

培養物はまずバッチ式で増殖された。対数増殖期初期に市販のグリセリンをパルスで行った： $105 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ の粗製グリセリンを添加したパルス合成培地 (バッチ培養で記載されたものと同じもの) が 3 時間の間、静的流速で加えられた (すなわち、 $18 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ のグリセリンの添加)。その後、連続バッチ式増殖を続け、対数増殖期の終了前に希釈率 0.025 h^{-1} での連続的添加が開始した。添加培地は $105 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ の粗製グリセリンを含む。バイオリアクターの接種後 8 - 10 日および 3 滞留時間 (3 residences times) 後、希釈率は様々な段階で 0.025 h^{-1} から 0.060 h^{-1} に増加した：48 時間は 0.01 h^{-1} ユニットの増加 24 時間は変化無し 48 時間 0.01 h^{-1} ユニ

10

20

30

40

50

ット増加 24時間変化無し - 48時間 0.015 h^{-1} ユニット増加。その後、以下に記載されたHPLCプロトコルを用いて培養の安定化の後に1,3-プロパンジオールの生産とグリセリンの消費(図1)が続いた。特に、我々は残留グリセリン濃度が可能な限り低くなるまで待った。

C08クローンの総合的な性能は表3で示され、同一条件下での集団の性能およびGonzalez-Pajuelo et al. (2005)で記載されたようなC. アセトブチリカムDG1 pSPD5 PD0001VT株の性能と比較される。

【0046】

分析手順：

細胞濃度は 620 nm で比濁分析により測定され、直接測定した細胞乾燥重量と関連させた。グリセリン、1,3-プロパンジオール、エタノール、ブタノール、酢酸および酪酸濃度はHPLC分析により測定された。分離はBiorad Aminex HPX-87Hカラムで行われ、検出は屈折率により達成された。操作条件は下記の通りであった：移動相 硫酸 0.5 mM ；流速 0.5 ml/min 、温度、 25 。

【0047】

【表3】

表3：C. アセトブチリカム DG1 pSPD5 集団 PD0001VE05 (4ケモスタットからの平均データ)、クローン c08 PD0001VE05c08 の性能。添加培地は $105 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ の粗製グリセリンを含み、希釈率は 0.060 h^{-1} および 0.025 h^{-1} であった。数値は、 0.060 h^{-1} の希釈率で少なくとも3滞留時間の後に分析されたサンプルの平均に相当する。

	クローン c08 PD0001VE05c08 の平均および標準 偏差	集団 PD0001VE05 の平均および標準偏 差	PD0001VT 株 (Gonzalez-Pajuelo et al. 2005)の平均および 標準偏差
グリセロール供給量 ($\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$)	105.49 +/- 1.07	104.21 +/- 1.36	58.54
1,3-プロパンジオ ール ($\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$)	51.30 +/- 0.54	50.45 +/- 1.00	29.76
$Y_{1,3\text{-PDO}}$ ($\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	0.50 +/- 0.01	0.53 +/- 0.01	0.50
$Q_{1,3\text{PDO}}$ ($\text{q} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	3.05 +/- 0.03	3.18 +/- 0.21	1.49
希釈率 (h^{-1})	0.059 +/- 0.001	0.063 +/- 0.004	0.05
残留グリセロール ($\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$)	3.72 +/- 1.62	4.82 +/- 1.82	0
バイオマス ($\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$)	1.52 +/- 0.55	2.09 +/- 0.15	1.64
酢酸 ($\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$)	2.67 +/- 0.26	2.09 +/- 0.27	NI
酪酸 ($\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$)	10.53 +/- 0.38	10.98 +/- 0.37	NI

$Y_{1,3\text{-PDO}}$: PDO 収率 (g/消費されたグリセロールの g 量)

$Q_{1,3\text{PDO}}$: PDO 体積生産性

NI: 情報がない。PD0001VT 株は酵母エキス欠損培地で成長できなかった。

【0048】

これらの結果はC. アセトブチリカムDG1 pSPD5の適合集団は、Gonzalez-Pajuelo et al. (2005)からの適合されていないC. アセトブチリカムDG1 pSPD5 PD0001VT株に比べ、よ

り高い濃度の工業用グリセリンにおいて増殖でき、従って、より良い力価および工業用グリセリンでのPDOの生産性を示す。

【0049】

実施例 3

ゲノムDNA抽出

PD0001VT、PD0001VE05、PD0001VE05c01、PD0001VE05c05、PD0001VE05c07 およびPD0001VE05c08株からのゲノムDNAはQiagen Genomic kit 500G (Qiagen, Inc., Valencia, CA)を用いて抽出された。簡単には、細胞はペニシリンバイアル(70 mL)で後期対数増殖期(A_{620} 1.5~2.0)まで(実施例1および2に記載されたような)富栄養または合成グリセリン培地でそれぞれ嫌氣的に増殖された。細胞溶解の間を通して厳しい嫌氣的条件が維持された。細胞は回収されSETバッファー(25%スクロース、0.05 M Tris-HCl、0.05 M EDTA)で2回洗浄された。細胞ペレットは11 mLのB1キットバッファーに44 μ LのRNase、30 mg/mLリゾチームおよび100 μ g/mL プロテアーゼKと共に懸濁された。その混合物は37、45分間培養し、遠心分離され、Qiagen DNA purification kitの使用説明書に従い、上清を用いてDNA抽出が行われた。その次に、DNAは50 μ Lの10 mM Tris-HCl (pH 8.0)に懸濁された。

