

(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
2024年11月21日(21.11.2024)



(10) 国際公開番号

WO 2024/236787 A1

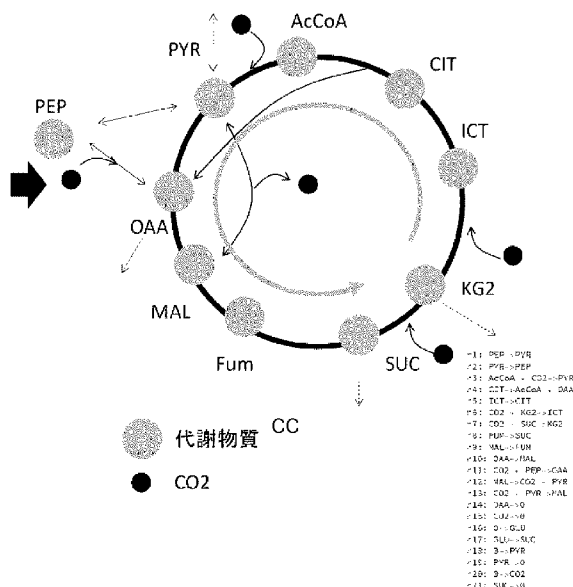
- (51) 国際特許分類:
C12P 7/46 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01) C12N 15/31 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01) C12N 15/60 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2023/018494
- (22) 国際出願日: 2023年5月17日(17.05.2023)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (71) 出願人: 株式会社日立製作所 (HITACHI, LTD.) [JP/JP]; 〒1008280 東京都千代田区丸の内一丁目6番6号 Tokyo (JP). 国立大学法人京都大学 (KYOTO UNIVERSITY) [JP/

JP]; 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町3番地1 Kyoto (JP).

- (72) 発明者: 田邊 麻衣子 (TANABE, Maiko); 〒1008280 東京都千代田区丸の内一丁目6番6号 株式会社日立製作所内 Tokyo (JP). 佐藤 美和 (SATO, Miwa); 〒1008280 東京都千代田区丸の内一丁目6番6号 株式会社日立製作所内 Tokyo (JP). 渡辺 康一 (WATANABE, Koichi); 〒1008280 東京都千代田区丸の内一丁目6番6号 株式会社日立製作所内 Tokyo (JP). 望月 敦史 (MOCHIZUKI, Atsushi); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町3番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 岡田 崇 (OKADA, Takashi);

(54) Title: METHOD FOR PERFORMING MATERIAL SYNTHESIS, AND METHOD FOR ABSORBING CO2 AND PRODUCING SUCCINIC ACID

(54) 発明の名称: 物質合成を実施する方法、およびCO2を吸収し、コハク酸を製造するための方法



$$AA \quad BB$$

$$\text{conditional on } \frac{d\bar{x}_m}{dk_{CO2in}} > 0 \text{ for } m = \text{MAL, PEP, SUC, CO2}$$

	k1	k2	k3	k4	k5	k6	k7	k8	k9	k10	k11	k12	k13	k14	k15	k16	k17	k18	k19	k20	k21
AcCoA	n	n	-1	0	0	1	0	n	1	n	n	n	-1	n	1	0	n	n	n	n	-1
CIT	n	n	0	-1	0	0	1	0	n	1	n	n	n	-1	-1	1	0	n	n	n	-1
CO2	n	n	0	0	0	0	1	0	1	n	n	n	-1	n	-1	1	1	0	1	1	1
PEP	n	n	0	0	0	0	0	0	n	-1	1	n	1	1	-1	-1	0	n	n	n	1
GLU	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	-1	0	0	0	0
ICT	n	n	0	0	0	1	0	1	0	n	1	n	n	n	-1	-1	1	0	n	n	-1
MGL	n	n	0	0	0	-1	1	0	n	1	n	n	n	-1	-1	n	0	n	n	n	-1
OAA	-1	1	0	0	0	0	0	n	n	n	1	n	n	-1	-1	n	n	n	n	n	1
PEP	n	n	0	0	0	0	1	0	n	-1	n	n	n	-1	-1	1	1	0	1	-1	-1
PYR	n	n	0	0	0	0	1	0	n	1	n	n	n	-1	-1	1	1	0	1	-1	-1
SUC	n	n	0	0	0	0	0	1	1	n	-1	1	-1	-1	1	1	0	1	-1	1	-1

	k1	k2	k3	k4	k5	k6	k7	k8	k9	k10	k11	k12	k13	k14	k15	k16	k17	k18	k19	k20	k21
r1	1	0	0	0	0	1	0	n	1	n	n	n	-1	1	1	0	1	1	1	1	1
r2	n	1	0	0	0	0	1	0	n	1	n	n	n	-1	-1	1	0	n	n	n	1
r3	n	n	0	0	0	1	0	n	1	n	n	n	-1	-1	1	0	n	n	n	1	1
r4	n	n	0	0	0	1	0	n	1	n	n	n	-1	-1	1	0	n	n	n	1	1
r5	n	n	0	0	0	1	0	n	1	n	n	n	-1	-1	1	0	n	n	n	1	1
r6	n	n	0	0	0	1	0	n	1	n	n	n	-1	-1	1	0	n	n	n	1	1
r7	n	n	0	0	0	1	0	n	1	n	n	n	-1	-1	1	0	n	n	n	1	1
r8	n	n	0	0	0	0	1	1	n	-1	1	1	1	1	0	n	n	n	n	1	n
r9	n	n	0	0	0	0	1	1	n	-1	1	1	1	1	0	n	n	n	n	1	n
r10	-1	1	0	0	0	0	0	n	1	1	n	n	-1	-1	n	0	n	n	n	1	n
r11	-1	1	0	0	0	0	0	n	1	n	n	n	-1	-1	n	0	n	n	n	1	n
r12	n	n	0	0	0	0	0	-1	1	n	1	1	1	1	0	n	n	n	n	1	n
r13	-1	1	0	0	0	0	0	n	n	1	n	1	1	1	0	n	n	n	n	1	n
r14	-1	1	0	0	0	0	0	n	n	1	n	n	-1	-1	0	n	0	n	n	1	n
r15	n	n	0	0	0	1	0	1	n	n	1	1	n	1	1	0	1	1	1	1	1
r16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
r17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
r18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
r19	n	n	0	0	0	1	0	n	1	n	n	n	-1	-1	1	0	1	n	1	1	1
r20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
r21	n	n	0	0	0	0	0	0	1	n	-1	1	-1	-1	1	0	1	1	1	1	1

AA conditional on
BB for
CC Metabolic substance

(57) Abstract: The present invention is a method for performing material synthesis by modifying one or more genes and culturing the modified organisms, thereby forming a metabolic pathway in which a CO₂ discharge site that has not undergone gene modification turns into absorption. Specifically, succinic acid is synthesized by culturing an organism in which a gene that encodes a sodium-ion-dependent bicarbonate transporter and a gene that encodes a phosphoenolpyruvate carboxykinase are forcibly expressed, and the following reactions are initiated in a TCA



WO 2024/236787 A1

〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番
地 1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP).

(74) 代理人: 弁理士法人一色国際特許事務所 (ISSHIKI PATENT & TRADEMARK FIRM);
〒1080073 東京都港区三田三丁目 1 1 番 3 6
号三田日東ダイビル Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 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))

cycle of the organism: (1) Succinyl-CoA + CO₂ → α-ketoglutaric acid; (2) α-ketoglutaric acid + CO₂ → D-isocitric acid

(57) 要約: 本発明は、一つ以上の遺伝子を改変し、改変した生物を培養することで、遺伝子改変を実施していないCO₂排出箇所が吸収に転じる代謝経路を形成することにより物質合成を実施する方法である。具体的には、ナトリウムイオン依存性重炭酸塩トランスポーターをコードする遺伝子とホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼをコードする遺伝子を強制発現させた生物を培養することで、コハク酸を合成し、且つ前記生物のTCA回路において以下の反応を起こさせる: (1) スクシニルCoA + CO₂ → αケトグルタル酸 (2) αケトグルタル酸 + CO₂ → D-イソクエン酸。

明 細 書

発明の名称：

物質合成を実施する方法、およびCO₂を吸収し、コハク酸を製造するための方法

技術分野

[0001] 本発明は、物質合成を実施する方法、およびCO₂を吸収し、コハク酸を製造するための方法に関する。

背景技術

[0002] 持続可能な社会の実現、例えばカーボンネガティブな社会実現のために、CO₂の排出を低減し且つCO₂の炭素を資源化する方法が求められている。

[0003] 非特許文献 (Scientific Reports 5:17321) には、bicA遺伝子とナトリウムイオン依存性重炭酸塩トランスポーターをコードする遺伝子 (pck遺伝子およびsbtA) を大腸菌で共発現させたことが記載されている。bicA遺伝子とsbtA遺伝子が大腸菌で強制発現させた場合、コハク酸の過剰生成が観察されたが、bicA遺伝子とpck遺伝子が大腸菌で強制発現させた場合、コハク酸の過剰生成は観察されなかった。

