

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02017/159499

発行日 平成31年1月31日 (2019. 1. 31)

(43) 国際公開日 平成29年9月21日 (2017. 9. 21)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/20 (2006. 01)	C 1 2 N 1/20 F	4 B 0 6 5
C 1 2 N 1/21 (2006. 01)	C 1 2 N 1/21 Z N A	
C 1 2 N 15/11 (2006. 01)	C 1 2 N 1/20 Z	
	C 1 2 N 15/11	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 20 頁)

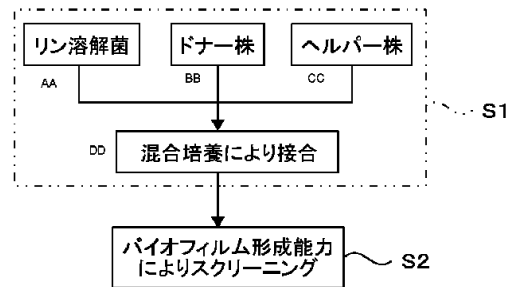
出願番号 特願2018-505856 (P2018-505856)	(71) 出願人 504136568 国立大学法人広島大学 広島県東広島市鏡山 1 丁目 3 番 2 号
(21) 国際出願番号 PCT/JP2017/009268	
(22) 国際出願日 平成29年3月8日 (2017. 3. 8)	
(31) 優先権主張番号 特願2016-52879 (P2016-52879)	(74) 代理人 110001427 特許業務法人前田特許事務所
(32) 優先日 平成28年3月16日 (2016. 3. 16)	
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(72) 発明者 上田 晃弘 広島県東広島市鏡山一丁目 4 番 4 号 国立 大学法人広島大学大学院生物圏科学研究科 内
	F ターム (参考) 4B065 AA41X AA44X AB01 AC20 BA01 BA16 BA24 BB02 CA53

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規微生物及びその作成方法

(57) 【要約】

新規微生物は、難溶性リン化合物をリン酸へ分解する Pseudomonas 属のリン溶解菌であり、PP\_4484タンパク質の機能を欠失した変異体である。



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

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

難溶性リン化合物をリン酸へ分解するPseudomonas属のリン溶解菌であり、PP\_4484タンパク質の機能を欠失した変異体である、新規微生物。

## 【請求項 2】

前記変異体は、トランスポゾン変異体である、請求項 1 に記載の新規微生物。

## 【請求項 3】

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

## 【請求項 4】

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

## 【請求項 5】

難溶性リン化合物のリン酸へ分解するPseudomonas属のリン溶解菌に、変異を導入して、変異株を得る工程と、  
前記変異株のうち、バイオフィーム形成能力が野生株よりも高い株をスクリーニングする工程とを備えた、新規微生物の作成方法。

## 【請求項 6】

前記スクリーニングする工程において、PP\_4484タンパク質の機能が欠失した株を選択する、請求項 5 に記載の新規微生物の作成方法。

## 【請求項 7】

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

## 【請求項 8】

前記リン溶解菌が、Pseudomonas sp. P - 4 5 1 株（受託番号 NITE BP-02205）である、請求項 5 又は 6 に記載の新規微生物の作成方法。

## 【請求項 9】

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

## 【請求項 10】

請求項 5 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の新規微生物の作成方法により作成した新規微生物を種子と共に、20 以上、35 以下の温度で培養して、種子の表面にバイオフィームを形成させる、バイオフィーム被覆種子の作成方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本開示は、新規微生物及びその作成方法等に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

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

## 【0003】

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

## 【0004】

植物に栄養分を供給する有用微生物として根粒菌が知られているが、マメ科植物以外で

10

20

30

40

50

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

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】特表2008-522932号公報

【特許文献2】特開2015-113374号公報

【特許文献3】特開2006-016386号公報

【特許文献4】特開2004-222551号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

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

【0007】

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

【0008】

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

【課題を解決するための手段】

【0009】

本開示の新規微生物の第1の態様は、難溶性リン化合物をリン酸へ分解するPseudomonas属のリン溶解菌であり、PP\_4484タンパク質の機能を欠失した変異体である。

