(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
2009 年 10 月 29 日(29.10.2009)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2009/131186 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) *C12P 7/62* (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2009/058092

(22) 国際出願日: 2009 年 4 月 23 日(23.04.2009)

(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 2008-113127 2008 年 4 月 23 日(23.04.2008) JP
特願 2008-298765 2008 年 10 月 27 日(27.10.2008) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人北海道大学(National University Corporation Hokkaido University) [JP/JP]; 〒0600808 北海道札幌市北区北８条西５丁目８番地 Hokkaido (JP). トヨタ自動車株式会社(TOYOTA JIDOSHA KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒4718571 愛知県豊田市トヨタ町１番地 Aichi (JP). 株式会社豊田中央研究所(KABUSHIKI KAISHA TOYOTA CHUO KENKYUSHO) [JP/JP]; 〒4801192 愛知県愛知郡長久手町大字長湫字横道４１番地の１ Aichi (JP).

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 田口精一(TAGUCHI, Seiichi). 田島健次(TAJIMA, Kenji). 佐藤康治(SATOH, Yasuharu). 松本謙一郎(MATSUMOTO, Ken'ichiro). 山田美和(YAMADA, Miwa). 小畑充生(OBATA, Shusei) [JP/JP]; 〒4718571 愛知県豊田市トヨタ町１番地 トヨタ自動車株式会社内 Aichi (JP). 神戸浩美(KANBE, Hiromi) [JP/JP]; 〒4718571 愛知県豊田市トヨタ町１番地 トヨタ自動車株式会社内 Aichi (JP). 幸田勝典(KOHDA, Katsunori) [JP/JP]; 〒4801192 愛知県愛知郡長久手町大字長湫字横道４１番地の１ 株式会社豊田中央研究所内 Aichi (JP). 大野克博(OHNO, Katsuhiro) [JP/JP]; 〒4801192 愛知県愛知郡長久手町大字長湫字横道４１番地の１ 株式会社豊田中央研究所内 Aichi (JP). 嶋村隆(SHIMAMURA, Takashi) [JP/JP]; 〒4801192 愛知県愛知郡長久手町大字長湫字横道４１番地の１ 株式会社豊田中央研究所内 Aichi (JP).

(74) 代理人: 平木祐輔, 外(HIRAKI, Yusuke et al.); 〒1050001 東京都港区虎ノ門４丁目３番２０号 神谷町ＭＴビル１９階 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, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,

[続葉有]

(54) **Title**: METHOD FOR PRODUCTION OF POLYESTER COPOLYMER USING GENETICALLY MODIFIED MICROORGANISM

(54) 発明の名称: 組み換え微生物を用いた共重合ポリエステルの製造方法

(57) **Abstract**: Disclosed is a method for producing a polyester copolymer comprising 3HB and LA with high efficiency by the microbial fermentation using a sugar as a raw material. Specifically disclosed is a method for producing a polyester copolymer comprising hydroxybutyric acid and lactic acid, which comprises the following steps 1) and 2): 1) culturing a genetically modified microorganism carrying a protein capable of catalyzing the reaction for transferring CoA into propionic acid and/or lactic acid, a protein capable of catalyzing the reaction for producing acetoacetyl-CoA from two acetyl-CoA molecules, a protein capable of catalyzing the reduction reaction of acetoacetyl-CoA, and a protein capable of catalyzing the synthetic reaction of a polyhydroxyalkanoic acid and comprising an amino acid sequence selected from the following amino acid sequences a) and b) in a culture medium containing a carbon source: a) an amino acid sequence having the substitution of at least one of the amino acid residues located at position-130, position-325, position-477 and position-481 by another amino acid residue in the amino acid sequence depicted in SEQ ID NO:2; and b) an amino acid sequence additionally having the deletion or substitution of at least one amino acid residue other than the amino acid residues located at position-130, position-325, position-477 and position-481 or the insertion of at least one amino acid residue in the protein defined in item a); and 2) collecting the polyester copolymer from the culture obtained in step 1). The method enables the efficient production of polyester copolymer composed of 3HB and LA by using an inexpensive carbon source as a raw material, and can achieve the reduction in the cost for production of a biodegradable plastic.

(57) 要約: 本発明は、３ＨＢとＬＡとを含む共重合ポリエステルを、糖を原料とした微生物発酵によって効率よく生産する方法を提供することを目的とする。 ヒドロキシ酪酸と乳酸とからなる共重合ポリエステルの製造方法であって、１）プロピオン酸及び／又は乳酸にＣｏＡが転移される反応を触媒するタンパク質、２分子のアセチルＣｏＡからアセトアセチルＣｏＡが形成される反応を触媒するタンパク質、アセトアセチルＣｏＡの還元反応を触媒するタンパク質、及び下記のａ）又はｂ）のアミノ酸配列からなるポリヒドロキシアルカン酸の合成反応を触媒するタンパク質を有する組み換え微生物を、炭素源を含む培地で培養する工程： ａ）配列番号２に示されるアミノ酸配列の１３０番目、３２５番目、４７７番目及び４８１番目のアミノ酸の少なくとも１以上が他のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列ｂ） ａ）に規定されるタンパク質において、さらに１３０番目、３２５番目、４７７番目及び４８１番目以外の少なくとも１以上のアミノ酸が欠失若しくは置換され、又は１以上のアミノ酸残基が挿入されたアミノ酸配列、 及び、２）工程１）の培養物から前記共重合ポリエステルを回収する工程を含む、前記共重合ポリエステルの製造方法。本発明の製造方法は、安価な炭素源を原料として、３ＨＢとＬＡとからなる共重合ポリエステルを効率的に製造することができ、生分解性プラスチックの製造コストを低くすることができる。

WO 2009/131186 A1

MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, 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)）

明　細　書

発明の名称 ：

組み換え微生物を用いた共重合ポリエステルの製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、組み換え微生物を用いた共重合ポリエステルの製造方法に関する。

背景技術

[0002] 糖を炭素源としてポリエステルを生産する能力を有する微生物は、これまでにも多数報告されている（非特許文献１）。微生物が生産するポリエステルは、自然界で容易に分解される生分解性プラスチックとして、また糖や植物油などの再生可能な炭素資源から合成することができる“グリーン”プラスチックとして、注目されている。

[0003] 微生物が生産する生分解性プラスチックの代表例は、３－ヒドロキシ酪酸（３ＨＢ）をモノマーとするポリ－３－ヒドロキシ酪酸（ｐｏｌｙｈｙｄｏｒｏｘｙｂｕｔｙｌａｔｅ、ＰＨＢ）である。ＰＨＢは、１８０℃程度に融解温度をもつ熱可塑性高分子であり、生分解性に加えて溶融加工性に優れるという利点を有する。その一方、ＰＨＢは、結晶性が高いために、硬くて脆い、すなわち耐衝撃性に劣るという物性上の問題を抱えている。

[0004] ＰＨＢの物性上の問題を解消する方法の一つとして、３ＨＢとその他のヒドロキシアルカン酸とからなる共重合ポリエステルを、微生物を用いて製造する方法が開発されている。

[0005] 例えば、特許文献１には３ＨＢと３－ヒドロキシ吉草酸（３ＨＶ）とからなる共重合体の製造方法が開示されている。また特許文献２には、メチロバクテリウム属（Ｍｅｔｈｙｌｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｓｐ．）、パラコッカス属（Ｐａｒａｃｏｃｃｕｓ ｓｐ．）、アルカリゲネス属（Ａｌｃａｌｉｇｅｎｅｓ ｓｐ．）、シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ｓｐ．）の微生物を、炭素数３から７の第一アルコールに接触させることにより、３Ｈ

Ｂと３ＨＶとの共重合体を生産させる方法が開示されている。

[0006] この３ＨＢと３ＨＶとの共重合体はＰＨＢに比べると柔軟性に富み、また共重合ポリエステル中の３ＨＶの含有率が増加すると柔軟性が高まることが確認されている。上記の微生物を用いた３ＨＢと３ＨＶとの共重合体の製造法では、例えば前記特許文献１ではプロピオン酸を、また特許文献３ではプロパン－１－オールをそれぞれ培地に添加することで、共重合ポリエステル中の３ＨＶの含有率を制御している。

[0007] ３ＨＢと３－ヒドロキシヘキサン酸（以下、３ＨＨと略す）との２成分共重合ポリエステルであるＰ（３ＨＢ－ｃｏ－３ＨＨ）およびその製造方法も、例えば、特許文献４及び特許文献５にそれぞれ記載されている。これらの公報のＰ（３ＨＢ－ｃｏ－３ＨＨ）共重合体の製造方法は、土壌より単離されたアエロモナス・キャビエ（Ａｅｒｏｍｏｎａｓ ｃａｖｉａｅ）を用い、オレイン酸等の脂肪酸やオリーブオイル等の油脂から発酵生産するものである。また、このＡ．ｃａｖｉａｅのＰＨＡシンターゼ遺伝子をクローニングし、この遺伝子をアルカリゲネス ユートロファス（Ａｌｃａｌｉｇｅｎｅｓ ｅｕｔｒｏｐｈｕｓ）に導入した組換え株を用いて、脂肪酸を炭素源としてＰ（３ＨＢ－ｃｏ－３ＨＨ）を生産する報告もなされている（特許文献６）。

[0008] また、上記の共重合ポリエステルの微生物を用いた製造法では、何れの場合にも、直接ポリマーを合成する活性を有する酵素タンパク質であるポリヒドロキシアルカン酸合成酵素を使用することが必要であるが、この合成酵素を改変して、モノマー単位のモル分率を調節する試みも行われている。例えば特許文献７は、シュードモナス・スピーシーズ（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ｓｐ．）６１－３として同定されている微生物のポリヒドロキシアルカン酸合成酵素のアミノ酸配列を変換して、３ＨＢの含有率が高いＰＨＢを生産する変異酵素を開示している。

[0009] 以上は、３－ヒドロキシアルカン酸をモノマー単位とする共重合ポリエステルと、微生物を用いたその製造法である。一方、３－ヒドロキシアルカン

酸以外の成分をモノマー単位とする共重合ポリエステルは、上記の共重合ポリエステルとは異なる物性を有することが期待される。特許文献８は、その様な３－ヒドロキシアルカン酸以外のモノマー単位を含む共重合ポリエステルの例として、クロストリジウム　プロピオニウム（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｐｒｏｐｉｏｎｉｃｕｍ）のプロピオニルＣｏＡトランスフェラーゼをコードする核酸を組み込んだラルストニア・ユートロファ（Ｒａｌｓｔｏｎｉａ　ｅｕｔｒｏｐｈａ、旧名アルカリゲネス　ユートロファス（Ａｌｃａｌｉｇｅｎｅｓ ｅｕｔｒｏｐｈｕｓ））を、培地に乳酸を添加しながら培養して、３ＨＢと乳酸（ＬＡ）とからなる共重合ポリエステルを製造する方法を開示している。また、同文献は、Ｃ．ｐｒｏｐｉｏｎｉｕｍ由来のプロピオニルＣｏＡトランスフェラーゼをコードする核酸と、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ｓｐ．６１－３由来のポリヒドロキシアルカン酸合成酵素をコードする核酸とを組み込んだ大腸菌を、培地に乳酸とデセノイン酸を添加しながら培養して、３－ヒドロキシヘキサノエート、３－ヒドロキシオクタノエート、３－ヒドロキシデカノエート及び乳酸からなるコポリマーを製造する方法も開示している。

[0010] しかし、培地に乳酸やデセノイン酸などのモノマー成分を添加してポリヒドロキシアルカン酸を合成する方法は、原料コストの面で不利である。また一般に共重合ポリエステルの微生物による製造は、ポリマー生産性及び炭素源収率が低いため、安価な天然物等を炭素源として利用した場合においても、生産性乃至収率の向上は製造コストの削減にとって重要な課題である。

非特許文献1：「生分解性プラスチックハンドブック」、生分解性プラスチック研究会編、１９９５年、第１７８－１９７頁、（株）エヌ・ティー・エス発行）

特許文献1：特開昭５７－１５０３９３号公報

特許文献2：特開平５－７４４９２号公報

特許文献3：特公平７－７９７０５号公報

特許文献4：特開平５－９３０４９号公報

特許文献5：特開平７－２６５０６５号公報

特許文献6：特開平１０－１０８６８２号公報

特許文献7：国際公開公報ＷＯ２００３／１０００５５

特許文献8：国際公開公報ＷＯ２００６／１２６７９６

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0011] 本発明は、３ＨＢと３ヒドロキシアルカン酸以外のモノマー単位であるＬＡとを含む共重合ポリエステルを、糖を原料とした微生物発酵によって効率よく生産する方法を提供することを目的とする。また、ポリエステル中の３ＨＢのモル分率を、使用される酵素の特性によって制御し、又は特定の宿主を選択したり培養条件を調節したりすることで、ＬＡを様々なモル分率で有する共重合ポリエステルの製造方法を提供することを目的とするものである。また本発明は、ＬＡと３ＨＢ以外のモノマー単位をさらに含む共重合ポリエステルを、糖を原料とした微生物発酵によって効率よく生産する方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0012] 本発明者らは、前記非特許文献７に記載のポリヒドロキシアルカン酸合成酵素の変異体をコードする核酸を導入した組み換え微生物が、糖から直接的に３ＨＢとＬＡとからなる共重合ポリエステルを効率的に製造することができることを見いだし、共重合中のＬＡのモル分率を調節できること、さらには培地中に３ＨＢとＬＡ以外のモノマー成分の前駆体を供給することでＬＡと３ＨＢ以外のモノマー単位をさらに含む共重合ポリエステルを効率的に製造することができることを見いだし、下記の各発明を完成した。

[0013] （１）３－ヒドロキシ酪酸と乳酸とからなる共重合ポリエステルの製造方法であって、１）プロピオン酸及び／又は乳酸にＣｏＡが転移される反応を触媒するタンパク質、２分子のアセチルＣｏＡからアセトアセチルＣｏＡが形成される反応を触媒するタンパク質、アセトアセチルＣｏＡの還元反応を触媒するタンパク質、及び下記のａ）又はｂ）のアミノ酸配列からなるポリヒ

ドロキシアルカン酸の合成反応を触媒するタンパク質を有する組み換え微生物を、炭素源を含む培地で培養する工程：

ａ）配列番号２に示されるアミノ酸配列の１３０番目、３２５番目、４７７番目及び４８１番目のアミノ酸の少なくとも１以上が他のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列

ｂ）ａ）に規定されるタンパク質において、さらに１３０番目、３２５番目、４７７番目及び４８１番目以外の少なくとも１以上のアミノ酸が欠失若しくは置換され、又は1以上のアミノ酸残基が挿入されたアミノ酸配列、

及び、２）工程１）の培養物から前記共重合ポリエステルを回収する工程を含む、前記共重合ポリエステルの製造方法。

[0014] （２）プロピオン酸及び／又は乳酸にＣｏＡが転移される反応を触媒するタンパク質のアミノ酸配列が、配列番号４に示されるアミノ酸配列、又は配列番号４に示されるアミノ酸配列において１若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列である、（１）に記載の製造方法。

[0015] （３）２分子のアセチルＣｏＡからアセトアセチルＣｏＡが形成される反応を触媒するタンパク質のアミノ酸配列が、配列番号６に示されるアミノ酸配列、又は配列番号６に示されるアミノ酸配列において１若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列である、（１）に記載の製造方法。

[0016] （４）アセトアセチルＣｏＡの還元反応を触媒するタンパク質のアミノ酸配列が、配列番号８に示されるアミノ酸配列、又は配列番号８に示されるアミノ酸配列において１又は数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列である、（１）に記載の製造方法。

[0017] （５）ポリヒドロキシアルカン酸の合成反応を触媒するタンパク質のアミノ酸配列が、配列番号２に示されるアミノ酸配列の３２５番目及び４８１番目のアミノ酸がそれぞれ他のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列である、（１）に記載の製造方法。

[0018] （６）ポリヒドロキシアルカン酸の合成反応を触媒するタンパク質のアミノ

酸配列が、配列番号２に示されるアミノ酸配列の３２５番目と４８１番目のアミノ酸が同時に置換されたアミノ酸配列である、（５）に記載の製造方法。

[0019] （７）ポリヒドロキシアルカン酸の合成反応を触媒するタンパク質のアミノ酸配列が、配列番号２に示されるアミノ酸配列の３２５番目のＳｅｒがＴｈｒに、４８１番目のＧｌｎがＬｙｓにそれぞれ置換されたアミノ酸配列である、（６）に記載の製造方法。

[0020] （８）前記タンパク質のいずれもが、微生物に導入された組み換え発現ベクターにコードされているタンパク質である、（１）に記載の製造方法。

[0021] （９）組み換え微生物の培養が嫌気条件下に行われる、（１）～（８）の何れかに記載の製造方法。

[0022] （１０）微生物が乳酸蓄積能を有する微生物である、（１）～（９）の何れかに記載の製造方法。

[0023] （１１）高乳酸蓄積能を有する微生物が、大腸菌Ｊｗ２２９３株、Ｊｗ０８８５株又はＪｗ０８８６株である、（１０）に記載の製造方法。

[0024] （１２）３－ヒドロキシ酪酸と乳酸を含む共重合ポリエステルの製造方法であって、１）プロピオン酸及び／又は乳酸にＣｏＡが転移される反応を触媒するタンパク質、２分子のアセチルＣｏＡからアセトアセチルＣｏＡが形成される反応を触媒するタンパク質、アセトアセチルＣｏＡの還元反応を触媒するタンパク質、及び下記のａ）又はｂ）のアミノ酸配列からなるポリヒドロキシアルカン酸の合成反応を触媒するタンパク質を有する組み換え微生物を、３－ヒドロキシ酪酸と乳酸以外のヒドロキシアルカン酸及び炭素源を含む培地で培養する工程：

ａ）配列番号２に示されるアミノ酸配列の１３０番目、３２５番目、４７７番目及び４８１番目のアミノ酸の少なくとも１以上が他のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列

ｂ）ａ）に規定されるタンパク質において、さらに１３０番目、３２５番目、４７７番目及び４８１番目以外の少なくとも１以上のアミノ酸が欠失若

しくは置換され、又は1以上のアミノ酸残基が挿入されたアミノ酸配列、及び、２）工程１）の培養物から前記共重合ポリエステルを回収する工程を含む、前記共重合ポリエステルの製造方法。

[0025] （１３）プロピオン酸及び／又は乳酸にＣｏＡが転移される反応を触媒するタンパク質のアミノ酸配列が、配列番号４に示されるアミノ酸配列、又は配列番号４に示されるアミノ酸配列において１若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列である、（１２）に記載の製造方法。

[0026] （１４）２分子のアセチルＣｏＡからアセトアセチルＣｏＡが形成される反応を触媒するタンパク質のアミノ酸配列が、配列番号６に示されるアミノ酸配列、又は配列番号６に示されるアミノ酸配列において１若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列である、（１２）に記載の製造方法。

[0027] （１５）アセトアセチルＣｏＡの還元反応を触媒するタンパク質のアミノ酸配列が、配列番号８に示されるアミノ酸配列、又は配列番号８に示されるアミノ酸配列において１又は数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列である、（１２）に記載の製造方法。

[0028] （１６）ポリヒドロキシアルカン酸の合成反応を触媒するタンパク質のアミノ酸配列が、配列番号２に示されるアミノ酸配列の３２５番目及び４８１番目のアミノ酸がそれぞれ他のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列である、（１２）に記載の製造方法。

[0029] （１７）ポリヒドロキシアルカン酸の合成反応を触媒するタンパク質のアミノ酸配列が、配列番号２に示されるアミノ酸配列の３２５番目と４８１番目のアミノ酸が同時に置換されたアミノ酸配列である、（１２）に記載の製造方法。

[0030] （１８）ポリヒドロキシアルカン酸の合成反応を触媒するタンパク質のアミノ酸配列が、配列番号２に示されるアミノ酸配列の３２５番目のＳｅｒがＴｈｒに、４８１番目のＧｌｎがＬｙｓにそれぞれ置換されたアミノ酸配列で

ある、（１６）又は（１７）に記載の製造方法。

[0031] （１９）前記タンパク質のいずれもが、微生物に導入された組み換え発現ベクターにコードされているタンパク質である、（１２）に記載の製造方法。

[0032] （２０）３－ヒドロキシ酪酸と乳酸以外のヒドロキシアルカン酸の前駆体が、プロピオン酸、吉草酸、ドデカン酸、４－ヒドロキシブタン酸及び４－ヒドロキシ吉草酸よりなる群から選ばれる一種以上の前駆体である、（１２）～（１９）のいずれかに記載の製造方法。

[0033] （２１）組み換え微生物の培養が嫌気条件下に行われる、（１２）～（２０）の何れかに記載の製造方法。

[0034] （２２）微生物が乳酸蓄積能を有する微生物である、（１２）～（２１）の何れかに記載の製造方法。

[0035] （２３）高乳酸蓄積能を有する微生物が、大腸菌Ｊｗ２２９３株、Ｊｗ０８８５株又はＪｗ０８８６株である、（２２）に記載の製造方法。

[0036] （２４）プロピオン酸及び／又は乳酸にＣｏＡが転移される反応を触媒するタンパク質、２分子のアセチルＣｏＡからアセトアセチルＣｏＡが形成される反応を触媒するタンパク質、アセトアセチルＣｏＡの還元反応を触媒するタンパク質、及び下記のａ）又はｂ）のアミノ酸配列からなるポリヒドロキシアルカン酸の合成反応を触媒するタンパク質を発現する組み換え微生物。

[0037] ａ）配列番号２に示されるアミノ酸配列の１３０番目、３２５番目、４７７番目及び４８１番目のアミノ酸の少なくとも１以上が他のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列