発明の概要

発明が解決しようとする課題

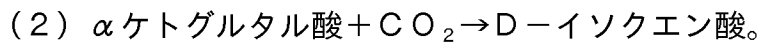
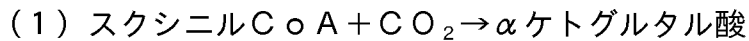
[0004] 本発明は、物質合成を実施する方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0005] 本発明者らは、コハク酸の生成方法を開発するために鋭意努力する中で、bicA遺伝子とpck遺伝子が大腸菌で多量に共発現させるとコハク酸が過剰生成されることを見出し、本発明に至った。

[0006] 本発明の一実施態様は、遺伝子を改変し、改変した生物を培養することで、遺伝子改変を実施していないCO₂排出箇所が吸収に転じる代謝経路を形成することにより物質合成を実施する方法である。前記遺伝子がナトリウムイオン依存性重炭酸塩トランスポーターをコードする遺伝子とホスホエノール

ピルビン酸カルボキシキナーゼをコードする遺伝子であり、それぞれを強制発現させた微生物を培養する工程を含み、前記物質がコハク酸であってもよい。前記CO₂排出箇所が吸収に転じる代謝経路がTCA回路において以下の反応を起こさせてもよい：



[0007] 本発明の他の実施態様は、CO₂を吸収するための方法であって、ナトリウムイオン依存性重炭酸塩トランスポーターをコードする遺伝子とホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼをコードする遺伝子を強制発現させた微生物を培養する工程を含む、方法。

[0008] 本発明のさらなる実施態様は、コハク酸を製造する方法であって、bicA遺伝子とpckA遺伝子が過剰発現している微生物を培養する工程を含む、方法である。

[0009] 本発明のさらなる実施態様は、CO₂の排出を抑制するための方法であって、bicA遺伝子とpckA遺伝子が過剰発現している微生物を培養する工程を含む、方法である。

[0010] 前記bicA遺伝子については1細胞当たり10⁶以上のコピーを発現させるか、またはバックグラウンドと比べて100倍以上になるように、前記pckA遺伝子についてはベクターだけの場合と比べて10倍以上になるように、発現させてもよい。前記微生物が大腸菌であってもよい。前記bicA遺伝子がシネココッカス由来であり、前記pckA遺伝子が大腸菌由来であってもよい。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]本発明の一実施形態におけるbicA遺伝子の(A)コーディング領域の塩基配列と、(B)それがコードするタンパク質のアミノ酸配列を示す図である。

[図2]本発明の一実施形態におけるpckA遺伝子の(A)コーディング領域の塩基配列と、(B)それがコードするタンパク質のアミノ酸配列を示す図である。

[図3]本発明の一実施例において用いたbicA遺伝子およびpckA遺伝子を発現する発現ベクターの配列を示す図である。連続した配列を(A)～(C)の3分割で表記している。(A)と(C)の配列がpETベクター由来であり、(B)の配列が挿入した配列を示す。一重線の下線は、上流から順に、最適化したbicA遺伝子および最適化したpckA遺伝子を示す。点線の下線がT7プロモーター、二重線の下線がT7ターミネーター、波線の下線がSD配列を示す。pUCベクターからpETベクターに2番目の配列を移した時に用いた制限酵素配列を太字で示す。

[図4]本発明の一実施例において、発現ベクターに挿入した遺伝子の発現レベルを調べた結果を示す図である。

[図5]本発明の一実施例において、TCAサイクルの要素の発現レベルを調べた結果を示す図である。

[図6]本発明の一実施例において、TCAサイクルの通常回転のフラックスを想定して算出した化学量論行列を示す図である。

[図7]本発明の一実施例において、TCAサイクルの逆回転のフラックスを想定して算出した化学量論行列において、実験結果と整合性がとれ、合成量が増加する各反応において分解して検証した結果を示す図である。

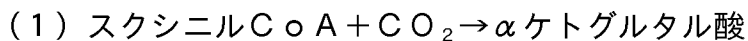
発明を実施するための形態

[0012] 本発明の目的、特徴、利点、及びそのアイデアは、本明細書の記載により、当業者には明らかであり、本明細書の記載から、当業者であれば、容易に本発明を再現できる。以下に記載された発明の実施の形態及び具体的に実施例などは、本発明の好ましい実施態様を示すものであり、例示又は説明のために示されているのであって、本発明をそれらに限定するものではない。本明細書で開示されている本発明の意図並びに範囲内で、本明細書の記載に基づき、様々な改変並びに修飾ができることは、当業者にとって明らかである。

[0013] 本発明の一実施形態は、遺伝子を改変し、改変した生物を培養することで、遺伝子改変を実施していないCO₂排出箇所が吸収に転じる代謝経路を形成

することにより物質合成を実施する方法である。

[0014] 例えば、ナトリウムイオン依存性重炭酸塩トランスポーター (ID:BICA_SYN P2) をコードする遺伝子とホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (E C4.1.1.32) をコードする遺伝子を強制発現させた生物を培養することで、コハク酸を合成し、且つその生物のTCA回路において以下の反応を起こさせることができる：



(2) αケトグルタル酸 + C O₂ → D-イソクエン酸。これによって、TCA回路の反応を通常方向とは逆の方向に回転させることができるようになる。

[0015] 具体的な方法としては、例えば、以下のように行えばよい。

[0016] まず、ナトリウムイオン依存性重炭酸塩トランスポーターをコードする遺伝子とホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼをコードする遺伝子を発現ベクターに挿入し、適切な宿主に導入して、その中で強制発現させる。

[0017] ナトリウムイオン依存性重炭酸塩トランスポーターをコードする遺伝子は、例えばbicA遺伝子であってもよく、とくにシネココッカスbicA遺伝子 (Ordered Locus Names: SYNPC07002_A2371) であってもよい。シネココッカスbicA遺伝子のコーディング領域の塩基配列 (A) と、それがコードするタンパク質のアミノ酸配列 (B) を図1に示す。

[0018] ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼをコードする遺伝子は、例えばpckA遺伝子であってもよく、特に大腸菌pckA遺伝子 (Ordered Locus Names: J7MG59_ECOLX) であってもよい。大腸菌pckA遺伝子のコーディング領域の塩基配列 (A) と、それがコードするタンパク質のアミノ酸配列 (B) を図2に示す。

[0019] 本明細書で、上記遺伝子名およびタンパク質名を生物名を特定せずに用いた場合、上記生物由来の遺伝子およびタンパク質、並びに他の生物由来の遺伝子およびタンパク質を含むものとする。

[0020] 用いるナトリウムイオン依存性重炭酸塩トランスポーターをコードする遺伝子の由来は特に限定されないが、シアノバクテリア (Cyanobacterium) 由

来であることが好ましく、シネココッカス (*Synechococcus*) 由来であることがより好ましい。用いるホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼをコードする遺伝子の由来も特に限定されないが、エンテロバクター (*Enterobacteriales*) 由来であることが好ましく、大腸菌 (*E. coli*) 由来であることがより好ましい。

[0021] 強制発現させる宿主の微生物は特に限定されないが、単細胞生物であることが好ましく、細菌であることがより好ましく、大腸菌 (*E. coli*) であることが最も好ましい。

[0022] ナトリウムイオン依存性重炭酸塩トランスポーターをコードする遺伝子とホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼをコードする遺伝子を宿主で発現するように発現ベクターに挿入し、得られた組換えベクターを宿主に導入するのは、当業者にとってはルーティンな技術である。この際、ナトリウムイオン依存性重炭酸塩トランスポーターおよびホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼが機能するように挿入する限り、挿入する遺伝子は野生型遺伝子そのものでなくてもよく、一部が欠失した遺伝子や、発現を強化するようにコドン最適化した遺伝子であってもよい。

[0023] ここで、ナトリウムイオン依存性重炭酸塩トランスポーターをコードする遺伝子は、その遺伝子の強制発現に用いられているベクターだけを微生物に導入した場合の内在性の *pckA* 遺伝子の発現レベルと比べて 10 倍以上発現していることが好ましい。また、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼをコードする遺伝子については 1 細胞当たり 10^6 以上のコピーが存在するように、またはバックグラウンドと比べて 100 倍以上になるように、発現していることが好ましい。そのような発現ベクターの例として、pET ベクターや pUC ベクターなどが例示できる。

[0024] ナトリウムイオン依存性重炭酸塩トランスポーターをコードする遺伝子とホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼをコードする遺伝子を強制発現させた微生物を培養するための培地は特に限定されず、当業者はその微生物に合わせて容易に選択することができる。