【0010】

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

【0011】

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

【0012】

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

【0013】

本開示の新規微生物の作成方法の一態様は、難溶性リン化合物のリン酸へ分解するPseudomonas属のリン溶解菌に、変異を導入して、変異株を得る工程と、変異株のうち、バイオフィーム形成能力が野生株よりも高い株をスクリーニングする工程とを備えている。

【0014】

本開示の新規微生物の作成方法の一態様は、スクリーニングする工程において、PP\_448

10

20

30

40

50

4タンパク質の機能が欠失した株を選択するようである。

【0015】

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

【0016】

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

【0017】

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

【0018】

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

【発明の効果】

【0019】

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

【図面の簡単な説明】

【0020】

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

【図2】図2はバイオフィルムの形成状態を示す写真である。

【図3】図3はバイオフィルムの形成状態を示す写真である。

【図4】図4は培養液中のリン酸濃度の変化を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0021】

リン酸は植物の生育に必要な必須栄養素であり、肥料として土壌に大量に供給されている。しかし、リンは土壌中において金属イオン等と容易に結合して、植物が直接利用できない難溶性の化合物に変化するため、肥料として供給されたリンの利用効率は高くない。リン溶解菌は、リン酸カルシウム等の難溶性のリン化合物を、植物が利用できるリン酸の状態に分解できる。このため、リン溶解菌を植物の根圏に着生させ、土壌中の難溶性のリン化合物を分解させることができれば、リンの利用効率を向上させることができる。しかし、リン溶解菌は、直接土壌に散布したり、植物の根に接種したりしても、土壌中に存在する土着の微生物と競合するため、すぐに死滅してしまう。これは、リン溶解菌に限らず他の有用微生物においても同様である。

【0022】

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

【0023】

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

を解消することができない。

【0024】

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

【0025】

本実施形態の変異体は、以下のようにして作成することができる。図1に示すように、まず、工程S1において、リン溶解菌と、ドナー株と、ヘルパー株とを混合培養することにより、接合させ、トランスポゾン変異を導入した変異体を得る。次に、工程S2において、変異体をスクリーニングして、バイオフィーム形成能力が高い変異体を選択する。

【0026】

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

【0027】

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

【0028】

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

【0029】

なお、P-451の耐性抗生物質としてクロラムフェニコールを用いることができ、E.coli MC4100/pMAR2xT7の耐性抗生物質としてゲンタマイシンを用いることができ、E.coli HB101/pRK2013の耐性抗生物質としてカナマイシンを用いることができる。

【0030】

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

【0031】

バイオフィーム形成能力が高い変異体として、トランスポゾン変異を導入していない野生株と比べて、5倍以上のバイオフィーム形成能力を有する変異株が好ましく、10倍以上の変異株がより好ましい。また、難溶性リン化合物の可溶化能力が野生株以上であるものが好ましく、野生株よりも高いものがより好ましい。難溶性リン化合物の可溶化能力が野

10

20

30

40

50

生株以上で、バイオフィルム形成能力が向上した変異株として、A B C トランスポータであるPP\_4484タンパク質の機能が欠失した株が好ましい。中でも、Pseudomonas sp. M T - 5 (以下M T - 5という。)が好ましい。M T - 5は、独立行政法人製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センター(N P M D : 住所 : 〒292-0818 日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2 - 5 - 8、120号室)に、M T - 5(受託番号NITE P-02215)として2016年3月3日に寄託され、2017年2月27日にブダペスト条約に基づく国際寄託へ移管申請され、移管後の受託番号はNITE BP-02215である。なお、難溶性リン化合物の可溶化能力は、実施例に記載した方法により評価することができる。

#### 【0032】

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

10

#### 【0033】

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

#### 【0034】

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

20

#### 【0035】

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

30

#### 【0036】

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

#### 【実施例】

#### 【0037】

##### (1) 使用菌株

宿主として、自然環境中から単離したリン溶解菌P - 451(受託番号NITE BP-02205)を用いた。トランスポゾン変異のドナー株としてE.coli MC4100/pMAR2xT7を用いた。ヘルパー株として、E.coli HB101/pRK2013を用いた。ドナー株及びヘルパー株はDepartment of Molecular Biology, Massachusetts General Hospital (185 Cambridge St., CPZN72 50 Boston, MA 02114)より分譲された。

