(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 9 月 21 日(21.09.2017)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2017/159499 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) *C12N 1/20* (2006.01)
A01H 5/10 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2017/009268

(22) 国際出願日: 2017 年 3 月 8 日(08.03.2017)

(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 2016-052879 2016 年 3 月 16 日(16.03.2016) JP

(71) 出願人: 国立大学法人広島大学(**HIROSHIMA UNIVERSITY**) [JP/JP]; 〒7398511 広島県東広島市鏡山１丁目３番２号 Hiroshima (JP).

(72) 発明者: 上田　晃弘(**UEDA Akihiro**); 〒7398528 広島県東広島市鏡山一丁目４番４号　国立大学法人広島大学大学院生物圏科学研究科内 Hiroshima (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人前田特許事務所(**MAEDA & PARTNERS**); 〒5300004 大阪府大阪市北区堂島浜１丁目２番１号　新ダイビル２３階 Osaka (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, 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, JP, KE, KG, KH, 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.

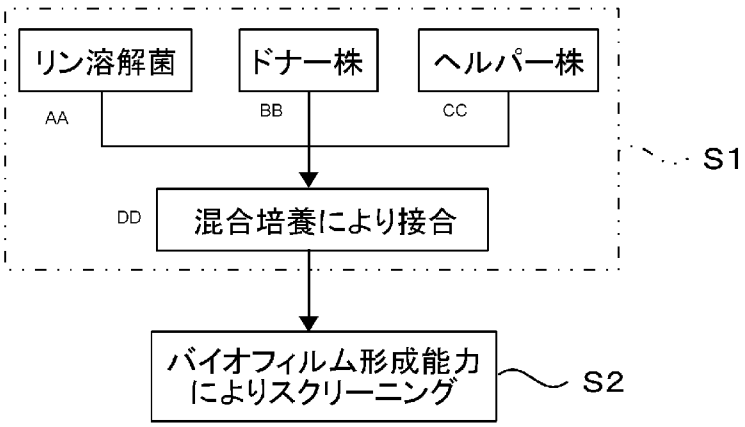
(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR),

[続葉有]

(54) **Title**: NOVEL MICROORGANISM AND METHOD FOR CONSTRUCTING SAME

(54) 発明の名称 : 新規微生物及びその作成方法

[図1]



AA Phosphorus-dissolving bacterium
BB Donor strain
CC Helper strain
DD Conjugation by mixed cultivation
S2 Screening depending on biofilm formation ability

(57) **Abstract**: A novel microorganism, which is a phosphorus-dissolving bacterium belonging to the genus *Pseudomonas* and decomposing a hardly soluble phosphorus compound into phosphoric acid, is a mutant defective in the function of PP_4484 protein.

(57) 要約: 新規微生物は、難溶性リン化合物をリン酸へ分解する Pseudomonas 属のリン溶解菌であり、PP_4484 タンパク質の機能を欠失した変異体である。

WO 2017/159499 A1

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)）

明　細　書

発明の名称 ： 新規微生物及びその作成方法

技術分野

[0001] 本開示は、新規微生物及びその作成方法等に関する。

背景技術

[0002] 作物生産においては、多量の化学肥料が用いられている。しかし、近年、多量の化学肥料を用いることによる問題が数多く指摘されており、化学肥料以外の肥料が求められている。

[0003] 化学肥料以外の肥料として、バイオ肥料が注目されている。バイオ肥料とは、生きた有用微生物を含有し、植物の根圏や根の内部で有用微生物を増殖させることにより、宿主植物に栄養分を供給したり、土壌中の栄養分の利用効率を向上させたりすることにより、植物の生育を促進するものである。

[0004] 植物に栄養分を供給する有用微生物として根粒菌が知られているが、マメ科植物以外では、根粒菌の利用は困難である。他の有用微生物として、アーバスキューラー菌根菌等の菌根を形成するが菌類が知られている。アーバスキューラー菌根菌を植物と共生させることにより、植物の栄養摂取効率及び水分摂取効率等を向上させ、生産量を向上させることが検討されている（例えば、特許文献１を参照。）この他、バチルス属の微生物を用いることも検討されている（例えば、特許文献２を参照。）。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特表２００８－５２２９３２号公報

特許文献2：特開２０１５－１１３３７４号公報

特許文献3：特開２００６－０１６３８６号公報

特許文献4：特開２００４－２２２５５１号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] しかしながら、従来のバイオ肥料には以下のような問題がある。バイオ肥料である有用微生物は、直接土壌中に散布したり、植物の根又は種子等に接種したりして用いられている。一般的に土壌中には多数の微生物が存在しているため、外部から有用微生物を移入したとしても、土壌中の既存の微生物との競合により、移入した有用微生物の定着や増殖は抑制される。このため、従来のバイオ肥料は十分な効果を発揮できていない。

[0007] 有用微生物の土壌中での定着率を向上させることを目的として、有機キャリアを使用することが検討されている（例えば、特許文献３を参照。）。また、微生物の着生率を向上させることを目的として、植物に電子線照射を行うことが検討されている（例えば、特許文献４を参照。）。しかし、これらの方法も土壌中における既存の微生物との競合を抑え、バイオ肥料としての効果を増大させる効果は十分ではなく、バイオ肥料として優れた特性を有する新規の微生物が求められている。

[0008] 本開示の課題は、バイオ肥料として優れた特性を有する新規微生物及びその作成方法を実現できるようにすることである。

課題を解決するための手段

[0009] 本開示の新規微生物の第１の態様は、難溶性リン化合物をリン酸へ分解するPseudomonas属のリン溶解菌であり、PP_4484タンパク質の機能を欠失した変異体である。

[0010] 本開示の新規微生物の第１の態様において、変異体はトランスポゾン変異体とすることができる。

[0011] 本開示の新規微生物の第２の態様は、難溶性リン化合物をリン酸へ分解するリン溶解菌であり、バイオフィルム作成能力を有するPseudomonas sp.ＭＴ－５株（受託番号 NITE BP-02215）である。

[0012] 本開示の種子の一態様は、本開示の新規微生物を含むバイオフィルムが表面に付着している。

[0013] 本開示の新規微生物の作成方法の一態様は、難溶性リン化合物のリン酸へ分解するPseudomonas属のリン溶解菌に、変異を導入して、変異株を得る工程

と、変異株のうち、バイオフィルム形成能力が野生株よりも高い株をスクリーニングする工程とを備えている。

[0014] 本開示の新規微生物の作成方法の一態様は、スクリーニングする工程において、PP_4484タンパク質の機能が欠失した株を選択するようにできる。

[0015] 新規微生物の作成方法の一態様において、リン溶解菌は、Pseudomonas putidaとすることができる。

[0016] 新規微生物の作成方法の一態様において、リン溶解菌は、Pseudomonas sp. Ｐ－４５１株（受託番号 NITE BP-02205）とすることができる。

[0017] 新規微生物の作成方法の一態様は、変異を導入する工程において、トランスポゾンドナーとしてE.coli MC4100/pMAR2xT7を用い、トランスポゾンヘルパーとしてE.coli HB101/pRK2013を用いて、トランスポゾン変異を導入することができる。

[0018] 本開示の種子の作成方法の一態様は、本開示の新規微生物の作成方法により作成した新規微生物を種子と共に、２０℃以上、３５℃以下の温度で培養して、種子の表面にバイオフィルムを形成させる。

