(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28日(28.11.2024)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2024/242124 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 15/31 (2006.01) *C12N 15/53* (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01) *C12P 7/44* (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2024/018765

(22) 国際出願日： 2024年5月22日(22.05.2024)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

(30) 優先権データ：
特願 2023-084247 2023年5月23日(23.05.2023) JP

(71) 出願人: 東レ株式会社 (**TORAY INDUSTRIES, INC.**) [JP/JP]; 〒1038666 東京都中央区日本橋室町２丁目１番１号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 中村 仁美 (**NAKAMURA, Hitomi**); 〒2488555 神奈川県鎌倉市手広６丁目１０番１号 東レ株式会社 基礎研究センター内 Kanagawa (JP). 磯部 匡平(**ISOBE, Kyohei**); 〒2488555 神奈川県鎌倉市手広６丁目１０番１号 東レ株式会社 基礎研究センター内 Kanagawa (JP). 山田勝成(**YAMADA, Katsushige**); 〒2488555 神奈川県鎌倉市手広６丁目１０番１号 東レ株式会社 基礎研究センター内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 弁理士法人谷川国際特許事務所 (**TANIGAWA AND PARTNERS, PATENT FIRM**); 〒1020072 東京都千代田区飯田橋一丁目７番１０号山京別館８０１ 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)）

(54) **Title:** GENETICALLY MODIFIED MICROORGANISM FOR PRODUCING 3-HYDROXYADIPIC ACID, α-HYDROMUCONIC ACID, AND/OR ADIPIC ACID, AND METHOD FOR PRODUCING SAID CHEMICALS

(54) 発明の名称： ３－ヒドロキシアジピン酸、α－ヒドロムコン酸および／またはアジピン酸を生産するための遺伝子改変微生物および当該化学品の製造方法

(57) **Abstract:** Abstract: Disclosed is a novel genetically modified microorganism capable of reducing the productivity of acetic acid, which is a main by-product, and improving the productivity of 3-hydroxyadipic acid, α-hydromuconic acid, and/or adipic acid, in a method for producing 3-hydroxyadipic acid, α-hydromuconic acid, and/or adipic acid using a microorganism. The genetically modified microorganism is one in which the glyoxalate cycle is enhanced and the lactic acid or ethanol generation reaction is reduced in a microorganism having the ability to produce 3-hydroxyadipic acid, α-hydromuconic acid, and/or adipic acid.

(57) 要約：要約 微生物を利用した３－ヒドロキシアジピン酸、α－ヒドロムコン酸および／またはアジピン酸の製造方法において、主な副生物である酢酸の生産性を低下させ、３－ヒドロキシアジピン酸、α－ヒドロムコン酸および／またはアジピン酸の生産性を向上させることができる新規の遺伝子改変微生物が開示されている。遺伝子改変微生物は、３－ヒドロキシアジピン酸、α－ヒドロムコン酸および／またはアジピン酸を製造する能力を有する微生物において、グリオキシル酸回路を強化し、かつ、乳酸またはエタノール生成反応を低下させたものである。

WO 2024/242124 A1

明　細　書

発明の名称 ：

３－ヒドロキシアジピン酸、α－ヒドロムコン酸および／またはアジピン酸を生産するための遺伝子改変微生物および当該化学品の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、３－ヒドロキシアジピン酸、α－ヒドロムコン酸および／またはアジピン酸を高生産する遺伝子改変微生物、および、当該遺伝子改変微生物を用いた３－ヒドロキシアジピン酸、α－ヒドロムコン酸および／またはアジピン酸の製造方法に関する。

背景技術

[0002] ３－ヒドロキシアジピン酸（ＩＵＰＡＣ名：３－ｈｙｄｒｏｘｙｈｅｘａｎｅｄｉｏｉｃ　ａｃｉｄ）、α－ヒドロムコン酸（ＩＵＰＡＣ名：（Ｅ）－ｈｅｘ－２－ｅｎｅｄｉｏｉｃ　ａｃｉｄ）およびアジピン酸（ＩＵＰＡＣ名：ｈｅｘａｎｅｄｉｏｉｃ　ａｃｉｄ）は炭素数６のジカルボン酸である。これらは多価アルコールと重合することでポリエステルとして、また多価アミンと重合することでポリアミドの原料として用いることができる。また、これらの末端にアンモニアを付加してラクタム化した化合物もポリアミドの原料として用いることができる。

[0003] 微生物を利用した３－ヒドロキシアジピン酸、α－ヒドロムコン酸および／またはアジピン酸の製造に関連する文献として、特許文献１には、３－オキソアジピル－ＣｏＡから３－ヒドロキシアジピル－ＣｏＡへの還元反応を触媒する優れた活性を示すポリペプチドを用いた３－ヒドロキシアジピン酸、α－ヒドロムコン酸および／またはアジピン酸の製造方法が記載されており、これら物質の生合成経路として、３－オキソアジピル－ＣｏＡを３－ヒドロキシアジピル－ＣｏＡへと還元する酵素反応を経由するとの記載がある。

[0004] 特許文献２には、３－オキソアジピル－ＣｏＡから３－ヒドロキシアジピ

ル－ＣｏＡへの還元反応を触媒する優れた活性を示すポリペプチドを用いるとともに、ピルビン酸キナーゼの機能を欠損させた遺伝子改変微生物による３－ヒドロキシアジピン酸、α－ヒドロムコン酸および／またはアジピン酸の製造方法が記載されている。

[0005] 特許文献３には、ピルビン酸からアセチル－ＣｏＡを生成する反応を強化し、ならびにピルビン酸キナーゼおよび／またはホスホトランスフェラーゼ系酵素の機能を低下させた遺伝子改変微生物による３－ヒドロキシアジピン酸および／またはα－ヒドロムコン酸の製造方法が記載されている。

[0006] ところで、微生物を利用した化学品の製造では、副生物を抑制して目的物質の生産性を向上させることが普遍的な技術課題となっているが、微生物を利用した３－ヒドロキシアジピン酸、α－ヒドロムコン酸および／またはアジピン酸の製造においては、特許文献２で示されるとおり、酢酸が主要な副生物であるため、３－ヒドロキシアジピン酸、α－ヒドロムコン酸および／またはアジピン酸を生産する能力を有する微生物による酢酸の副生を低減できれば、当該微生物の３－ヒドロキシアジピン酸、α－ヒドロムコン酸および／またはアジピン酸の生産性の向上が期待できる。

[0007] しかし、微生物を利用した化学品の製造において、酢酸の副生を低減するために酢酸の生産経路を遮断すると、目的物質の生産性も低下することも知られている。具体的には、酢酸の生産経路を遮断する方法として、酢酸の生成反応を触媒する酵素をコードする遺伝子を不活化または欠損させる方法が挙げられ、酢酸の生成反応を触媒する主な酵素として、アセチル－ＣｏＡとリン酸からアセチルリン酸とＣｏＡを生成する反応を触媒するリン酸アセチルトランスフェラーゼ（ＥＣ　２．３．１．８）とアセチルリン酸から酢酸を生成する反応を触媒する酢酸キナーゼ（ＥＣ　２．７．２．１）、ピルビン酸から酢酸と二酸化炭素を生成する反応を触媒するピルビン酸デヒドロゲナーゼ（ＥＣ　１．２．５．１）が知られているが、非特許文献１に例示されるように、工業的に汎用される大腸菌では、酢酸の生成反応を触媒する酵素をコードする遺伝子であるａｃｋＡ、ｐｔａおよびｐｏｘＢが欠損するこ

とによって微生物の生育が低下し、それに伴い、目的物質の生産性も低下してしまうことが知られている。

先行技術文献

特許文献

[0008] 特許文献1：ＷＯ２０１９／１０７５１６号

特許文献2：ＷＯ２０２０／２３０７１８号

特許文献3：ＷＯ２０２２／１０２６３５号

特許文献4：特表２００８－５１３０２３号

非特許文献

[0009] 非特許文献1：Ｆｒｏｎｔ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．２０２０，１１，２３３．

非特許文献2：ＢＭＣ　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ　２０１１，１１：７０．

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0010]　本発明では、３－ヒドロキシアジピン酸、α－ヒドロムコン酸および／またはアジピン酸を製造する能力を有する微生物において、酢酸の生産経路を遮断せずに当該微生物の代謝経路を改変することによって、酢酸の副生を低減させつつ、３－ヒドロキシアジピン酸、α－ヒドロムコン酸および／またはアジピン酸の生産性が向上する遺伝子改変微生物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

[0011]　本発明者は、上記目的を達成するため鋭意検討した結果、３－ヒドロキシアジピン酸、α－ヒドロムコン酸および／またはアジピン酸を製造する能力を有する微生物において、グリオキシル酸回路を強化し、かつ、乳酸またはエタノール生成反応を低下させることで、３－ヒドロキシアジピン酸、α－ヒドロムコン酸および／またはアジピン酸の生産性が向上し、酢酸の生産性が低下することを見出し、本発明を完成させるに至った。

[0012]　具体的には、本発明は次の（１）～（１６）から構成される。

[0013] （１）３－ヒドロキシアジピン酸、α－ヒドロムコン酸および／またはアジピン酸を製造する能力を有する微生物において、グリオキシル酸回路を強化し、かつ、乳酸またはエタノール生成反応を低下させた、遺伝子改変微生物。

（２）前記グリオキシル酸回路の強化が、イソクエン酸リアーゼレプレッサーの機能の低下、リンゴ酸シンターゼの機能の強化および／またはイソクエン酸デヒドロゲナーゼキナーゼ／ホスファターゼの機能の強化である、（１）に記載の遺伝子改変微生物。

（３）前記グリオキシル酸回路の強化が、以下の（ｉ）～（ｉｉｉ）のいずれかである、（１）または（２）に記載の遺伝子改変微生物。

（ｉ）ｉｃｌＲ遺伝子の欠失、機能喪失変異または発現抑制によるイソクエン酸リアーゼレプレッサーの機能の低下

（ｉｉ）ａｃｅＢ遺伝子の発現量の増大によるリンゴ酸シンターゼの機能の強化

（ｉｉｉ）ａｃｅＫ遺伝子の発現量の増大によるイソクエン酸デヒドロゲナーゼキナーゼ／ホスファターゼの機能の強化。

（４）前記乳酸生成反応の低下が、乳酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子の欠失、機能喪失変異または発現抑制による低下である、（１）～（３）のいずれかに記載の遺伝子改変微生物。

（５）前記乳酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子が、ｌｄｈＡ遺伝子である、（４）に記載の遺伝子改変微生物。

（６）前記エタノール生成反応の低下が、アルコールデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子の欠失、機能喪失変異または発現抑制による低下である、（１）～（５）のいずれかに記載の遺伝子改変微生物。

（７）前記アルコールデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子が、ａｄｈＥ遺伝子である、（６）に記載の遺伝子改変微生物。

（８）さらに３－オキソアジピル－ＣｏＡを還元して３－ヒドロキシアジピル－ＣｏＡを生成する反応を強化した、（１）～（７）のいずれかに記載の

遺伝子改変微生物。

（９）アセチル－ＣｏＡまたはピルビン酸から酢酸を生成する反応経路を維持する、（１）に記載の遺伝子改変微生物。

（１０）（１）から（９）のいずれかに記載の遺伝子改変微生物を培養する工程を含む、３－ヒドロキシアジピン酸、α－ヒドロムコン酸および／またはアジピン酸の製造方法。

（１１）（１０）に記載の方法により３－ヒドロキシアジピン酸および／またはα－ヒドロムコン酸を製造する工程、ならびに、水素化触媒の存在化、水素と反応させる工程（水素化工程）を含む、アジピン酸の製造方法。

（１２）（１０）または（１１）に記載の方法によりアジピン酸を製造する工程、ならびに、アジピン酸およびジアミンを重縮合する工程を含む、ポリアミドの製造方法。

（１３）前記ジアミンが、１，４－ブタンジアミン、１，５－ペンタンジアミンまたはヘキサメチレンジアミンを含有するジアミンである、（１２）に記載のポリアミドの製造方法。

（１４）（１）から（９）のいずれかに記載の遺伝子改変微生物を培養する工程から得られる、３－ヒドロキシアジピン酸、α－ヒドロムコン酸および／またはアジピン酸。

（１５）（１０）に記載の方法により３－ヒドロキシアジピン酸および／またはα－ヒドロムコン酸を製造する工程、ならびに、水素化触媒の存在下、水素と反応させる工程（水素化工程）を含む工程から得られる、アジピン酸。

（１６）（１０）または（１１）に記載の方法によりアジピン酸を製造する工程、ならびに、アジピン酸およびジアミンを重縮合する工程を含む工程から得られる、ポリアミド。

発明の効果

[0014] 本発明に係る遺伝子改変微生物は、当該遺伝子を改変していない親株の微生物と比較して、３－ヒドロキシアジピン酸、α－ヒドロムコン酸および／

またはアジピン酸の生産性を高め、さらに酢酸の生産性を低減することができる。すなわち、酢酸に対する３－ヒドロキシアジピン酸、α－ヒドロムコン酸および／またはアジピン酸の生産比率を高めることができる。

発明を実施するための形態

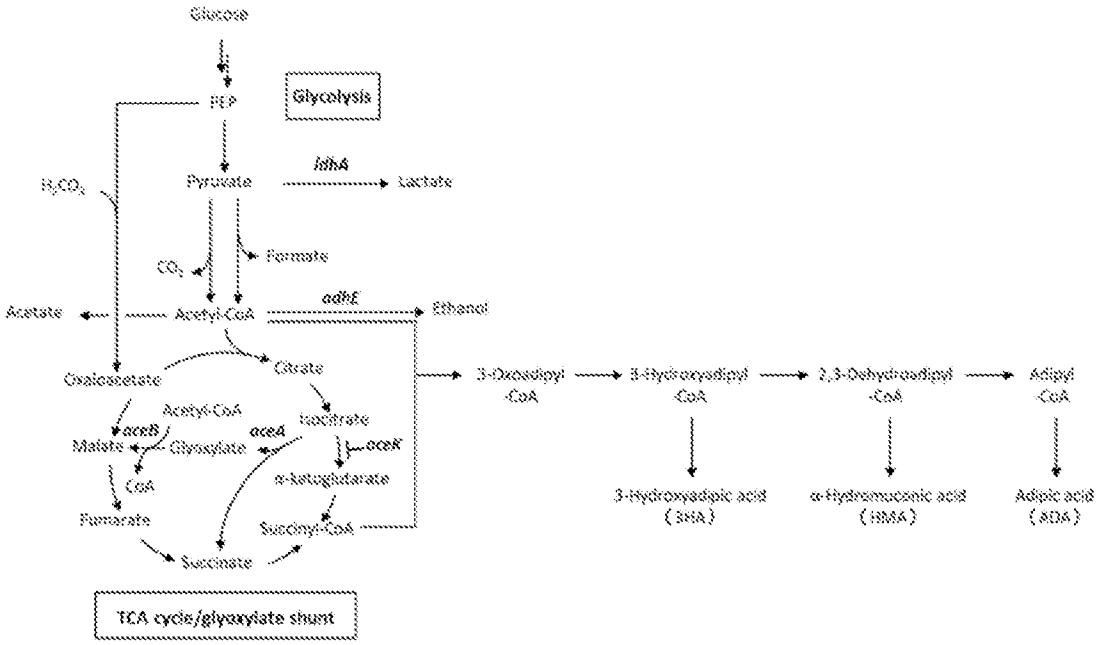
[0015] 以下、本発明をより詳細に説明するが、本発明は以下の実施の形態に限定されるものではなく、本発明の要旨の範囲内であれば種々変更して実施することができる。

[0016] 以下、本明細書では３－ヒドロキシアジピン酸を「３ＨＡ」、α－ヒドロムコン酸を「ＨＭＡ」、アジピン酸を「ＡＤＡ」と略すことがある。また、３－オキソアジピル－ＣｏＡを「３ＯＡ－ＣｏＡ」、３－ヒドロキシアジピル－ＣｏＡを「３ＨＡ－ＣｏＡ」、２，３－デヒドロアジピル－ＣｏＡを「ＨＭＡ－ＣｏＡ」、アジピル－ＣｏＡを「ＡＤＡ－ＣｏＡ」と略すことがある。また、３－オキソアジピル－ＣｏＡを還元して３－ヒドロキシアジピル－ＣｏＡを生成する反応を触媒する酵素を「３－オキソアジピル－ＣｏＡレダクターゼ」と記載することがある。また、イソクエン酸リアーゼレプレッサーを「ＩｃｌＲ」、リンゴ酸シンターゼを「ＡｃｅＢ」、イソクエン酸デヒドロゲナーゼキナーゼ／ホスファターゼを「ＡｃｅＫ」と記載することがある。また、機能を持つポリペプチドをコードする核酸のことを遺伝子と記載することがある。

[0017] 本発明の遺伝子改変微生物は、以下の代謝経路に示されるとおりアセチル－ＣｏＡおよびスクシニル－ＣｏＡを中間体として、３ＨＡ、ＨＭＡおよび／またはＡＤＡを生合成することができる。グルコースからアセチル－ＣｏＡまでの代謝経路は解糖系、スクシニル－ＣｏＡまでの代謝経路はＴＣＡ回路、グリオキシル酸回路、およびＰＥＰからオキサロ酢酸を生成する補充経路と還元的ＴＣＡ回路からなる代謝経路として周知である。

[0018]

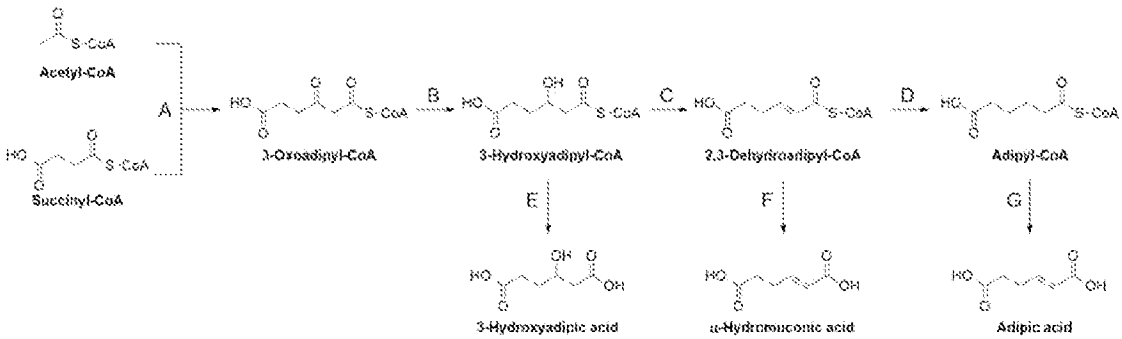
[化1]



[0019] アセチル－ＣｏＡおよびスクシニル－ＣｏＡから３ＨＡ、ＨＭＡおよび／またはＡＤＡを生産する代謝経路の代謝産物を化学式で表示したものを以下に示す。ここで、反応Ａは、アセチル－ＣｏＡおよびスクシニル－ＣｏＡから３－オキソアジピル－ＣｏＡを生成する反応を示す。反応Ｂは、３－オキソアジピル－ＣｏＡを還元して３－ヒドロキシアジピル－ＣｏＡを生成する反応を示す。反応Ｃは、３－ヒドロキシアジピル－ＣｏＡから２，３－デヒドロアジピル－ＣｏＡを生成する反応を示す。反応Ｄは、２，３－デヒドロアジピル－ＣｏＡからアジピル－ＣｏＡを生成する反応を示す。反応Ｅは、３－ヒドロキシアジピル－ＣｏＡから３－ヒドロキシアジピン酸を生成する反応を示す。反応Ｆは、２，３－デヒドロアジピル－ＣｏＡからα－ヒドロムコン酸を生成する反応を示す。反応Ｇは、アジピル－ＣｏＡからアジピン酸を生成する反応を示す。以下の代謝経路での各反応を触媒する酵素、ならびに以下の代謝経路を利用した３ＨＡ、ＨＭＡおよび／またはＡＤＡを生産する能力を有する微生物を創出する方法は、ＷＯ２０１９／１０７５１６号に詳述されている。