ｂ）ａ）に規定されるタンパク質において、さらに１３０番目、３２５番目、４７７番目及び４８１番目以外の少なくとも１以上のアミノ酸が欠失若しくは置換され、又は1以上のアミノ酸残基が挿入されたアミノ酸配列

（２５）プロピオン酸及び／又は乳酸にＣｏＡが転移される反応を触媒するタンパク質のアミノ酸配列が、配列番号４に示されるアミノ酸配列、又は配列番号４に示されるアミノ酸配列において１若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列である、（２４）に記載の組み換え

微生物。

[0038] （２６）２分子のアセチルＣｏＡからアセトアセチルＣｏＡが形成される反応を触媒するタンパク質のアミノ酸配列が、配列番号６に示されるアミノ酸配列、又は配列番号６に示されるアミノ酸配列において１若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列である、（２４）に記載の組み換え微生物。

[0039] （２７）アセトアセチルＣｏＡの還元反応を触媒するタンパク質のアミノ酸配列が、配列番号８に示されるアミノ酸配列、又は配列番号８に示されるアミノ酸配列において１又は数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列である、（２４）に記載の組み換え微生物。

[0040] （２８）ポリヒドロキシアルカン酸の合成反応を触媒するタンパク質のアミノ酸配列が、配列番号２に示されるアミノ酸配列の３２５番目及び４８１番目のアミノ酸がそれぞれ他のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列である、（２４）に記載の組み換え微生物。

[0041] （２９）ポリヒドロキシアルカン酸の合成反応を触媒するタンパク質のアミノ酸配列が、配列番号２に示されるアミノ酸配列の３２５番目と４８１番目のアミノ酸が同時に置換されたアミノ酸配列である、（２４）に記載の組み換え微生物。

[0042] （３０）ポリヒドロキシアルカン酸の合成反応を触媒するタンパク質のアミノ酸配列が、配列番号２に示されるアミノ酸配列の３２５番目のＳｅｒがＴｈｒに、４８１番目のＧｌｎがＬｙｓにそれぞれ置換されたアミノ酸配列である、（２８）又は（２９）に記載の組み換え微生物。

[0043] （３１）前記タンパク質のいずれもが、微生物に導入された組み換え発現ベクターにコードされているタンパク質である、（２４）に記載の組み換え微生物。

[0044] （３２）微生物が乳酸蓄積能を有する微生物である、（２４）～（３１）のいずれかに記載の組み換え微生物。

[0045] （３３）高乳酸蓄積能を有する微生物が、大腸菌Ｊｗ２２９３株、Ｊｗ０８

８５株又はＪｗ０８８６株である、（３２）に記載の組み換え微生物。

発明の効果

[0046] 本発明の製造方法は、安価な炭素源を原料として、３ＨＢとＬＡとからなる共重合ポリエステルを効率的に製造することができ、生分解性プラスチックの製造コストを低くすることができる。また、使用される酵素を選択したり、ＬＡの高生産性微生物を宿主としたり、微生物の培養を嫌気条件下で行ったりすることで３ＨＢとＬＡとからなる共重合ポリエステルにおけるモノマー単位の含有率を調節することができる。また、培地に３ＨＢとＬＡ以外のヒドロキシアルカン酸を培地に加えることにより、３ＨＢとＬＡ以外のモノマー単位をさらに含む共重合ポリエステル製造することができる。

[0047] 本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願2008-113127号、2008-298765号の明細書および／または図面に記載される内容を包含する。

図面の簡単な説明

[0048] [図1]組換えプラスミドｐＴＶ１１８ＮＰＣＴＣ１（ＳＴ／ＱＫ）ＡＢの構成を示す概略図である。図中、ｐｈａＡはＲ．ユートロファ（Ｒ．ｅｕｔｒｏｐｈａ）由来のβＫＴ遺伝子を、ｐｈａＢはＲ．ユートロファ（Ｒ．ｅｕｔｒｏｐｈａ）由来のＡＡＣｏＡ－Ｒ遺伝子を、ｐｈａＣ１（ＳＴ／ＱＫ）はＳＴＱＫ遺伝子を、ＰＣＴはＭ．エルスデニ（Ｍ．ｅｌｓｄｅｎｉｉ）由来のＰｃｔ遺伝子を、ＰＲｅはＲ．ユートロファ（Ｒ．ｅｕｔｒｏｐｈａ）由来プロモーターを、及びＰｌａｃは大腸菌ラクトースオペロンプロモーターを、それぞれ表す。

[図2]実施例１で調製したポリマーの分子量分布曲線である。

[図3]実施例１で調製したポリマーの熱分析の測定結果を表わすグラフである。

[図4]実施例１で調製したポリマーのＧＣ／ＭＳ分析の結果を表わすチャートである。

[図5]実施例１で調製したポリマーの^{1}Ｈ－ＮＭＲスペクトル分析の結果を表わすチャートである。

[図6]実施例１で調製したポリマーの^{13}Ｃ－ＮＭＲスペクトル分析の結果を表わすチャートである。

[図7]実施例１で調製したポリマーの^{1}Ｈ^{1}Ｈ－ＮＭＲスペクトル分析の結果を表わすチャートである。

[図8]実施例１で調製したポリマーの^{13}Ｃ^{1}Ｈ－ＮＭＲスペクトル分析の結果を表わすチャートである。

[図9]組換えプラスミドｐＴＶ１１８ＮＰＣＴＣ（Ｒｅ）ＡＢ、ｐＴＶ１１８ＮＰＣＴＣ（Ｂｃ）ＡＢ、ｐＴＶ１１８ＮＰＣＴＣ１（ＷＴ）ＡＢ、ｐＴＶ１１８ＮＰＣＴＣ２ＡＢの構成を示す概略図である。

[図10]比較例で調製されたｐＴＶ１１８ＮＰＣＴＣ（Ｒｅ）ＡＢ及びｐＴＶ１１８ＮＰＣＴＣ（Ｂｃ）の各ポリマーのＧＣ／ＭＳ分析の結果を表わすチャートである。パネルＡがｐＴＶ１１８ＮＰＣＴＣ（Ｒｅ）ＡＢのチャート、パネルＢがｐＴＶ１１８ＮＰＣＴＣ（Ｂｃ）のチャート、パネルＣがｐＴＶ１１８ＮＰＣＴＣ２ＡＢのチャートである。

[図11a]実施例２で調製したＬＡ高蓄積性大腸菌Ｊｗ２２９３株由来のポリマーの分子量分布曲線である。

[図11b]実施例２で調製したＬＡ高蓄積性大腸菌Ｊｗ０８８５株由来のポリマーの分子量分布曲線である。

[図11c]実施例２で調製したＬＡ高蓄積性大腸菌Ｊｗ０８８６株由来のポリマーの分子量分布曲線である。

[図12a]実施例２で調製したＬＡ高蓄積性大腸菌Ｊｗ２２９３株由来のポリマーの熱分析の測定結果を表わすグラフである。

[図12b]実施例２で調製したＬＡ高蓄積性大腸菌Ｊｗ０８８５株由来のポリマーの熱分析の測定結果を表わすグラフである。

[図12c]実施例２で調製したＬＡ高蓄積性大腸菌Ｊｗ０８８６株由来のポリマーの熱分析の測定結果を表わすグラフである。

[図13a]実施例２で調製したＬＡ高蓄積性大腸菌Ｊｗ２２９３株由来のポリマーのＧＣ／ＭＳ分析の結果を表わすチャートである。

[図13b]実施例２で調製したＬＡ高蓄積性大腸菌Ｊｗ０８８５株由来のポリマーのＧＣ／ＭＳ分析の結果を表わすチャートである。

[図13c]実施例２で調製したＬＡ高蓄積性大腸菌Ｊｗ０８８６株由来のポリマーのＧＣ／ＭＳ分析の結果を表わすチャートである。

[図14a]実施例２で調製したＬＡ高蓄積性大腸菌Ｊｗ２２９３株由来のポリマーの^{1}Ｈ－ＮＭＲスペクトル分析の結果を表わすチャートである。

[図14b]実施例２で調製したＬＡ高蓄積性大腸菌Ｊｗ０８８５株由来のポリマーの^{1}Ｈ－ＮＭＲスペクトル分析の結果を表わすチャートである。

[図14c]実施例２で調製したＬＡ高蓄積性大腸菌Ｊｗ０８８６株由来のポリマーの^{1}Ｈ－ＮＭＲスペクトル分析の結果を表わすチャートである。

[図15a]実施例２で調製したＬＡ高蓄積性大腸菌Ｊｗ２２９３株由来のポリマーの^{13}Ｃ－ＮＭＲスペクトル分析の結果を表わすチャートである。

[図15b]実施例２で調製したＬＡ高蓄積性大腸菌Ｊｗ０８８６株由来のポリマーの^{13}Ｃ－ＮＭＲスペクトル分析の結果を表わすチャートである。

[図15c]実施例２で調製したＬＡ高蓄積性大腸菌Ｊｗ０８８６株由来のポリマーの^{13}Ｃ－ＮＭＲスペクトル分析の結果を表わすチャートである。

[図16]組換えプラスミドｐＡＣＹＣ１１７ＡＢの構成を示す概略図である。

[図17]実施例３で調製したポリマーの分子量分布曲線である。

[図18]実施例３で調製したポリマーの熱分析の測定結果を表わすグラフである。

[図19]実施例３で調製したポリマーのＧＣ／ＭＳ分析の結果を表わすチャートである。

[図20]実施例３で調製したポリマーの^{1}Ｈ－ＮＭＲスペクトル分析の結果を表わすチャートである。

[図21]実施例３で調製したポリマーの^{13}Ｃ－ＮＭＲスペクトル分析の結果を表わすチャートである。

[図22]実施例３で調製したポリマーの^{1}Ｈ^{13}Ｃ－ＮＭＲスペクトル分析の結果を表わすチャートである。

[図23]標準物質であるポリ乳酸のＨＰＬＣチャートである。

[図24]標準物質であるポリ［ヒドロキシ酪酸（ＨＢ）－ｃｏ－ヒドロキシ吉草酸（ＨＶ）－ｃｏ－ヒドロキシヘキサン酸（ＨＨｘ）］（ＨＢ：７０ｍｏｌ％、ＨＶ：２３ｍｏｌ％、ＨＨｘ：７ｍｏｌ％）のＨＰＬＣチャートである。

[図25]実施例４で得られたポリマーのＨＰＬＣチャートである。

符号の説明

[0049] ｐｈａＡ：Ｒ．ユートロファ由来βＫＴ遺伝子

ｐｈａＢ：Ｒ．ユートロファ由来ＡＡＣｏＡ－Ｒ遺伝子

ｐｈａＣ（Ｒｅ）：Ｒ．ユートロファ由来ポリヒドロキシアルカン酸合成酵素遺伝子

ｐｈａＣ（Ｂｃ）：Ｂ．セレウス由来ポリヒドロキシアルカン酸合成酵素遺伝子

ｐｈａＣ１（ＷＴ）：シュードモナスｓｐ．６１－３由来ポリヒドロキシアルカン酸合成酵素遺伝子（野生型）

ｐｈａＣ２：シュードモナスｓｐ．６１－３由来ポリヒドロキシアルカン酸合成酵素２遺伝子

ＰＣＴ：Ｍ．エルスデニ由来Ｐｃｔ遺伝子

ＰＲｅ：アルカリゲネス・ユウトロファス由来プロモーター

Ｐｌａｃ：ラクトースオペロンプロモーター

発明を実施するための最良の形態

[0050] 本発明は、１）プロピオン酸及び／又は乳酸にＣｏＡが転移される反応を触媒するタンパク質と、２分子のアセチルＣｏＡからアセトアセチルＣｏＡが形成される反応を触媒するタンパク質、アセトアセチルＣｏＡの還元反応を触媒するタンパク質と、下記のａ）又はｂ）のアミノ酸配列からなるポリヒドロキシアルカン酸の合成反応を触媒するタンパク質を有する組み換え微生物を、炭素源を含む培地で培養する工程：

ａ）配列番号２に示されるアミノ酸配列の１３０番目、３２５番目、４７

７番目及び４８１番目のアミノ酸の少なくとも１以上が他のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列

ｂ）ａ）に規定されるタンパク質において、さらに１３０番目、３２５番目、４７７番目及び４８１番目以外の少なくとも１以上のアミノ酸が欠失若しくは置換され、又は1以上のアミノ酸残基が挿入されたアミノ酸配列、

及び２）前記工程１）の培養物から前記共重合ポリエステルを回収する工程を含む、３ＨＢとＬＡとからなる共重合ポリエステルの製造方法である。以下、本発明で使用されるタンパク質、組み換え微生物、及び本発明の製造方法の諸条件について、説明する。

[0051] １）プロピオン酸及び／又は乳酸（ＬＡ）にＣｏＡが転移される反応を触媒するタンパク質

本発明で使用される「プロピオン酸及び／又はＬＡにＣｏＡが転移される反応を触媒するタンパク質」は、適当なＣｏＡ基質からプロピオン酸及び／又はＬＡにＣｏＡが転移される反応を触媒する活性を有するタンパク質である。かかる活性を有するタンパク質は、一般にプロピオニルＣｏＡトランスフェラーゼ（ＰｒｏｐｉｏｎｙｌＣｏＡ　Ｔｒａｎｓｆｅｒａｓｅ、Ｐｃｔ）と称されている。以下、本発明では、当該タンパク質をＰｃｔと表すこととする。

[0052] 表１に、これまでに報告されたＰｃｔの由来（微生物名）の代表例と、それをコードする塩基配列情報を開示した文献情報を示す。

[表1]

微生物名	文献情報
Clostridium propionicum	Eur. J. Biochem., 2002, Vol. 269, pp.372-380
Megasphaera elsdenii	United States Patent 7186541
Staphylococcus aureus	Eur. J. Biochem., 2002, Vol. 269, pp.372-380
Escherichia coli	Eur. J. Biochem., 2002, Vol. 269, pp.372-380

[0053] 本発明では、上記表１の他にも、これまでに報告されたＰｃｔのいずれも

利用することができる。また、「プロピオン酸及び／又はＬＡにＣｏＡが転移される反応を触媒するタンパク質」であるかぎり、既知のＰｃｔのアミノ酸配列において1個又は数個、例えば１～数十個、好ましくは１～十数個、より好ましくは１０個以下のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であっても利用することができる。

[0054] プロピオン酸及び／又はＬＡにＣｏＡが転移される反応の触媒活性は、例えばＡ．Ｅ．Ｈｏｆｍｅｉｓｔｅｒら（Ｅｕｒ．Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．、第２０６巻、第５４７－５５２頁）に記載された方法に従って測定することができる。

[0055] 本発明における好ましいＰｃｔは、メガスファエラ　エルスデニ（Ｍｅｇａｓｐｈａｅｒａ ｅｌｓｄｅｎｉｉ）由来のＰｃｔであり、そのアミノ酸配列を配列番号４に、当該アミノ酸配列をコードする核酸（ＤＮＡ）の塩基配列の例を配列番号３に示す。

[0056] ２）２分子のアセチルＣｏＡからアセトアセチルＣｏＡが形成される反応を触媒するタンパク質

本発明で使用される「２分子のアセチルＣｏＡからアセトアセチルＣｏＡが形成される反応を触媒するタンパク質」は、２分子のアセチルＣｏＡが縮合してアセトアセチルＣｏＡが形成される反応を触媒するタンパク質であり、一般的には、βケトチオラーゼ又はアセチルーＣｏＡ－ＣｏＡ－Ｃ－アセチルトランスフェラーゼと称されている。以下、本発明では、「２分子のアセチルＣｏＡからアセトアセチルＣｏＡが形成される反応を触媒するタンパク質」を、βＫＴと表すこととする。

[0057] 表２に、これまでに報告されたβＫＴの由来（微生物名）の代表例と、それをコードする塩基配列情報を開示した文献情報を示す。

[表2]

微生物名	文献情報
Alkaligenes beijerinckii	Biochem. J.、1973, Vol. 134、pp.225－238
R. eutropha	Biochem. J.、1973, Vol. 134、pp.239－248
Clostridium pasteurianum	Arch.Microbiol.、1975, Vol. 103、pp.21－30
Z.ramigera	United States Patent No. 067,695

[0058] 本発明では、上記表２の他にも、これまでに報告されたβＫＴのいずれも利用することができる。また、「２分子のアセチルＣｏＡからアセトアセチルＣｏＡが形成される反応を触媒するタンパク質」であるかぎり、既知のβＫＴのアミノ酸配列において1個又は数個、例えば１～数十個、好ましくは１～十数個、より好ましくは１０個以下のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であっても、使用することができる。

[0059] ２分子のアセチルＣｏＡからアセトアセチルＣｏＡが形成される反応の触媒活性は、例えばＳｌａｔｅｒら（Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌｏｇｙ、１９９８年、第１８０巻、第１９７９－１９８７頁）に記載された方法によって測定することができる。

[0060] 本発明における好ましいβＫＴは、Ｒ．ユートロファ（Ｒ．ｅｕｔｒｏｐｈａ）由来のβＫＴであり、そのアミノ酸配列を配列番号６に、当該アミノ酸配列をコードする核酸（ＤＮＡ）の塩基配列の例を配列番号５に示す。

[0061] ３）アセトアセチルＣｏＡの還元反応を触媒するタンパク質

本発明で使用される「アセトアセチルＣｏＡの還元反応を触媒するタンパク質」は、アセトアセチルＣｏＡのＮＡＤＰ等の補酵素の存在下で生じる還元反応によって、Ｄ（－）－β－ヒドロキシブチリル－ＣｏＡが形成される反応を触媒するタンパク質であり、一般的にはアセトアセチルＣｏＡリダクターゼと称されている。以下、本発明では、「アセトアセチルＣｏＡの還元反応を触媒するタンパク質」を、ＡＡＣｏＡ－Ｒと表すこととする。

[0062] 表３に、これまでに報告されたＡＡＣｏＡ－Ｒの由来（微生物名）の例と

、それをコードする塩基配列情報を開示した文献又はデータベース登録番号を示す。

[表3]

微生物名	文献情報又はデータベース登録番号
Zoogloea	Arch. Microbiol.、1977, Vol. 114, pp. 211－217
R. eutropha	Accession No. J04987
Z. ramigera	United States Patent No. 067,695

[0063] 本発明では、上記表３の他にも、これまでに報告されたＡＡＣｏＡ－Ｒのいずれも使用することができる。また、「アセトアセチルＣｏＡの還元反応を触媒するタンパク質」であるかぎり、既知のＡＡＣｏＡ－Ｒのアミノ酸配列において1個又は数個、例えば１～数十個、好ましくは１～十数個、より好ましくは１０個以下のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であっても、使用することができる。

[0064] アセトアセチルＣｏＡの還元反応の触媒活性は、例えばＧ．Ｗ．Ｈａｙｗｏｏｄら（ＦＥＭＳ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ Ｌｅｔｔｅｒｓ，１９８８年、第５２巻、第２５９－２６４頁）に記載された方法によって測定することができる。

[0065] 本発明における好ましいＡＡＣｏＡ－Ｒは、Ｒ．ユートロファ（Ｒ．ｅｕｔｒｏｐｈａ）由来のＡＡＣｏＡ－Ｒであり、そのアミノ酸配列を配列番号８に、当該アミノ酸配列をコードする核酸（ＤＮＡ）の塩基配列の例を配列番号７に示す。

[0066] その他、これまでに知られているβＫＴとＡＡＣｏ－Ｒとそのアクセッション番号を表４に示す。

[表4]

Designation	Organism	Accession No.
phaBPCA	Acinetobacter sp. RA3849	L37761
phaPCJ	Aeromonas caviae FA440	D88825
phaCAB	Alcaligenes laatus DSM1123	AF078795
phaCAB	Alcaligenes laatus DSM1124	U47026
phaA	Alcaligenes sp. SH-69	AF002013
phaBPCA	Alcaligenes sp. SH-69	AF002014
phaCEARPB	Allochromatium vinosum D	L01112
phaPBC	Bacillus megaterium ATCC11561	AF109909
phaCABR	Burkholderia sp. DSM 9242	AF153086
phaCA	Chromobacterium violaceum DSM30191	AF061446
phaCA	Comamonas acidovorans DS-17	AB009273
phaCEAPB	Ectothiorhodospira shaposhnikovii	AF307334
phaAB	Paracoccus denitrificans	D49326
phaCABR	Pseudomonas acidophila	-
phbRBAC	Pseudomonas sp. 61-3	AB014757
phaAB	Ralstonia eutropha H16	J04987
phaCA, phaC, phaB	Rrickettsia prowazedkii Madrid E	AJ235273
phaAB	Sinorhizobium meliloti	U17226
phaC	Sinorhizobium meliloti Rm1021	AF031938
phaCE	Sunechocystis sp. PCC6803	D90906
phaAB	Sunechocystis sp. PCC6803	D90910
phaCE	Thiococcus pfennigii	A49465
phaCE	Thiocystis violacea 2311	L01113
phaBAPC	Vibrio cholerae	AE004398
phaA(B)	Zoogloea ramigera	J02631

[0067] 4）ポリヒドロキシアルカン酸の合成反応を触媒するタンパク質

本発明におけるポリヒドロキシアルカン酸の合成を触媒するタンパク質は

、ａ）配列番号２に示されるアミノ酸配列の１３０番目、３２５番目、４７７番目及び４８１番目のアミノ酸の少なくとも１以上が他のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列、又はｂ）ａ）に規定されるタンパク質において、さらに１３０番目、３２５番目、４７７番目及び４８１番目以外の少なくとも１以上のアミノ酸が欠失若しくは置換され、又は1以上のアミノ酸残基が挿入されたアミノ酸配列からなるタンパク質である。このタンパク質は、前記特許文献７に記載されている、シュードモナス・スピーシーズ（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓｐ．）６１－３由来のポリヒドロキシアルカン酸合成酵素のアミノ酸配列の一部を変異させたタンパク質である。以下、本発明におけるポリヒドロキシアルカン酸の合成を触媒するタンパク質をＰｈａＣｍと表し、また特許文献７の記載を全て本明細書に取り込むこととする。

