

(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 1 月 5 日(05.01.2017)



(10) 国際公開番号
WO 2017/002929 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) *C12N 1/15* (2006.01)
A01G 7/00 (2006.01) *C12N 1/19* (2006.01)
C07K 14/195 (2006.01) *C12N 1/21* (2006.01)
C12N 1/00 (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/069474
- (22) 国際出願日: 2016 年 6 月 30 日(30.06.2016)
- (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 2015-130895 2015 年 6 月 30 日(30.06.2015) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人北海道大学 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION HOKKAIDO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒0600808 北海道札幌市北区北 8 条西 5 丁目 Hokkaido (JP).
- (72) 発明者: 森川 正章 (MORIKAWA Masaaki); 〒0600808 北海道札幌市北区北 8 条西 5 丁目 国立大学法人北海道大学内 Hokkaido (JP). ラフルジョグ (RAHUL Jog); 〒0600808 北海道札幌市北区北 8 条西 5 丁目 国立大学法人北海道大学内 Hokkaido (JP). 三輪 京子 (MIWA Kyoko); 〒0600808 北海道札幌市北区北 8 条西 5 丁目 国立大学法

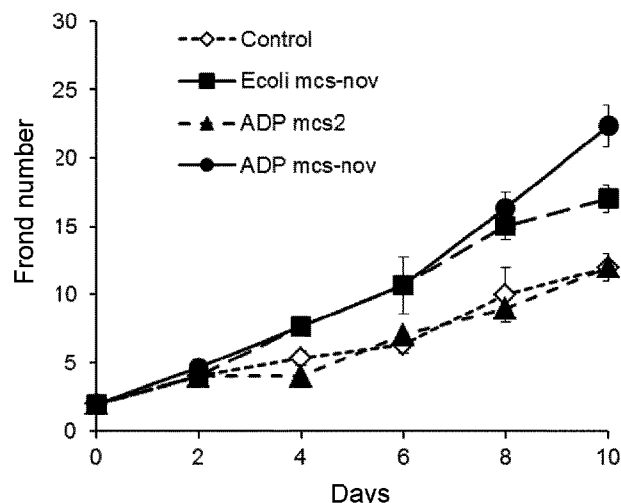
人北海道大学内 Hokkaido (JP). 菅原 雅之 (SUGAWARA Masayuki); 〒0600808 北海道札幌市北区北 8 条西 5 丁目 国立大学法人北海道大学内 Hokkaido (JP).

- (74) 代理人: 一入 章夫, 外 (HITOSHIO Akio et al.); 〒0600002 北海道札幌市中央区北 2 条西 3 丁目 1 番地 太陽生命札幌ビル 7 階 I P アシスト特許事務所 Hokkaido (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, 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, KN, KP, KR, 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: METHOD FOR ACCELERATING PLANT GROWTH, METHOD FOR PRODUCING PLANT GROWTH ACCELERATOR, AND PROTEIN USED THEREIN

(54) 発明の名称: 植物の生長を促進する方法、植物生長促進物質を製造する方法及びこれらに利用されるタンパク質



(57) Abstract: [Problem] The purpose of the present invention is to effectively utilize microorganisms having the function of accelerating the growth of plants, especially plants of the family Lemnaceae. [Solution] The present invention provides a method for accelerating the growth of plants, the method including a step for causing microorganisms capable of expressing at least one gene that encodes a protein shown by SEQ ID NOS: 1-5 (however, excluding *Acinetobacter calcoaceticus* P23) to be jointly present with plants. The present invention makes it possible to utilize novel microorganisms other than strain P23 having a PGPC-related gene, and to raise the efficiency of biomass production by promoting the growth of plants, especially plants of the family Lemnaceae.

(57) 要約:

[続葉有]

WO 2017/002929 A1



ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, 添付公開書類:

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).

- 国際調査報告（条約第 21 条(3)）
- 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)）

【課題】 本発明は、植物、特にウキクサ科植物の生長を促進する機能を有する微生物の有効利用を目的とするものである。【解決手段】 本発明は、配列番号 1～5 に示されるタンパク質をコードする遺伝子の少なくとも 1 つを発現可能に有する微生物（ただしアシネトバクター・カルコアセティカス P 2 3 を除く）を植物と共存させる工程を含む、植物の生長を促進する方法を提供する。本発明によれば、P G P C 関連遺伝子を有する P 2 3 株以外の新たな微生物を利用することができ、植物特にウキクサ科植物の生長を促進させることでバイオマス生産の効率を高めることが可能となる。

明 細 書

発明の名称：

植物の生長を促進する方法、植物生長促進物質を製造する方法及びこれらに利用されるタンパク質

技術分野

[0001] 本発明は、植物の生長を促進する方法、植物生長促進物質を製造する方法、及びこれらの方法において利用されるタンパク質に関する。

背景技術

[0002] ウキクサ科植物（*Lemnaceae*）は、地球のほぼ全域に生息する淡水性の水生植物である。これまで、ウキクサ科植物、特にコウキクサ（*Lemna minor*、英語名 *duckweed*）の産業への利用は、根圏微生物を含むコウキクサを用いた産業廃水の水質浄化に関連するものが主流であった（例えば、特許文献１）。また、有用タンパク質の生産のための遺伝子組換え宿主としてウキクサ科植物を利用する技術も開発されている（特許文献２及び特許文献３）。

[0003] 近年、ウキクサ科植物が植物体重量当たり６０％程のデンプンと１５％を越えるタンパク質を有する極めて栄養価の高い植物であることが認識されるようになり、ウキクサ科植物をバイオマス、特にバイオマスエネルギーとして活用することへの関心が高まっている。特に、従来知られている水質浄化能力と組み合わせた都市下水、工場廃水、農業廃水などを利用したウキクサ科植物の栽培は、省エネ型の水質浄化とバイオマス生産を同時に達成することが可能となる点で、魅力的である。

[0004] 水質浄化及びバイオマス生産へのいずれの利用においても、低コストでウキクサ科植物の生長速度を高める技術の開発は有益である。係る観点から、本発明者らはコウキクサの生長を促進する機能を有する根圏微生物（*Plant Growth Promoting Bacterium*（PGPB）及び *Plant Growth Promoting Fungi*（PG

P F)) に注目して研究を行い、アシネトバクター・カルコアセティカス (*A c i n e t o b a c t o r c a l c o a c e t i c u s*) P 2 3 (以下、P 2 3 株と表す) が P G P B であること、及び P 2 3 株の分泌する多糖が植物生長促進物質 (*P l a n t G r o w t h P r o m o t i n g C o m p o u n d*、P G P C) であることを見出している (非特許文献 1) 。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特開 2 0 0 9 - 2 4 7 2 7 9 号公報

特許文献2：特表 2 0 0 1 - 5 1 3 3 2 5 号公報

特許文献3：特表 2 0 0 9 - 5 2 3 4 3 1 号公報

非特許文献

[0006] 非特許文献1：M. Sugawara ら、 “ I d e n t i f i c a t i o n o f t h e p l a n t g r o w t h - p r o m o t i n g f a c t o r p r o d u c e d b y A c i n e t o b a c t e r s p . P 2 3 ” 、 [o n l i n e] 、 平成 2 6 年 5 月 1 9 日、第 1 1 4 回米国微生物学会大会 発表番号 Q - 1 8 5 1 [平成 2 7 年 6 月 1 7 日検索] 、インターネット < U R L : <http://www.asmonlineducation.com/php/asm2014abstracts/data/index.htm>>

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明は、植物、特にウキクサ科植物の生長を促進する機能を有する微生物の有効利用を目的とするものである。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、ウキクサの生長を促進させる P G P C の生合成に関する遺伝子群 (P G P C 関連遺伝子クラスターと表す) を P 2 3 株のゲノム中に見だし、下記の各発明を完成させた。

[0009] (1) 下記の1)～5)の遺伝子の少なくとも1つを発現可能に有する微生物（ただしアシネトバクター・カルコアセティカス P23を除く）を植物と共存させる工程を含む、植物の生長を促進する方法。

1) 配列番号1に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、又は配列番号1に示されるアミノ酸配列の1～数個のアミノ酸が欠失され若しくは置換されたアミノ酸配列若しくは配列番号1に示されるアミノ酸配列に1～数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であって、植物生長促進物質の生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子

2) 配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、又は配列番号2に示されるアミノ酸配列の1～数個のアミノ酸が欠失され若しくは置換されたアミノ酸配列若しくは配列番号2に示されるアミノ酸配列に1～数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であって、植物生長促進物質の生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子

3) 配列番号3に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、又は配列番号3に示されるアミノ酸配列の1～数個のアミノ酸が欠失され若しくは置換されたアミノ酸配列若しくは配列番号3に示されるアミノ酸配列に1～数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であって、植物生長促進物質の生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子

4) 配列番号4に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、又は配列番号4に示されるアミノ酸配列の1～数個のアミノ酸が欠失され若しくは置換されたアミノ酸配列若しくは配列番号4に示されるアミノ酸配列に1～数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であって、植物生長促進物質の生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子

5) 配列番号5に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、又は配列番号5に示されるアミノ酸配列の1～数個のアミノ酸が欠失され若しくは置換されたアミノ酸配列若しくは配列番号5に示されるアミノ酸配列に1～数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であって、植物生長促進物質の生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子

(2) 下記の1)～5)の遺伝子の少なくとも1つを発現可能に導入された微生物を植物と共存させる工程を含む、植物の生長を促進する方法。

1) 配列番号1に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、又は配列番号1に示されるアミノ酸配列の1～数個のアミノ酸が欠失され若しくは置換されたアミノ酸配列若しくは配列番号1に示されるアミノ酸配列に1～数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であって、植物生長促進物質の生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子

2) 配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、又は配列番号2に示されるアミノ酸配列の1～数個のアミノ酸が欠失され若しくは置換されたアミノ酸配列若しくは配列番号2に示されるアミノ酸配列に1～数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であって、植物生長促進物質の生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子

3) 配列番号3に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、又は配列番号3に示されるアミノ酸配列の1～数個のアミノ酸が欠失され若しくは置換されたアミノ酸配列若しくは配列番号3に示されるアミノ酸配列に1～数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であって、植物生長促進物質の生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子

4) 配列番号4に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、又は配列番号4に示されるアミノ酸配列の1～数個のアミノ酸が欠失され若しくは置換されたアミノ酸配列若しくは配列番号4に示されるアミノ酸配列に1～数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であって、植物生長促進物質の生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子

5) 配列番号5に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、又は配列番号5に示されるアミノ酸配列の1～数個のアミノ酸が欠失され若しくは置換されたアミノ酸配列若しくは配列番号5に示されるアミノ酸配列に1～数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であって、植物生長促進物質の生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子