[0025] この組換え微生物を用いれば、CO₂を吸収すること、およびコハク酸を製造することが可能になる。例えば、所定の液体からCO₂を吸収するためには、その液体中で組換え微生物を生存させ、好ましくは増殖させる。あるいは、増殖に適切な培地の中で組換え微生物を増殖させ、所定時間培養後、微生物を回収し、当業者にとってはルーティンな方法によってコハク酸を分離することができる。

実施例

[0026] (1) ベクターの構築

nul pETベクター中に、シアノバクテリア *Synechocystis* PCC6803由来のbicA遺伝子、および大腸菌BL21 (DE3) 由来のpck 遺伝子を、T7プロモーターとT7ターミネーターの間に配置されるような形で発現ベクターを設計した。具体的には、pUCベクターに図3の(B)の配列を挿入したプラスミド全長を化学合成し、図3の太字で表した制限酵素を用いて、(B)の配列をpETベクターに挿入した。なお、bicA遺伝子およびpck 遺伝子は、発現が増加するように配列を最適化したものを用いた。

(2) 強制発現

(1) で構築した発現ベクターを、大腸菌BL21 (DE3) 細胞にトランスフェクトし、100 μg/mLのアンピシリンが入ったLBプレートに塗布し、37°Cのインキュベーターにより終夜培養することによって形質転換した。

[0027] 得られた形質転換体を50 mLのLB+アンピシリン培地へ植菌し、終夜(通常16時間以上)培養して増殖させた後に集菌した。RNAprotect Bacteria Reagent (キアゲン社)を用いてmRNAを抽出し、RNeasy Mini Kits (キアゲン社)を用いて、mRNAを精製した。得られたmRNAに対し、Random HexamersとSuperScript III RT (200 U/ul)を用いて逆転写を行った。

[0028] 得られたcDNAに対し、リアルタイムPCRにより発現レベルを調べた。Premix Ex Taq (Perfect Real Time) (タカラバイオ社)および以下の配列を有するプライマー及びプローブを用い、QuantStudio 12 K Flexリアルタイ

ムPCRシステム (Thermo Fisher Scientific, US) を用いて増幅および融解曲線解析を行い、発現レベルを算出した。増幅条件は、95℃で30秒変性させた後、95℃ 3秒-60℃ 30秒を40サイクル行った。その結果を図4に示す。なお、ネガティブコントロールとして、DNAの添加無しに同じ操作を行ったもの (NC)、および挿入配列の無いnul pETベクターのみで形質転換したもの (WT) を用いた。

bicA遺伝子：

F w : T T T T T T T T G C G G C C C T C T T C (配列番号1)

R e v : G G G C C G G T C G G T T C A C (配列番号2)

P r o b e : A C C C C G A C G C T G A T (配列番号3)

pckA遺伝子：

F w : G C C G A T C A A A C C C A G T A T C A C T (配列番号
4)

R e v : T C A G T A C C G G C C A G T T T G G (配列番号5)

P r o b e : C C T C T C T G G C T T C A C (配列番号6)

その結果、bicA遺伝子については、1細胞当たり約 10^6 の分子数のmRNAが発現し、pckA遺伝子については、約 8×10^5 の分子数のmRNAが発現していた。あるいはそれらの発現レベルは、bicA遺伝子についてはバックグラウンドの 10^4 倍以上であり、pckA遺伝子についてはベクターだけの場合の10倍以上であった。

(3) CO₂取り込み

ベクター導入株 (WTと表記) 及び組換え遺伝子導入株 (ENGまたはNo. 5と表記) をSOC培地 (100mg/mL Ampを添加) で、37℃で培養した。約20時間後、OD₆₀₀が0.5になったときに、1mM IPTGを添加し、さらに培養した。SOC培地でOD₆₀₀を0.9に希釈し、¹²CO₂ (1atm) または¹³CO₂ (1atm) の下で、デシケータ内で一晚培養した。培養後のOD₆₀₀は、¹²CO₂ (1atm) 下で培養したWTが0.7、ENGが1.32、¹³CO₂ (1atm) 下で培養したWTが1.2

3、ENGが0.75であった。

[0029] 遠心して菌体を集めて、 OD_{600} が1.0になるように調整した。10 mL分を凍結後6.4 mM NH_4HCO_3 水溶液に懸濁し、超音波破碎した。遠心して上清を限外濾過（3 kDaフィルタ）にかけ、ろ液20 μ Lについて、LC/MSで計測した。なお、LC（液体クロマトグラフィー）およびMS（質量分析）は以下の条件で行った。

LC

機器：UltiMate3000(ThermoFisher)

カラム：Hypercarb4.6 \times 150 mm (ThermoFisher, PN 35003-154630, lot 3-916, SN 20130692)

展開溶媒：A：6.4 mM NH_4HCO_3 、B：メタノール、0.3 mL/分、0-99% B over 10分、平衡化20分

MS

機器：Orbitrap Q ExactiveFocus

m/zの範囲：56.7-850.0

イオンモード：switching (negative/positive)

解像度：70,000

内部標準物質として、天然の大腸菌には代謝物として存在しない化合物である、L-メチオニンスルホン及びPIPES（両方とも富士フィルム和光社より入手）を用いた。この内部標準物質はそれぞれ10 mM水溶液を作製して4℃で保存し、標識大腸菌抽出物調製時にスパイクした。

[0030] また、TCAサイクルに関与する代謝物（オキサロ酢酸、ホスホエノールピルビン酸一カリウム塩、ピルビン酸ナトリウム、L（-）-りんご酸、グリシン、L-セリン、アセチルコエンザイムAナトリウム塩、酢酸）について、標準物質を準備し、各代謝物の量を測定した。その結果を図5に示す。

[0031] 図5に示すように、L（-）-りんご酸、コハク酸、フマル酸/マレイン酸（以下FA/MA）（RT9~10分）の3種類の化合物において、WT株では約0.4、No. 5株では約0.6~0.9の質量増加が観察された

。アスパラギン酸、クエン酸+イソクエン酸、FA/MA (RT 7~8分) においても、L-メチオニンスルホン、ピルビン酸、ホスホエノールピルビン酸-カリウム塩、セリン、酢酸よりは顕著な質量増加が観察された。グリシンにおいては、WT株とNo. 5株のいずれでも同程度の質量増加が観察された。このように、グルコースは存在せず、 ^{13}C でラベルした CO_2 存在下で、大腸菌の CO_2 の取り込みを増加させると、L(-)-リンゴ酸、コハク酸、ホスホエノールピルビン酸-カリウム塩、ピルビン酸の ^{13}C の割合が増加する。

(4) CO_2 固定場所

(3) に記載した実験結果と構造感度解析によりTCAサイクルの回転方向及び CO_2 固定箇所をシミュレートした。

[0032] 構造感度解析とは、代謝ネットワークの構造から代謝ネットワーク上の物質の量に影響を与える酵素を提案する技術 (A. Mochizuki and B. Fiedler, *J. Theor. Biol.* 367, 189(2015)) である。この手法をもちいて大腸菌の中心代謝経路の化学反応ネットワークから化学量論行列を構築し (T. Okada and A. Mochizuki, *Phys. Rev. Lett.* 117, 048101(2016))、(3) で記載した実験結果のもと、シミュレーション結果を解釈した。

[0033] まず、大腸菌の中心代謝系の化学反応ネットワークに「bicAによる CO_2 の取り込み」を加え、TCAサイクルの通常回転 (図6) 及び逆回転 (図7) のフラックスを想定して、それぞれに対して化学量論行列を算出した (それぞれ、図6及び図7の右下に示す)。得られた結果と(3)に記載した結果とコンセンサスがとれているかを検証した結果、通常回転での実験結果とは一致せず、上記実験条件ではTCAサイクルが逆回転にて機能していることが示された。

[0034] 上記化学量論行列において、(3)の実験結果と整合性がとれ、合成量が増加する各反応において分解して検証した (図7、 r_{1-22})。その結果、 r_{20} を促進し、L(-)-リンゴ酸、コハク酸、ホスホエノールピルビン酸-カリウム塩、の合成量が増大している行列においては、 r_7 (スク

シニルC o A + C O 2 → αケトグルタル酸)、 r 6 (αケトグルタル酸 + C O 2 → D - イソクエン酸)、 r 1 1 (ホスホエノールピルビン酸 - カリウム塩 + C O 2 → オキサロ酢酸) のC O 2の取り込みが促進されていた。このように、上記遺伝子の強制過剰発現によって、T C A回路において、以下の反応が起きる。