発明の効果

[0019] 本開示によれば、バイオ肥料として優れた特性を有する新規微生物及びその作成方法を実現できる。

図面の簡単な説明

[0020] [図1]図１は一実施形態に係る新規微生物の作成方法を示すフローチャートである。

[図2]図２はバイオフィルムの形成状態を示す写真である。

[図3]図３はバイオフィルムの形成状態を示す写真である。

[図4]図４は培養液中のリン酸濃度の変化を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0021] リン酸は植物の生育に必要な必須栄養素であり、肥料として土壌に大量に供給されている。しかし、リンは土壌中において金属イオン等と容易に結合して、植物が直接利用できない難溶性の化合物に変化するため、肥料として

供給されたリンの利用効率は高くない。リン溶解菌は、リン酸カルシウム等の難溶性のリン化合物を、植物が利用できるリン酸の状態に分解できる。このため、リン溶解菌を植物の根圏に着生させ、土壌中の難溶性のリン化合物を分解させることができれば、リンの利用効率を向上させることができる。しかし、リン溶解菌は、直接土壌に散布したり、植物の根に接種したりしても、土壌中に存在する土着の微生物と競合するため、すぐに死滅してしまう。これは、リン溶解菌に限らず他の有用微生物においても同様である。

[0022] 一般に細菌等の微生物は、自らを保護するためにバイオフィルムを形成する。バイオフィルムは、微生物自身と、微生物が生成する細胞外多糖との複合体であり、バイオフィルム内には微生物の生存に適した環境が構築される。このため、リン溶解菌等の有用微生物にバイオフィルムを形成させることにより、土壌中における着生及び増殖を促進できると考えられる。しかし、バイオフィルムは衛生上の問題としてその形成を抑制することについては種々の研究が行われているが、その形成を促進することについての研究はほとんどない。

[0023] 一般に、微生物の絶対数を増やすことにより、バイオフィルムの形成を活発化させることができるが、既存の微生物との競合が生じている状態においては、微生物の絶対数が少ない状態において、十分なバイオフィルムの形成が行われることが重要である。また、バイオフィルムの形成に必要な成分の供給量を増やすことも考えられるが、既存の微生物との競合が生じている状態においては、既存の微生物の活動も活発化されるため、競合状態を解消することができない。

[0024] 本発明者らは、リン溶解菌等の有用微生物にトランスポゾン変異を導入することにより、バイオフィルム形成能力が大幅に増大した変異体が得られることを見出した。バイオフィルム形成能力が高い変異体を用いることにより、種子表面等への有用微生物の付着量を向上でき、土壌中における有用微生物の生存率が向上することを見出した。

[0025] 本実施形態の変異体は、以下のようにして作成することができる。図１に

示すように、まず、工程Ｓ１において、リン溶解菌と、ドナー株と、ヘルパー株とを混合培養することにより、接合させ、トランスポゾン変異を導入した変異体を得る。次に、工程Ｓ２において、変異体をスクリーニングして、バイオフィルム形成能力が高い変異体を選択する。

[0026] トランスポゾン変異を導入する宿主は、Pseudomonas属のリン溶解菌を用いることができ、例えば、本発明者らが単離した、Pseudomonas sp. Ｐ－４５１（以下Ｐ－４５１という。）を用いることができる。Ｐ－４５１は、独立行政法人製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センター（ＮＰＭＤ：住所：〒292-0818 日本国千葉県木更津市かずさ鎌足２－５－８、１２０号室）に、Ｐ－４５１（受託番号 NITE P-02205）として２０１６年２月１９日に寄託され、２０１７年２月２７日にブダペスト条約に基づく国際寄託へ移管申請され、移管後の受託番号はNITE BP-02205である。Ｐ－４５１は、難溶性のリン化合物を可溶化する能力が高いリン溶解菌である。Ｐ－４５１は、土壌中から単離された菌であり、16S rRNAの部分配列同定の結果から、Pseudomonas putidaと推定される。ドナー株には、例えばE.coli MC4100/pMAR2xT7を用いることができ、ヘルパー株には、例えばE.coli HB101/pRK2013を用いることができる。

[0027] 接合は、宿主と、ドナー株と、ヘルパー株とを混合して、寒天培地に接種し、培養することにより行うことができる。接合を行う際には、宿主と、ドナー株と、ヘルパー株とをそれぞれ液体培養した後、３種類の菌を混合して混合菌溶液を作成し、これを寒天培地に接種することが好ましい。このようにすれば、３種類の菌のそれぞれについて、必要量を満たすことが容易にできる。液体培養の培地には、それぞれの耐性抗生物質を添加することが好ましい。このようにすれば、菌の純度を確保することができる。

[0028] 次に、回収した寒天培地上の菌を、宿主の耐性抗生物質とドナー株の耐性抗生物質とを含む培地により培養することにより、接合によりトランスポゾン変異が導入された変異体を得ることができる。

[0029] なお、Ｐ－４５１の耐性抗生物質としてクロラムフェニコールを用いるこ

とができ、E.coli MC4100/pMAR2xT7の耐性抗生物質としてゲンタマイシンを用いることができ、E.coli HB101/pRK2013の耐性抗生物質としてカナマイシンを用いることができる。

[0030] 変異体のバイオフィルム形成能力は、菌を液体培地により培養した後、培養容器に付着したバイオフィルムの量を定量することにより評価することができる。液体培地はＮａＣｌを添加していない培地とすることが好ましい。培養は、２５℃以上、３０℃以下の温度で、２４時間以上、７２時間以下とすることが好ましい。正確な評価をする観点から、培養は静置培養とすることが好ましい。バイオフィルムの定量は、実施例において示すクリスタルバイオレットによる染色法を用いることができる。

[0031] バイオフィルム形成能力が高い変異体として、トランスポゾン変異を導入していない野生株と比べて、５倍以上のバオフィルム形成能力を有する変異株が好ましく、１０倍以上の変異株がより好ましい。また、難溶性リン化合物の可溶化能力が野生株以上であるものが好ましく、野生株よりも高いものがより好ましい。難溶性リン化合物の可溶化能力が野生株以上で、バイオフィルム形成能力が向上した変異株として、ＡＢＣトランスポータであるPP_4484タンパク質の機能が欠失した株が好ましい。中でも、Pseudomonas sp. ＭＴ－５（以下ＭＴ－５という。）が好ましい。ＭＴ－５は、独立行政法人製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センター（ＮＰＭＤ：住所：〒292-0818 日本国千葉県木更津市かずさ鎌足２－５－８、１２０号室）に、ＭＴ－５（受託番号 NITE P-02215）として２０１６年３月３日に寄託され、２０１７年２月２７日にブダペスト条約に基づく国際寄託へ移管申請され、移管後の受託番号はNITE BP-02215である。なお、難溶性リン化合物の可溶化能力は、実施例に記載した方法により評価することができる。

[0032] 本実施形態の変異体を付着させる植物は、特に限定されず、穀物、野菜、花卉及び果樹等のいずれであってもよい。変異体が分解により産生したリン酸は、根から吸収されるため、変異体はバイオフィルムを形成した状態で植物の根に付着させるようにすることが好ましい。また、種子の表面に本実施

