

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02015/147318

発行日 平成29年4月13日 (2017. 4. 13)

(43) 国際公開日 平成27年10月1日 (2015. 10. 1)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 6 4
C 1 2 P 7/16 (2006.01)	C 1 2 P 7/16	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	

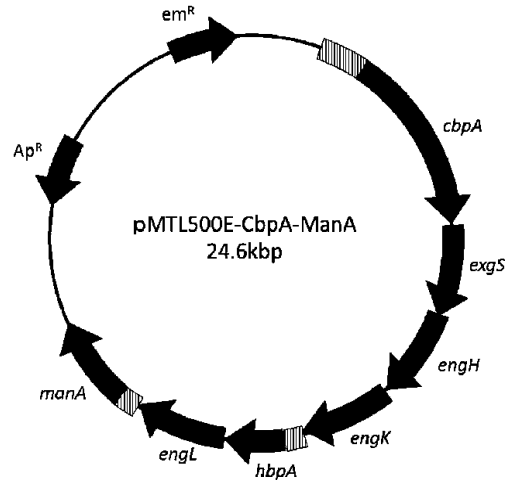
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 22 頁)

出願番号 特願2016-510578 (P2016-510578)	(71) 出願人 304026696 国立大学法人三重大学 三重県津市栗真町屋町1577
(21) 国際出願番号 PCT/JP2015/059854	(74) 代理人 110000774 特許業務法人 もえぎ特許事務所
(22) 国際出願日 平成27年3月30日 (2015. 3. 30)	(72) 発明者 三宅 英雄 三重県津市栗真町屋町1577 国立大学 法人三重大学大学院生物資源学研究科内
(31) 優先権主張番号 特願2014-68757 (P2014-68757)	(72) 発明者 田丸 浩 三重県津市栗真町屋町1577 国立大学 法人三重大学大学院生物資源学研究科内
(32) 優先日 平成26年3月28日 (2014. 3. 28)	Fターム(参考) 4B064 AC01 AC04 CA02 CA19 4B065 AA23X AB01 BA02 BA03 CA05 CA55
(33) 優先権主張国 日本国(JP)	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アルコールの製造方法

(57) 【要約】

バイオ燃料の製造において、従来の技術に対してさらに有用な方法を提供することを課題とする。セルロソーム発現プラスミドを構築し、該プラスミドにより形質転換された微生物を得て、これを培養することにより、従来の技術に対してさらに有用なアルコールの製造方法を提供する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

c b p A 遺伝子のプロモーター領域を含むセルロソーム発現プラスミド。

【請求項 2】

さらに、c b p A 遺伝子のシグナルペプチドをコードする領域を含む請求項 1 に記載のセルロソーム発現プラスミド。

【請求項 3】

配列表配列番号 2 に示される塩基配列を含む c b p A 遺伝子のプロモーター領域と、配列表配列番号 3 に示される塩基配列を含む c b p A 遺伝子のシグナルペプチドをコードする領域を含む、請求項 2 に記載のセルロソーム発現プラスミド。

10

【請求項 4】

請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載のプラスミドを微生物に導入して得られる形質転換体。

【請求項 5】

微生物がクロストリジウム属に属する微生物または酵母である請求項 4 に記載の形質転換体。

【請求項 6】

微生物がクロストリジウム ベイジェリンキまたはクロストリジウム アセトブチリカムである請求項 5 に記載の形質転換体。

【請求項 7】

請求項 4 ~ 6 のいずれかに記載の形質転換体を培養する工程を含む、基質からアルコールを製造する方法。

20

【請求項 8】

基質がセルロース系バイオマスである請求項 7 に記載のアルコールを製造する方法。

【請求項 9】

セルロース系バイオマスがローカストビーンガム、稲わら、バガス、コーンストーバー、スイッチグラス、ポプラまたは植物残渣である請求項 8 に記載のアルコールを製造する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

30

【0001】

本発明はセルロソーム発現プラスミド、該プラスミドにより形質転換された微生物、および該微生物によるアルコールの製造方法に関する。さらに詳しくは、セルロース系バイオマスを直接糖化可能なセルロソームを発現するためのプラスミドに関する。また、該プラスミドによって、アルコール発酵が可能な微生物の形質転換体を得て、ブタノール等のアルコールを製造する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

近年、稲わら、バカス、植物残渣等のセルロース系バイオマスからエタノール、ブタノール等のアルコールをバイオ燃料として製造する様々な技術が開発されている。しかし、これらのバイオ燃料の製造はコストが高いという問題がある。そこで、次世代のバイオ燃料生産をはじめとしたバイオリファイナリーにおいて、「前処理、糖化、発酵」の工程を統合 (Consolidated Bio-Processing: CBP (以下、単に CBP と示す場合がある)) する技術開発が求められている。CBP による技術革新により、さらにバイオ燃料製造のコストダウンが可能であり、最大で 41% のコストダウンが見込めるとされている (非特許文献 1)。

40

【0003】

この前処理、糖化に関して、稲わらなどのソフトバイオマスを直接分解できる微生物として、嫌気性中温菌であるクロストリジウム セルロボランス (Clostridium cellulovorans) が報告された (非特許文献 2)。その後、クロストリジ

50

ウム セルロポランスは「セルロソーム」とよばれる超タンパク質複合体を生産することが確認された（非特許文献3）。

【0004】

セルロソームは、セルロソーム骨格タンパク質にセルラーゼやヘミセルラーゼなどの酵素を搭載した超タンパク質複合体であり、基質に応じて酵素を組み合わせることでソフトバイオマスを効率よく分解する（非特許文献4）。本発明者らは、クロストリジウム セルロポランスの全遺伝子情報を全ゲノム解析により解読し（非特許文献5）、この結果から、セルロソームの土台となるセルロソーム骨格タンパク質、セルロソーム骨格タンパク質と相互作用することができるセルラーゼ、ヘミセルラーゼなどの酵素やタンパク質、さらに分泌型の糖質関連酵素であるノンセルロソームの同定および分類を完了した。また、

10

【0005】

このうちクロストリジウム セルロポランスが生産するセルロソーム骨格タンパク質の一つであるCbpA（Cellulose binding protein（以下、単にCbpAと示す場合がある））は、（1）結晶性セルロースと結合することができる糖質結合モジュール（CBM）が1つ、（2）菌体の細胞表層と結合する表層ホモロジドメイン（SLH）が4つ、（3）セルロソームを構成する酵素が持つドックリンドメインと結合するコヘシンドメインが9つあり、これらの（1）～（3）から構成される分子量が189,000の比較的大きなタンパク質である。cbpA遺伝子の下流にはセルラーゼおよびヘミセルラーゼの遺伝子が多数存在し、cbpA遺伝子クラスターと呼ばれる遺伝子クラスターを形成している（非特許文献9）。

20

【0006】

クロストリジウム属の微生物には、クロストリジウム セルロポランスのようにセルロソームを形成してリグノセルロースを分解したり、ブタノールやエタノール等のアルコールやアセトンなどの有機溶媒を生産したりするものがいくつか知られている。