40

#### 【0038】

##### (2) 使用培地

寒天培地にはLuria-Bertini(以下、L B という。)寒天培地を用い、液体培養培地にはL B 液体培地を用いた。L B 寒天培地の組成は、ポリペプトンを10g/L、酵母エキス

50

を 5 g / L、NaCl を 10 g / L、寒天を 15 g / L とした。LB 液体培地は、ポリペプトンを 10 g / L、酵母エキスを 5 g / L、NaCl を 10 g / L とした。

【0039】

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

【0040】

なお、以下の実施例において使用した培地及び器具類は全て滅菌処理して用いた。

【0041】

(3) トランスポゾン変異の導入

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

【0042】

P - 451、E.coli MC4100/pMAR2xT7、及び E.coli HB101/pRK2013 の培養液を 1.0 mL ずつ、それぞれ 1.5 mL マイクロチューブに移し、遠心分離機 (KUBOTA 社製、3700) を用いて、20,000 g で、1 分間、室温にて遠心した。遠心後、上澄みを捨て、各チューブに滅菌した蒸留水を加えて懸濁し、再び遠心機にかけた。その後、もう一度上澄みを取り除き、1 mL の滅菌蒸留水で 3 つのチューブを懸濁した。その懸濁液を LB 寒天培地に接種し、インキュベーターで 28、一晩培養し、接合を行った。

【0043】

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

【0044】

(4) バイオフィーム形成能力の評価

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

【0045】

マイクロプレートをインキュベーターを用いて 28 で、24 時間培養した。培養後に 620 nm における吸光度 (OD<sub>620</sub> 値) を測定した。OD<sub>620</sub> 値を測定する際には、LB ( - NaCl ) 液体培地の値をブランクとしてバックグラウンド補正を行った。各変異体の OD<sub>620</sub> 値を、対照区である野生株の OD<sub>620</sub> 値を 1 として規格化した値を、各変異体の浮遊菌量とした。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 4 6 】

この後、マイクロプレートの培地を取り除き、水道水で3回洗浄した。その後、0.1% (w/v) クリスタルバイオレット水溶液を各ウェルに200  $\mu$ Lずつ加え、室温で30分間静置して、ウェル内に付着したバイオフィルムの染色を行った。染色後、クリスタルバイオレット水溶液を取り除き、水道水で3回洗浄し、95% (v/v) エタノールを200  $\mu$ L添加して脱色を行った。この後、吸光プレートリーダー (TECAN社製、SUNRISE Remote R) を用いて540 nmにおける吸光度 ( $OD_{540}$  値) を測定した。 $OD_{540}$  値を測定する際には、LB (-NaCl) 液体培地のみを入れたウェルの値をブランクとしてバックグラウンド補正を行った。各変異体の $OD_{540}$  値を、対照区である野生株の $OD_{540}$  値を1として規格化した値を、各変異体のバイオフィルム形成能力とした

10

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

## 【 0 0 4 7 】

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

## 【 0 0 4 8 】

## 【表1】

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

20

30

40

## 【 0 0 4 9 】

(5) トランスポゾン変異により欠損した遺伝子の同定

変異体MT-5及びMT-10について遺伝子の欠損部位を評価した。変異体MT-5及びMT-10をLB寒天培地で培養し、滅菌爪楊枝で単一コロニーをかき取り、50  $\mu$ L滅菌蒸留水の入った1.5 mLマイクロチューブに懸濁した。そのチューブをブロックインキュベーターに入れ100、10分の条件で加熱し、溶菌させた。溶菌液の入ったチューブを15,000 g、5分の条件で遠心機にかけ、上澄みを新しいチューブに移した。次に、表2に示す1st PCR混合液を用意しそれを95 2分間、(95 30秒間、47 45秒間、72 1分間)  $\times$  30回の条件でPCR装置にかけた。なお、PCRとは、Polymerase Chain Reactionの略称であり、ポリメラーゼ連鎖反応である。

50



【 0 0 5 0 】

【表 2】

成分	( $\mu$ L)
2x Quick Taq™	5
10 $\mu$ M ARB1	0.5
10 $\mu$ M GB-3a	0.5
Cell lysate	2
Autoclaved, distilled water	2

