

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2009-254234

(P2009-254234A)

(43) 公開日 平成21年11月5日(2009.11.5)

(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 0 2 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B 0 5 0
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 B 0 6 3
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 B 0 6 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 B	

審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 10 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2006-173485 (P2006-173485)
 (22) 出願日 平成18年6月23日 (2006. 6. 23)

(71) 出願人 000125347
 学校法人近畿大学
 大阪府東大阪市小若江3丁目4番1号
 (71) 出願人 503360115
 独立行政法人科学技術振興機構
 東京都千代田区四番町5-3 サイエンス
 プラザ5F
 (74) 代理人 100076406
 弁理士 杉本 勝徳
 (72) 発明者 官本 裕史
 大阪府泉佐野市笠松1丁目7-54-13
 (72) 発明者 森本 康一
 大阪府堺市鴨谷台2丁3番3

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 真珠貝の貝殻、真珠の色調を制御する遺伝子とそのタンパク質

(57) 【要約】

【課題】貝殻、真珠の色に関与する遺伝子などについての情報を飛躍的に増大することによって、真珠養殖の効率化と改善に資する。

【解決手段】アコヤ貝外套膜cDNAの網羅的な解析(EST解析)と、TOF-MSによるタンパク質の同定、という二つのアプローチにより、真珠および貝殻の色調の制御に係る遺伝子の同定を効率的に行った。その結果、外套膜において特異的に発現する2種類のチロシナーゼ遺伝子を同定した。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

下記の (a) 又は (b) のDNAからなる遺伝子、

(a) 配列番号 1 又は配列番号 2 の何れかに示す塩基配列からなるDNA、

(b) 配列番号 1 又は配列番号 2 の何れかに示す塩基配列において、1 個又は数個の塩基が欠失、置換又は挿入された塩基配列からなり、真珠貝又は真珠の外套膜で特異的に発現するDNA。

【請求項 2】

請求項 1 に記載のDNAを、その遺伝子機能が発現可能な状態で含む発現ベクター。

【請求項 3】

請求項 1 に記載のDNA又は請求項 2 に記載の発現ベクターを、そのDNAの遺伝子機能が発現可能な状態で含む形質転換体。

【請求項 4】

請求項 1 に記載のDNAにコードされたタンパク質。

【請求項 5】

請求項 1 に記載のDNAの全部又は一部からなるDNAを含むDNAプローブ。

【請求項 6】

請求項 1 に記載のDNAの全部又は一部からなるDNAの転写産物を含むRNAプローブ。

【請求項 7】

請求項 1 に記載のDNAの一部からなるDNAを含むDNAプライマー。

【請求項 8】

請求項 5 に記載のDNAプローブ、請求項 6 に記載のRNAプローブ、請求項 7 に記載のDNAプライマーの少なくとも何れか一つを使用して、請求項 1 に記載の遺伝子の発現量を測定することによって、良質なアコヤ貝あるいは真珠を選別する方法。

【請求項 9】

請求項 4 に記載のタンパク質に対する抗体を使用して、請求項 2 に記載のタンパク質の発現量を測定することによって、良質なアコヤ貝あるいは真珠を選別する方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

この発明は、真珠貝の遺伝子、特に真珠貝の貝殻、外套膜で特異的に発現し、色調を制御する遺伝子、及びこの遺伝子がコードするタンパク質などに関するものである。

【背景技術】**【0002】**

真珠養殖は、貝殻を球状に加工してなる核と、アコヤ貝（ピース貝）の外套膜の細胞片（ピース）とを、母貝となるアコヤ貝に挿入し、これを約 1 年に渡って海中で養殖することによって行う。

【0003】

このように、真珠養殖には、母貝及びピース貝の両者が必要であり、母貝とピースの組み合わせがよくなければ良品はできない。そのため、真珠の養殖においては、形成された膨大な真珠の中から、良品を選択するために膨大な選抜作業を必要とするものの、良品の割合は低かった。

【0004】

そこで、良品の割合を高めるため、従来から優れた母貝とピース貝が求められており、中でもピース貝の性質が真珠の品質により大きく影響することから、優れたピース貝が求められている。なお、ピース貝の性質は、ピース貝の遺伝的性質によって決まるのはもちろん、外套膜のどの領域を使用するのかによっても決まるため、外套膜のどの領域をピースに使用するかは養殖業者の企業秘密であるとともに、現在でもそれを明確に特定する方法は確立されていない。