[0020]

[化2]



[0021] 本発明は、３ＨＡ、ＨＭＡおよび／またはＡＤＡを製造する能力を有する微生物において、イソクエン酸リアーゼレプレッサーの機能を低下、リンゴ酸シンターゼの機能を強化および／またはイソクエン酸デヒドロゲナーゼキナーゼ／ホスファターゼの機能を強化させることを特徴とする。

[0022] イソクエン酸リアーゼレプレッサーとは、イソクエン酸リアーゼ、リンゴ酸シンターゼおよびイソクエン酸デヒドロゲナーゼキナーゼ／ホスファターゼをコードする遺伝子の発現を抑制する活性を有するタンパク質である。

[0023] イソクエン酸リアーゼレプレッサーの具体例としては、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ ｓｔｒ．Ｋ－１２ ｓｕｂｓｔｒ．ＭＧ１６５５株由来のＩｃｌＲ（ＮＣＢＩ－ＰｒｏｔｅｉｎＩＤ：ＮＰ＿４１８４４２、配列番号１）が挙げられ、ＩｃｌＲをコードする遺伝子の具体例としては配列番号２の核酸配列が挙げられる。

[0024] イソクエン酸リアーゼは、イソクエン酸からコハク酸とグリオキシル酸を生成する反応を可逆的に触媒する酵素（ＥＣ ４．１．３．１）である。イソクエン酸リアーゼの具体例としては、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ ｓｔｒ．Ｋ－１２ ｓｕｂｓｔｒ．ＭＧ１６５５株由来のＡｃｅＡ（ＮＣＢＩ－ＰｒｏｔｅｉｎＩＤ：ＮＰ＿４１８４３９）が挙げられる。

[0025] リンゴ酸シンターゼは、グリオキシル酸とアセチル－ＣｏＡからリンゴ酸とＣｏＡを生成する反応を触媒する酵素（ＥＣ ２．３．３．９）である。リンゴ酸シンターゼの具体例としては、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ ｓｔｒ．Ｋ－１２ ｓｕｂｓｔｒ．ＭＧ１６５５株由来のＡｃｅＢ（ＮＣ

ＢＩ－ＰｒｏｔｅｉｎＩＤ：ＮＰ＿４１８４３８、配列番号３５）が挙げられ、ＡｃｅＢをコードする遺伝子の具体例としては配列番号３６の核酸配列が挙げられる。

[0026] イソクエン酸デヒドロゲナーゼキナーゼ／ホスファターゼは、ＴＣＡ回路のイソクエン酸からα－ケトグルタル酸と二酸化炭素を生成する反応を触媒する酵素であるイソクエン酸デヒドロゲナーゼのリン酸化を触媒する酵素（ＥＣ　２．７．１１．５）である。イソクエン酸デヒドロゲナーゼはリン酸化により触媒活性が低下することが知られている。イソクエン酸デヒドロゲナーゼキナーゼ／ホスファターゼの具体例としては、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ｓｔｒ．Ｋ－１２　ｓｕｂｓｔｒ．ＭＧ１６５５株由来のＡｃｅＫ（ＮＣＢＩ－ＰｒｏｔｅｉｎＩＤ：ＮＰ＿４１８４４０、配列番号３７）が挙げられ、ＡｃｅＫをコードする遺伝子の具体例としては配列番号３８の核酸遺伝子が挙げられる。

[0027] イソクエン酸リアーゼをコードするａｃｅＡ遺伝子、リンゴ酸シンターゼをコードするａｃｅＢ遺伝子とイソクエン酸デヒドロゲナーゼキナーゼ／ホスファターゼをコードする遺伝子であるａｃｅＫ遺伝子は共にａｃｅＢＡＫオペロンを形成している。イソクエン酸リアーゼ、リンゴ酸シンターゼおよびイソクエン酸デヒドロゲナーゼキナーゼ／ホスファターゼは、ＴＣＡ回路の一部をバイパスするグリオキシル酸回路を形成する反応を触媒することから、ａｃｅＢＡＫオペロンはグリオキシル酸バイパスオペロンとしても知られている。

[0028] ＩｃｌＲ遺伝子がコードするタンパク質は、ａｃｅＢＡＫオペロンの発現を抑制する機能を有するイソクエン酸リアーゼレプレッサーである。イソクエン酸リアーゼリプレッサーの機能を低下させることで、ａｃｅＢＡＫオペロンの発現が誘導され、イソクエン酸リアーゼ、リンゴ酸シンターゼおよびイソクエン酸デヒドロゲナーゼキナーゼ／ホスファターゼの発現が強化されることが想到される。

[0029] また、イソクエン酸リアーゼリプレッサー以外でａｃｅＢＡＫオペロンの

発現を制御する機能を有するタンパク質として、ＦａｄＲ（ＮＣＢＩ－ＰｒｏｔｅｉｎＩＤ：ＮＰ＿４１５７０５）やＡｒｃＡ（ＮＣＢＩ－ＰｒｏｔｅｉｎＩＤ：ＮＰ＿４１８８１８）などが報告されている（Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．１９９６，１７８（１５），４７０４－４７０９．；ＢＭＣ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．２０１１，１１：７０．）。

[0030] 本発明でグリオキシル酸回路を強化する方法は、イソクエン酸リアーゼレプレッサーの機能を低下させる方法、またはリンゴ酸シンターゼおよび／またはイソクエン酸デヒドロゲナーゼキナーゼ／ホスファターゼの機能を強化させる方法であれば特に限定されない。イソクエン酸リアーゼレプレッサーの機能を低下させる方法としては、例えば、当該酵素をコードする遺伝子の欠失、機能喪失変異、または発現抑制が挙げられ、当該酵素をコードする遺伝子の欠失または発現抑制が好ましい。また、機能を低下させるイソクエン酸リアーゼレプレッサー遺伝子としてはｉｃｌＲ遺伝子が好ましい。

[0031] リンゴ酸シンターゼおよび／またはイソクエン酸デヒドロゲナーゼキナーゼ／ホスファターゼの機能を強化させる方法としては、例えば、当該酵素自体の触媒活性を増強することや、当該酵素の発現量を増加させることが挙げられ、当該酵素の発現量を増加させることが好ましい。また、機能を強化させるリンゴ酸シンターゼ遺伝子としてはａｃｅＢ遺伝子が、イソクエン酸デヒドロゲナーゼキナーゼ／ホスファターゼ遺伝子としてはａｃｅＫ遺伝子が好ましい。

[0032] ｉｃｌＲ遺伝子の発現を抑制する方法は特に限定されないが、例えば、微生物ゲノム上の遺伝子の上流に存在するプロモーター領域の核酸配列に変異を導入し、プロモーター活性を低下させることで転写を阻害する方法、遺伝子領域の転写により得られるｍＲＮＡの核酸配列にヘアピンなどの二次構造を形成する塩基配列を導入し、翻訳を阻害する方法、または遺伝子の一部の相補鎖となるＲＮＡ核酸を発現し、遺伝子の核酸分子と複合体を形成させることで翻訳を阻害する方法（Ｊ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ ２０１８，１５４，２５－３２．；Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２０１３

，３１（２），１７０－１７６．）などが挙げられる。本発明では、遺伝子の一部の相補鎖となるＲＮＡ核酸を発現し、遺伝子の核酸分子と複合体を形成させることで翻訳を阻害する遺伝子発現の抑制方法が好ましい。

[0033] 本発明において、リンゴ酸シンターゼおよび／またはイソクエン酸デヒドロゲナーゼキナーゼ／ホスファターゼである酵素自体の触媒活性を増強することは、例えば、当該酵素の触媒活性を有するポリペプチドの一部のアミノ酸の欠失、置換および／または挿入につながる変異を導入し、変異導入前と比べ高い触媒活性を示す酵素を発現させることにより行うことができる。また、リンゴ酸シンターゼおよび／またはイソクエン酸デヒドロゲナーゼキナーゼ／ホスファターゼの発現量を増加させる方法は特に限定されないが、例えば、当該酵素をコードする遺伝子を宿主微生物の菌体外から菌体内へと導入したり、当該遺伝子のコピー数を増加させたり、当該遺伝子のコーディング領域上流のプロモーター領域やリボソーム結合配列を改変させたりする方法などが挙げられる。当該酵素をコードする遺伝子を宿主微生物の菌体外から菌体内へと導入する、または、当該遺伝子のコピー数を増加させる方法としては、宿主遺伝子がもともと保有する当該遺伝子を人為的に導入する方法であっても、外来の当該遺伝子を導入する方法であっても良い。当該酵素の発現量を増加させる方法としては、前述の方法を単独で行ってもよいし、組み合わせてもよい。

[0034] ＢＭＣ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ ２０１１，１１：７０．には、ｉｃｌＲ遺伝子の欠失によりイソクエン酸リアーゼレプレッサーの機能を低下させることで、酢酸や二酸化炭素の生成が減少することが開示されている。また、特表２００８－５１３０２３号では、ｉｃｌＲ遺伝子がコードするタンパク質の活性を低下させてイソクエン酸リアーゼレプレッサーの機能を低下させること、またはａｃｅＢ遺伝子やａｃｅＫ遺伝子の過剰発現またはこれら遺伝子がコードするたんぱく質の活性を増加させてリンゴ酸シンターゼやイソクエン酸デヒドロゲナーゼキナーゼ／ホスファターゼの機能を強化させることで、ＴＣＡ回路を使用して生成されるコハク酸、フマル酸、リンゴ酸

、オキサロ酢酸またはグリオキシル酸を高生産する方法が開示されている。一方で、３ＨＡ、ＨＭＡおよび／またはＡＤＡを製造する能力を有する微生物による３ＨＡ、ＨＭＡおよび／またはＡＤＡの生産では中間体であるアセチル－ＣｏＡが必須であり、ＷＯ２０２２／１０２６３５号にはアセチル－ＣｏＡを生成する反応を強化することで３ＨＡおよび／またはＨＭＡの生産性が向上することが開示されている。グリオキシル酸回路のリンゴ酸シンターゼが触媒する反応はアセチル－ＣｏＡを消費する反応であり、３ＨＡ、ＨＭＡおよびＡＤＡの生産反応と競合するため、３ＨＡ、ＨＭＡおよび／またはＡＤＡを製造する能力を有する微生物においてイソクエン酸リアーゼレプレッサーの機能を低下させたり、リンゴ酸シンターゼやイソクエン酸デヒドロゲナーゼキナーゼ／ホスファターゼの機能を強化させると、グリオキシル酸回路の強化により酢酸の副生は抑制されるが、３ＨＡ、ＨＭＡおよび／またはＡＤＡの生産性も低下すると推定されたが、後述の実施例にて示されるとおり、酢酸の副生は抑制され、３ＨＡ、ＨＭＡおよび／またはＡＤＡの生産性も向上するという予想外の効果が得られる。

[0035] また、３ＨＡ、ＨＭＡおよび／またはＡＤＡを製造する能力を有する微生物を培養して得られる主な副生物として、酢酸の他に、乳酸やエタノールが挙げられるが、本発明では、３ＨＡ、ＨＭＡおよび／またはＡＤＡを製造する能力を有する微生物において乳酸またはエタノール生成反応を低下させることを特徴としている。

[0036] 微生物を使用した化学品の製造において、副生物の生成反応を低下させることで目的とする化学品の生産性を向上させることは、当業者にとって汎用的な技術的手段である。ところが、後段の実施例で示されるとおり、３ＨＡ、ＨＭＡおよび／またはＡＤＡを製造する能力を有する微生物において、単に乳酸またはエタノールの生成反応を低下させると、副生物である酢酸に対する３ＨＡ、ＨＭＡおよび／またはＡＤＡの生産比率が低下するという問題が生じる。本発明においては、グリオキシル酸回路を強化し、かつ乳酸またはエタノール生成反応を低下させることで、酢酸に対する３ＨＡ、ＨＭＡお

よび／またはＡＤＡと酢酸の生産比率を向上させることができる。

[0037] 乳酸はピルビン酸を還元する反応により生成される。ピルビン酸を乳酸に還元する反応を触媒する酵素の具体例としては、乳酸デヒドロゲナーゼ（ＥＣ　１．１．１．２７、１．１．１．２８）が挙げられる。乳酸デヒドロゲナーゼの具体例としては、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ｓｔｒ．Ｋ－１２　ｓｕｂｓｔｒ．ＭＧ１６５５株由来のＬｄｈＡ（ＮＣＢＩ－ＰｒｏｔｅｉｎＩＤ：ＮＰ＿４１５８９８、配列番号３）が挙げられ、ＬｄｈＡをコードする遺伝子の具体例として配列番号４の核酸配列が挙げられる。

[0038] エタノールはアセチル－ＣｏＡを還元する反応により生成される。アセチル－ＣｏＡをエタノールに還元する反応を触媒する酵素の具体例としては、アルコールデヒドロゲナーゼ（ＥＣ　１．２．１．１０、１．１．１．１）が挙げられる。アルコールデヒドロゲナーゼの具体例としては、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ｓｔｒ．Ｋ－１２　ｓｕｂｓｔｒ．ＭＧ１６５５株由来のＡｄｈＥ（ＮＣＢＩ－ＰｒｏｔｅｉｎＩＤ：ＮＰ＿４１５７５７、配列番号５）が挙げられ、ＡｄｈＥをコードする遺伝子の具体例として配列番号６の核酸配列が挙げられる。

[0039] 本発明で乳酸またはエタノール生成反応を低下させる方法は特に限定されないが、例えば、前述の乳酸デヒドロゲナーゼまたはアルコールデヒドロゲナーゼの機能を低下させる方法が挙げられる。乳酸デヒドロゲナーゼまたはアルコールデヒドロゲナーゼの機能を低下させる方法は特に限定されないが、例えば、当該酵素をコードする遺伝子の欠失、機能喪失変異、または発現抑制が挙げられ、当該酵素をコードする遺伝子の欠失または発現抑制が好ましい。機能を低下させる乳酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子としては、ｌｄｈＡ遺伝子が好ましく、機能を低下させるアルコールデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子としては、ａｄｈＥ遺伝子が好ましい。

[0040] 本発明において、遺伝子の欠失または機能喪失変異方法は特に限定されないが、例えば、遺伝子変異剤、紫外線照射などによる遺伝子変異処理、部位特異的変異法等による核酸配列の一部や全部の欠失処理、核酸配列へのフレ

ームシフト変異の導入、塩基配列へのストップコドンの挿入等により行うことができる。また、遺伝子組換え技術を用いて、核酸配列の全部または一部を除去すること、または他の核酸配列と置換することで機能を喪失させることができる。これらの中で核酸配列の一部もしくは全体を欠失させる方法が好ましい。

[0041] また、本発明では３－オキソアジピル－ＣｏＡを還元して３－ヒドロキシアジピル－ＣｏＡを生成する反応を強化することが好ましい。３－オキソアジピル－ＣｏＡを還元して３－ヒドロキシアジピル－ＣｏＡを生成する反応を強化するとは、例えば、本反応を触媒する酵素の発現量を増加することが挙げられる。発現量を増加する方法としては、例えば、本酵素遺伝子を宿主微生物の菌体外から菌体内へと導入したり、当該遺伝子のコピー数を増加させたり、当該遺伝子のコーディング領域上流のプロモーター領域やリボソーム結合配列を改変させたりする方法などが挙げられる。これらの方法は単独で行ってもよいし、組み合わせてもよいが、ＷＯ２０１９／１０７５１６号に記載される方法により本酵素遺伝子を宿主微生物の菌体外から菌体内へ導入することが好ましい。

[0042] ３－オキソアジピル－ＣｏＡを還元して３－ヒドロキシアジピル－ＣｏＡを生成する反応を触媒する３－オキソアジピル－ＣｏＡレダクターゼの具体例としては、３－ヒドロキシアシル－ＣｏＡデヒドロゲナーゼとしてＥＣ１．１．１．３５に分類される酵素、３－ヒドロキシブチリル－ＣｏＡデヒドロゲナーゼとしてＥＣ１．１．１．１５７に分類される酵素、ならびにＷＯ２０１９／１０７５１６号に記載の配列番号１～６および２１３のいずれかのアミノ酸配列に対して７０％以上、好ましくは８０％以上、さらに好ましくは９０％以上、さらに好ましくは９５％以上、さらに好ましくは９７％以上、さらに好ましくは９９％以上の配列同一性を有し、かつ、３－オキソアジピル－ＣｏＡレダクターゼ活性を有する酵素などが挙げられる。具体例として、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ｐｕｔｉｄａ ＫＴ２４４０株由来のＰａａＨ（ＮＣＢＩ－ＰｒｏｔｅｉｎＩＤ：ＮＰ＿７４５４２５．１）、Ｅｓｃ

herichia coli str. K－12 substr. MG1655株由来のPaaH（NCBI－ProteinID：NP＿415913．1）、Acinetobacter baylyi ADP1株由来のDcaH（NCBI－ProteinID：CAG68533．1）、Serratia plymuthica NBRC102599株由来のPaaH（NCBI－ProteinID：WP＿063197120）、Serratia marcescens ATCC13880株由来のポリペプチド（NCBI－ProteinID：KFD11732．1）が挙げられる。なお、WO2019／107516号に記載された配列番号1～6及び213のポリペプチドのアミノ酸配列並びにそれらをコードする塩基配列を、それぞれ、配列番号51～56および57、並びに配列番号17、58～62および63に示す。

[0043] 本発明で「配列同一性」とは、2つのアミノ酸配列または塩基配列にギャップを導入して、またはギャップを導入しないで整列させた場合の、最適なアライメントにおいて、オーバーラップする全アミノ酸配列（翻訳開始点となるアミノ酸を含む）または塩基配列（開始コドンを含む）に対する同一アミノ酸または塩基の割合（パーセンテージ）を意味し、式（1）によって算出する。式（1）において、比較する短い方の配列長は400アミノ酸以上であり、400アミノ酸未満の場合には配列同一性は定義されない。配列同一性は、この分野で汎用されているアルゴリズムであるBLAST（Basic Local Alignment Search Tool）を用いて容易に調べることができる。例えばBLASTは、NCBI（National Center for Biotechnology Information）やKEGG（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes）などのウェブサイトから誰でも利用可能であり、デフォルトのパラメーターを用いて容易に配列同一性を調べることができる。また、配列同一性はGenetyxなどのソフトウェアに搭載されている同様の機能を用いても調べることができる。

配列同一性（％）＝一致数（ギャップ同士はカウントしない）／短い方の配列長（両端のギャップを含まない長さ）×１００・・・式（１）

[0044] ３－ヒドロキシアジピン酸を製造する能力を元来有する微生物としては、以下の微生物が挙げられる。

[0045] Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｆｅｒｇｕｓｏｎｉｉ、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉなどのＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ属。

Ｓｅｒｒａｔｉａ ｇｒｉｍｅｓｉｉ、Ｓｅｒｒａｔｉａ ｆｉｃａｒｉａ、Ｓｅｒｒａｔｉａ ｆｏｎｔｉｃｏｉａ、Ｓｅｒｒａｔｉａ ｏｄｏｒｉｆｅｒａ、Ｓｅｒｒａｔｉａ ｐｌｙｍｕｔｈｉｃａ、Ｓｅｒｒａｔｉａ ｅｎｔｏｍｏｐｈｉｌａまたはＳｅｒｒａｔｉａ ｎｅｍａｔｏｄｉｐｈｉｌａなどのＳｅｒｒａｔｉａ属。

Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ｃｈｌｏｒｏｒａｐｈｉｓ、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ｐｕｔｉｄａ、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ａｚｏｔｏｆｏｒｍａｎｓ、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ｃｈｌｏｒｏｒａｐｈｉｓ ｓｕｂｓｐ．ａｕｒｅｏｆａｃｉｅｎｓなどのＰｓｕｅｄｏｍｏｎａｓ属。