例えば、クロストリジウム アセトブチリカム（Clostridium acetobutylicum）やクロストリジウム ベイジェリンクキ（Clostridium beijerinckii）はブタノール生産菌として知られており、これらの微生物によるアセトン・ブタノール・エタノール（ABE）発酵が、酵母を使ったエタノール発酵

30

に続いて実用化されている（非特許文献10）。
ABE発酵によるアセトン・ブタノール生産は、化学合成法により安価な合成アルコールが普及するにつれて衰退したが、化石燃料の高騰や地球温暖化等の問題から、近年、再び世界的に注目されている。

【0007】

このようなバイオ燃料の製造のための技術として、例えば、特許文献1は、効率的にブタノールを得るために、クロストリジウム アセトブチリカムやクロストリジウム ベイジェリンクキ等のクロストリジウム属に属する微生物を、一定量の乳酸を基質として含む環境（medium）で培養する方法を開示している。

特許文献2は、酪酸の形成に関与するホストランスブチリラーゼをコードする遺伝子等の遺伝子が削除されているクロストリジウム属に属する微生物を培養することで、n-ブタノールを高収率で生物学的に製造する方法を開示している。

40

特許文献3は、アルコールの製造に直接関与するものではないが、セルロソーム足場タンパク質等の融合タンパク質をコードするポリ核酸を含む組換え微生物として、クロストリジウム属に属する微生物を得て、異種セルラーゼを分泌させる方法等を開示している。

また、特許文献4は、クロストリジウム属に属する微生物等を培養することによって得られた1-ブタノール、2-ブタノール等の有機成分を特定のステップを経ることにより高濃度で回収する方法等を開示している。

さらに、特許文献5は、クロストリジウム セルロリチカム由来のセルロソーム構成タンパク質をコードする遺伝子（Cel5A遺伝子またはCel9M遺伝子）やビルビン

50

酸脱炭酸酵素 (P D C) やアルコール脱水素酵素 (A D H 1) をコードする遺伝子等を組み込んだクロストリジウム アセトブチリカムを得て、これを培養することにより、グルコースやセルロースを基質としてエタノールを産生させる方法等を開示している。

この方法もセルロソーム発現プラスミドにより形質転換されたクロストリジウム属の微生物を用いて、アルコールを製造する方法に関するものであるが、セルロソームを構成しているタンパク質の種類や該タンパク質の由来、また生産させたセルロソームのサイズ等が本発明と異なり、生産しているアルコールも主にエタノールである。

これらの技術により、バイオ燃料の製造において、微生物によるアルコール生産を効率化したり、回収率を高めたりすることが可能となりつつあるが、さらに有用な方法の提供が望まれている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【 0 0 0 8 】

【特許文献 1】特許第 4 6 6 5 0 6 6 号

【特許文献 2】特表 2 0 1 0 - 5 0 8 0 1 7 号公報

【特許文献 3】特表 2 0 1 1 - 5 2 9 3 3 6 号公報

【特許文献 4】特表 2 0 1 3 - 5 1 3 3 9 4 号公報

【特許文献 5】国際公開第 2 0 1 0 / 0 6 3 7 6 6 号パンフレット

【非特許文献】

【 0 0 0 9 】

【非特許文献 1】Lynd, L. R., Laser, M. S., Bransby, D., Dale, B. E., Davison, B., Hamilton, R., Himmel, M., Keller, M., McMillan, J. D., Sheehan, J., and Wyman, C. E. (2008) How biotech can transform biofuels. *Nat Biotechnol* 26, 169-172

【非特許文献 2】Sleat, R., Mah, R. A., and Robinson, R. (1984) Isolation and Characterization of an Anaerobic, Cellulolytic Bacterium, *Clostridium cellulovorans* sp. nov. *Appl Environ Microbiol* 48, 88-93

【非特許文献 3】Shoseyov, O., Takagi, M., Goldstein, M. A., and Doi, R. H. (1992) Primary sequence analysis of *Clostridium cellulovorans* cellulose binding protein A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 3483-3487

【非特許文献 4】Lamed, R., Setter, E., and Bayer, E. A. (1983) Characterization of a cellulose-binding, cellulase-containing complex in *Clostridium thermocellum*. *J Bacteriol* 156, 828-836

【非特許文献 5】Tamaru, Y., Miyake, H., Kuroda, K., Nakanishi, A., Kawade, Y., Yamamoto, K., Uemura, M., Fujita, Y., Doi, R. H., and Ueda, M. (2010) Genome sequence of the cellulosome-producing mesophilic organism *Clostridium cellulovorans* 743B. *J Bacteriol* 192, 901-902

【非特許文献 6】Han, S. O., Yukawa, H., Inui, M., and Doi, R. H. (2005) Effect of carbon source on the cellulosomal subpopulations of *Clostridium cellulovorans*. *Microbiology-Sgm.*, 151, 1491-1497

【非特許文献 7】Morisaka, H., Matsui, K., Tatsukami, Y., Kuroda, K., Miyake, H., Tamaru, Y., Ueda, M. (2012) Profile of native cellulosomal proteins of *Clostridium cellulovorans* adapted to various carbon sources. *AMB Express.*, 2, 37

【非特許文献 8】Matsui, K., Bae, J., Esaka, K., Morisaka, H., Kuroda, K., Ueda, M. (2013) Exoproteome profiles of *Clostridium cellulovorans* grown on various carbon sources. *Appl Environ Microbiol.*, 21, 6576-6584

【非特許文献 9】Tamaru, Y., Karita, S., Ibrahim, A., Chan, H., and Doi, R. H. (2000) A large gene cluster for the *Clostridium cellulovorans* cellulosome. *J Bacteriol* 182, 5906-5910

【非特許文献 10】Jones, D. T., and Woods, D. R. (1986) Acetone-butanol fermentation revisited. *Microbiol Rev* 50, 484-524

10

20

30

40

50

【発明の概要】**【発明が解決しようとする課題】****【0010】**

本発明は、バイオ燃料の製造において、従来の技術に対してさらに有用な方法を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】**【0011】**

本発明者は、上記課題の解決を目的として鋭意検討した結果、セルロソーム発現プラスミドを構築し、該プラスミドにより形質転換された微生物を得て、これを培養することにより、従来の技術に対してさらに有用なアルコールの製造方法が提供できることを見出し、本発明を完成するに至った。

本発明によって構築されるプラスミドは、セルロース系バイオマスを直接糖化可能なセルロソームを発現するためのプラスミドであり、該プラスミドによって、アルコール発酵が可能な微生物の形質転換体を得ることにより、該微生物の培養におけるエタノール、ブタノール等のアルコールの生産効率を高めることが可能となる。