(3) 前記1)～5)の遺伝子の少なくとも3つを有する微生物を植物と共

存させる工程を含む、（１）又は（２）に記載の方法。

（４）前記１）～５）の全ての遺伝子を有する微生物を植物と共存させる工程を含む、（１）又は（２）に記載の方法。

（５）植物がウキクサ科植物である、（１）～（４）のいずれかに記載の方法。

（６）下記の１）～５）の遺伝子の少なくとも１つを発現可能に有する微生物（ただしアシネトバクター・カルコアセティカス P 2 3を除く）を増殖させる工程を含む、植物生長促進物質の製造方法。

１）配列番号１に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、又は配列番号１に示されるアミノ酸配列の１～数個のアミノ酸が欠失され若しくは置換されたアミノ酸配列若しくは配列番号１に示されるアミノ酸配列に１～数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であって、植物生長促進物質の生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子

２）配列番号２に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、又は配列番号２に示されるアミノ酸配列の１～数個のアミノ酸が欠失され若しくは置換されたアミノ酸配列、若しくは配列番号２に示されるアミノ酸配列に１～数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であって、植物生長促進物質の生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子

３）配列番号３に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、又は配列番号３に示されるアミノ酸配列の１～数個のアミノ酸が欠失され若しくは置換されたアミノ酸配列若しくは配列番号３に示されるアミノ酸配列に１～数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であって、植物生長促進物質の生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子

４）配列番号４に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、又は配列番号４に示されるアミノ酸配列の１～数個のアミノ酸が欠失され若しくは置換されたアミノ酸配列若しくは配列番号４に示されるアミノ酸配列に１～数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であって、植物生長促進物質の生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子

5) 配列番号5に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、又は配列番号5に示されるアミノ酸配列の1～数個のアミノ酸が欠失され若しくは置換されたアミノ酸配列若しくは配列番号5に示されるアミノ酸配列に1～数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であって、植物生長促進物質の生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子

(7) 下記の1)～5)の遺伝子の少なくとも1つを発現可能に導入された微生物を増殖させる工程を含む、植物生長促進物質の製造方法。

1) 配列番号1に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、又は配列番号1に示されるアミノ酸配列の1～数個のアミノ酸が欠失され若しくは置換されたアミノ酸配列若しくは配列番号1に示されるアミノ酸配列に1～数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であって、植物生長促進物質の生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子

2) 配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、又は配列番号2に示されるアミノ酸配列の1～数個のアミノ酸が欠失され若しくは置換されたアミノ酸配列若しくは配列番号2に示されるアミノ酸配列に1～数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であって、植物生長促進物質の生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子

3) 配列番号3に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、又は配列番号3に示されるアミノ酸配列の1～数個のアミノ酸が欠失され若しくは置換されたアミノ酸配列若しくは配列番号3に示されるアミノ酸配列に1～数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であって、植物生長促進物質の生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子

4) 配列番号4に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、又は配列番号4に示されるアミノ酸配列の1～数個のアミノ酸が欠失され若しくは置換されたアミノ酸配列若しくは配列番号4に示されるアミノ酸配列に1～数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であって、植物生長促進物質の生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子

5) 配列番号5に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、又は配列番

号5に示されるアミノ酸配列の1～数個のアミノ酸が欠失され若しくは置換されたアミノ酸配列若しくは配列番号5に示されるアミノ酸配列に1～数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であって、植物生長促進物質の生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子

(8) 前記1)～5)の遺伝子の少なくとも3つを有する微生物を増殖させる工程を含む、(6)又は(7)に記載の方法。

(9) 前記1)～5)の全ての遺伝子を有する微生物を増殖させる工程を含む、(6)又は(7)に記載の方法。

(10) 下記1)～3)のいずれかのタンパク質。

1) 配列番号3に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、又は配列番号3に示されるアミノ酸配列の1～数個のアミノ酸が欠失され若しくは置換されたアミノ酸配列若しくは配列番号3に示されるアミノ酸配列に1～数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であって、植物生長促進物質の生合成に関与するタンパク質

2) 配列番号4に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、又は配列番号4に示されるアミノ酸配列の1～数個のアミノ酸が欠失され若しくは置換されたアミノ酸配列若しくは配列番号4に示されるアミノ酸配列に1～数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であって、植物生長促進物質の生合成に関与するタンパク質

3) 配列番号5に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、又は配列番号5に示されるアミノ酸配列の1～数個のアミノ酸が欠失され若しくは置換されたアミノ酸配列若しくは配列番号5に示されるアミノ酸配列に1～数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であって、植物生長促進物質の生合成に関与するタンパク質

(11) (10)に記載のいずれかのタンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸。

(12) (11)に記載の核酸を発現可能に含むベクター。

(13) (11)に記載の核酸又は(12)に記載のベクターで形質転換さ

れた微生物。

発明の効果

[0010] 本発明によれば、PGPC関連遺伝子を有するP23株以外の新たな微生物を利用することができ、植物特にウキクサ科植物の生長を促進させることでバイオマス生産の効率を高めることができる。また、遺伝子工学的手法を用いてPGPC関連遺伝子を導入した組換え微生物を作製することで、植物の生長を促進させることのできる微生物種の範囲を拡大することができる他、PGPCの効率的な生産又は生長促進が期待される植物に合わせた微生物の利用が可能となる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1] P23-2757~2761を含むPGPC/P23遺伝子クラスターをpBBR-1 MCS-2ベクターに組み込んで得られるmcs-novの模式図である。

[図2]組換えを行っていないE. coli、ADP1又はP23株を付着させた後に10日間培養したコウキクサの葉状体数の推移を示すグラフである。

[図3]組換えを行っていないE. coli、ADP1又はP23株を付着させた後に10日間培養したコウキクサのクロロフィル含量を示すグラフである。

[図4]組換えを行っていないE. coli、ADP1又はP23株を付着させた後に10日間培養したコウキクサの葉状体数、湿重量及び根の長さを示すグラフである。

[図5] P23-2757~2761が導入された組換え菌(E. coli mcs-nov、ADP1 mcs-nov)又は空のベクターが導入された組換え菌(ADP1 mcs2)を付着させた後に10日間培養したコウキクサの葉状体数の推移を示すグラフである。

[図6] E. coli mcs-nov、ADP1 mcs-nov又はADP1 mcs2を付着させた後に10日間培養したコウキクサのクロロフィル含量を示すグラフである。

[図7] *E. coli* *mcs-nov*、ADP1 *mcs-nov*又はADP1 *mcs2*を付着させた後に10日間培養したコウキクサの葉状体数、湿重量及び根の長さを示すグラフである。

[図8] P23株、ADP1 *mcs-nov*又はADP1 *mcs2*の培養上清由来多糖を添加した培養液で10日間培養したコウキクサの葉状体数の推移を示すグラフである。

[図9] P23株、ADP1 *mcs-nov*又はADP1 *mcs2*の培養上清由来多糖を添加した培養液で10日間培養したコウキクサの葉状体数、湿重量及び根の長さを示すグラフである。

[図10] P23-2759~2761が導入された組換え菌（ADP1 *mcs-nov3*）、ADP1 *mcs-nov*又はADP1 *mcs2*を付着させた後に10日間培養したコウキクサの葉状体数の推移を示すグラフである。

[図11] ADP1 *mcs-nov3*、ADP1 *mcs-nov*又はADP1 *mcs2*を付着させた後に10日間培養したコウキクサの葉状体数、湿重量及び根の長さを示すグラフである。

[図12] ADP1 *mcs-nov3*、ADP1 *mcs-nov*又はADP1 *mcs2*の培養上清由来多糖を添加した培養液で10日間培養したコウキクサの葉状体数の推移を示すグラフである。

[図13] ADP1 *mcs-nov3*、ADP1 *mcs-nov*又はADP1 *mcs2*の培養上清由来多糖を添加した培養液で10日間培養したコウキクサの葉状体数、湿重量及び根の長さを示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0012] 本発明の第1の態様は、下記の1)~5)の遺伝子の少なくとも1つを発現可能に有する微生物（ただしP23株を除く）を植物と共存させる工程を含む、植物の生長を促進する方法に関する。

1) 配列番号1に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、又は配列番号1に示されるアミノ酸配列の1~数個のアミノ酸が欠失され若しくは置換

されたアミノ酸配列若しくは配列番号 1 に示されるアミノ酸配列に 1 ～数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であって、P G P C の生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子

2) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、又は配列番号 2 に示されるアミノ酸配列の 1 ～数個のアミノ酸が欠失され若しくは置換されたアミノ酸配列若しくは配列番号 2 に示されるアミノ酸配列に 1 ～数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であって、P G P C の生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子

3) 配列番号 3 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、又は配列番号 3 に示されるアミノ酸配列の 1 ～数個のアミノ酸が欠失され若しくは置換されたアミノ酸配列若しくは配列番号 3 に示されるアミノ酸配列に 1 ～数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であって、P G P C の生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子

4) 配列番号 4 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、又は配列番号 4 に示されるアミノ酸配列の 1 ～数個のアミノ酸が欠失され若しくは置換されたアミノ酸配列若しくは配列番号 4 に示されるアミノ酸配列に 1 ～数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であって、P G P C の生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子

5) 配列番号 5 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、又は配列番号 5 に示されるアミノ酸配列の 1 ～数個のアミノ酸が欠失され若しくは置換されたアミノ酸配列若しくは配列番号 5 に示されるアミノ酸配列に 1 ～数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であって、P G P C の生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子

[0013] P 2 3 株は、植物、特にウキクサ科植物の生長を促進する作用を有する P G P B の一種で、グルコース、ガラクトース及び N - アセチルグルコサミンを構成成分として含む多糖類（以下、P G P C / P 2 3 と表す）を産生する。

[0014] 配列番号 1 ～ 5 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質は、P 2 3 株

からクローニングされた、PGPC/P23の生合成に関与するPGPC関連遺伝子クラスターを構成する5つの遺伝子にそれぞれコードされているタンパク質、すなわちPGPCの生合成に関与するタンパク質である。以下、PGPC/P23の生合成に関与するPGPC関連遺伝子クラスターをPGPC/P23遺伝子クラスターと表す。PGPC/P23遺伝子クラスターを含むP23株のゲノム塩基配列はデータベースDDBJ/EMBL/GenBankにアクセッション番号BBQU01000012で登録されており、クローニングされたPGPC/P23遺伝子クラスターの塩基配列（配列番号6）は、上記アクセッション番号で登録されている塩基配列の102, 725～107, 026番目に相当する。