【0005】

10

20

30

40

50

一方、良質な真珠の条件としては、真珠の形状や照りに加えて、真珠の色調（色）が挙げられる。真珠の色調には、白色、ピンク色、クリーム色、金色、青色などがあるが、この中でも白色の真珠が最も好まれており、その販売価格も高い。

【0006】

現在までに、真珠の色調は外套膜により分泌された真珠層によってつくられる干渉色と真珠層間に存在する有機基質による実体色によって決まることが知られており、多様な動植物で普遍的に利用されるメラニン合成系が関与することも示唆されている。ただ、その具体的な制御因子に関しては明らかになっていなかった。このように制御因子の詳細については明らかではないものの、真珠などの色調は外套膜によって制御されていることから、良質な真珠を得るためには、前記のように良質の外套膜を有するピース貝を確保することが最も重要である。

10

【0007】

そのため、従来から特定の性質を備えたピース貝を選抜することによって、白色真珠を養殖する方法が研究されている。例えば、アコヤ貝の稜柱層の色が白色である白色系アコヤ貝（真珠養殖業者間ではシロガイと呼ばれる。）を、同系交配させて得られたアコヤ貝をピース貝として使用する養殖方法などが研究されている（特許文献1を参照。）。

【0008】

しかし、この養殖方法には次に掲げるような問題点があった。まず、白色系アコヤ貝をピース貝として使用した場合には、通常の普通のアコヤ貝を使用する場合と比較すれば、白色真珠ができる確率は高くなるものの、その確率は養殖業者が満足できるほど高くはないとの問題点があった。また、白色系アコヤ貝は、水温変化に弱いため、ピース貝の養殖が困難であるとの問題点もあった。

20

【0009】

【特許文献1】特開平05-308870号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

そこで、この発明は貝殻、真珠の色調の制御に関与する遺伝子などについての情報を飛躍的に増大することによって、優良な真珠の割合を増やし、真珠養殖の効率化と改善に資することを課題とする。

30

【課題を解決するための手段】

【0011】

発明者らは、アコヤ貝外套膜cDNAの網羅的な解析（EST解析）と、TOF-MSによるタンパク質の同定、という二つのアプローチにより、効率的に真珠、貝殻の色に関与する制御因子の探索を行った。そして、外套膜において特異的に発現するとともに、貝殻、真珠の色調を制御していると考えられる2種類のチロシナーゼの遺伝子を同定し、Pfty1、Pfty2と命名した。

【発明の効果】

【0012】

この発明により同定したチロシナーゼ遺伝子Pfty1、Pfty2は、貝殻と真珠の色に関係している。そこで、この遺伝子に基づいて調整したプローブ、プライマー、およびこの遺伝子がコードするタンパク質の抗体を使用することにより、良質な色調を有するピース貝や母貝を選別することが期待できる。また、チロシナーゼ遺伝子の発現量を操作することによって、将来的には真珠の品質向上につなげることも可能である。

40

【発明を実施するための最良の形態】

【0013】

この発明は、アコヤ貝の外套膜で特異的に発現する新規のチロシナーゼ遺伝子であり、このDNAにコードされた新規タンパク質、前記DNAから作られるプローブやプライマー、これらを利用した貝の選別方法などである。

【0014】

50

(1) チロシナーゼ遺伝子

チロシナーゼ遺伝子、Pfty1、Pfty2は、アコヤ貝の外殻膜で特異的に発現している遺伝子であり、これらの遺伝子は配列番号9又は配列番号10に示す塩基配列を有している。また、この塩基配列から、この遺伝子がコードしているタンパク質はメラニン合成系の酵素として働いていると考えられる。

【0015】

(2) 発現ベクター、形質転換体、タンパク質

この発明の発現ベクターは、宿主細胞において自立複製が可能、または染色体中への組込みが可能で、前記DNAの転写に適した位置にプロモータを含有しており、前記DNAを発現可能な状態を含むものである。また、マルチクローニングサイトや抗生物質耐性遺伝子などを含有していれば、遺伝子操作を効率よく行うことができる。なお、「遺伝子機能が発現可能な状態」とは、当該遺伝子の産物（酵素）が酵素活性を有する状態で発現することをいう。