【0012】

すなわち、本発明は、次の(1)～(9)に示されるアルコールの製造方法に関する。

(1) c b p A 遺伝子のプロモーター領域を含むセルロソーム発現プラスミド。

(2) さらに、c b p A 遺伝子のシグナルペプチドをコードする領域を含む上記(1)に記載のセルロソーム発現プラスミド。

(3) 配列表配列番号2に示される塩基配列を含むc b p A 遺伝子のプロモーター領域と、配列表配列番号3に示される塩基配列を含むc b p A 遺伝子のシグナルペプチドをコードする領域を含む、上記(2)に記載のセルロソーム発現プラスミド。

(4) 上記(1)～(3)のいずれかに記載のプラスミドを微生物に導入して得られる形質転換体。

(5) 微生物がクロストリジウム属に属する微生物または酵母である上記(4)に記載の形質転換体。

(6) 微生物がクロストリジウム ベイジェリンキまたはクロストリジウム アセトブチリカムである上記(5)に記載の形質転換体。

(7) 上記(4)～(6)のいずれかに記載の形質転換体を培養する工程を含む、基質からアルコールを製造する方法。

(8) 基質がセルロース系バイオマスである上記(7)に記載のアルコールを製造する方法。

(9) セルロース系バイオマスがローカストピーンガム、稲わら、バガス、コーンストーパー、スイッチグラス、ポプラまたは植物残渣である上記(8)に記載のアルコールを製造する方法。

【発明の効果】**【0013】**

本発明によって構築されたセルロソーム発現プラスミドによりクロストリジウム ベイジェリンキ等のアルコールを産生する微生物の形質転換体を得て、該形質転換体を培養することにより、セルロース系バイオマスから直接ブタノール等のアルコールを製造することが可能となる。これによりバイオ燃料の効率的な製造が可能となり、時間やコストを大幅に削減することができる。

【図面の簡単な説明】**【0014】**

【図1】セルロソーム関連遺伝子およびノンセルロソーム関連遺伝子の遺伝子発現量を示した図である(実施例1)。

【図2】c b p A 遺伝子の塩基配列におけるプロモーター領域およびシグナルペプチド領域を示した図である(実施例1)。

【図3】p M T L 5 0 0 E - c b p A - M a n A のマップを示した図である(実施例1)

10

20

30

40

50

。

【図4】形質転換体において、導入した遺伝子の挿入の有無を確認した図である（実施例2）。

【図5】形質転換体の酵素活性を確認した図である（実施例2）。

【図6】ローカストビーンガム（Locust bean gum（以下、単にLBGと示す場合がある））を含む培地における形質転換体の培養後の写真を示した図である（実施例3）。

【図7】ガスクロマトグラフィーによりブタノールの生産量を確認した図である（実施例3）。

【図8】Cb p A - Man A形質転換体クロストリジウム ベイジェリンキによるLBGの分解結果を示した図である（実施例3）。

10

【発明を実施するための形態】

【0015】

本発明の「セルロソーム発現プラスミド」は、微生物に導入することにより、該微生物にセルロソームを賦与し、セルロソーム発現能を与え得るプラスミドのことをいう。

本発明の「セルロソーム発現プラスミド」は、セルロソームを構築し得る遺伝子を含んでいればよい。このような遺伝子として、セルロソーム骨格タンパク質をコードする遺伝子やセルロソーム骨格タンパク質と相互作用するセルラーゼ、ヘミセルラーゼ等の酵素をコードする遺伝子等のセルロソーム関連遺伝子が挙げられる。これらのセルロソーム関連遺伝子は従来知られるいずれの遺伝子であってもよい。

20

【0016】

本発明の「セルロソーム発現プラスミド」に含まれる遺伝子として、例えば、セルロソーム骨格タンパク質をコードするcbpA遺伝子やhbpA遺伝子が挙げられる。

このcbpA遺伝子として、配列表配列番号1に示される塩基配列が挙げられるが、cbpA遺伝子と同様に作用し得るのであれば、配列表配列番号1に示される塩基配列に85%以上の同一性を有する塩基配列、90%以上の同一性を有する塩基配列や95%以上の同一性を有する塩基配列で示されるものも、本発明の「セルロソーム発現プラスミド」に含むことができる。

【0017】

また、本発明の「セルロソーム発現プラスミド」は、cbpA遺伝子として示される塩基配列を全て含む必要はなく、少なくとも配列表配列番号2に示されるcbpA遺伝子のプロモーター領域を含むものであれば良い。また、cbpA遺伝子のプロモーター領域と同様に作用し得るのであれば、配列表配列番号2に示される塩基配列に85%以上の同一性を有する塩基配列、90%以上の同一性を有する塩基配列や95%以上の同一性を有する塩基配列で示されるものも、本発明の「セルロソーム発現プラスミド」に含むことができる。

30

【0018】

さらに、本発明の「セルロソーム発現プラスミド」は、cbpA遺伝子のプロモーター領域に加えて配列表配列番号3に示されるcbpA遺伝子のシグナルペプチドをコードする領域を含むものであることが好ましい。また、cbpA遺伝子のシグナルペプチドと同様に作用し得るのであれば、配列表配列番号3に示される塩基配列に85%以上の同一性を有する塩基配列、90%以上の同一性を有する塩基配列や95%以上の同一性を有する塩基配列で示されるものも、本発明の「セルロソーム発現プラスミド」に含むことができる。

40

また、本発明の「セルロソーム発現プラスミド」は、cbpA遺伝子のプロモーター領域やcbpA遺伝子のシグナルペプチドをコードする領域に加えて、配列表配列番号4に示されるcbpA遺伝子のコーディング領域を含むものであることがさらに好ましい。cbpA遺伝子のコーディング領域と同様に作用し得るのであれば、配列表配列番号4に示される塩基配列に85%以上の同一性を有する塩基配列、90%以上の同一性を有する塩基配列や95%以上の同一性を有する塩基配列で示されるものも、本発明の「セルロソーム

50

ム発現プラスミド」に含むことができる。

【0019】

セルロソーム骨格タンパク質をコードする h b p A 遺伝子としては、配列表配列番号 8 に示される塩基配列が挙げられる。また、h b p A 遺伝子と同様に作用し得るのであれば、配列表配列番号 8 に示される塩基配列に 85%以上の同一性を有する塩基配列、90%以上の同一性を有する塩基配列や95%以上の同一性を有する塩基配列で示されるものも、本発明の「セルロソーム発現プラスミド」に含むことができる。

【0020】

さらに、本発明の「セルロソーム発現プラスミド」に含まれる遺伝子として、例えば、セルロソーム骨格タンパク質と相互作用するセルラーゼ、ヘミセルラーゼ等の酵素をコードする e x g S 遺伝子、e n g H 遺伝子、e n g K 遺伝子、e n g L 遺伝子または e n g M 遺伝子等が挙げられる。また、本発明の「セルロソーム発現プラスミド」は、マンナーゼ等のその他の酵素をコードする m a n A 遺伝子や m a n B 遺伝子等を含んでいても良い。