【0050】

シーケンシング解析

天然のDG1 pSPD5 PD0001VT株のゲノムおよび発生した集団DG1 pSPD5 PD0001VE05はRoche GS FLX technologyを用いてシーケンシングされた。シーケンシングプロジェクトはEurofins Genomics MWG/ Operon (ZA de Courtabeuf-9 Avenue de la Laponie, 91978 Les Ulis Cedex)により、各株1毎にロングタグペアエンドライブラリ(Long-Tag paired end libraries) (8 Kb)に行われ、GS FLX Titanium series chemistryを半分の稼働(最高600000読込、最高180000-300000の実際のペアードエンド読込(true paired end reads))させて、配列の生成およびコンティグの足場組み(scaffolding)が行われた。

【0051】

発生した集団から単離されたクローンはNimbleGen (Roche NimbleGen Inc. 500 S. Rosa Rd. Madison WI 53719)により開発された比較ゲノムシーケンシング(comparative genomic sequencing) (CGS)を用いて配列決定された。CGS解析は2段階で行われた: 第1段階、ゲノムの差異のある領域が天然の株と発生したクローンのDNAの比較ハイブリダイゼーションにより同定された。第2段階、ゲノムの差異のある同定された領域だけが、完全に明らかにされた一連の一塩基変異多型(SNPs)を作り出すために配列決定された。

【0052】

SNP解析

発生した集団のバイインフォマティクスおよびSNP解析はEurofins Genomics MWG / Operonにより行われた。この解析のために、両方の株の読み込みセットは別々に、ソフトウェアgsMapper (Roche 454, V2.3)を用いてGenbank 参照配列(Clostridium acetobutylicum ATCC 824 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AE001437>)にマッピングされた。3つのSNPファイルを適用して、ATCC824とDG1 pSPD5 PD0001VT、ATCC824とDG1 pSPD5 PD0001VE05、そしてDG1 pSPD5 PD0001VE05とDG1 pSPD5 PD0001VTの比較を行った。天然と発生した菌株の間の固有のSNPが以下に示すように存在する。低包括度(coverage) (< 25)および低変異頻度(variant frequency) (< 85%)は除かれ、ファミリーグループの注釈のために用いられたKEGGデータベースに従って17ファミリーに分布した160の固有のSNPという結果となった。

【0053】

単離されたクローンのSNP解析はNimbleGen (Roche)によって行われた。SNPファイルは、Genbank参照配列(Clostridium acetobutylicum ATCC 824 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AE001437>)を用い、天然のDG1 pSPD5 PD0001VTと、DG1 pSPD5 PD0001VE05c01、DG1 pSPD5 PD0001VE05c05、DG1 pSPD5 PD0001VE05c07またはDG1 pSPD5 PD0001VE05c08との比

10

20

30

40

50

較に適用された。

【 0 0 5 4 】

配列結果は表 1 に示され、以下の情報を含んでいる：

RefStart	参照配列内のスタート位置で、ここで差異が生じる	
RefNuc	差異位置 (the difference location) での参照ヌクレオチド配列	
VarNuc	差異位置での異なるヌクレオチド配列	
VarFreq	差異位置に完全に及ぶ全読込 (total reads) に対する異なる読込のパーセンテージ	
タイプ	SNPが注釈遺伝子内、または注釈遺伝子間で発見されたか否かのリスト。遺伝子中のSNPはコーディング (coding) として指定される。遺伝子間のSNPは遺伝子間 (intergenic) として指定される。	10
AA 変化	タンパク質のアミノ酸を変化するか否かに基づいてコーディングSNPを分類する。Sは同義的なSNP (アミノ酸変化無し) を意味する。Nは非同義的SNP (アミノ酸変化あり) を意味する。FC (フレームチェンジ) はヌクレオチドの挿入や削除によりタンパク質の翻訳に改変があることを意味する。	
ORIG_AA	SNP部位に対応する参考配列に関連したアミノ酸	
SNP_AA	試験配列に関連したアミノ酸、SNP部位に対応する	
遺伝子座タグ	Genbankからの対応遺伝子の遺伝子座タグ (locus tag)	
機能	Genbankに記載の遺伝子の機能	20
ファミリー	KEGGからの遺伝子のファミリー	

【 0 0 5 5 】

表 1：天然と発生した菌株の間の変異。変異はまず適合集団において確認され、それぞれの変異の存在が単離されたクローンで確認された（最後の4欄：Yは変異が存在することおよびNは不在を示す）

Ref Start	Ref Nuc	Var Nuc	Var Freq	タイプ	AA cha.	YRIG AA	SNP AA	遺伝子座タグ	機能	ファミリー	c01	c05	c07	c08
15594	C	T	>99%	C	N	L	P	CA_C0009	未同定の保存されたタンパク質、B.subtilisのYRXAのオルソログ	仮想タンパク質 (Hypothetical proteins)	Y	Y	Y	Y
21339	G	A	>99%	I					I		Y	Y	Y	Y
25354	G	A	>99%	C	N	G	S	CA_C0017	セリル-tRNA合成酵素	転写翻訳制御	Y	Y	Y	Y
29516	G	A	>99%	C	N	G	D	CA_C0020	MDR-型パーミアーゼ	トランスポーター	Y	Y	Y	Y
31667	C	T	>99%	C	N	A	V	CA_C0021	セリル-tRNA合成酵素 (セリン-tRNAリガーゼ)	転写翻訳制御	Y	Y	Y	Y
35547	G	A	>99%	C	S	R	R	CA_C0024	アクチノバチラス (Actinobacillus) タンパク質(1944168)に関連した、膜タンパク質	膜タンパク質	Y	Y	Y	Y
43029	C	T	>99%	C	N	A	V	CA_C0032	転写調節遺伝子 TetR/AcrR ファミリー	転写翻訳制御	Y	Y	Y	Y
52503	A	G	>99%	C	S	A	A	CA_C0039	DNA 分離 ATPase FisK/SpoIIIE タンパク質、FHA ドメインを含む	細胞分裂	Y	Y	Y	Y
76769	C	T	>99%	C	S	F	F	CA_C0066	ABC トランスポーター、ATP 結合タンパク質	トランスポーター	Y	Y	Y	Y
143022	G	A	>99%	C	S	S	S	CA_C0135	仮想タンパク質、CF-23 ファミリー	仮想タンパク質	Y	Y	Y	Y
198989	C	T	>99%	C	N	T	I	CA_C0175	推定糖リン酸イソメラーゼ、真核性のグルコキナーゼ調節遺伝子のホモログ	炭水化物代謝	Y	Y	Y	Y