【0016】

また、この発明の形質転換体は公知の手段により、この発明のDNAまたは発現ベクターをその遺伝子機能が発現可能な状態で宿主細胞に導入して得られる形質転換体である。なお、形質転換体の宿主としては、前記DNAの遺伝子機能が発現可能な状態で含むことができ、特に限定することなく使用することができる。

【0017】

具体的には、宿主細胞としては、細菌などの原核細胞、糸状菌、酵母等の微生物細胞、貝などの軟体動物を含む動物細胞、昆虫細胞、植物細胞など、目的とする遺伝子が発現できるものであればいずれも使用することができる。

【0018】

ただ、チロシナーゼ遺伝子、Pfty1、Pfty2がコードするタンパク質を大量に発現させてその性質を調べる場合には大腸菌などの細菌が好ましく、糖鎖などが付加したタンパク質を産出して、抗体作製などに供する場合には、貝、特にアコヤ貝の細胞や卵などが好ましい。

【0019】

なお、このような形質転換体は、宿主に応じて公知の任意の方法によって得ることができる。具体的な方法としては、塩化カルシウム法、アグロバクテリウム法、エレクトロポレーション法、パーティクルガン法、リン酸カルシウム共沈法、DEAE-デキストラン法、エレクトロポレーション法、リポフェクション法/リポソーム法などが挙げられる。

【0020】

さらに、チロシナーゼ遺伝子、Pfty1、Pfty2がコードするタンパク質は、前記形質転換体が生産したタンパク質を分離精製したものである。なお、タンパク質の分離・精製は、硫酸沈殿などの塩析法、HPLCを使用するカラムクロマトグラフィー等、公知の方法を組み合わせればよい。

【0021】

(3) プローブ及びプライマー

チロシナーゼ遺伝子、Pfty1、Pfty2のDNAは、その全部又は一部をプローブとして使用することができる、その一部をプライマーとして使用することができる。また、Pfty1、Pfty2のDNAの全部又は一部を公知の転写系により転写してなるRNAは、プローブとして使用することができる。ここで、一部とは、プライマー又はプローブとして使用するDNAがチロシナーゼ遺伝子のDNAに含まれる少なくとも10個、好ましくは15個、さらに好ましくは約20~30個の塩基配列に対応するヌクレオチドからなることを意味する。なお、プローブとして使用する場合には、さらに高分子のもの、具体的にはチロシナーゼ遺伝子のDNAやその転写産物であるmRNAそのものであってもよい。

【0022】

これらのプローブ及びプライマーは、例えば、DNA合成装置によって合成したDNA、チロシナーゼ遺伝子のDNAを制限酵素により部分消化したDNA、チロシナーゼ遺伝子のDNAやそ

10

20

30

40

50

の部分配列を組み換えた発現ベクターからT7 RNA polymerase等のRNA polymeraseを使用して作製したRNAなどである。また、プローブやプライマーについては標識物質により標識してあるほうがよい。

【0023】

ここで、標識物質としては、例えば ^{-32}P -dCTP、蛍光物質、放射性同位体などの検出可能なものが挙げることができ、標識は、例えば標識物質を化学的にDNAに結合させる、DNAを合成する際にすでに標識したヌクレオチドを使用してDNAを合成するなどによって行う等公知の方法により行なうことができる。

【0024】

(4) アコヤ貝の選抜方法

この発明の選抜方法は、前記DNAプローブ、RNAプローブ又はDNAプライマーの少なくとも何れか一つを使用して、チロシナーゼ遺伝子の外套膜における転写量を測定することによって、真珠養殖のピースとして使用するのに適したピース貝を選別するものである。具体的には、公知の方法、例えば、前記プローブやプライマーを使用したノーザンハイブリダイゼーション法、RT-PCR法、in situハイブリダイゼーション法等が挙げられる。また、前記の核酸を使用した方法のほかにも、チロシナーゼ遺伝子がコードするタンパク質に対する抗体を使用する公知の免疫学的方法、具体的には酵素免疫測定法などによっても、優良なアコヤ貝を選抜することができる。