この e x g S 遺伝子として、配列表配列番号 5 に示される塩基配列が挙げられる。また、e x g S 遺伝子と同様に作用し得るのであれば、配列表配列番号 5 に示される塩基配列に 85%以上の同一性を有する塩基配列、90%以上の同一性を有する塩基配列や95%以上の同一性を有する塩基配列で示されるものも、本発明の「セルロソーム発現プラスミド」に含むことができる。

e n g H 遺伝子としては、配列表配列番号 6 に示される塩基配列が挙げられる。また、e n g H 遺伝子と同様に作用し得るのであれば、配列表配列番号 6 に示される塩基配列に 85%以上の同一性を有する塩基配列、90%以上の同一性を有する塩基配列や95%以上の同一性を有する塩基配列で示されるものも、本発明の「セルロソーム発現プラスミド」に含むことができる。

【0021】

さらに、e n g K 遺伝子として、配列表配列番号 7 に示される塩基配列が挙げられる。また、e n g K 遺伝子と同様に作用し得るのであれば、配列表配列番号 7 に示される塩基配列に 85%以上の同一性を有する塩基配列、90%以上の同一性を有する塩基配列や95%以上の同一性を有する塩基配列で示されるものも、本発明の「セルロソーム発現プラスミド」に含むことができる。

e n g L 遺伝子として、配列表配列番号 9 に示される塩基配列が挙げられる。また、e n g L 遺伝子と同様に作用し得るのであれば、配列表配列番号 9 に示される塩基配列に 85%以上の同一性を有する塩基配列、90%以上の同一性を有する塩基配列や95%以上の同一性を有する塩基配列で示されるものも、本発明の「セルロソーム発現プラスミド」に含むことができる。

【0022】

その他の酵素として、例えばマンナーゼをコードする遺伝子として m a n A 遺伝子が挙げられる。m a n A 遺伝子としては、配列表配列番号 10 に示される塩基配列が挙げられる。また、m a n A 遺伝子と同様に作用し得るのであれば、配列表配列番号 10 に示される塩基配列に 85%以上の同一性を有する塩基配列、90%以上の同一性を有する塩基配列や95%以上の同一性を有する塩基配列で示されるものも、本発明の「セルロソーム発現プラスミド」に含むことができる。

【0023】

本発明の「セルロソーム発現プラスミド」は、セルロソームの構築が可能であれば、これらのセルロソーム骨格タンパク質をコードする遺伝子、セルロソーム骨格タンパク質と相互作用するセルラーゼ、ヘミセルラーゼ等の酵素をコードする遺伝子や、その他の酵素をコードする遺伝子を2つ以上複数組み合わせ含むことができる。

本発明の「セルロソーム発現プラスミド」は、セルロソームを微生物に発現させるためのベクターに、c b p A 遺伝子のプロモーター領域、または c b p A 遺伝子のプロモーター領域と c b p A 遺伝子のシグナルペプチドをコードする領域を組み込むことにより構築

10

20

30

40

50

することができる。これらに *c b p A* 遺伝子のコーディング領域を組み合わせても良く、さらにセルロソーム骨格タンパク質をコードする遺伝子、セルロソーム骨格タンパク質と相互作用するセルラーゼ、ヘミセルラーゼ等の酵素をコードする遺伝子や、その他の酵素をコードする遺伝子を組み合わせても組み込んで良い。

【 0 0 2 4 】

本発明の「セルロソーム発現プラスミド」において使用するベクターは、従来知られるいずれのものであっても良いが、例えば、ブタノール生産菌のホスト-ベクター系として知られる *E. coli* - *C. acetobutylicum* のシャトルベクター（参考文献 1、2）、*pMTL500E* ベクター（参考文献 3）や、*pMTL80000* ベクター（参考文献 4）等を使用することができる。

参考文献 1 : Tummala, S. B., Welker, N. E., and Papoutsakis, E. T. (1999) Development and characterization of a gene expression reporter system for *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Appl Environ Microbiol* 65, 3793-3799

参考文献 2 : Collas, F., Kuit, W., Clement, B., Marchal, R., Lopez-Contreras, A. M., and Monot, F. (2012) Simultaneous production of isopropanol, butanol, ethanol and 2,3-butanediol by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 engineered strains. *AMB Express* 2, 45

参考文献 3 : Oultram, J. D., Loughlin, M., Swinfield, T-J., Brehm, J. K., Thompson, D. E., Minton, N. P. (1988) Introduction of plasmids into whole cells of *Clostridium acetobutylicum* by electroporation. *FEMS Microbiol. Letters* 56: 83-88

【 0 0 2 5 】

このようにして構築した「セルロソーム発現プラスミド」として、例えば、*pMTL500E* ベクターに *c b p A* 遺伝子のプロモーター領域、*c b p A* 遺伝子のシグナルペプチドをコードする領域および *c b p A* 遺伝子のコーディング領域を組み合わせ、さらに *h b p A* 遺伝子、*exgS* 遺伝子、*engH* 遺伝子、*engK* 遺伝子、*engL* 遺伝子および *manA* 遺伝子を組み合わせ組み込んだ *pMTL500E-c b p A-ManA* 等が挙げられる。なお、これらの遺伝子等のベクターへの組み込み方法は、従来知られているいずれの方法であっても良い。

【 0 0 2 6 】

本発明の「形質転換体」は、本発明の「セルロソーム発現プラスミド」を微生物に導入することで、セルロソームを賦与された微生物のことをいう。

本発明においてセルロソームを賦与する微生物は、従来知られているいずれの微生物であっても良いが、エタノール、ブタノール等のアルコールを生産し得る、バイオマス燃料の製造に有用な微生物であることが好ましい。

このような微生物として、バイオマス燃料の製造に有用なクロストリジウム属に属する微生物等が挙げられ、クロストリジウム属に属する微生物としてクロストリジウム ベイジェリンク、クロストリジウム アセトブチリカム等が挙げられる。また、酵母を「形質転換体」としても良い。

【 0 0 2 7 】

本発明の「アルコールを製造する方法」は、本発明の「形質転換体」を基質を含む培地で培養する工程を含むことにより、基質からエタノールおよび/またはブタノールを製造する方法のことをいう。このような基質として、セルロース系バイオマスを挙げることができる。

本発明のセルロース系バイオマスとして、ローカストビーンガム、稲わら、バッカス、コーンストーバー、スイッチグラス、ポプラまたは植物残渣等が挙げられる。

【 0 0 2 8 】

以下に実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、本発明がこれらに限定されないことは言うまでもない。

【 0 0 2 9 】

[実施例 1]

プラスミドの構築

1. RNA-Seq解析によるプロモーターの検討

1) グルコース、セロビオース、カルボキシメチルセルロース (CMC)、キシラン、ローストビーンガム (LBG)、ペクチンの6種類の糖を炭素源とした培地 (非特許文献2、参照) でクロストリジウム セルロバランスをそれぞれ培養し、対数増殖期中期に total RNAを抽出した。

その後、mRNA-Seqライブラリーの調製とrRNAの量を減少させるためにDSN処理によるNormalizationを行った後、次世代シーケンサーであるHiSeq 2000 (Illumina) に供した。