【表 4 - 2】

219199	C	T	>99%	C	N	M	I	CA_C0193	未同定の保存された膜タンパク質、LPSの生成に影響を与えている	膜タンパク質	Y	Y	Y	Y
220222	T	C	>99%	C	N	N	S	CA_C0194	細胞壁合成に関与するグリコシルトランスフェラーゼ	炭水化物代謝	Y	Y	Y	Y
265152	G	A	>99%	C	N	G	S	CA_C0234	PTS系、フルクトソシ(fructoso) 特異的 IIBC 成分	炭水化物代謝	Y	Y	Y	Y
286308	G	A	>99%	C	N	A	T	CA_C0256	ニトロゲナーゼ・モリブデン-鉄タンパク質、アルファ鎖 (ニトロゲナーゼ成分) 遺伝子 nifD	エネルギー代謝	Y	Y	Y	Y
347024	G	A	>99%	C	N	A	T	CA_C0291	融合：メチオニン合成酵素 I (コバラミン依存性) および 5, 10-メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素	アミノ酸代謝	Y	Y	Y	Y
364263	A	G	>99%	I						I	Y	Y	Y	Y
454074	G	A	>99%	C	N	E	K	CA_C0390	シスタチオン・ガンマ生成酵素	アミノ酸代謝	Y	Y	Y	Y
541268	C	T	>99%	C	N	T	I	CA_C0471	GrpE タンパク質 HSP-70 補因子	転写翻訳制御	Y	Y	Y	Y
601197	A	G	>99%	I						I	Y	Y	Y	Y
621074	C	T	>99%	C	N	P	L	CA_C0534	ホスホエールピルビン酸塩生成酵素 (pps 遺伝子)	炭水化物代謝	Y	Y	Y	Y
656050	T	C	>99%	C	N	S	P	CA_C0566	リンゴ酸脱水素酵素	エネルギー代謝	Y	Y	Y	Y
668495	A	G	>99%	C	S	I	I	CA_C0578	コバラミン依存性メチオニン合成酵素 I (メチルトランスフェラーゼおよびコバラミン結合ドメイン)	アミノ酸代謝	Y	Y	Y	Y
723431	-	A	>99%	I						I	N	N	N	N
794841	C	T	>99%	C	N	T	I	CA_C0688	1-アシル-sn-グリセリン-3-リン酸アシルトランスフェラーゼ	グリセリン代謝	Y	Y	Y	Y

【 0 0 5 7 】

10

20

30

40

50

【表 4 - 3】

817479	C	T	>99%	C	N	A	V	CA_C0706	エンド-1, 4-ペー グルカナーゼ (2つのリ ン-B-様ドメインに融合)	セルラーゼ	Y	Y	Y	Y
819542	C	T	>99%	C	N	P	L	CA_C0707	RNAポリメラーゼ・シグマ -5 4 因子	転写翻訳制御	Y	Y	Y	Y
951584	A	G	>99%	C	N	I	V	CA_C0823	推定膜タンパク質	膜タンパク質	Y	Y	Y	Y
977563	G	A	>99%	I							Y	Y	Y	Y
978671	C	T	>99%	C	S	C	C	CA_C0850	ニトロ還元酵素ファミリ ータンパク質	エネルギー代謝	Y	Y	Y	Y
991021	T	C	>99%	C	N	V	A	CA_C0861	ABC型多剤輸送系、ATPア ーゼ成分	トランスポーター	Y	Y	Y	Y
991449	G	A	>99%	C	N	G	R	CA_C0861	ABC型多剤輸送系、ATPア ーゼ成分	トランスポーター	Y	Y	Y	Y
1019710	G	A	>99%	C	N	V	.	CA_C0888	ホスフォグリセリシントラン スフェラーゼ MdoB 関連タ ンパク質、アルカリ性ホス ファターゼ・スーパーファ ミリー	グリセリン代謝	Y	Y	Y	Y
1068817	T	C	>99%	C	N	L	S	CA_C0925	TPRリピート含有タンパク 質	仮想タンパク質	Y	Y	Y	Y
1113238	G	A	>99%	C	N	N	S	CA_C0967	おそらく膜タンパク質 (Probably membrane protein)	膜タンパク質	Y	Y	Y	Y
1223725	G	A	>99%	C	N	A	T	CA_C1072	Fe-S酸化還元酵素	エネルギー代謝	Y	Y	Y	Y
1254865	T	A	>99%	C	N	Y	N	CA_C1086	NagC/XylRファミリーの転 写制御遺伝子	転写翻訳制御	Y	Y	Y	Y
1299105	A	G	>99%	C	N	M	T	CA_C1133	フィージ関連タンパク質、 YonE B.subtilis のホモログ	仮想タンパク質	Y	Y	Y	Y
1309504	C	T	>99%	C	N	M	I	CA_C1143	エキソデオキシリボヌクレ アーゼV、アルファユニッ ト、RecD	細胞分裂	Y	Y	Y	Y
1324897	A	G	>99%	C	S	P	P	CA_C1166	仮想タンパク質	仮想タンパク質	Y	Y	Y	Y
1366058	T	A	>99%	C	N	N	K	CA_C1223	DNAポリメラーゼIIIアルフ ア鎖 (dnaE)	転写翻訳制御	Y	Y	Y	Y
1424502	A	G	>99%	C	N	Y	C	CA_C1280	熱ショック遺伝子の転写制 御遺伝子、HrcA	転写翻訳制御	Y	Y	Y	Y