(1) スクシニルC o A + C O 2 → αケトグルタル酸

(2) αケトグルタル酸 + C O 2 → D - イソクエン酸

産業上の利用可能性

[0035] 本発明によって、新規な物質合成を実施する方法を提供することができるようになった。

請求の範囲

- [請求項1] 一つ以上の遺伝子を改変し、改変した生物を培養することで、遺伝子改変を実施していないCO₂排出箇所が吸収に転じる代謝経路を形成することにより物質合成を実施する方法。
- [請求項2] 前記遺伝子がナトリウムイオン依存性重炭酸塩トランスポーターをコードする遺伝子とホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼをコードする遺伝子であり、それぞれを強制発現させた微生物を培養する工程を含み、前記物質がコハク酸である、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 前記CO₂排出箇所が吸収に転じる代謝経路がTCA回路において以下の反応を起こさせる、請求項1に記載の方法：
- (1) スクシニルCoA + CO₂ → αケトグルタル酸
 - (2) αケトグルタル酸 + CO₂ → D-イソクエン酸。
- [請求項4] CO₂を吸収するための方法であって、
- ナトリウムイオン依存性重炭酸塩トランスポーターをコードする遺伝子とホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼをコードする遺伝子を強制発現させた微生物を培養する工程を含む、方法。
- [請求項5] ナトリウムイオン依存性重炭酸塩トランスポーターをコードする遺伝子とホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼをコードする遺伝子を強制発現させた生物を培養することで、コハク酸を合成し、且つ前記生物のTCA回路において以下の反応を起こさせる方法：
- (1) スクシニルCoA + CO₂ → αケトグルタル酸
 - (2) αケトグルタル酸 + CO₂ → D-イソクエン酸。
- [請求項6] 前記ナトリウムイオン依存性重炭酸塩トランスポーターをコードする遺伝子については1細胞当たり10⁶以上のコピーを発現させるか、またはバックグラウンドと比べて100倍以上になるように、前記ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼをコードする遺伝子についてはベクターだけの場合と比べて10倍以上になるように発現させる、請求項5に記載の方法。

[請求項7] 前記生物が大腸菌である、請求項5または6に記載の方法。

[請求項8] 前記ナトリウムイオン依存性重炭酸塩トランスポーターをコードする遺伝子がシネココッカス由来であり、前記ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼをコードする遺伝子が大腸菌由来である、請求項5～7のいずれか1項に記載の方法。

[図1]

(A)

ATGCAGATAACCAACAAAATTCACCTTTAGGAATATCCGCGGCGATATTTTTGGCGGGCT
AACGGCGGCGGTCATTGCGTTGCCCATGGCCCTCGCCTTCGGGGTGGCATCCGGTGCCG
GGGCAGAAGCCGGTCTCTGGGGTGTGTGCTTGTGGGCTTCTTTGCCGCCCTCTTTGGG
GGAACCCCCACCCTCATTTCCGAACCCACAGGGCCGATGACGGTGGTTATGACCGCTGT
GATTGCCCATTTACAGGCCAGCGCCGCTACTCCAGAAGAAGGTTTGGCGATCGCCTTTA
CCGTGCGTGATGATGGCCGGGGTGTTCCAAATTATTTTTGGCTCCCTCAAACCTCGGCAAA
TACGTCACCATGATGCCCTACACCGTGATTTCTGGCTTCATGTCAGGGATCGGGATCAT
CCTGGTCATTTTGCAATTAGCGCCCTTCTGGGACAGGCGAGTCCGGGGGGCGGCGTCA
TCGGCACGCTCCAAAATTTACCCACACTGCTGAGTAATATTCAACCGGGCGAAACAGCC
TTAGCTTTAGGCACCGTGGCGATCATCTGGTTTATGCCAGAGAAGTTTAAAAAGGTAAT
CCCGCCCCAATTGGTCGCCCTTGTCTTGGGGACAGTAATCGCCTTTTTTTGTTTTCCCGC
CAGAAGTAAGCGATCTCCGTCGCATCGGTGAAATTCGAGCTGGGTTCCCAGAGCTGGTC
AGACCGAGCTTTAGTCCGGTTGAATTCAGAGAATGATCCTCGATGCGGCAGTGCTAGG
GATGCTCGGTTGTATCGATGCCCTCTTGACGTCTGTGCTCGCCGATAGCTTGACCCGGA
CAGAGCATAATTCACAACAAAGAATTAATGGCCAAGGTCTAGGGAACCTCTTTTCTGGC
TTGTTCCGGCGGGATTGCTGGGGCTGGGGCCACCATGGGGACTGTGGTAAATATCCAGTC
CGGTGGTTCGAACGGCGCTTTCTGGATTGGTACGGGCCTTTGTCCTGTTGGTTGTGATCC
TTGGGGCGGCTAGTTTAAACGGCAACCATCCCCCTGGCTGTGCTTGCTGGGATTGCCTTC
AAGGTCGGGGTTGACATCATTGACTGGAGTTTCTAAAACGGGCCACGAAATTTCCCC
CAAGGGGGCACTGATCATGTACGGCGTCATTCTGTTGACGGTCTTAGTTGACTTGATTG
TCGCCGTGGGTGTGGGTGTGTTTGTGCTAATGTGCTCACCATCGAACGGATGAGTAAT
CTCCAGTCTGAAAAGTCCAAACGGTTAGTGATGCTGACGATAATATCCGCCTGACTAC
CACTGAAAACGCTGGTTGGATGAAGGCCAAGGCCGTGTTCTTTTGTTCAACTCAGTG
GGCCGATGATCTTTGGGGTCGCAAAGGCGATCGCCAGAGAACACAATGCGATGGGTGAC
TGTGATGCCCTCGTCTTTGATATCGGTGAAGTGCCCCACATGGGGGTTACCGCTTCCCT
AGCCTTAGAAAATGCCATTGAAGAGGCCCTCGACAAAGAACGTCAGGTTTATATTGTCG
GTGCTGCGGGCCAAACCCGTCGCCGTCTGGAAAACTCAAGCTCTTTAAGCGGGTTCCC
CCCGATAAATGTTTGTGTCGCGGGAAGAAGCCCTCAAGAATGCCGTGCTCGGAATCTA
TCCCCATTTGGCGGATGGTGTACGGCTCCCAGTTCAGAGATGGGTTAA (配列番号7)

(B)

MQITNKIHR NIRGDI FGLL TAAVIALPMA LAFGVASGAG AEAGLWGA VL
VGFFAALFGG TPTLISEPTG PMTVVMTAVI AHFTASAATP EEGLAIAFTV
VMMAGVFQII FGSLKLGKYV TMMPYTVISG FMSGIGIILV ILQLAPFLGQ
ASPGGGVIGT LQNLPTLLSN IQPGETALAL GTVAIIWFMP EKFKKVIPPQ
LVALVLGTVI AFFVFPPEVS DLRRIGEIRA GFPELVRPSF SPVEFQRMIL
DAAVLGMLGC IDALLTSVVA DSLTRTEHNS NKELIGQGLG NLFSGLFGGI
AGAGATMGTV VNIQSGGRTA LSGLVRAFVL LVVILGAASL TATIPLAVLA
GIAFKVGVDI IDWSFLKRAH EISPKGALIM YGVILLTVLV DLIVAVGVGV
FVANVLTIER MSNLQSEKVQ TVSDADDNIR LTTTEKRWLD EGQGRVLLFQ
LSGPMIFGVA KAIAREHNAM GDCDALVFDI GEVPHMGVTA SLALENAIEE
ALDKERQVYI VGAAGQTRRR LEKCLKLFRV PPKCLMSRE EALKNAVLGI
YPHLADGVTA PSSEMG (配列番号8)


[図2]

(A)