10

【 0 0 5 1 】

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

【 0 0 5 2 】

【表 3】

成分	( $\mu$ L)
2x Quick Taq™	20
10 $\mu$ M ARB1	2
10 $\mu$ M GB-3a	2
1st PCR reaction	4
Autoclaved, distilled water	12

20

30

【 0 0 5 3 】

次に2nd PCR産物を0.5 × TAE - バッファーで作成した0.8% (w/v) アガロースゲルを用いて電気泳動装置(アドバンスバイオ社製、Mupid-2 plus)を用いて、100Vで30分間電気泳動を行い、1  $\mu$ g /  $\mu$ Lの臭化エチジウム中で20分間振とうして染色した。

【 0 0 5 4 】

この後、市販のDNA断片回収キット(RBC BIOSCIENCE社製、HiYield Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit)を用いて、以下のようにしてPCR産物の回収を行った。染色後、UVランプで照らしながら目的のバンド部分を切り取り、1.5 mLのマイクロチューブに入れた。DF Buffer 500  $\mu$ Lをチューブに入れ、55 で約10分間温めてゲルを完全に溶解させた。これを、コネクションチューブにつないだカラムに全て注入し10,000 gで30秒間遠心分離した。コネクションチューブにある液を捨て、Wash Bufferを600  $\mu$ L入れて10,000 gで30秒間遠心分離した。その後、再びコネクションチューブにある液を捨て、再度10,000 gで3分間遠心分離し、カラムを乾燥させた。コネクションチューブを1.5 mLマイクロチューブに付け替え、カラムの中心にElution Bufferを5  $\mu$ L添加した。再度10,000 g、30秒で遠心分離し、PCR産物を回収した。

40

【 0 0 5 5 】

次に、市販のPCR産物のクローニングキット(Promega社製、pGEM-T Easy Vector Systems)を用いて、以下のようにしてPCR産物のライゲーションを行った。2 × Rapid Li

50

gation Bufferを2.5  $\mu$ Lと、T4 DNA Ligase (3 Weiss Units /  $\mu$ L) 及びpGEM-T Easy Vector (17 ng /  $\mu$ L) を0.5  $\mu$ Lと、蒸留水を0.5  $\mu$ Lと、回収したPCR産物を1.5  $\mu$ Lとを混合し、室温で1時間静置した。次に、エレクトロポレーション用のキュベットに大腸菌TOP10株のコンピテントセルを55  $\mu$ L及びライゲーション産物を1  $\mu$ L注入した。これにエレクトロポレーション装置 (Bio Rad社製、E.coliバルサー) を用いて1.25 V、1秒でパルスを加えて、形質転換を行った。パルスを加えた後、キュベットに500  $\mu$ LのLB溶液を加えて混合し、懸濁液を1.5 mLチューブに移した。チューブを横向きにし、バイオシェーカーを用いて1時間、37 で培養した。その後、100  $\mu$ g / mLのアンピシリンを添加したLB寒天培地に培養液を200  $\mu$ L撒いて、インキュベーターで37、16時間培養した。

10

## 【0056】

表4に示すコロニーPCR溶液を調製し、サンプル1種類につき5チューブずつ用意した。培地の単一コロニーを、2  $\mu$ Lチップを付けたマイクロピペットでかき取り、マスタープレート用の100  $\mu$ g / mLのアンピシリン入りLB寒天培地に接種すると共に、先に調製したPCR用チューブに懸濁してPCR混合液を作成した。PCR混合液は、96分、(95 30秒、55 30秒、68 1分)  $\times$  35回の条件でPCR装置にかけた。PCR後、電気泳動を行い、目的のバンドが出たコロニーをマスタープレートから滅菌した爪楊枝でかき取り、100  $\mu$ g / mLのアンピシリン入りLB液体培地に接種した。これを、バイオシェーカーを用いて120 rpm、37、16時間培養した。

20

## 【0057】

## 【表4】

成分	( $\mu$ L)
2x Quick Taq™	5
10 $\mu$ M M13 forward	0.5
10 $\mu$ M M13 reverse	0.5
Autoclaved, distilled water	12