【 0 0 5 8 】

10

20

30

40

50

【表 4 - 4】

1444099	G	A	>99%	C	N	G	R	CA_C1300	RNAポリメラーゼシグマ因子 RPOD	転写翻訳制御	Y	Y	Y
1540446	A	G	>99%	C	S	L	L	CA_C1396	ホスフォリボシルアミン-グリシリンリガーゼ	核酸代謝	Y	Y	Y
1554592	A	G	>99%	C	N	K	R	CA_C1408	ホスフォ-オベーター-グルコシダーゼ	炭水化物代謝	Y	Y	Y
1644651	A	-	>99%	I				I			Y	Y	Y
1770126	A	G	>99%	C	N	I	V	CA_C1628	DNAギラーゼAサブユニット	転写翻訳制御	Y	Y	Y
1778678	G	A	>99%	C	N	A	T	CA_C1636	未同定タンパク質、B. firmus のホモログ(2654481)	仮想タンパク質	Y	Y	Y
1805186	G	A	>99%	C	N	V	I	CA_C1661	推定分泌核酸結合タンパク質	核酸代謝	Y	Y	Y
1821699	G	A	>99%	C	N	A	T	CA_C1673	NADH-依存性グルタメート合成酵素の大サブユニット	エネルギー代謝	Y	Y	Y
1916660	A	G	>99%	C	N	N	S	CA_C1771	未同定タンパク質、ykr1 B.subtilis サブユニット	仮想タンパク質	Y	Y	Y
1948050	C	T	>99%	I				I			Y	Y	Y
2037205	G	A	>99%	C	S	C	C	CA_C1886	未同定ファージ関連タンパク質	仮想タンパク質	Y	Y	Y
2114483	A	G	>99%	C	N	V	A	CA_C2003	推定パーミアアーゼ	トランスポーター	Y	Y	Y
2123888	T	C	>99%	C	S	L	L	CA_C2010	推定 Fe-S 酸化還元酵素	エネルギー代謝	Y	Y	Y
2171503	C	T	>99%	C	N	D	N	CA_C2068	胞子形成因子 spoIIM、未同定膜タンパク質	胞子形成	Y	Y	Y
2231570	C	-	>99%	C	FC			CA_C2137	カチオントランスポーターP型 ATP アーゼ	トランスポーター	N	N	Y
2294764	G	A	>99%	C	N	T	I	CA_C2201	仮想タンパク質	仮想タンパク質	Y	Y	Y
2299326	C	G	>99%	C	N	S	T	CA_C2205	鞭毛フック関連タンパク質 FilD	細胞運動性	Y	Y	Y
2307214	C	T	>99%	C	N	G	R	CA_C2215	鞭毛スウィッチタンパク質 FilY、CheC-様ドメインを含む	細胞運動性	Y	N	Y
2342826	G	C	>99%	C	N	P	A	CA_C2247	部位特異的リコンビナーゼ、DNA インベルターゼ Pin ホモログ	転写翻訳制御	Y	Y	Y

【表 4 - 5】

2392178	C	T	>99%	C	N	V	.	CA_C2288	アシル-タンパク質合成酵素、luxE	脂質代謝	Y	Y	Y	Y
2450006	C	T	>99%	C	S	P	P	CA_C2340	DNA ミスマッチ修復タンパク質 mutS、YSHD B.subtilis オルソログ	転写翻訳制御	Y	Y	Y	Y
2477825	C	T	>99%	C	S	S	S	CA_C2367	推定細胞接着ドメインおよび Chw-リピートを含有する未同定のタンパク質	細胞接着性	Y	Y	Y	Y
2493211	T	C	>99%	C	S	H	H	CA_C2385	仮想タンパク質	仮想タンパク質	Y	Y	Y	Y
2595349	G	A	>99%	C	N	A	V	CA_C2486	転写制御遺伝子、MarR/EmrR ファミリー	転写翻訳制御	Y	Y	Y	Y
2693354	C	T	>99%	C	N	E	K	CA_C2588	グリコシルトランスフェラーゼ	炭水化物代謝	Y	Y	Y	Y
2787387	C	T	>99%	C	N	M	I	CA_C2670	Glu-tRNAGln アミノトランスフェラーゼサブユニット A	転写翻訳制御	Y	Y	Y	Y
2833384	T	C	>99%	C	N	I	V	CA_C2709	電子伝達フラビンタンパク質アルファ-サブユニット	エネルギー代謝	Y	Y	Y	Y
2838979	G	A	>99%	C	N	A	V	CA_C2713	AT リッチ DNA 結合タンパク質	転写翻訳制御	Y	Y	Y	Y
2901642	C	T	>99%	C	N	V	.	CA_C2770	アミノ酸トランスポーター	トランスポーター	Y	Y	Y	Y
2969858	G	A	>99%	C	N	M	I	CA_C2838	推定ヌクレオチド結合タンパク質、YjeE ファミリー	転写翻訳制御	Y	Y	Y	Y
3001642	G	A	>99%	C	S	L	L	CA_C2867	FoF1-型 ATP 合成酵素アルファサブユニット	エネルギー代謝	Y	Y	Y	Y
3032956	T	C	>99%	C	N	H	R	CA_C2898	ステージ II 胞子形成タンパク質 R	胞子形成	Y	Y	Y	Y
3140918	T	C	>99%	I							Y	Y	Y	Y
3174743	G	A	>99%	C	S	D	D	CA_C3032	ガラクトースムタロターゼ関連酵素	炭水化物代謝	Y	N	Y	Y
3251276	G	C	>99%	C	N	T	S	CA_C3099	偽ウリジレート生成酵素、TRUA	核酸代謝	Y	Y	Y	Y
3337937	G	-	>99%	I							N	N	N	N
3392124	G	A	>99%	C	N	G	R	CA_C3242	未同定の Fe-S タンパク質、PIX (ピルビン酸リン酸リアーゼ活性化タンパク質) ホモログ	エネルギー代謝	Y	Y	Y	Y