ATGCGCGTTAACAAATGGTTTGACCCCGCAAGAACTCGAGGCTTATGGTATCAGTGACGT
 ACATGATATCGTTTACAACCCAAGCTACGACCTGCTGTATCAGGAAGAGCTCGATCCGA
 GCCTGACAGGTTATGAGCGCGGGGTGTTAACTAATCTGGGTGCCGTTGCCGTCGATACC
 GGGATCTTCACCGGTCGTTACCAAAAAGATAAGTATATCGTCCGTGACGATAACACTCG
 CGATACTTTCTGGTGGGCAGACAAAGGCAAAGGTAAGAACGACAACAAACCTCTCTCTC
 CGGAAACCTGGCAGCATCTGAAAGGCCTGGTGACCAGGCAGCTTTCCGGCAAACGTCTG
 TTCGTTGTGACGCTTTCTGTGGTGCGAACCCGGATACTCGTCTTTCCGTCCGTTTCAT
 CACCGAAGTGGCCTGGCAGGCGCATTTTTGTCAAAAACATGTTTATTCGCCCGAGCGATG
 AAGAACTGGCAGGTTTCAAACCAGACTTTATCGTTATGAACGGCGCGAAGTGCCTAAC
 CCGCAGTGGAAGAAGAGGGTCTCAACTCCGAAAACCTTCGTGGCGTTTAACTGACCGA
 GCGCATGCAGCTGATTGGCGGCACCTGGTACGGCGGCGAAATGAAGAAAGGGATGTTCT
 CGATGATGAACTACCTGCTGCCGCTGAAAGGTATCGCTTCTATGCACTGCTCCGCCAAC
 GTTGGTGAGAAAGGCGATGTTGCGGTGTTCTTCGGCCTTTCCGGCACCGGTAAAACCAC
 CCTTCCACCGACCCGAAACGTGCGCTGATTGGCGATGACGAACACGGCTGGGACGATG
 ACGGCGTGTTTAACTTCGAAGGCGGCTGCTACGCAAAAACCTATCAAGCTGTCGAAAGAA
 GCGGAACCTGAAATCTACAACGCTATCCGTGCTGATGCGTTGCTGGAAAACGTCACCGT
 GCGTGAAGATGGCACTATCGACTTTGATGATGGTTCAAAAACCGAGAACACCCGCGTTT
 CTTATCCGATCTATCACATCGATAACATTGTTAAGCCGGTTTCCAAAGCGGGCCACGCG
 ACTAAGGTTATCTTCCTGACTGCTGATGCTTTCGGCGTGTTGCCGCCGGTTTCTCGCCT
 GACTGCCGATCAAACCCAGTATCACTTCCTCTCTGGCTTCACCGCCAACTGGCCGGTA
 CTGAGCGTGGCATCACCGAACCGACGCCAACCTTCTCCGCTTGCTTCGGCGCGGCATTC
 CTGTCGCTGCACCCGACTCAGTACGCAGAAGTGCTGGTGAAACGTATGCAGGCGGCGGG
 CGCGCAGGCTTATCTGGTTAACACTGGCTGGAACGGCACTGGCAAACGTATCTCGATTA
 AAGATAACCCGCGCCATTATCGACGCCATCCTCAACGGTTCGCTGGATAATGCAGAAACC
 TTCCTCTGCCGATGTTTAACTGGCGATCCCAACCGAACTGCCGGGCGTAGACACGAA
 GATTCTCGATCCGCGTAACACCTACGCTTCTCCGGAACAGTGGCAGGAAAAAGCCGAAA
 CCCTGGCGAAACTGTTTATCGACAACCTTCGATAAATACACCGACACCCCTGCGGGTGCC
 GCGCTGGTAGCGGCTGGTCCGAAACTGTAA (配列番号9)

(B)

MRVNNGLTPQ ELEAYGISDV HDIVYNPSYD LLYQEELDPS LTGYERGVLT
 NLGAVAVDTG IFTGRSPKDK YIVRDDTTRD TFWWADKGGK KNDNKPLSPE
 TWQHLKGLVT RQLSGKRLFV VDAFCGANPD TRLSVRFITE VAWQAHFVKN
 MFIRPSDEEL AGFKPDFIVM NGAKCTNPQW KEQGLNSENF VAFNLTERMQ
 LIGGTWYGGE MKKGMFSMMN YLLPLKGIAS MHCSANVGEK GDVAVFFGLS
 GTGKTTLSTD PKRRLIGDDE HGWDDDGVFN FEGGCYAKTI KLSKEAEPEI
 YNAIRRDALL ENVTVREDGT IDFDDGSKTE NTRVSYPIYH IDNIVKPVSK
 AGHATKVIFL TADAFGVLPV VSRLTADQTQ YHFLSGFTAK LAGTERGITE
 PTPTFSACFG AAFLSLHPTQ YAEVLVKRMQ AAGAQAAYLVN TGWNGTGKRI
 SIKDTRAIID AILNGSLDNA ETFTLPMFNL AIPTELPGVD TKILDPRNTY
 ASPEQWQE (配列番号10)

[3-1]

(A)

TGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGC
GCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTCTTCCCT
TCCTTCTCGCCACGTTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTT
AGGGTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATG
GTTACGTTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCC
ACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGT
CTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGC
TGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGTTTACAATTTACAGGT
GGCAGTTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTTATTTTTCTAAATACATTC
AAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAA
GGAAGAGTATGAGTATCAACATTTCCGTGTGCGCCCTTATCCCTTTTTTTCGGGCATTT
TGCCTTCTGTTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCA
GTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGA
GTTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTTCCAATGATGAGCACTTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGC
GCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTTCGCCGCATACACTATTC
TCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGA
CAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTA
CTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCCTTTTTTTGCACAACATGGGGGA
TCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATAACCAACGACG
AGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAACCTGGC
GAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGT
TGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTTATTGCTGATAAATCTG
GAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCC
TCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAG
ACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACCTGTCAGACCAAGTTT
ACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTG
AAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTG
AGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCG
TAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTGCCGGAT
CAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAA
TACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGC
CTACATACTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCG
TGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTTCGGGCTG
AACGGGGGGTTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGAT
ACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGG
TATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAA
CGCCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGTTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTT
TGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTA
CGGTTCCCTGGCCTTTTTGCTGGCCTTTTTGCTCACATGTTCTTTTCTGCGTTATCCCCTGA
TTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAA
CGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTT
CTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCGCATATATGGTGCCTCTCAGTACAATC
TGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATACACTCCGCTATCGCTACGTGACTGGGT
ATGGCTGCGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCT
CCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTGAGAGGT
TTTTACCGTCATCACGAAACGCGCGAGGCAGCTGCGGTAAAGCTCATCAGCGTGGTCG
TGAAGCGATTCACAGATGTCTGCCTGTTTCATCCGCGTCCAGCTCGTTGAGTTTTCTCCAG

[図3-2]

AAGCGTTAATGTCTGGCTTCTGATAAAGCGGGCCATGTTAAGGGCGGTTTTTTCCTGTT
 TGGTCACTGATGCCTCCGTGTAAGGGGGATTTCTGTTTCATGGGGGTAATGATACCGATG
 AAACGAGAGAGGATGCTCACGATACGGGTTACTGATGATGAACATGCCCGGTTACTGGA
 ACGTTGTGAGGGTAAACAACCTGGCGGTATGGATGCGGCGGGACCAGAGAAAAATCACTC
 AGGGTCAATGCCAGCGCTTCGTTAATACAGATGTAGGTGTTCCACAGGGTAGCCAGCAG
 CATCCTGCGATGCAGATCCGGAACATAATGGTGCAGGGCGCTGACTTCCGCGTTTTCCAG
 ACTTTACGAAACACGGAAACCGAAGACCATTTCATGTTGTTGCTCAGGTGCGCAGACGTTT
 TGCAGCAGCAGTGCCTTCACGTTTCGCTCGCGTATCGGTGATTCATTCTGCTAACCAGTA
 AGGCAACCCCGCCAGCCTAGCCGGGTCTCAACGACAGGAGCACGATCATGCGCACCCG
 TGGGGCCGCCATGCCGGCGATAAATGGCCTGCTTCTCGCCGAAACGTTTGGTGGCGGGAC
 CAGTGACGAAGGCTTGAGCGAGGGCGTGCAAGATTCGAATACCGCAAGCGACAGGCCG
 ATCATCGTTCGCGCTCCAGCGAAAGCGGTCTTCGCCGAAAATGACCCAGAGCGCTGCCGG
 CACCTGTCTACGAGTTGCATGATAAAGAAGACAGTCATAAGTGCGGCGACGATAGTCA
 TGCCCCGCGCCACCAGGAGCTGACTGGGTGAAGGCTCTCAAGGGCATCGGTGCA
 GATCCCGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTTACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGC
 TTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGA
 GAGGCGGTTTTGCGTATTGGGCGCCAGGGTGGTTTTTCTTTTACCAGTGAGACGGGCAA
 CAGCTGATTGCCCTTACCAGCCTGGCCCTGAGAGAGTTGCAGCAAGCGGTCCACGCTGG
 TTTGCCCCAGCAGGCGAAAATCCTGTTTTGATGGTGGTTAACGGCGGGATATAACATGAG
 CTGTCTTCGGTATCGTTCGTATCCACTACCGAGATATCCGCACCAACGCGCAGCCCGGA
 CTCGGTAATGGCGCGCATTGCGCCAGCGCCATCTGATCGTTGGCAACCAGCATCGCAG
 TGGGAACGATGCCCTCATTTCAGCATTTCATGGTTTTGTTGAAAACCGGACATGGCACTC
 CAGTCGCCTTCCCGTTCCGCTATCGGGCTGAATTTGATTGCGAGTGAGATATTTATGCCA
 GCCAGCCAGACGACGCGCCGAGACAGAACTTAATGGGCCCGTAACAGCGCGATTT
 GCTGGTGACCCAATGCGACCAGATGCTCCACGCCAGTTCGCGTACCGTCTTCATGGGAG
 AAAATAATACTGTTGATGGGTGTCTGGTCAGAGACATCAAGAAATAACGCCGGAACATT
 AGTGCAGGCAGCTTCCACAGCAATGGCATCCTGGTTCATCCAGCGGATAGTTAATGATCA
 GCCCACTGACGCGTTGCGCGAGAAGATTGTGCACCGCCGCTTTACAGGCTTCGACGCCG
 CTTGTTCTACCATCGACACCACCAGCTGGCACCCAGTTGATCGGCGCGAGATTTAAT
 CGCCGCGACAATTTGCGACGGCGCGTGCAGGGCCAGACTGGAGGTGGCAACGCCAATCA
 GCAACGACTGTTTGCCCGCCAGTTGTTGTGCCACGCGGTTGGGAATGTAATTCAGCTCC
 GCCATCGCCGCTTCCACTTTTTCCCGCGTTTTTCGCAGAAACGTGGCTGGCCTGGTTTAC
 CACGCGGGAAACGGTCTGATAAGAGACACCGGCATACTCTGCGACATCGTATAACGTTA
 CTGGTTTTACATTCACCACCCTGAATTGACTCTCTTCCGGGCGCTATCATGCCATAACG
 CGAAAGTTTTGCGCCATTCGATGGTGTCCGGGATCTCGACGCTCTCCCTTATGCGACT
 CCTGCATTAGGAAGCAGCCCAGTAGTAGTTGAGGCCGTTGAGCACCGCCGCGCAAGG
 AATGGTGCATGCAAGGAGATGGCGCCAACAGTCCCCGGCCACGGGGCCTGCCACCAT
 ACCCACGCCGAAACAAGCGTTCATGAGCCCGAAGTGGCGAGCCCGATCTTCCCCATCGG
 TGATGTCGGCGATATAGGCGCCAGCAACCGCACCTGTGGCGCCGGTGTGCGGCGCCACG
 ATGCGTCCGGCGTAGAGGATCGAGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATA
 GGGGAATTGTGAGCGGATAACAATCCCCCTCTAGAAATAATTTGTTAACTTTAAGAA
GGAGATATACATATG (配列番号 1 1)