[0068] ＰｈａＣｍの好適な具体例は、特許文献７の表６及び表７に記載されている、配列番号２に示されるアミノ酸配列の１３０番目、３２５番目、４７７番目及び４８１番目のアミノ酸が、それぞれ単独で置換された単独変異、任意の２つのアミノ酸が置換された二重変異、任意の３つのアミノ酸が置換された三重変異、４つ全てのアミノ酸が置換された四重変異を挙げることができる。好ましいタンパク質は、任意の２つのアミノ酸が置換された二重変異であり、特に好ましくは３２５番目のＳｅｒがＴｈｒに、及び４８１番目のＧｌｎがＬｙｓに置換された二重変異（以下、ＳＴＱＫと表す）である。

[0069] ＰｈａＣｍをコードするＤＮＡは、シュードモナス・スピーシーズ（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓｐ．）６１－３由来のポリヒドロキシアルカン酸合成酵素のアミノ酸配列（配列番号２）及びそれをコードするＤＮＡの塩基配列（配列番号１）を基に、当業者に知られた部位特異的変異導入法によって組み換え的に作製することができる。また、特許文献７に記載されている通り、ＰｈａＣｍのポリヒドロキシアルカン酸の合成を触媒する活性は、前記ＰｈａＣｍを発現可能な核酸で形質転換された宿主細胞を得、当該宿主細胞のポリヒドロキシアルカン酸の蓄積能によって確認することができる。

[0070] ＰｈａＣｍを種々選択して使用することにより、製造される共重合ポリエ

ステル中の３ＨＢの含有率を調節することができる。例えば、前記ＳＴＱＫを使用した場合には、３ＨＢ：乳酸＝９４：６の、乳酸がランダムに取り込まれたランダムコポリマーが製造される。

[0071] また、ＰｈａＣｍの選択以外に、例えば大腸菌株Ｊｗ２２９３、Ｊｗ０８８５、Ｊｗ０８８６などの乳酸高蓄積性微生物を宿主として使用することで、製造される共重合ポリエステル中のＬＡのモル分率を高めることができる。例えば、前記の乳酸高蓄積性大腸菌株を宿主として好気的に培養することで、共重合体ポリエステル中のＬＡのモル分率を３０%程度に高めることができる。

[0072] さらに、微生物によるＬＡの産生量を高める工夫を施すことにより、共重合体ポリエステル中のＬＡのモル分率をさらに高めることができる。例えば、前記タンパク質をコードする遺伝子で形質転換された宿主微生物を嫌気条件下で培養することにより、宿主微生物自身のＬＡ産生量を増加させることで、製造される共重合ポリエステル中のＬＡのモル分率を高めることができる。大腸菌を宿主として嫌気条件下に培養することで、共重合体ポリエステル中のＬＡのモル分率を５０%程度に高めることができる。

[0073] ５）タンパク質をコードする核酸

上記１）～４）の各タンパク質は、それらをコードする核酸を微生物に導入して、当該微生物内でタンパク質に転写翻訳させて使用することが好ましい。微生物に導入される核酸は、ベクターに組み込まれた形態にあることが好ましい。

[0074] 前記の核酸を微生物に導入するためのベクターは、宿主中で自立複製可能なものであればよく、プラスミドＤＮＡ、ファージＤＮＡの形態にあることが好ましい。核酸を大腸菌に導入するためのベクターの例としては、ｐＢＲ３２２、ｐＵＣ１８、ｐＢＬｕｅｓｃｒｉｐｔＩＩ等のプラスミドＤＮＡを、ＥＭＢＬ３、Ｍ１３、λｇｔＩＩ等のファージＤＮＡ等を、それぞれ挙げることができる。また酵母に導入するためのベクターの例としては、ＹＥｐ１３、ＹＣｐ５０等を挙げることができる。

[0075] また、核酸をラルストニア（Ｒａｌｓｔｏｎｉａ）属細菌やシュードモナス（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）属細菌に導入するためのベクターの例としては、広範囲の宿主において複製・保持されるＲＫ２複製起点を有するｐＬＡ２９１７（ＡＴＣＣ３７３５５）やＲＳＦ１０１０複製起点を有するｐＪＲＤ２１５（ＡＴＣＣ ３７５３３）等を挙げることができる。

[0076] 上記１）～４）の各タンパク質をコードする核酸、好ましくはＤＮＡのベクターへの挿入は、当業者に知られた遺伝子組み換え技術を用いて行うことができる。また組み換えに際して、ベクターに挿入されるＤＮＡからの各タンパク質の転写翻訳を調節することのできるプロモーターの下流に、前記ＤＮＡを連結することが好ましい。プロモーターとしては、宿主中で遺伝子の転写を調節できるものであればいずれを用いてもよい。例えば、大腸菌を宿主として用いる場合には、ｔｒｐプロモーター、ｌａｃプロモーター、ＰＬプロモーター、ＰＲプロモーター、Ｔ７プロモーターなどを、酵母を宿主として用いる場合には、ｇａｌ1プロモーター、ｇａｌ１０プロモーターなどを用いることができる。また、シュードモナス（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）属細菌を本発明の微生物として用いる場合には、プロモーターとして、ｐｈａＣ１Ｐｓ遺伝子上流やｐｈｂＣＡＢＲｅオペロン上流のプロモーターを含むと考えられる領域などを用いることができる。

[0077] また、本発明のベクターには、必要に応じて、核酸を導入しようとする微生物において利用可能なターミネーター配列、エンハンサー配列、スプライシングシグナル配列、ポリＡ付加シグナル配列、リボゾーム結合配列（ＳＤ配列）、選択マーカー遺伝子などを連結することができる。選択マーカー遺伝子の例としては、アンピシリン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、カナマシン耐性遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子等の薬剤耐性遺伝子の他、アミノ酸や核酸等の栄養素の細胞内生合成に関与する遺伝子、あるいはルシフェラーゼとうの蛍光タンパク質をコードする遺伝子などを挙げることができる。

[0078] 上記の核酸、好ましくはベクターの形態にある核酸は、当業者に知られた

方法によって、微生物に導入される。微生物へのベクターの組み換え方法としては、例えばリン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法、スフェロプラスト法、酢酸リチウム法、接合伝達法、カルシウムイオンを用いる方法や等が挙げられる。

[0079] ６）微生物

本発明における組み換え微生物としては、上記１）～４）のタンパク質を発現している微生物、好ましくは上記１）～４）のタンパク質を機能的に発現し得る核酸の導入によって形質転換された微生物である。好適な微生物としては、シュードモナス・エスピー（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ｓｐ．）６１－３株などのシュードモナス（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）属細菌、Ｒ．ユートロファなどのラルストニア（Ｒａｌｓｔｏｎｉａ）属細菌、バチルス・ズブチリス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｕｂｔｉｌｉｓ）などのバチルス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ）属細菌、大腸菌（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ）などのエシェリヒア（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ）属細菌、コリネバクテリウム（Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ）属細菌、サッカロマイセス・セレビシー（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）などのサッカロマイセス（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ）属酵母、カンジダ・マルトーサ（Ｃａｎｄｉｄａ ｍａｌｔｏｓａ）などのカンジダ（Ｃａｎｄｉｄａ）属酵母などを挙げることができる。中でも大腸菌、コリネバクテリウム属細菌、及びＲ．ユートロファが好ましく、特に好ましくは大腸菌、コリネバクテリウム属細菌である。

[0080] Ｒ．ユートロファなどの、それ自体が固有のポリヒドロキシアルカン酸合成酵素を持つ微生物の場合には、当該固有のポリヒドロキシアルカン酸合成酵素の発現能を失った微生物を使用することが好ましい。かかる発現能を失った微生物は、ニトロソグアニジンなどの化学変異源やＵＶ等の物理的変異源によって微生物を処理したり、ポリヒドロキシアルカン酸合成酵素をコードする核酸を改変して当該酵素の機能的な発現を不能とした変異核酸を微生物に導入し、「相同的組み換え」（ｈｏｍｏｌｏｇｏｕｓ ｒｅｃｏｍｂｉ

ｎａｔｉｏｎ）を行わせたりして、作製することができる。ポリヒドロキシアルカン酸合成酵素遺伝子が破壊されていることの確認は、該遺伝子の一部をプローブとして用いるサザンハイブリダイゼーションによって、ハイブリダイズするバンドが、野性株由来のバンドに比べて予想される位置にシフトしていることを調べることによって行うことができる。

[0081] ６）ヒドロキシ酪酸と乳酸とからなる共重合ポリエステルの製造

ヒドロキシ酪酸と乳酸とからなる共重合ポリエステルの製造は、前記の核酸が導入された組み換え微生物を、炭素源を含む培地で培養し、培養菌体又は培養物中に共重合ポリエステルを生成蓄積させ、該培養菌体又は培養物から該共重合ポリエステルを回収することにより行われる。

[0082] 本発明の組み換え微生物の培養は、培地組成を除き、組み換え微生物の種類に応じて、それぞれの微生物についての一般的な培養条件で行うことが好ましい。特に、組み換え微生物を嫌気条件下に培養することで、共重合体ポリエステル中のＬＡのモル分率を高めることができる点で有利である。

[0083] 特殊な組成を有する培地は特に必要とされないが、炭素源以外の窒素源、無機塩類その他の有機栄養源のいずれかを制限した培地を利用することが好ましい。例えば、ラルストニア（Ｒａｌｓｔｏｎｉａ）属細菌やシュードモナス（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）属細菌等に核酸を組み込んだ組み換え微生物を培養する培地としては、例えば窒素源を０．０１～０．１%に制限した培地が挙げられる。

[0084] 炭素源としては、例えばグルコース、フラクトース、スクロース、マルトース等の炭水化物が挙げられる。また、炭素数４以上の油脂関連物質を炭素源とすることもできる。炭素数４以上の油脂関連物質としては、コーン油、大豆油、サフラワー油、サンフラワー油、オリーブ油、ヤシ油、パーム油、ナタネ油、魚油、鯨油、豚油又は牛油などの天然油脂、ブタン酸、ペンタン酸、ヘキサン酸、オクタン酸、デカン酸、ラウリン酸、オレイン酸、パルミチン酸、リノレン酸、リノール酸若しくはミリスチン酸等の脂肪酸又はこれらの脂肪酸のエステル、オクタノール、ラウリルアルコール、オレイルアル

コール若しくはパルミチルアルコール等又はこれらアルコールのエステル等が挙げられる。

[0085] 窒素源としては、例えばアンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等のアンモニウム塩の他、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスティープリカー等が挙げられる。無機物としては、例えばリン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム等が挙げられる。

[0086] 培養は、通常振盪培養などの好気的条件下、２５～３７℃の範囲で、前記１）～４）のタンパク質が転写発現されてから２４時間以上行うことが好ましい。嫌気条件下に培養を行うときは、前記時間は４８時間以上であることが好ましい。培養中は、カナマイシン、アンピシリン、テトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。前記１）～４）のタンパク質をコードするＤＮＡのいずれか或いは全てを誘導性プロモーターの制御下に連結した場合には、当該プロモーターの転写に誘導する因子を培地に添加すればよい。

[0087] 本発明の好ましい態様は、Ｍ．エルスデニ（Ｍ．ｅｌｓｄｅｎｉｉ）由来のＰｃｔをコードする核酸（配列番号３）、Ｒ．ユートロファ（Ｒ．ｅｕｔｒｏｐｈａ）のβＫＴをコードする核酸（配列番号５）、Ｒ．ユートロファ（Ｒ．ｅｕｔｒｏｐｈａ）のＡＡＣｏＡ－Ｒをコードする核酸（配列番号７）及びＳＴＱＫをコードする核酸を有する発現ベクターを導入した組み換え大腸菌を培養し、３ＨＢとＬＡとからなる共重合ポリエステルを製造する方法である。特に大腸菌株Ｊｗ２２９３、Ｊｗ０８８５、Ｊｗ０８８６などの乳酸高蓄積性微生物を宿主として使用することで、共重合体ポリエステル中のＬＡのモル分率をより高めることができる。また、大腸菌を宿主として嫌気条件下で培養することで、共重合体ポリエステル中のＬＡのモル分率をさらに高めることができる。

[0088] 本発明の方法は、培地にＬＡ、３ＨＢなどの、目的とするポリマーを構成するモノマー成分を培地に添加しなくても、安価な廃糖蜜から、３ＨＢとＬ

Ａとからなる共重合ポリエステルを製造することができ、製造コストの点で有利である。

[0089] 本発明において、ポリエステルの回収は、微生物から共重合ポリエステルあるいはＰＨＡを回収するための、当業者に公知の方法によって行えばよい。例えば、培養液から遠心分離によって集菌、洗浄した後、乾燥させ、クロロホルムに乾燥菌体を懸濁し、加熱することによって、目的とする共重合ポリエステルをクロロホルム画分に抽出し、さらにこのクロロホルム溶液にメタノールを加えてポリエステルを沈殿させ、濾過や遠心分離によって上澄み液を除去した後、乾燥することで、精製された共重合ポリエステルを得ることができる。

[0090] 回収されたポリエステルが３ＨＢとＬＡとからなる共重合ポリエステルであることの確認は、通常の方法、例えばガスクロマトグラフ法や核磁気共鳴法等により行えばよい。

[0091] 本発明はさらに、３ＨＢとＬＡを含む共重合ポリエステルの製造方法であって、１）プロピオン酸及び／又は乳酸にＣｏＡが転移される反応を触媒するタンパク質、２分子のアセチルＣｏＡからアセトアセチルＣｏＡが形成される反応を触媒するタンパク質、アセトアセチルＣｏＡの還元反応を触媒するタンパク質、及び下記のａ）又はｂ）のアミノ酸配列からなるポリヒドロキシアルカン酸の合成反応を触媒するタンパク質を有する組み換え微生物を、３ＨＢとＬＡ以外のヒドロキシアルカン酸及び炭素源を含む培地で培養する工程：

ａ）配列番号２に示されるアミノ酸配列の１３０番目、３２５番目、４７７番目及び４８１番目のアミノ酸の少なくとも１以上が他のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列

ｂ）ａ）に規定されるタンパク質において、さらに１３０番目、３２５番目、４７７番目及び４８１番目以外の少なくとも１以上のアミノ酸が欠失若しくは置換され、又は1以上のアミノ酸残基が挿入されたアミノ酸配列、

及び、２）工程１）の培養物から前記共重合ポリエステルを回収する工程を

含む、前記共重合ポリエステルの製造方法を提供する。

[0092] かかる方法において、プロピオン酸及び／又は乳酸にＣｏＡが転移される反応を触媒するタンパク質、２分子のアセチルＣｏＡからアセトアセチルＣｏＡが形成される反応を触媒するタンパク質、アセトアセチルＣｏＡの還元反応を触媒するタンパク質、及び上記ａ）又はｂ）のアミノ酸配列からなるポリヒドロキシアルカン酸の合成反応を触媒するタンパク質と、これらを発現する組み換え微生物については、いずれも先に説明したとおりである。

[0093] 本発明の３ＨＢとＬＡを含む共重合ポリエステルの製造方法は、このようなタンパク質を有する組み換え微生物を、３ＨＢとＬＡ以外のヒドロキシアルカン酸及び炭素源を含む培地で培養することを特徴とする。組み換え微生物は自身が３ＨＢとＬＡを生産するが、３ＨＢとＬＡ以外の共重合ポリエステルのモノマー単位に変換され得る前駆体を培地に加えることで、３ＨＢとＬＡとこれら以外のモノマー単位を含む共重合ポリエステルが製造される。

[0094] 前記前駆体とそこから変換されるモノマー単位の例としては、プロピオン酸（３－ヒドロキシプロピオン酸）、吉草酸（３－ヒドロキシ吉草酸）、ドデカン酸（３－ヒドロキシヘキサン酸、３－ヒドロキシオクタン酸、３－ヒドロキシドデカン酸、３－ヒドロキシドデカン酸）、４－ヒドロキシ酪酸（４－ヒドロキシ酪酸）、４－ヒドロキシ吉草酸（４－ヒドロキシ吉草酸）などを挙げることができる。本発明ではこれらのいずれも利用することができ、培地に予め加えておいてもよく、また経時的に培地に添加してもよい。また、３ＨＢとＬＡとこれら以外のモノマー単位を含む共重合ポリエステルを製造する培養を嫌気条件下に行うことにより、ＬＡのモル分率を調節することができる。

[0095] 以下、非限定的な実施例を示して本発明をさらに詳細に説明する。なお、実施例における各実験操作は、Ｓａｍｂｒｏｏｋら（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ｃｌｏｎｉｎｇ： ａ ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ ｍａｎｕａｌ， ２ｎｄ ｅｄ． １９８９年、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ， Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ， Ｎ．

Ｙ．）を初めとする各種の実験操作を紹介したマニュアル、又は各種試薬及びキットに添付された指示書の各記載に従い、行った。

実施例

[0096] ＜実施例１＞　ＬＡ高蓄積性大腸菌を用いた共重合ポリエステルの製造

１）組み換え微生物の作製

Ｍ．エルスデニ（Ｍ．ｅｌｓｄｅｎｉｉ、ＡＴＣＣ１７７５３）からＤＮｅａｓｙ Ｔｉｓｓｕｅ Ｋｉｔ（Ｑｉａｇｅｎ社）を用いてゲノムＤＮＡを抽出後、プロピオニルＣｏＡトランスフェラーゼ（アクセッションＮｏ．Ｊ０４９８７）をコードする核酸をＰＣＲで増幅するために、ＥｃｏＲＩ認識配列を含むフォワードプライマーと、ＰｓｔＩ認識配列を含むリバースプライマーのプライマーＤＮＡを合成した。前記ゲノムＤＮＡを鋳型として、ｉＣｙｃｌｅｒ（ＢｉｏＲａｄ）を用い、ＫＯＤ－Ｐｌｕｓ－ＤＮＡポリメラーゼ（１Ｕ）、ＰＣＲバッファー、１ｍＭ $MgSO_4$、各プライマー１５ｐｍｏｌ、０．２ｍＭ ｄＮＴＰｓ（全て東洋紡株式会社製）を含む反応液中、９４℃２分を１サイクル、９４℃で１５秒、５５℃で３０秒、６８℃で２分を１サイクルとするＰＣＲ反応を３０サイクル行った後、約１，５００ｂｐの増幅断片を回収し、ＥｃｏＲＩ及びＰｓｔＩで消化して、ＤＮＡフラグメントを得た。

[0097] プラスミドｐＴＶ１１８Ｎ（宝酒造）をＥｃｏＲＩ及びＰｓｔＩを用いて消化し、アルカリホスファターゼを用いて脱リン酸化した後、前記ＤＮＡフラグメントを加えてライゲーションし、プロピオニルＣｏＡトランスフェラーゼをコードするＤＮＡを含む、約４．７ｋｂｐの組み換えプラスミドＰＴＶ１１８Ｎ Ｍ．Ｅ．－ＰＣＴを調製した。

[0098] Ｔａｋａｓｅら（Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．、２００３年、第１３３巻、第１３９－１４５頁）に記載されている方法に従い、Ｒ．ユートロファ（Ｒ．ｅｕｔｒｏｐｈａ）由来のβ－ケトチオラーゼをコードするＤＮＡ（配列番号５）、Ｒ．ユートロファ（Ｒ．ｅｕｔｒｏｐｈａ）由来のアセトアセチルＣｏＡレダクターゼをコードするＤＮＡ（配列番号７）、及びＳＴＱＫをコー

ドするＤＮＡを全て含むプラスミドｐＧＥＭＣ１（ＳＴ／ＱＫ）ＡＢを調製した。

[0099] ｐＧＥＭＣ１（ＳＴ／ＱＫ）ＡＢをＢａｍＨＩで消化して、約６ｋｂｐのＤＮＡ断片を回収し、６６ｍＭ酢酸カリウム、１０ｍＭ酢酸マグネシウム、０．５ｍＭ ＤＴＴ，０．１ｍｇ／ｍＬ ＢＳＡ、０．１ｍＭ ｄＮＴＰを含む３ｍＭ トリス酢酸緩衝液（ｐＨ７．９）中、２００ユニットのＴ４ポリメラーゼを３７℃で５分間作用させて、ＳＴＱＫをコードするＤＮＡ断片を得た。

[0100] ｐＴＶ１１８Ｎ Ｍ．Ｅ．－ＰＣＴをＰｓｔＩで消化し、上記と同条件でＴ４ポリメラーゼを作用させた後、アルカリホスファターゼを用いて脱リン酸化し、前記ｐｈａＣｍをコードするＤＮＡ断片をライゲーションして、ｐＴＶ１１８Ｎ Ｍ．Ｅ．－ＰＣＴのＳａｌＩサイトにＳＴＱＫをコードするＤＮＡを導入した、約９．６ｋｂｐのプラスミドｐＴＶ１１８ＮＰＣＴＣ１（ＳＴ／ＱＫ）ＡＢ（図１）を得た。大腸菌種ＪＭ１０９のコンピテントセルをｐＴＶ１１８ＮＰＣＴＣ１（ＳＴ／ＱＫ）ＡＢを用いて形質転換した。

[0101] ２）ポリマーの生産

得られた形質転換体を、アンピシリン１００μｇ／ｍＬ、２％グルコース、１０ｍＭパントテン酸を含むＬＢ培地１００ｍＬに植菌し、３７℃にて７２時間培養を行った。培養後４℃、３，１００ｒｐｍ、１５分間の条件で遠心して菌体を回収し、１０ｍＭトリス塩酸緩衝液（ｐＨ７．５）に懸濁させてから再度同条件で遠心分離した後、２日間、凍結乾燥した。