30

## 【0058】

次に、市販のプラスミド分離キット (RBC BIOSCIENCE社製、HiYield Plasmid Mini Kit) を用いて、以下のようにしてプラスミドの生成を行った。培養液を1.5 mLチューブに1.5 mL入れて、20,000 g、1分間の条件で遠心分離し、上澄みを捨てた。チューブにPD1 Bufferを200  $\mu$ L入れ、続いてPD2 Bufferバッファを200  $\mu$ L加えて静かに5回転倒混和した。5分間静置した後、PD3 Bufferバッファを300  $\mu$ L加えて10回転倒混和させ20,000 g、3分間の条件で遠心分離した。上澄み液をカラムに入れ、コネクシオンチューブを取り付けて20,000 g、30秒間の条件で遠心分離した。上澄み液を捨てカラムにW1 Bufferを400  $\mu$ L注入し、再び遠心分離をして上澄み液を捨て、Wash Bufferを600  $\mu$ L入れて20,000 g、30秒間の条件で遠心分離した。その後、コネクシオンチューブを空にした状態で20,000 g、3分間の条件で遠心分離して乾燥させた。コネクシオンチューブを1.5 mLチューブに付け替えて、カラムの中心にElution Bufferを10  $\mu$ L添加し、20,000 g、3分間の条件で遠心分離をし、精製したプラスミドを回収した。

40

## 【0059】

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

## 【0060】

50

1. 5 mL チューブに、精製したプラスミドと、1  $\mu$ L の10倍濃縮高塩濃度緩衝液 (10  $\times$  Hパッファ) と、0.5  $\mu$ L の制限酵素 (EcoRI、15 U /  $\mu$ L) とを入れ、蒸留水を加えて10  $\mu$ L とした。プラスミドの濃度は200 nm / mg となるようにした。これを37 で2時間培養後、電気泳動用色素 (6  $\times$  Loading Dye) を3  $\mu$ L 混合し、6.5  $\mu$ L を電気泳動した。制限酵素により、目的のバンドが出ているか確認した。

#### 【0061】

Sequencing PCR 溶液 (5  $\mu$ M primer 1  $\mu$ L、5  $\times$  Buffer 0.5  $\mu$ L を含む) に精製したプラスミドが200 ~ 400 ng / mg になるよう加えた。チューブの蓋の内側に2  $\mu$ L の蒸留水を添加し、静かに蓋を閉め、96 1分、(96 10秒、50 10秒、60 4分)  $\times$  35回の条件でPCR装置にかけた。

10

#### 【0062】

PCR後のチューブに蒸留水を3  $\mu$ L 加え、1.5 mL チューブに移した。そこにNaOAc (pH 8.0、3 M) を1  $\mu$ L、EDTA (0.5 M) を加えて攪拌し、100% エタノールを40  $\mu$ L 加えてさらに攪拌した。15分間遮光して静置した後、20,000 g で15分間遠心分離し、上澄みを取り除き、70% エタノールを100  $\mu$ L 加えた。そして15,000 g で5分間遠心分離し、上澄みを取り除き、遮光状態で蓋を開けてエタノールを除いた。

#### 【0063】

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

20

#### 【0064】

この結果、MT-5のゲノムDNAに挿入されたトランスポゾンの隣接領域のDNA配列は、CAACCTGTTATTGATGGCAAAGGCCAGGCAGGCACAGAACGTTGCGCTGGACAGCCACGGCCAGAAGであった。このDNA配列より推定されるアミノ酸配列は、Pseudomonas putidaのABCトランスポータであるPP\_4484タンパク質のアミノ酸配列と85.71%の相同性を有しており、MT-5におけるトランスポゾン変異の導入部位は、PP\_4484タンパク質(232aa)の88番目のアミノ酸残基であった。このことから、MT-5はABCトランスポータであるPP\_4484タンパク質の機能を欠失した変異体である。MT-5は、ABCトランスポータ遺伝子の欠損により、バイオフィーム形成に影響を与える何らかの物質が輸送されなくなり、バイオフィーム形成能力が向上したと推定される。

30

#### 【0065】

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

40

#### 【0066】

このDNA配列より推定されるアミノ酸配列は、Pseudomonas putidaのAcetyl-CoA合成酵素であるPP\_4702タンパク質のアミノ酸配列と97.3%の相同性を有しており、MT-10におけるトランスポゾン変異の導入部位は、PP\_4702タンパク質(644aa)の310番目のアミノ酸残基であった。このことから、MT-10はAcetyl-CoA合成酵素であるPP\_4702タンパク質の機能を欠失した変異体である。MT-10はAcetyl-CoA合成酵素に関する遺伝子が欠損した結果、タンパク質機能のコントロールの低下や、脂肪酸合成能の低下が生じ、菌体の凝集が促進され、バイオフィーム形成能力が上昇したと推測され