形態の変異体を含むバイオフィルムを付着させておくことにより、発根した根に変異体を拡がらせることができる。

[0033] 本実施形態の変異体含むバイオフィルムは、例えば、変異体を種子等と共に培養することにより容易に植物の表面に付着させることができる。また、変異体を培養してバイオフィルムを形成させた培養液中に植物を浸漬したり、この培養液を植物の表面に塗布又は噴霧したりすることにより行うことができる。

[0034] 本実施形態の変異体を含むバイオフィルムを付着させた種子を土壌中に埋めることにより、種子の周りに高密度で存在する変異体が、種子の周りの土壌中のリン酸カルシウム等の難溶性リン化合物をリン酸に分解する。さらに、発根すると、根の周りにもバイオフィルムが拡がる。変異体が生成したリン酸は、栄養素として植物に吸収されるため、植物の生育を促進できる。また、変異体はバイオフィルムの状態となって存在しており、土壌中の既存の微生物に対して有利な生存条件が構築されているため、土壌中に定着しやすく、バイオ肥料として高い効果を発揮することができる。

[0035] 本実施形態において、トランスポゾン変異を用いて変異体を得る方法を示した。しかし、例えばゲノム編集技術を用いて遺伝子を欠失させることにより変異体を得ることもできる。ゲノム編集は、例えばＴＡＬＥＮ（TALE Nuclease）やＺＦＮ（Zinc Finger Nuclease）等のＤＮＡ結合ドメインとＤＮＡ切断ドメインからなるヌクレアーゼサブユニットを複数含むポリペプチドを用いて行うことができる。また、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステム等のＲＮＡ誘導型ヌクレアーゼを用いて行うこともできる。

[0036] 本発明は、上記の実施形態に限定されるものではなく、本発明の技術的思想の範囲内で、種々変更して実施することができる。以下に、本発明について実施例を用いてさらに詳細に説明する。これらの実施例は例示であり、本発明は以下の実施例に限定されない。

実施例

[0037] （１）使用菌株

宿主として、自然環境中から単離したリン溶解菌Ｐ－４５１（受託番号 NITE BP-02205）を用いた。トランスポゾン変異のドナー株としてE.coli MC4100/pMAR2xT7を用いた。ヘルパー株として、E.coli HB101/pRK2013を用いた。ドナー株及びヘルパー株はDepartment of Molecular Biology, Massachusetts General Hospital (185 Cambridge St., CPZN7250 Boston, MA 02114)より分譲された。

[0038] （２）使用培地

寒天培地にはLuria-Bertini(以下、ＬＢという。）寒天培地を用い、液体培養培地にはＬＢ液体培地を用いた。ＬＢ寒天培地の組成は、ポリペプトンを１０ｇ／Ｌ、酵母エキスを５ｇ／Ｌ、ＮａＣｌを１０ｇ／Ｌ、寒天を１５ｇ／Ｌとした。ＬＢ液体培地は、ポリペプトンを１０ｇ／Ｌ、酵母エキスを５ｇ／Ｌ、ＮａＣｌを１０ｇ／Ｌとした。

[0039] バイオフィルム形成能力の評価試験には、ＮａＣｌのバイオフィルムへの影響を除くためにＬＢ培地からＮａＣｌを取り除いたＬＢ（－ＮａＣｌ）培地を使用した。

[0040] なお、以下の実施例において使用した培地及び器具類は全て滅菌処理して用いた。

[0041] （３）トランスポゾン変異の導入

－８０℃の超低温冷凍庫内で保存した菌株をＬＢ寒天培地に植菌し、インキュベーター（アズワン社製、ETTAS EI-600B）を用いて２８℃で一晩培養した。その後、ＬＢ寒天培地から滅菌した爪楊枝でシングルコロニーをかき取り、１０ｍＬのＬＢ液体培地の入った５０ｍＬ三角フラスコに直接移し、バイオシェーカー（タイテック社製、BR-40LF）を用いて２８℃、１１５ｒｐｍ、１６～１８時間の条件下で振とう培養を行った。培養は、それぞれの菌株の耐性抗生物質を添加した条件で行うことができる。

[0042] Ｐ－４５１、E.coli MC4100/pMAR2xT7、及びE.coli HB101/pRK2013の培養液を１．０ｍＬずつ、それぞれ１．５ｍＬマイクロチューブに移し、遠心分離機（ＫＵＢＯＴＡ社製、３７００）を用いて、２０，０００ｇで、１分間

、室温にて遠心した。遠心後、上澄みを捨て、各チューブに滅菌した蒸留水を加えて懸濁し、再び遠心機にかけた。その後、もう一度上澄みを取り除き、１ｍＬの滅菌蒸留水で３つのチューブを懸濁した。その懸濁液をＬＢ寒天培地に接種し、インキュベーターで２８℃、一晩培養し、接合を行った。

[0043] 培養後、滅菌したスプレッダーを用いてＬＢ寒天培地上の菌体を回収し、滅菌蒸留水１０ｍＬに懸濁した。回収した菌体の懸濁液を１００～１，０００倍に希釈し、１００μＬをＬＢ寒天培地に接種した。ＬＢ寒天培地には、Ｐ－４５１の耐性抗生物質であるクロラムフェニコール及びドナー株の耐性抗生物質であるゲンタマイシンを、それぞれ２０μｇ／ｍＬ及び９０μｇ／ｍＬとなるように添加した。これをインキュベーターで２８℃、一晩培養した。これにより、約１２００種類の変異体株が得られた。このうちの１０個の変異体株をトランスポゾン変異を導入した変異体ＭＴ－１からＭＴ－１０として選択して次の実験に用いた。

[0044] （４）バイオフィルム形成能力の評価

（３）において得られた変異体のバイオフィルム形成能力を評価し、バイオフィルム形成能力が高い変異体を選択した。バイオフィルム形成能力の測定には、９６穴のポリエチレンテレフタラート製マイクロプレートを用いた。ＮａＣｌを除いたＬＢ液体培地（ＬＢ（－ＮａＣｌ）液体培地）を１ウェルに１５０μＬずつ入れ、（３）において得られた変異体のコロニーを滅菌爪楊枝でかき取り、マイクロプレートのウェルに懸濁した。マイクロプレートに懸濁する際に、マスタープレートにも植菌を行った。マスタープレートは、２０μｇ／ｍＬのクロラムフェニコールと９０μｇ／ｍＬのゲンタマイシンとを含むＬＢ寒天培地とした。マイクロプレートには変異体のウェルだけではなく、変異体との対照区として野生株Ｐ－４５１のウェルと、バックグラウンド補正用の何も接種しないＬＢ（－ＮａＣｌ）液体培地のみのウェルとを設けた。なお、ＭＴ－９及びＭＴ－１０については、１／５濃度のＬＢ（－ＮａＣｌ）液体培地を用いた。

[0045] マイクロプレートをインキュベーターを用いて２８℃で、２４時間培養し

た。培養後に６２０ｎｍにおける吸光度（ＯＤ$_{620}$値）を測定した。ＯＤ$_{620}$値を測定する際には、ＬＢ（－ＮａＣｌ）液体培地の値をブランクとしてバックグラウンド補正を行った。各変異体のＯＤ$_{620}$値を、対照区である野生株のＯＤ$_{620}$値を１として規格化した値を、各変異体の浮遊菌量とした。