シーケンスから得られたリード配列をゲノム配列にマッピングし、各遺伝子の発現量を、遺伝子の長さとして正規化した単位 (RPKM) で算出することにより求めた (参考文献5)。

10

参考文献5 : Mortazavi, A., Williams, B. A., McCue, K., Schaeffer, L., Wold, B. (2008) Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. Nat Methods., 5, 621-628

【0030】

2) クロストリジウム セルロバランスにおいて発現した遺伝子のうち、セルロソーム関連遺伝子およびノンセルロソーム関連遺伝子に着目し、上記1)において求めた各遺伝子におけるRPKMに対して底を2とした対数変換を行い、得られた値 $[\log_2(RPKM)]$ を遺伝子発現量とした。

20

得られたセルロソーム関連遺伝子およびノンセルロソーム関連遺伝子の遺伝子発現量をヒートマップにより図1に表した。

図1の(A)は全てのセルロソーム関連遺伝子およびノンセルロソーム関連遺伝子の発現量を示したものである。このうち遺伝子発現量 $[\log_2(RPKM)]$ が3.5以上のセルロソーム関連遺伝子を(B)にまとめて示し、同様のノンセルロソーム関連遺伝子を(C)にまとめて示した。これらの(A)~(C)において、発現量が高い遺伝子は赤色、低い遺伝子は緑色、中間の遺伝子は黒色で示している。

【0031】

3) 上記1)および2)の結果、セルロソーム関連遺伝子では、cbpA遺伝子クラスターに含まれる遺伝子 (cbpA、exgS、engH、engK、hbpA、engL、manA、engM) と manGH26A (manA)、manGH26B (manB) がいずれの炭素源においても遺伝子発現量 $[\log_2(RPKM)]$ が3.5以上の高い発現量を示すことが確認できた。

30

従って、この結果より、クロストリジウム ベイジェリンキにセルロソームを賦与する本発明のプラスミドの構築にあたり、cbpA遺伝子クラスターの上流に位置するcbpA遺伝子のプロモーターを選択した。また、菌体の表層に発現させるか、もしくは分泌させるために、そのシグナルペプチドも使用した。

【0032】

配列表配列番号1に、このcbpA遺伝子の塩基配列を示すとともに、図2において、このcbpA遺伝子の塩基配列におけるプロモーター領域 (図2: 太字、一重下線部 (配列表配列番号2))、シグナルペプチド領域 (図2: イタリック体、二重下線部 (配列表配列番号3)) をそれぞれ示した。

40

また、配列表配列番号4にcbpA遺伝子のコーディング領域の塩基配列を示し、配列表配列番号5にexgS遺伝子の塩基配列、同配列番号6にengH遺伝子の塩基配列、同配列番号7にengK遺伝子の塩基配列、同配列番号8にhbpA遺伝子の塩基配列、同配列番号9にengL遺伝子の塩基配列、同配列番号10にmanA遺伝子の塩基配列をそれぞれ示した。exgS、engH、engK、engLはセルラーゼ遺伝子であり、hbpAはセルロソーム骨格タンパク質遺伝子であり、manAはマンナーゼ遺伝子である (非特許文献9、参照)。

【0033】

50

2. セルロソーム発現用プラスミドの構築

1) 上記1.の結果より、c b p A 遺伝子クラスターのc b p A 遺伝子からm a n A 遺伝子までの遺伝子によりセルロソームの構築を行った。c b p A 遺伝子からm a n A 遺伝子までの領域(配列表配列番号11)は、表1に示したプライマーによるPCRによって増幅し、これをp M T L 5 0 0 E ベクターに挿入した。

c b p A 遺伝子からm a n A 遺伝子までの領域を表1に示したプライマー(配列表配列番号12、13)により、クロストリジウム セルロボランスのゲノムDNAを鋳型としてPCRを行い増幅した。表1の各プライマーは、増幅した断片をプラスミドに挿入するために、プラスミドと相同配列となるような塩基配列(表1、下線部)を含むものであった。

【0034】

【表1】

Seq. No.	Primer name	Sequence	Length
12	CbpAgene_Foward	<u>ATACCAGCTTTAGCAGCGACATCATCAATGTCAGTTGAATTTTACA</u> ACTC	50 mer
13	ManA_Reverse	CGGGGATCCTCTAGATTACCTAACAAATATCAGTATGTTGAGCTCC	45 mer

10

20

【0035】

2) 上記1)によって増幅したc b p A 遺伝子からm a n A 遺伝子の断片を精製し、線状化したp M T L 5 0 0 E ベクターに、In - F u s i o n (登録商標) H D C l o n i n g K i t (タカラバイオ)によってIn - F u s i o n (登録商標)反応を行い、セルロソーム発現用プラスミドとした。

このセルロソーム発現用プラスミドを大腸菌H S T 0 8 株へ導入した後、100 μ g / m L のアンピシリンを含むL B 寒天培地に植菌し37 °Cで一晩静置培養した。コロニーPCRにより、c b p A 遺伝子からm a n A 遺伝子が挿入されているコロニーを選択してL B 液体培地で培養した後、プラスミドDNAを抽出した。このようにして得られたセルロソーム発現用プラスミドは、以下、本発明においてp M T L 5 0 0 E - c b p A - M a n A と示す。図3にp M T L 5 0 0 E - c b p A - M a n A のマップを示した。

30

【0036】

なお、図3における各部分はそれぞれ次のものを示す。

A p R、e m R : 抗生物質耐性遺伝子

斜線部 : プロモーター領域

c b p A、h b p A : セルロソーム骨格タンパク質遺伝子

e x g S、e n g H、e n g K、e n g L : セルラーゼ遺伝子

m a n A : マンナーゼ遺伝子

【0037】

[実施例2]

40

1. 形質転換体の作製

1) エレクトロポレーション法により、p M T L 5 0 0 E - C b p A - M a n A を導入し、クロストリジウム ベイジェリンキの形質転換を行った。

クロストリジウム ベイジェリンキ(N B R C 103909) ((独)製品評価技術基盤機構より分譲を受けた)をOD600 = 0.3になるまで表2の組成で作製した培地で培養した。この培養液を5 mL容のチューブに入れ、嫌気チャンパー中の卓上遠心機で室温、2,400 g、5分間遠心分離して集菌した。この上清を取り除き、氷上で冷したエレクトロポレーション緩衝液(270 mM スクロース、10 mM M g C l ₂、0.6 mM N a H ₂ P O ₄、4.4 mM N a H ₂ P O ₄ pH6.0)を1 mL加えて菌体を懸濁し、再び5分間遠心分離して集菌した。この上清を取り除き、10 mM が含ま

50

れていない冷えたエレクトロポレーション緩衝液 (270 mM スクロース、0.6 mM NaH_2PO_4 、4.4 mM NaH_2PO_4 pH 6.0) を 0.4 mL 加えて再懸濁し、氷上で 10 分間静置した。