[0102] ガラス製耐圧反応管に乾燥菌体を移し、クロロホルム３ｍＬを加えて懸濁液としてから、１００℃のヒートブロック中で３時間保った後、室温まで冷却後、０．２μｍＰＴＦＥフィルター（ＡＤＶＡＮＴＥＣ）で濾過して、クロロホルム溶液と菌体を分離した。濾液を遠心用ガラス試験管に移し、６０℃でドライアップしてクロロホルムを留去した。試験管内に残った膜状のポリマーを、ヘキサンを用いて洗浄、乾燥し、再びクロロホルム３ｍＬを加え、ポリマーを含むクロロホルム溶液を得た。０．２μｍＰＴＦＥフィルター

（ＡＤＶＡＮＴＥＣ）で濾過し、分取用ＧＰＣ（ＬＣ－９２０１）を用いてポリマー画分を分取した後、クロロホルムを留去して、ポリマー４８．６２ｍｇを回収した。ポリマーの菌体内含有率（培養後の乾燥菌体総重量に対して回収されたポリマー重量割合）は１６．６５％であった。

[0103] ３）ポリマーの分析

ｉ）ＧＰＣ

２）で回収されたポリマー約１ｍｇにクロロホルムを１ｍＬ加え、これを０．２μｍＰＴＦＥフィルター（ＡＤＶＡＮＴＥＣ）で濾過した溶液をサンプルとして、下記の条件でＧＰＣ測定を行った。

[0104] システム　：Ｓｈｉｍａｄｚｕ　Ｐｒｏｍｉｎｅｎｃｅ　ＧＰＣ　ｓｙｓｔｅｍ

カラム　：ＴＳＫｇｅｌ－Ｓｕｐｅｒ　ＴＨＺ－Ｍ（６．０ｍｍ×１５０ｍｍ）

溶離液　：$CHCl_3$

流量　：０．８ｍＬ／分

温度　：４０℃

検出　：１０Ａ　ｒｅｆｒａｃｔｉｖｅ　ｉｎｄｅｘ　ｄｅｔｅｃｔｏｒ

サンプル量：１０μＬ

測定された分子量分布曲線を図２に示す。分子量較正曲線は標準ポリスチレンを用いて作成し、標準ポリスチレン分子量の換算値で分子量を表した。その結果、ポリマーの分子量（ｍＷ）は３２万、平均分子量（Ｍｎ）は２３万、Ｍｗ／Ｍｎは１．３であった。

[0105] ｉｉ）熱分析（ＤＳＣ）

２）で回収されたポリマー約１ｍｇを、示差走査熱量計（ＤＳＣ３１００、マックサイエンス）を用い、－５０℃～２１０℃：２０℃／分上昇、２１０℃～－９０℃：４０℃／分下降、－９０℃：５分保持、－９０℃～２１０℃：２０℃／分上昇の条件で分析した（図３）。

[0106] その結果、ガラス転移温度が０℃付近、結晶化度が８６．８℃、ポリマーのＴｍは１５７．３～１５７．５℃であった。

[0107] ｉｉｉ）ＧＣ／ＭＳ

２）で回収されたポリマー約５０μｇを１ｍＬのクロロホルムに溶解した溶液２５０μＬ、エタノール８５０μＬ、塩酸１００μＬをガラス製耐圧反応管で混合し、１００℃のヒートブロック中で３時間、エタノリシス処理を行った。室温まで冷却後、０．６５Ｍリン酸および０．９ＭＮａＣｌを含む溶液１ｍｌと２５０ｍＭリン酸溶液５００μＬを加えて混合し、ｐＨを中性に調整した後、室温、１，２００ｒｐｍで５分間の条件で遠心し、水層とクロロホルム層を分離した。クロロホルム層を採取し、モレキュラーシーブスにより脱水を行って、ＧＣ分析用サンプルとした。

[0108] ＧＣ／ＭＳ分析は、下記の条件で行った。

[0109] ＧＣシステム　：Ｓｈｉｍａｄｚｕ　ＧＣ　２０１０

ＭＳシステム　：ＧＣ／ＭＳ－ＱＰ２０１０

カラム　：ＮＥＵＴＲＡ－ＢＯＮＤ－１（０．２５ｍｍ×３０００ｍｍ）

キャリアガス　：Ｈｅ

ガス流量　：３０．０ｍＬ／分

ディテクター温度　：３１０℃

インジェクター温度：２５０℃

カラムオーブン温度：１００℃

カラム昇温　：８℃／分

サンプル量　：１μＬ

上記条件での分析結果及び乳酸エチルのＭＳスペクトルを図４に示す。ＧＣ／ＭＳの結果より、（２）で回収されたポリマーは３ＨＢとＬＡをモノマー単位として含むことが確認された。

[0110] iv）ＮＭＲ分析

（２）で回収されたポリマーを重水素化クロロホルムに溶解してサンプルとし、３００ＭＨｚで^{1}Ｈ－ＮＭＲ（図５）、^{13}Ｃ－ＮＭＲ（図６）、^{1}Ｈ^{1}Ｈ－ＮＭＲ（図７）及び^{13}Ｃ^{1}Ｈ－ＮＭＲ（図８）を測定した。その結果、（２）で回収されたポリマーは３ＨＢとＬＡをモノマー単位として含むこと、３ＨＢとＬＡの比が約９４：６であることが判明した。

[0111] ＜比較例＞

実施例１で作製したプラスミドｐＴＶ１１８ＮＰＣＴＣ１（ＳＴ／ＱＫ）ＡＢに含まれるＳＴＱＫをコードする塩基配列を、下記のタンパク質をコードする塩基配列に置き換えた発現ベクターを、それぞれ作製した。当該発現ベクターの構成を纏めて図９に示す。

[0112] ｐＴＶ１１８ＮＰＣＴＣ（Ｒｅ）ＡＢ：Ｒ．ユートロファのポリヒドロキシアルカン酸合成酵素（アクセッション番号Ｊ０５００３）

ｐＴＶ１１８ＮＰＣＴＣ（Ｂｃ）ＡＢ：Ｂ．セレウスのポリヒドロキシアルカン酸合成酵素（アクセッション番号ＤＱ４８６１３５）

ｐＴＶ１１８ＮＰＣＴＣ１（ＷＴ）ＡＢ：シュードモナスｓｐ．６１－３のポリヒドロキシアルカン酸合成酵素（野性型、配列番号１）

ｐＴＶ１１８ＮＰＣＴＣ２ＡＢ：シュードモナスｓｐ．６１－３のポリヒドロキシアルカン酸合成酵素２（アクセッション番号ＡＢ０１４７５８）

上記各発現ベクターを用いて形質転換した大腸菌ＪＭ１０９を、アンピシリン１００μｇ／ｍｌ、２％グルコース、１０ｍＭパントテン酸を含むＬＢ培地１００ｍｌに植菌し、３７℃にて７２時間培養を行った。菌体を集菌し、１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．５）に懸濁させ、再度集菌してから２日間、凍結乾燥した。耐圧反応管（ガラス製）に乾燥菌体を移し、クロロホルム３mlを加えて懸濁液とし、１００℃のヒートブロック中で３時間保ったのち、室温まで冷却後、０．２μｍＰＴＦＥフィルター（ＡＤＶＡＮＴＥＣ）で濾過して、クロロホルム溶液と菌体とを分離した。濾液を遠心用ガラス試験管に移し、６０℃でドライアップしてクロロホルムを留去した。試験管内に残った膜状のポリマーを、ヘキサンを用いて洗浄した後に乾燥し、再びクロロホルム３ｍｌに溶解して、ポリマーのクロロホルム溶液を得た。

[0113] ０．２μｍＰＴＦＥフィルター（ＡＤＶＡＮＴＥＣ社）で濾過し、分取用ＧＰＣ（Ｐｒｅｐａｒａｔｉｖｅ　ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒａｐｈｙ：ＬＣ－９２０１）によってポリマー画分を分取し、クロロホルムを留去して、ポリマーを得た。各ポリマーの量は、ｐＴＶ１１８ＮＰＣＴＣ（Ｒｅ）ＡＢ：１

３１．４１ｍｇ、ｐＴＶ１１８ＮＰＣＴＣ（Ｂｃ）ＡＢ：１６０．６１ｍｇ、ｐＴＶ１１８ＮＰＣＴＣ１（ＷＴ）ＡＢ：検出されず、ｐＴＶ１１８ＮＰＣＴＣ２ＡＢ：極微量のため定量不能であった。

[0114] また、ｐＴＶ１１８ＮＰＣＴＣ（Ｒｅ）ＡＢ及びｐＴＶ１１８ＮＰＣＴＣ（Ｂｃ）のポリマー５０μｇを、またｐＴＶ１１８ＮＰＣＴＣ２ＡＢについてはポリマー全量を、実施例１の３）のiii）と同様にしてＧＣ／ＭＳ分析を行ったところ、得られたポリマーはいずれも３ＨＢのみを構成モノマー単位とするホモポリマーＰＨＢであることが確認された（図１０）。

[0115] ＜実施例２＞ 高ＬＡ蓄積性微生物を用いた製造

１）ポリマーの生産

乳酸高蓄積大腸菌Ｊｗ２２９３株、Ｊｗ０８８５株、Ｊｗ０８８６株を、実施例１の１）で作製したｐＴＶ１１８ＮＰＣＴＣ１（ＳＴ／ＱＫ）ＡＢ１を用いて形質転換した。

[0116] 得られた形質転換体をアンピシリン１００μｇ／ｍｌ、２％グルコース、１０ｍＭパントテン酸を含むＬＢ培地１０００ｍｌに植菌し、３７℃にて７２時間培養を行った。培養後４℃、３，１００ｒｐｍ、１５分間の条件で遠心して菌体を回収し、１０ｍＭトリス塩酸緩衝液（ｐＨ７．５）に懸濁させてから再度同条件で遠心分離した後、２日間、凍結乾燥した。

[0117] ガラス製耐圧反応管に乾燥菌体を移し、クロロホルム４０ｍｌを加えて懸濁液としてから、１００℃のヒートブロック中で３時間保ったのち、室温まで冷却後、０．２μｍＰＴＦＥフィルター（ＡＤＶＡＮＴＥＣ）で濾過して、クロロホルム溶液と菌体を分離した。濾液を遠心用ガラス試験管へ移し、６０℃でドライアップしてクロロホルムを留去した。試験管内に残った膜状のポリマーをヘキサンを用いて洗浄、乾燥し、再びクロロホルム４０ｍｌに溶解してクロロホルム溶液をえた。０．２μｍＰＴＦＥフィルター（ＡＤＶＡＮＴＥＣ）で濾過し、分取用ＧＰＣ（ＬＣ－９２０１）によってポリマー画分を分取した。クロロホルムを留去してポリマーを得た。

[0118] 回収されたポリマーの量は、８０２ｍｇ（Ｊｗ２２９３）、８０４ｍｇ（

Ｊｗ０８８５）、８０６ｍｇ（Ｊｗ０８８６）であった。また、ポリマーの菌体内含有率（培養後の乾燥菌体重量に対して回収されたポリマー重量割合）は４１％（Ｊｗ２２９３）、５０％（Ｊｗ０８８５）、５４％（Ｊｗ０８８６）であった。

[0119] ２）ポリマーの分析

ｉ）ＧＰＣ

１）で回収されたポリマー約１ｍｇにクロロホルムを１ｍＬ加え、これを０．２μｍＰＴＦＥフィルター（ＡＤＶＡＮＴＥＣ）で濾過した溶液をサンプルとして、下記の条件でＧＰＣ測定を行った。

[0120] システム　：ＰＵ－２０８０　Ｐｌｕｓ　ｓｙｓｔｅｍ（ＪＡＳＣＯ）

カラム　：ＧＰＣ　Ｋ－８０６Ｌ（８．０ｍｍ　ｉｎｎｅｒａｍｅｔｅ×３００ｍｍ）（Ｓｈｏｄｅｘ）

溶離液　：$CHCl_3$

流量　：０．８ｍＬ／分

温度　：４０℃

検出　：１０Ａ　ｒｅｆｒａｃｔｉｖｅ　ｉｎｄｅｘ　ｄｅｔｅｃｔｏｒ（ＪＡＳＣＯ）

注入量　：１０μＬ

測定された分子量分布曲線を図１１ａ～ｃに示す。分子量較正曲線は標準ポリスチレンを用いて作成し、標準ポリスチレン分子量の換算値で分子量を表した。その結果、ポリマーの分子量（ｍＷ）は、Ｊｗ２２９３株由来のポリマーの分子量（Ｍｗ）＝２８万、Ｍｎ＝５８，０００、Ｊｗ０８８５株由来のポリマーのＭｗ＝２８万、Ｍｎ＝６６，０００、Ｊｗ０８８６株由来のポリマーのＭｗ＝２８万、Ｍｎ＝６４，０００であった。また、Ｍｗ／Ｍｎは全て４であった。

[0121] ｉｉ）熱分析（ＤＳＣ）

２）で回収されたポリマー約１ｍｇを、示差走査熱量計（ＤＳＣ３１００、マックサイエンス）を用い、－５０℃～２１０℃：２０℃／分上昇、２１

０℃～－９０℃：４０℃／分下降、－９０℃：５分保持、－９０℃～２１０℃：２０℃／分上昇の条件で分析した（図１２ａ～ｃ）。

[0122] その結果、ポリマーのＴｍは１１１～１６３℃であった。

[0123] iii）ＧＣ／ＭＳ

２）で回収されたポリマー約５０μｇを１ｍＬのクロロホルムに溶解した溶液２５０μＬ、エタノール８５０μＬ、塩酸１００μＬをガラス製耐圧反応管で混合し、１００℃のヒートブロック中で３時間、エタノリシス処理を行った。室温まで冷却後、０．６５Ｍリン酸および０．９ＭＮａＣｌを含む溶液１ｍｌと２５０ｍＭリン酸溶液５００μＬを加えて混合し、ｐＨを中性に調整した後、室温、１，２００ｒｐｍで５分間の条件で遠心し、水層とクロロホルム層を分離した。クロロホルム層を採取し、モレキュラーシーブスにより脱水を行って、ＧＣ分析用サンプルとした。

[0124] ＧＣ／ＭＳ分析は、下記の条件で行った。

[0125]

ＧＣシステム	：Ｓｈｉｍａｄｚｕ　ＧＣ　２０１０
ＭＳシステム	：ＧＣ／ＭＳ－ＱＰ２０１０
カラム	：ＮＥＵＴＲＡ－ＢＯＮＤ－１（０．２５ｍｍ×３０００ｍｍ）
キャリアガス	：Ｈｅ
ガス流量	：３０．０ｍＬ／分
ディテクター温度	：３１０℃
インジェクター温度	：２５０℃
カラムオーブン温度	：１００℃
カラム昇温	：８℃／分
サンプル量	：１μＬ

上記条件での分析結果及び乳酸エチルのＭＳスペクトルを図１３ａ～ｃに示す。ＧＣ／ＭＳの結果より、（２）で回収されたポリマーは３ＨＢとＬＡをモノマー単位として含むことが確認された。

[0126] iv）ＮＭＲ分析

（２）で回収されたポリマーを重水素化クロロホルムに溶解してサンプル

とし、３００ＭＨｚで^{1}Ｈ－ＮＭＲ（図１４ａ～ｃ）及び^{13}Ｃ－ＮＭＲ（図１５ａ～ｃ）を測定した。その結果、（２）で回収されたポリマーは３ＨＢとＬＡをモノマー単位として含むこと、３ＨＢとＬＡの比が約３２：６８（Ｊｗ２２９３）、約３０：７０（Ｊｗ０８８５）、約３２：６８（Ｊｗ０８８６）であることが判明した。

[0127] ＜実施例３＞　嫌気条件下での培養による共重合ポリエステルの製造

１）ベクターの構築

実施例１の１）で作製したｐＴＶ１１８ＮＰＣＴＣ１（ＳＴ／ＱＫ）ＡＢを鋳型にして、βＫＴをコードする遺伝子及びＡＡＣｏＡ－Ｒをコードする遺伝子が取り除かれた直鎖状プラスミドが得られる様にＰＣＲを行い、得られた増幅断片を閉環させて、ｐＴＶ１１８ＮにＰｃｔをコードする遺伝子とＰｈａＣｍをコードする遺伝子を有するプラスミドｐＴＶ１１８ＮｐｃｔＣ１（ＳＴ／ＱＫ）（図１６左）を作製した。

[0128] 実施例１の１）で作製したｐＧＥＭＣ１ＡＢを制限酵素ＢａｍＨＩで消化して得られる約３，２００塩基対のＤＮＡ断片と、低コピープラスミドであるｐＡＣＹＣ１７７ＤＮＡを制限酵素ＢａｍＨＩで消化した直鎖状ベクタープラスミドとを連結して、ｐＡＣＹＣ１７７ＤＮＡのＢａｍＨＩサイトにβＫＴをコードする遺伝子及びＡＡＣｏＡ－Ｒをコードする遺伝子を導入したプラスミドｐＡＣＹＣ１７７ＡＢを得た（図１６右）に示す。

[0129] ２）ポリマーの製造

ｐＴＶ１１８ＮＰＣＴＣ１（ＳＴ／ＱＫ）とｐＡＣＹＣ１７７ＡＢを用いて大腸菌Ｗ３１１０株を形質転換した。

[0130] 得られた形質転換体をアンピシリン１００μｇ／ｍｌ、２％グルコース、１０ｍＭパントテン酸を含むＬＢ培地１００ｍｌに植菌し、３７℃にて７２時間培養を行った。培養後４℃、３，１００ｒｐｍ、１５分間の条件で遠心して菌体を回収し、１０ｍＭトリス塩酸緩衝液（ｐＨ７．５）に懸濁させてから再度同条件で遠心分離した後、２日間、凍結乾燥した。

[0131] ガラス製耐圧反応管に乾燥菌体を移し、クロロホルム６０ｍｌを加えて懸

濁液としてから、１００℃のヒートブロック中で３時間保ったのち、室温まで冷却後、０．２μｍＰＴＦＥフィルター（ＡＤＶＡＮＴＥＣ）で濾過して、クロロホルム溶液と菌体を分離した。濾液を遠心用ガラス試験管へ移し、６０℃でドライアップしてクロロホルムを留去した。試験管内に残った膜状のポリマーを、ヘキサンを用いて洗浄、乾燥し、再びクロロホルム６０ｍｌに溶解してクロロホルム溶液をえた。０．２μｍＰＴＦＥフィルター（ＡＤＶＡＮＴＥＣ）で濾過し、分取用ＧＰＣ（ＬＣ－９２０１）によってポリマー画分を分取した。クロロホルムを留去してポリマーを得た。

[0132] 回収されたポリマーの量は、１２２８ｍｇであった。また、ポリマーの菌体内含有率（培養後の乾燥菌体重量に対して回収されたポリマー重量割合）は２．３％であった。

[0133] ３）ポリマーの分析

ｉ）ＧＰＣ

２）で回収されたポリマー約１ｍｇにクロロホルムを１ｍＬ加え、これを０．２μｍＰＴＦＥフィルター（ＡＤＶＡＮＴＥＣ）で濾過した溶液をサンプルとして、下記の条件でＧＰＣ測定を行った。

[0134] システム　：ＰＵ－２０８０ Ｐｌｕｓ ｓｙｓｔｅｍ（ＪＡＳＣＯ）

カラム　：ＧＰＣ Ｋ－８０６Ｌ（８．０ｍｍ ｉｎｎｅｒａｍｅｔｅ×３００ｍｍ）（Ｓｈｏｄｅｘ）

溶離液　：$CHCl_3$

流量　：０．８ｍＬ／分

温度　：４０℃

検出　：１０Ａ ｒｅｆｒａｃｔｉｖｅ ｉｎｄｅｘ ｄｅｔｅｃｔｏｒ（ＪＡＳＣＯ）

注入量　：１０μＬ

測定された分子量分布曲線を図１７に示す。分子量較正曲線は標準ポリスチレンを用いて作成し、標準ポリスチレン分子量の換算値で分子量を表した。その結果、ポリマーの分子量（ｍＷ）は２８，０００、Ｍｎは２２，００

０、Ｍｗ／Ｍｎは１．５であった。

[0135] ii）熱分析（ＤＳＣ）

２）で回収されたポリマー約１ｍｇを、示差走査熱量計（ＤＳＣ３１００、マックサイエンス）を用い、－５０℃～２１０℃：２０℃／分上昇、２１０℃～－９０℃：４０℃／分下降、－９０℃：５分保持、－９０℃～２１０℃：２０℃／分上昇の条件で分析した（図１８）。

[0136] その結果、ポリマーの融点（Ｔｍ）は１５７．０～１６１．４℃であった。

[0137] iii）ＧＣ／ＭＳ

２）で回収されたポリマー約５０μｇを１ｍＬのクロロホルムに溶解した溶液２５０μＬ、エタノール８５０μＬ、塩酸１００μＬをガラス製耐圧反応管で混合し、１００℃のヒートブロック中で３時間、エタノリシス処理を行った。室温まで冷却後、０．６５Ｍリン酸および０．９ＭＮａＣｌを含む溶液１ｍｌと２５０ｍＭリン酸溶液５００μＬを加えて混合し、ｐＨを中性に調整した後、室温、１，２００ｒｐｍで５分間の条件で遠心し、水層とクロロホルム層を分離した。クロロホルム層を採取し、モレキュラーシーブスにより脱水を行って、ＧＣ分析用サンプルとした。

[0138] ＧＣ／ＭＳ分析は、下記の条件で行った。

[0139]