【 0 0 6 0 】

10

20

30

40

50

【表 4 - 6】

3462380	C	T	>99%	C	S	N	N	N	CA_C3297	D-アラニン-D-アラニンカルボキシペプチダーゼファミリーヒドロラーゼ、YODJ B.subtilis オルソログ	仮想タンパク質	Y	Y	Y	Y
3509372	C	T	>99%	C	S	E	E	E	CA_C3335	短鎖アルコールデヒドロゲナーゼファミリー酵素	エネルギー代謝	Y	Y	Y	Y
3512658	C	T	>99%	C	S	Y	Y	Y	CA_C3339	ABC トランスポーターの ATP アーゼ成分 (2つの ATP アーゼドメイン)	トランスポーター	Y	Y	Y	Y
3518240	T	C	>99%	C	S	Y	Y	Y	CA_C3345	転写制御遺伝子、AcrR ファミリー	転写翻訳制御	Y	Y	Y	Y
3541557	T	C	>99%	C	N	I	I	V	CA_C3363	仮想タンパク質	仮想タンパク質	Y	Y	Y	Y
3565291	C	T	>99%	C	N	T	T	I	CA_C3387	ペクターゼリアーゼ	セルラーゼ	Y	Y	Y	Y
3576865	T	C	>99%	C	N	H	H	R	CA_C3392	NADH 依存性ブタノール脱水素酵素	エネルギー代謝	Y	Y	Y	Y
3583724	C	T	>99%	I								Y	Y	Y	Y
3608511	C	T	>99%	C	S	S	S	S	CA_C3422	糖：プロトン共輸送体 (キシロロースの可能性)	トランスポーター	Y	Y	Y	Y
3614985	C	T	>99%	C	S	K	K	K	CA_C3428	6Fe-6S プリズマシクラスタ一含有タンパク質	エネルギー代謝	Y	Y	Y	Y
3674358	T	C	>99%	I								Y	Y	Y	Y
3707038	T	C	>99%	C	S	L	L	L	CA_C3510	膜関連メチル基受容化学走性タンパク質 (HAMP ドメインと共に)	膜タンパク質	Y	Y	Y	Y
3747653	G	A	>99%	C	N	A	V	V	CA_C3551	Na+ ABC トランスポーター (ATP 結合タンパク質)、NATA	トランスポーター	Y	Y	Y	Y
3821135	C	T	>99%	C	S	N	N	N	CA_C3617	未同定膜タンパク質、YHAG B.subtilis ホモログ	仮想タンパク質	Y	Y	Y	Y
3850220	A	G	>99%	C	N	I	T	T	CA_C3650	HD-GYP ドメイン含有タンパク質	プロテアーゼ/ペプチダーゼ	Y	Y	Y	Y
3921509	C	T	>99%	C	N	V	I	I	CA_C3716	Lon 様 ATP 依存性プロテアーゼ	プロテアーゼ/ペプチダーゼ	Y	Y	Y	Y
239312	G	A	98%	C	N	E	K	K	CA_C0214	エンドグルカナーゼ、アミノペプチダーゼ M42 ファミリー	セルラーゼ	Y	Y	Y	Y