滅菌済みの 1.5 mL 容チューブに 20 μL の菌体懸濁液と 25 ng の pMTL500 E - CbpA - ManA を加えて混合し、氷上で 8 分間静置した。この混合液を、氷上で冷した 0.1 cm ギャップ滅菌済みエレクトロポレーションキュベット (BIO-RAD) に移し、Gene Pulser Xcell (商標) エレクトロポレーションシステム (BIO-RAD) により、エレクトロポレーション法による形質転換を行った。エレクトロポレーションの条件は、700 V、200 μs 、25 μF で行った。エレクトロポレーションを行った後、キュベットを氷上で 10 分間静置した。その後、170 μL の表 2 の組成で作製した培地を加え、混合してから 2 mL 容の密栓できるチューブに移し、37 $^{\circ}\text{C}$ で 2.5 時間静置培養した。ここまでの操作は全て嫌気チャンバー内で行った。

【0038】

2) 上記 1) のサンプルの入ったチューブを嫌気チャンバーから取り出し、表 2 の組成からなる培地に 1.5% Agar を含んだ 7 mL の培地を滅菌して溶解し、培地に二酸化炭素を吹き込みながら植菌した。植菌の際に、エリスロマイシンを 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ になるように加えた。酸素が入らないようにブチル栓をし、ロールチューブ作製器 (三紳工業株式会社) でロールチューブを作製した。作製したロールチューブを 37 $^{\circ}\text{C}$ で一晩培養した。

形質転換後、コロニー PCR により導入した遺伝子が挿入されているかを確認した。コロニーを鋳型とし、表 1 に記載のプライマーにより PCR 反応を行い、導入した遺伝子の挿入を確認した (図 4)。このようにして得られた形質転換体 (CbpA - ManA 形質転換体 クロストリジウム ベイジェリンキ) は、以下、単に CbpA - ManA 形質転換体と示す場合がある。

【0039】

なお、図 4 における各部分はそれぞれ次のものを示す。

M : 1 kb Extend DNA Ladder (Bio Labs)

1 : pMTL500 E - CbpA - ManA

2 : CbpA - ManA 形質転換体のコロニー鋳型 PCR

3 : 野生型のクロストリジウム ベイジェリンキのコロニー鋳型 PCR

【0040】

【表 2】

培地 1 L 当たり	
ポリペプトン	15 g
酵母エキス	5 g
グルコース	5 g
NaCl	2.5 g
チオグリコレート酸ナトリウム	0.5 g
L-システイン	0.5 g
0.1% レザズリン	1 mL

【0041】

2. 酵素活性の評価

CbpA - ManA 形質転換体 クロストリジウム ベイジェリンキの酵素活性を、コン

ゴーレッドによる活性染色によって評価した。

L B G は不溶性であるため、L B G と同じマンナンを構成糖として持ち可溶性であるグルコマンナンを炭素源として、表 3 に示した組成で培地を作製した。滅菌後、ゲル化する前に嫌気チャンパー内でエリスロマイシンを $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ になるように加え、シャーレに分注した。

作製したシャーレに C b p A - M a n A 形質転換体とコントロールとして空ベクターを形質転換した p M T L 5 0 0 E 形質転換体の培養液を白金耳で植菌し、 37°C で 2 日間静置培養した。ここまでの操作はすべて嫌気チャンパー内で行った。

培養後、シャーレに 1 % コンゴーレッド溶液を 1 mL 加えスプレッターで広げ、5 分間染色した。その後、 1 M NaCl 水溶液を 3 mL 加え脱色を 4 回繰り返して行った。

その結果、図 5 に示すように、C b p A - M a n A 形質転換体を植菌したもの（図 5 : B）はコロニーの周りにハローが観察されたが、p M T L 5 0 0 E 形質転換体を植菌したもの（図 5 : A）には観察されなかった。従って、この結果より、C b p A - M a n A 形質転換体がグルコマンナンの分解活性を有することが確認できた。

【 0 0 4 2 】

【表 3】

培地 1 L 当たり	
ポリペプトン	15 g
酵母エキス	5 g
グルコマンナン	5 g
NaCl	2.5 g
チオグリコレート酸ナトリウム	0.5 g
L-システイン	0.5 g
0.1% レザズリン	1 mL
Agar	15 g

【 0 0 4 3 】

[実施例 3]

アルコールの製造

L B G を含む培地で C b p A - M a n A 形質転換体 クロストリジウム ベイジェリンキを培養し、反応生成物を検出した。

即ち、L B G を炭素源として含む培地を表 4 の組成で 100 mL 容の密栓できるバイアル瓶に 40 mL ずつ作製した。嫌気チャンパー内で培地にエリスロマイシンが $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ になるように加え、その後、C b p A - M a n A 形質転換体と空ベクターを形質転換した p M T L 5 0 0 E 形質転換体の植菌を行った。また、エリスロマイシンを含まない培地も作製し、それには野生型のクロストリジウム ベンジェリンキも植菌した。それらは全て 37°C で 3 日間静置培養した。

【 0 0 4 4 】

その結果、図 6 に示したように、野生型のクロストリジウム ベイジェリンキ（図 6 : A）や、空ベクターを形質転換した p M T L 5 0 0 E 形質転換体（図 6 : B）を培養した系では、培養後も培地が濁ったままであり、培地に含まれる L B G をほとんど分解されなかった。一方、C b p A - M a n A 形質転換体（図 6 : C）を培養した系では、培養後の培地が透過しており、培地に含まれる L B G がほぼすべて分解されたことが確認できた。

そして、ガスクロマトグラフィーによりブタノール生産量を調べたところ、空ベクター

を形質転換した p M T L 5 0 0 E 形質転換体を培養した系（図 7 : A）ではブタノールの生産が確認できなかったが、C b p A - M a n A 形質転換体を培養した系（図 7 : B）では、9.3 mg / mL のブタノールを生産していることが確認できた。

【 0 0 4 5 】

【表 4】

培地 1 L 当たり	
ポリペプトン	15 g
酵母エキス	5 g
L B G	5 g
N a C l	2.5 g
チオグリコレート酸ナトリウム	0.5 g
L-システイン	0.5 g
0.1 % レザズリン	1 mL

10

【 0 0 4 6 】

さらに、C b p A - M a n A 形質転換体クロストリジウム ベイジェリンキの培養後の培地（培養上清）と野生型のクロストリジウム ベイジェリンキの培養後の培地（培養上清）をサンプルとし、基質として 0.5 % の L B G を含む培地で 37 °C で 1 日間反応させた。その反応溶液に展開溶媒（1 - ブタノール : 酢酸 : 水 = 2 : 1 : 1）を加えて T L C に供与し、分解産物を確認した。

20

【 0 0 4 7 】

図 8 に T L C の結果を示した。図 8 の 1 は各糖をスポットしたマーカーであり、上からマンノース、マンノピオース、マンノトリオース、マンノテトラオース、マンノペンタオース、マンノヘキサオースのスポットを示す。また、図 8 の 4 は基質である L B G のスポットを示す。