ＧＣシステム	：Ｓｈｉｍａｄｚｕ　ＧＣ　２０１０
ＭＳシステム	：ＧＣ／ＭＳ－ＱＰ２０１０
カラム	：ＮＥＵＴＲＡ－ＢＯＮＤ－１（０．２５ｍｍ×３０００ｍｍ）
キャリアガス	：Ｈｅ
ガス流量	：３０．０ｍＬ／分
ディテクター温度	：３１０℃
インジェクター温度	：２５０℃
カラムオーブン温度	：１００℃
カラム昇温	：８℃／分
サンプル量	：１μＬ

上記条件での分析結果及び乳酸エチルのＭＳスペクトルを図１９に示す。ＧＣ／ＭＳの結果より、（２）で回収されたポリマーは３ＨＢとＬＡをモノマー単位として含むことが確認された。

[0140] iv）ＮＭＲ分析

（２）で回収されたポリマーを重水素化クロロホルムに溶解してサンプルとし、３００ＭＨｚで^{1}Ｈ－ＮＭＲ（図２０）、^{13}Ｃ－ＮＭＲ（図２１）及び^{1}Ｈ^{13}Ｃ－ＮＭＲ（図２２）を測定した。その結果、（２）で回収されたポリマーは３ＨＢとＬＡをモノマー単位として含むこと、３ＨＢとＬＡの比が約５３：４７であることが判明した。

[0141] ＜実施例４＞　３ＨＢ、ＬＡ及び３ＨＶをモノマー単位とする共重合ポリエステルの製造

１）ポリマーの生産

実施例１で作製したｐＴＶ１１８ＮＰＣＴＣ１（ＳＴ／ＱＫ）ＡＢを用いて乳酸高蓄積大腸菌株Ｊｗ０８８５を形質転換した。得られた形質転換体をアンピシリン１００μｇ／ｍｌ、２％グルコース、１０ｍＭパントテン酸、０．５％プロピオン酸ナトリウムを含むＬＢ培地（表１に示す）１００ｍｌに植菌し、３０℃にて７２時間培養を行った。この培養物を４℃、３，１００ｒｐｍ、１５分間の条件で遠心して菌体を回収し、１０ｍＭトリス塩酸緩衝液（ｐＨ７．５）に懸濁させてから再度同条件で遠心分離した後、２日間、凍結乾燥した。

[0142] ガラス製耐圧反応管に乾燥菌体を移し、クロロホルム５ｍｌを加えて懸濁液としてから、６０℃のヒートブロック中で４８時間保ったのち、室温まで冷却後、０．２μｍＰＴＦＥフィルター（ＡＤＶＡＮＴＥＣ）で濾過して、クロロホルム溶液と菌体を分離した。次に濾液に１００ｍｌのメタノールを加え、ポリマーを析出させた。析出したポリマーを０．２μｍＰＴＦＥフィルター（ＡＤＶＡＮＴＥＣ）で濾過してポリマーを得た。

[0143] 回収されたポリマーの量は、１２ｍｇであった。また、ポリマーの菌体内含有率（培養後の乾燥菌体重量に対して回収されたポリマー重量割合）は８

．５％であった。

[0144] ２）ポリマーの分析

ｉ）ＨＰＬＣ分析

回収されたポリマー約１０ｍｇに１Ｎ水酸化ナトリウムを５００μｌ加え、１００℃で３時間加熱し水和分解した。反応後１Ｎ塩酸を５００μｌ加えて中和し、０．２μｍＰＴＦＥフィルター（ＡＤＶＡＮＴＥＣ）で濾過したものを検液と、下記の条件下でＨＰＬＣ分析を行った。

[0145] システム：ＰＵ－２０８９　Ｐｌｕｓ　ｓｙｓｔｅｍ（ＪＡＳＣＯ）

カラム　：Ａｍｉｎｅｘ　ＨＰＸ－８７Ｈ（７．８ｍｍ　ｉｎｎｅｒａｍｅｔｅ×３００ｍｍ）

（Ｓｈｏｄｅｘ）

溶離液　：０．０１４Ｎ硫酸－２０％アセトニトリル

流量　　：０．５ｍＬ／分

温度　　：６０℃

検出　　：ＡＳ－２０５５　（ＪＡＳＣＯ）

注入量　：１０μＬ

検量線はモノマー組成既知のポリ乳酸（ＬＡ１００ｍｏｌ％）およびポリ［ヒドロキシ酪酸（ＨＢ）－ｃｏ－ヒドロキシ吉草酸（ＨＶ）－ｃｏ－ヒドロキシヘキサン酸（ＨＨｘ）］（ＨＢ：７０ｍｏｌ％、ＨＶ：２３ｍｏｌ％、ＨＨｘ：７ｍｏｌ％）を用いて作成した。

[0146] その結果（図２３～２５）、得られたポリマーは４０ｍｏｌ％程度の乳酸、４８ｍｏｌ％程度の３－ヒドロキシ酪酸、１１ｍｏｌ％程度の３－ヒドロキシ吉草酸からなることが確認された。

[0147] 本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

請求の範囲

[請求項1] ３－ヒドロキシ酪酸と乳酸とからなる共重合ポリエステルの製造方法であって、１）プロピオン酸及び／又は乳酸にＣｏＡが転移される反応を触媒するタンパク質、２分子のアセチルＣｏＡからアセトアセチルＣｏＡが形成される反応を触媒するタンパク質、アセトアセチルＣｏＡの還元反応を触媒するタンパク質、及び下記のａ）又はｂ）のアミノ酸配列からなるポリヒドロキシアルカン酸の合成反応を触媒するタンパク質を有する組み換え微生物を、炭素源を含む培地で培養する工程：

ａ）配列番号２に示されるアミノ酸配列の１３０番目、３２５番目、４７７番目及び４８１番目のアミノ酸の少なくとも１以上が他のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列

ｂ）ａ）に規定されるタンパク質において、さらに１３０番目、３２５番目、４７７番目及び４８１番目以外の少なくとも１以上のアミノ酸が欠失若しくは置換され、又は1以上のアミノ酸残基が挿入されたアミノ酸配列、

及び、２）工程１）の培養物から前記共重合ポリエステルを回収する工程を含む、前記共重合ポリエステルの製造方法。

[請求項2] プロピオン酸及び／又は乳酸にＣｏＡが転移される反応を触媒するタンパク質のアミノ酸配列が、配列番号４に示されるアミノ酸配列、又は配列番号４に示されるアミノ酸配列において１若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列である、請求項１に記載の製造方法。

[請求項3] ２分子のアセチルＣｏＡからアセトアセチルＣｏＡが形成される反応を触媒するタンパク質のアミノ酸配列が、配列番号６に示されるアミノ酸配列、又は配列番号６に示されるアミノ酸配列において１若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列である、請求項１に記載の製造方法。

[請求項4] アセトアセチルＣｏＡの還元反応を触媒するタンパク質のアミノ酸配列が、配列番号８に示されるアミノ酸配列、又は配列番号８に示されるアミノ酸配列において１又は数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列である、請求項１に記載の製造方法。

[請求項5] ポリヒドロキシアルカン酸の合成反応を触媒するタンパク質のアミノ酸配列が、配列番号２に示されるアミノ酸配列の３２５番目及び４８１番目のアミノ酸がそれぞれ他のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列である、請求項１に記載の製造方法。

[請求項6] ポリヒドロキシアルカン酸の合成反応を触媒するタンパク質のアミノ酸配列が、配列番号２に示されるアミノ酸配列の３２５番目と４８１番目のアミノ酸が同時に置換されたアミノ酸配列である、請求項５に記載の製造方法。

[請求項7] ポリヒドロキシアルカン酸の合成反応を触媒するタンパク質のアミノ酸配列が、配列番号２に示されるアミノ酸配列の３２５番目のＳｅｒがＴｈｒに、４８１番目のＧｌｎがＬｙｓにそれぞれ置換されたアミノ酸配列である、請求項６に記載の製造方法。

[請求項8] 前記タンパク質のいずれもが、微生物に導入された組み換え発現ベクターにコードされているタンパク質である、請求項１に記載の製造方法。

[請求項9] 組み換え微生物の培養が嫌気条件下に行われる、請求項１～８の何れかに記載の製造方法。

[請求項10] 微生物が乳酸蓄積能を有する微生物である、請求項１～９の何れかに記載の製造方法。

[請求項11] 高乳酸蓄積能を有する微生物が、大腸菌Ｊｗ２２９３株、Ｊｗ０８８５株又はＪｗ０８８６株である、請求項１０に記載の製造方法。

[請求項12] ３－ヒドロキシ酪酸と乳酸を含む共重合ポリエステルの製造方法であって、１）プロピオン酸及び／又は乳酸にＣｏＡが転移される反応を触媒するタンパク質、２分子のアセチルＣｏＡからアセトアセチル

ＣｏＡが形成される反応を触媒するタンパク質、アセトアセチルＣｏＡの還元反応を触媒するタンパク質、及び下記のａ）又はｂ）のアミノ酸配列からなるポリヒドロキシアルカン酸の合成反応を触媒するタンパク質を有する組み換え微生物を、３－ヒドロキシ酪酸と乳酸以外のヒドロキシアルカン酸及び炭素源を含む培地で培養する工程：

ａ）配列番号２に示されるアミノ酸配列の１３０番目、３２５番目、４７７番目及び４８１番目のアミノ酸の少なくとも１以上が他のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列

ｂ）ａ）に規定されるタンパク質において、さらに１３０番目、３２５番目、４７７番目及び４８１番目以外の少なくとも１以上のアミノ酸が欠失若しくは置換され、又は1以上のアミノ酸残基が挿入されたアミノ酸配列、

及び、２）工程１）の培養物から前記共重合ポリエステルを回収する工程を含む、前記共重合ポリエステルの製造方法。

[請求項13] プロピオン酸及び／又は乳酸にＣｏＡが転移される反応を触媒するタンパク質のアミノ酸配列が、配列番号４に示されるアミノ酸配列、又は配列番号４に示されるアミノ酸配列において１若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列である、請求項１２に記載の製造方法。

[請求項14] ２分子のアセチルＣｏＡからアセトアセチルＣｏＡが形成される反応を触媒するタンパク質のアミノ酸配列が、配列番号６に示されるアミノ酸配列、又は配列番号６に示されるアミノ酸配列において１若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列である、請求項１２に記載の製造方法。

[請求項15] アセトアセチルＣｏＡの還元反応を触媒するタンパク質のアミノ酸配列が、配列番号８に示されるアミノ酸配列、又は配列番号８に示されるアミノ酸配列において１又は数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列である、請求項１２に記載の製造方法。

[請求項16] ポリヒドロキシアルカン酸の合成反応を触媒するタンパク質のアミノ酸配列が、配列番号２に示されるアミノ酸配列の３２５番目及び４８１番目のアミノ酸がそれぞれ他のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列である、請求項１２に記載の製造方法。

[請求項17] ポリヒドロキシアルカン酸の合成反応を触媒するタンパク質のアミノ酸配列が、配列番号２に示されるアミノ酸配列の３２５番目と４８１番目のアミノ酸が同時に置換されたアミノ酸配列である、請求項１２に記載の製造方法。

[請求項18] ポリヒドロキシアルカン酸の合成反応を触媒するタンパク質のアミノ酸配列が、配列番号２に示されるアミノ酸配列の３２５番目のＳｅｒがＴｈｒに、４８１番目のＧｌｎがＬｙｓにそれぞれ置換されたアミノ酸配列である、請求項１６又は１７に記載の製造方法。

[請求項19] 前記タンパク質のいずれもが、微生物に導入された組み換え発現ベクターにコードされているタンパク質である、請求項１２に記載の製造方法。

[請求項20] ３－ヒドロキシ酪酸と乳酸以外のヒドロキシアルカン酸の前駆体が、プロピオン酸、吉草酸、ドデカン酸、４－ヒドロキシ酪酸及び４－ヒドロキシ吉草酸よりなる群から選ばれる一種以上の前駆体である、請求項１２～１９のいずれかに記載の製造方法。

[請求項21] 組み換え微生物の培養が嫌気条件下に行われる、請求項１２～２０の何れかに記載の製造方法。

[請求項22] 微生物が乳酸蓄積能を有する微生物である、請求項１２～２１の何れかに記載の製造方法。

[請求項23] 高乳酸蓄積能を有する微生物が、大腸菌Ｊｗ２２９３株、Ｊｗ０８８５株又はＪｗ０８８６株である、請求項２２に記載の製造方法。

[請求項24] プロピオン酸及び／又は乳酸にＣｏＡが転移される反応を触媒するタンパク質、２分子のアセチルＣｏＡからアセトアセチルＣｏＡが形成される反応を触媒するタンパク質、アセトアセチルＣｏＡの還元反

応を触媒するタンパク質、及び下記のａ）又はｂ）のアミノ酸配列からなるポリヒドロキシアルカン酸の合成反応を触媒するタンパク質を発現する組み換え微生物。

ａ）配列番号２に示されるアミノ酸配列の１３０番目、３２５番目、４７７番目及び４８１番目のアミノ酸の少なくとも１以上が他のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列

ｂ）ａ）に規定されるタンパク質において、さらに１３０番目、３２５番目、４７７番目及び４８１番目以外の少なくとも１以上のアミノ酸が欠失若しくは置換され、又は1以上のアミノ酸残基が挿入されたアミノ酸配列

[請求項25] プロピオン酸及び／又は乳酸にＣｏＡが転移される反応を触媒するタンパク質のアミノ酸配列が、配列番号４に示されるアミノ酸配列、又は配列番号４に示されるアミノ酸配列において１若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列である、請求項２４に記載の組み換え微生物。

[請求項26] ２分子のアセチルＣｏＡからアセトアセチルＣｏＡが形成される反応を触媒するタンパク質のアミノ酸配列が、配列番号６に示されるアミノ酸配列、又は配列番号６に示されるアミノ酸配列において１若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列である、請求項２４に記載の組み換え微生物。

[請求項27] アセトアセチルＣｏＡの還元反応を触媒するタンパク質のアミノ酸配列が、配列番号８に示されるアミノ酸配列、又は配列番号８に示されるアミノ酸配列において１又は数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列である、請求項２４に記載の組み換え微生物。

[請求項28] ポリヒドロキシアルカン酸の合成反応を触媒するタンパク質のアミノ酸配列が、配列番号２に示されるアミノ酸配列の３２５番目及び４８１番目のアミノ酸がそれぞれ他のアミノ酸に置換されたアミノ酸配

列である、請求項２４に記載の組み換え微生物。

[請求項29] ポリヒドロキシアルカン酸の合成反応を触媒するタンパク質のアミノ酸配列が、配列番号２に示されるアミノ酸配列の３２５番目と４８１番目のアミノ酸が同時に置換されたアミノ酸配列である、請求項２４に記載の組み換え微生物。

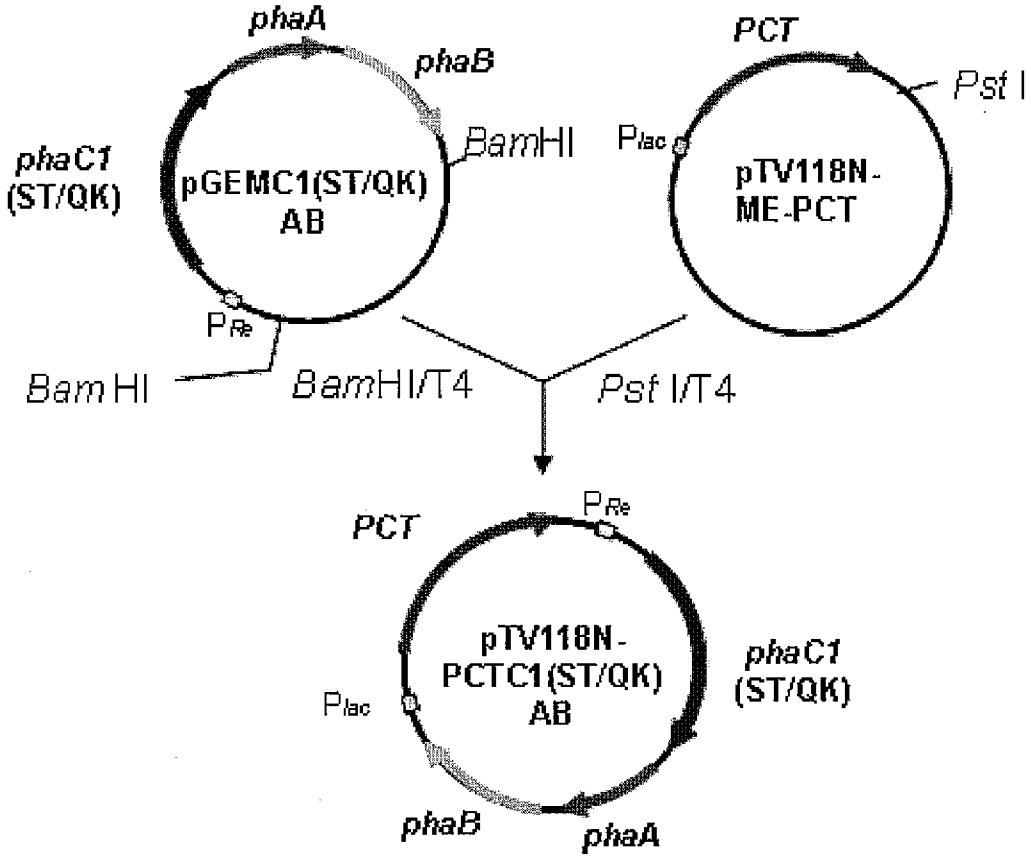
[請求項30] ポリヒドロキシアルカン酸の合成反応を触媒するタンパク質のアミノ酸配列が、配列番号２に示されるアミノ酸配列の３２５番目のＳｅｒがＴｈｒに、４８１番目のＧｌｎがＬｙｓにそれぞれ置換されたアミノ酸配列である、請求項２８又は２９に記載の組み換え微生物。

[請求項31] 前記タンパク質のいずれもが、微生物に導入された組み換え発現ベクターにコードされているタンパク質である、請求項２４に記載の組み換え微生物。

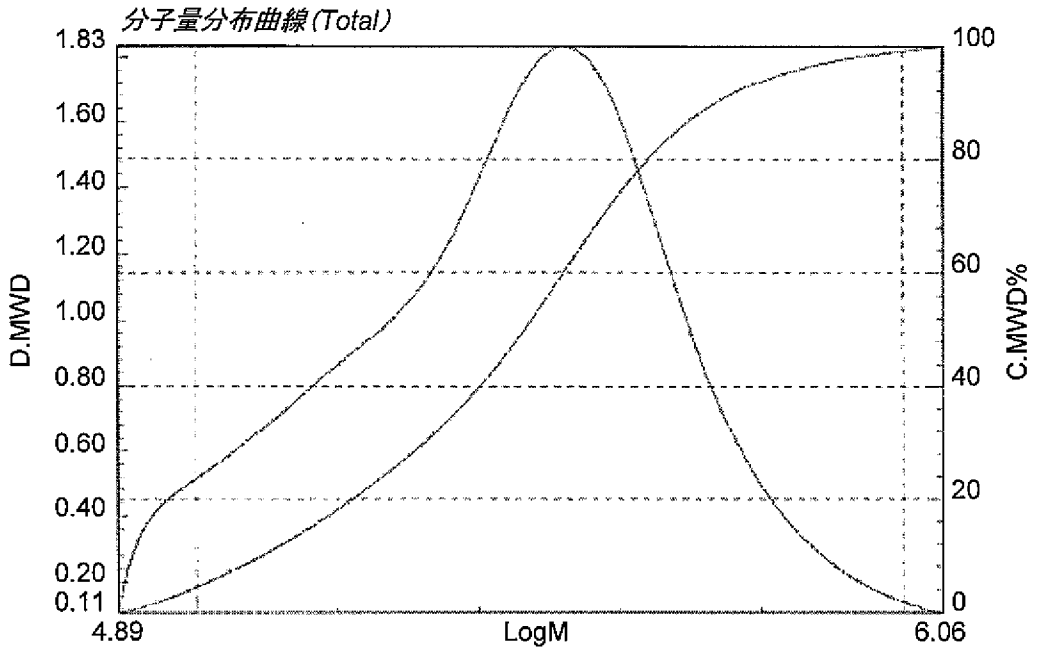
[請求項32] 微生物が乳酸蓄積能を有する微生物である、請求項２４～３１のいずれかに記載の組み換え微生物。