[0046] この後、マイクロプレートの培地を取り除き、水道水で３回洗浄した。その後、０．１％（ｗ／ｖ）クリスタルバイオレット水溶液を各ウェルに２００μＬずつ加え、室温で３０分間静置して、ウェル内に付着したバイオフィルムの染色を行った。染色後、クリスタルバイオレット水溶液を取り除き、水道水で３回洗浄し、９５％（ｖ／ｖ）エタノールを２００μＬ添加して脱色を行った。この後、吸光プレートリーダー（TECAN社製、SUNRISE Remote R）を用いて５４０ｎｍにおける吸光度（ＯＤ$_{540}$値）を測定した。ＯＤ$_{540}$値を測定する際には、ＬＢ（－ＮａＣｌ）液体培地のみを入れたウェルの値をブランクとしてバックグラウンド補正を行った。各変異体のＯＤ$_{540}$値を、対照区である野生株のＯＤ$_{540}$値を１として規格化した値を、各変異体のバイオフィルム形成能力とした

表１に示すように、ＭＴ－２を除いてバイオフィルム形成能力の向上が認められた。中でも、ＭＴ－４からＭＴ－６及びＭＴ－１０の４つの変異体において、野生株であるＰ－４５１の１０倍以上のバイオフィルム形成能力を示した。

[0047] 培養後の浮遊菌量は、ＭＴ－１０を除いて、ほぼ野生株であるＰ－４５１と同じになった。ＭＴ－１０において、浮遊菌量がＰ－４５１の半分程度となったが、これは、バイオフィルム内に存在する菌が増加し、浮遊状態の菌が減少したことによると考えられる。

[0048]

[表1]

	バイオフィルム形成能力	浮遊菌量
P-451	1.0	1.0
M1-1	1.7	1.0
MT-2	1.0	1.0
MT-3	4.3	1.0
MT-4	29.7	0.8
MT-5	27.0	0.9
MT-6	22.7	0.9
MT-7	8.0	1.0
MT-8	3.3	0.9
MT-9	1.7	1.0
MT-10	25.0	0.4

[0049] （５）トランスポゾン変異により欠損した遺伝子の同定

変異体ＭＴ－５及びＭＴ－１０について遺伝子の欠損部位を評価した。変異体ＭＴ－５及びＭＴ－１０をＬＢ寒天培地で培養し、滅菌爪楊枝で単一コロニーをかき取り、５０μＬ滅菌蒸留水の入った１．５ｍＬマイクロチューブに懸濁した。そのチューブをブロックインキュベーターに入れ１００℃、１０分の条件で加熱し、溶菌させた。溶菌液の入ったチューブを１５，０００ｇ、５分の条件で遠心機にかけ、上澄みを新しいチューブに移した。次に、表２に示す１st ＰＣＲ混合液を用意しそれを９５℃２分間、（９５℃３０秒間、４７℃４５秒間、７２℃１分間）×３０回の条件でＰＣＲ装置にかけた。なお、ＰＣＲとは、Polymerase Chain Reactionの略称であり、ポリメラーゼ連鎖反応である。

[0050]

[表2]

成分	（μL）
2x Quick Taq™	5
10μM ARB1	0.5
10μM GB-3a	0.5
Cell lysate	2
Autoclaved, distilled water	2

[0051] １st ＰＣＲ産物を用いて、表３に示す２nd ＰＣＲ混合液を調整し、９５℃２分間、（９５℃３０秒間、４５℃３０秒間、７２℃１分間）×３０回の条件でＰＣＲ装置にかけた。

[0052] [表3]

成分	（μL）
2x Quick Taq™	20
10μM ARB1	2
10μM GB-3a	2
1st PCR reaction	4
Autoclaved, distilled water	12

[0053] 次に２nd ＰＣＲ産物を０．５×ＴＡＥ－バッファーで作成した０．８％（ｗ／ｖ）アガロースゲルを用いて電気泳動装置（アドバンスバイオ社製、Mupid-2 plus）を用いて、１００Ｖで３０分間電気泳動を行い、１μｇ／μＬの臭化エチジウム中で２０分間振とうして染色した。

[0054] この後、市販のＤＮＡ断片回収キット（RBC BIOSCIENCE社製、HiYield Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit）を用いて、以下のようにしてＰＣＲ産物の回収を行った。染色後、ＵＶランプで照らしながら目的のバンド部分を切り取り、１．５ｍＬのマイクロチューブに入れた。DF Buffer５００μＬをチューブに入れ、５５℃で約１０分間温めてゲルを完全に溶解させた。これを、コネクションチューブにつないだカラムに全て注入し１０，０００ｇで

３０秒間遠心分離した。コネクションチューブにある液を捨て、Wash Bufferを６００μＬ入れて１０，０００ｇで３０秒間遠心分離した。その後、再びコネクションチューブにある液を捨て、再度１０，０００ｇで３分間遠心分離し、カラムを乾燥させた。コネクションチューブを１．５ｍＬマイクロチューブに付け替え、カラムの中心にElution Bufferを５μＬ添加した。再度１０，０００ｇ、３０秒で遠心分離し、ＰＣＲ産物を回収した。

[0055] 次に、市販のＰＣＲ産物のクローニングキット（Promega社製、pGEM-T Easy Vector Systems）を用いて、以下のようにしてＰＣＲ産物のライゲーションを行った。2×Rapid Ligation Bufferを２．５μＬと、T4 DNA Ligase（3 Weiss Units／μＬ）及びpGEM-T Easy Vecter（１７ｎｇ／μＬ）を０．５μＬと、蒸留水を０．５μＬと、回収したＰＣＲ産物を１．５μＬとを混合し、室温で１時間静置した。次に、エレクトロポレーション用のキュベットに大腸菌TOP10株のコンピテントセルを５５μＬ及びライゲーション産物を１μＬ注入した。これにエレクトロポレーション装置（Bio Rad社製、E.coliパルサー）を用いて１．２５Ｖ、１秒でパルスを加えて、形質転換を行った。パルスを加えた後、キュベットに５００μＬのＬＢ溶液を加えて混合し、懸濁液を１．５ｍＬチューブに移した。チューブを横向きにし、バイオシェーカーを用いて１時間、３７℃で培養した。その後、１００μｇ／ｍＬのアンピシリンを添加したＬＢ寒天培地に培養液を２００μＬ撒いて、インキュベーターで３７℃、１６時間培養した。

[0056] 表４に示すコロニーＰＣＲ溶液を調製し、サンプル１種類につき５チューブずつ用意した。培地の単一コロニーを、２μＬチップを付けたマイクロピペットでかき取り、マスタープレート用の１００μｇ／ｍＬのアンピシリン入りＬＢ寒天培地に接種すると共に、先に調製したＰＣＲ用チューブに懸濁してＰＣＲ混合液を作成した。ＰＣＲ混合液は、９６℃２分、（９５℃３０秒、５５℃３０秒、６８℃１分）×３５回の条件でＰＣＲ装置にかけた。ＰＣＲ後、電気泳動を行い、目的のバンドが出たコロニーをマスタープレートから滅菌した爪楊枝でかき取り、１００μｇ／ｍＬのアンピシリン入りＬＢ

液体培地に接種した。これを、バイオシェーカーを用いて１２０ｒｐｍ、３７℃、１６時間培養した。

[0057] [表4]