30

図 8 の 2 は、C b p A - M a n A 形質転換体の培地（培養上清）をサンプルとし、基質と反応させた結果を示したものであり、マンノヘキサオース（6 糖）に相当する位置に分解産物を確認され、基質である L B G のスポットの色が薄くなっていた。従って、この結果より、C b p A - M a n A 形質転換体によって、L B G を分解できることが確認できた。

図 8 の 3 は、野生型のクロストリジウム ベイジェリンキの培養上清をサンプルとし、基質と反応させた結果を示したものであるが、L B G の分解産物は確認されず、基質である L B G のスポットの減少も確認されなかった。

【 0 0 4 8 】

実施例 1 ~ 実施例 3 において、セルロソーム発現プラスミドを構築し、これを導入した形質転換体を得て、セルロース系バイオマスであるローカストビーンガムからブタノールを製造することが可能となった。

40

一般に、セルロース系バイオマスからのバイオ燃料を得るには、前処理 糖化 発酵 蒸留の各工程が必要になる。しかし、本発明によって、クロストリジウム セルロポランスのセルロソームが賦与されたクロストリジウム ベイジェリンキにより、セルロース系バイオマスであるローカストビーンガムを直接糖化し、発酵することが可能となる。これにより、セルロース系バイオマスからのブタノールの製造を 1 つのタンクで行うことが可能となり、従来、バイオ燃料製造に要していた時間とコストを大幅に削減することができる。

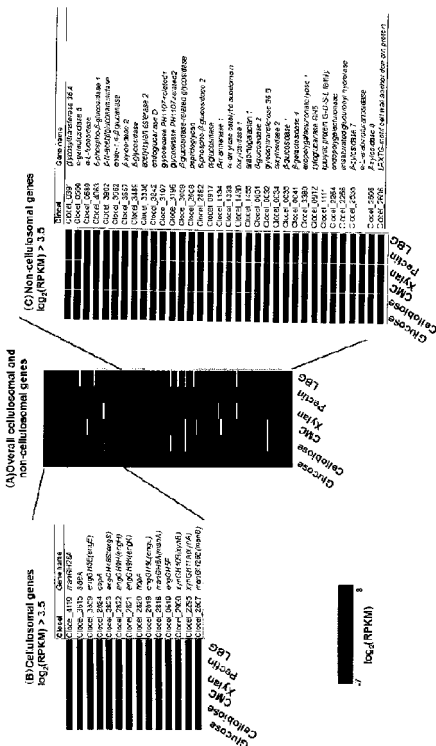
【産業上の利用可能性】

【 0 0 4 9 】

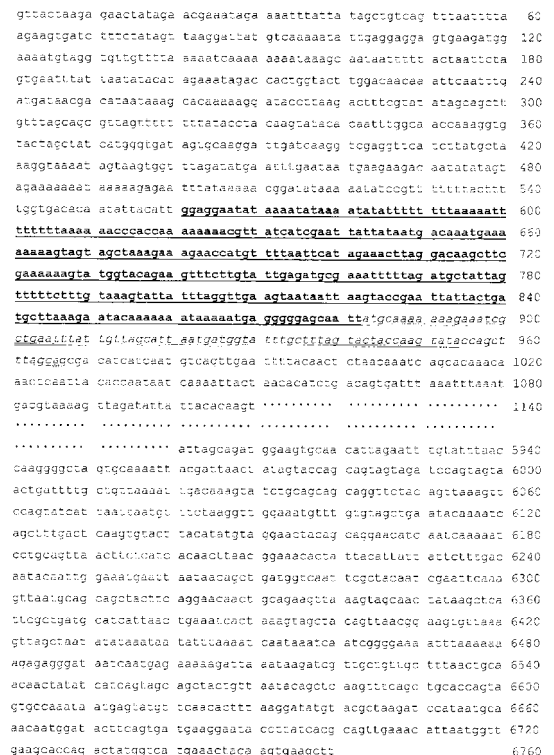
50

本発明によって構築されたセルローム発現プラスミドは、アルコールを産生する微生物の形質転換体を得るために、広く流通させることができる。このプラスミドを導入することによって得られた形質転換体は、培養によってセルロース系バイオマスから直接アルコール等を製造できるため、効率的なバイオ燃料の製造が可能となる。