[0015] 配列番号1に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質は、その特徴的なモチーフ配列などから、グリコシルトランスフェラーゼの一種であると推察される。P23株におけるこのタンパク質をコードする遺伝子は、遺伝子名P23__2757、アクセッション番号GAM32233として登録されており、配列番号6の130～951番目の塩基配列に相補する塩基配列に相当する。P23__2757は、P23__2758及びP23__2759の転写方向とは逆向きに配置されている。

[0016] 配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質は他のタンパク質と協同してPGPC/P23の生合成に関与しているタンパク質である。P23株におけるこのタンパク質をコードする遺伝子は、遺伝子名P23__2758、アクセッション番号GAM32234として登録されており、配列番号6の1, 461～1, 673番目の塩基配列に相当する。

[0017] 配列番号3に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質は、その特徴的なモチーフ配列などから、マンノシルトランスフェラーゼの一種であると推察される。P23株におけるこのタンパク質をコードする遺伝子は、遺伝子名P23__2759、アクセッション番号GAM32235として登録されており、配列番号6の1, 709～2, 629番目の塩基配列に相当する。

[0018] 配列番号4に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質は、その特徴的な

モチーフ配列などから、グリコシルトランスフェラーゼの一種であると推察される。P 2 3 株におけるこのタンパク質をコードする遺伝子は、遺伝子名 P 2 3 __ 2 7 6 0、アクセッション番号 G A M 3 2 2 3 6 として登録されており、配列番号 6 の 2, 6 4 1 ~ 3, 5 8 2 番目の塩基配列に相補する塩基配列に相当する。P 2 3 __ 2 7 6 0 は、P 2 3 __ 2 7 5 8 及び P 2 3 __ 2 7 5 9 の転写方向とは逆向きに配置されている。

[0019] 配列番号 5 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質は、その特徴的なモチーフ配列などから、グリコシルトランスフェラーゼの一種であると推察される。P 2 3 株におけるこのタンパク質をコードする遺伝子は、遺伝子名 P 2 3 __ 2 7 6 1、アクセッション番号 G A M 3 2 2 3 7 として登録されており、配列番号 6 の 3, 6 2 4 ~ 4, 2 6 2 番目の塩基配列に相補する塩基配列に相当する。P 2 3 __ 2 7 6 1 は、P 2 3 __ 2 7 5 8 及び P 2 3 __ 2 7 5 9 の転写方向とは逆向きに配置されている。

[0020] P G P C / P 2 3 遺伝子クラスターを構成する上記 5 つの遺伝子について、N C B I B L A S T で相同性検索を行った結果を表 1 に示す。表中、枠で囲われた遺伝子 P 2 3 __ 2 7 5 9 ~ 2 7 6 1 は既知遺伝子との配列同一性が低く、新規の遺伝子であると考えられる。P 2 3 __ 2 7 5 9 ~ 2 7 6 1 はまた、P 2 3 株と同様にフェノール分解能を持つ近縁種であるアシネトバクター・カルコアセティカス P H E A - 2 及びアシネトバクター・カルコアセティカス L B ' - 3 のゲノム配列上には見出されない、又は配列同一性が低いことが確認されている。

[表1]

Gene ID	Description	Identity
P23_2757	glycosyltransferase [<i>Acinetobacter oleivorans</i> DR1]	96%
P23_2758	hypothetical protein [<i>Acinetobacter oleivorans</i> DR1]	99%
P23_2759	mannosyltransferase OCH1-like enzyme [<i>Acinetobacter</i> sp. HA]	47%
P23_2760	glycosyl transferase family protein [<i>Flavobacterium</i> sp. F52]	37%
P23_2761	glycosyl transferase [<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1]	57%

[0021] 本発明の第 1 の態様は、P 2 3 株を除く微生物であって、配列番号 1 ~ 5 のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子又はこれらと同等の

タンパク質をコードする遺伝子の少なくとも1つを発現可能に有する微生物を植物と共存させる工程を含む。

[0022] 上記「同等のタンパク質をコードする遺伝子」とは、配列番号1～5に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質に関連して、各タンパク質と実質的に同等のタンパク質をコードする遺伝子であり、具体的には、次の通りである。

[0023] ・配列番号1に示されるアミノ酸配列の1～数個のアミノ酸が欠失され若しくは置換されたアミノ酸配列又は配列番号1に示されるアミノ酸配列に1～数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であって、P G P Cの生合成に関与するタンパク質、特にグリコシルトランスフェラーゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子。

・配列番号2に示されるアミノ酸配列の1～数個のアミノ酸が欠失され若しくは置換されたアミノ酸配列又は配列番号2に示されるアミノ酸配列に1～数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であって、P G P Cの生合成に関与するタンパク質タンパク質をコードする遺伝子。

・配列番号3に示されるアミノ酸配列の1～数個のアミノ酸が欠失され若しくは置換されたアミノ酸配列又は配列番号3に示されるアミノ酸配列に1～数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であって、P G P Cの生合成に関与するタンパク質、特にマンノシルトランスフェラーゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子。

・配列番号4に示されるアミノ酸配列の1～数個のアミノ酸が欠失され若しくは置換されたアミノ酸配列又は配列番号4に示されるアミノ酸配列に1～数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であって、P G P Cの生合成に関与するタンパク質、特にグリコシルトランスフェラーゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子。

・配列番号5に示されるアミノ酸配列の1～数個のアミノ酸が欠失され若しくは置換されたアミノ酸配列又は配列番号5に示されるアミノ酸配列に1～数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であって、P

G P Cの生合成に関与するタンパク質、特にグリコシルトランスフェラーゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子。

[0024] 微生物は、配列番号1～5のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子又はこれらと同等のタンパク質をコードする遺伝子のうちの少なくとも3つを発現可能に有する微生物が好ましく、配列番号1～5のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子又はこれらと同等のタンパク質をコードする遺伝子のうちの少なくとも4つを発現可能に有する微生物がより好ましく、配列番号1～5のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子又はこれらと同等のタンパク質をコードする遺伝子のうちの5つ全てを発現可能に有する微生物がさらに好ましい。

[0025] P 2 3株が産生するP G P C / P 2 3は、グルコース、ガラクトース及びN－アセチルグルコサミンを構成成分として含む多糖類である。この多糖類は、配列番号1～5の各アミノ酸配列からなるタンパク質の関与により生合成されていると推察される。本発明の第1の態様においては、P G P C / P 2 3遺伝子クラスターを構成する各遺伝子と同一の遺伝子を有する微生物に限らず、上記タンパク質と同等のタンパク質をコードする遺伝子を有する微生物も利用することができる。かかる同等の遺伝子を有する微生物が産生するP G P Cは、P G P C / P 2 3とは少なくとも一部の構造が異なるP G P Cであって、P G P C / P 2 3と同様の植物に対する生長促進作用を示すものであり得る。

[0026] 微生物を植物と共存させるとは、微生物と植物とを同じ媒体中に存在させることを意味し、微生物が産生するP G P Cが植物に接触することができる限り、微生物と植物とが直接的に接触することを必要としない。例えば、P G P Cは透過できるが微生物自身は透過できない程度の孔径を持つフィルターで微生物と植物とを隔てて存在させることも、本発明における「微生物を植物と共存させる」に包含される。

[0027] 「微生物を植物と共存させる」の具体例は、例えば前記微生物が懸濁された液体例えば微生物を培養若しくは懸濁した培養液に植物の根を浸すこと、

又は前記微生物の培養液を練り込んだ適当な土壌に植物を植えることなどが挙げられる。特に、微生物を培養又は懸濁した培養液に植物の根を浸すことが好ましく、微生物を懸濁した培養液に植物の根を浸して微生物を根に定着させた後に植物を生長させる、又はかかる培養液に植物の根を浸したまま植物を生長させることが特に好ましい。また、屋外で生息中の水生植物に対して本発明を適用する場合は、植物が生息している水に前記微生物の培養液を混合するなどしてもよい。微生物の数としては、 $10^4 \sim 10^{10}$ 細胞/mL、好ましくは $10^6 \sim 10^8$ 細胞/mLとすればよい。

[0028] 微生物と共存させる植物の部位は、微生物が産生するPGPCを感知あるいは吸収することができる部位である限り制限はなく、葉、茎、根（葉状体を含む）などのいずれの部位を微生物と共存させてもよいが、よりPGPC吸収能が高い部位、例えば植物の葉又は根を微生物と共存させることが好ましい。

[0029] 本発明の第1の態様において利用可能な微生物は、PGPC/P23遺伝子クラスター全体の塩基配列（配列番号6）若しくはこれを構成する各遺伝子の塩基配列をクエリーとした、微生物のゲノム情報に対する相同性検索などのインシリコスクリーニングによって、又は前記塩基配列を有する適当な核酸分子を用いた微生物ゲノムDNAに対するハイブリダイゼーション法などによって候補微生物を選択し、さらに例えば前記候補微生物を懸濁した培養液を用いてコウキクサを生長させて、コウキクサの生長が促進されることを確認することで、選択することができる。

[0030] 植物の生長促進は、植物個体の重量、葉又は葉状体の枚数などの植物の生長度合いの指標について、本発明にかかる微生物を利用せずに植物を生長させたときと比較して、本発明にかかる微生物を利用して植物を生長させたときに生ずる差、例えば植物個体の重量が増加する、葉の枚数が増加するなどを観察することによって確認することができる。具体例としては、適当数例えば葉状体数として10～20枚のコウキクサを浮かべたホーランド（Hoagland）培地などの植物培養液に微生物を添加して28℃で一日イ

ンキュベートした後に、葉状体2枚ずつを新しい植物培養液に移し、さらに10日間ほど生長させた後に葉状体数を数え、微生物を添加しないコントロールにおける葉状体数との差を確認すればよい。