成分	（μL）
2x Quick Taq™	5
10μM M13 forward	0.5
10μM M13 reverse	0.5
Autoclaved, distilled water	12

[0058] 次に、市販のプラスミド分離キット（RBC BIOSCIENCE社製、HiYield Plasmid Mini Kit）を用いて、以下のようにしてプラスミドの生成を行った。培養液を１．５ｍＬチューブに１．５ｍＬ入れて、２０，０００ｇ、１分間の条件で遠心分離し、上澄みを捨てた。チューブにPD1 Bufferを２００μＬ入れ、続いてPD2 Bufferバッファーを２００μＬ加えて静かに５回転倒混和した。５分間静置した後、PD3 Bufferバッファーを３００μＬ加えて１０回転倒混和させ２０，０００ｇ、３分間の条件で遠心分離した。上澄み液をカラムに入れ、コネクションチューブを取り付けて２０，０００ｇ、３０秒間の条件で遠心分離した。上澄み液を捨てカラムにW1 Bufferを４００μＬ注入し、再び遠心分離をして上澄み液を捨て、Wash Bufferを６００μＬ入れて２０，０００ｇ、３０秒間の条件で遠心分離した。その後、コネクションチューブを空にした状態で２０，０００ｇ、３分間の条件で遠心分離して乾燥させた。コネクションチューブを１．５ｍＬチューブに付け替えて、カラムの中心にElution Bufferを１０μＬ添加し、２０，０００ｇ、３分間の条件で遠心分離をし、精製したプラスミドを回収した。

[0059] 回収した溶液を極微量分光光度計（Thermo scientific社製、Nano Drop 2000）を用いて２６０ｎｍの吸光度（OD_{260}値）と２８０ｎｍの吸光度（OD_{280}値）を計測し、回収したプラスミドの濃度を算出した。

[0060] １．５ｍＬチューブに、精製したプラスミドと、１μＬの10倍濃縮高塩濃

度緩衝液（10×Hバッファ）と、０．５μＬの制限酵素（EcoRI、１５Ｕ／μＬ）とを入れ、蒸留水を加えて１０μＬとした。プラスミドの濃度は２００ｎｍ／ｍｇとなるようにした。これを３７℃で２時間培養後、電気泳動用色素（6×Loading Dye）を３μＬ混合し、６．５μＬを電気泳動した。制限酵素により、目的のバンドが出ているか確認した。

[0061] SequencingＰＣＲ溶液（５μM primer １μＬ、５×Buffer ０．５μＬを含む）に精製したプラスミドが２００～４００ｎｇ／ｍｇになるよう加えた。チューブの蓋の内側に２μＬの蒸留水を添加し、静かに蓋を閉め、９６℃１分、（９６℃１０秒、５０℃１０秒、６０℃４分）×３５回の条件でＰＣＲ装置にかけた。

[0062] ＰＣＲ後のチューブに蒸留水を３μＬ加え、１．５ｍＬチューブに移した。そこにＮａＯＡＣ（ｐＨ８．０、３M）を１μＬ、ＥＤＴＡ（０．５M）を加えて攪拌し、１００％エタノールを４０μＬ加えてさらに攪拌した。１５分間遮光して静置した後、２０，０００ｇで１５分間遠心分離し、上澄みを取り除き、７０％エタノールを１００μＬ加えた。そして１５，０００ｇで５分間遠心分離し、上澄みを取り除き、遮光状態で蓋を開けてエタノールを除いた。

[0063] 広島大学構内の自然科学研究センター遺伝子科学研究開発部でサンプルの塩基配列を調査し、決定した塩基配列をＢＬＡＳＴプログラムでＮＣＢＩのデータベース、Pseudomonas Genome DBと比較して欠損した遺伝子の同定を行った。

[0064] この結果、ＭＴ－５のゲノムＤＮＡに挿入されたトランスポゾンの隣接領域のＤＮＡ配列は、CAACCTGTTATTGATGGCAAAGGCCAGGCAGGCACAGAACGTTGCGCTGGACAGCCACGGCCAGAAGであった。このＤＮＡ配列より推定されるアミノ酸配列は、Pseudomonas putidaのＡＢＣトランスポータであるPP_4484タンパク質のアミノ酸配列と８５．７１％の相同性を有しており、ＭＴ－５におけるトランスポゾン変異の導入部位は、PP_4484タンパク質（２３２ａａ）の８８番目のアミノ酸残基であった。このことから、ＭＴ－５はＡＢＣトランスポータで

あるPP_4484タンパク質の機能を欠失した変異体である。ＭＴ－５は、ＡＢＣトランスポータ遺伝子の欠損により、バイオフィルム形成に影響を与える何らかの物質が輸送されなくなり、バイオフィルム形成能力が向上したと推定される。

[0065] また、ＭＴ－１０のゲノムＤＮＡに挿入されたトランスポゾンの隣接領域のＤＮＡ配列は、TTACATCGTCTACGGGCCTTTGGCCAACGGCGCGACTTCACTGATGTTCGAAGGCGTACCCAATTACCCGGACACCTCGCGCTTCTGGCAAGTGGTGGACAAACATCAGGTAAACATCTTCTACACCGCACCCACCGCCCTGCGCGCGTTGATGCGTGAAGGTTCGGCACCGCTGCAGAGCACCTCGCGCAAAAGCCTGCGTCTGCTCGGCAGCGTTGGCGAGCCAATCAACCCGGAAGCCTGGGAGTGGTACTTCGAAGAGGTGGGCCAGAAGCGTTGCCCCATCGTCGACACCTGGTGGCAGACCGAGACCGGCGGCATCATGCTCACGCCGCTACCGGGTGCTCAAAAGCTCAAGCCCGGGTGCGCCACCCAGCCGATGTTCGGTGTGCAACCGGTGCTACTGGACGAAAAAGGCAAGCTGATCGAAGGCCCGGGCGCCGGTCTGCTGGTGATCAAGGCCAGCTGGCCCGGGCAGATCCGCAGCGTCTATGGTGACCACCAGCGCATGGTCGACACCTACTTCAAACCCATGCCCGGCTACTACTTCACCGGCGATGGCGCCCGCCGCGACGCTGATGGCGATTACTGGATCACCGGCCGCATCGACGATGTCATCAATGTCTCCGGCCACCGCATCGGCACCGCCGAGGTGGAAAGCGCGCTGであった。

[0066] このＤＮＡ配列より推定されるアミノ酸配列は、Pseudomonas putidaのAcetyl-CoA合成酵素であるPP_4702タンパク質のアミノ酸配列と９７．３％の相同性を有しており、ＭＴ－１０におけるトランスポゾン変異の導入部位は、PP_4702タンパク質（６４４ａａ）の３１０番目のアミノ酸残基であった。このことから、ＭＴ－１０はAcetyl-CoA合成酵素であるPP_4702タンパク質の機能を欠失した変異体である。ＭＴ－１０はAcetyl-CoA合成酵素に関する遺伝子が欠損した結果、タンパク質機能のコントロールの低下や、脂肪酸合成能の低下が生じ、菌体の凝集が促進され、バイオフィルム形成能力が上昇したと推測される。