10

【0025】

以下、この発明を実施例によってより詳細に説明するが、以下の実施例によりこの発明の特許請求の範囲はいかなる意味でも限定的に解釈されるものではない。

20

【実施例1】

【0026】

(1) アコヤ貝外套膜cDNAライブラリーの作製

日本産アコヤ貝の3年貝から、人工海水中にて外套膜を切除した。このアコヤ貝外套膜からtotal RNAをtrizol試薬(Invitrogen社製)により抽出し、mRNA purification kit (GEヘルスケアバイオサイエンス株式会社製)により、poly(A)+RNAを精製した。

【0027】

このpoly(A)+RNA 1 μg を鋳型として、SuperScript Plasmid System with Gateway Technology for cDNA Synthesis and Cloning (Invitrogen社製)を使用して、個々のcDNAをプラスミドベクターpSPORT1に挿入した。次にcDNA断片を含んだpSPORT1ベクターをエレクトロポレーションにより大腸菌DH10Bに導入し、cDNAライブラリーを構築した。

30

【0028】

(2) 外套膜由来cDNAの塩基配列決定

cDNAライブラリーから、Rolling Cycle Amplification法により鋳型を調製し、この鋳型を用いてDye Terminator法によりシーケンシング反応を行った。なお、プライマーにはT7 Promoter Primer (シグマ社製)を使用した。

【0029】

また、DNAの塩基配列決定はMegaBACE4000 capillary sequencer (GEヘルスケアバイオサイエンス株式会社製)により行い、3214個のcDNAの塩基配列を決定した。なお、決定したcDNAの塩基配列をHASTEアルゴリズムを使用するPTA (Paracel Transcript Assembler、パラセル社製)によりクラスタリングを行ったところ、1586個の単一配列と、1628個のクローンよりなる257個のクラスターを確認した。

40

【0030】

(3) 貝殻中に存在するチロシナーゼの同定

日本産アコヤ貝の3年貝の貝殻を洗浄したのち、8M尿素-50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ APMSF中にて3日間37度で振とうした。遠心後、上清を純粋に対して透析し、この時点で沈殿した画分を貝殻の不溶性タンパク質画分とした。

【0031】

不溶性タンパク質画分をSDS-PAGEにより分離したところ、3つの明確なバンド(分子量4

50

3000、47000、49000)を確認した。つぎに、これらのバンドを切り出し、96ウェルマイクロタイプレートに移した。これに50mM炭酸水素アンモニウム - 50%アセトニトリル100 μ lを加えて2回洗浄し、100 μ lアセトニトリルにより20分間洗浄した。

【0032】

その後、ゲル切片を25mM炭酸水素アンモニウム30 μ l中、30分にて一晩トリプシンで消化した。消化液をZipTip μ -C₁₈(ミリポア)により濃縮したのち、2.5mg/ml α -cyano-4-hydroxycinnamic acidと共にMALDIサンプルプレート上にスポットした。MALDI-TOF MS解析は、4700 MALDI-TOF/TOF mass spectrometer (Applied Biosystems)を使用してリフレクターモードで行ない、MS/MS解析はCID-offモードで行った。その結果を図2に示す。なお、図2(a)は49kDaのタンパク質のMSスペクトルであり、図(b)は43kDaのタンパク質のMSスペクトルである。ここで、47kDaのタンパク質については、49kDaのタンパク質とほぼ同様のMSスペクトルを示したため記載を省略した。

10

【0033】

また、MALDI-TOF/TOF MS解析の結果から、図2に示す8つのピークに該当するペプチド断片のアミノ酸配列が判明した。具体的には、図2中のa(1540.79m/z)のピークは配列番号1に、b(2043.05m/z)のピークは配列番号2に、c(1105.45m/z)のピークは配列番号3に、d(2493.22m/z)のピークは配列番号4に、e(1413.70m/z)のピークは配列番号5に、f(1362.72m/z)のピークは配列番号6に、g(960.52m/z)のピークは配列番号7に、h(1282.62m/z)のピークは配列番号8に、記載のアミノ酸配列を有するペプチド断片に該当することが分かった。