Ｈａｆｎｉａ ａｌｖｅｉなどのＨａｆｎｉａ属。

Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ ａｃｅｔｏａｃｉｄｏｐｈｉｌｕｍ、Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ ａｃｅｔｏｇｌｕｔａｍｉｃｕｍ、Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ ａｍｍｏｎｉａｇｅｎｅｓ、Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｇｌｕｔａｍｉｃｕｍなどのＣｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ属。

Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｂａｄｉｕｓ、Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｍｅｇａｔｅｒｉｕｍ、Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｒｏｓｅｕｓなどのＢａｃｉｌｌｕｓ属。

Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ ｖｉｎａｃｅｕｓ、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ ｋａｒｎａｔａｋｅｎｓｉｓ、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ ｏｌｉｖａｃｅｕｓなどのＳｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ属。

Ｃｕｐｒｉａｖｉｄｕｓ ｍｅｔａｌｌｉｄｕｒａｎｓ、Ｃｕｐｒｉａｖｉｄｕｓ ｎｅｃａｔｏｒ、Ｃｕｐｒｉａｖｉｄｕｓ ｏｘａｌａｔｉｃｕ

ｓなどのＣｕｐｒｉａｖｉｄｕｓ属。

Ａｃｉｎｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｂａｙｌｙｉ、Ａｃｉｎｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｒａｄｉｏｒｅｓｌｓｔｅｎｓなどのＡｃｉｎｅｔｏｂａｃｔｅｒ属。

Ａｌｃａｌｉｇｅｎｅｓ ｆａｅｃａｌｉｓなどのＡｌｃａｌｉｇｅｎｅｓ属。

Ｎｏｃａｒｄｉｏｉｄｅｓ ａｌｂｕｓなどのＮｏｃａｒｄｉｏｉｄｅｓ属。

Ｂｒｅｖｉｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｉｏｄｉｎｕｍなどのＢｒｅｖｉｂａｃｔｅｒｉｕｍ属。

Ｄｅｌｆｔｉａ ａｃｉｄｏｖｏｒａｎｓなどのＤｅｌｆｔｉａ属。

Ｓｈｉｍｗｅｌｌｉａ ｂｌａｔｔａｅなどのＳｈｉｍｗｅｌｌｉａ属。

Ａｅｒｏｂａｃｔｅｒ ｃｌｏａｃａｅなどのＡｅｒｏｂａｃｔｅｒ属。

Ｒｈｉｚｏｂｉｕｍ ｒａｄｉｏｂａｃｔｅｒなどのＲｈｉｚｏｂｉｕｍ属。

[0046] 前記３－ヒドロキシアジピン酸を製造する能力を元来有する微生物の中でも、本発明では、ホスホケトラーゼ経路による糖代謝をしない微生物であるＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ属、Ｓｅｒｒａｔｉａ属、Ｈａｆｎｉａ属、Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ属、Ｂｒｅｖｉｂａｃｔｅｒｉｕｍ属、Ｓｈｉｍｗｅｌｌｉａ属、Ａｅｒｏｂａｃｔｅｒ属が好ましく、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ属またはＳｅｒｒａｔｉａ属に属する微生物がより好ましく利用される。

[0047] α－ヒドロムコン酸を製造する能力を元来有すると推定される微生物としては、以下の微生物が挙げられる。

[0048] Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｆｅｒｇｕｓｏｎｉｉ、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉなどのＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ属。

Ｓｅｒｒａｔｉａ ｇｒｉｍｅｓｉｉ、Ｓｅｒｒａｔｉａ ｆｉｃａｒｉａ、Ｓｅｒｒａｔｉａ ｆｏｎｔｉｃｏｌａ、Ｓｅｒｒａｔｉａ ｏｄｏｒｉｆｅｒａ、Ｓｅｒｒａｔｉａ ｐｌｙｍｕｔｈｉｃａ、Ｓｅｒｒａｔｉａ

ｅｎｔｏｍｏｐｈｉｌａまたはＳｅｒｒａｔｉａ ｎｅｍａｔｏｄｉｐｈｉｌａなどのＳｅｒｒａｔｉａ属。

Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｓ、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ｐｕｔｉｄａ、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ａｚｏｔｏｆｏｒｍａｎｓ、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ｃｈｌｏｒｏｒａｐｈｉｓ ｓｕｂｓｐ．ａｕｒｅｏｆａｃｉｅｎｓなどのＰｓｕｅｄｏｍｏｎａｓ属。

Ｈａｆｎｉａ ａｌｖｅｉなどのＨａｆｎｉａ属。

Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｂａｄｉｕｓなどのＢａｃｉｌｌｕｓ属。

Ｃｕｐｒｉａｖｉｄｕｓ ｍｅｔａｌｌｉｄｕｒａｎｓ、Ｃｕｐｒｉａｖｉｄｕｓ ｎｕｍａｚｕｅｎｓｉｓ、Ｃｕｐｒｉａｖｉｄｕｓ ｏｘａｌａｔｉｃｕｓなどのＣｕｐｒｉａｖｉｄｕｓ属。

Ａｃｉｎｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｂａｙｌｙｉ、Ａｃｉｎｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｒａｄｉｏｒｅｓｉｓｔｅｎｓなどのＡｃｉｎｅｔｏｂａｃｔｅｒ属。

Ａｌｃａｌｉｇｅｎｅｓ ｆａｅｃａｌｉｓなどのＡｌｃａｌｉｇｅｎｅｓ属。

Ｄｅｌｆｔｉａ ａｃｉｄｏｖｏｒａｎｓなどのＤｅｌｆｔｉａ属。

Ｓｈｉｍｗｅｌｌｉａ ｂｌａｔｔａｅなどのＳｈｉｍｗｅｌｌｉａ属。

[0049] 本発明の遺伝子改変微生物が、３－ヒドロキシアジピン酸を製造する能力を元来有していない場合には、反応Ａ、Ｂ、Ｅを触媒する酵素をコードする核酸を適当に組み合わせて微生物に導入することで、これらの製造能を付与することができる。α－ヒドロムコン酸を製造する能力を元来有していない場合には、反応Ａ、Ｂ、Ｃ、Ｆを触媒する酵素をコードする核酸を適当に組み合わせて微生物に導入することで、これらの製造能を付与することができる。また、アジピン酸を製造する能力を元来有していない場合には、反応Ａ、Ｂ、Ｃ、Ｄ、Ｇを触媒する酵素をコードする核酸を適当に組み合わせて微生物に導入することで、これらの製造能を付与することができる。

[0050] 本発明で遺伝子改変微生物を得るための宿主として用いることができる微生物は、遺伝子改変が可能な微生物であれば特に制限はなく、３－ヒドロキ

シアジピン酸、α－ヒドロムコン酸および／またはアジピン酸を製造する能力を有する微生物であってもそうでない微生物であってもよいが、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ属、Ｓｅｒｒａｔｉａ属、Ｈａｆｎｉａ属、Ｐｓｕｅｄｏｍｏｎａｓ属、Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ属、Ｂａｃｉｌｌｕｓ属、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ属、Ｃｕｐｒｉａｖｉｄｕｓ属、Ａｃｉｎｅｔｏｂａｃｔｅｒ属、Ａｌｃａｌｉｇｅｎｅｓ属、Ｂｒｅｖｉｂａｃｔｅｒｉｕｍ属、Ｄｅｌｆｔｉａ属、Ｓｈｉｍｗｅｌｌｉａ属、Ａｅｒｏｂａｃｔｅｒ属、Ｒｈｉｚｏｂｉｕｍ属、Ｔｈｅｒｍｏｂｉｆｉｄａ属、Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ属、Ｓｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ属、Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ属、Ｐｉｃｈｉａ属およびＣａｎｄｉｄａ属に属する微生物が好ましく、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ属、Ｓｅｒｒａｔｉａ属、Ｈａｆｎｉａ属、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ属に属する微生物がより好ましく、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ属またはＳｅｒｒａｔｉａ属に属する微生物が特に好ましい。

[0051] 本発明の遺伝子改変微生物は、アセチル－ＣｏＡまたはピルビン酸から酢酸を生成する反応経路を維持していることが好ましい。これは、例えば、酢酸の生成反応を触媒するいずれかの酵素をコードする遺伝子を保有し、当該酵素の機能が維持されていることにより達成することができる。酢酸の生成反応を触媒する酵素としては、アセチル－ＣｏＡとリン酸からアセチルリン酸とＣｏＡを生成する反応を触媒するリン酸アセチルトランスフェラーゼ（ＥＣ　２．３．１．８）とアセチルリン酸から酢酸を生成する反応を触媒する酢酸キナーゼ（ＥＣ　２．７．２．１）、ピルビン酸から酢酸と二酸化炭素を生成する反応を触媒するピルビン酸デヒドロゲナーゼ（ＥＣ　１．２．５．１）などが挙げられる。

[0052] 本発明の遺伝子改変微生物を創出するために遺伝子を導入する方法は特に限定されず、微生物内で自律複製可能な発現ベクターに当該遺伝子を組み込み、宿主微生物に導入する方法や、微生物のゲノムに当該遺伝子を組み込む方法などを用いることができる。

[0053] 導入する遺伝子は１種類でも複数種類でもよい。また遺伝子の導入と発現

の増強を組み合わせてもよい。

[0054] 本発明で発現させる遺伝子または遺伝子の発現抑制に用いる核酸断片を発現ベクターまたは宿主微生物ゲノムに組み込む場合、当該発現ベクターまたはゲノム組み込み用核酸はプロモーター、リボソーム結合配列、発現させる遺伝子または核酸断片、転写終結配列により構成されていることが好ましい。また、プロモーター活性を制御する遺伝子が含まれていてもよい。

[0055] 本発明で用いるプロモーターは、宿主微生物内で遺伝子を発現させられるものであれば特に限定されないが、例えばｇａｐプロモーター、ｔｒｐプロモーター、ｌａｃプロモーター、ｔａｃプロモーター、Ｔ７プロモーター、λプロモーター（ＰＬまたはＰＲ）などが挙げられる。

[0056] 本発明で発現ベクターを用いて遺伝子の導入や、遺伝子の発現の増強を行う場合は、当該微生物中で自律複製可能であれば特に限定されないが、例えばｐＢＢＲ１ＭＣＳベクター、ｐＢＲ３２２ベクター、ｐＭＷベクター、ｐＥＴベクター、ｐＲＳＦベクター、ｐＣＤＦベクター、ｐＡＣＹＣベクター、および上述のベクターの派生型などが挙げられる。

[0057] 本発明でゲノム組み込み用核酸を用いて遺伝子の導入や、遺伝子の発現の増強を行う場合は、部位特異的相同組換えを用いて導入する。部位相同組換えの方法は特に限定されないが、例えばλ　Ｒｅｄ　レコンビナーゼおよびＦＬＰレコンビナーゼを用いる方法（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ．２０００，９７（１２），６６４０－６６４５．）、λ　ＲｅｄレコンビナーゼおよびｓａｃＢ遺伝子を用いる方法（Ｂｉｏｓｃｉ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．２００７，７１（１２），２９０５－２９１１．）が挙げられる。

[0058] 発現ベクターまたはゲノム組み込み用核酸の導入方法は、微生物に核酸を導入する方法であれば特に限定されないが、例えばカルシウムイオン法（Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９７０，５３，１５９－１６２．）、エレクトロポレーション法（Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ，１９８８，１７０，２７９６－２８０１．）などが挙げられる。

[0059] 本発明の遺伝子改変微生物による３ＨＡ、ＨＭＡおよび／またはＡＤＡの製造方法において、酢酸に対する３ＨＡの生産比率は式（２）に従って算出する。酢酸に対するＨＭＡの生産比率または酢酸に対するＡＤＡの生産比率は、式（２）の３ＨＡをＨＭＡまたはＡＤＡに置き換えることで算出する。

[0060] 酢酸に対する３ＨＡの生産比率＝３ＨＡ生産量（ｇ／Ｌ）／酢酸生産量（ｇ／Ｌ）・・・式（２）。

[0061] 本発明の遺伝子改変微生物は、通常の微生物が利用し得る炭素源を発酵原料として含有する培地、好ましくは液体培地中において培養する。当該遺伝子改変微生物が利用し得る炭素源の他には、窒素源、無機塩および必要に応じてアミノ酸やビタミンなどの有機微量栄養素を程よく含有した培地を用いる。上記栄養源を含有していれば天然培地、合成培地のいずれでも利用できる。

[0062] 発酵原料とは、当該遺伝子改変微生物が代謝し得る原料である。「代謝」とは、微生物が細胞外から取り入れた、あるいは細胞内で別の化学化合物より生じたある化学化合物が、酵素反応により別の化学化合物へと変換されることを指す。炭素源としては、糖類を好ましく用いることができる。糖類の具体例としては、グルコース、フルクトース、ガラクトース、マンノース、キシロース、アラビノース等の単糖類、これら単糖類が結合したシュクロース等の二糖類、多糖類、およびこれらを含有する澱粉糖化液、糖蜜、セルロース含有バイオマス糖化液などが挙げられる。

[0063] 上記に挙げた炭素源は、一種類のみ用いてもよいし、組み合わせて用いてもよいが、特にグルコースを含む培地で培養することが好ましい。炭素源の添加において、培地中の炭素源の濃度は、特に限定されず、炭素源の種類などに応じて適宜設定することができる。グルコースの好ましい濃度は、５～３００ｇ／Ｌである。

[0064] 当該遺伝子改変微生物の培養に用いる窒素源としては、例えば、アンモニアガス、アンモニア水、アンモニウム塩類、尿素、硝酸塩類、その他補助的に使用される有機窒素源、例えば、油粕類、大豆加水分解液、カゼイン分解

物、その他のアミノ酸、ビタミン類、コーンスティープリカー、酵母または酵母エキス、肉エキス、ペプトン等のペプチド類、各種発酵菌体およびその加水分解物などが使用できる。培地中の窒素源の濃度は、特に限定されないが、好ましくは、０．１～５０ｇ／Ｌである。

[0065] 当該遺伝子改変微生物の培養に用いる無機塩類としては、例えば、リン酸塩、マグネシウム塩、カルシウム塩、鉄塩およびマンガン塩等を適宜添加使用することができる。

[0066] ３－ヒドロキシアジピン酸、α－ヒドロムコン酸および／またはアジピン酸を生産するための遺伝子改変微生物の培養条件は、前記成分組成の培地、培養温度、撹拌速度、ｐＨ、通気量、植菌量などを、当該遺伝子改変微生物の種類および外部条件などに応じて、適宜調節あるいは選択して設定する。

[0067] 培養におけるｐＨの範囲は当該遺伝子改変微生物が生育することができれば特に制限はないが、好ましくはｐＨ５～８、より好ましくはｐＨ５．５～７．０である。

[0068] 培養における通気条件の範囲は３－ヒドロキシアジピン酸、α－ヒドロムコン酸および／またはアジピン酸を生産することができれば特に制限はないが、当該微生物変異体を良好に生育させるために、少なくとも培養開始時において培養容器内の気相および／または液相に酸素が残存していることが好ましい。

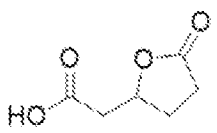
[0069] 液体培養において発泡がある場合には、鉱油、シリコーン油および界面活性剤などの消泡剤を適宜培地に配合することができる。

[0070] 前記微生物の培養物中に、３－ヒドロキシアジピン酸、α－ヒドロムコン酸および／またはアジピン酸が回収可能な量まで生産された後、生産された当該生産物を回収することができる。生産された当該生産物の回収、例えば単離は、蓄積量が適度に高まった時点で培養を停止し、その培養物から、発酵生産物を採取する一般的な方法に準じて行うことができる。具体的には、遠心分離、ろ過などにより菌体を分離したのち、カラムクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、活性炭処理、結晶化、膜分離、蒸留など

により、当該生産物を培養物から単離することができる。より具体的には、当該生産物の塩に酸成分を添加して析出物を回収する方法、培養物を逆浸透膜やエバポレーターなどを用いた濃縮操作により水を除去して当該生産物の濃度を高めた後、冷却結晶化や断熱結晶化により当該生産物および／または当該生産物の塩の結晶を析出させ、遠心分離やろ過などにより当該生産物および／または当該生産物の塩の結晶を得る方法、培養物にアルコールを添加して当該生産物をエステルとした後、蒸留操作により当該生産物のエステルを回収後、加水分解により当該生産物を得る方法等を挙げることができるがこれらに限定されるものではない。また、これらの回収方法は生成物の物性などにより適当に選択して最適化することができる。

[0071] 本発明で得られるα－ヒドロムコン酸を、水素化触媒の存在下、水素と反応（水素化）させることにより、アジピン酸を製造することができる。また、３－ヒドロキシアジピン酸発酵液からのアジピン酸の製造方法は、ＷＯ２０２１／０６０３３５号に詳述されている。また、３－ヒドロキシアジピン酸を水に溶解させ、ｐＨを４以下に調整することにより、３－ヒドロキシアジピン酸－３，６－ラクトン（３－ｈｙｄｒｏｘｙａｄｉｐｉｃ　ａｃｉｄ－３，６－ｌａｃｔｏｎｅ）を調製することができる。３－ヒドロキシアジピン酸から３－ヒドロキシアジピン酸－３，６－ラクトンを調製する方法は、ＷＯ２０２２／１９１３１４号に詳述されている。３－ヒドロキシアジピン酸－３，６－ラクトンを、水系溶媒中、水素化触媒の存在下、水素と反応（水素化）させることにより、アジピン酸を製造することができる。

[0072] [化3]



3-Hydroxyadipic acid-3,6-lactone

[0073] 水素化触媒は、遷移金属元素を含んでいることが好ましく、具体的には、パラジウム、白金、ルテニウム、ロジウム、レニウム、ニッケル、コバルト、鉄、イリジウム、オスミウム、銅およびクロムからなる群から選ばれる１

種または２種以上を含んでいることが好ましく、パラジウム、白金、ニッケル、コバルト、鉄、銅およびクロムからなる群から選ばれる１種または２種以上を含んでいることがより好ましい。

[0074] 水素化触媒は、使用する金属量が節約できる、触媒の活性表面が増加する等の観点から、担体に担持して使用することが好ましい。水素化触媒の担体への担持は、含浸法、析出沈殿法、気相担持法など公知の方法により行うことができる。担体としては、炭素、高分子、金属酸化物、金属硫化物、ゼオライト、粘土、ヘテロポリ酸、固体リン酸、ハイドロキシアパタイトなどが挙げられる。

[0075] α－ヒドロムコン酸および／または３－ヒドロキシアジピン酸－３，６－ラクトンと反応させる水素は、反応器に一括添加しても逐次添加してもよい。水素の分圧は特に制限されないが、低すぎると反応時間が長くなる一方、水素の分圧が高すぎると設備安全上望ましくないため、常温で０．１ＭＰａ以上１０ＭＰａ以下（ゲージ圧）が好ましく、より好ましくは０．３ＭＰａ以上５ＭＰａ以下（ゲージ圧）、さらに好ましくは０．５ＭＰａ以上３ＭＰａ以下（ゲージ圧）である。

[0076] 反応形式は、バッチ式槽型反応器、半バッチ式槽型反応器、連続式槽型反応器、連続式管型反応器、トリクルベッド式管状反応器のいずれの反応器を用いる反応形式でもよい。固体の水素化触媒を用いる場合、懸濁床式、固定床式、移動床式、流動床式のいずれの方式でも反応を実施することができる。

[0077] 水素化の反応温度は、特に制限されないが、低すぎると反応速度が遅くなり、反応温度が高すぎるとエネルギー消費量が多くなるため好ましくない。このような観点から、反応温度は１００～３５０℃であることが好ましく、１２０～３００℃であることがより好ましく、１３０～２８０℃であることがさらに好ましく、１４０～２５０℃であることがさらに好ましく、１５０～２３０℃であることがさらに好ましく、１６０～２２０℃であることがさらに好ましい。