[0067] （６）バイオフィルムの形態観察

変異体ＭＴ－５及びＭＴ－１０のバイオフィルムを、形態的に観察した。変異体ＭＴ－５及びＭＴ－１０並びに野生株Ｐ－４５１をＬＢ寒天培地で培

養し、単一コロニーを滅菌した爪楊枝でかき取り、それぞれＬＢ液体培地で前培養した。培養液を１．５ｍＬマイクロチューブに１ｍＬずつ分注した後、遠心分離機にて２０，０００ｇ、２分間の条件で遠心分離をし、上澄みを取り除き、１ｍＬのＬＢ（－ＮａＣｌ）液体培地を加えて攪拌した。これを２回繰り返して菌体の洗浄を行った。２ｍＬのＬＢ（－ＮａＣｌ）液体培地が入った１０ｍＬ試験管にOD_{600}値が０．０５となるように菌懸濁液を添加した。その後試験管を２８℃で、２４時間静置培養を行った。これをそれぞれ３反復ずつ行った。

[0068] 培養後に写真撮影を行い、肉眼により形態的特徴を観察した。また、培養液のOD_{600}値を分光光度計によって測定した。

[0069] 図２及び図３に示すように、変異体ＭＴ－５及びＭＴ－１０並びに野生株Ｐ－４５１のいずれにもバイオフィルムの形成が確認された。変異体ＭＴ－５及びＭＴ－１０においては、野生株Ｐ－４５１と比べて、真横から見た際に明確に厚いバイオフィルムが確認できた。一方、ＭＴ－５及びＰ－４５１が形成したバイオフィルムの表面は滑らかであるのに対し、Ｍ－１０が形成したバイオフィルムの表面には、皺が形成されており、ＭＴ－５及びＰ－４５１とは異なる形態を示した。また、OD_{600}値は、Ｐ－４５１が２．７であったのに対し、ＭＴ－５では０．６であり、ＭＴ－１０では０．２であった。ＭＴ－５及びＭＴ－１０においては、Ｐ－４５１と比べてバイオフィルムが明確に成長し、菌体がバイオフィルム内に取り込まれていることが確認された。

[0070] （７）リン酸カルシウム可溶化能力の評価

トランスポゾン変異を導入した変異体ＭＴ－５及びＭＴ－１０のリン酸カルシウム可溶化能力を野生株であるＰ－４５１と比較した。定量的なリン酸カルシウム分解能力の測定法はNautiyalの測定法（Nautiyal CS (1999) FEMS Microbiology Letters 170:265-270）を採用した。変異体ＭＴ－５及び野生株Ｐ－４５１を寒天培地で培養し、単一コロニーを滅菌した爪楊枝でかき取り、それぞれＬＢ液体培地で前培養した。

[0071] 培養液を１．５ｍＬマイクロチューブに１ｍＬずつ分注した後、遠心分離機にて２０，０００ｇ、２分間の条件で遠心分離をし、上澄みを取り除き、表５に示すNational Botanical Research Institute's phosphate（ＮＢＲＩＰ）液体培地を１ｍＬ加えて攪拌した。これを２回繰り返して菌体の洗浄を行った。

[0072] 次に、ＮＢＲＩＰ液体培地を２０ｍＬ入れた５０ｍＬ三角フラスコに菌懸濁液を添加してOD_{600}値が０．０５になるよう調整した。バイオシェーカーを用いて１２０ｒｐｍ、１０日間振とう培養した。それぞれの菌株につき２反復分の培養を行い、これを各３反復行い、合計で各菌株につき６反復行った。

[0073] [表5]

成分	濃度(g/L)
グルコース	10
$Ca_3(PO_4)_2$	5
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	5
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.25
KCl	0.2
$(NH_4)_2SO_4$	0.1

[0074] 培養中、４８時間毎に培養液中のリン酸濃度を定量した。リン濃度の測定はモリブデンブルー法により行った。培養液を１００μＬ採取し、滅菌蒸留水９００μＬを入れた１．５ｍＬチューブにて希釈した。続いてチューブを２０，０００ｇ、５分間の条件で遠心分離した。培養液の上澄み１０μＬに、２．５％モリブデン酸アンモニウム０．８ｍＬ、６Ｎ硫酸０．８ｍＬ、アスコルビン酸８９ｍｇを加え、蒸留水により８ｍＬとし、分光光度計を用いた８２０ｎｍの吸光度（OD_{820}値）を測定した。予め、既知濃度のリン酸を含む溶液を用いて作成した検量線によりOD_{820}値からリン酸濃度を算出した。

[0075] 図４に示すように、ＭＴ－５及びＭＴ－１０並びにＰ－４５１のいずれにおいても、培養液中のリン酸濃度は、培養を開始した後に大きく上昇した。

これは、培養液中のリン酸カルシウムが、いずれの菌株においても可溶化されたことを示している。その後、いずれの菌株においても、培養液中のリン酸濃度は緩やかに低下した。これは、細菌がリン酸を消費したことによる。２日目から１０日目まで、ＭＴ－５及びＭＴ－１０の培養液においてＰ－４５１の培養液よりもリン酸濃度が若干高くなっており、ＭＴ－５及びＭＴ－１０のリン可溶化能力はＰ－４５１と同等以上であることが示された。

[0076] （８）被覆種子の作成

植物への菌の付着について検討した。菌を付着させる植物には、イネ（ヒノヒカリ）の種子を用いた。種子は、６０℃のお湯に３０秒間浸漬した後、２．５％（ｖ／ｖ）次亜塩素酸ナトリウム溶液の入ったビーカーに入れ、スターラーで２０分間攪拌することで殺菌処理を行った。その後、１０分毎に滅菌水で洗うことを３回繰り返し、次亜塩素酸ナトリウムを取り除いた。殺菌処理をした種子は、１００ｍＬ三角フラスコに１５粒ずつ入れた。 被覆に用いる菌株はＬＢ寒天培地で培養し、単一コロニーを滅菌した爪楊枝でかき取り、それぞれＬＢ液体培地で前培養した。培養液を１．５ｍＬマイクロチューブに１ｍＬずつ分注した後、遠心分離機にて２０，０００ｇ、２分間の条件で遠心分離をし、上澄みを取り除き、１ｍＬの滅菌蒸留水を加えて攪拌した。これを２回繰り返して菌体の洗浄を行った。

[0077] 洗浄を行った後、OD_{600}値が０．０５となるように、ＬＢ（－ＮａＣｌ）液体培地で希釈を行い、これを種子を入れた三角フラスコに１０ｍＬ加えた。この後、インキュベーターにより２８℃で、２４時間静置培養を行った。

[0078] 培養後、培養液を取り除き、滅菌蒸留水を３０ｍＬ注入した。攪拌後、蒸留水を取り除き、これを５回繰り返し、種子に付着していない菌を除去した。この後、培養後の種子を滅菌したすり鉢を使ってすり潰した。すり潰した種子を１０ｍＬの滅菌蒸留水に懸濁し、１５ｍＬのチューブに注入した。これを３粒の種子についてそれぞれ行った。また、前培養から２反復行った。この後、希釈平板法によって菌数を測定した。菌数測定の際に、野生株Ｐ－４５１は２０μｇ／ｍＬクロラムフェニコールを含むＬＢ寒天培地を使用し