[請求項33] 高乳酸蓄積能を有する微生物が、大腸菌Ｊｗ２２９３株、Ｊｗ０８８５株又はＪｗ０８８６株である、請求項３２に記載の組み換え微生物。

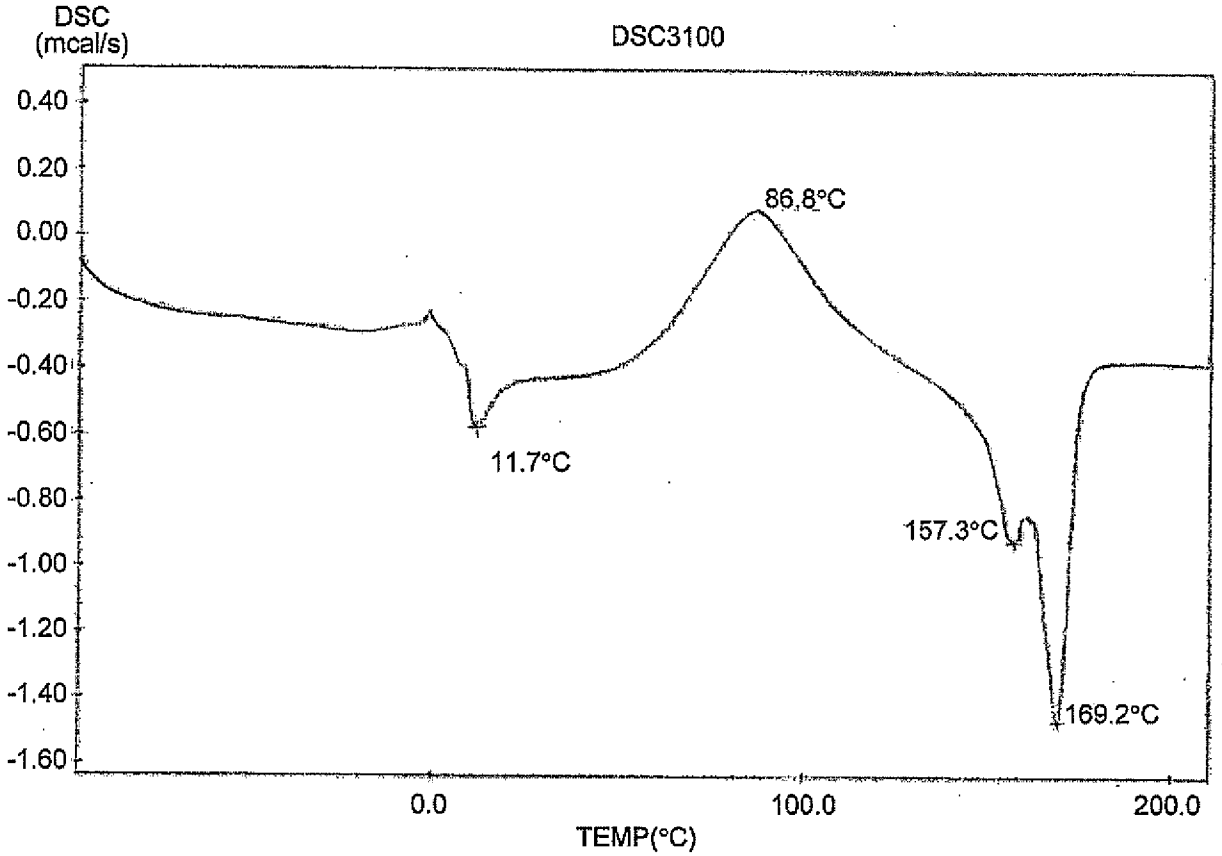
[図1]


phaA
phaB
BamHI
phaC1
(ST/QK)
pGEMC1(ST/QK)
AB
PRe
BamHI
BamHI/T4
PCT
PstI
Plac
pTV118N-
ME-PCT
PstI/T4
PCT
PRe
pTV118N-
PCTC1(ST/QK)
AB
Plac
phaC1
(ST/QK)
phaB
phaA

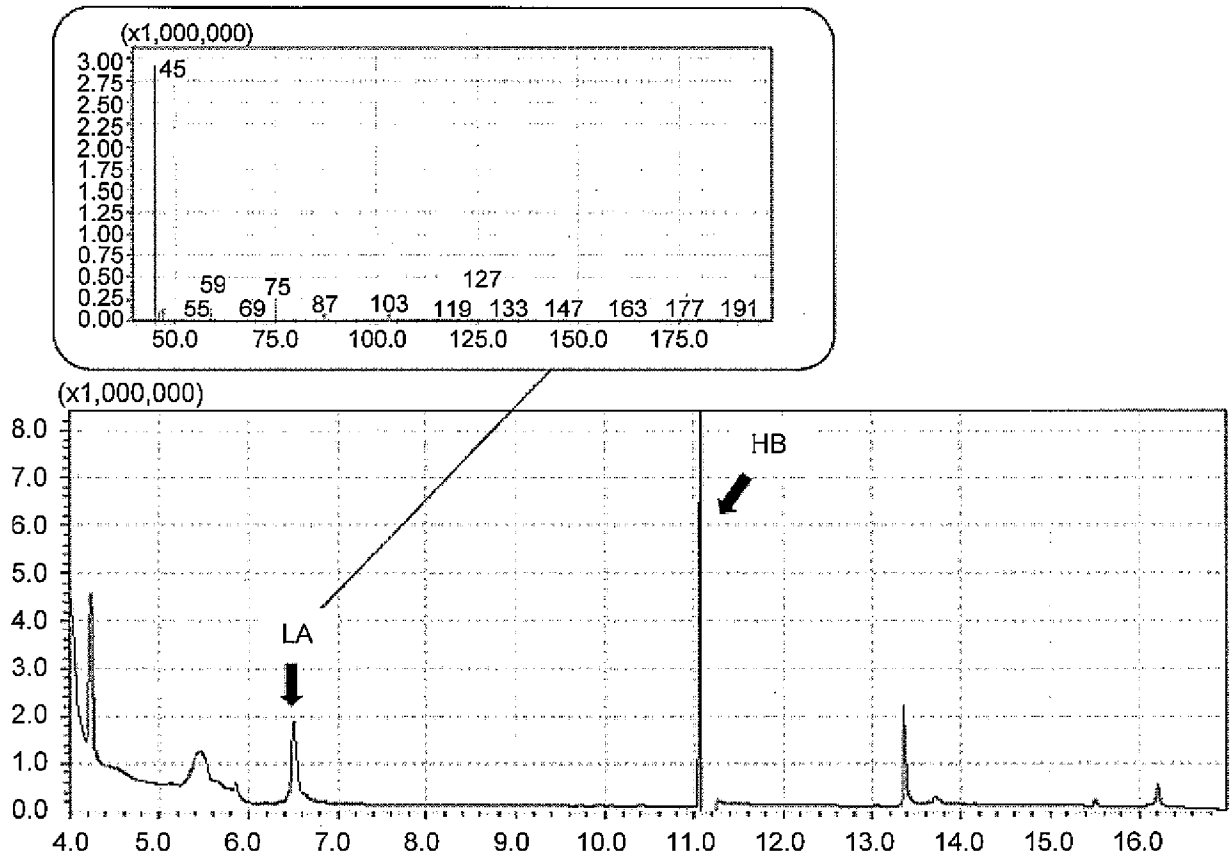
[図2]


分子量分布曲線(Total)
1.83
1.60
1.40
1.20
1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
0.11
D.MWD
100
80
60
40
20
0
C.MWD%
4.89
LogM
6.06

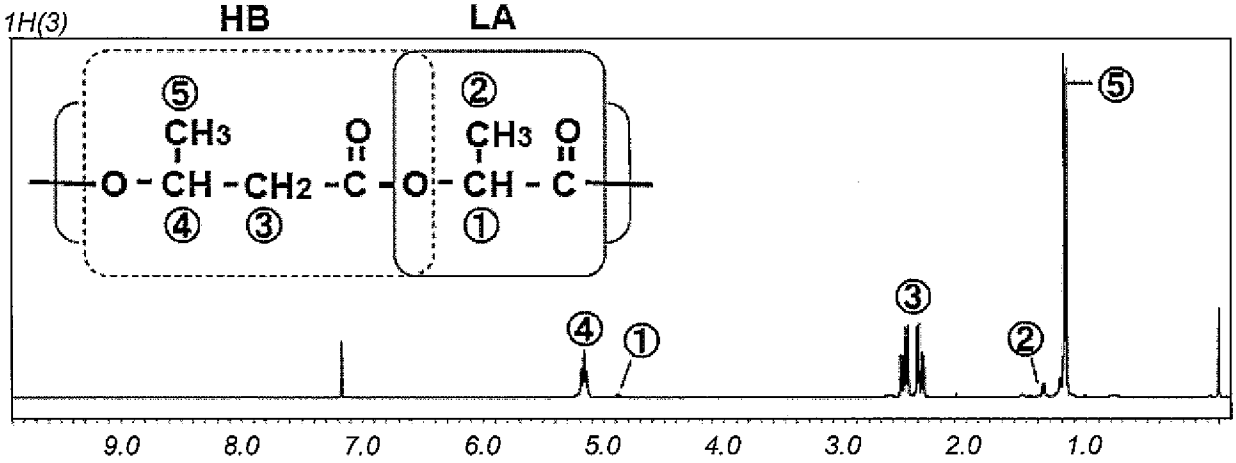
[図3]


DSC
(mcal/s)
DSC3100
0.40
0.20
0.00
-0.20
-0.40
-0.60
-0.80
-1.00
-1.20
-1.40
-1.60
86.8°C
11.7°C
157.3°C
169.2°C
0.0
100.0
200.0
TEMP(°C)

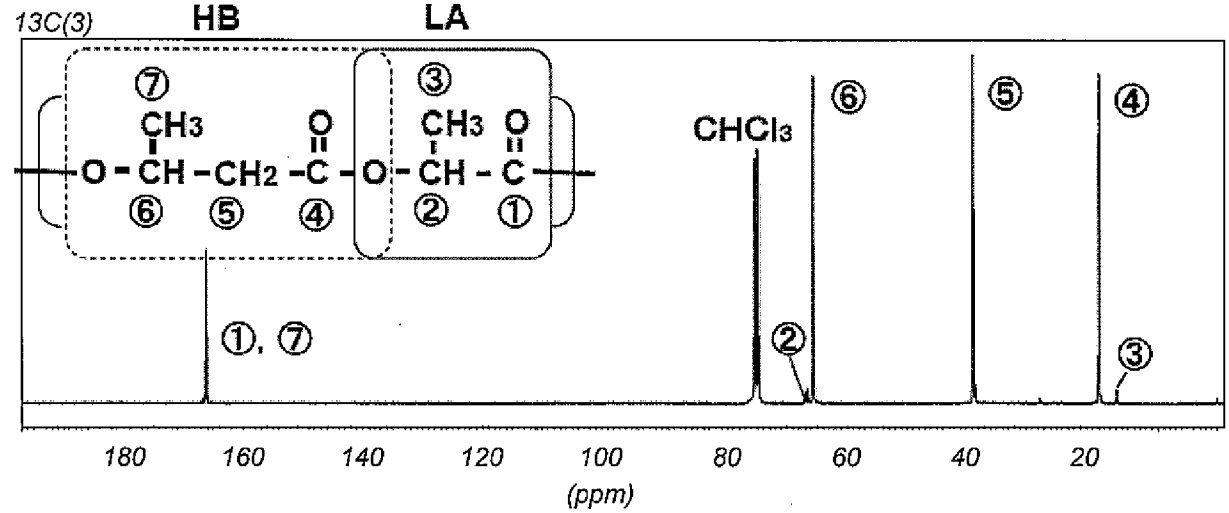
[図4]


(x1,000,000)
3.00
2.75
2.50
2.25
2.00
1.75
1.50
1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
45
59
75
127
55
69
87
103
119
133
147
163
177
191
50.0
75.0
100.0
125.0
150.0
175.0
(x1,000,000)
8.0
7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
LA
HB
4.0
5.0
6.0
7.0
8.0
9.0
10.0
11.0
12.0
13.0
14.0
15.0
16.0

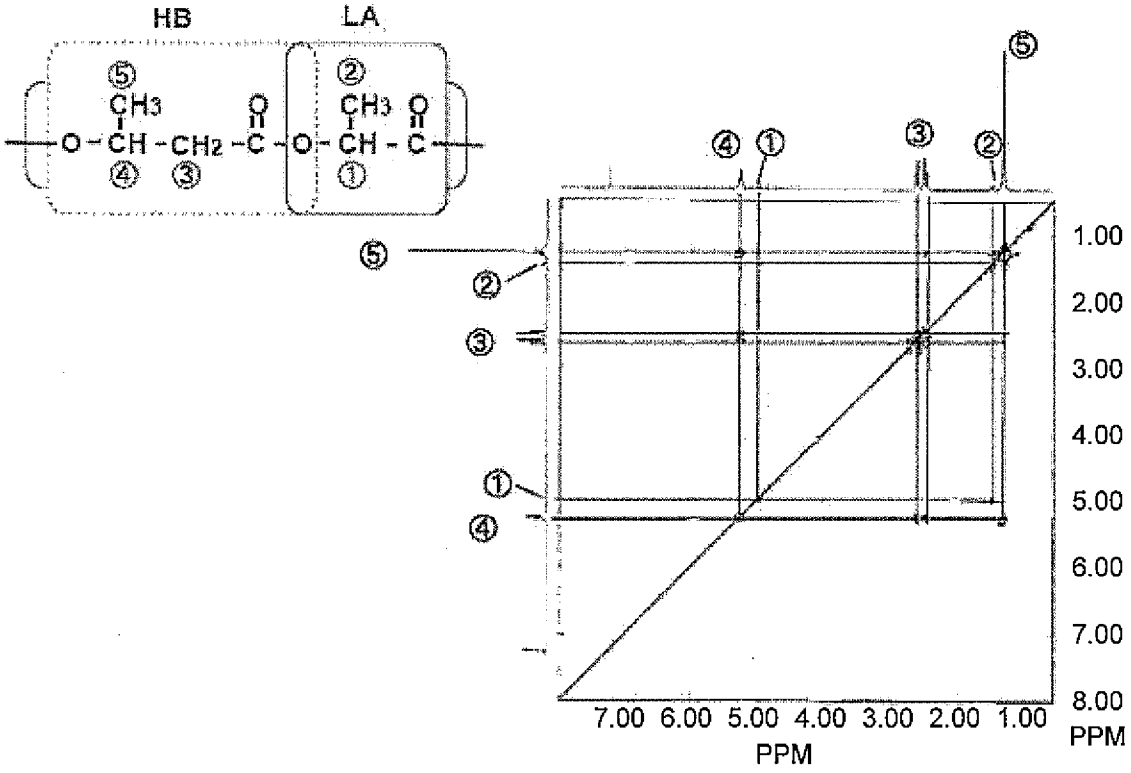
[図5]


1H(3)
HB
LA
9.0
8.0
7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0

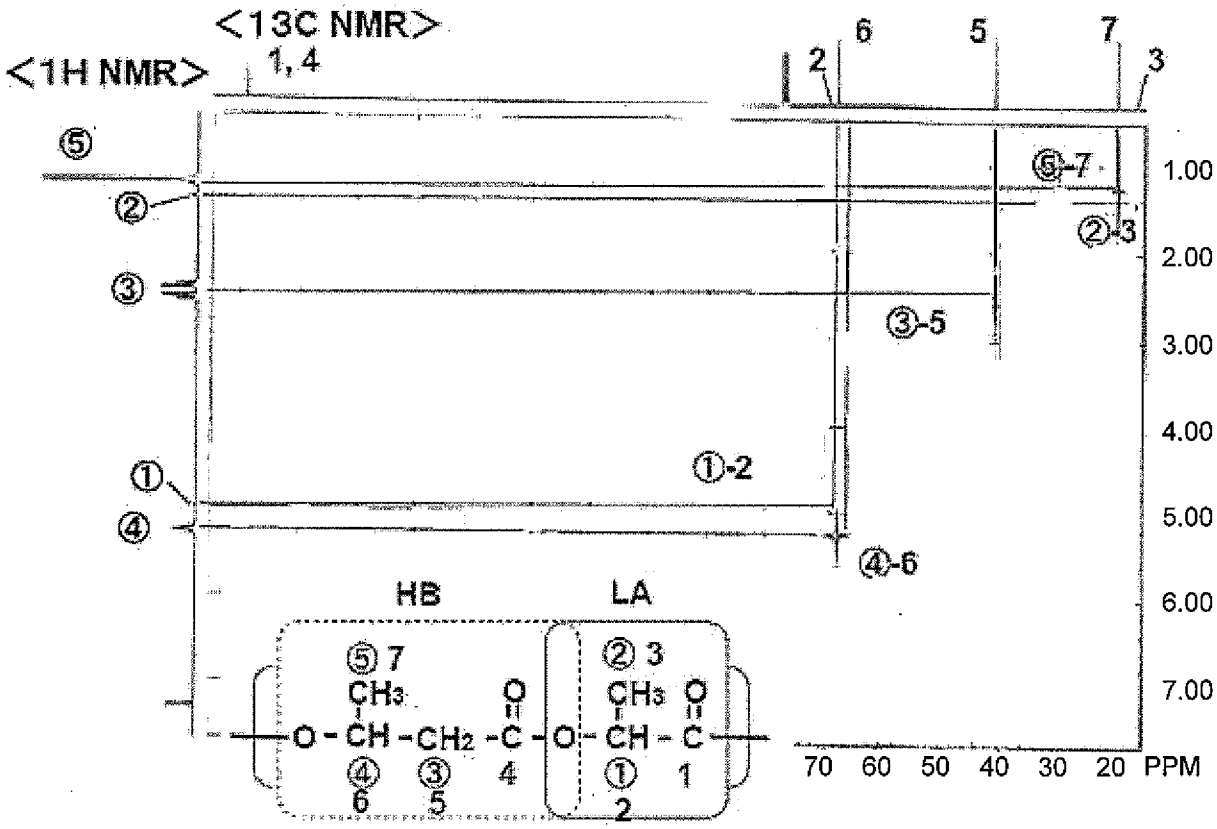
[図6]


13C(3)
HB
LA
CHCl3
180
160
140
120
100
80
60
40
20
(ppm)

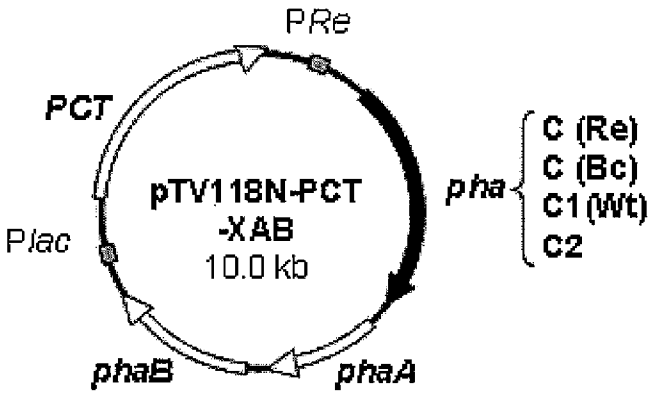
[図7]


HB
LA
1.00
2.00
3.00
4.00
5.00
6.00
7.00
8.00
7.00 6.00 5.00 4.00 3.00 2.00 1.00
PPM
PPM

[図8]



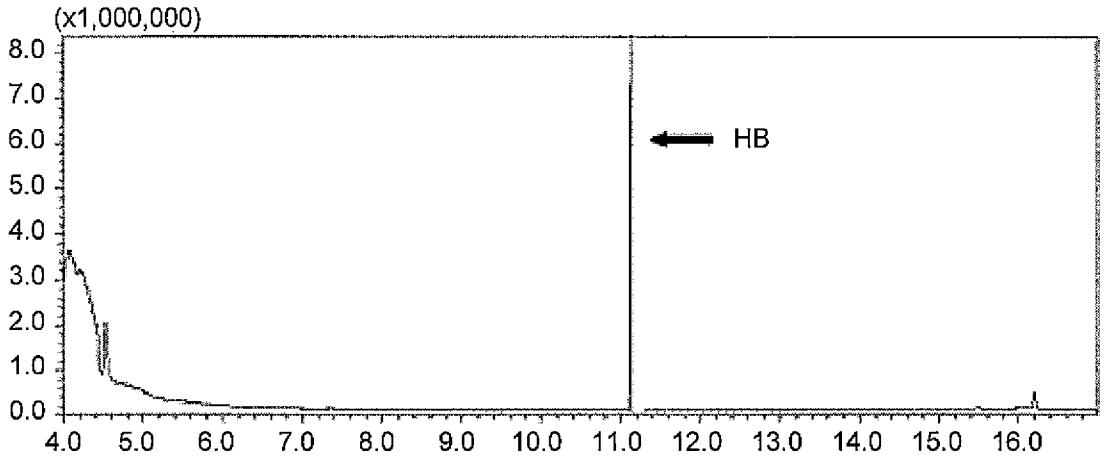
[図9]



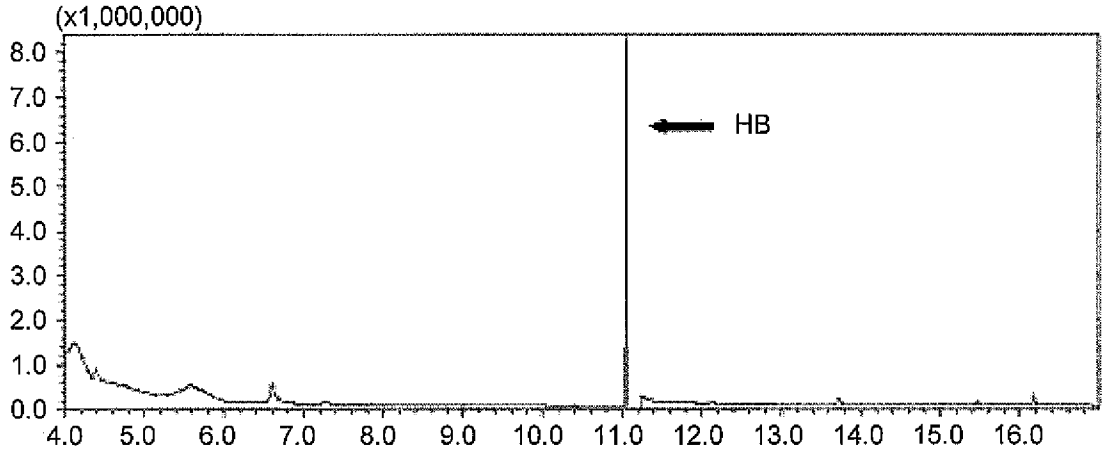
X = C (Re), C (Bc), C1 (Wt), C2

[図10]