【表 4 - 8】

1717948	G	A	97%	C	N	V	I	CA_C1572	フルクトース-1, 6-ビスホスファターゼ (YYDE B.subtilis オルソログ)	炭水化物代謝	Y	Y	Y	Y
2004797	C	T	97%	C	N	S	N	CA_C1852	マグネシウムおよびコバルト輸送タンパク質	トランスポーター	Y	Y	Y	Y
2134058	G	A	97%	C	S	A	A	CA_C2020	モリブドテリン バイオシニシス (Molybdopterin bioSithesis) 酵素、MoeA、モリブドテリン (molybdopterin) 結合ドメインに融合	エネルギー代謝	Y	Y	Y	Y
2331746	G	A	97%	C	N	G	R	CA_C2237	ADP-グルコース ピロホスホリラーゼ	脂質代謝	Y	Y	Y	Y
2391588	G	A	97%	C	N	P	L	CA_C2288	アシル-タンパク質シターゼ (Sthetase)、luxE	脂質代謝	Y	Y	Y	Y
2452705	C	T	97%	C	N	C	Y	CA_C2341	コラゲナーゼファミリープロテアーゼ	プロテアーゼ/ペプチダーゼ	Y	Y	Y	Y
2739459	T	C	97%	C	N	I	V	CA_C2630	未同定の保存されたタンパク質、YOME B.subtilis オルソログ	仮想タンパク質	Y	Y	Y	Y
2775979	C	T	97%	C	N	A	T	CA_C2660	Pyruvate carboxylase, PYKA ヒルビン酸カルボキシラーゼ、PYKA	炭水化物代謝	Y	Y	Y	Y
2813985	G	-	97%	I				I			N	N	N	N
3082247	C	T	97%	C	N	L	F	CA_C2948	重複 ATP アーゼドメインを有する ABC トランスポーターの ATP アーゼ成分 (第二ドメインは不活性)	トランスポーター	Y	Y	Y	Y
3242900	G	C	97%	C	N	V	L	CA_C3088	NtrC ファミリー転写制御遺伝子、2つの PAS ドメインに融合した ATP アーゼドメイン	転写翻訳制御	Y	N	N	Y
3442855	T	C	97%	C	N	M	V	CA_C3282	ABC 型多剤/タンパク質/脂質輸送システム、ATP アーゼ成分	トランスポーター	Y	Y	Y	Y

【表 4 - 9】

3498584	C	T	97%	C	N	L	F	CA_C3327	アミノ酸ABC型トランスポーター、ATPアーゼ成分	トランスポーター	Y	Y	Y	Y
3643224	G	A	97%	C	S	L	L	CA_C3447	タンパク質-ジスルフィドイソメラゼ DsbC/DsbG	胞子形成	Y	Y	Y	Y
3663477	-	T	97%	C	FC			CA_C3464	未定の保存されたタンパク質 (断片)	仮想タンパク質	N	N	N	N
204202	G	A	96%	C	N	G	E	CA_C0180	オリゴペプチドABCトランスポーター、ATP結合タンパク質	トランスポーター	Y	Y	Y	Y
803682	C	T	96%	C	N	T	I	CA_C0695	アルトロナート (Altronate) 酸化還元酵素	炭水化物代謝	Y	Y	Y	Y
892875	G	A	96%	C	N	M	I	CA_C0770	グリセリン取り込み促進タンパク質、パーミアアーゼ	グリセリン代謝	Y	Y	Y	Y
1009389	C	T	96%	C	N	P	S	CA_C0879	ABC型極性アミノ酸輸送システム、ATPアーゼ成分	トランスポーター	Y	Y	Y	Y
1690355	C	T	96%	C	S	G	G	CA_C1546	ピリジン-ヌクレオシドホスホリラーゼ	核酸代謝	Y	Y	Y	Y
1752341	C	T	96%	C	N	G	R	CA_C1610	分岐鎖アミノ酸パーミアアーゼ	トランスポーター	Y	Y	Y	Y
3217481	A	C	96%	C	S	L	L	CA_C3067	推定膜タンパク質	膜タンパク質	Y	Y	Y	Y
3238489	T	C	96%	C	S	S	S	CA_C3086	細胞接着ドメイン含有タンパク質	細胞接着性	Y	Y	Y	Y
447460	A	-	95%	I							N	N	N	N
670931	G	A	95%	C	S	N	N	CA_C0578	コバラミン依存性メチオニン合成酵素I (メチルトランスフェラーゼおよびコバラミン結合ドメイン)	アミノ酸代謝	N	Y		Y
994575	G	A	95%	C	N	A	T	CA_C0864	ヒスチジンキナーゼ様ATPアーゼ	転写翻訳制御	Y	Y	Y	Y
3657101	A	-	95%	C	FC			CA_C3459	細胞分裂GTPアーゼFtsZのホモログ、分岐	細胞分裂	N	N	N	N
1142263	T	-	94%	C	FC			CA_C0995	推定膜タンパク質	膜タンパク質	N	N	N	N
1823156	G	A	94%	C	S	E	E	CA_C1674	NADPH依存性ルタメート合成酵素の小ユニット	アミノ酸代謝	Y	Y	Y	Y
1989117	C	T	94%	C	N	R	K	CA_C1837	ミスマッチ修復タンパク質 MutS、ATPアーゼ	転写翻訳制御	Y	Y	Y	Y

【表 4 - 1 0】

3481651	G	A	94%	C	S	S	S	CA_C3311	グリコシルトランスフェラーゼに融合したTPR-リポータードメイン	炭水化物代謝	Y	Y	Y	Y
126942	G	A	93%	C	N	E	K	CA_C0116	一酸化炭素脱水素酵素、ペー タ鎖	エネルギー代謝	Y	Y	Y	Y
302716	-	T	93%	C	FC			CA_C0270	仮想タンパク質	仮想タンパク質	N	N	N	N
2551103	G	A	93%	C	S	S	S	CA_C2434	HAMP ドメインを有する膜 関連ヒスチジンキナーゼ	転写翻訳制御	Y	N	Y	Y
1834077	C	T	92%	C	N	S	L	CA_C1684	TYPA/BIPA 型GTPアーゼ	エネルギー代謝	Y	Y	Y	Y
3927304	G	A	92%	I							Y	N	Y	N
786649	-	T	91%	C	FC			CA_C0680	推定膜タンパク質	膜タンパク質	N	N	N	N
2640439	C	T	91%	C	N	E	K	CA_C2532	ChW-リポーター含有タンパク 質	細胞接着性	Y	Y	Y	Y
3601904	A	-	91%	C	FC			CA_C3415	ABC-型多剤/タンパク質/ 脂質輸送システム、ATPア ーゼ成分	トランスポーター	N	N	N	N
838350	A	-	89%	C	FC			CA_C0723	転写制御遺伝子、AcrR フア ミリー	転写翻訳制御	N	N	N	N
3721023	G	A	89%	C	S	S	S	CA_C3523	仮想タンパク質、CF-7 フア ミリー	仮想タンパク質	Y	Y	Y	Y
803924	G	A	88%	C	N	A	T	CA_C0695	アルトロナート酸化還元酵素	炭水化物代謝	Y	Y	Y	Y
3478420	C	T	87%	C	N	G	E	CA_C3309	推定膜タンパク質	膜タンパク質	N	Y	N	Y
3853836	T	C	87%	C	N	N	D	CA_C3652	アセト乳酸合成酵素	アミノ酸代謝	Y	Y	Y	Y
244464	C	T	86%	C	N	S	L	CA_C0220	仮想タンパク質	仮想タンパク質	Y	Y	Y	Y
899104	G	A	86%	C	N	M	I	CA_C0776	NCAIR ムターゼ (PurE) - 関連タンパク質	核酸代謝	Y	N	Y	N
658665	T	-	85%	C	FC			CA_C0569	SACPA オペロン抗集結遺伝 子 (SacT)	転写翻訳制御	N	N	N	N