(B)

CAGATACCAATAAGATTCACCTCCGCAATATCCGCGGTGACATCTTTGGTGGTCTGAC
GGCGGCCGTTATTGCGCTGCCAATGGCGCTGGCGTTTTGGTGTGCGAGTGGCGCGGGTG
CCGAAGCGGGTCTGTGGGGCGCGGTGCTGGTGGTTTTTTTTGCGGCCCTCTTCGGTGGT
ACCCCGACGCTGATCAGTGAACCGACCGGCCCGATGACCGTTGTTATGACCGCCGTGAT
TGCCCACTTACCAGCGAGTGCAGGCCACCCAGAAGAGGGTCTGGCGATTGCGTTACCCG

[図3-3]

TGGTGATGATGGCGGGCGTTTTCCAGATCATCTTCGGCAGCCTCAAGCTGGGTAAGTAC
GTGACGATGATGCCGTACACGGTGATCAGCGGCTTCATGAGTGGCATCGGCATCATCCT
CGTTATTCTGCAGCTGGCCCCGTTTCTCGGTCAAGCCAGTCCGGGTGGCGGCGTTATCG
GTACGCTGCAGAATCTCCCAACGCTGCTGAGCAACATTCAGCCGGGCGAAACGGCGCTC
GCGCTGGGTACCGTGGCCATTATCTGGTTCATGCCAGAGAAATTCAAAAAAGTTATTCC
ACCGCAGCTGGTTGCGCTGGTTCTCGGCACCGTGATCGCGTCTTTGTTTTCCCACCGG
AAGTGAGCGATCTGCGTCGCATCGGCGAAATCCGCGCCGGTTTCCCAGAACTGGTGCGT
CCAAGTTTCAGCCCAGTGGAATTCAGCGCATGATTCTCGATGCGGCGGTTCTCGGTAT
GCTGGGCTGCATCGATGCCCTCCTCACCAGCGTTGTGGCCGACAGCCTCACCCGCACGG
AACACAACAGCAACAAGGAGCTGATCGGTCAAGGTCTCGGCAATCTGTTCAGCGGTCTC
TTTGGCGGCATTGCCGGTGCGGGCGCCACGATGGGCACGGTGGTTAACATCCAGAGTGG
TGGCCGTACGGCGCTCAGTGGTCTGGTTCGCGCCTTCGTTCTGCTGGTTGTTATTCTCG
GTGCCGCCAGTCTGACGGCCACCATTCCACTCGCGGTTCTGGCCGGCATCGCCTTAAA
GTGGGCGTGGACATCATCGACTGGAGCTTCTGAAACGCGCGCATGAGATTAGCCCGAA
AGGCGCCCTCATTATGTATGGCGTGATTCTGCTCACCGTGCTCGTGGATCTGATTGTTG
CGGTGGGCGTTGGCGTTTTCTGGCCAACGTGCTGACGATCGAACGCATGAGCAATCTG
CAGAGCGAGAAGGTTAGACCGTTAGCGATGCCGACGATAACATCCGTCTGACCACGAC
GGAAAAGCGTTGGCTGGATGAGGGTCAAGGCCGCGTTCTGCTGTTTCAGCTGAGCGGCC
CGATGATCTTTGGTGTGCCAAAGCCATCGCCCGGAGCATAATGCGATGGGCGATTGC
GATGCGCTGGTGTTCGACATCGGCGAAGTTCACACATGGGCGTTACCGCCAGTCTCGC
GCTGGAGAACGCGATCGAAGAGGCGCTGGACAAGGAACGTCAAGTTTATATCGTTGGCG
CGGCCGGTCAGACGCGTCGCCGTCTGGAAAAGCTCAAGCTGTTCAAACGCGTGCCGCCG
GATAAATGTCTGATGAGCCGCGAAGAGGCGCTCAAGAATGCGGTGCTGGGCATCTATCC
ACATCTGGCCGACGGTGTACGGCGCCAAGCAGCGAGATGGGCTAAGATCCGGCTGCTA
ACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAA
CCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTGAGATCTCGATCCCGCGAAAT
TAATACGACTCACTATAGGGGAATGTGAGCGGATAACAATCCCCTCTAGAAATAATT
TTGTTAACTTTAAGAAAGGAGATATACAATGCGCGTTAACAATGGTTTGACCCCGCAAG
AACTCGAGGCTTATGGTATCAGTGACGTACATGATATCGTTTACAACCCAAGCTACGAC
CTGCTGTATCAGGAAGAGCTCGATCCGAGCCTGACAGGTTATGAGCGCGGGGTGTTAAC
TAATCTGGGTGCCGTTGCCGTGATACCGGGATCTTCACCGGTCGTTACCAAAGATA
AGTATATCGTCCGTGACGATAACCACTCGCGATACTTTCTGGTGGCAGACAAAGGCAAA
GGTAAGAACGACAACAAACCTCTCTCTCCGAAACCTGGCAGCATCTGAAAGGCCTGGT
GACCAGGCAGCTTCCGGCAAACGTCTGTTTCGTTGTCGACGCTTCTGTGGTGCGAACC
CGGATACTCGTCTTCCGTCCGTTTCATCACCGAAGTGGCCTGGCAGGCGCATTTTGTC
AAAAACATGTTTATTCGCCCAGCGATGAAGAACTGGCAGGTTTCAAACCAGACTTTAT
CGTTATGAACGGCGCGAAGTGCACCTAACCCGAGTGGAAAGAACAGGGTCTCAACTCCG
AAAACCTTCGTGGCGTTAACCTGACCGAGCGCATGCAGCTGATTGGCGGCACCTGGTAC
GGCGGCGAAATGAAGAAAGGGATGTTCTCGATGATGAACTACCTGCTGCCGCTGAAAGG
TATCGCTTCTATGCACTGCTCCGCCAACGTTGGTGAGAAAGGCGATGTTGCGGTGTTCT
TCGGCCTTTCGGGCACCGGTAAAACCACCCTTTCACCGACCCGAAACGTCGCCTGATT
GGCGATGACGAACACGGCTGGGACGATGACGGCGTGTAACTTCGAAGGCGGCTGCTA
CGCAAAAACCTATCAAGCTGTGCAAGAAGCGGAACCTGAAATCTACAACGCTATCCGTC
GTGATGCGTTGCTGGAAAACGTCACCGTGCGTGAAGATGGCACTATCGACTTTGATGAT
GGTTCAAAAACCGAGAACACCCGCGTTTCTTATCCGATCTATCACATCGATAACATGTT
TAAGCCGGTTTCCAAAGCGGGCCACGCGACTAAGGTTATCTTCCTGACTGCTGATGCTT
TCGGCGTGTGCGCGCGGTTTCTCGCCTGACTGCCGATCAAACCCAGTATCACTTCCTC
TCTGGCTTCACCGCCAAACTGGCCGGTACTGAGCGTGGCATCACCGAACCGACGCCAAC
CTTCTCCGCTTGCTTCGGCGCGGCATTCCCTGTCGCTGCACCCGACTCAGTACGCAGAAG