[0078] 反応器中の雰囲気は、水素の他に、窒素、ヘリウム、アルゴン等の不活性ガスが共存していてもよいが、水素化触媒の劣化および爆鳴気の生成につながるため、酸素濃度は５体積％以下であることが好ましい。また、α－ヒドロムコン酸および／または３－ヒドロキシアジピン酸－３，６－ラクトンならびにアジピン酸の安定性の観点から、α－ヒドロムコン酸および／または３－ヒドロキシアジピン酸－３，６－ラクトン原料に対するアンモニア量が５重量％以下であることが好ましく、３重量％以下であることがより好ましく、０重量％（すなわち、アンモニア非存在下での反応）であることがさらに好ましい。

[0079] α－ヒドロムコン酸および／または３－ヒドロキシアジピン酸－３，６－ラクトンの水素化は、溶媒存在下で行うことが好ましい。

[0080] 水素化の溶媒としては、メタノール、エタノール、ｎ－プロパノール、イソプロパノール、ｎ－ブタノール、イソブタノール、ｔｅｒｔ－ブタノール、ペンタン、ヘキサン、シクロヘキサン、ヘプタン、オクタン、デカン、ジメチルエーテル、ジエチルエーテル、１，２－ジメトキシエタン、ジグリム、テトラヒドロフラン、ジオキサン、酢酸メチル、酢酸エチル、酢酸ｎ－プロピル、酢酸ｎ－ブチル、γ－ブチロラクトン、Ｎ－メチルピロリドン、ジメチルスルホキシド、水系溶媒などが使用でき、これらのうち２種類以上の混合溶媒を用いてもよいが、経済性や環境性の観点から水系溶媒を用いることが好ましい。

[0081] 本発明において、水系溶媒とは、水または水を主体として水混和性有機溶媒を混合させている混合溶媒を意味する。「水を主体として」とは混合溶媒中の水の割合が５０体積％超、好ましくは７０体積％以上、さらに好ましくは９０体積％以上であることを意味する。

[0082] 水混和性有機溶媒としては、メタノール、エタノール、ｎ－プロパノール、イソプロパノール、ｎ－ブタノール、イソブタノール、ｔｅｒｔ－ブタノール、１，２－ジメトキシエタン、ジグリム、テトラヒドロフラン、ジオキサン、γ－ブチロラクトン、Ｎ－メチルピロリドン、ジメチルスルホキシド

、ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド、アセトンなどが挙げられる。

[0083] 水系溶媒のｐＨは特に制限されないが、触媒劣化の抑制、副生成物の生成抑制、反応装置への腐食性等を考慮すると、ｐＨ２～１３であることが好ましく、ｐＨ３～１１であることがより好ましく、ｐＨ４～１０であることがさらに好ましい。

[0084] １級アルコール並びに２級アルコールを除く溶媒を水素化の溶媒とする場合、α－ヒドロムコン酸および／または３－ヒドロキシアジピン酸－３，６－ラクトンのカルボン酸、カルボン酸塩、カルボン酸エステルから、それぞれ対応するアジピン酸、アジピン酸塩、アジピン酸エステルが生成する。メタノール、エタノール、ｎ－プロパノール、イソプロパノール、ｎ－ブタノール、イソブタノール等の１級アルコールまたは２級アルコールを含む溶媒を水素化の溶媒とする場合、反応後には、アジピン酸、アジピン酸塩、アジピン酸モノエステル、アジピン酸ジエステルの混合物が得られる。なお、本明細書では、アジピン酸のカルボン酸、カルボン酸塩、カルボン酸エステルおよびこれらの混合物を総称して「アジピン酸」という。

[0085] 本発明で得られたアジピン酸のカルボン酸は、さらにエステル化反応に供することによりアジピン酸エステルに変換することができる。エステル化する方法は特に制限されないが、例えば酸触媒、縮合剤を用いたカルボン酸とアルコールの脱水縮合、ジアゾメタンやハロゲン化アルキルなどのアルキル化試薬を用いる方法などが挙げられる。

[0086] 本発明で得られたアジピン酸は、遠心分離、濾過、膜濾過、蒸留、抽出、晶析、乾燥など通常の単位操作により分離・精製することができる。

[0087] 本発明で得られたアジピン酸から公知の方法（例えば、特公昭６１－２４５５５号公報）により、アジポニトリルを製造することができる。得られたアジポニトリルを公知の方法（例えば、特表２０００－５０８３０５号公報）により水素化することでヘキサメチレンジアミンを製造することができる。

[0088] 本発明で得られたアジピン酸を公知の方法（例えば、福本修編、「ポリアミド樹脂ハンドブック」日刊工業出版社（１９９８年１月）参照）で、ジアミンと重縮合することにより、ポリアミドを製造することができる。具体的には、ジアミンとして、１，４－ジアミノブタン、１，５－ペンタンジアミン、ヘキサメチレンジアミンを用いることにより、それぞれ、ポリアミド４６、ポリアミド５６、ポリアミド６６を製造することができる。

[0089] ポリアミドを公知の方法（例えば、国際公開２０１９／２０８４２７号）により加工し、ポリアミド繊維を製造することができる。かくして得られるポリアミド繊維は、インナーウエア、スポーツウエア、カジュアルウェア等の衣料用途やエアバッグ、タイヤコード等の産業資材用途に用いることができる。

[0090] また、ポリアミドを公知の方法（例えば、国際公開２０２１／００６２５７号）により成形加工し、ポリアミド成形品を製造することができる。かくして得られるポリアミド成形品は、自動車部品、電気部品、電子部品、建築部材、各種容器、日用品、生活雑貨および衛生用品等に用いることができる。

実施例

[0091] 参考例１　　アセチル－ＣｏＡおよびスクシニル－ＣｏＡから３ＯＡ－ＣｏＡおよび補酵素Ａを生成する反応（反応Ａ）、３ＯＡ－ＣｏＡから３ＨＡ－ＣｏＡを生成する反応（反応Ｂ）、３ＨＡ－ＣｏＡから３－ヒドロキシアジピン酸を生成する反応（反応Ｅ）、ＨＭＡ－ＣｏＡからα－ヒドロムコン酸を生成する反応（反応Ｆ）、および、ＡＤＡ－ＣｏＡからアジピン酸を生成する反応（反応Ｇ）を触媒する酵素を発現するプラスミドの作製

大腸菌内で自律複製可能なベクターｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２（ＭＥ　Ｋｏｖａｃｈ，（１９９５），Ｇｅｎｅ　１６６：１７５－１７６）をＸｈｏＩで切断し、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２／ＸｈｏＩを得た。当該ベクターに構成的な発現プロモーターを組み込むために、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ｓｔｒ．Ｋ－１２　ｓｕｂｓｔｒ．ＭＧ１６５５のゲノムＤＮＡを鋳型とし

ＴｇａｐＡ（ＮＣＢＩ－ＧｅｎｅＩＤ： ＮＣ＿０００９１３．３）の上流域２００ｂ（配列番号７）をＰＣＲ増幅するためのプライマーを設計し（配列番号８、９）、常法に従ってＰＣＲ反応を行った。得られた断片およびｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２／ＸｈｏＩを、“Ｉｎ－Ｆｕｓｉｏｎ ＨＤ Ｃｌｏｎｉｎｇ Ｋｉｔ”（タカラバイオ株式会社製）を用いて連結し、大腸菌株ＤＨ５αに導入した。得られた組換え大腸菌株から当該プラスミドを抽出し、常法により塩基配列を確認したプラスミドをｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：Ｐｇａｐとした。続いてｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＰｇａｐをＳｃａＩで切断し、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：Ｐｇａｐ／ＳｃａＩを得た。反応Ａを触媒する酵素をコードする遺伝子を増幅するために、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ｐｕｔｉｄａ ＫＴ２４４０株のゲノムＤＮＡを鋳型としてアシルトランスフェラーゼ遺伝子ｐｃａＦ（ＮＣＢＩ－ＧｅｎｅＩＤ：１０４１７５５、配列番号１０）の全長をＰＣＲ増幅するためのプライマーを設計し（配列番号１１、１２）、常法に従ってＰＣＲ反応を行った。得られた断片およびｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：Ｐｇａｐ／ＳｃａＩを、“Ｉｎ－Ｆｕｓｉｏｎ ＨＤ Ｃｌｏｎｉｎｇ Ｋｉｔ”を用いて連結し、大腸菌株ＤＨ５αに導入した。得られた組換え株から当該プラスミドを抽出し、常法により塩基配列を確認したプラスミドをｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴとした。続いてｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴをＨｐａＩで切断し、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴ／ＨｐａＩを得た。反応Ｄおよび反応Ｅを触媒する酵素をコードする遺伝子を増幅するために、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ｐｕｔｉｄａ ＫＴ２４４０株のゲノムＤＮＡを鋳型としてＣｏＡトランスフェラーゼ遺伝子ｐｃａＩおよびｐｃａＪ（ＮＣＢＩ－ＧｅｎｅＩＤ：１０４６６１３、１０４６６１２、配列番号１３、１４）の全長を含む連続した配列をＰＣＲ増幅するためのプライマーを設計し（配列番号１５、１６）、常法に従ってＰＣＲ反応を行った。得られた断片およびｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴ／ＨｐａＩを、“Ｉｎ－Ｆｕｓｉｏｎ ＨＤ Ｃｌｏｎｉｎｇ Ｋｉｔ”を用いて連結し、大腸菌株ＤＨ５αに導入した。得られた組換え株から当該プラスミドを抽出し、常

法により塩基配列を確認したプラスミドをｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴとした。

[0092] ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴをＳｃａＩで切断し、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴ／ＳｃａＩを得た。反応Ｂを触媒する酵素をコードする遺伝子を増幅するために、Ｓｅｒｒａｔｉａ ｍａｒｃｅｓｃｅｎｓ ＡＴＣＣ１３８８０株のゲノムＤＮＡを鋳型として、配列番号１７に記載の核酸を増幅するためのプライマーを設計し（配列番号１８、１９）、常法に従ってＰＣＲ反応を行った。得られた断片およびｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴ／ＳｃａＩを、“Ｉｎ－Ｆｕｓｉｏｎ ＨＤ Ｃｌｏｎｉｎｇ Ｋｉｔ”（タカラバイオ株式会社製）を用いて連結し、大腸菌株ＤＨ５αに導入した。得られた組換え株から当該プラスミドを抽出し、常法により塩基配列を確認したプラスミドをｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲとした。

[0093] 参考例２ 遺伝子発現抑制用のテンプレートプラスミドの作製

遺伝子発現抑制にはＮａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２０１３，３１（２），１７０－１７６．に記載の方法を用いた。遺伝子発現抑制用のテンプレートプラスミドとして、遺伝子の相補鎖となる２４塩基の核酸を挿入するため、ＮｃｏＩ制限酵素処理サイトを導入した核酸断片（配列番号２０）を遺伝子合成した（アゼンタ株式会社製）。大腸菌内で自律複製可能なベクターｐＣＤＦ－１ｂをＸｂａＩとＢａｍＨＩで切断し、ｐＣＤＦ－１ｂ／ＸｂａＩ，ＢａｍＨＩを得た。当該ベクターに遺伝子抑制用の核酸断片を組み込むために、遺伝子抑制用の核酸断片をＰＣＲ増幅するためのプライマーを設計し（配列番号２１、２２）、常法に従ってＰＣＲ反応を行った。得られた断片およびｐＣＤＦ－１ｂ／Ｘｂａｌ，ＢａｍＨＩを“Ｉｎ－Ｆｕｓｉｏｎ ＨＤ Ｃｌｏｎｉｎｇ Ｋｉｔ”（タカラバイオ株式会社製）を用いて連結し、大腸菌株ＤＨ５αに導入した。得られた組換え株から当該プラスミドを抽出し、常法により塩基配列を確認したプラスミドをｐＣＤＦ－１ｂ：：ｔｅｍｐとした。

[0094] 参考例３ ｉｃＩＲ遺伝子発現抑制用プラスミドの作製

ｐＣＤＦ－１ｂ：：ｔｅｍｐをＮｃｏＩで切断し、更にＢａｃｔｅｒｉａｌ　Ａｌｋａｌｉｎｅ　Ｐｈｏｓｐｈａｔａｓｅ脱リン酸化処理をして、ｐＣＤＦ－１ｂ：：ｔｅｍｐ／Ｎｃｏｌ，ＢＡＰを得た。当該ベクターにｉｃｌＲ遺伝子発現抑制用の核酸断片を組み込むために、ｉｃｌＲ遺伝子の開始コドンを含む２４塩基の相補鎖を含む核酸断片（配列番号２３）を遺伝子合成した（アゼンタ株式会社製）。当該断片とｐＣＤＦ－１ｂ：：ｔｅｍｐ／Ｎｃｏｌ，ＢＡＰを“Ｉｎ－Ｆｕｓｉｏｎ　ＨＤ　Ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｋｉｔ”（タカラバイオ株式会社製）を用いて連結し、大腸菌株ＤＨ５αに導入した。得られた組換え株から当該プラスミドを抽出し、常法により塩基配列を確認したプラスミドをｐＣＤＦ－１ｂ：：ｉｃｌＲｉとした。

[0095] 参考例４　　ｆａｄＲ遺伝子発現抑制用プラスミドの作製

ｐＣＤＦ－１ｂ：：ｔｅｍｐベクターにｆａｄＲ遺伝子発現抑制用の核酸断片を組み込むために、ｆａｄＲ遺伝子の開始コドンを含む２４塩基の相補鎖を含む核酸断片（配列番号２４）を遺伝子合成した（アゼンタ株式会社製）。当該断片と参考例３に記載の方法で作製したｐＣＤＦ－１ｂ：：ｔｅｍｐ／Ｎｃｏｌ，ＢＡＰを“Ｉｎ－Ｆｕｓｉｏｎ　ＨＤ　Ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｋｉｔ”（タカラバイオ株式会社製）を用いて連結し、大腸菌株ＤＨ５αに導入した。得られた組換え株から当該プラスミドを抽出し、常法により塩基配列を確認したプラスミドをｐＣＤＦ－１ｂ：：ｆａｄＲｉとした。

[0096] 参考例５　　ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲプラスミドとｐＣＤＦ－１ｂ：：ｔｅｍｐプラスミドを導入したＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ｓｔｒ．Ｋ－１２　ｓｕｂｓｔｒ．ＭＧ１６５５株の作製と培養

Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ｓｔｒ．Ｋ－１２　ｓｕｂｓｔｒ．ＭＧ１６５５株に、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲプラスミドをエレクトロポレーションで導入した。導入後、当該株をカナマイシン２５μｇ／ｍＬを含有するＬＢ寒天培地にて３７℃で培養した。得られた株に、ｐＣＤＦ－１ｂ：：ｔｅｍｐプラスミドをエレクトロポレーションで導入した。導入後、当該株をカナマイシン２５μｇ／ｍＬとストレプトマイシン５０μ

ｇ／ｍＬを含有するＬＢ寒天培地にて３７℃で培養した。

[0097] ｐＨ７に調整したカナマイシン２５μｇ／ｍＬとストレプトマイシン５０μｇ／ｍＬを含有するＬＢ培地（Ｂａｃｔｏトリプトン（Ｄｉｆｃｏ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ社製）１０ｇ／Ｌ、Ｂａｃｔｏ酵母エキス（Ｄｉｆｃｏ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ社製）５ｇ／Ｌ、塩化ナトリウム５ｇ／Ｌ）５ｍＬに、当該株を一白金耳植菌し、３０℃、１２０ｍｉｎ－１で２４時間振とう培養した。当該培養液０．０５ｍＬを試験管に入ったｐＨ６．５に調整した２５μｇ／ｍＬカナマイシンとストレプトマイシン５０μｇ／ｍＬを含有する培地Ｉ（グルコース１０ｇ／Ｌ、硫酸アンモニウム１ｇ／Ｌ、リン酸カリウム５０ｍＭ、硫酸マグネシウム０．０２５ｇ／Ｌ、硫酸鉄０．０６２５ｍｇ／Ｌ、硫酸マンガン２．７ｍｇ／Ｌ、塩化カルシウム０．３３ｍｇ／Ｌ、塩化ナトリウム１．２５ｇ／Ｌ、Ｂａｃｔｏトリプトン２．５ｇ／Ｌ、Ｂａｃｔｏ酵母エキス１．２５ｇ／Ｌ）５ｍＬに添加し、３０℃、１２０ｍｉｎ－１で２４時間振とう培養した。

[0098] 当該培養液より菌体を遠心分離した上清をＭｉｌｌｅｘ－ＧＶ（０．２２μｍ、ＰＶＤＦ、Ｍｅｒｃｋ社製）を用いて膜処理し、透過液をＨＰＬＣおよびＬＣ－ＭＳ／ＭＳにて分析した。培養上清中に蓄積した酢酸および３ＨＡの定量分析を行い、式（２）を用いて算出した酢酸に対する３ＨＡの生産比率を表１に示す。

[0099] ［ＨＰＬＣによる酢酸の定量分析条件］

ＨＰＬＣ：Ｓｈｉｍａｚｕ Ｐｒｏｍｉｎｅｎｃｅ（株式会社島津製作所製）

カラム：Ｓｈｏｄｅｘ Ｓｕｇａｒ ＳＨ１０１１（昭和電工株式会社製）、長さ３００ｍｍ、内径８ｍｍ、粒径６μｍ

移動相：０．０５Ｍ 硫酸水溶液

流速：０．６ｍＬ／ｍｉｎ

カラム温度：６５℃

検出器：ＲＩ。

[0100] ［ＬＣ－ＭＳ／ＭＳによる３ＨＡの定量分析条件］

ＨＰＬＣ：１２９０Ｉｎｆｉｎｉｔｙ（Ａｇｉｌｅｎｔ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）

カラム：Ｓｙｎｅｒｇｉ ｈｙｄｒｏ－ＲＰ（Ｐｈｅｎｏｍｅｎｅｘ社製）、長さ１００ｍｍ、内径３ｍｍ、粒径２．５μｍ

移動相：０．１％ギ酸水溶液／メタノール＝７０／３０

流速：０．３ｍＬ／分

カラム温度：４０℃

ＬＣ検出器：１２６０ＤＡＤ ＶＬ＋（２１０ｎｍ）

ＭＳ／ＭＳ：Ｔｒｉｐｌｅ－Ｑｕａｄ ＬＣ／ＭＳ（Ａｇｉｌｅｎｔ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）

イオン化方法：ＥＳＩ ネガティブモード。

[0101] 参考例６ ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲプラスミドとｐＣＤＦ－１ｂ：：ｔｅｍｐプラスミドを導入したＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ ｓｔｒ．Ｋ－１２ ｓｕｂｓｔｒ．Ｗ３１１０株の作製と培養

Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ ｓｔｒ．Ｋ－１２ ｓｕｂｓｔｒ．Ｗ３１１０株に、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲプラスミドをエレクトロポレーションで導入した。導入後、当該株をカナマイシン２５μｇ／ｍＬを含有するＬＢ寒天培地にて３７℃で培養した。得られた株に、ｐＣＤＦ－１ｂ：：ｔｅｍｐプラスミドをエレクトロポレーションで導入した。導入後、当該株をカナマイシン２５μｇ／ｍＬとストレプトマイシン５０μｇ／ｍＬを含有するＬＢ寒天培地にて３７℃で培養した。

[0102] 当該株を参考例５と同様の方法にて培養した後、参考例５と同様の方法にて培養上清中に蓄積した酢酸および３ＨＡの定量分析を行い、式（２）を用いて算出した酢酸に対する３ＨＡの生産比率を表１に示す。

[0103] 比較例１ ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲプラスミドとｐＣＤＦ－１ｂ：：ｉｃｌＲｉプラスミドを導入したＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ ｓｔｒ．Ｋ－１２ ｓｕｂｓｔｒ．ＭＧ１６５５株の作製と培養