20

【0034】

つぎに、このアミノ酸配列と、外套膜cDNAライブラリーに含まれる遺伝子がコードするタンパク質のアミノ酸配列とを比較した。その結果、各ピークa~gに該当するアミノ酸配列をコードする遺伝子が2つ見つかった。そこで、これらの遺伝子をPfty1、Pfty2と名付けた。Pfty1、Pfty2の塩基配列をそれぞれ配列番号9、10に、コードするタンパク質のアミノ酸配列をそれぞれ配列番号11、12に示す。なお、図3は、Pfty1、Pfty2遺伝子がコードするタンパク質のアミノ酸配列を示しており、図中の下線部は図2の各ピークa~hに対応する。

【0035】

Pfty1、Pfty2のアミノ酸配列をデータベース(UniProt)により検索した結果、その中央付近に公知のチロシナーゼと高い類似性を有する領域(図3中に囲み線で示す。)が存在することは確認できたものの、遺伝子全体としては一致するものは同定できなかった。このことから、2つの遺伝子はいずれも新規のチロシナーゼをコードしていると考えられる。なお、前記類似性を有する領域は、節足動物のフェノールオキシダーゼの同様の領域と約20%の相同性があり、脊椎動物のチロシナーゼの同様の領域とは25%の相同性があり、イカスミのチロシナーゼの同様の領域は最も類似しており、Pfty1、Pfty2とそれぞれ35%、33%の相同性があった。

30

【0036】

(4) Pfty1、Pfty2遺伝子発現部位の確認

単離したチロシナーゼ遺伝子、Pfty1、Pfty2の発現部位を明らかにするため、アコヤ貝の各種組織を使用してノーザンプロット分析を行った。具体的には、まず、アコヤ貝の外套膜、エラ、中腸、閉殻筋から単離したtotal RNAを、定法に沿って電気泳動して大きさごとに分離し、メンブレンフィルターにブロッティングした。なお、ブロッティング用のメンブレンはHybond-N⁺(GEヘルスケアバイオサイエンス株式会社製)を使用した。

40

【0037】

つぎに、各チロシナーゼ遺伝子の5'末領域約500塩基をRediprime II DNA labeling system(GEヘルスケアバイオサイエンス株式会社製)により γ -³²P-dCTPで標識して、プローブを作成した。そして、前記メンブレン及びプローブを使用して65°Cで一晩ハイブリダイゼーションを行ったのち、65°Cの0.5XSSC中にて30分間、2回洗浄し、BAS2500(フジフィルム社製)によりシグナルを検出した。

50

【0038】

その結果を図4に示す。なお、図4において、(a)はPfty1由来のプローブ、(b)はPfty2由来のプローブを使用した場合の泳動結果を示している。また、(a)及び(b)の各電気泳動結果において、レーン1は外套膜(野生型)、レーン2はエラ(野生型)、レーン3は中腸(野生型)、レーン4は外套膜(シロガイ)に由来するtotal RNAを泳動した結果を示している。

【0039】

この図からも明らかなように、ノーザンハイブリダイゼーションの結果、Pfty1、Pfty2は、いずれも外套膜で特異的に発現することが確認できた。また、この図より、野生型のアコヤ貝に比べて白色の貝殻をつくるシロガイでは、Pfty1、Pfty2遺伝子の発現量が野生型に比べて減少していることも確認できた。このことから、Pfty1、Pfty2遺伝子は貝殻及び真珠の色調の決定に重要な役割を果たしていると推察できた。

10

【図面の簡単な説明】

【0040】

【図1】アコヤ貝稜柱層から単離したタンパク質をSDS-PAGEにより分離し、CBB R250にて染色した結果を示す図である。なお、左側に分子量マーカーの位置を示し、TOF-MS分析に供した領域は括弧で示している。

【図2】SDS-PAGEにより分離したアコヤ貝稜柱層に由来するタンパク質のうち、49 kDaタンパク質(a)と43 kDa(b)タンパク質の画分を、それぞれMALDI-TOF MS分析して得られたMSスペクトルである。