[0031] 本発明の第1の態様の方法が適用される植物としては、浮遊性、抽水性あるいは沈水性などの水生植物、特にウキクサ科植物が好ましい。ウキクサ科植物の例としては、アオウキクサ (*Lemna*) 属植物例えばコウキクサ (*L. minor*)、*L. dispersa* (*L. disperma*)、*L. ecuatoriensis* (*L. ecuadoriensis*)、イボウキクサ、*L. japonica* (*L. japonica*)、*L. miniscula* (*L. miniscula*)、*L. obscura* (*L. obscura*)、*L. perpusilla* (*L. perpusilla*)、*L. tenera* (*L. tenera*)、ヒンジモ (*L. trisulca*) (*L. trisulca*)、*L. turionifera* (*L. turionifera*)、チリウキクサ (*L. valdiviana*) など、スピロデラ (*Spirodel*) 属植物例えば *S. intermedia* (*S. intermedia*)、*S. punctata* (*S. punctata*)、ミジンコウキクサ (*Wolffia*) 属植物例えば *Wa. angusta* (*Wa. angusta*)、*Wa. arrhiza* (*Wa. arrhiza*)、*Wa. australina* (*Wa. australina*)、*Wa. borealis* (*Wa. borealis*)、*Wa. brasiliensis* (*Wa. brasiliensis*)、*Wa. columbiana* (*Wa. columbiana*)、*Wa. elongata* (*Wa. elongata*)、*Wa. globosa* (*Wa. globosa*)、*Wa. microscopica* (*Wa. microscopica*)、*Wa. neglecta* (*Wa. neglecta*)、*Wolffiella* (*Wolffiella*) 属植物例えば *Wl. caudata* (*Wl. caudata*)、*Wl. denticulata* (*Wl. denticulata*)、*Wl. gladiata* (*Wl. gladiata*)、*Wl. hyalina* (*Wl. hyalina*)、*Wl. lingulata* (*Wl. lingulata*)、*Wl. repunda* (*Wl. repunda*)、*Wl. rotunda* (*Wl. rotunda*)、及び *Wl. neotropica* (*Wl. neotropica*)

W l . n e o t r o p i c a) 及びランドルティア (L a n d o l t i a) 属植物例えば L . ポンクタタ (L . p u n c t a t a) などを挙げることができる。

[0032] 本発明の第2の態様は、下記の1)～5)の遺伝子の少なくとも1つを発現可能に導入された微生物を植物と共存させる工程を含む、植物の生長を促進する方法に関する。

1) 配列番号1に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、又は配列番号1に示されるアミノ酸配列の1～数個のアミノ酸が欠失され若しくは置換されたアミノ酸配列若しくは配列番号1に示されるアミノ酸配列に1～数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であって、P G P Cの生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子

2) 配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、又は配列番号2に示されるアミノ酸配列の1～数個のアミノ酸が欠失され若しくは置換されたアミノ酸配列若しくは配列番号2に示されるアミノ酸配列に1～数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であって、P G P Cの生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子

3) 配列番号3に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、又は配列番号3に示されるアミノ酸配列の1～数個のアミノ酸が欠失され若しくは置換されたアミノ酸配列若しくは配列番号3に示されるアミノ酸配列に1～数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であって、P G P Cの生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子

4) 配列番号4に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、又は配列番号4に示されるアミノ酸配列の1～数個のアミノ酸が欠失され若しくは置換されたアミノ酸配列若しくは配列番号4に示されるアミノ酸配列に1～数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であって、P G P Cの生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子

5) 配列番号5に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、又は配列番号5に示されるアミノ酸配列の1～数個のアミノ酸が欠失され若しくは置換

されたアミノ酸配列若しくは配列番号5に示されるアミノ酸配列に1～数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であって、PGPCの生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子

[0033] 本発明の第2の態様における「微生物を植物と共存させる工程」及び植物に対する生長促進作用を確認する手段は、本発明の第1の態様において説明したとおりである。

[0034] 本発明の第2の態様は、配列番号1～5に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子又はこれらと同等のタンパク質をコードする遺伝子の少なくとも1つを発現可能に導入された微生物を植物と共存させる工程を含む。

[0035] 微生物は、配列番号1～5に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子又はこれらと同等のタンパク質をコードする遺伝子のうちの少なくとも3つが導入された微生物が好ましく、配列番号1～5に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子又はこれらと同等のタンパク質をコードする遺伝子のうちの少なくとも4つが導入された微生物がより好ましく、配列番号1～5に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子又はこれらと同等のタンパク質をコードする遺伝子のうちの5つ全てが導入された微生物がさらに好ましい。特に好ましくは、配列番号6に示される塩基配列からなる核酸が導入された微生物である。組み換える前の微生物が配列番号1～5に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子及びこれらと同等のタンパク質をコードする遺伝子の幾つかを既に有しているときは、それら以外のタンパク質をコードする遺伝子を選択して導入すればよい。

[0036] 複数の遺伝子を導入するときは、1のベクターに1又は複数の遺伝子を組み込んで導入することができる。例えば5つ全ての遺伝子を導入する場合、遺伝子を個別に組み込んだ5のベクター、複数の遺伝子を組み込んだ複数のベクター、5つ全ての遺伝子を組み込んだ1のベクターのいずれも用いることができる。ベクターの導入は、ベクター毎に連続して行ってもよく、ベク

ターの混合物を用いて同時に行ってもよい。

[0037] 第2の態様において利用される微生物は、外来遺伝子の機能的発現を可能にする適当な宿主ベクター系が知られており、かつ安全性の高い微生物であることが好ましい。そのような微生物としては、非病原性大腸菌、枯草菌、酵母、PGPB例えばアシネトバクター属微生物、シュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*) などのシュードモナス属微生物、セラチア・ホンチコラ (*Serratia fonticola*) などのセラチア属微生物、又はPGPF例えばリゾクトニア・ソラニ (*Rhizoctonia solani*)、フザリウム属微生物又はペニシリウム属微生物などを挙げることができる。また、PGPCを生産しないアシネトバクター属微生物、例えばアシネトバクター・ベイリ (*Acinetobacter baylyi*) などにも利用可能である。特に好ましい微生物は非病原性大腸菌、シュードモナス・プチダ及びアシネトバクター・ベイリである。

[0038] 配列番号1～5に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質又はこれらと同等のタンパク質をコードする遺伝子は、宿主となる微生物で発現可能な状態で導入されている限り、それぞれ異なるプロモーター配列その他の遺伝子の転写を調節する塩基配列（以下、転写調節領域と表す）の制御下にあるように導入されてもよく、又は複数の遺伝子が一種類の転写調節領域の支配下にあるように導入されてもよい。

[0039] また、転写調節領域は、宿主となる微生物ごとに公知の転写調節領域を選択して使用してもよいが、配列番号1～5に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質又はこれらと同等のタンパク質をコードする遺伝子をPGPB又はPGPFからクローニングして利用するときは、それぞれに固有の転写調節領域をそのまま使用してもよい。固有の転写調節領域を含む核酸の例は、配列番号6に示される塩基配列からなる核酸である。同様に、配列番号3～5に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質又はこれらと同等のタンパク質をコードする遺伝子をPGPB又はPGPFからクローニングして利用するときは、それぞれに固有の転写調節領域をそのまま使用してもよい。固有

の転写調節領域を含む核酸の例は、配列番号 7 に示される塩基配列からなる核酸である。

[0040] 本発明の第 2 の態様にかかる微生物は、前記遺伝子をコードする塩基配列を含む核酸又はこれを組み込んだ発現ベクターによって前記微生物を形質転換した、組換え微生物である。発現ベクターは宿主内で前記遺伝子を一過性又は安定的に発現させることができるベクターであり、宿主となる微生物に応じて、例えばプラスミドベクター、ファージベクター、コスミドベクターなどから適宜選択すればよい。また例えば pBBR-1 MCS-2 などの広域宿主発現ベクターを利用することもできる。

[0041] 核酸の調製、組換え、微生物の形質転換などの実験的操作は、いずれも当業者に公知又は周知の手法、例えば Sambrook らによる「Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd. edition」(1989 年、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、N. Y.) その他の、当分野の教科書又はハンドブックに記載され、当業者に広く利用されている手法を用いて行うことができる。また、市販のキットや試薬の使用を伴う手順は、当該キットや試薬の製造者が定めたプロトコル及び／又はパラメータに従って行えばよい。

[0042] 本発明の第 3 の態様は、前記第 1 の態様で説明した微生物（ただし P23 株を除く）を増殖させる工程を含む、PGPC すなわち植物生長促進物質の製造方法に関する。また、本発明の第 4 の態様は、前記第 2 の態様で説明した組換え微生物を増殖させる工程を含む、PGPC の製造方法に関する。

[0043] 第 3 の態様及び第 4 の態様いずれの方法も、前記第 1 の態様で説明した微生物（ただし P23 株を除く）又は前記第 2 の態様で説明した組換え微生物を適当な培地を用いて増殖させることにより、微生物に PGPC を生産させる方法である。

[0044] PGPC／P23 は、液体培地で増殖させた上記微生物の菌体を除去した培養上清に硫酸アンモニウム等を加えた塩濃度 50 % での塩析、沈殿物に水

を添加した後の脱塩、フェノールを添加した攪拌抽出による除タンパク質、抽出後の水層に塩化ナトリウム及び1～5倍量程度のエタノールを加えたエタノール沈殿、及び沈殿物に水を添加した後の脱塩によって調製することができる。PGPC/P23以外のPGPCも、この方法又はこの方法に準じて調製することができる。また、PGPCの植物に対する生長促進作用は、前記第1の態様において植物の生長促進を確認する方法に従い、微生物の代わりに適当量の例えば5～20 µg/mLとなるような量のPGPCを添加することで確認することができる。

[0045] 上記方法で調製されたPGPCは、適当量の液体、例えば水若しくは緩衝液に懸濁若しくは溶解した状態で保存してもよく、又は凍結乾燥させて保存してもよい。

[0046] 本発明の第5の態様は、前記第2の態様において説明した配列番号3～5に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質及びこれらと同等のタンパク質に関する。また、かかるタンパク質をコードする核酸、該核酸を発現可能に含む発現ベクター、該核酸又は発現ベクターで形質転換された微生物も本発明として提供される。発現ベクター又は微生物の種類は、前記第2の態様において説明したとおりであり、核酸の調製、組換え、微生物の形質転換などの実験的操作も、本発明の第2の態様で説明したとおりに当業者に広く利用されている手法を用いて行うことができる。

[0047] 以下の実施例によって本発明をさらに詳細に説明する。

実施例

[0048] <実施例1> PGPC/P23 遺伝子クラスターのクローニング及び組換え菌の作製

データベースDDBJ/EMBL/GenBankにアクセッション番号BBQU01000012で登録されているP23株のゲノム塩基配列を元に、P23-2757～2761の5つの遺伝子を含む配列番号6に示される塩基配列を増幅できるように、配列番号8及び9に示される塩基配列からなるプライマーセット(Fnov及びRp23nov)を作製した。

[0049] *A. calcoaceticus* P23の培養菌体から調製したゲノムDNAに対して前記プライマーセット及びKODポリメラーゼを用いたPCRを行い、約4.5 kbpの増幅断片を得た。これを制限酵素SmaIで開環させた広域宿主ベクターpBBR-1 MCS-2 (Kovach ME ら Gene、1995年、第166巻、第175～176ページ) に組み込んで、P23-2757～2761の5つの遺伝子を有するプラスミドmcs-novを作製した。このプラスミドのインサート部分について塩基配列解析を行い、図1に示す方向で5つの遺伝子が導入されていることを確認した。