ｉｃｌＲ遺伝子の発現を抑制したＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ ｓｔｒ．Ｋ－１２ ｓｕｂｓｔｒ．ＭＧ１６５５株を作製するために、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲプラスミドを導入したＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ ｓｔｒ．Ｋ－１２ ｓｕｂｓｔｒ．ＭＧ１６５５株に、ｐＣＤＦ－１ｂ：：ｉｃｌＲｉプラスミドをエレクトロポレーションで導入した。導入後、当該株をカナマイシン２５μｇ／ｍＬとストレプトマイシン５０μｇ／ｍＬを含有するＬＢ寒天培地にて３７℃で培養した。

[0104] 当該株を参考例５と同様の方法にて培養した後、参考例５と同様の方法にて培養上清中に蓄積した酢酸および３ＨＡの定量分析を行い、式（２）を用いて算出した酢酸に対する３ＨＡの生産比率を表１に示す。

[0105] 比較例２ ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲプラスミドとｐＣＤＦ－１ｂ：：ｔｅｍｐプラスミドを導入した、ｌｄｈＡ遺伝子欠失Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ ｓｔｒ．Ｋ－１２ ｓｕｂｓｔｒ．ＭＧ１６５５株の作製と培養

まず、乳酸デヒドロゲナーゼをコードするｌｄｈＡ遺伝子の全長を欠失したＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ ｓｔｒ．Ｋ－１２ ｓｕｂｓｔｒ．ＭＧ１６５５株を作製した。遺伝子の欠失方法は、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ．２０００，９７（１２）：６６４０-６６４５．に記載の方法に従った。Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ ｓｔｒ．Ｋ－１２ ｓｕｂｓｔｒ．ＭＧ１６５５株に、λ Ｒｅｄレコンビナーゼを発現するために必要なｐＫＤ４６プラスミドをエレクトロポレーションで導入した。導入後、当該株をアンピシリン５０μｇ／ｍＬを含有するＬＢ寒天培地にて３０℃で培養し、Ｅ．ｃｏｌｉ ＭＧ１６５５／ｐＫＤ４６株を得た。

[0106] 次に、ｌｄｈＡ遺伝子欠失用の核酸断片を遺伝子合成した（アゼンタ株式会社製）。当該核酸断片には、Ｅ．ｃｏｌｉ ＭＧ１６５５株のゲノム上でｌｄｈＡ遺伝子の上流域５００ｂ、ｓａｃＢ遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子とｌｄｈＡ遺伝子の下流域５００ｂが含まれる（配列番号２５）。遺伝子合成により入手した核酸断片をＰＣＲ増幅するためのプライマーを設計し（

配列番号２６、２７）、常法に従ってＰＣＲ反応を行った。得られた断片を、アガロースゲルを用いた電気泳動法と核酸カラム精製キットで精製し、ｌｄｈＡ遺伝子欠失株作製に使用した。Ｅ．ｃｏｌｉ　ＭＧ１６５５／ｐＫＤ４６株に、ｌｄｈＡ遺伝子の欠失用核酸断片を、エレクトロポレーションで導入した。導入後、当該株をカナマイシン２５μｇ／ｍＬを含有するＬＢ寒天培地にて３０℃で培養した。得られた組み換え株はｌｄｈＡ遺伝子配列全長が、ｓａｃＢ遺伝子とカナマイシン耐性遺伝子の全長を含む配列（ｓａｃＢ－ｋａｎ配列）で置換されたＥ．ｃｏｌｉ　ＭＧ１６５５／ｌｄｈＡ－ｓａｃＢ－ｋａｎ株である。

[0107] 次に、ｓａｃＢ－ｋａｎ配列を除去するための核酸断片を遺伝子合成した（アゼンタ株式会社製）。当該断片には、Ｅ．ｃｏｌｉ　ＭＧ１６５５株のゲノム上でｌｄｈＡ遺伝子の上流域５００ｂと下流域５００ｂが含まれる（配列番号２８）。遺伝子合成により入手した核酸断片をＰＣＲ増幅するため、配列番号２６、２７のプライマーを用いて、常法に従ってＰＣＲ反応を行った。得られた断片を、アガロースゲルを用いた電気泳動法と核酸カラム精製キットで精製し、ｓａｃＢ－ｋａｎ配列除去に使用した。Ｅ．ｃｏｌｉ　ＭＧ１６５５／ｌｄｈＡ－ｓａｃＢ－ｋａｎ株に、ｓａｃＢ－ｋａｎ配列除去用の核酸断片を、エレクトロポレーションで導入した。導入後、当該株をスクロース５０ｇ／Ｌを含有するＬＢ寒天培地にて３０℃で培養した。得られたコロニーからＬＢ寒天培地およびカナマイシン２５μｇ／ｍＬを含有するＬＢ寒天培地にて３０℃で培養し、カナマイシン耐性が無い株を選出した。得られた株はゲノム上のｌｄｈＡ遺伝子が欠失した、Ｅ．ｃｏｌｉ　ＭＧ１６５５／ｌｄｈＡ遺伝子欠失株である。

[0108] Ｅ．ｃｏｌｉ　ＭＧ１６５５／ｌｄｈＡ遺伝子欠失株にｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲプラスミドをエレクトロポレーションで導入した。導入後、当該株をカナマイシン２５μｇ／ｍＬを含有するＬＢ寒天培地にて３７℃で培養した。得られた株に、ｐＣＤＦ－１ｂ：：ｔｅｍｐプラスミドをエレクトロポレーションで導入した。導入後、当該株をカナマイシン２５μ

ｇ／ｍＬとストレプトマイシン５０μｇ／ｍＬを含有するＬＢ寒天培地にて３７℃で培養した。

[0109] 当該株を参考例５と同様の方法にて培養した後、参考例５と同様の方法にて培養上清中に蓄積した酢酸および３ＨＡの定量分析を行い、式（２）を用いて算出した酢酸に対する３ＨＡの生産比率を表１に示す。

[0110] 比較例３　ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲプラスミドとｐＣＤＦ－１ｂ：：ｔｅｍｐプラスミドを導入した、ａｄｈＥ遺伝子欠失Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ｓｔｒ．Ｋ－１２　ｓｕｂｓｔｒ．Ｗ３１１０株の作製と培養

まず、アルコールデヒドロゲナーゼをコードするａｄｈＥ遺伝子の全長を欠失したＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ｓｔｒ．Ｋ－１２　ｓｕｂｓｔｒ．Ｗ３１１０株を作製した。遺伝子の欠失方法は、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ．２０００，９７（１２）：６６４０-６６４５．に記載の方法に従った。Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ｓｔｒ．Ｋ－１２　ｓｕｂｓｔｒ．Ｗ３１１０株に、λ　Ｒｅｄレコンビナーゼを発現するために必要なｐＫＤ４６プラスミドをエレクトロポレーションで導入した。導入後、当該株をアンピシリン５０μｇ／ｍＬを含有するＬＢ寒天培地にて３０℃で培養し、Ｅ．ｃｏｌｉ　Ｗ３１１０／ｐＫＤ４６株を得た。

[0111] 次に、ａｄｈＥ遺伝子欠失用の核酸断片を遺伝子合成した（アゼンタ株式会社製）。当該核酸断片には、Ｅ．ｃｏｌｉ　ＭＧＷ３１１０株のゲノム上でａｄｈＥ遺伝子の上流域５００ｂ、ｓａｃＢ遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子とａｄｈＥ遺伝子の下流域５００ｂが含まれる（配列番号２９）。遺伝子合成により入手した核酸断片をＰＣＲ増幅するためのプライマーを設計し（配列番号３０、３１）、常法に従ってＰＣＲ反応を行った。得られた断片を、アガロースゲルを用いた電気泳動法と核酸カラム精製キットで精製し、ａｄｈＥ遺伝子欠失株作製に使用した。Ｅ．ｃｏｌｉ　Ｗ３１１０／ｐＫＤ４６株に、ａｄｈＥ遺伝子の欠失用核酸断片を、エレクトロポレーションで導入した。導入後、当該株をカナマイシン２５μｇ／ｍＬを含有するＬＢ寒

天培地にて３０℃で培養した。得られた組み換え株はａｄｈＥ遺伝子配列全長が、ｓａｃＢ遺伝子とカナマイシン耐性遺伝子の全長を含む配列（ｓａｃＢ－ｋａｎ配列）で置換されたＥ．ｃｏｌｉ　Ｗ３１１０／ａｄｈＥ－ｓａｃＢ－ｋａｎ株である。

[0112] 次に、ｓａｃＢ－ｋａｎ配列を除去するための核酸断片を遺伝子合成した（アゼンタ株式会社製）。当該断片には、Ｅ．ｃｏｌｉ　Ｗ３１１０株のゲノム上でａｄｈＥ遺伝子の上流域５００ｂと下流域５００ｂが含まれる（配列番号３２）。遺伝子合成により入手した核酸断片をＰＣＲ増幅するため、配列番号３０、３１のプライマーを用いて、常法に従ってＰＣＲ反応を行った。得られた断片を、アガロースゲルを用いた電気泳動法と核酸カラム精製キットで精製し、ｓａｃＢ－ｋａｎ配列除去に使用した。Ｅ．ｃｏｌｉ　Ｗ３１１０／ａｄｈＥ－ｓａｃＢ－ｋａｎ株に、ｓａｃＢ－ｋａｎ配列除去用の核酸断片を、エレクトロポレーションで導入した。導入後、当該株をスクロース５０ｇ／Ｌを含有するＬＢ寒天培地にて３０℃で培養した。得られたコロニーからＬＢ寒天培地およびカナマイシン２５μｇ／ｍＬを含有するＬＢ寒天培地にて３０℃で培養し、カナマイシン耐性が無い株を選出した。得られた株はゲノム上のａｄｈＥ遺伝子が欠失した、Ｅ．ｃｏｌｉ　Ｗ３１１０／ａｄｈＥ遺伝子欠失株である。

[0113] Ｅ．ｃｏｌｉ　Ｗ３１１０／ａｄｈＥ遺伝子欠失株にｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲプラスミドをエレクトロポレーションで導入した。導入後、当該株をカナマイシン２５μｇ／ｍＬを含有するＬＢ寒天培地にて３７℃で培養した。得られた株に、ｐＣＤＦ－１ｂ：：ｔｅｍｐプラスミドをエレクトロポレーションで導入した。導入後、当該株をカナマイシン２５μｇ／ｍＬとストレプトマイシン５０μｇ／ｍＬを含有するＬＢ寒天培地にて３７℃で培養した。

[0114] 当該株を参考例５と同様の方法にて培養した後、参考例５と同様の方法にて培養上清中に蓄積した酢酸および３ＨＡの定量分析を行い、式（２）を用いて算出した酢酸に対する３ＨＡの生産比率を表１に示す。

[0115] 実施例１　　ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲプラスミドとｐＣＤＦ－１ｂ：：ｉｃｌＲｉプラスミドを導入した、ｌｄｈＡ遺伝子欠失Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ｓｔｒ．Ｋ－１２　ｓｕｂｓｔｒ．ＭＧ１６５５株の作製と培養

ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲプラスミドを導入した比較例２に記載のｌｄｈＡ遺伝子欠失Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ｓｔｒ．Ｋ－１２　ｓｕｂｓｔｒ．ＭＧ１６５５株に、ｉｃｌＲ遺伝子の発現を抑制するためのｐＣＤＦ－１ｂ：：ｉｃｌＲｉプラスミドをエレクトロポレーションで導入した。導入後、当該株をカナマイシン２５μｇ／ｍＬとストレプトマイシン５０μｇ／ｍＬを含有するＬＢ寒天培地にて３７℃で培養した。

[0116] 当該株を参考例５と同様の方法にて培養した後、参考例５と同様の方法にて培養上清中に蓄積した酢酸および３ＨＡの定量分析を行い、式（２）を用いて算出した酢酸に対する３ＨＡの生産比率を表１に示す。

[0117] 実施例２　　ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲプラスミドとｐＣＤＦ－１ｂ：：ｉｃｌＲｉプラスミドを導入した、ａｄｈＥ遺伝子欠失Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ｓｔｒ．Ｋ－１２　ｓｕｂｓｔｒ．Ｗ３１１０株の作製と培養

ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲプラスミドを導入した比較例３に記載のａｄｈＥ遺伝子欠失Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ｓｔｒ．Ｋ－１２　ｓｕｂｓｔｒ．Ｗ３１１０株に、ｉｃｌＲ遺伝子の発現を抑制するためのｐＣＤＦ－１ｂ：：ｉｃｌＲｉプラスミドをエレクトロポレーションで導入した。導入後、当該株をカナマイシン２５μｇ／ｍＬとストレプトマイシン５０μｇ／ｍＬを含有するＬＢ寒天培地にて３７℃で培養した。

[0118] 当該株を参考例５と同様の方法にて培養した後、参考例５と同様の方法にて培養上清中に蓄積した酢酸および３ＨＡの定量分析を行い、式（２）を用いて算出した酢酸に対する３ＨＡの生産比率を表１に示す。

[0119] 比較例４　　ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲプラスミドとｐＣＤＦ－１ｂ：：ｆａｄＲｉプラスミドを導入した、ｌｄｈＡ遺伝子欠失Ｅｓｃｈ

ｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ｓｔｒ．Ｋ－１２　ｓｕｂｓｔｒ．ＭＧ１６５５株の作製と培養

ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲプラスミドを導入した比較例２に記載のｌｄｈＡ遺伝子欠失Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ｓｔｒ．Ｋ－１２　ｓｕｂｓｔｒ．ＭＧ１６５５株に、ｆａｄＲ遺伝子の発現を抑制するためのｐＣＤＦ－１ｂ：：ｆａｄＲｉプラスミドをエレクトロポレーションで導入した。導入後、当該株をカナマイシン２５μｇ／ｍＬとストレプトマイシン５０μｇ／ｍＬを含有するＬＢ寒天培地にて３７℃で培養した。

[0120] 当該株を参考例５と同様の方法にて培養した後、参考例５と同様の方法にて培養上清中に蓄積した酢酸および３ＨＡの定量分析を行い、式（２）を用いて算出した酢酸に対する３ＨＡの生産比率を表１に示す。

[0121] 比較例５　ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲプラスミドとｐＣＤＦ－１ｂ：：ｆａｄＲｉプラスミドを導入した、ａｄｈＥ遺伝子欠失Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ｓｔｒ．Ｋ－１２　ｓｕｂｓｔｒ．Ｗ３１１０株の作製と培養

ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲプラスミドを導入した比較例３に記載のａｄｈＥ遺伝子欠失Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ｓｔｒ．Ｋ－１２　ｓｕｂｓｔｒ．Ｗ３１１０株に、ｆａｄＲ遺伝子の発現を抑制するためｐＣＤＦ－１ｂ：：ｆａｄＲｉプラスミドをエレクトロポレーションで導入した。導入後、当該株をカナマイシン２５μｇ／ｍＬとストレプトマイシン５０μｇ／ｍＬを含有するＬＢ寒天培地にて３７℃で培養した。

[0122] 当該株を参考例５と同様の方法にて培養した後、参考例５と同様の方法にて培養上清中に蓄積した酢酸および３ＨＡの定量分析を行い、式（２）を用いて算出した酢酸に対する３ＨＡの生産比率を表１に示す。

[0123] 実施例３　ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲプラスミドとｐＣＤＦ－１ｂ：：ｉｃｌＲｉプラスミドを導入した、ｐｙｋＡ、ｐｙｋＦおよびｌｄｈＡ遺伝子欠失Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ｓｔｒ．Ｋ－１２　ｓｕｂｓｔｒ．ＭＧ１６５５株の作製と培養

まず、ピルビン酸キナーゼをコードするｐｙｋＦとｐｙｋＡ遺伝子（配列番号３３、３４）およびｌｄｈＡ遺伝子の全長を欠失したＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ｓｔｒ．Ｋ－１２　ｓｕｂｓｔｒ．ＭＧ１６５５株を作製した。ｐｙｋＦおよびｐｙｋＡ遺伝子の欠失方法は、ＷＯ２０２０／２３０７１８号に記載の方法に従った。ｌｄｈＡ遺伝子欠失は、比較例２に記載の方法を使用した。ｐｙｋＦ，ｐｙｋＡ，ｌｄｈＡ遺伝子欠失株にｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲプラスミドをエレクトロポレーションで導入した。導入後、当該株をカナマイシン２５μｇ／ｍＬを含有するＬＢ寒天培地にて３７℃で培養した。得られた株に、ｉｃｌＲ遺伝子の発現を抑制するためのｐＣＤＦ－１ｂ：：ｉｃｌＲｉプラスミドをエレクトロポレーションで導入した。導入後、当該株をカナマイシン２５μｇ／ｍＬとストレプトマイシン５０μｇ／ｍＬを含有するＬＢ寒天培地にて３７℃で培養した。

[0124] 当該株を参考例５と同様の方法にて培養した後、参考例５と同様の方法にて培養上清中に蓄積した酢酸および３ＨＡの定量分析を行い、式（２）を用いて算出した酢酸に対する３ＨＡの生産比率を表１に示す。

[0125] [表1]

参考例・比較例・実施例	株	遺伝子欠失	遺伝子抑制	3HA (g/L)	酢酸 (g/L)	3HA/酢酸 (生産比率)
参考例５	MG1655	―	―	0.40	1.72	0.232
参考例６	W3110	―	―	0.40	1.76	0.230
比較例１	MG1655	―	iclR	0.33	2.04	0.160
比較例２	MG1655	ldhA	―	0.37	1.61	0.230
比較例３	W3110	adhE	―	0.42	2.12	0.197
実施例１	MG1655	ldhA	iclR	0.47	1.38	0.343
実施例２	W3110	adhE	iclR	0.42	1.48	0.282
比較例４	MG1655	ldhA	fadR	0.37	1.95	0.190
比較例５	W3110	adhE	fadR	0.39	1.92	0.204
実施例３	MG1655	pykA, pykF, ldhA	iclR	1.25	1.00	1.250

[0126] 参考例５および比較例１の結果から、遺伝子欠失を施していない大腸菌株では、ｉｃｌＲ遺伝子の発現抑制により、酢酸に対する３ＨＡの生産比率が

低下することが明らかとなった。

[0127] 参考例５、６および比較例２、３の結果から、ＩｄｈＡ遺伝子またはａｄｈＥ遺伝子を欠失した大腸菌株では、遺伝子欠失を施していない大腸菌株と比較し、酢酸に対する３ＨＡの生産比率が低下することが明らかとなった。

[0128] 参考例５および実施例１の結果から、ＩｄｈＡ遺伝子を欠失し、ｉｃｌＲ遺伝子の発現を抑制した大腸菌株では、酢酸に対する３ＨＡの生産比率が向上することが示された。また、参考例６および実施例２の結果から、ａｄｈＥ遺伝子を欠失し、ｉｃｌＲ遺伝子の発現を抑制した大腸菌株では、酢酸に対する３ＨＡの生産比率が向上することが示された。

[0129] 参考例５および比較例４の結果から、ＩｄｈＡ遺伝子を欠失し、ｆａｄＲ遺伝子の発現を抑制した大腸菌株では、酢酸に対する３ＨＡの生産比率が低下することが明らかとなった。また、参考例６および比較例５の結果から、ａｄｈＥ遺伝子を欠失し、ｆａｄＲ遺伝子の発現を抑制した大腸菌株では、酢酸に対する３ＨＡの生産比率が低下することが明らかとなった。このことから、ＩｃｌＲと同様にａｃｅＢＡＫオペロンの発現を制御する機能を有するＦａｄＲをコードする遺伝子の発現抑制では、酢酸に対する３ＨＡの生産比率向上効果が得られないことが示された。

[0130] 実施例３では、ＷＯ２０２０／２３０７１８号に詳述されているピルビン酸キナーゼの機能を欠失させた遺伝子改変微生物にＩｄｈＡ遺伝子欠失を施し、さらにｉｃｌＲ遺伝子の発現を抑制することで、酢酸に対する３ＨＡの生産比率が著しく向上することが示された。