、変異体ＭＴ－５及びＭＴ－１０は２０μｇ／ｍＬクロラムフェニコールと９０μｇ／ｍｇゲンタマイシンを含むＬＢ寒天培地を使用した。

[0079] 表６に示すように、１反復目のＭＴ－５の種子１粒あたりのコロニー数は２３００００ｃｆｕであり、ＭＴ－１０のコロニー数は７７０００ｃｆｕであり、Ｐ－４５１のコロニー数は１２００００ｃｆｕであった。２反復目のＭＴ－５のコロニー数は、２７００００ｃｆｕであり、ＭＴ－１０のコロニー数は２５０００ｃｆｕであり、Ｐ－４５１のコロニー数は２５０００ｃｆｕであった。１反復目、２反復目のいずれにおいても、ＭＴ－５とＰ－４５１との間には、コロニー数に有為な差が認められ、ＭＴ－５は、Ｐ４５１よりも植物の表面に付着させやすいことが示された。一方、１反復目、２反復目のいずれにおいても、ＭＴ－１０とＰ－４５１との間には、コロニー数に有為な差は認められなかった。

[0080] [表6]

	コロニー数（cfu/種子）	
	1反復目	2反復目
P-451	120,000	25,000
MT-5	230,000	270,000
MT-10	77,000	25,000

産業上の利用可能性

[0081] 本開示の新規微生物は、リンの可溶化能力及びバイオフィルムの形成能力が高く、バイオ肥料等として有用である。

請求の範囲

[請求項1] 難溶性リン化合物をリン酸へ分解するPseudomonas属のリン溶解菌であり、PP_4484タンパク質の機能を欠失した変異体である、新規微生物。

[請求項2] 前記変異体は、トランスポゾン変異体である、請求項１に記載の新規微生物。

[請求項3] 難溶性リン化合物をリン酸へ分解するリン溶解菌であり、バイオフィルム作成能力を有するPseudomonas sp.ＭＴ－５株（受託番号 NITE BP-02215）である、新規微生物。

[請求項4] 請求項１～３のいずれか１項に記載の新規微生物を含むバイオフィルムを表面に付着させた、種子。

[請求項5] 難溶性リン化合物のリン酸へ分解するPseudomonas属のリン溶解菌に、変異を導入して、変異株を得る工程と、

前記変異株のうち、バイオフィルム形成能力が野生株よりも高い株をスクリーニングする工程とを備えた、新規微生物の作成方法。

[請求項6] 前記スクリーニングする工程において、PP_4484タンパク質の機能が欠失した株を選択する、請求項５に記載の新規微生物の作成方法。

[請求項7] 前記リン溶解菌が、Pseudomonas putidaである、請求項５又は６に記載の新規微生物の作成方法。

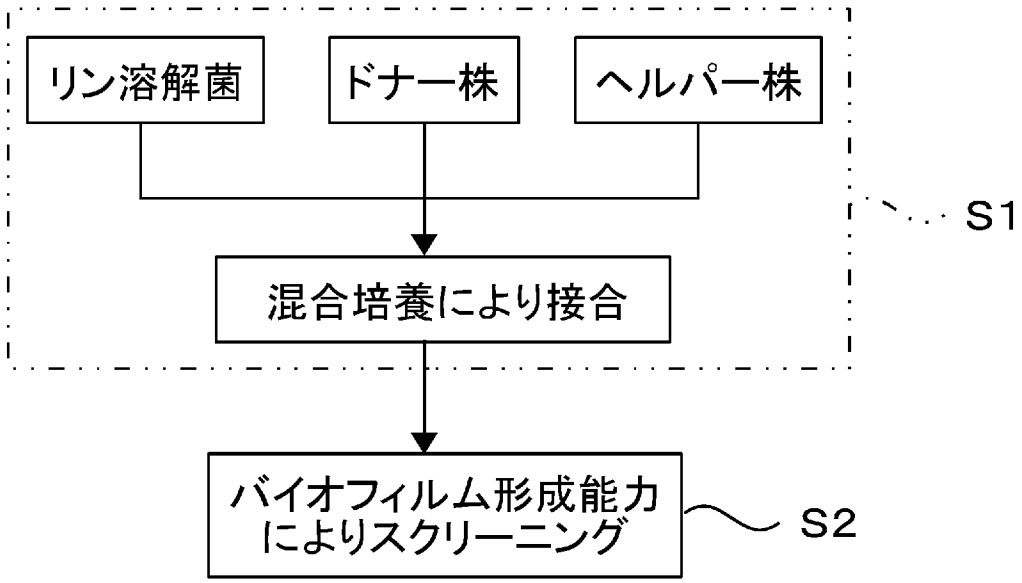
[請求項8] 前記リン溶解菌が、Pseudomonas sp.Ｐ－４５１株（受託番号 NITE BP-02205）である、請求項５又は６に記載の新規微生物の作成方法。

[請求項9] 前記変異を導入する工程において、トランスポゾンドナーとしてE.coli MC4100/pMAR2xT7を用い、トランスポゾンヘルパーとしてE.coli HB101/pRK2013を用いて、トランスポゾン変異を導入する、請求項５～８のいずれか１項に記載の新規微生物の作成方法。

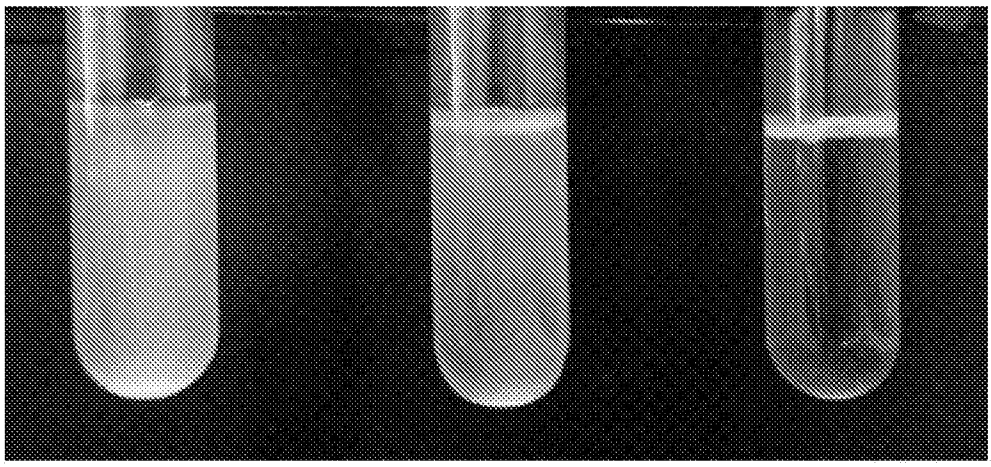
[請求項10] 請求項５～９のいずれか１項に記載の新規微生物の作成方法により作成した新規微生物を種子と共に、２０℃以上、３５℃以下の温度で