50

る。

【0067】

(6) バイオフィルムの形態観察

変異体 MT-5 及び MT-10 のバイオフィルムを、形態的に観察した。変異体 MT-5 及び MT-10 並びに野生株 P-451 を LB 寒天培地で培養し、単一コロニーを滅菌した爪楊枝でかき取り、それぞれ LB 液体培地で前培養した。培養液を 1.5 mL マイクロチューブに 1 mL ずつ分注した後、遠心分離機にて 20,000 g、2 分間の条件で遠心分離をし、上澄みを取り除き、1 mL の LB (- NaCl) 液体培地を加えて攪拌した。これを 2 回繰り返して菌体の洗浄を行った。2 mL の LB (- NaCl) 液体培地が入った 10 mL 試験管に OD<sub>600</sub> 値が 0.05 となるように菌懸濁液を添加した。その後試験管を 28℃ で、24 時間静置培養を行った。これをそれぞれ 3 反復ずつ行った。

10

【0068】

培養後に写真撮影を行い、肉眼により形態的特徴を観察した。また、培養液の OD<sub>600</sub> 値を分光光度計によって測定した。

【0069】

図 2 及び図 3 に示すように、変異体 MT-5 及び MT-10 並びに野生株 P-451 のいずれにもバイオフィルムの形成が確認された。変異体 MT-5 及び MT-10 においては、野生株 P-451 と比べて、真横から見た際に明確に厚いバイオフィルムが確認できた。一方、MT-5 及び P-451 が形成したバイオフィルムの表面は滑らかであるのに対し、MT-10 が形成したバイオフィルムの表面には、皺が形成されており、MT-5 及び P-451 とは異なる形態を示した。また、OD<sub>600</sub> 値は、P-451 が 2.7 であったのに対し、MT-5 では 0.6 であり、MT-10 では 0.2 であった。MT-5 及び MT-10 においては、P-451 と比べてバイオフィルムが明確に成長し、菌体がバイオフィルム内に取り込まれていることが確認された。

20

【0070】

(7) リン酸カルシウム可溶化能力の評価

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

30

【0071】

培養液を 1.5 mL マイクロチューブに 1 mL ずつ分注した後、遠心分離機にて 20,000 g、2 分間の条件で遠心分離をし、上澄みを取り除き、表 5 に示す National Botanical Research Institute's phosphate (NBRI-P) 液体培地を 1 mL 加えて攪拌した。これを 2 回繰り返して菌体の洗浄を行った。

【0072】

次に、NBRI-P 液体培地を 20 mL 入れた 50 mL 三角フラスコに菌懸濁液を添加して OD<sub>600</sub> 値が 0.05 になるよう調整した。バイオシェーカーを用いて 120 rpm、10 日間振とう培養した。それぞれの菌株につき 2 反復分の培養を行い、これを各 3 反復行い、合計で各菌株につき 6 反復行った。

40

【0073】

【表 5】

成分	濃度 (g/L)
グルコース	10
Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	5
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	5
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.25
KCl	0.2
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.1

10

## 【0074】

培養中、48時間毎に培養液中のリン酸濃度を定量した。リン酸濃度の測定はモリブデンブルー法により行った。培養液を100μL採取し、滅菌蒸留水900μLを入れた1.5mLチューブにて希釈した。続いてチューブを20,000g、5分間の条件で遠心分離した。培養液の上澄み10μLに、2.5%モリブデン酸アンモニウム0.8mL、6N硫酸0.8mL、アスコルビン酸89mgを加え、蒸留水により8mLとし、分光光度計を用いた820nmの吸光度(OD<sub>820</sub>値)を測定した。予め、既知濃度のリン酸を含む溶液を用いて作成した検量線によりOD<sub>820</sub>値からリン酸濃度を算出した。