[0131] 参考例７　　３ＨＡ－ＣｏＡからＨＭＡ－ＣｏＡを生成する反応（反応Ｃ）を触媒する酵素を発現するためのプラスミドの作製

大腸菌内で自律複製可能な発現ベクターｐＭＷ１１９（株式会社ニッポンジーン製）をＳａｃＩで切断し、ｐＭＷ１１９／ＳａｃＩを得た。当該ベクターに構成的な発現プロモーターを組み込むために、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　Ｋ－１２　ＭＧ１６５５のゲノムＤＮＡを鋳型としてｇａｐＡ（ＮＣＢＩ　Ｇｅｎｅ　ＩＤ：　ＮＣ＿０００９１３．３）の上流域２０

０ｂ（配列番号７）をＰＣＲ増幅するためのプライマーを設計し（配列番号３９、４０）、常法に従ってＰＣＲ反応を行った。得られた断片およびｐＭＷ１１９／ＳａｃＩを、“Ｉｎ－Ｆｕｓｉｏｎ　ＨＤ　Ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｋｉｔ”（タカラバイオ株式会社製）を用いて連結し、大腸菌株ＤＨ５αに導入した。得られた組換え大腸菌株から当該プラスミドを抽出し、常法により塩基配列を確認したプラスミドをｐＭＷ１１９：：Ｐｇａｐとした。続いてｐＭＷ１１９：：ＰｇａｐをＳｐｈＩで切断し、ｐＭＷ１１９：：Ｐｇａｐ／ＳｐｈＩを得た。反応Ｃを触媒する酵素をコードする遺伝子を増幅するために、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｐｕｔｉｄａ　ＫＴ２４４０株のゲノムＤＮＡを鋳型としてエノイル－ＣｏＡヒドラターゼ遺伝子ｐａａＦ（ＮＣＢＩ　Ｇｅｎｅ　ＩＤ：　１０４６９３２、配列番号４１）の全長をＰＣＲ増幅するためのプライマーを設計し（配列番号４２、４３）、常法に従ってＰＣＲ反応を行った。得られた断片およびｐＭＷ１１９：：Ｐｇａｐ／ＳｐｈＩを、“Ｉｎ－Ｆｕｓｉｏｎ　ＨＤ　Ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｋｉｔ”（タカラバイオ株式会社製）を用いて連結し、大腸菌株ＤＨ５αに導入した。得られた組換え株から当該プラスミドを抽出し、常法により塩基配列を確認した。得られたプラスミドをｐＭＷ１１９：：ＥＨとした。

[0132] 参考例８　　３ＨＡ－ＣｏＡからＨＭＡ－ＣｏＡを生成する反応（反応Ｃ）およびＨＭＡ－ＣｏＡからＡＤＡ－ＣｏＡを生成する反応（反応Ｄ）を触媒する酵素を発現するためのプラスミドの作製

ｐＭＷ１１９：：ＥＨをＨｉｎｄＩＩＩで切断し、ｐＭＷ１１９：：ＥＨ／ＨｉｎｄＩＩＩを得た。反応Ｄを触媒する酵素をコードする遺伝子を増幅するために、Ａｃｉｎｅｔｏｂａｃｔｅｒ　ｂａｙｌｙｉ　ＡＤＰ１株由来のｄｃａＡ（ＮＣＢＩ－ＰｒｏｔｅｉｎＩＤ：ＡＡＬ０９０９４．１、配列番号４４）の全長をＰＣＲ増幅するためのプライマーを設計し（配列番号４５、４６）、常法に従ってＰＣＲ反応を行った。得られた断片およびｐＭＷ１１９：：ＥＨ／ＨｉｎｄＩＩＩを、“Ｉｎ－Ｆｕｓｉｏｎ　ＨＤ　Ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｋｉｔ”（タカラバイオ株式会社製）を用いて連結し、大腸菌株

ＤＨ５αに導入した。得られた組換え株から当該プラスミドを抽出し、常法により塩基配列を確認したプラスミドをｐＭＷ１１９：：ＥＨＥＲとした。

[0133] 参考例９　　ａｃｅＢ遺伝子発現用プラスミドの作製

ｐＭＷ１１９：：ＰｇａｐをＫｐｎＩで切断し、ｐＭＷ１１９：：Ｐｇａｐ／ＫｐｎＩを得た。リンゴ酸シンターゼをコードするａｃｅＢ遺伝子を増幅するために、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ＭＧ１６５５株由来のａｃｅＢ（配列番号３６）の全長をＰＣＲ増幅するためのプライマーを設計し（配列番号４７、４８）、常法に従ってＰＣＲ反応を行った。得られた断片およびｐＭＷ１１９：：Ｐｇａｐ／ＫｐｎＩを、“Ｉｎ－Ｆｕｓｉｏｎ　ＨＤ　Ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｋｉｔ”（タカラバイオ株式会社製）を用いて連結し、大腸菌株ＤＨ５αに導入した。得られた組換え株から当該プラスミドを抽出し、常法により塩基配列を確認したプラスミドをｐＭＷ１１９：：ａｃｅＢとした。

[0134] 参考例１０　　ａｃｅＫ遺伝子発現用プラスミドの作製

ｐＭＷ１１９：：ＰｇａｐをＫｐｎＩで切断し、ｐＭＷ１１９：：Ｐｇａｐ／ＫｐｎＩを得た。イソクエン酸デヒドロゲナーゼキナーゼ／ホスファターゼをコードするａｃｅＫ遺伝子を増幅するために、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ＭＧ１６５５株由来のａｃｅＫ（配列番号３８）の全長をＰＣＲ増幅するためのプライマーを設計し（配列番号４９、５０）、常法に従ってＰＣＲ反応を行った。得られた断片およびｐＭＷ１１９：：Ｐｇａｐ／ＫｐｎＩを、“Ｉｎ－Ｆｕｓｉｏｎ　ＨＤ　Ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｋｉｔ”（タカラバイオ株式会社製）を用いて連結し、大腸菌株ＤＨ５αに導入した。得られた組換え株から当該プラスミドを抽出し、常法により塩基配列を確認したプラスミドをｐＭＷ１１９：：ａｃｅＫとした。

[0135] 参考例１１　　ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲプラスミド、ｐＣＤＦ－１ｂ：：ｔｅｍｐプラスミドとｐＭＷ１１９：：ＥＨプラスミドを導入したＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ｓｔｒ．Ｋ－１２　ｓｕｂｓｔｒ．ＭＧ１６５５株の作製と培養

参考例５で作製したｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲプラスミドとｐＣＤＦ－１ｂ：：ｔｅｍｐプラスミドを導入したＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ ｓｔｒ．Ｋ－１２ ｓｕｂｓｔｒ．ＭＧ１６５５株に、ｐＭＷ１１９：：ＥＨプラスミドをエレクトロポレーションで導入した。導入後、当該株をカナマイシン２５μｇ／ｍＬ、ストレプトマイシン５０μｇ／ｍＬとアンピシリン１００μｇ／ｍＬを含有するＬＢ寒天培地にて３７℃で培養した。

[0136] ｐＨ７に調整したカナマイシン２５μｇ／ｍＬ、ストレプトマイシン５０μｇ／ｍＬとアンピシリン１００μｇ／ｍＬを含有するＬＢ培地（Ｂａｃｔｏトリプトン（Ｄｉｆｃｏ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ社製）１０ｇ／Ｌ、Ｂａｃｔｏ酵母エキス（Ｄｉｆｃｏ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ社製）５ｇ／Ｌ、塩化ナトリウム５ｇ／Ｌ）５ｍＬに、当該株を一白金耳植菌し、３０℃、１２０ｍｉｎ－１で２４時間振とう培養した。当該培養液０．０５ｍＬを試験管に入ったｐＨ６．５に調整したカナマイシン２５μｇ／ｍＬ、ストレプトマイシン５０μｇ／ｍＬとアンピシリン１００μｇ／ｍＬを含有する培地Ｉ（グルコース１０ｇ／Ｌ、硫酸アンモニウム１ｇ／Ｌ、リン酸カリウム５０ｍＭ、硫酸マグネシウム０．０２５ｇ／Ｌ、硫酸鉄０．０６２５ｍｇ／Ｌ、硫酸マンガン２．７ｍｇ／Ｌ、塩化カルシウム０．３３ｍｇ／Ｌ、塩化ナトリウム１．２５ｇ／Ｌ、Ｂａｃｔｏトリプトン２．５ｇ／Ｌ、Ｂａｃｔｏ酵母エキス１．２５ｇ／Ｌ）５ｍＬに添加し、３０℃、１２０ｍｉｎ－１で２４時間振とう培養した。

[0137] 当該培養液より菌体を遠心分離した上清をＭｉｌｌｅｘ－ＧＶ（０．２２μｍ、ＰＶＤＦ、Ｍｅｒｃｋ社製）を用いて膜処理し、透過液をＨＰＬＣおよびＬＣ－ＭＳ／ＭＳにて分析した。培養上清中に蓄積した酢酸およびＨＭＡの定量分析を行い、式（２）の３ＨＡをＨＭＡに置き換えて算出した酢酸に対するＨＭＡの生産比率を表２に示す。

[0138] ［ＨＰＬＣによる酢酸の定量分析条件］

参考例５に記載のＨＰＬＣによる酢酸の定量分析と同様の条件で実施した

。

[0139] ［ＬＣ－ＭＳ／ＭＳによるＨＭＡの定量分析条件］

参考例５に記載のＬＣ－ＭＳ／ＭＳによる３ＨＡの定量分析と同様の条件で実施した。

[0140] 比較例６　ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲプラスミド、ｐＣＤＦ－１ｂ：：ｔｅｍｐプラスミドとｐＭＷ１１９：：ＥＨプラスミドを導入した、ＩｄｈＡ遺伝子欠失Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ｓｔｒ．Ｋ－１２　ｓｕｂｓｔｒ．ＭＧ１６５５株の作製と培養

比較例２で作製したｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲプラスミドとｐＣＤＦ－１ｂ：：ｔｅｍｐプラスミドを導入した、ＩｄｈＡ遺伝子欠失Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ｓｔｒ．Ｋ－１２　ｓｕｂｓｔｒ．ＭＧ１６５５株に、ｐＭＷ１１９：：ＥＨプラスミドをエレクトロポレーションで導入した。導入後、当該株をカナマイシン２５μｇ／ｍＬ、ストレプトマイシン５０μｇ／ｍＬとアンピシリン１００μｇ／ｍＬを含有するＬＢ寒天培地にて３７℃で培養した。

[0141] 当該株を参考例１１と同様の方法にて培養した後、参考例１１と同様の方法にて培養上清中に蓄積した酢酸およびＨＭＡの定量分析を行い、式（２）の３ＨＡをＨＭＡに置き換えて算出した酢酸に対するＨＭＡの生産比率を表２に示す。

[0142] 比較例７　ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲプラスミド、ｐＣＤＦ－１ｂ：：ｉｃｌＲｉプラスミドとｐＭＷ１１９：：ＥＨプラスミドを導入した、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ｓｔｒ．Ｋ－１２　ｓｕｂｓｔｒ．ＭＧ１６５５株の作製と培養

比較例１で作製したｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲプラスミドとｐＣＤＦ－１ｂ：：ｉｃｌＲｉプラスミドを導入したＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ｓｔｒ．Ｋ－１２　ｓｕｂｓｔｒ．ＭＧ１６５５株に、ｐＭＷ１１９：：ＥＨプラスミドをエレクトロポレーションで導入した。導入後、当該株をカナマイシン２５μｇ／ｍＬ、ストレプトマイシン５０μｇ／ｍ

Ｌとアンピシリン１００μｇ／ｍＬを含有するＬＢ寒天培地にて３７℃で培養した。

[0143] 当該株を参考例１１と同様の方法にて培養した後、参考例１１と同様の方法にて培養上清中に蓄積した酢酸およびＨＭＡの定量分析を行い、式（２）の３ＨＡをＨＭＡに置き換えて算出した酢酸に対するＨＭＡの生産比率を表２に示す。

[0144] 実施例４　ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲプラスミド、ｐＣＤＦ－１ｂ：：ｉｃｌＲｉプラスミドとｐＭＷ１１９：：ＥＨプラスミドを導入した、ＩｄｈＡ遺伝子欠失Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ ｓｔｒ．Ｋ－１２ ｓｕｂｓｔｒ．ＭＧ１６５５株の作製と培養

実施例１で作製したｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲプラスミドとｐＣＤＦ－１ｂ：：ｉｃｌＲｉプラスミドを導入した、ＩｄｈＡ遺伝子欠失Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ ｓｔｒ．Ｋ－１２ ｓｕｂｓｔｒ．ＭＧ１６５５株に、ｐＭＷ１１９：：ＥＨプラスミドをエレクトロポレーションで導入した。導入後、当該株をカナマイシン２５μｇ／ｍＬ、ストレプトマイシン５０μｇ／ｍＬとアンピシリン１００μｇ／ｍＬを含有するＬＢ寒天培地にて３７℃で培養した。

[0145] 当該株を参考例１１と同様の方法にて培養した後、参考例１１と同様の方法にて培養上清中に蓄積した酢酸およびＨＭＡの定量分析を行い、式（２）の３ＨＡをＨＭＡに置き換えて算出した酢酸に対するＨＭＡの生産比率を表２に示す。

[0146] 参考例１２　ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲプラスミド、ｐＣＤＦ－１ｂ：：ｔｅｍｐプラスミドとｐＭＷ１１９：：ＥＨプラスミドを導入したＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ ｓｔｒ．Ｋ－１２ ｓｕｂｓｔｒ．Ｗ３１１０株の作製と培養

参考例６で作製したｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲプラスミドとｐＣＤＦ－１ｂ：：ｔｅｍｐプラスミドを導入したＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ ｓｔｒ．Ｋ－１２ ｓｕｂｓｔｒ．Ｗ３１１０株に、ｐＭＷ１

１９：：ＥＨプラスミドをエレクトロポレーションで導入した。導入後、当該株をカナマイシン２５μｇ／ｍＬ、ストレプトマイシン５０μｇ／ｍＬとアンピシリン１００μｇ／ｍＬを含有するＬＢ寒天培地にて３７℃で培養した。

[0147] 当該株を参考例１１と同様の方法にて培養した後、参考例１１と同様の方法にて培養上清中に蓄積した酢酸およびＨＭＡの定量分析を行い、式（２）の３ＨＡをＨＭＡに置き換えて算出した酢酸に対するＨＭＡの生産比率を表２に示す。

[0148] 比較例８　ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲプラスミド、ｐＣＤＦ－１ｂ：：ｔｅｍｐプラスミドとｐＭＷ１１９：：ＥＨプラスミドを導入した、ａｄｈＥ遺伝子欠失Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ｓｔｒ．Ｋ－１２　ｓｕｂｓｔｒ．Ｗ３１１０株の作製と培養

比較例３で作製したｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲプラスミドとｐＣＤＦ－１ｂ：：ｔｅｍｐプラスミドを導入した、ａｄｈＥ遺伝子欠失Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ｓｔｒ．Ｋ－１２　ｓｕｂｓｔｒ．Ｗ３１１０株に、ｐＭＷ１１９：：ＥＨプラスミドをエレクトロポレーションで導入した。導入後、当該株をカナマイシン２５μｇ／ｍＬ、ストレプトマイシン５０μｇ／ｍＬとアンピシリン１００μｇ／ｍＬを含有するＬＢ寒天培地にて３７℃で培養した。

[0149] 当該株を参考例１１と同様の方法にて培養した後、参考例１１と同様の方法にて培養上清中に蓄積した酢酸およびＨＭＡの定量分析を行い、式（２）の３ＨＡをＨＭＡに置き換えて算出した酢酸に対するＨＭＡの生産比率を表２に示す。

[0150] 比較例９　ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲプラスミド、ｐＣＤＦ－１ｂ：：ｉｃｌＲｉプラスミドとｐＭＷ１１９：：ＥＨプラスミドを導入したＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ｓｔｒ．Ｋ－１２　ｓｕｂｓｔｒ．Ｗ３１１０株の作製と培養

参考例６で作製したｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲプラスミドを

導入したＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ｓｔｒ．Ｋ－１２　ｓｕｂｓｔｒ．Ｗ３１１０株に、ｐＣＤＦ－１ｂ：：ｉｃｌＲｉプラスミドをエレクトロポレーションで導入した。導入後、当該株をカナマイシン２５μｇ／ｍＬとストレプトマイシン５０μｇ／ｍＬを含有するＬＢ寒天培地にて３７℃で培養した。得られた株に、ｐＭＷ１１９：：ＥＨプラスミドをエレクトロポレーションで導入した。導入後、当該株をカナマイシン２５μｇ／ｍＬ、ストレプトマイシン５０μｇ／ｍＬとアンピシリン１００μｇ／ｍＬを含有するＬＢ寒天培地にて３７℃で培養した。

[0151] 当該株を参考例１１と同様の方法にて培養した後、参考例１１と同様の方法にて培養上清中に蓄積した酢酸およびＨＭＡの定量分析を行い、式（２）の３ＨＡをＨＭＡに置き換えて算出した酢酸に対するＨＭＡの生産比率を表２に示す。

[0152] 実施例５　　ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲプラスミド、ｐＣＤＦ－１ｂ：：ｉｃｌＲｉプラスミドとｐＭＷ１１９：：ＥＨプラスミドを導入した、ａｄｈＥ遺伝子欠失Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ｓｔｒ．Ｋ－１２　ｓｕｂｓｔｒ．Ｗ３１１０株の作製と培養

実施例２で作製したｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲプラスミドとｐＣＤＦ－１ｂ：：ｉｃｌＲｉプラスミドを導入した、ａｄｈＥ遺伝子欠失Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ｓｔｒ．Ｋ－１２　ｓｕｂｓｔｒ．Ｗ３１１０株に、ｐＭＷ１１９：：ＥＨプラスミドをエレクトロポレーションで導入した。導入後、当該株をカナマイシン２５μｇ／ｍＬ、ストレプトマイシン５０μｇ／ｍＬとアンピシリン１００μｇ／ｍＬを含有するＬＢ寒天培地にて３７℃で培養した。

[0153] 当該株を参考例１１と同様の方法にて培養した後、参考例１１と同様の方法にて培養上清中に蓄積した酢酸およびＨＭＡの定量分析を行い、式（２）の３ＨＡをＨＭＡに置き換えて算出した酢酸に対するＨＭＡの生産比率を表２に示す。

[0154]

[表2]

参考例・比較例・実施例	株	遺伝子欠失	遺伝子抑制	HMA (mg/L)	酢酸 (g/L)	HMA/酢酸 (生産比率)
参考例11	MG1655	ー	ー	8.5	1.91	0.0045
比較例6	MG1655	ldhA	ー	8.4	2.00	0.0042
比較例7	MG1655	ー	iclR	8.2	1.96	0.0042
実施例4	MG1655	ldhA	iclR	9.9	1.88	0.0053
参考例12	W3110	ー	ー	8.1	1.84	0.0044
比較例8	W3110	adhE	ー	7.6	1.73	0.0044
比較例9	W3110	ー	iclR	6.8	1.77	0.0038
実施例5	W3110	adhE	iclR	9.7	1.52	0.0064

[0155] 参考例１１、１２および比較例７、９の結果から、遺伝子欠失を施していない大腸菌株では、ｉｃｌＲ遺伝子の発現抑制により、酢酸に対するＨＭＡの生産比率が低下することが明らかとなった。

[0156] 参考例１１および比較例６の結果から、ｌｄｈＡ遺伝子を欠失した大腸菌株では、遺伝子欠失を施していない大腸菌株と比較し、酢酸に対するＨＭＡの生産比率が低下することが明らかとなった。また、参考例１２および比較例８の結果から、ａｄｈＥ遺伝子を欠失した大腸菌株では、遺伝子欠失を施していない大腸菌株と比較し、酢酸に対するＨＭＡの生産比率が向上しないことが明らかとなった。