培養して、種子の表面にバイオフィルムを形成させる、バイオフィルム被覆種子の作成方法。

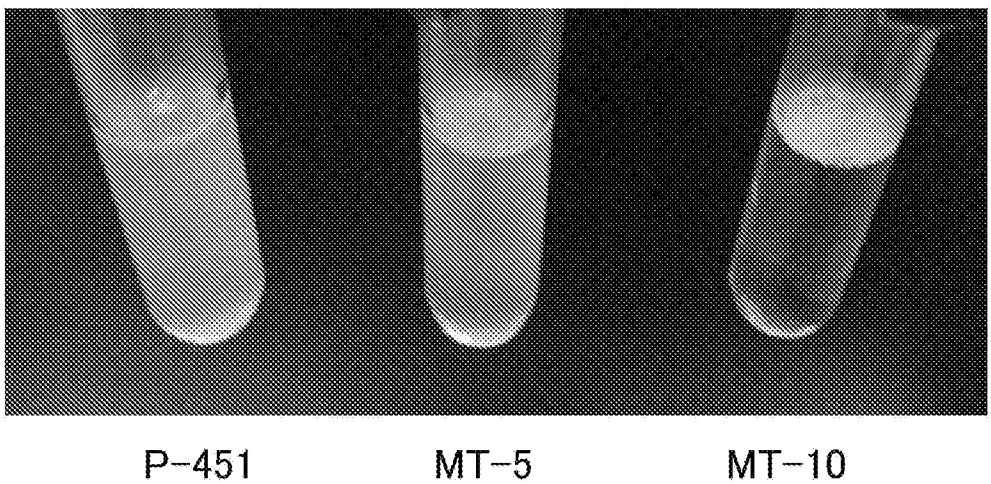
[図1]


リン溶解菌
ドナー株
ヘルパー株
S1
混合培養により接合
バイオフィルム形成能力によりスクリーニング
S2

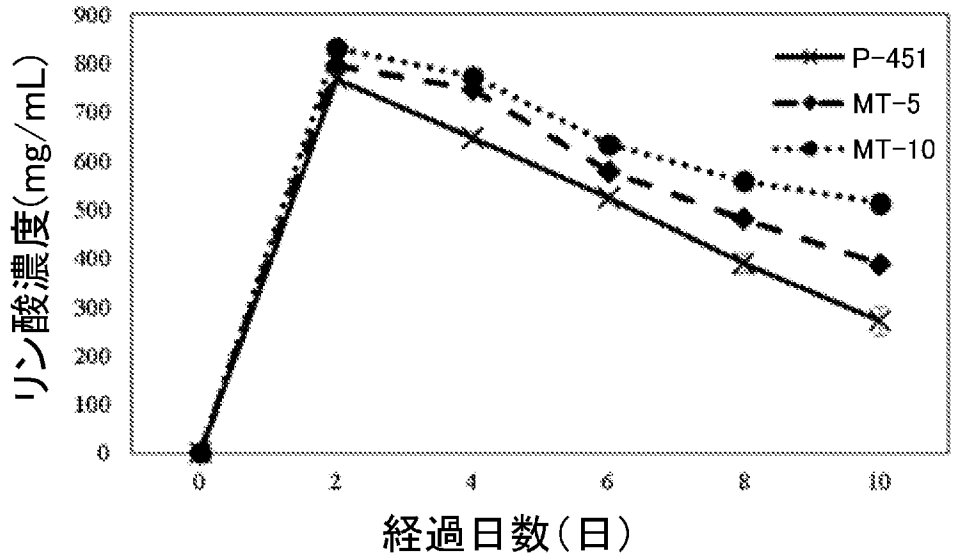
[図2]


P-451
MT-5
MT-10

[図3]


P-451
MT-5
MT-10

[図4]


リン酸濃度(mg/mL)
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
0
2
4
6
8
10
経過日数(日)
P-451
MT-5
MT-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2017/009268

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N15/09(2006.01)i, *A01H5/10*(2006.01)i, *C12N1/20*(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)
C12N15/09, A01H5/10, C12N1/20

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)
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, PubMed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y/A	Mizuki NAKANO et al., "Transposon Hen'i ni yoru Nan'yosei Phosphorus Kayoka Saikin no Biofilm Keisei Noryoku no Kojo", 2015, Abstracts of the Annual Meeting, Japanese Society of Soil Science and Plant Nutrition 61st series, page 43, P3-2-4, entire text	5,7-9/1-4, 6,10
Y/A	Kenji OKANO, et al., "Biseibutsu ni yoru Nan'yosei Phosphate Yokai Kiko no Kaimei(1) Calcium Phosphate", 2015, 2015 Nendo Proceedings of the Annual Meeting of Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry (online), page 1294, entire text	5,7-9/1-4, 6,10

☒ 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	Date of mailing of the international search report
28 March 2017 (28.03.17)	11 April 2017 (11.04.17)

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
Japan Patent Office 3-4-3,Kasumigaseki,Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915,Japan	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2017/009268

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y/A	WO 2010/018210 A1 (BIO-ILIBERIS RESEARCH AND DEVELOPMENT S.L.), 18 February 2010 (18.02.2010), claim 7; example 1 & EP 2154239 A1	5,7-9/1-4, 6,10
A	UEDA, A., et al., Characterization of the Ability to Form Biofilms by Plant-Associated Pseudomonas Species, 2015, Current Microbiology, Vol.70, p.506-513, entire text	1-10
A	Akihiro UEDA, "Yuyo Dojo Saikin no Biofilm Keisei o Kaishita Shokubutsu Hyomen eno Teichakuno no Kaizen", 2013, Institute for Fermentation Josei Kenkyu Hokoku, vol.27, pages 59 to 60, entire text	1-10
A	Database DDBJ/EMBL/GenBank [online], Accession No. NP_746595, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/26991170?sat=4&satkey=159244931> 04-MAR-2016 uploaded, [retrieved on 23-MAR-2017] BELDA, E., et al., Definition: histidine / lysine / arginine / ornithine ABC transporter -permease subunit [Pseudomonas putida KT2440]. entire text	1-10

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１７／００９２６８

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N15/09(2006.01)i, A01H5/10(2006.01)i, C12N1/20(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.　C12N15/09, A01H5/10, C12N1/20

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）

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, PubMed

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
Ｙ／Ａ	中野瑞己, et al., トランスポゾン変異による難溶性リン可溶化細菌のバイオフィルム形成能力の向上, 2015, 日本土壌肥料学会講演要旨集　第６１集, p.43 P3-2-4 全文	５、７－９／１－４、６、１０

☑　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	国際調査報告の発送日
２８．０３．２０１７	１１．０４．２０１７

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
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）　４Ｂ　３９６３
福澤　洋光
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
Ｙ／Ａ	岡野憲司, et al., 微生物による難溶性リン酸塩溶解機構の解明（１）リン酸カルシウム, 2015, 日本農芸化学会２０１５年度大会講演要旨集（オンライン）, p.1294 全文	５、７－９／１－４、６、１０
Ｙ／Ａ	WO 2010/018210 A1 (BIO-ILIBERIS RESEARCH AND DEVELOPMENT S.L.) 2010.02.18, 請求項７、実施例１ & EP 2154239 A1	５、７－９／１－４、６、１０
Ａ	UEDA, A., et al., Characterization of the Ability to Form Biofilms by Plant-Associated Pseudomonas Species, 2015, Current Microbiology, Vol.70, p.506-513 全文	１－１０
Ａ	上田晃弘, 有用土壌細菌のバイオフィルム形成を介した植物表面への定着能の改善, 2013, 発酵研究所助成研究報告, Vol.27, p.59-60 全文	１－１０
Ａ	Database DDBJ/EMBL/GenBank [online], Accession No. NP_746595, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/26991170?sat=4&satkey=159244931> 04-MAR-2016 uploaded, [retrieved on 23-MAR-2017] BELDA, E., et al., Definition: histidine / lysine / arginine / ornithine ABC transporter - permease subunit [Pseudomonas putida KT2440]. 全文	１－１０