[0050] プラスミドmcs-novを塩化カルシウム法で*E. coli* DH5 α 株に導入して形質転換させ、P23-2757～2761の5つの遺伝子を有する組換え菌*E. coli* mcs-novを作製した。さらに、*E. coli* mcs-novをLB培地で培養して菌体からプラスミドを回収し、これを*A. baylyi* ADP-1に導入して、組換え菌ADP1 mcs-novを作製した。上記5遺伝子を持たない空のベクターpBBR-1 MCS-2を導入した*A. baylyi* ADP1 (ADP1 mcs2) も同様に作製した。

[0051] <実施例2>組換え菌の植物生長促進活性評価

実施例1で作製した*E. coli* mcs-nov、ADP1 mcs-nov及びADP1 mcs2の各組換え菌、並びに組換えを行っていない*E. coli*、ADP1株及びP23株について、コウキクサに対する生長促進活性の評価を行った。

[0052] 2-1. 組換えを行っていない*E. coli*、ADP1株及びP23株の評価

100 mL容の培養フラスコにホーランド培地50 mLを分注し、これにホーランド培地中で予め培養した滅菌コウキクサの葉状体20枚を入れた。組換えを行っていない*E. coli*、ADP1株及びP23株を最終OD=0.3 (約 10^8 細胞/mL) になるように接種した後、3日間培養した

。培養条件を以下に示す。以降、特に指定がない限り、同じ条件で培養を行った。

植物培養液：ホーランド培地（表2）

[表2]

植物培養液 (Hoagland medium)	
Ingredients	mg/L
KNO ₃	36.1
NaH ₂ PO ₄	3.87
K ₂ SO ₄	298
MgSO ₄ ·7H ₂ O	103
CaCl ₂ ·2H ₂ O	147
FeSO ₄ ·7H ₂ O	3.33
H ₃ BO ₃	0.95
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.39
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.03
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.08
H ₂ MoO ₄ ·4H ₂ O	0.254
pH 7.0, adjust with NaOH	

温度：28℃

相対湿度：60～70%

16時間の明期（5000ルクス）／8時間の暗期

[0053] 培養終了後、40mLの新たなホーランド培地を入れたチューブに植物を移し、チューブを2回反転させることにより非付着菌を洗浄除去した。この洗浄操作を2回行った後、2枚の葉状体を有する1個の植物体を、50mLのホーランド培地を分注した100mL容培養フラスコに移し、10日間培養した。培養期間中は葉状体の数を2日毎に計数し、試験終了時にクロロフィル含量、植物の湿重量及び根の長さを測定した。クロロフィル含量の測定は、Suzuki Wら、J Biosci Bioeng. 118（1）：41－4に記載の方法により行った。

[0054] 結果を図2～図4に示す。既に報告されているように、P23株を付着させて培養したコウキクサは、菌を付着させずに培養したコントロール及びE

、*E. coli* 又は ADP1 を付着させて培養した場合と比べて、葉状体の数、クロロフィル含量、湿重量が大きく増加した。なお、根に付着した菌数は、P23 株及び ADP1 が約 10^6 cfu/植物個体、*E. coli* が約 10^4 cfu/植物個体であった。

[0055] 2-2. 組換え菌の評価

E. coli mcs-nov、ADP1 mcs-nov 及び ADP1 mcs2 が有する植物生長促進活性について、使用するホーグランド培地にカナマイシン（終濃度 100 ng/mL ）及び IPTG（終濃度 0.5 mM ）を添加した以外は上記 2-1. と同様の方法で評価した。

[0056] 結果を図 5～図 7 に示す。*E. coli* mcs-nov 又は ADP1 mcs-nov を付着させて培養したコウキクサは、菌を付着させずに培養したコントロール及び空ベクターを導入した ADP1 mcs2 を付着させて培養した場合と比べて、葉状体の数、クロロフィル含量及び湿重量が増加し、その傾向は ADP1 mcs-nov において特に顕著であった。ADP1 mcs-nov では根の長さの増加も観察された。この結果から、P23-2757～2761 を導入された菌は、植物生長促進活性を有することが示された。

[0057] <実施例 3>組換え菌により産生された多糖の植物生長促進活性評価

P23 株並びに実施例 1 で作製した ADP1 mcs2 及び ADP1 mcs-nov を、表 3 に示す M9S 培地中で、 30°C 、3 日間、 120 rpm で振盪しながら培養し、 1.5 L の培養上清を得た。

[表3]

M9S medium pH=7.2 (g/L)	
Ingredients	g/L
Na ₂ HPO ₄ -7H ₂ O	12.8
KH ₂ PO ₄	3.0
NaCl	0.5
NH ₄ Cl	1.0
MgSO ₄ -7H ₂ O	0.494
CaCl ₂ -2H ₂ O	0.0147
Thiamine	0.005
Succinate	2.0

この培養上清に313gの硫酸アンモニウム（50%飽和）を加え、4℃で一晩置いた後、遠心分離（8000rpm、15分間、4℃）により沈殿を回収した。沈殿を20mLのMilliQ水に懸濁し、3LのMilliQ水に対して透析を行った。透析中、少なくとも5回水を交換した。透析後、予め65℃に加温した90%フェノール20mLを加え、激しく攪拌した後、65℃で15分間維持した後、氷浴中で冷却し、遠心分離（5000rpm、30分間、10℃）により層を分離した。水層を回収し、残ったフェノール層及び中間層に予め65℃に加熱した水を加え、上記のフェノール抽出操作を再度行った。回収した水層を合わせ、10分の1量の1M NaCl及び5倍量の冷エタノールを加えた後、遠心分離（7500rpm、15分間、4℃）により沈殿を回収した。沈殿を70%エタノールで2回洗浄した後、MilliQ水に懸濁し、PD-10カラム（GEヘルスケア社製）により脱塩した。これを凍結乾燥して、多糖抽出物（PS）を得た。P23株の培養上清から得たPSは6mg、ADP1 mcs2の培養上清から得たPSは1.5mg、ADP1 mcs-nov培養上清から得たPSは2.0mgであった。

[0058] 次に、これらのPSの植物生長促進活性を評価した。評価は、菌を接種する代わりにPSを終濃度10μg/mLで添加した以外は、上記2-1.

と同様の方法で実施した。

[0059] 結果を図8及び図9に示す。ADP1 mcs-novのPSは、菌を接種せずに培養したコントロール及びADP1 mcs2のPSと比べて、コウキクサの葉状体数、湿重量及び根の長さを増加させ、その活性の強さはP23株のPSと同等であった。この結果から、P23-2757~2761の導入により、P23のPGPCと同等の活性を持つPGPCの産生が誘導されることが示された。

[0060] <実施例4> P23-2759~2761の3遺伝子を導入した組換え菌の作製

実施例1と同様に、P23-2759~2761の3つの遺伝子を含む領域を配列番号10及び9に示される塩基配列からなるプライマーセット(Fp23nov及びRp23nov)を用いたPCRで増幅し、制限酵素SmaIで開環させた広域宿主ベクターpBBR-1 MCS-2に組み込んで、プラスミドmcs-nov3を作製し、これをA. baylyi ADP-1に導入して、組換え菌ADP1 mcs-nov3を作製した。プラスミドmcs-nov3中の前記3遺伝子の向きは、プラスミドmcs-novのそれと同じであった。

[0061] <実施例5> P23-2759~2761の3遺伝子を有する組換え菌の植物生長促進活性評価

ADP1 mcs-nov3、ADP1 mcs-nov及びADP1 mcs2が有する植物生長促進活性について、ホーランド培地に添加するIPTGの終濃度を0.02mMとした以外は実施例2の2-2.と同様の方法で評価した。結果を図10及び図11に示す。ADP1 mcs-nov3を付着させて培養したコウキクサは、ADP1 mcs-novを付着させて培養した場合には及ばないものの、菌を付着させずに培養したコントロール及び空ベクターを導入したADP1 mcs2を付着させて培養した場合と比べて葉状体の数及び湿重量が増加した。また、プラスミドmcs-nov3をE. coliに導入して得た組換え菌についても同様の傾向が認

められた。この結果から、P 2 3 - 2 7 5 9 ~ 2 7 6 1 を導入された菌もまた、植物生長促進活性を有することが示された。

[0062] <実施例 6> P 2 3 - 2 7 5 9 ~ 2 7 6 1 の 3 遺伝子を有する組換え菌により産生された多糖の植物生長促進活性評価

A D P 1 m c s - n o v 3、A D P 1 m c s - n o v 及び A D P 1 m c s 2 を、カナマイシン（終濃度 $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ ）及び I P T G（終濃度 1mM ）を添加した 300mL の M 9 S 培地中で、 30°C 、3 日間、 110rpm で振盪しながら培養し、遠心分離及びろ過により培養上清を得た。この培養上清を硫酸アンモニウム沈殿（ 50% 飽和）、透析、凍結乾燥、熱フェノール抽出処理に順に供し、多糖抽出物（P S）を得た。個々の操作は実施例 3 と同様に行った。A D P 1 m c s - n o v の培養上清から得た P S は 2.5mg 、A D P 1 m c s - n o v 3 の培養上清から得た P S は 2.3mg 、A D P 1 m c s 2 の培養上清から得た P S は 2.0mg であった。

[0063] 次いで、これらの P S の植物生長促進活性を実施例 3 と同様に評価した。結果を図 1 2 及び図 1 3 に示す。A D P 1 m c s - n o v 3 の P S は、A D P 1 m c s - n o v の P S と同じように、菌を接種せずに培養したコントロール及び A D P 1 m c s 2 の P S と比べてコウキクサの葉状体数、湿重量及び根の長さを増加させた。この結果から、P 2 3 - 2 7 5 9 ~ 2 7 6 1 の導入によって、P 2 3 - 2 7 5 7 ~ 2 7 6 1 の導入と同程度に P G P C の産生が誘導されることが示された。

産業上の利用可能性

[0064] 本発明は、P G P C 関連遺伝子を有する P 2 3 株以外の新たな微生物、又は遺伝子工学的手法を用いて P G P C 関連遺伝子を導入した組換え微生物を利用することで植物の生長を促進させることができ、バイオマス生産における産業上の利用可能性を有する。

請求の範囲

[請求項1] 下記の１）～５）の遺伝子の少なくとも１つを発現可能に有する微生物（ただしアシネトバクター・カルコアセティカス P 2 3を除く）を植物と共存させる工程を含む、植物の生長を促進する方法。