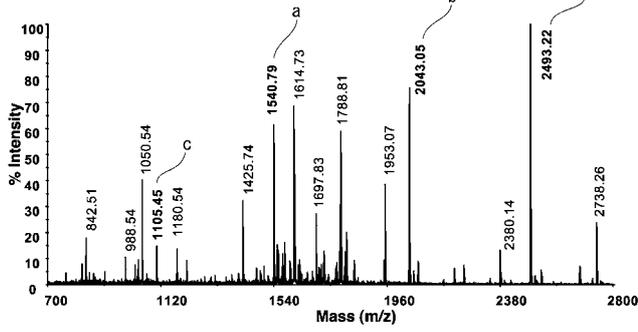
20

【図3】アコヤ貝チロシナーゼの一次構造とMALDI-TOF/TOF MS分析により得られたアミノ酸配列との対応関係を示す図である。図中に下線で示す各ペプチドa~hは、図2中のピークa~hにそれぞれ該当する。

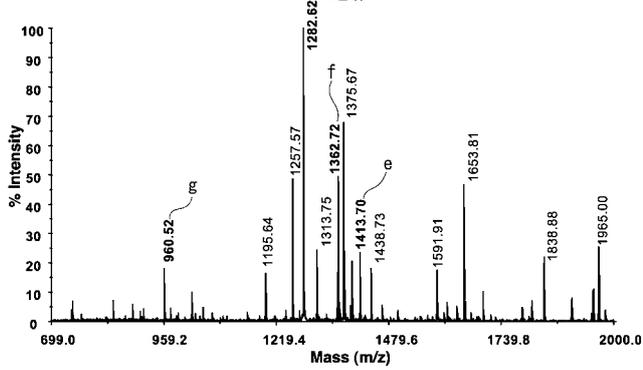
【図4】アコヤ貝成体組織由来のRNAを使用して、ノーザンプロット分析を行った結果を示す図である。(a)はPfty1由来のプローブ、(b)はPfty2由来のプローブを使用した結果を示している。また、各レーンは、レーン1:外套膜(野生型)、レーン2:エラ(野生型)、レーン3:中腸腺(野生型)、レーン4:外套膜(シロガイ)に由来するtotal RNAを使用した結果を示している。

【 図 2 】

(a) Pfty1 (49 kDa)



(b) Pfty2 (43 kDa)



【 図 3 】

(a) Pfty1

```

MTSLLTLFVHACILIGVNSMLQPKRVKDTYENSCLHNAVFNFSSTNYL
EPKQCTLFMDKYTEMKNFLNYTDMQMNLYLSLRAVLRKYEKKQGRHKR
QTGMMARQECRTLSDGARGALFGAIVDLKPTGGMSRYDTTAGMHSFAAY
RYAHLGSPSFLGWHRREYLIMYEEALQEIRSDVVLICYWDSTLDFLMPGSTQR
a
FTVAFSADLFGNGRGNVINGAFANWQLPGGGTLRRNIAGDRFPGPPPSLT
b
RPGIVDLIATDPSITSHTQIVRGGTGFDPDITGRVHTWEQEHNDTHVWVG
EIMQDVAAPGDPVFFHHHTFIDYGWELFRQKINPNGNIDLNDYPNVGG
FHAPDAPMFGFGGITNRDGYSDIYTRMYAPHPTCSNGCGGSTQFLYCPDG
c
GPMANPNRRCISRDINSDLVPAAAVAPAAAMQAMASGPEATMARFGPAAT
MGMFGPAATRAGFSPAATMSMFGPAASRALFGPAAMTRAVPAVGSARVSV
EATDAVAVRSALSEPPPPVSGISFESSFSDSRL
d