参考文献

1. Gonzalez-Pajuelo M, Meynial-Salles I, Mendes F, Andrade JC, Vasconcelos I, and Soucaille P. 2005. Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* for the industrial production of 1,3-propanediol from glycerol. *Metabolic Engineering* 7: 329-336.
2. Gonzalez-Pajuelo M, Meynial-Salles I, Mendes F, Soucaille P. and Vasconcelos I. 2006. Microbial conversion of a natural producer, *Clostridium butyricum* VPI 3266, and an engineered strain, *Clostridium acetobutylicum* DG (pSPD5). *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 96-101.
3. Nolling J, Breton G, Omelchenko MV, Makarova KS, Zeng Q, Gibson R, Lee HM, Dubois J, Qiu D, Hitti J, Wolf YI, Tatusov RL, Sabathe F, Doucette-Stamm L, Soucaille P, Daly MJ, Bennett GN, Koonin EV, Smith DR. 2001. Genome sequence and comparative analysis of the solvent-producing bacterium *Clostridium acetobutylicum*. *Journal of bacteriology* 183(16):4823 - 4838 10
4. Papanikolaou S, Ruiz-Sanchez P, Pariset B, Blanchard F and Fick M. 2000. High production of 1,3-propanediol from industrial glycerol by a newly isolated *Clostridium butyricum* strain. *Journal of Biotechnology*. 77: 191-208.
5. Vasconcelos I, Girbal L, Soucaille P. 1994. Regulation of carbon and electron flow in *Clostridium acetobutylicum* grown in chemostat culture at neutral pH on mixtures of glucose and glycerol. *Journal of bacteriology*. 176(5): 1443-1450. 20

【 0 0 6 6 】

359692WO 2012/062832

24

PCT/EP2011/069789

PCT

* RO/EP

プリントアウト（原本は電子形式である）
 （このシートは国際出願の一部でなく、国際出願のシートとしてカウントされない）

0-1	様式PCT RO.134 (SAFE) この寄託された微生物又は他の生物材料に関する表示 (PCT規則13の2) は 右記によって作成された	PCT オンライン出願 Version 3.5.000.225 MT/FOP 20020701/0.20.5.20
0-2	国際出願番号	
0-3	出願人又は代理人の書類番号	359692D29153
1	下記の表示は発明の詳細な説明中に記載された微生物又は他の生物材料に関連している。	
1-1	頁	3
1-2	行	11-12
1-3	受託の表示	
1-3.1	受託機関の名称	CNCM 国立微生物カルチャーコレクション
1-3.2	受託機関のあて名	フランス国 75724、パリ、セデ、15、リュ、デュ、ドクトゥール、ルー、28 パスツール研究所
1-3.3	受託の日付	2010年 10月 27日 (27.10.2010)
1-3.4	受託番号	CNCM I-4378
1-5	この表示を行うための指定国	すべての指定国
2	下記の表示は発明の詳細な説明中に記載された微生物又は他の生物材料に関連している。	
2-1	頁	3
2-2	行	13-14
2-3	受託の表示	
2-3.1	受託機関の名称	CNCM 国立微生物カルチャーコレクション
2-3.2	受託機関のあて名	フランス国 75724、パリ、セデ、15、リュ、デュ、ドクトゥール、ルー、28 パスツール研究所
2-3.3	受託の日付	2010年 10月 27日 (27.10.2010)
2-3.4	受託番号	CNCM I-4379
2-5	この表示を行うための指定国	すべての指定国

10

20

30

359692WO 2012/062832

25

PCT/EP2011/069789

PCT

* RO/EP

プリントアウト (原本は電子形式である)
(このシートは国際出願の一部でなく、国際出願のシートとしてカウントされない)

3	下記の表示は発明の詳細な説明中に記載された微生物又は他の生物材料に関連している。	
3-1	頁	3
3-2	行	15-16
3-3	受託の表示	
3-3-1	受託機関の名称	CNCM 国立微生物カルチャーコレクション
3-3-2	受託機関のあて名	フランス国 75724、パリ、セデ、15、リュ、デュ、ドクトゥール、ルー、28 パスツール研究所
3-3-3	受託の日付	2010年 10月 27日 (27.10.2010)
3-3-4	受託番号	CNCM I-4380
3-5	この表示を行うための指定国	すべての指定国