１）配列番号１に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、又は配列番号１に示されるアミノ酸配列の１～数個のアミノ酸が欠失され若しくは置換されたアミノ酸配列若しくは配列番号１に示されるアミノ酸配列に１～数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であって、植物生長促進物質の生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子

２）配列番号２に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、又は配列番号２に示されるアミノ酸配列の１～数個のアミノ酸が欠失され若しくは置換されたアミノ酸配列若しくは配列番号２に示されるアミノ酸配列に１～数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であって、植物生長促進物質の生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子

３）配列番号３に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、又は配列番号３に示されるアミノ酸配列の１～数個のアミノ酸が欠失され若しくは置換されたアミノ酸配列若しくは配列番号３に示されるアミノ酸配列に１～数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であって、植物生長促進物質の生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子

４）配列番号４に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、又は配列番号４に示されるアミノ酸配列の１～数個のアミノ酸が欠失され若しくは置換されたアミノ酸配列若しくは配列番号４に示されるアミノ酸配列に１～数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であって、植物生長促進物質の生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子

5) 配列番号5に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、又は配列番号5に示されるアミノ酸配列の1～数個のアミノ酸が欠失され若しくは置換されたアミノ酸配列若しくは配列番号5に示されるアミノ酸配列に1～数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であって、植物生長促進物質の生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子

[請求項2]

下記の1)～5)の遺伝子の少なくとも1つを発現可能に導入された微生物を植物と共存させる工程を含む、植物の生長を促進する方法。

1) 配列番号1に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、又は配列番号1に示されるアミノ酸配列の1～数個のアミノ酸が欠失され若しくは置換されたアミノ酸配列若しくは配列番号1に示されるアミノ酸配列に1～数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であって、植物生長促進物質の生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子

2) 配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、又は配列番号2に示されるアミノ酸配列の1～数個のアミノ酸が欠失され若しくは置換されたアミノ酸配列若しくは配列番号2に示されるアミノ酸配列に1～数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であって、植物生長促進物質の生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子

3) 配列番号3に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、又は配列番号3に示されるアミノ酸配列の1～数個のアミノ酸が欠失され若しくは置換されたアミノ酸配列若しくは配列番号3に示されるアミノ酸配列に1～数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であって、植物生長促進物質の生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子

4) 配列番号4に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、又は

配列番号4に示されるアミノ酸配列の1～数個のアミノ酸が欠失され若しくは置換されたアミノ酸配列若しくは配列番号4に示されるアミノ酸配列に1～数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であって、植物生長促進物質の生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子

5) 配列番号5に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、又は配列番号5に示されるアミノ酸配列の1～数個のアミノ酸が欠失され若しくは置換されたアミノ酸配列若しくは配列番号5に示されるアミノ酸配列に1～数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であって、植物生長促進物質の生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子

[請求項3] 前記1)～5)の遺伝子の少なくとも3つを有する微生物を植物と共存させる工程を含む、請求項1又は2に記載の方法。

[請求項4] 前記1)～5)の全ての遺伝子を有する微生物を植物と共存させる工程を含む、請求項1又は2に記載の方法。

[請求項5] 植物がウキクサ科植物である、請求項1～4のいずれかに記載の方法。

[請求項6] 下記の1)～5)の遺伝子の少なくとも1つを発現可能に有する微生物(ただしアシネトバクター・カルコアセティカス P23を除く)を増殖させる工程を含む、植物生長促進物質の製造方法。

1) 配列番号1に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、又は配列番号1に示されるアミノ酸配列の1～数個のアミノ酸が欠失され若しくは置換されたアミノ酸配列若しくは配列番号1に示されるアミノ酸配列に1～数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であって、植物生長促進物質の生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子

2) 配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、又は配列番号2に示されるアミノ酸配列の1～数個のアミノ酸が欠失され

若しくは置換されたアミノ酸配列、若しくは配列番号2に示されるアミノ酸配列に1～数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であって、植物生長促進物質の生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子

3) 配列番号3に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、又は配列番号3に示されるアミノ酸配列の1～数個のアミノ酸が欠失され若しくは置換されたアミノ酸配列若しくは配列番号3に示されるアミノ酸配列に1～数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であって、植物生長促進物質の生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子

4) 配列番号4に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、又は配列番号4に示されるアミノ酸配列の1～数個のアミノ酸が欠失され若しくは置換されたアミノ酸配列若しくは配列番号4に示されるアミノ酸配列に1～数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であって、植物生長促進物質の生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子

5) 配列番号5に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、又は配列番号5に示されるアミノ酸配列の1～数個のアミノ酸が欠失され若しくは置換されたアミノ酸配列若しくは配列番号5に示されるアミノ酸配列に1～数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であって、植物生長促進物質の生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子

[請求項7]

下記の1)～5)の遺伝子の少なくとも1つを発現可能に導入された微生物を増殖させる工程を含む、植物生長促進物質の製造方法。

1) 配列番号1に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、又は配列番号1に示されるアミノ酸配列の1～数個のアミノ酸が欠失され若しくは置換されたアミノ酸配列若しくは配列番号1に示されるアミノ酸配列に1～数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなるタ

ンパク質であって、植物生長促進物質の生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子

2) 配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、又は配列番号2に示されるアミノ酸配列の1～数個のアミノ酸が欠失され若しくは置換されたアミノ酸配列若しくは配列番号2に示されるアミノ酸配列に1～数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であって、植物生長促進物質の生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子

3) 配列番号3に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、又は配列番号3に示されるアミノ酸配列の1～数個のアミノ酸が欠失され若しくは置換されたアミノ酸配列若しくは配列番号3に示されるアミノ酸配列に1～数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であって、植物生長促進物質の生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子

4) 配列番号4に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、又は配列番号4に示されるアミノ酸配列の1～数個のアミノ酸が欠失され若しくは置換されたアミノ酸配列若しくは配列番号4に示されるアミノ酸配列に1～数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であって、植物生長促進物質の生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子

5) 配列番号5に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、又は配列番号5に示されるアミノ酸配列の1～数個のアミノ酸が欠失され若しくは置換されたアミノ酸配列若しくは配列番号5に示されるアミノ酸配列に1～数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であって、植物生長促進物質の生合成に関与するタンパク質をコードする遺伝子

[請求項8] 前記1)～5)の遺伝子の少なくとも3つを有する微生物を増殖させる工程を含む、請求項6又は7に記載の方法。

[請求項9] 前記 1) ～ 5) の全ての遺伝子を有する微生物を増殖させる工程を含む、請求項 6 又は 7 に記載の方法。

[請求項10] 下記 1) ～ 3) のいずれかのタンパク質。

1) 配列番号 3 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、又は配列番号 3 に示されるアミノ酸配列の 1 ～数個のアミノ酸が欠失され若しくは置換されたアミノ酸配列若しくは配列番号 3 に示されるアミノ酸配列に 1 ～数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であって、植物生長促進物質の生合成に関与するタンパク質

2) 配列番号 4 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、又は配列番号 4 に示されるアミノ酸配列の 1 ～数個のアミノ酸が欠失され若しくは置換されたアミノ酸配列若しくは配列番号 4 に示されるアミノ酸配列に 1 ～数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であって、植物生長促進物質の生合成に関与するタンパク質

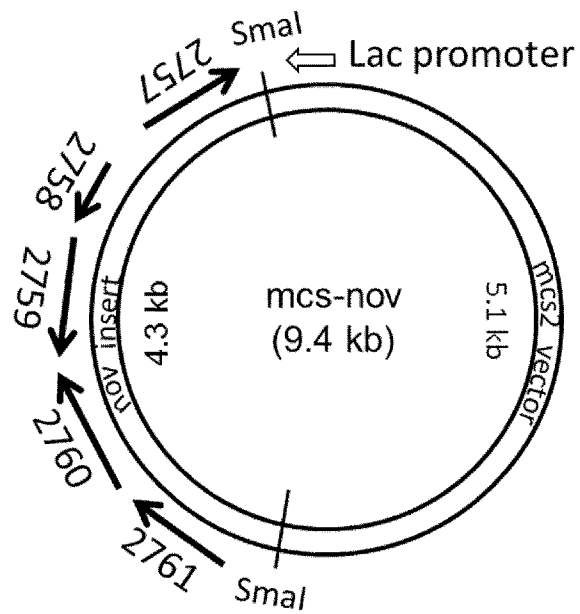
3) 配列番号 5 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、又は配列番号 5 に示されるアミノ酸配列の 1 ～数個のアミノ酸が欠失され若しくは置換されたアミノ酸配列若しくは配列番号 5 に示されるアミノ酸配列に 1 ～数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であって、植物生長促進物質の生合成に関与するタンパク質

[請求項11] 請求項 10 に記載のいずれかのタンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸。

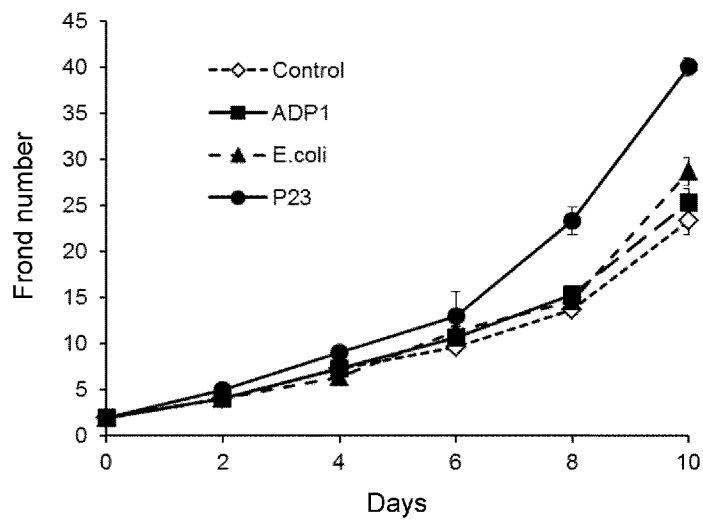
[請求項12] 請求項 11 に記載の核酸を発現可能に含むベクター。

[請求項13] 請求項 11 に記載の核酸又は請求項 12 に記載のベクターで形質転換された微生物。

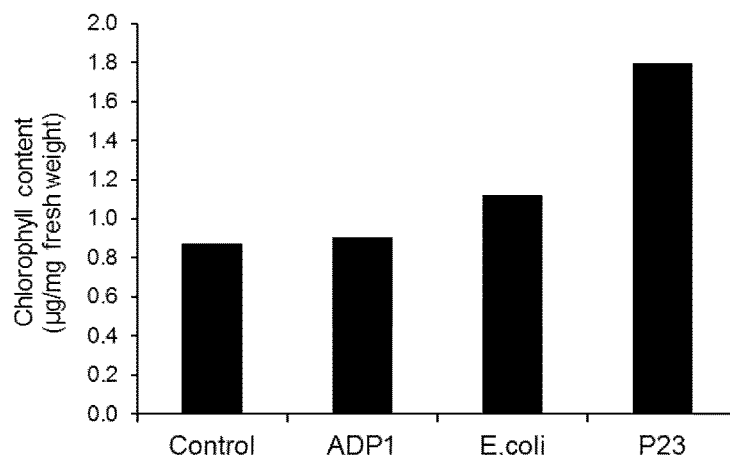
[図1]