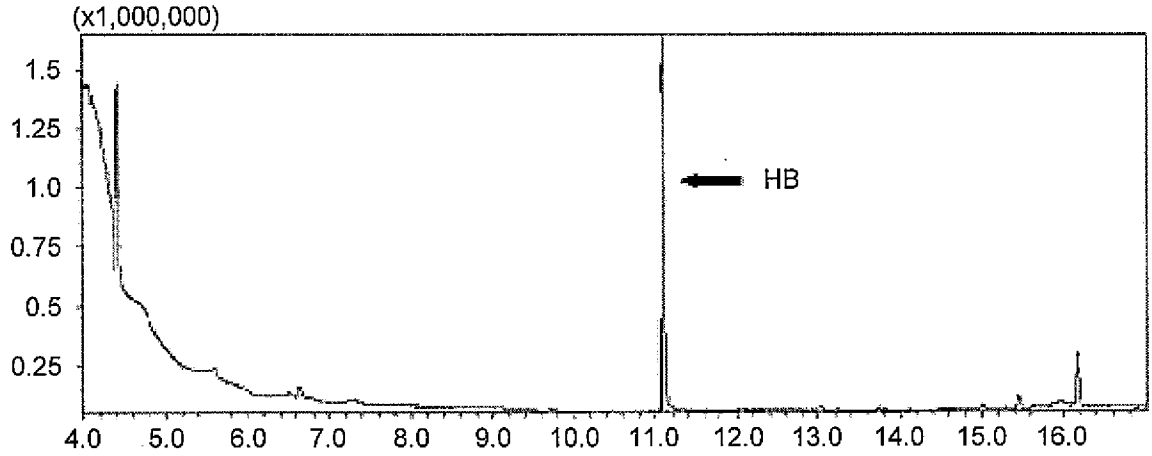
A


(x1,000,000)
8.0
7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
HB
4.0 5.0 6.0 7.0 8.0 9.0 10.0 11.0 12.0 13.0 14.0 15.0 16.0

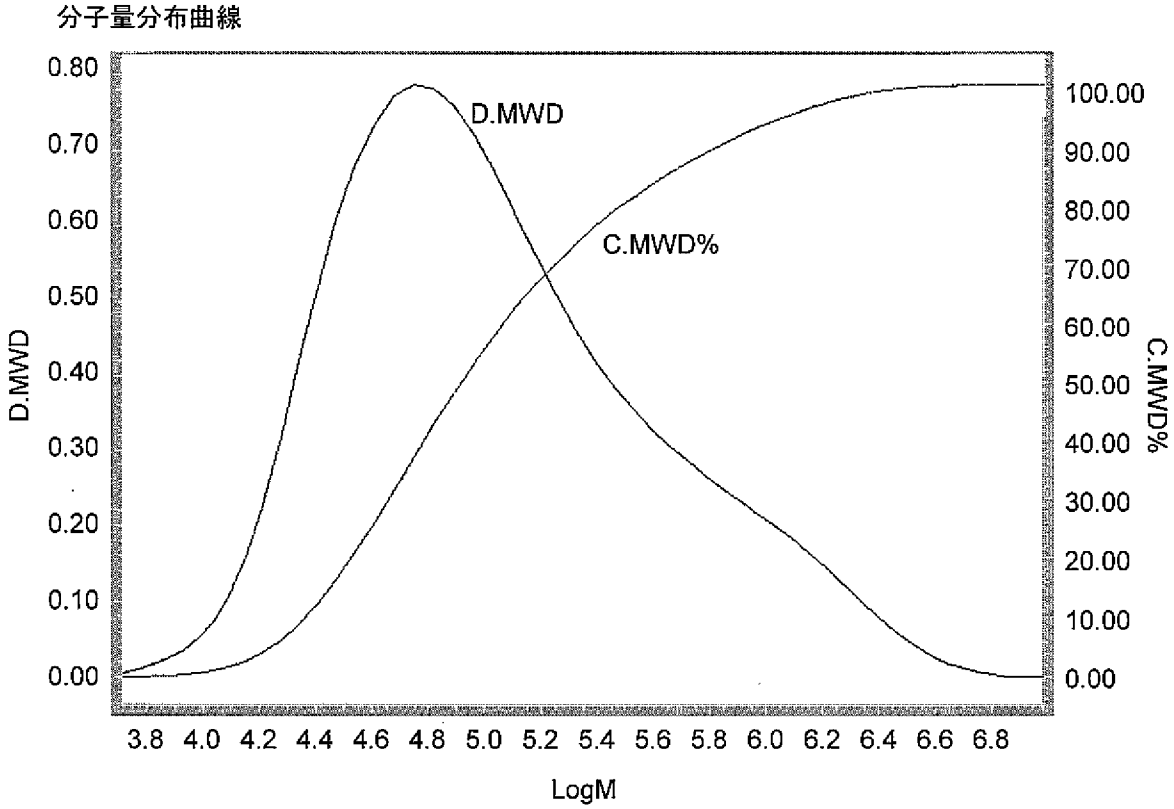
B


(x1,000,000)
8.0
7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
HB
4.0 5.0 6.0 7.0 8.0 9.0 10.0 11.0 12.0 13.0 14.0 15.0 16.0

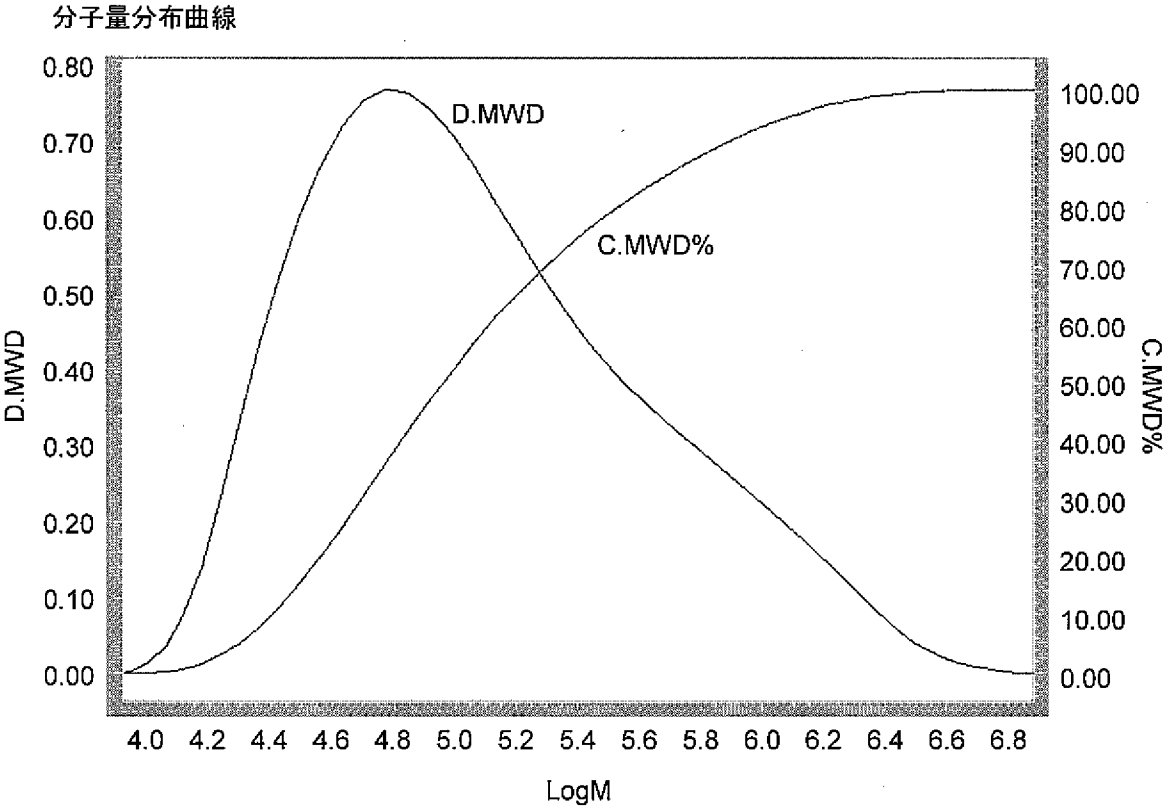
C


(x1,000,000)
1.5
1.25
1.0
0.75
0.5
0.25
HB
4.0 5.0 6.0 7.0 8.0 9.0 10.0 11.0 12.0 13.0 14.0 15.0 16.0

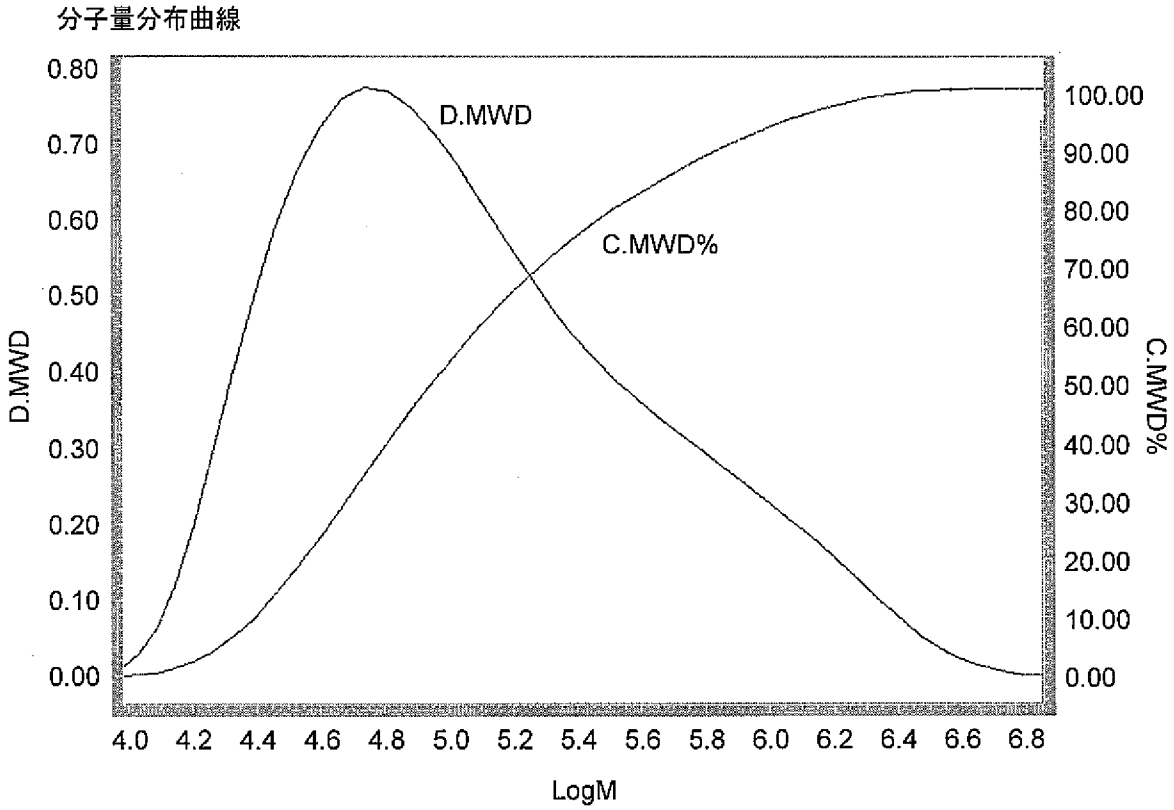
[図11a]


分子量分布曲線
D.MWD
C.MWD%
D.MWD
C.MWD%
LogM
0.80
0.70
0.60
0.50
0.40
0.30
0.20
0.10
0.00
100.00
90.00
80.00
70.00
60.00
50.00
40.00
30.00
20.00
10.00
0.00
3.8 4.0 4.2 4.4 4.6 4.8 5.0 5.2 5.4 5.6 5.8 6.0 6.2 6.4 6.6 6.8

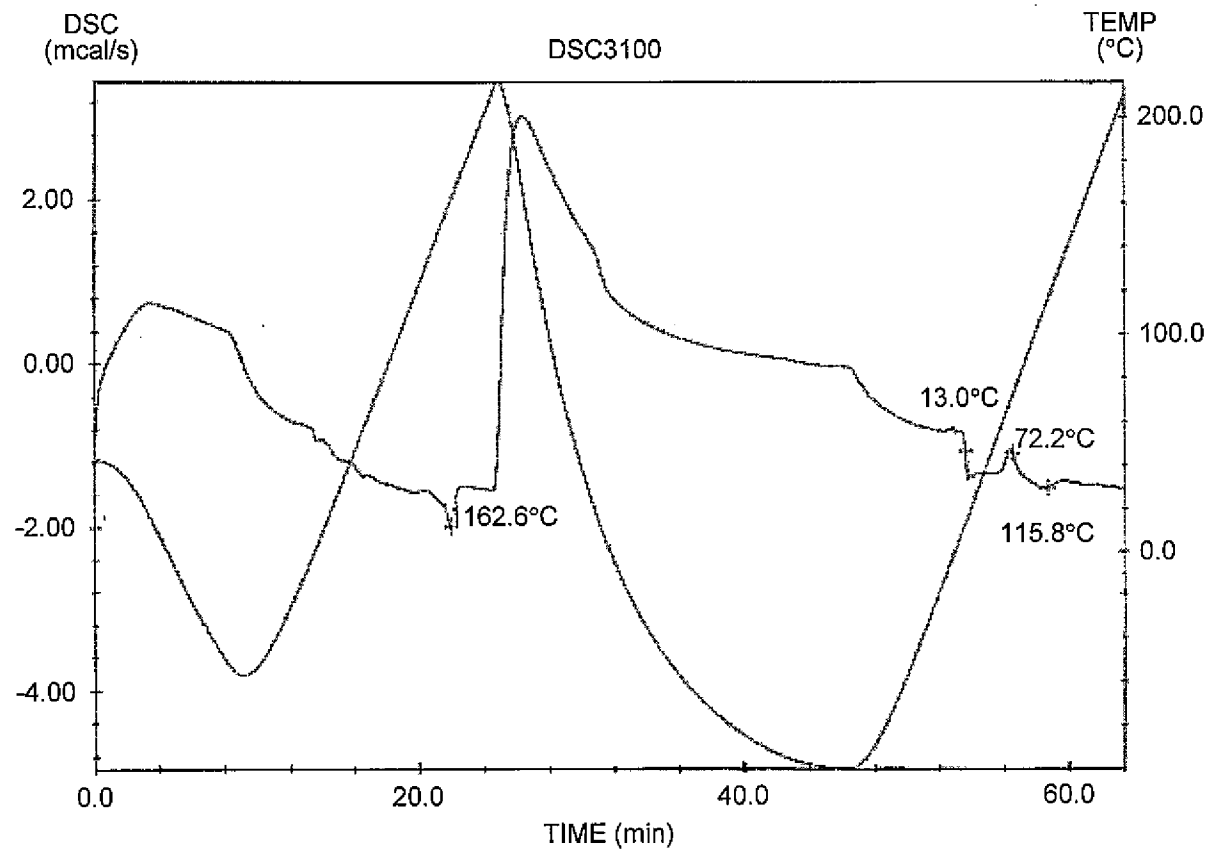
[図11b]


分子量分布曲線
D.MWD
C.MWD%
D.MWD
C.MWD%
LogM
0.80
0.70
0.60
0.50
0.40
0.30
0.20
0.10
0.00
100.00
90.00
80.00
70.00
60.00
50.00
40.00
30.00
20.00
10.00
0.00
4.0 4.2 4.4 4.6 4.8 5.0 5.2 5.4 5.6 5.8 6.0 6.2 6.4 6.6 6.8

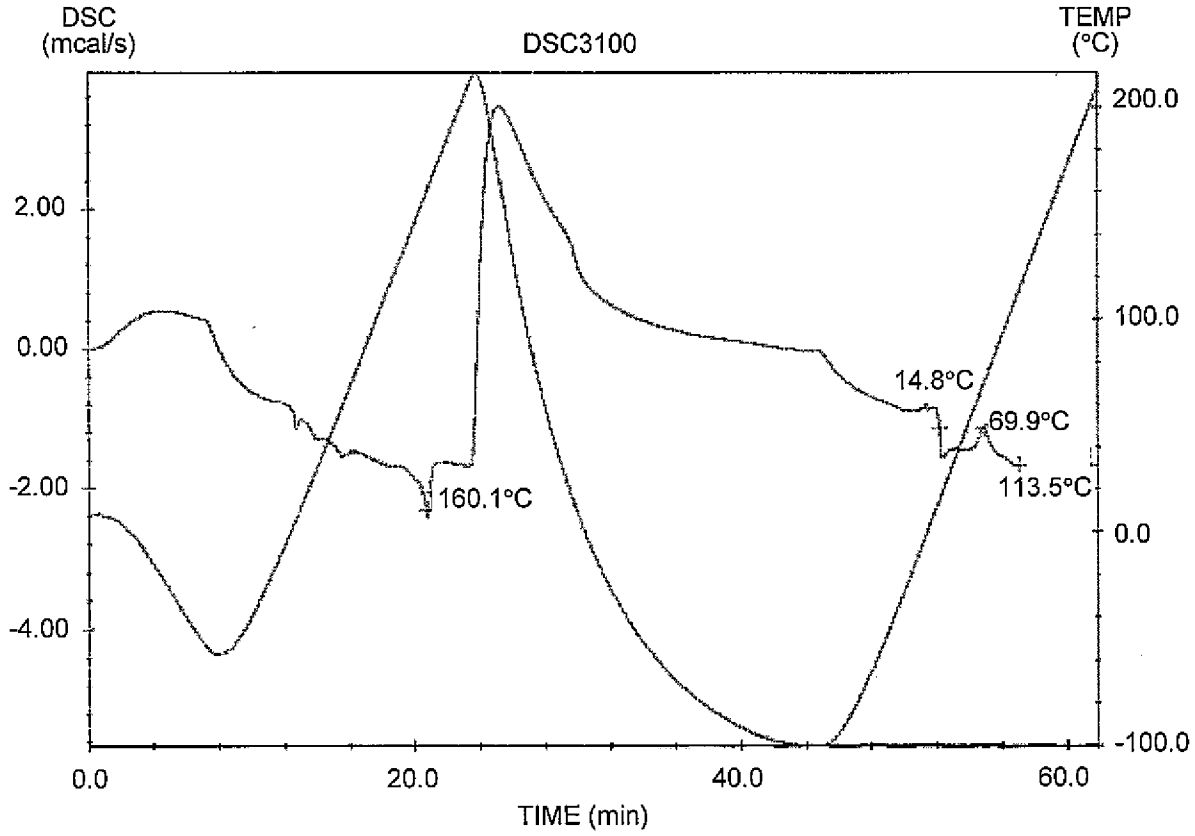
[図11c]


分子量分布曲線
D.MWD
C.MWD%
D.MWD
C.MWD%
LogM
0.80
0.70
0.60
0.50
0.40
0.30
0.20
0.10
0.00
100.00
90.00
80.00
70.00
60.00
50.00
40.00
30.00
20.00
10.00
0.00
4.0 4.2 4.4 4.6 4.8 5.0 5.2 5.4 5.6 5.8 6.0 6.2 6.4 6.6 6.8

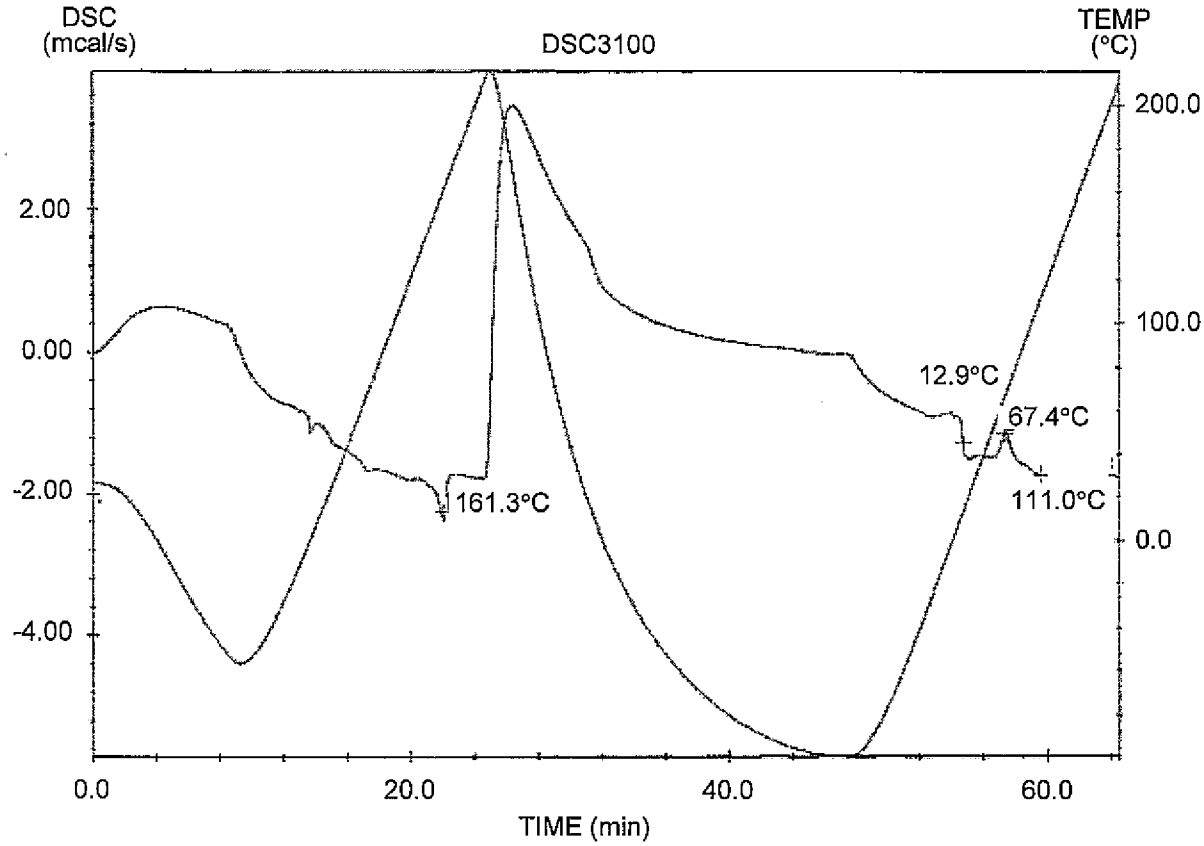
[図12a]