[0157] 参考例１１および実施例４の結果から、ｌｄｈＡ遺伝子を欠失し、ｉｃｌＲ遺伝子の発現を抑制した大腸菌株では、酢酸に対するＨＭＡの生産比率が向上することが示された。また、参考例１２および実施例５の結果から、ａｄｈＥ遺伝子を欠失し、ｉｃｌＲ遺伝子の発現を抑制した大腸菌株では、酢酸に対するＨＭＡの生産比率が向上することが示された。

[0158] 参考例１３　　ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲプラスミド、ｐＣＤＦ－１ｂ：：ｔｅｍｐプラスミドとｐＭＷ１１９：：ＥＨＥＲプラスミドを導入したＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ｓｔｒ．Ｋ－１２　ｓｕｂｓｔｒ．ＭＧ１６５５株の作製と培養

参考例５で作製したｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲプラスミドと

ｐＣＤＦ－１ｂ：：ｔｅｍｐプラスミドを導入したＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ ｓｔｒ．Ｋ－１２ ｓｕｂｓｔｒ．ＭＧ１６５５株に、ｐＭＷ１１９：：ＥＨＥＲプラスミドをエレクトロポレーションで導入した。導入後、当該株をカナマイシン２５μｇ／ｍＬ、ストレプトマイシン５０μｇ／ｍＬとアンピシリン１００μｇ／ｍＬを含有するＬＢ寒天培地にて３７℃で培養した。

[0159] ｐＨ７に調整したカナマイシン２５μｇ／ｍＬ、ストレプトマイシン５０μｇ／ｍＬとアンピシリン１００μｇ／ｍＬを含有するＬＢ培地（Ｂａｃｔｏトリプトン（Ｄｉｆｃｏ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ社製）１０ｇ／Ｌ、Ｂａｃｔｏ酵母エキス（Ｄｉｆｃｏ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ社製）５ｇ／Ｌ、塩化ナトリウム５ｇ／Ｌ）５ｍＬに、当該株を一白金耳植菌し、３０℃、１２０ｍｉｎ－１で２４時間振とう培養した。当該培養液０．０５ｍＬを試験管に入ったｐＨ６．５に調整したカナマイシン２５μｇ／ｍＬ、ストレプトマイシン５０μｇ／ｍＬとアンピシリン１００μｇ／ｍＬを含有する培地Ｉ（グルコース１０ｇ／Ｌ、硫酸アンモニウム１ｇ／Ｌ、リン酸カリウム５０ｍＭ、硫酸マグネシウム０．０２５ｇ／Ｌ、硫酸鉄０．０６２５ｍｇ／Ｌ、硫酸マンガン２．７ｍｇ／Ｌ、塩化カルシウム０．３３ｍｇ／Ｌ、塩化ナトリウム１．２５ｇ／Ｌ、Ｂａｃｔｏトリプトン２．５ｇ／Ｌ、Ｂａｃｔｏ酵母エキス１．２５ｇ／Ｌ）５ｍＬに添加し、３０℃、１２０ｍｉｎ－１で２４時間振とう培養した。

[0160] 当該培養液より菌体を遠心分離した上清をＭｉｌｌｅｘ－ＧＶ（０．２２μｍ、ＰＶＤＦ、Ｍｅｒｃｋ社製）を用いて膜処理し、透過液をＨＰＬＣおよびＬＣ－ＭＳ／ＭＳにて分析した。培養上清中に蓄積した酢酸およびＡＤＡの定量分析を行い、式（２）の３ＨＡをＡＤＡに置き換えて算出した酢酸に対するＡＤＡの生産比率を表３に示す。

[0161] ［ＨＰＬＣによる酢酸の定量分析条件］

参考例５に記載のＨＰＬＣによる酢酸の定量分析と同様の条件で実施した。

[0162] ［ＬＣ－ＭＳ／ＭＳによるＡＤＡの定量分析条件］

参考例５に記載のＬＣ－ＭＳ／ＭＳによる３ＨＡの定量分析と同様の条件で実施した。

[0163] 比較例１０　ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲプラスミド、ｐＣＤＦ－１ｂ：：ｔｅｍｐプラスミドとｐＭＷ１１９：：ＥＨＥＲプラスミドを導入した、ＩｄｈＡ遺伝子欠失Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ ｓｔｒ．Ｋ－１２ ｓｕｂｓｔｒ．ＭＧ１６５５株の作製と培養

比較例２で作製したｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲプラスミドとｐＣＤＦ－１ｂ：：ｔｅｍｐプラスミドを導入した、ＩｄｈＡ遺伝子欠失Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ ｓｔｒ．Ｋ－１２ ｓｕｂｓｔｒ．ＭＧ１６５５株に、ｐＭＷ１１９：：ＥＨＥＲプラスミドをエレクトロポレーションで導入した。導入後、当該株をカナマイシン２５μｇ／ｍＬ、ストレプトマイシン５０μｇ／ｍＬとアンピシリン１００μｇ／ｍＬを含有するＬＢ寒天培地にて３７℃で培養した。

[0164] 当該株を参考例１３と同様の方法にて培養した後、参考例１３と同様の方法にて培養上清中に蓄積した酢酸およびＡＤＡの定量分析を行い、式（２）の３ＨＡをＡＤＡに置き換えて算出した酢酸に対するＡＤＡの生産比率を表３に示す。

[0165] 比較例１１　ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲプラスミド、ｐＣＤＦ－１ｂ：：ｉｃｌＲｉプラスミドとｐＭＷ１１９：：ＥＨＥＲプラスミドを導入した、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ ｓｔｒ．Ｋ－１２ ｓｕｂｓｔｒ．ＭＧ１６５５株の作製と培養

比較例１で作製したｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲプラスミドとｐＣＤＦ－１ｂ：：ｉｃｌＲｉプラスミドを導入したＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ ｓｔｒ．Ｋ－１２ ｓｕｂｓｔｒ．ＭＧ１６５５株に、ｐＭＷ１１９：：ＥＨＥＲプラスミドをエレクトロポレーションで導入した。導入後、当該株をカナマイシン２５μｇ／ｍＬ、ストレプトマイシン５０μｇ／ｍＬとアンピシリン１００μｇ／ｍＬを含有するＬＢ寒天培地にて３７℃

で培養した。

[0166] 当該株を参考例１３と同様の方法にて培養した後、参考例１３と同様の方法にて培養上清中に蓄積した酢酸およびＡＤＡの定量分析を行い、式（２）の３ＨＡをＡＤＡに置き換えて算出した酢酸に対するＡＤＡの生産比率を表３に示す。

[0167] 実施例６　ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲプラスミド、ｐＣＤＦ－１ｂ：：ｉｃｌＲｉプラスミドとｐＭＷ１１９：：ＥＨＥＲプラスミドを導入した、ＩｄｈＡ遺伝子欠失Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ｓｔｒ．Ｋ－１２　ｓｕｂｓｔｒ．ＭＧ１６５５株の作製と培養

実施例１で作製したｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲプラスミドとｐＣＤＦ－１ｂ：：ｉｃｌＲｉプラスミドを導入した、ＩｄｈＡ遺伝子欠失Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ｓｔｒ．Ｋ－１２　ｓｕｂｓｔｒ．ＭＧ１６５５株に、ｐＭＷ１１９：：ＥＨＥＲプラスミドをエレクトロポレーションで導入した。導入後、当該株をカナマイシン２５μｇ／ｍＬ、ストレプトマイシン５０μｇ／ｍＬとアンピシリン１００μｇ／ｍＬを含有するＬＢ寒天培地にて３７℃で培養した。

[0168] 当該株を参考例１３と同様の方法にて培養した後、参考例１３と同様の方法にて培養上清中に蓄積した酢酸およびＡＤＡの定量分析を行い、式（２）の３ＨＡをＡＤＡに置き換えて算出した酢酸に対するＡＤＡの生産比率を表３に示す。

[0169] 参考例１４　ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲプラスミド、ｐＣＤＦ－１ｂ：：ｔｅｍｐプラスミドとｐＭＷ１１９：：ＥＨＥＲプラスミドを導入したＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ｓｔｒ．Ｋ－１２　ｓｕｂｓｔｒ．Ｗ３１１０株の作製と培養

参考例６で作製したｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲプラスミドとｐＣＤＦ－１ｂ：：ｔｅｍｐプラスミドを導入したＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ｓｔｒ．Ｋ－１２　ｓｕｂｓｔｒ．Ｗ３１１０株に、ｐＭＷ１１９：：ＥＨＥＲプラスミドをエレクトロポレーションで導入した。導入後

、当該株をカナマイシン２５μｇ／ｍＬ、ストレプトマイシン５０μｇ／ｍＬとアンピシリン１００μｇ／ｍＬを含有するＬＢ寒天培地にて３７℃で培養した。

[0170] 当該株を参考例１３と同様の方法にて培養した後、参考例１３と同様の方法にて培養上清中に蓄積した酢酸およびＡＤＡの定量分析を行い、式（２）の３ＨＡをＡＤＡに置き換えて算出した酢酸に対するＡＤＡの生産比率を表３に示す。

[0171] 比較例１２　ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲプラスミド、ｐＣＤＦ－１ｂ：：ｔｅｍｐプラスミドとｐＭＷ１１９：：ＥＨＥＲプラスミドを導入した、ａｄｈＥ遺伝子欠失Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ｓｔｒ．Ｋ－１２　ｓｕｂｓｔｒ．Ｗ３１１０株の作製と培養

比較例３で作製したｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲプラスミドとｐＣＤＦ－１ｂ：：ｔｅｍｐプラスミドを導入した、ａｄｈＥ遺伝子欠失Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ｓｔｒ．Ｋ－１２　ｓｕｂｓｔｒ．Ｗ３１１０株に、ｐＭＷ１１９：：ＥＨＥＲプラスミドをエレクトロポレーションで導入した。導入後、当該株をカナマイシン２５μｇ／ｍＬ、ストレプトマイシン５０μｇ／ｍＬとアンピシリン１００μｇ／ｍＬを含有するＬＢ寒天培地にて３７℃で培養した。

[0172] 当該株を参考例１３と同様の方法にて培養した後、参考例１３と同様の方法にて培養上清中に蓄積した酢酸およびＡＤＡの定量分析を行い、式（２）の３ＨＡをＡＤＡに置き換えて算出した酢酸に対するＡＤＡの生産比率を表３に示す。

[0173] 比較例１３　ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲプラスミド、ｐＣＤＦ－１ｂ：：ｉｃｌＲｉプラスミドとｐＭＷ１１９：：ＥＨＥＲプラスミドを導入したＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ｓｔｒ．Ｋ－１２　ｓｕｂｓｔｒ．Ｗ３１１０株の作製と培養

参考例６で作製したｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲプラスミドを導入したＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ｓｔｒ．Ｋ－１２　ｓｕｂｓ

ｔｒ．Ｗ３１１０株に、ｐＣＤＦ－１ｂ：：ｉｃｌＲｉプラスミドをエレクトロポレーションで導入した。導入後、当該株をカナマイシン２５μｇ／ｍＬとストレプトマイシン５０μｇ／ｍＬを含有するＬＢ寒天培地にて３７℃で培養した。得られた株に、ｐＭＷ１１９：：ＥＨＥＲプラスミドをエレクトロポレーションで導入した。導入後、当該株をカナマイシン２５μｇ／ｍＬ、ストレプトマイシン５０μｇ／ｍＬとアンピシリン１００μｇ／ｍＬを含有するＬＢ寒天培地にて３７℃で培養した。

[0174] 当該株を参考例１３と同様の方法にて培養した後、参考例１３と同様の方法にて培養上清中に蓄積した酢酸およびＡＤＡの定量分析を行い、式（２）の３ＨＡをＡＤＡに置き換えて算出した酢酸に対するＡＤＡの生産比率を表３に示す。

[0175] 実施例７　ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲプラスミド、ｐＣＤＦ－１ｂ：：ｉｃｌＲｉプラスミドとｐＭＷ１１９：：ＥＨＥＲプラスミドを導入した、ａｄｈＥ遺伝子欠失Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ｓｔｒ．Ｋ－１２　ｓｕｂｓｔｒ．Ｗ３１１０株の作製と培養

実施例２で作製したｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲプラスミドとｐＣＤＦ－１ｂ：：ｉｃｌＲｉプラスミドを導入した、ａｄｈＥ遺伝子欠失Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ｓｔｒ．Ｋ－１２　ｓｕｂｓｔｒ．Ｗ３１１０株に、ｐＭＷ１１９：：ＥＨＥＲプラスミドをエレクトロポレーションで導入した。導入後、当該株をカナマイシン２５μｇ／ｍＬ、ストレプトマイシン５０μｇ／ｍＬとアンピシリン１００μｇ／ｍＬを含有するＬＢ寒天培地にて３７℃で培養した。

[0176] 当該株を参考例１３と同様の方法にて培養した後、参考例１３と同様の方法にて培養上清中に蓄積した酢酸およびＡＤＡの定量分析を行い、式（２）の３ＨＡをＡＤＡに置き換えて算出した酢酸に対するＡＤＡの生産比率を表３に示す。

[0177]

[表3]

参考例・比較例・実施例	株	遺伝子欠失	遺伝子抑制	ADA (mg/L)	酢酸 (g/L)	ADA/酢酸 (生産比率)
参考例13	MG1655	ー	ー	2.7	1.75	0.0015
比較例10	MG1655	ldhA	ー	2.5	1.75	0.0014
比較例11	MG1655	ー	iclR	2.7	1.84	0.0015
実施例6	MG1655	ldhA	iclR	4.8	1.70	0.0028
参考例14	W3110	ー	ー	8.9	1.66	0.0054
比較例12	W3110	adhE	ー	9.6	1.79	0.0054
比較例13	W3110	ー	iclR	9.1	1.69	0.0054
実施例7	W3110	adhE	iclR	8.6	1.37	0.0063

[0178] 参考例１３、１４および比較例１１、１３の結果から、遺伝子欠失を施していない大腸菌株では、ｉｃｌＲ遺伝子の発現抑制による、酢酸に対するＡＤＡの生産比率の向上効果が見られないことが明らかとなった。

[0179] 参考例１３および比較例１０の結果から、ｌｄｈＡ遺伝子を欠失した大腸菌株では、遺伝子欠失を施していない大腸菌株と比較し、酢酸に対するＡＤＡの生産比率が低下することが明らかとなった。また、参考例１４および比較例１２の結果から、ａｄｈＥ遺伝子を欠失した大腸菌株では、遺伝子欠失を施していない大腸菌株と比較し、酢酸に対するＡＤＡの生産比率が向上しないことが明らかとなった。

[0180] 参考例１３および実施例６の結果から、ｌｄｈＡ遺伝子を欠失し、ｉｃｌＲ遺伝子の発現を抑制した大腸菌株では、酢酸に対するＡＤＡの生産比率が向上することが示された。また、参考例１４および実施例７の結果から、ａｄｈＥ遺伝子を欠失し、ｉｃｌＲ遺伝子の発現を抑制した大腸菌株では、酢酸に対するＡＤＡの生産比率が向上することが示された。

[0181] 参考例１５　ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲプラスミドとｐＭＷ１１９：：Ｐｇａｐプラスミドを導入したＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ｓｔｒ．Ｋ－１２　ｓｕｂｓｔｒ．ＭＧ１６５５株の作製と培養

参考例５で作製したｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲプラスミドを導入したＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ｓｔｒ．Ｋ－１２　ｓｕｂｓ

ｔｒ．ＭＧ１６５５株に、ｐＭＷ１１９：：Ｐｇａｐプラスミドをエレクトロポレーションで導入した。導入後、当該株をカナマイシン２５μｇ／ｍＬとアンピシリン１００μｇ／ｍＬを含有するＬＢ寒天培地にて３７℃で培養した。

[0182] ｐＨ７に調整したカナマイシン２５μｇ／ｍＬとアンピシリン１００μｇ／ｍＬを含有するＬＢ培地（Ｂａｃｔｏトリプトン（Ｄｉｆｃｏ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ社製）１０ｇ／Ｌ、Ｂａｃｔｏ酵母エキス（Ｄｉｆｃｏ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ社製）５ｇ／Ｌ、塩化ナトリウム５ｇ／Ｌ）５ｍＬに、当該株を一白金耳植菌し、３０℃、１２０ｍｉｎ－１で２４時間振とう培養した。当該培養液０．０５ｍＬを試験管に入ったｐＨ６．５に調整したカナマイシン２５μｇ／ｍＬとアンピシリン１００μｇ／ｍＬを含有する培地Ｉ（グルコース１０ｇ／Ｌ、硫酸アンモニウム１ｇ／Ｌ、リン酸カリウム５０ｍＭ、硫酸マグネシウム０．０２５ｇ／Ｌ、硫酸鉄０．０６２５ｍｇ／Ｌ、硫酸マンガン２．７ｍｇ／Ｌ、塩化カルシウム０．３３ｍｇ／Ｌ、塩化ナトリウム１．２５ｇ／Ｌ、Ｂａｃｔｏトリプトン２．５ｇ／Ｌ、Ｂａｃｔｏ酵母エキス１．２５ｇ／Ｌ）５ｍＬに添加し、３０℃、１２０ｍｉｎ－１で２４時間振とう培養した。

[0183] 当該培養液より菌体を遠心分離した上清をＭｉｌｌｅｘ－ＧＶ（０．２２μｍ、ＰＶＤＦ、Ｍｅｒｃｋ社製）を用いて膜処理し、透過液をＨＰＬＣおよびＬＣ－ＭＳ／ＭＳにて分析した。培養上清中に蓄積した酢酸および３ＨＡの定量分析を行い、式（２）を用いて算出した酢酸に対する３ＨＡの生産比率を表４に示す。

[0184] ［ＨＰＬＣによる酢酸の定量分析条件］

参考例５に記載のＨＰＬＣによる酢酸の定量分析と同様の条件で実施した。

[0185] ［ＬＣ－ＭＳ／ＭＳによる３ＨＡの定量分析条件］

参考例５に記載のＬＣ－ＭＳ／ＭＳによる３ＨＡの定量分析と同様の条件で実施した。

[0186] 比較例１４　　ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲプラスミドとｐＭＷ１１９：：Ｐｇａｐプラスミドを導入した、ＩｄｈＡ遺伝子欠失Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ｓｔｒ．Ｋ－１２　ｓｕｂｓｔｒ．ＭＧ１６５５株の作製と培養

比較例２で作製したｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲプラスミドを導入したＩｄｈＡ遺伝子欠失Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ｓｔｒ．Ｋ－１２　ｓｕｂｓｔｒ．ＭＧ１６５５株に、ｐＭＷ１１９：：Ｐｇａｐプラスミドをエレクトロポレーションで導入した。導入後、当該株をカナマイシン２５μｇ／ｍＬとアンピシリン１００μｇ／ｍＬを含有するＬＢ寒天培地にて３７℃で培養した。

[0187] 当該株を参考例１５と同様の方法にて培養した後、参考例１５と同様の方法にて培養上清中に蓄積した酢酸および３ＨＡの定量分析を行い、式（２）を用いて算出した酢酸に対する３ＨＡの生産比率を表４に示す。

[0188] 比較例１５　　ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲプラスミドとｐＭＷ１１９：：ａｃｅＢプラスミドを導入したＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ｓｔｒ．Ｋ－１２　ｓｕｂｓｔｒ．ＭＧ１６５５株の作製と培養

参考例５で作製したｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲプラスミドを導入したＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ｓｔｒ．Ｋ－１２　ｓｕｂｓｔｒ．ＭＧ１６５５株に、ｐＭＷ１１９：：ａｃｅＢプラスミドをエレクトロポレーションで導入した。導入後、当該株をカナマイシン２５μｇ／ｍＬとアンピシリン１００μｇ／ｍＬを含有するＬＢ寒天培地にて３７℃で培養した。

[0189] 当該株を参考例１５と同様の方法にて培養した後、参考例１５と同様の方法にて培養上清中に蓄積した酢酸および３ＨＡの定量分析を行い、式（２）を用いて算出した酢酸に対する３ＨＡの生産比率を表４に示す。