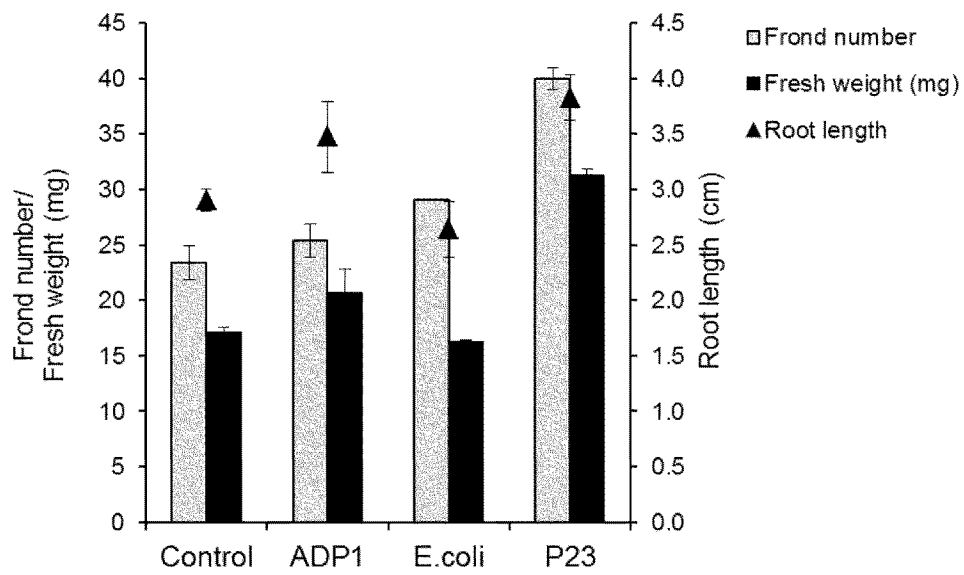
[図2]



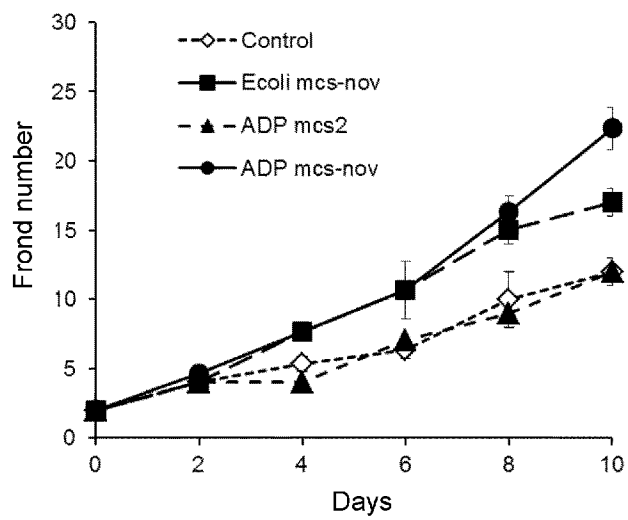
[図3]



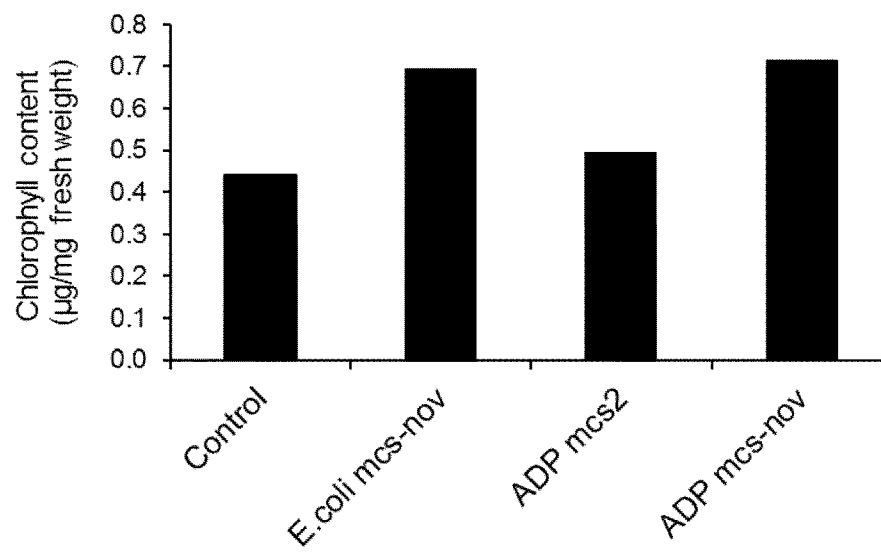
[図4]



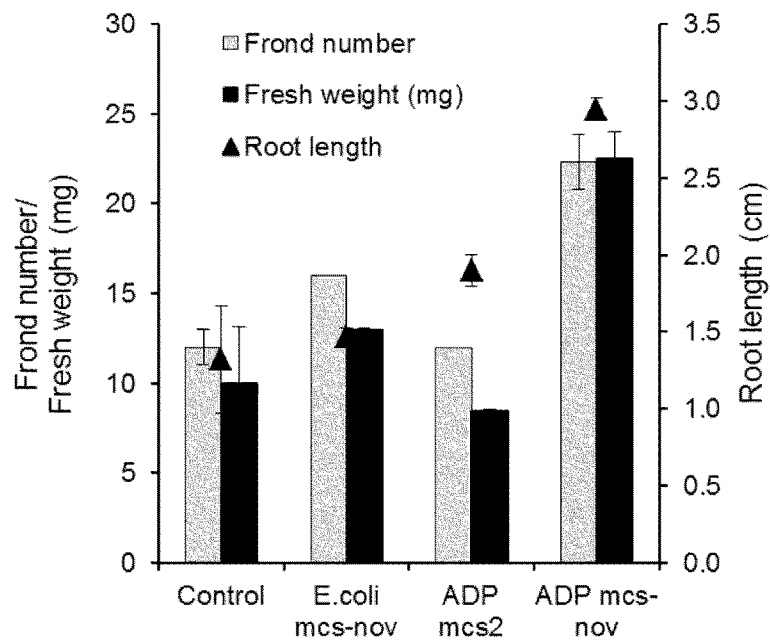
[図5]



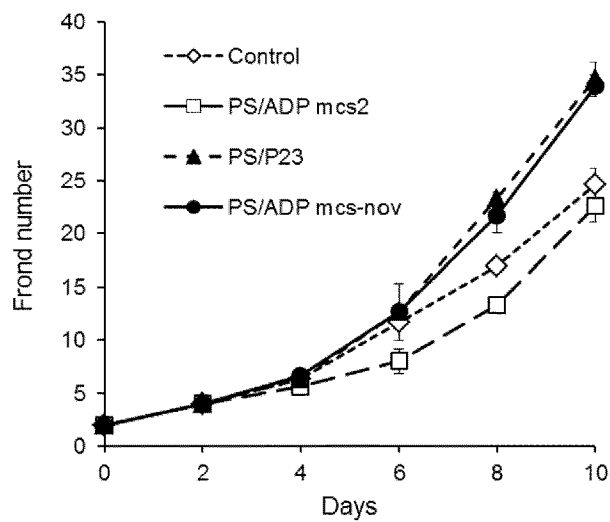
[図6]



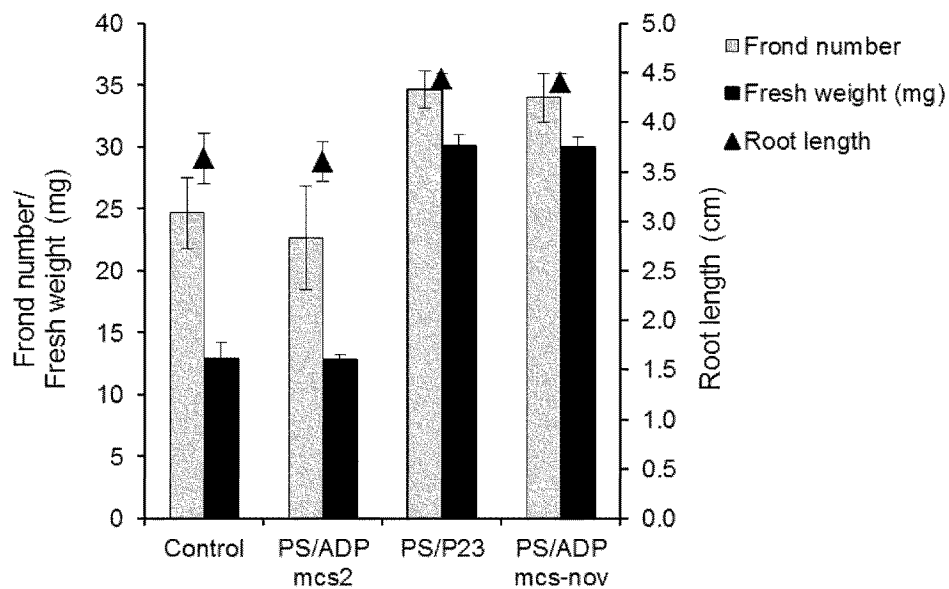
[図7]



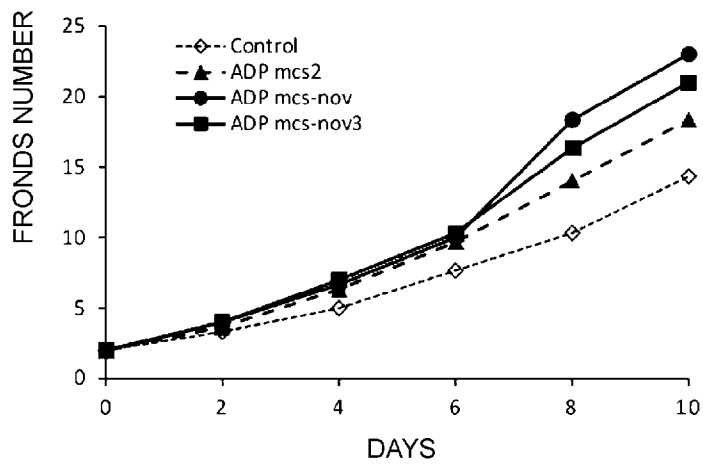
[図8]