[**図3-4**]

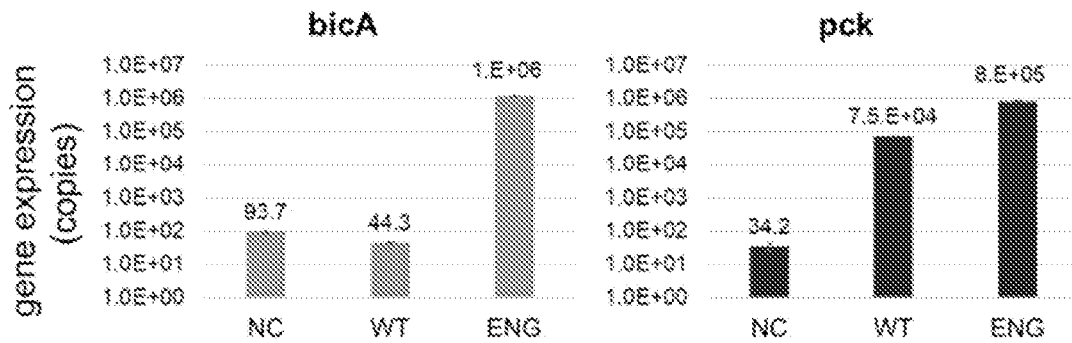
TGCTGGTGAAACGTATGCAGGCGGCGGGCGCGCAGGCTTATCTGGTTAACACTGGCTGG
AACGGCACTGGCAAACGTATCTCGATTAAAGATACCCGCGCCATTATCGACGCCATCCT
CAACGGTTCGCTGGATAATGCAGAAACCTTCACTCTGCCGATGTTTAACCTGGCGATCC
CAACCGAACTGCCGGGCGTAGACACGAAGATTCTCGATCCGCGTAACACCTACGCTTCT
CCGGAACAGTGGCAGGAAAAAGCCGAAACCCTGGCGAAACTGTTTATCGACAACCTCGA
TAAATACACCGACACCCCTGCGGGTGCCGCGCTGGTAGCGGCTGGTCCGAAACTGTAA

(配列番号 1 2)

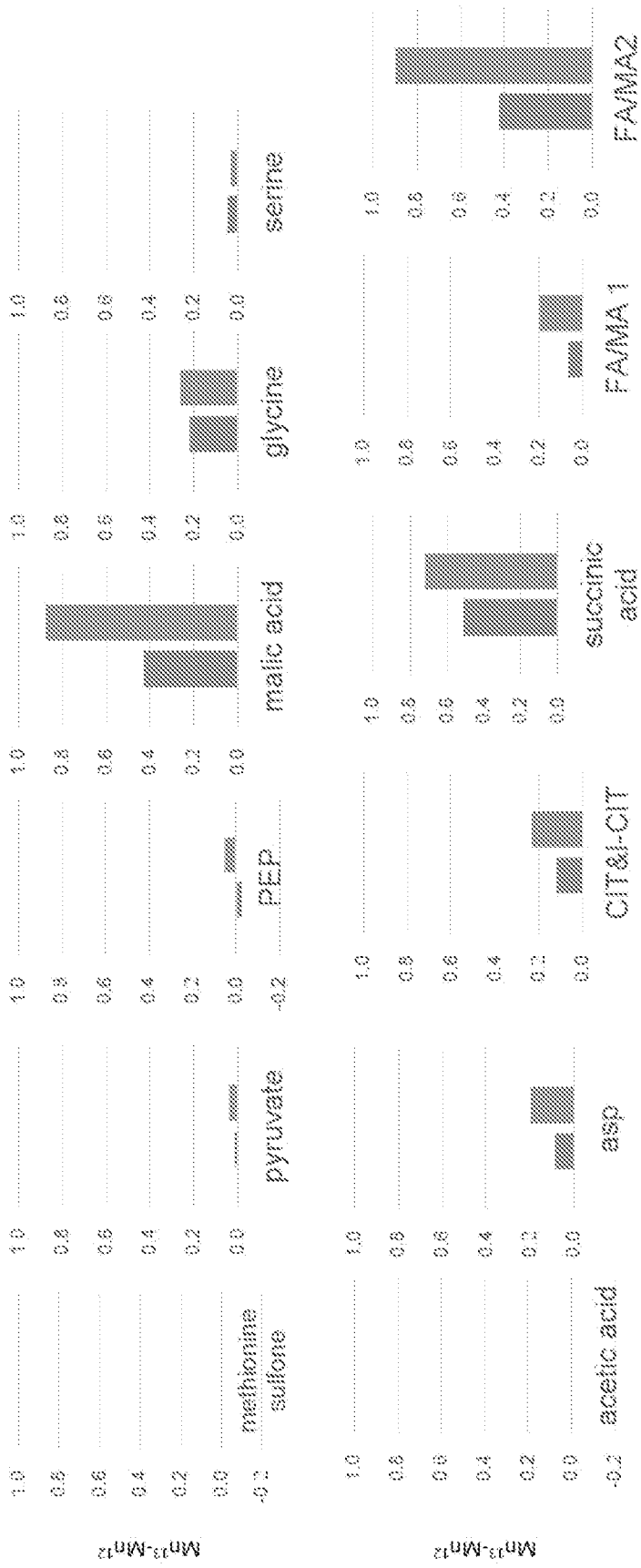
(C)

GCGGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCCTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCG
 AAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGG
CCTCTAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTGCTGAAAGGAGGAACTATATCCGGAT (配列番
 号 1 3)

[**図4**]



[図5]



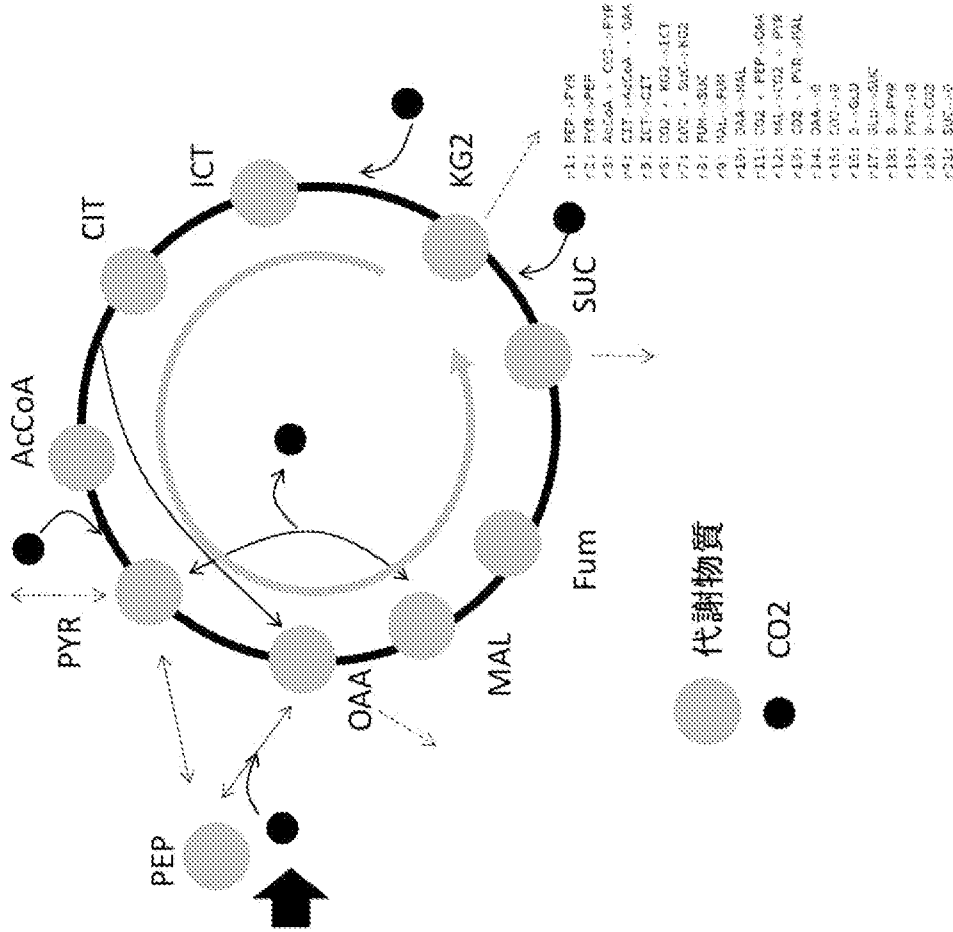
左:WT、右:No. 5

[7]