20

## 【0075】

図4に示すように、MT-5及びMT-10並びにP-451のいずれにおいても、培養液中のリン酸濃度は、培養を開始した後に大きく上昇した。これは、培養液中のリン酸カルシウムが、いずれの菌株においても可溶化されたことを示している。その後、いずれの菌株においても、培養液中のリン酸濃度は緩やかに低下した。これは、細菌がリン酸を消費したことによる。2日目から10日目まで、MT-5及びMT-10の培養液においてP-451の培養液よりもリン酸濃度が若干高くなっており、MT-5及びMT-10のリン可溶化能力はP-451と同等以上であることが示された。

30

## 【0076】

## (8) 被覆種子の作成

植物への菌の付着について検討した。菌を付着させる植物には、イネ(ヒノヒカリ)の種子を用いた。種子は、60のお湯に30秒間浸漬した後、2.5%(v/v)次亜塩素酸ナトリウム溶液の入ったビーカーに入れ、スターラーで20分間攪拌することで殺菌処理を行った。その後、10分毎に滅菌水で洗うことを3回繰り返し、次亜塩素酸ナトリウムを取り除いた。殺菌処理をした種子は、100mL三角フラスコに15粒ずつ入れた。被覆に用いる菌株はLB寒天培地で培養し、単一コロニーを滅菌した爪楊枝でかき取り、それぞれLB液体培地で前培養した。培養液を1.5mLマイクロチューブに1mLずつ分注した後、遠心分離機にて20,000g、2分間の条件で遠心分離をし、上澄みを取り除き、1mLの滅菌蒸留水を加えて攪拌した。これを2回繰り返して菌体の洗浄を行った。

40

## 【0077】

洗浄を行った後、OD<sub>600</sub>値が0.05となるように、LB(-NaCl)液体培地で希釈を行い、これを種子を入れた三角フラスコに10mL加えた。この後、インキュベーターにより28で、24時間静置培養を行った。

## 【0078】

培養後、培養液を取り除き、滅菌蒸留水を30mL注入した。攪拌後、蒸留水を取り除き、これを5回繰り返し、種子に付着していない菌を除去した。この後、培養後の種子を滅菌したすり鉢を使ってすり潰した。すり潰した種子を10mLの滅菌蒸留水に懸濁し、

50

15 mLのチューブに注入した。これを3粒の種子についてそれぞれ行った。また、前培養から2反復を行った。この後、希釈平板法によって菌数を測定した。菌数測定の際に、野生株P-451は20 µg/mLクロラムフェニコールを含むLB寒天培地を使用し、変異体MT-5及びMT-10は20 µg/mLクロラムフェニコールと90 µg/mgゲンタマイシンを含むLB寒天培地を使用した。

【0079】

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

10

【0080】

【表6】

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

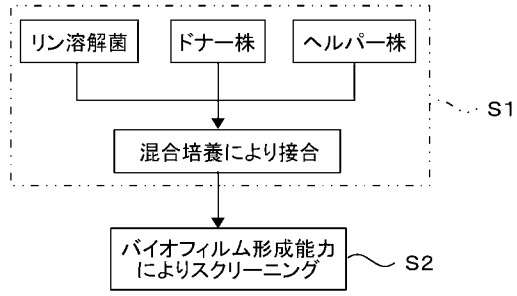
20

【産業上の利用可能性】

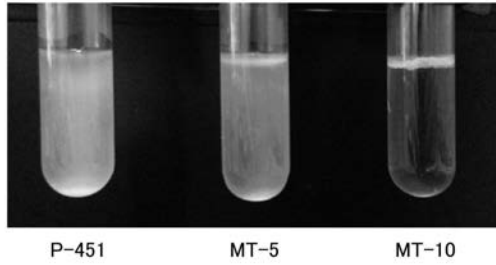
【0081】

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

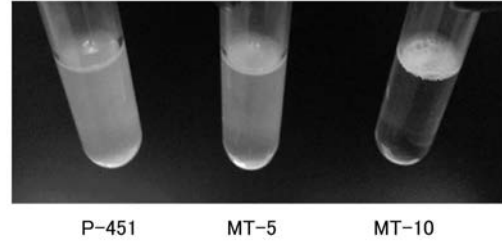
【 図 1 】



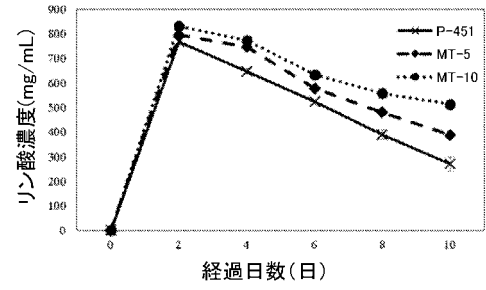
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