```

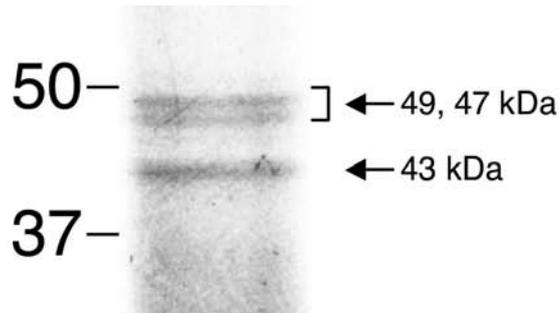
(b) Pfty2

```

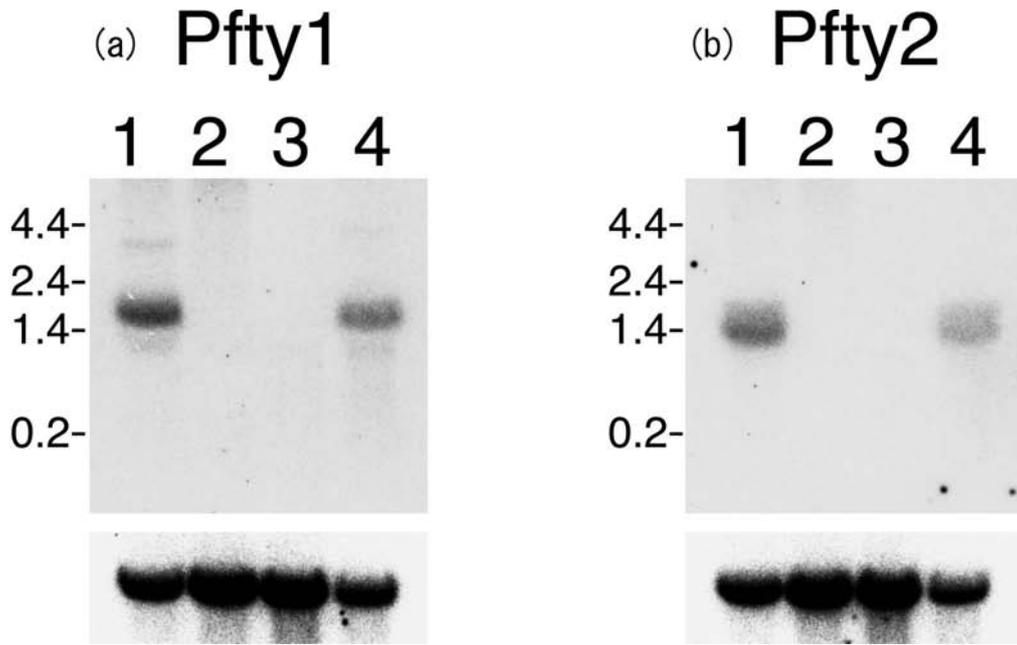
MKKLWALAASLPLLLCVHCIKEKEILKESYKQKCMNAVYDFNSTNPTTL
EPKCATLFGHEYSDIKNFLKFDDQMNLYLSLERAMMRTQHRNKRHKRQ
AMMRPROECRTLSDPDRNALFGAIVTLKQPFSGMSRYNTLAAMHNLQAFG
NAHNGPNFLGWHRVYLNMYEALQEIRPGVALCYWDSTLDYLMPGDSQRR
TVAFSDELFGNGRGAVINSQFANWRLSDNTPLRRMIGENSSLTRPGIVD
e
LILTDPRINRHRWLVNEGSRFNQSPRFGFIDPDSGMRHSWEREHNDTHVW
f
VGGIMVNVVERSPEDPVFVHHLYIDYVWELFRRKIDPMDRFDLRTDYPMD
SYNEQHRAFQTMAGFPAYRNIIDGYHNFFRRMYAPHPRCSNCCGSRFLRC
h
PDIGPMGNPDRRCVSLAIDSDDVVPAAAASPAAMAGFGASRAGFAAFGGP
AAMASGGAARVSLQATDEVAMRAAMSAPQTVVQGPNTSSRADSRLL

```

【 図 1 】



【 図 4 】



【 配列表 】

[200925423400001.app](#)

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I			テーマコード(参考)
C 1 2 N 9/06 (2006.01)	C 1 2 N	9/06		B
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q	1/68		A
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N	33/53		D

(72)発明者 矢野 昌人

和歌山県紀の川市南勢田 6 0 5 - 1 ニューライフセイダ 2 2 0 1号室

(72)発明者 永井 宏平

和歌山県紀の川市下井阪 5 6 5 - 3 - 2 0 2

Fターム(参考) 4B024 AA10 AA11 BA08 CA04 CA05 CA06 CA09 CA11 CA12 DA06
 EA04 FA02 FA10 GA11 GA19 HA03 HA08 HA09 HA12 HA14
 4B050 CC03 CC04 DD11 FF04E FF09E LL03
 4B063 QA01 QA18 QA20 QQ42 QQ53 QR08 QR32 QR35 QR36 QR42
 QR55 QR62 QR77 QS02 QS12 QS16 QS25 QS34 QS36 QS39
 QX02
 4B065 AA26Y AA90Y AB01 AC14 AC20 BA02 BA24 CA28 CA46