conditional on $\frac{d\bar{x}^m}{dk_{co2in}} > 0$ for $m = \text{MAL, PEP, SUC, CO2}$

	k1	k2	k3	k4	k5	k6	k7	k8	k9	k10	k11	k12	k13	k14	k15	k16	k17	k18	k19	k20	k21	
accCoA	0	0	-1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	-1
CIT	0	0	0	-1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	-1
CO2	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	1	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	-1
PUR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	1	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0
UIC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ICT	0	0	0	0	-1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	-1	1	0	0	0	0	0	-1
KGZ	0	0	0	0	0	-1	1	0	0	1	0	0	0	-1	0	1	0	0	0	0	0	-1
MAL	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	1	0	-1	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0
OAA	-1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	-1	0	0	0	0	0	0	0
PEP	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	-1	0	0	-1	-1	0	0	0	0	0	0	-1
PUR	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	-1	-1	0	0	0	0	0	0	-1
SUC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	-1	0	-1	-1	0	0	0	0	0	0	-1

	k1	k2	k3	k4	k5	k6	k7	k8	k9	k10	k11	k12	k13	k14	k15	k16	k17	k18	k19	k20	k21	
r1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	-1	0	0	-1	-1	0	0	0	0	0	0	-1
r2	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	-1	-1	0	0	0	0	0	0	-1
r3	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	-1	-1	0	0	0	0	0	0	-1
r4	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	-1	-1	0	0	0	0	0	0	-1
r5	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	-1	-1	0	0	0	0	0	0	-1
r6	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	-1	-1	0	0	0	0	0	0	-1
r7	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	-1	-1	0	0	0	0	0	0	-1
r8	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	-1	-1	0	0	0	0	0	0	-1
r9	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	-1	-1	0	0	0	0	0	0	-1
r10	-1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	-1	-1	0	0	0	0	0	0	0
r11	-1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	-1	-1	0	0	0	0	0	0	0
r12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	-1	-1	0	0	0	0	0	0	0
r13	1	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0
r14	-1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0
r15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	-1	0	0	0	0	0
r16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	-1	0	0	0	0
r17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
r18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
r19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
r20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
r21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
r22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/018494

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>C12P 7/46</i> (2006.01)i; <i>C12N 1/21</i> (2006.01)i; <i>C12N 5/10</i> (2006.01)i; <i>C12N 15/09</i> (2006.01)i; <i>C12N 15/31</i> (2006.01)n; <i>C12N 15/60</i> (2006.01)n FI: C12P7/46; C12N1/21; C12N5/10; C12N15/09 Z; C12N15/31; C12N15/60		
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) C12P7/46; C12N1/21; C12N5/10; C12N15/09; C12N15/31; C12N15/60		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2023 Registered utility model specifications of Japan 1996-2023 Published registered utility model applications of Japan 1994-2023		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAlplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); GenBank/EMBL/DDBJ/ GeneSeq; UniProt/GeneSeq		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ZHU, L. W. et al. Collaborative regulation of CO2 transport and fixation during succinate production in Escherichia coli. Scientific reports. vol. 5, 02 December 2015, article No. 17321 abstract, p. 8, 4th paragraph, fig. 5c, table 1	1-7
Y		8
Y	Database Uniprot [online]. Accession No. Q14SY0. 22 February 2023, [retrieved on 05 July 2023], Retrieved from the Internet: <URL: https://rest.uniprot.org/unisave/Q14SY0?format=txt&versions=100 >, Definition: Bicarbonate transporter BicA in particular, sequence information	8
Y	Database Uniprot [online]. Accession No. V0ANF8. 03 May 2023, [retrieved on 05 July 2023], Retrieved from the Internet: <URL: https://rest.uniprot.org/unisave/V0ANF8?format=txt&versions=47 >, Definition: Phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP) in particular, sequence information	8
Y	US 2013/0130339 A1 (HERMANN, Theron) 23 May 2013 (2013-05-23) paragraphs [0011], [0055], [0056]	8
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" 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 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 06 July 2023		Date of mailing of the international search report 18 July 2023
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/018494

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2022-530475 A (GENOMATICA, INC.) 29 June 2022 (2022-06-29) abstract, paragraph [0128]	1
A	MOCHIZUKI, A. et al. Sensitivity of chemical reaction networks: A structural approach. 1. Examples and the carbon metabolic network. Journal of Theoretical Biology. vol. 367, no. 21, 2015, pp. 189-202 entire text	1-8
A	WO 2023/068295 A1 (ITOCHU CORPORATION) 27 April 2023 (2023-04-27) entire text	1-8

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - on paper or in the form of an image file.
 - b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

“In the form of an Annex C/ST.25 text file” above should be understood as “in ST. 26 format”.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2023/018494

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
US	2013/0130339	A1	23 May 2013	WO 2012/018699	A2
JP	2022-530475	A	29 June 2022	US 2022/0235385	A1
				abstract, paragraph [0127]	
				WO 2020/219863	A1
				EP 3959310	A1
				KR 10-2022-0023339	A
				CN 114269908	A
WO	2023/068295	A1	27 April 2023	(Family: none)	

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12P 7/46(2006.01)i; C12N 1/21(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; C12N 15/09(2006.01)i; C12N 15/31(2006.01)n; C12N 15/60(2006.01)n FI: C12P7/46; C12N1/21; C12N5/10; C12N15/09 Z; C12N15/31; C12N15/60</p>										
<p>B. 調査を行った分野</p>										
<p>調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） C12P7/46; C12N1/21; C12N5/10; C12N15/09; C12N15/31; C12N15/60</p>										
<p>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</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922 - 1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971 - 2023年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996 - 2023年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994 - 2023年</td> </tr> </table>			日本国実用新案公報	1922 - 1996年	日本国公開実用新案公報	1971 - 2023年	日本国実用新案登録公報	1996 - 2023年	日本国登録実用新案公報	1994 - 2023年
日本国実用新案公報	1922 - 1996年									
日本国公開実用新案公報	1971 - 2023年									
日本国実用新案登録公報	1996 - 2023年									
日本国登録実用新案公報	1994 - 2023年									
<p>国際調査で利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/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); GenBank/EMBL/DBJ/ GeneSeq; UniProt/GeneSeq</p>										
<p>C. 関連すると認められる文献</p>										
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	ZHU, L. W. et al., Collaborative regulation of CO2 transport and fixation during succinate production in Escherichia coli, Scientific reports, Vol. 5, 2015.12.02, article No. 17321 要約, 第8頁第4段落, 図5c, 表1	1-7								
Y		8								
Y	Database Uniprot [online], Accession No. Q14SY0, 2023.02.22, [検索日:2023/07/05], Retrieved from the Internet:<URL: https://rest.uniprot.org/unisave/Q14SY0?format=txt&versions=100>, Definition: Bicarbonate transporter Bica 特に、配列情報	8								
Y	Database Uniprot [online], Accession No. VOANF8, 2023.05.03, [検索日:2023/07/05], Retrieved from the Internet:<URL: https://rest.uniprot.org/unisave/VOANF8?format=txt&versions=47>, Definition: Phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP) 特に、配列情報	8								
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>										
<p>* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な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抵触するものではなく、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</p>										
国際調査を完了した日	06.07.2023	国際調査報告の発送日 18.07.2023								
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員（特許庁審査官） 藤山 純 4B 1968 電話番号 03-3581-1101 内線 3448									

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	US 2013/0130339 A1 (HERMANN, Theron) 23.05.2013 (2013 - 05 - 23) [0011], [0055], [0056]	8
X	JP 2022-530475 A (ジェノマティカ インコーポレイテッド) 29.06.2022 (2022 - 06 - 29) 要約, [0128]	1
A	MOCHIZUKI, A. et al., Sensitivity of chemical reaction networks: A structural approach. 1. Examples and the carbon metabolic network, Journal of Theoretical Biology, Vol. 367, No. 21, 2015, pp. 189-202 全文	1-8
A	WO 2023/068295 A1 (伊藤忠商事株式会社) 27.04.2023 (2023 - 04 - 27) 全文	1-8

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。
- a. 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
- 附属書C/ST.25テキストファイル形式
- 紙形式又はイメージファイル形式
- b. 国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c. 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
- 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))
- 紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)
2. さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。
3. 補足意見:
- 上記「附属書 C/ST.25 テキストファイル形式」は「ST.26 形式」と読み替える。

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2023/018494

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
US	2013/0130339	A1	23.05.2013	WO	2012/018699	A2	
JP	2022-530475	A	29.06.2022	US	2022/0235385	A1	
					abstract, [0127]		
				WO	2020/219863	A1	
				EP	3959310	A1	
				KR	10-2022-0023339	A	
				CN	114269908	A	
WO	2023/068295	A1	27.04.2023	(ファミリーなし)			