【 配 列 表 】

2017159499000001.app

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2017/009268
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> C12N15/09(2006.01)i, A01H5/10(2006.01)i, C12N1/20(2006.01)i  According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N15/09, A01H5/10, C12N1/20  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2017 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2017 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2017  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, PubMed		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y/A	Mizuki NAKANO et al., "Transposon Hen'i ni yoru Nan'yosei Phosphorus Kayoka Saikin no Biofilm Keisei Noryoku no Kojo", 2015, Abstracts of the Annual Meeting, Japanese Society of Soil Science and Plant Nutrition 61st series, page 43, P3-2-4, entire text	5,7-9/1-4, 6,10
Y/A	Kenji OKANO, et al., "Biseibutsu ni yoru Nan'yosei Phosphate Yokai Kiko no Kaimei(1) Calcium Phosphate", 2015, 2015 Nendo Proceedings of the Annual Meeting of Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry (online), page 1294, entire text	5,7-9/1-4, 6,10
<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 28 March 2017 (28.03.17)		Date of mailing of the international search report 11 April 2017 (11.04.17)
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/JP2017/009268

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

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 7 / 0 0 9 2 6 8													
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/09(2006,01)i, A01H5/10(2006,01)i, C12N1/20(2006,01)i															
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/09, A01H5/10, C12N1/20															
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <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>1971-2017年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2017年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2017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	1971-2017年	日本国実用新案登録公報	1996-2017年	日本国登録実用新案公報	1994-2017年				
日本国実用新案公報	1922-1996年														
日本国公開実用新案公報	1971-2017年														
日本国実用新案登録公報	1996-2017年														
日本国登録実用新案公報	1994-2017年														
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTplus/JMEDplus/JST7580 (JDreamIII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, PubMed															
C. 関連すると認められる文献															
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号													
Y / A	中野瑞己, et al., トランスポゾン変異による難溶性リン可溶性細菌のバイオフィルム形成能力の向上, 2015, 日本土壌肥料学会講演要旨集 第61集, p.43 P3-2-4 全文	5、7-9 / 1-4、6、 10													
<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。															
<table border="0"> <tr> <td>* 引用文献のカテゴリー</td> <td>の日の後に公表された文献</td> </tr> <tr> <td>「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</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「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</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「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)</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td>「&amp;」同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</td> <td></td> </tr> </table>				* 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	
* 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 28.03.2017		国際調査報告の発送日 11.04.2017													
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) 福澤 洋光 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B 3963												

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2017/009268
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y / A	岡野憲司, et al., 微生物による難溶性リン酸塩溶解機構の解明 (1) リン酸カルシウム, 2015, 日本農芸化学会 2015 年度大会講演要旨集 (オンライン), p.1294 全文	5、7-9 / 1-4、6、 10
Y / A	WO 2010/018210 A1 (BIO-ILIBERIS RESEARCH AND DEVELOPMENT S.L.) 2010.02.18, 請求項 7、実施例 1 & EP 2154239 A1	5、7-9 / 1-4、6、 10
A	UEDA, A., et al., Characterization of the Ability to Form Biofilms by Plant-Associated Pseudomonas Species, 2015, Current Microbiology, Vol.70, p.506-513 全文	1-10
A	上田晃弘, 有用土壌細菌のバイオフィーム形成を介した植物表面への定着能の改善, 2013, 発酵研究所助成研究報告, Vol.27, p.59-60 全文	1-10
A	Database DDBJ/EMBL/GenBank [online], Accession No. NP_746595, < <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/26991170?sat=4&amp;satkey=159244931">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/26991170?sat=4&amp;satkey=159244931</a> > 04-MAR-2016 uploaded, [retrieved on 23-MAR-2017] BELDA, E., et al., Definition: histidine / lysine / arginine / ornithine ABC transporter - permease subunit [Pseudomonas putida KT2440]. 全文	1-10

## 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ

(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。