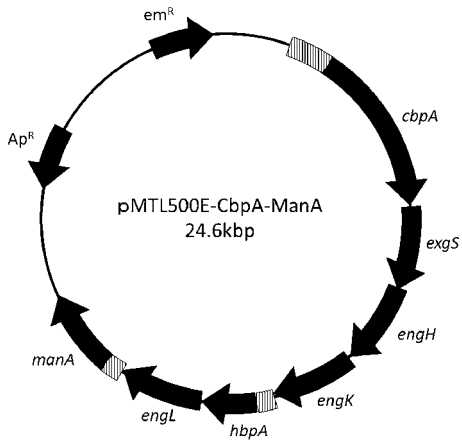
【 図 1 】



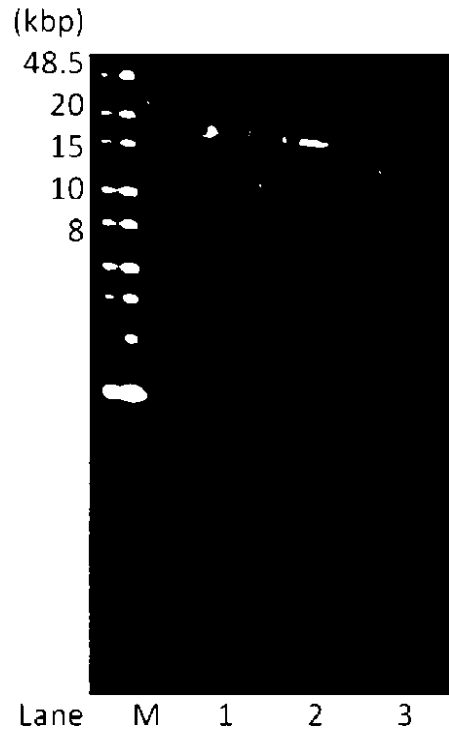
【 図 2 】



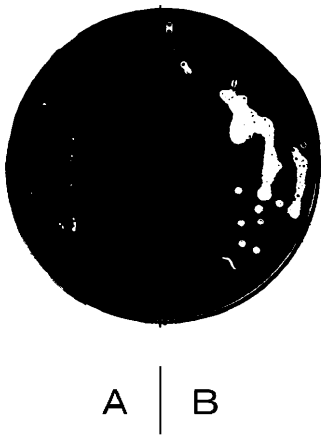
【 図 3 】



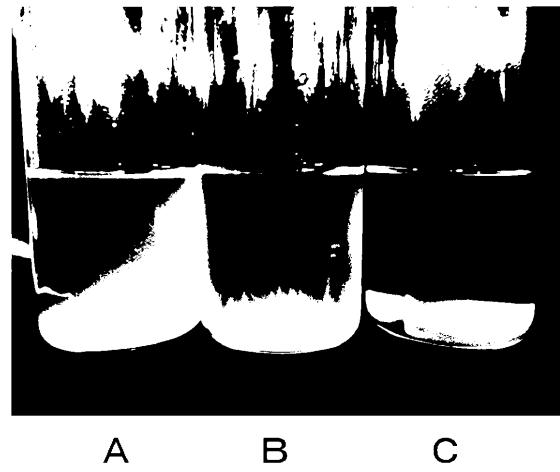
【 図 4 】



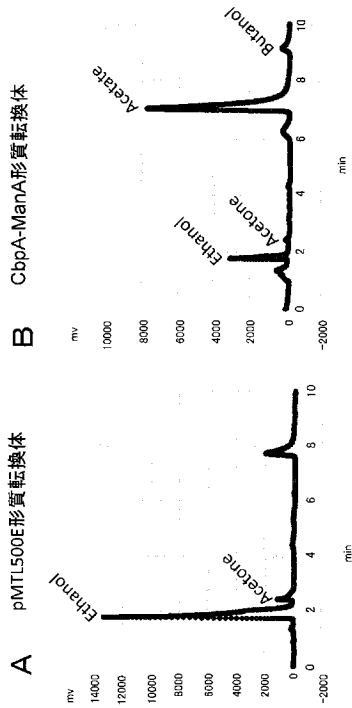
【 図 5 】



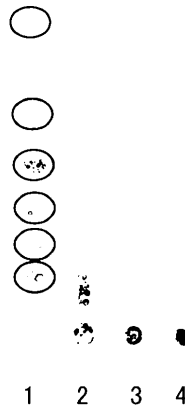
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



【 配列表 】

2015147318000001.app

【 手続補正書 】

【 提出日 】 平成28年1月27日 (2016.1.27)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】 特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】 全文

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

(削除)

【 請求項 2 】

(削除)

【 請求項 3 】

(削除)

【 請求項 4 】

(削除)

【 請求項 5 】

(削除)

【 請求項 6 】

(削除)

【 請求項 7 】

次の (1) および (2) の工程を含む、基質からアルコールを製造する方法。

(1) 配列表配列番号 2 に示される塩基配列を含む c b p A 遺伝子のプロモーター領域と

、配列表配列番号 3 に示される塩基配列を含む c b p A 遺伝子のシグナルペプチドをコードする領域を含むセルロソーム発現プラスミドをクロストリジウム属に属する微生物または酵母に導入して形質転換体を得る工程

(2) 該形質転換体を培養する工程

【請求項 8】

基質がセルロース系バイオマスである請求項 7 に記載のアルコールを製造する方法。

【請求項 9】

セルロース系バイオマスがローカストビーンガム、稲わら、バガス、コーンストーバー、スイッチグラス、ポプラまたは植物残渣である請求項 8 に記載のアルコールを製造する方法。

【請求項 10】

微生物がクロストリジウム ベイジェリンキまたはクロストリジウム アセトブチリカムである請求項 7 ~ 9 のいずれかに記載の基質からアルコールを製造する方法。

【請求項 11】

配列表配列番号 2 に示される塩基配列を含む c b p A 遺伝子のプロモーター領域と、配列表配列番号 3 に示される塩基配列を含む c b p A 遺伝子のシグナルペプチドをコードする領域を含むセルロソーム発現プラスミド。

【請求項 12】

配列表配列番号 2 に示される塩基配列を含む c b p A 遺伝子のプロモーター領域と、配列表配列番号 3 に示される塩基配列を含む c b p A 遺伝子のシグナルペプチドをコードする領域を含むセルロソーム発現プラスミドをクロストリジウム属に属する微生物または酵母に導入して得られる形質転換体。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2015/059854
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N15/09(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12P7/08 (2006.01)i, C12P7/16(2006.01)i, C12R1/145(2006.01)n 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, C12N1/19, C12N1/21, C12P7/08, C12P7/16, C12R1/145 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 1996-2015 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2015 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2015 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIX(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), GenBank/EMBL/DBET/GeneSeq		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HAN, S. O., et al., Transcription of Clostridium cellulovorans cellulosomal cellulase and hemicellulase genes, J. Bacteriol., 2003, Vol. 185, No. 8, pp. 2520-2527	1-9
Y	WO 2010/096562 A1 (MASCOMA CORP.), 26 August 2010 (26.08.2010), paragraphs [0005] to [0014], [0205]; examples 1, 3, 4; claims & US 2012/0142046 A1	1-9
Y	JP 2011-529336 A (Total S.A.), 08 December 2011 (08.12.2011), paragraphs [0006] to [0010] & US 2011/0129876 A1 & WO 2010/012805 A1 & EP 2192177 A1	1-9
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier 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 24 April 2015 (24.04.15)		Date of mailing of the international search report 19 May 2015 (19.05.15)
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/JP2015/059854

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MINGARDON, F., et al., Heterologous production, assembly, and secretion of a minicellulosome by <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824, Appl. Environ. Microbiol., 2005, Vol. 71, No. 3, pp. 1215-1222	1-9
A	CHO, H. -Y., et al., Production of minicellulosomes from <i>Clostridium cellulovorans</i> in <i>Bacillus subtilis</i> WB800, Appl. Environ. Microbiol., 2004, Vol. 70, No. 9, pp. 5704-5707	1-9

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 5 / 0 5 9 8 5 4	
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, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12P7/08(2006.01)i, C12P7/16(2006.01)i, C12R1/145(2006.01)n			
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, C12N1/19, C12N1/21, C12P7/08, C12P7/16, C12R1/145			
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 1971-2015年 日本国実用新案登録公報 1996-2015年 日本国登録実用新案公報 1994-2015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) CAPus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIX(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq			
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	HAN, S. O., et al., Transcription of Clostridium cellulovorans cellulosomal cellulase and hemicellulase genes, J. Bacteriol., 2003, Vol. 185, No. 8, pp. 2520-2527	1-9	
Y	WO 2010/096562 A1 (MASCOMA CORPORATION) 2010.08.26, [0005]-[0014], [0205], Example1, 3, 4, claims & US 2012/0142046 A1	1-9	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> 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		の日の後に公表された文献	
「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		「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	
「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		「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	
「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)		「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	
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」同一パテントファミリー文献	
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願			
国際調査を完了した日 24.04.2015		国際調査報告の発送日 19.05.2015	
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) 川合 理恵	4N 4046
		電話番号 03-3581-1101 内線 3488	

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 5 / 0 5 9 8 5 4
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	JP 2011-529336 A (トータル エス アー) 2011.12.08, [0006]-[0010] & US 2011/0129876 A1 & WO 2010/012805 A1 & EP 2192177 A1	1-9
Y	MINGARDON, F., et al., Heterologous production, assembly, and secretion of a minicellulosome by Clostridium acetobutylicum ATCC 824, Appl. Environ. Microbiol., 2005, Vol. 71, No. 3, pp. 1215-1222	1-9
A	CHO, H. -Y., et al., Production of minicellulosomes from Clostridium cellulovorans in Bacillus subtilis WB800, Appl. Environ. Microbiol., 2004, Vol. 70, No. 9, pp. 5704-5707	1-9

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), 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

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。