[0190] 実施例８　　ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲプラスミドとｐＭＷ１１９：：ａｃｅＢプラスミドを導入した、ＩｄｈＡ遺伝子欠失Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ｓｔｒ．Ｋ－１２　ｓｕｂｓｔｒ．ＭＧ１６５５株

の作製と培養

比較例２で作製したｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲプラスミドを導入したＩｄｈＡ遺伝子欠失Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ｓｔｒ．Ｋ－１２　ｓｕｂｓｔｒ．ＭＧ１６５５株に、ｐＭＷ１１９：：ａｃｅＢプラスミドをエレクトロポレーションで導入した。導入後、当該株をカナマイシン２５μｇ／ｍＬとアンピシリン１００μｇ／ｍＬを含有するＬＢ寒天培地にて３７℃で培養した。

[0191] 当該株を参考例１５と同様の方法にて培養した後、参考例１５と同様の方法にて培養上清中に蓄積した酢酸および３ＨＡの定量分析を行い、式（２）を用いて算出した酢酸に対する３ＨＡの生産比率を表４に示す。

[0192] 比較例１６　ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲプラスミドとｐＭＷ１１９：：ａｃｅＫプラスミドを導入したＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ｓｔｒ．Ｋ－１２　ｓｕｂｓｔｒ．ＭＧ１６５５株の作製と培養

参考例５で作製したｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲプラスミドを導入したＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ｓｔｒ．Ｋ－１２　ｓｕｂｓｔｒ．ＭＧ１６５５株に、ｐＭＷ１１９：：ａｃｅＫプラスミドをエレクトロポレーションで導入した。導入後、当該株をカナマイシン２５μｇ／ｍＬとアンピシリン１００μｇ／ｍＬを含有するＬＢ寒天培地にて３７℃で培養した。

[0193] 当該株を参考例１５と同様の方法にて培養した後、参考例１５と同様の方法にて培養上清中に蓄積した酢酸および３ＨＡの定量分析を行い、式（２）を用いて算出した酢酸に対する３ＨＡの生産比率を表４に示す。

[0194] 実施例９　ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲプラスミドとｐＭＷ１１９：：ａｃｅＫプラスミドを導入した、ＩｄｈＡ遺伝子欠失Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ｓｔｒ．Ｋ－１２　ｓｕｂｓｔｒ．ＭＧ１６５５株の作製と培養

比較例２で作製したｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲプラスミドを導入したＩｄｈＡ遺伝子欠失Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ｓｔｒ．

Ｋ－１２　ｓｕｂｓｔｒ．ＭＧ１６５５株に、ｐＭＷ１１９：：ａｃｅＫプラスミドをエレクトロポレーションで導入した。導入後、当該株をカナマイシン２５μｇ／ｍＬとアンピシリン１００μｇ／ｍＬを含有するＬＢ寒天培地にて３７℃で培養した。

[0195] 当該株を参考例１５と同様の方法にて培養した後、参考例１５と同様の方法にて培養上清中に蓄積した酢酸および３ＨＡの定量分析を行い、式（２）を用いて算出した酢酸に対する３ＨＡの生産比率を表４に示す。

[0196] 参考例１６　ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲプラスミドとｐＭＷ１１９：：Ｐｇａｐプラスミドを導入したＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ｓｔｒ．Ｋ－１２　ｓｕｂｓｔｒ．Ｗ３１１０株の作製と培養

参考例６で作製したｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲプラスミドを導入したＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ｓｔｒ．Ｋ－１２　ｓｕｂｓｔｒ．Ｗ３１１０株に、ｐＭＷ１１９：：Ｐｇａｐプラスミドをエレクトロポレーションで導入した。導入後、当該株をカナマイシン２５μｇ／ｍＬとアンピシリン１００μｇ／ｍＬを含有するＬＢ寒天培地にて３７℃で培養した。

[0197] 当該株を参考例１５と同様の方法にて培養した後、参考例１５と同様の方法にて培養上清中に蓄積した酢酸および３ＨＡの定量分析を行い、式（２）を用いて算出した酢酸に対する３ＨＡの生産比率を表４に示す。

[0198] 比較例１７　ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲプラスミドとｐＭＷ１１９：：Ｐｇａｐプラスミドを導入した、ａｄｈＥ遺伝子欠失Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ｓｔｒ．Ｋ－１２　ｓｕｂｓｔｒ．Ｗ３１１０株の作製と培養

比較例３で作製したｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲプラスミドを導入したａｄｈＥ遺伝子欠失Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ｓｔｒ．Ｋ－１２　ｓｕｂｓｔｒ．Ｗ３１１０株に、ｐＭＷ１１９：：Ｐｇａｐプラスミドをエレクトロポレーションで導入した。導入後、当該株をカナマイシン２５μｇ／ｍＬとアンピシリン１００μｇ／ｍＬを含有するＬＢ寒天培地

にて３７℃で培養した。

[0199] 当該株を参考例１５と同様の方法にて培養した後、参考例１５と同様の方法にて培養上清中に蓄積した酢酸および３ＨＡの定量分析を行い、式（２）を用いて算出した酢酸に対する３ＨＡの生産比率を表４に示す。

[0200] 比較例１８　ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲプラスミドとｐＭＷ１１９：：ａｃｅＢプラスミドを導入したＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ｓｔｒ．Ｋ－１２　ｓｕｂｓｔｒ．Ｗ３１１０株の作製と培養

参考例６で作製したｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲプラスミドを導入したＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ｓｔｒ．Ｋ－１２　ｓｕｂｓｔｒ．Ｗ３１１０株に、ｐＭＷ１１９：：ａｃｅＢプラスミドをエレクトロポレーションで導入した。導入後、当該株をカナマイシン２５μｇ／ｍＬとアンピシリン１００μｇ／ｍＬを含有するＬＢ寒天培地にて３７℃で培養した。

[0201] 当該株を参考例１５と同様の方法にて培養した後、参考例１５と同様の方法にて培養上清中に蓄積した酢酸および３ＨＡの定量分析を行い、式（２）を用いて算出した酢酸に対する３ＨＡの生産比率を表４に示す。

[0202] 実施例１０　ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲプラスミドとｐＭＷ１１９：：ａｃｅＢプラスミドを導入した、ａｄｈＥ遺伝子欠失Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ｓｔｒ．Ｋ－１２　ｓｕｂｓｔｒ．Ｗ３１１０株の作製と培養

比較例３で作製したｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲプラスミドを導入したａｄｈＥ遺伝子欠失Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ｓｔｒ．Ｋ－１２　ｓｕｂｓｔｒ．Ｗ３１１０株に、ｐＭＷ１１９：：ａｃｅＢプラスミドをエレクトロポレーションで導入した。導入後、当該株をカナマイシン２５μｇ／ｍＬとアンピシリン１００μｇ／ｍＬを含有するＬＢ寒天培地にて３７℃で培養した。

[0203] 当該株を参考例１５と同様の方法にて培養した後、参考例１５と同様の方法にて培養上清中に蓄積した酢酸および３ＨＡの定量分析を行い、式（２）

を用いて算出した酢酸に対する３ＨＡの生産比率を表４に示す。

[0204] 比較例１９　　ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲプラスミドとｐＭＷ１１９：：ａｃｅＫプラスミドを導入したＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ｓｔｒ．Ｋ－１２　ｓｕｂｓｔｒ．Ｗ３１１０株の作製と培養

参考例６で作製したｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲプラスミドを導入したＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ｓｔｒ．Ｋ－１２　ｓｕｂｓｔｒ．Ｗ３１１０株に、ｐＭＷ１１９：：ａｃｅＫプラスミドをエレクトロポレーションで導入した。導入後、当該株をカナマイシン２５μｇ／ｍＬとアンピシリン１００μｇ／ｍＬを含有するＬＢ寒天培地にて３７℃で培養した。

[0205] 当該株を参考例１５と同様の方法にて培養した後、参考例１５と同様の方法にて培養上清中に蓄積した酢酸および３ＨＡの定量分析を行い、式（２）を用いて算出した酢酸に対する３ＨＡの生産比率を表４に示す。

[0206] 実施例１１　　ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲプラスミドとｐＭＷ１１９：：ａｃｅＫプラスミドを導入した、ａｄｈＥ遺伝子欠失Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ｓｔｒ．Ｋ－１２　ｓｕｂｓｔｒ．Ｗ３１１０株の作製と培養

比較例３で作製したｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲプラスミドを導入したａｄｈＥ遺伝子欠失Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ｓｔｒ．Ｋ－１２　ｓｕｂｓｔｒ．Ｗ３１１０株に、ｐＭＷ１１９：：ａｃｅＫプラスミドをエレクトロポレーションで導入した。導入後、当該株をカナマイシン２５μｇ／ｍＬとアンピシリン１００μｇ／ｍＬを含有するＬＢ寒天培地にて３７℃で培養した。

[0207] 当該株を参考例１５と同様の方法にて培養した後、参考例１５と同様の方法にて培養上清中に蓄積した酢酸および３ＨＡの定量分析を行い、式（２）を用いて算出した酢酸に対する３ＨＡの生産比率を表４に示す。

[0208]

[表4]

参考例・比較例・実施例	株	遺伝子欠失	遺伝子発現	3HA (g/L)	酢酸 (g/L)	3HA/酢酸 (生産比率)
参考例15	MG1655	ー	ー	0.44	1.50	0.294
比較例14	MG1655	ldhA	ー	0.43	1.49	0.288
比較例15	MG1655	ー	aceB	0.44	1.52	0.289
実施例8	MG1655	ldhA	aceB	0.43	1.37	0.313
比較例16	MG1655	ー	aceK	0.42	1.46	0.286
実施例9	MG1655	ldhA	aceK	0.45	1.43	0.315
参考例16	W3110	ー	ー	0.47	1.06	0.443
比較例17	W3110	adhE	ー	0.43	1.35	0.314
比較例18	W3110	ー	aceB	0.46	1.07	0.429
実施例10	W3110	adhE	aceB	0.45	1.02	0.448
比較例19	W3110	ー	aceK	0.44	0.99	0.440
実施例11	W3110	adhE	aceK	0.51	0.80	0.645

[0209] 参考例１５、１６および比較例１５、１８の結果から、遺伝子欠失を施していない大腸菌株では、ａｃｅＢ遺伝子の発現量の増大により、酢酸に対する３ＨＡの生産比率が低下することが明らかとなった。

[0210] 参考例１５、１６および比較例１６、１９の結果から、遺伝子欠失を施していない大腸菌株では、ａｃｅＫ遺伝子の発現量の増大により、酢酸に対する３ＨＡの生産比率が低下することが明らかとなった。

[0211] 参考例１５、１６および比較例１４、１７の結果から、ｌｄｈＡ遺伝子またはａｄｈＥ遺伝子を欠失した大腸菌株では、遺伝子欠失を施していない大腸菌株と比較し、酢酸に対する３ＨＡの生産比率が低下することが明らかとなった。

[0212] 参考例１５および実施例８、９の結果から、ｌｄｈＡ遺伝子を欠失し、ａｃｅＢ遺伝子またはａｃｅＫ遺伝子の発現量が増大した大腸菌株では、酢酸に対する３ＨＡの生産比率が向上することが示された。また、参考例１６および実施例１０、１１の結果から、ａｄｈＥ遺伝子を欠失し、ａｃｅＢ遺伝子またはａｃｅＫ遺伝子の発現量が増大した大腸菌株では、酢酸に対する３ＨＡの生産比率が向上することが示された。

請求の範囲

[請求項1] ３－ヒドロキシアジピン酸、α－ヒドロムコン酸および／またはアジピン酸を製造する能力を有する微生物において、グリオキシル酸回路を強化し、かつ、乳酸またはエタノール生成反応を低下させた、遺伝子改変微生物。

[請求項2] 前記グリオキシル酸回路の強化が、イソクエン酸リアーゼレプレッサーの機能の低下、リンゴ酸シンターゼの機能の強化および／またはイソクエン酸デヒドロゲナーゼキナーゼ／ホスファターゼの機能の強化である、請求項１に記載の遺伝子改変微生物。

[請求項3] 前記グリオキシル酸回路の強化が、以下の（ｉ）～（ｉｉｉ）のいずれかである、請求項１または２に記載の遺伝子改変微生物。

（ｉ）ｉｃｌＲ遺伝子の欠失、機能喪失変異または発現抑制によるイソクエン酸リアーゼレプレッサーの機能の低下

（ｉｉ）ａｃｅＢ遺伝子の発現量の増大によるリンゴ酸シンターゼの機能の強化

（ｉｉｉ）ａｃｅＫ遺伝子の発現量の増大によるイソクエン酸デヒドロゲナーゼキナーゼ／ホスファターゼの機能の強化。

[請求項4] 前記乳酸生成反応の低下が、乳酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子の欠失、機能喪失変異または発現抑制による低下である、請求項１～３のいずれか１項に記載の遺伝子改変微生物。

[請求項5] 前記乳酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子が、ｌｄｈＡ遺伝子である、請求項４に記載の遺伝子改変微生物。

[請求項6] 前記エタノール生成反応の低下が、アルコールデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子の欠失、機能喪失変異または発現抑制による低下である、請求項１～５のいずれか１項に記載の遺伝子改変微生物。

[請求項7] 前記アルコールデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子が、ａｄｈＥ遺伝子である、請求項６に記載の遺伝子改変微生物。

[請求項8] さらに３－オキソアジピル－ＣｏＡを還元して３－ヒドロキシアジ

ピル－ＣｏＡを生成する反応を強化した、請求項１～７のいずれか１項に記載の遺伝子改変微生物。

[請求項9] アセチル－ＣｏＡまたはピルビン酸から酢酸を生成する反応経路を維持する、請求項１～８のいずれか１項に記載の遺伝子改変微生物。

[請求項10] 請求項１から９のいずれか１項に記載の遺伝子改変微生物を培養する工程を含む、３－ヒドロキシアジピン酸、α－ヒドロムコン酸および／またはアジピン酸の製造方法。

[請求項11] 請求項１０に記載の方法により３－ヒドロキシアジピン酸および／またはα－ヒドロムコン酸を製造する工程、ならびに、水素化触媒の存在下、水素と反応させる工程（水素化工程）を含む、アジピン酸の製造方法。

[請求項12] 請求項１０または１１に記載の方法によりアジピン酸を製造する工程、ならびに、アジピン酸およびジアミンを重縮合する工程を含む、ポリアミドの製造方法。

[請求項13] 前記ジアミンが、１，４－ブタンジアミン、１，５－ペンタンジアミンまたはヘキサメチレンジアミンを含有するジアミンである、請求項１２に記載のポリアミドの製造方法。

[請求項14] 請求項１から９のいずれか１項に記載の遺伝子改変微生物を培養する工程から得られる、３－ヒドロキシアジピン酸、α－ヒドロムコン酸および／またはアジピン酸。

[請求項15] 請求項１０に記載の方法により３－ヒドロキシアジピン酸および／またはα－ヒドロムコン酸を製造する工程、ならびに、水素化触媒の存在下、水素と反応させる工程（水素化工程）を含む工程から得られる、アジピン酸。

[請求項16] 請求項１０または１１に記載の方法によりアジピン酸を製造する工程、ならびに、アジピン酸およびジアミンを重縮合する工程を含む工程から得られる、ポリアミド。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2024/018765

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/31(2006.01)i; ***C12N 1/21***(2006.01)i; ***C12N 15/53***(2006.01)i; ***C12P 7/44***(2006.01)i
FI: C12N15/31; C12N1/21 ZNA; C12N15/53; C12P7/44

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)

C12N15/00-15:90; C12N1/00-7/08; C12P1/00-41/00

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 1971-2024
Registered utility model specifications of Japan 1996-2024
Published registered utility model applications of Japan 1994-2024

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2009-191156 A (MITSUBISHI CHEMICAL CORPORATION) 27 August 2009 (2009-08-27) paragraphs [0054]-[0076]	14-16
A	paragraphs [0054]-[0076]	1-13
X	WO 2019/107516 A1 (TORAY INDUSTRIES, INC.) 06 June 2019 (2019-06-06) claims, paragraph [0002], examples	14-16
A	claims, paragraph [0002], examples	1-13
X	WO 2020/230718 A1 (TORAY INDUSTRIES, INC.) 19 November 2020 (2020-11-19) claims, paragraph [0002], examples	14-16
A	claims, paragraph [0002], examples	1-13
X	WO 2022/102635 A1 (TORAY INDUSTRIES, INC.) 19 May 2022 (2022-05-19) claims, examples	14
A	claims, examples	1-13, 15-16

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"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	Date of mailing of the international search report
31 July 2024	**13 August 2024**
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/JP2024/018765

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2008-513023 A (RICE UNIVERSITY) 01 May 2008 (2008-05-01) claims, paragraphs [0024]-[0034], fig. 1-2	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2024/018765

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.
   b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)),
      ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2024/018765

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP 2009-191156 A	27 August 2009	(Family: none)	
WO 2019/107516 A1	06 June 2019	US 2020/0291435 A1 claims, paragraph [0002], examples	
WO 2020/230718 A1	19 November 2020	US 2022/0213514 A1 claims, paragraph [0002], examples	
WO 2022/102635 A1	19 May 2022	US 2023/0392112 A1 claims, examples	
JP 2008-513023 A	01 May 2008	WO 2006/034156 A2 claims, paragraphs [0024]-[0034], fig. 1-2	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2024/018765

A.　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

C12N 15/31(2006.01)i; C12N 1/21(2006.01)i; C12N 15/53(2006.01)i; C12P 7/44(2006.01)i
FI: C12N15/31; C12N1/21 ZNA; C12N15/53; C12P7/44

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））

C12N15/00-15:90; C12N1/00-7/08; C12P1/00-41/00

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	１９７１－２０２４年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２４年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２４年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C.　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	JP 2009-191156 A (三菱化学株式会社) 27.08.2009 (2009-08-27) 段落［００５４］－［００７６］	14-16
A	段落［００５４］－［００７６］	1-13
X	WO 2019/107516 A1 (東レ株式会社) 06.06.2019 (2019-06-06) 請求の範囲、段落[0002]、実施例	14-16
A	請求の範囲、段落[0002]、実施例	1-13
X	WO 2020/230718 A1 (東レ株式会社) 19.11.2020 (2020-11-19) 請求の範囲、段落[0002]、実施例	14-16
A	請求の範囲、段落[0002]、実施例	1-13
X	WO 2022/102635 A1 (東レ株式会社) 19.05.2022 (2022-05-19) 請求の範囲、実施例	14
A	請求の範囲、実施例	1-13,15-16
A	JP 2008-513023 A (ライス　ユニバーシティー) 01.05.2008 (2008-05-01) 特許請求の範囲、段落［００２４］－［００３４］、図１－２	1-16

☐ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☑ パテントファミリーに関する別紙を参照。

*　引用文献のカテゴリー
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
“D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献
“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

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
31.07.2024	13.08.2024

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）

小林　薫 4B 6114

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2024/018765

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
b. ☐ 国際出願日後に、国際調査のために提出された配列表（ＰＣＴ規則13の3.1(a)）
☐ 配列表が出願時の国際出願の開示の範囲を超えるものではない旨の陳述書が添付されていた。

2. ☐ 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、この国際調査報告は、WIPO標準ST.26に準拠する配列表なしで有意義な国際調査をすることができる限度において作成された。

3. 補足意見:

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/JP2024/018765

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2009-191156 A	27.08.2009	（ファミリーなし）	
WO 2019/107516 A1	06.06.2019	US 2020/0291435 A1 Claims, 段落[0002], Examples	
WO 2020/230718 A1	19.11.2020	US 2022/0213514 A1 Claims, 段落[0002], Examples	
WO 2022/102635 A1	19.05.2022	US 2023/0392112 A1 Claims, Examples	
JP 2008-513023 A	01.05.2008	WO 2006/034156 A2 Claims, 段落[0024]-[0034],Figures 1-2	