10

受理官庁記入欄

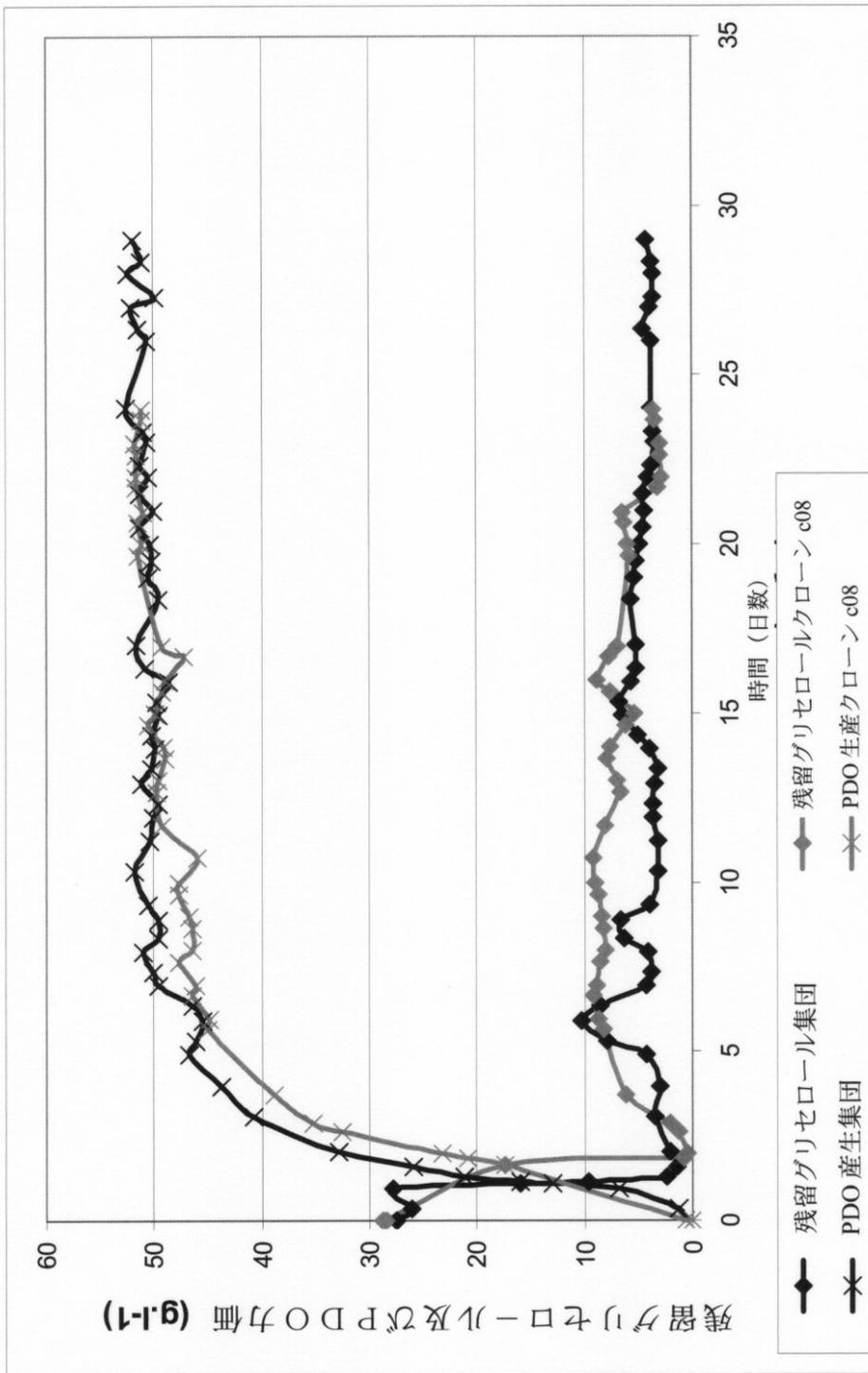
0-4	この用紙は国際出願とともに受理した (はい/いいえ)	はい
0-4-1	権限のある職員	ワレンチン、マルコ

20

国際事務局記入欄

0-5	この用紙が国際事務局に受理された日	
0-5-1	権限のある職員	

【 図 1 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2011/069789

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12P7/18 C12N1/32 C07K14/33 C12R1/145 ADD.		
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) C12P C12N C07K C12R		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GONZÁLEZ-PAJUELO MMEYNIAL-SALLESMENDES FANDRADE JCVASCONCELOSSOUCAILLE P: "Metabolic engineering of Clostridium acetobutylicum for the industrial production of 1,3-propanediol from glycerol", METABOLIC ENGINEERING, vol. 7, 20 May 2001 (2001-05-20), pages 329-336, XP005207140, cited in the application abstract ----- -/--	1-9
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of Box C.	<input 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 document 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		Date of mailing of the international search report
30 January 2012		07/02/2012
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer van Voorst, Frank

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2011/069789

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>CELINSKA ET AL: "Debottlenecking the 1,3-propanediol pathway by metabolic engineering", BIOTECHNOLOGY ADVANCES, ELSEVIER PUBLISHING, BARKING, GB, vol. 28, no. 4, 1 July 2010 (2010-07-01), pages 519-530, XP027048562, ISSN: 0734-9750 [retrieved on 2010-05-13] the whole document -----</p>	1-9

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
	C 1 2 R 1:145	
	C 1 2 R 1:145	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, T
J, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, R
O, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA,
BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, H
U, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI
, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN

Fターム(参考) 4B064 AC02 AF02 CA02 CB07 CC03 CD30 DA16
4B065 AA23X AC14 BB31 CA54