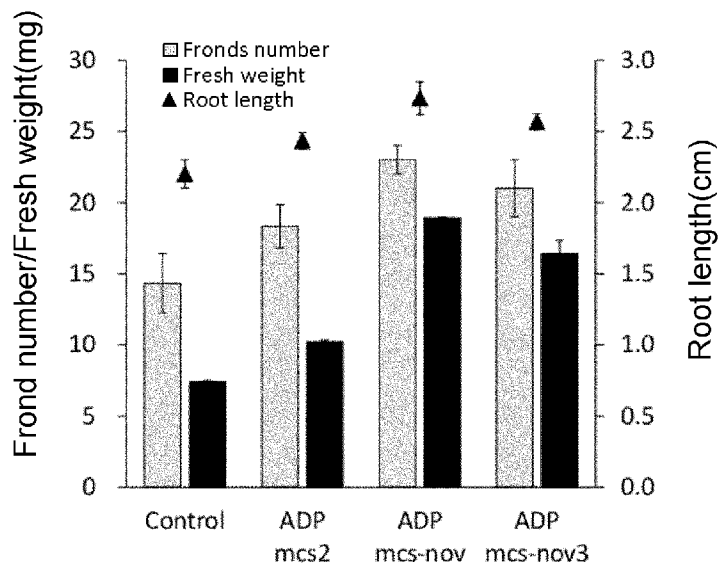
[図9]



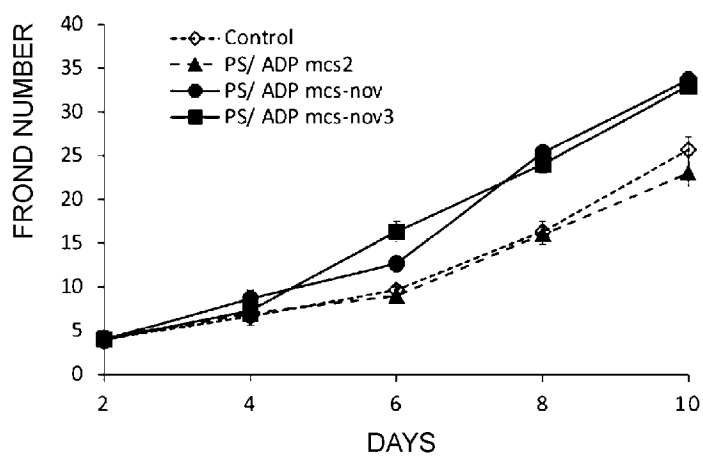
[図10]



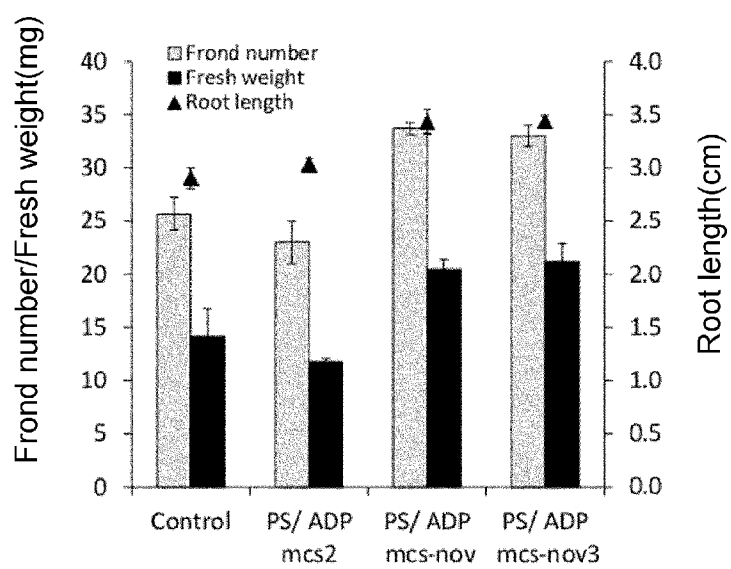
[図11]



[図12]



[図13]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/069474

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, A01G7/00(2006.01)i, C07K14/195(2006.01)i, C12N1/00(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(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, A01G7/00, C07K14/195, C12N1/00, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10

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	1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2016	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2016

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, PubMed, CiNii, WPIDS/WPIX(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2009-247279 A (National University Corporation Hokkaido University), 29 October 2009 (29.10.2009), claims; paragraphs [0089], [0090]; fig. 7 (Family: none)	1, 3-6, 8, 9
X	SUGAWARA, M., et al, UDP-glucose-4-epimerase [Acinetobacter calcoaceticus], GenBank [online], [retrived on 2016.9.12], NCBI, 2015.10.07, Accession No. GAM32233, entire text	1, 2, 5-7, 10-13
X	SUGAWARA, M., et al, hypothetical protein P23_2758 [Acinetobacter calcoaceticus], GenBank [online], [retrived on 2016.9.12], 2015.01.07, Accession No. GAM32234, entire text	1, 2, 5-7, 10-13

☒ 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
13 September 2016 (13.09.16)

Date of mailing of the international search report
27 September 2016 (27.09.16)

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/JP2016/069474

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SUGAWARA, M., et al, hypothetical protein P23_2759 [Acinetobacter calcoaceticus], GenBank [online], [retrived on 2016.9.12], NCBI, 2015.01.07, Accession No. GAM32235, entire text	1,2,5-7, 10-13
X	SUGAWARA, M., et al, hypothetical protein P23_2760 [Acinetobacter calcoaceticus], GenBank [online], 2015.01.07, [retrived on 2016.9.12], Accession No. GAM32236, entire text	1,2,5-7, 10-13
X	SUGAWARA, M., et al, hypothetical protein P23_2761 [Acinetobacter calcoaceticus], GenBank [online], [retrived on 2016.9.12], NCBI, 2015.01.07, Accession No. GAM32237, entire text	1,2,5-7, 10-13
X	CERQUEIRA, G., et al., hypothetical protein F937_00044 [Acinetobacter calcoaceticus ANC 3680], GenBank [online], [retrived on 2016.9.12], NCBI, 2013.04.16, Accession No. ENV96344, entire text	10-13
X	CERQUEIRA, G., et al., hypothetical protein F937_00043 [Acinetobacter calcoaceticus ANC 3680], GenBank [online], [retrived on 2016.9.12], NCBI, 2013.04.16, Accession No. ENV96343, entire text	10-13
A	CERQUEIRA, G., et al., hypothetical protein F937_00046 [Acinetobacter calcoaceticus ANC 3680], GenBank [online], [retrived on 2016.9.12], NCBI, 2013.04.16, Accession No. ENV96346, entire text	1-13
A	CERQUEIRA, G., et al., hypothetical protein F935_00215 [Acinetobacter calcoaceticus ANC 3811], GenBank [online], [retrived on 2016.9.12], NCBI, 2013.05.16, Accession No. EOQ65371, entire text	1-13
A	CERQUEIRA, G., et al., hypothetical protein F937_00042 [Acinetobacter calcoaceticus ANC 3680], GenBank [online], [retrived on 2016.9.12], NCBI, 2013.04.16, Accession No. ENV96342, entire text	1-13

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, A01G7/00(2006.01)i, C07K14/195(2006.01)i, C12N1/00(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(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, A01G7/00, C07K14/195, C12N1/00, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10

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	1971-2016年
日本国実用新案登録公報	1996-2016年
日本国登録実用新案公報	1994-2016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 (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, PubMed, CiNii, WPIDS/WPIX (STN)

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
X	JP 2009-247279 A (国立大学法人 北海道大学) 2009.10.29, 【特許請求の範囲】、【0089】、【0090】、【図7】 (ファミリーなし)	1, 3-6, 8, 9
X	SUGAWARA, M., et al, UDP-glucose-4-epimerase [Acinetobacter calcoaceticus], GenBank [online], [retrived on 2016.9.12], NCBI, 2015.10.07, Accession No. GAM32233, 全文	1, 2, 5-7, 10-13

☑ 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

13.09.2016

国際調査報告の発送日

27.09.2016

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)

太田 雄三

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

4B

3959

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
X	SUGAWARA, M., et al, hypothetical protein P23_2758 [Acinetobacter calcoaceticus], GenBank [online], [retrived on 2016.9.12], 2015.01.07, Accession No. GAM32234, 全文	1, 2, 5-7, 10-13
X	SUGAWARA, M., et al, hypothetical protein P23_2759 [Acinetobacter calcoaceticus], GenBank [online], [retrived on 2016.9.12], NCBI, 2015.01.07, Accession No. GAM32235, 全文	1, 2, 5-7, 10-13
X	SUGAWARA, M., et al, hypothetical protein P23_2760 [Acinetobacter calcoaceticus], GenBank [online], 2015.01.07, [retrived on 2016.9.12], Accession No. GAM32236, 全文	1, 2, 5-7, 10-13
X	SUGAWARA, M., et al, hypothetical protein P23_2761 [Acinetobacter calcoaceticus], GenBank [online], [retrived on 2016.9.12], NCBI, 2015.01.07, Accession No. GAM32237, 全文	1, 2, 5-7, 10-13
X	CERQUEIRA, G., et al., hypothetical protein F937_00044 [Acinetobacter calcoaceticus ANC 3680], GenBank [online], [retrived on 2016.9.12], NCBI, 2013.04.16, Accession No. ENV96344, 全文	10-13
X	CERQUEIRA, G., et al., hypothetical protein F937_00043 [Acinetobacter calcoaceticus ANC 3680], GenBank [online], [retrived on 2016.9.12], NCBI, 2013.04.16, Accession No. ENV96343, 全文	10-13
A	CERQUEIRA, G., et al., hypothetical protein F937_00046 [Acinetobacter calcoaceticus ANC 3680], GenBank [online], [retrived on 2016.9.12], NCBI, 2013.04.16, Accession No. ENV96346, 全文	1-13
A	CERQUEIRA, G., et al., hypothetical protein F935_00215 [Acinetobacter calcoaceticus ANC 3811], GenBank [online], [retrived on 2016.9.12], NCBI, 2013.05.16, Accession No. EOQ65371, 全文	1-13
A	CERQUEIRA, G., et al., hypothetical protein F937_00042 [Acinetobacter calcoaceticus ANC 3680], GenBank [online], [retrived on 2016.9.12], NCBI, 2013.04.16, Accession No. ENV96342, 全文	1-13