DSC
(mcal/s)
DSC3100
TEMP
(°C)
2.00
0.00
-2.00
-4.00
200.0
100.0
0.0
13.0°C
72.2°C
162.6°C
115.8°C
0.0
20.0
40.0
60.0
TIME (min)

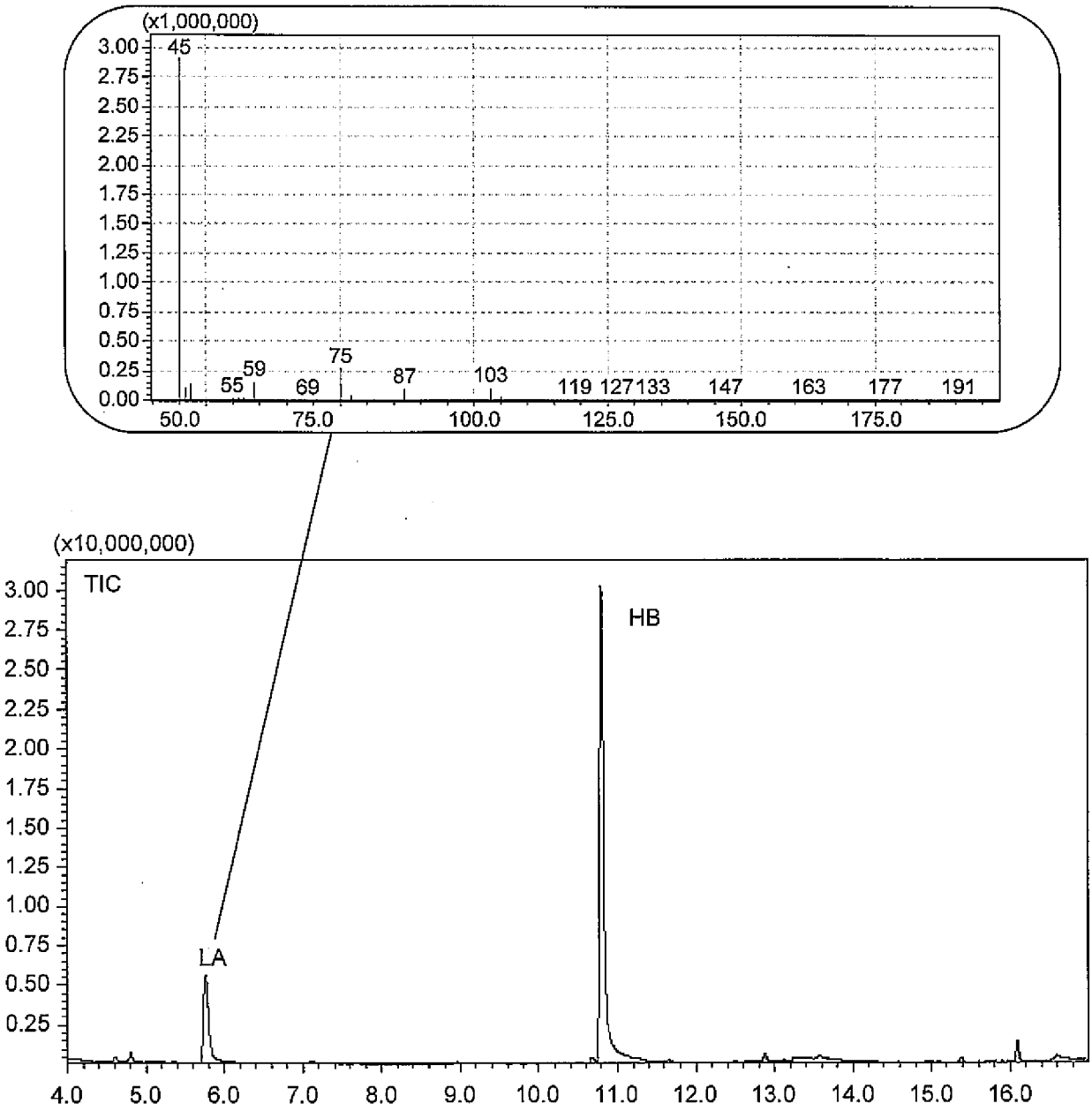
[図12b]


DSC
(mcal/s)
DSC3100
TEMP
(°C)
2.00
0.00
-2.00
-4.00
200.0
100.0
0.0
-100.0
14.8°C
69.9°C
113.5°C
160.1°C
0.0
20.0
40.0
60.0
TIME (min)

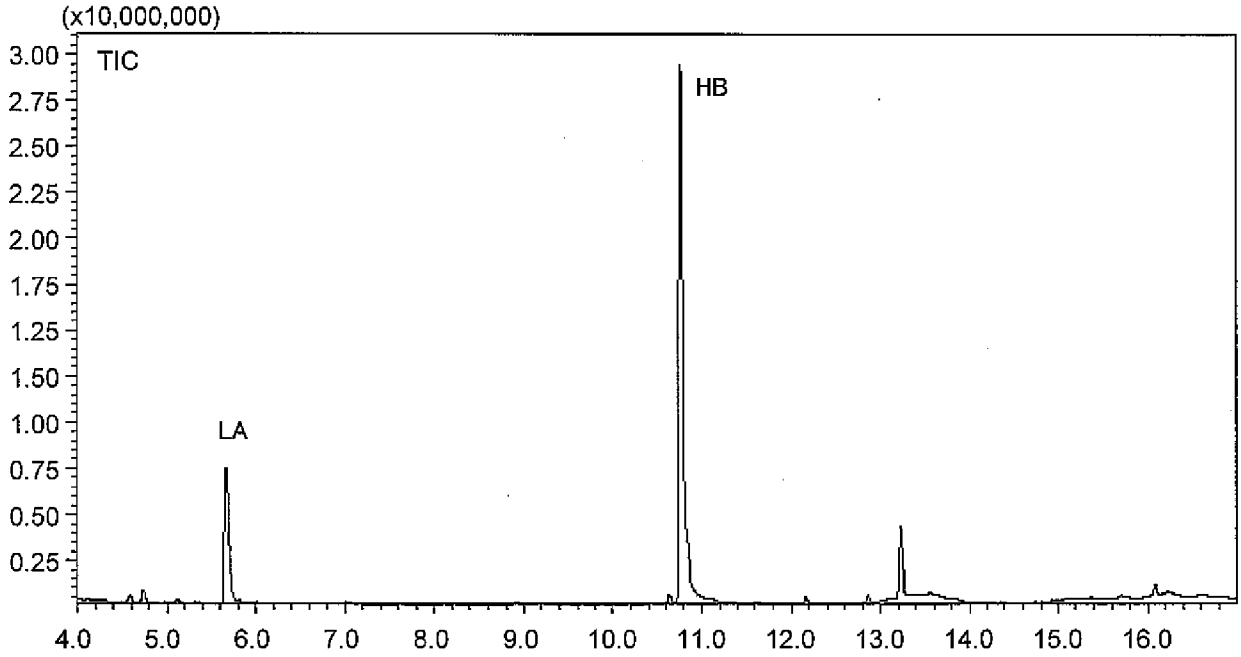
[図12c]


DSC
(mcal/s)
DSC3100
TEMP
(°C)
2.00
0.00
-2.00
-4.00
200.0
100.0
0.0
12.9°C
67.4°C
111.0°C
161.3°C
0.0
20.0
40.0
60.0
TIME (min)

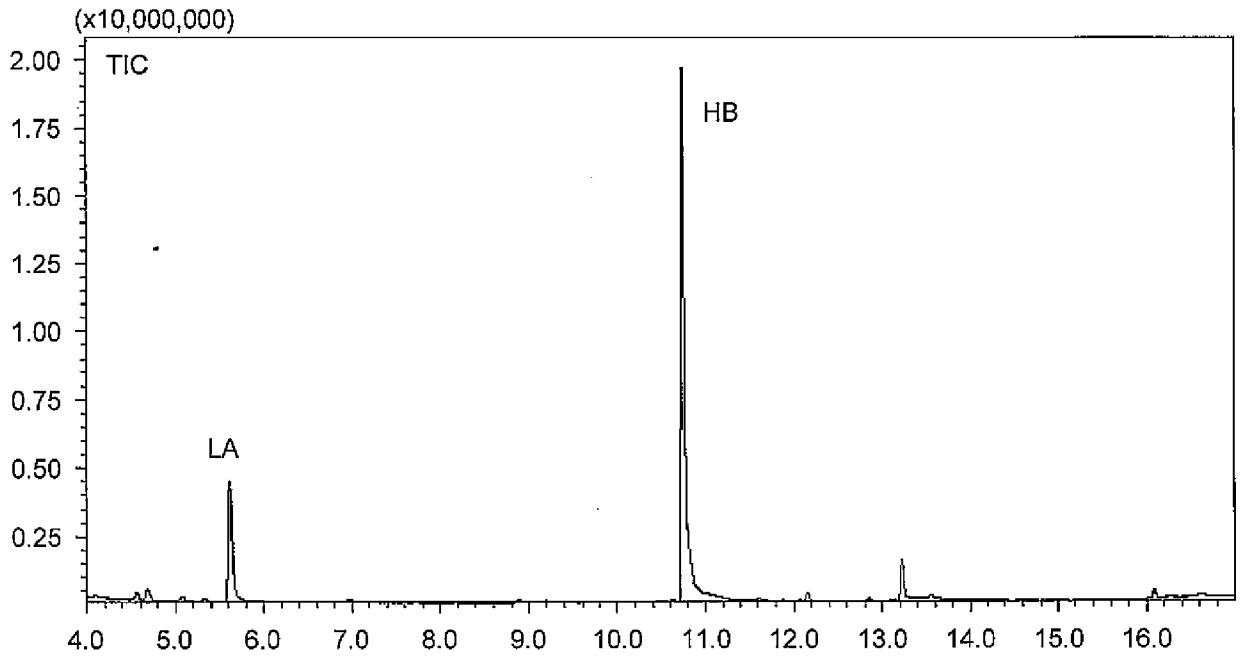
[図13a]


(x1,000,000)
3.00
2.75
2.50
2.25
2.00
1.75
1.50
1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
45
59
55
69
75
87
103
119
127
133
147
163
177
191
50.0
75.0
100.0
125.0
150.0
175.0
(x10,000,000)
TIC
LA
HB
4.0
5.0
6.0
7.0
8.0
9.0
10.0
11.0
12.0
13.0
14.0
15.0
16.0

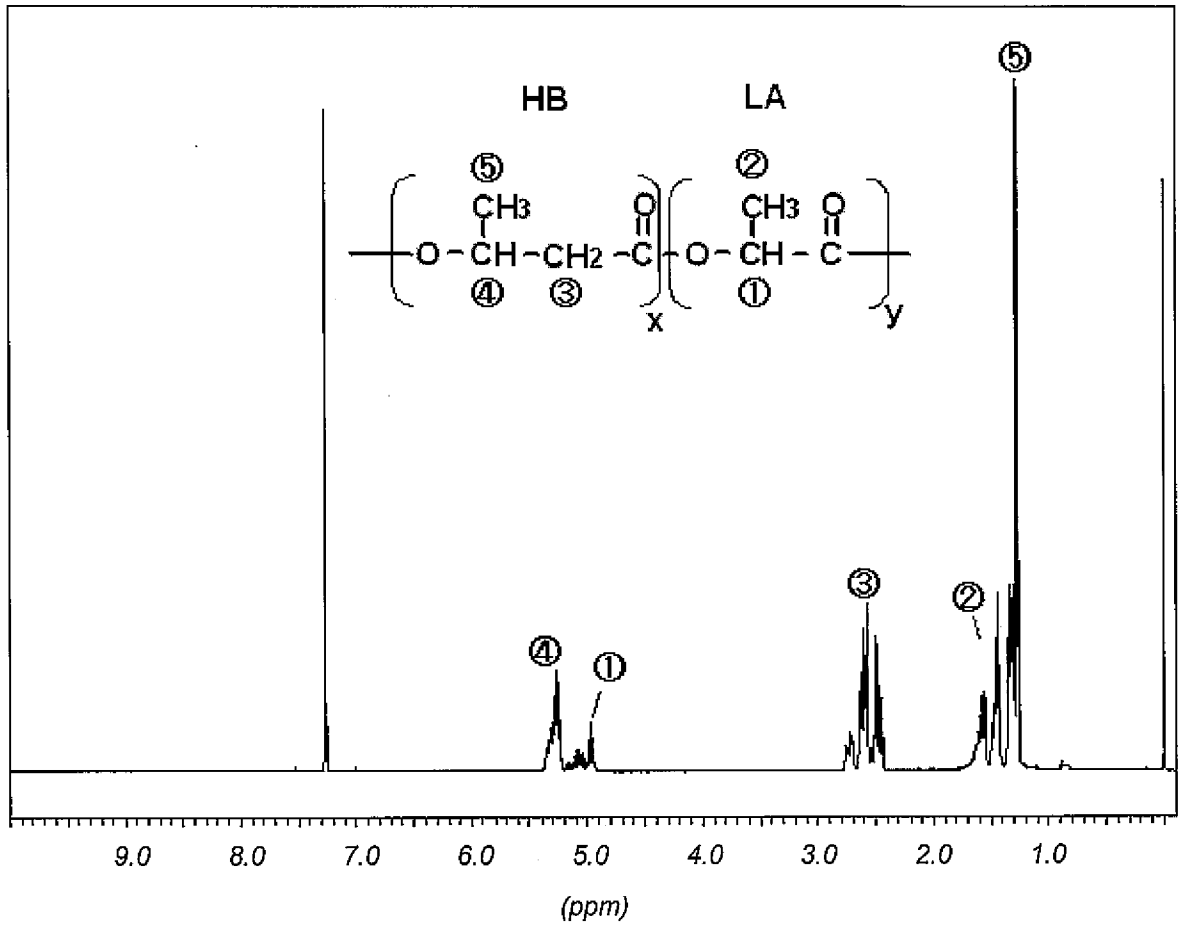
[図13b]


(x10,000,000)
TIC
HB
LA
3.00
2.75
2.50
2.25
2.00
1.75
1.25
1.50
1.00
0.75
0.50
0.25
4.0
5.0
6.0
7.0
8.0
9.0
10.0
11.0
12.0
13.0
14.0
15.0
16.0

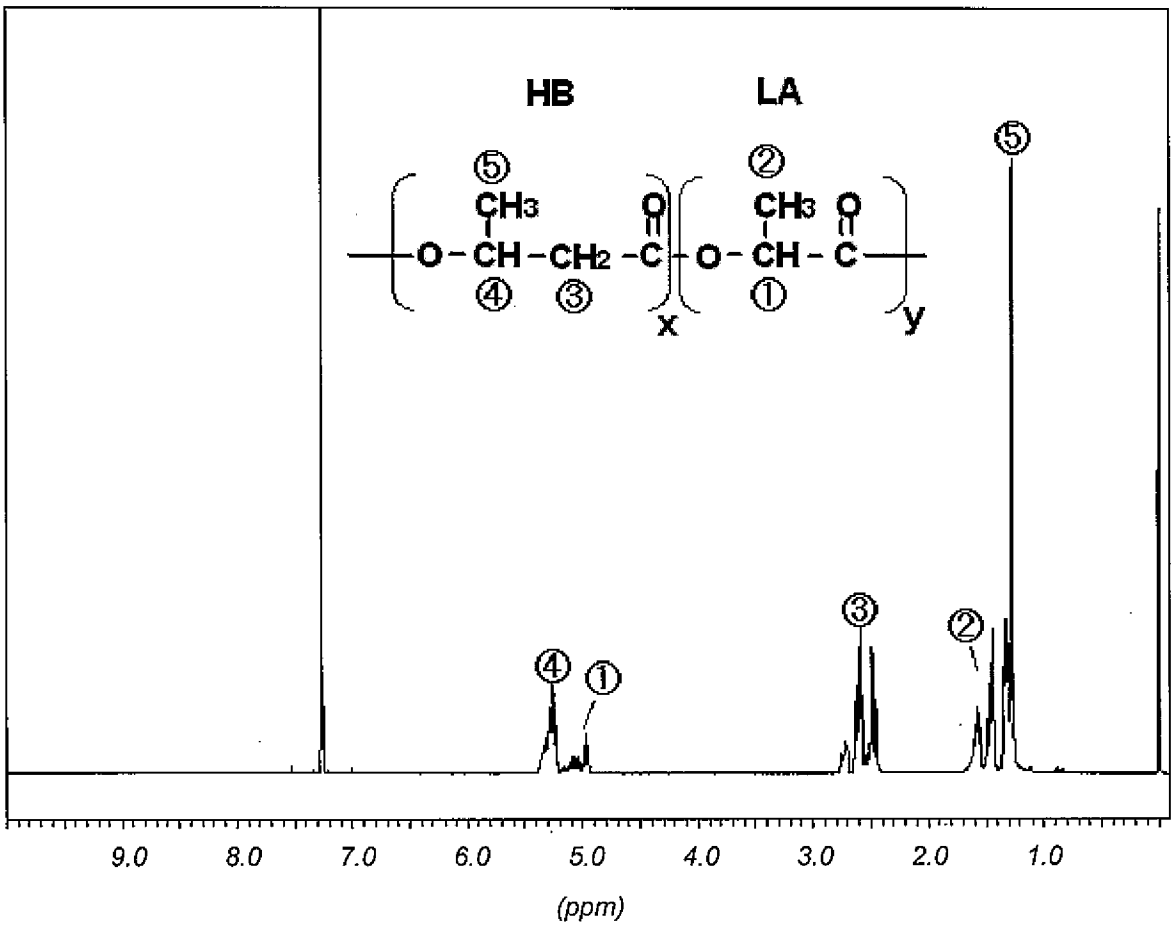
[図13c]


(x10,000,000)
TIC
HB
LA
2.00
1.75
1.50
1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
4.0
5.0
6.0
7.0
8.0
9.0
10.0
11.0
12.0
13.0
14.0
15.0
16.0

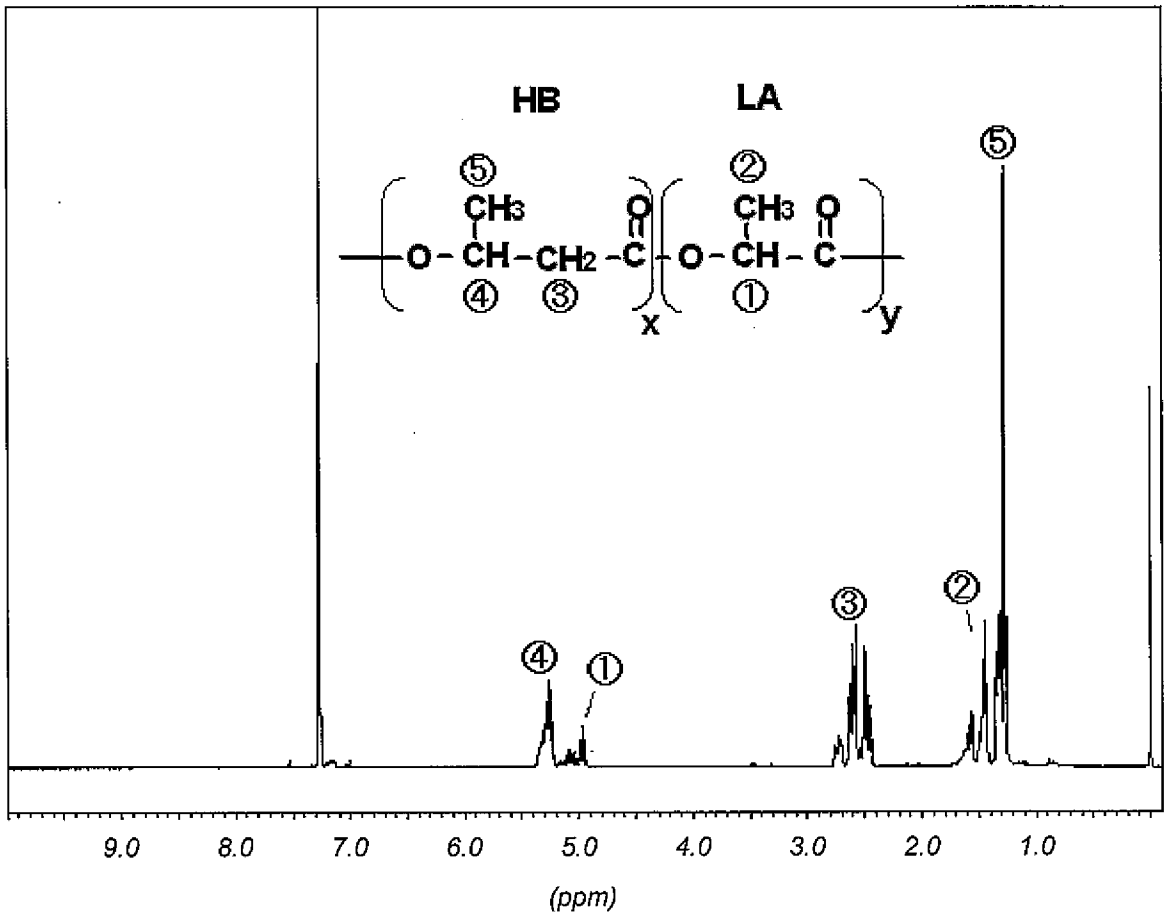
[図14a]


HB
LA
⑤
②
CH3
O
O-CH-CH2-C-O-CH-C
④
③
①
x
y
⑤
③
②
④
①
9.0
8.0
7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
(ppm)

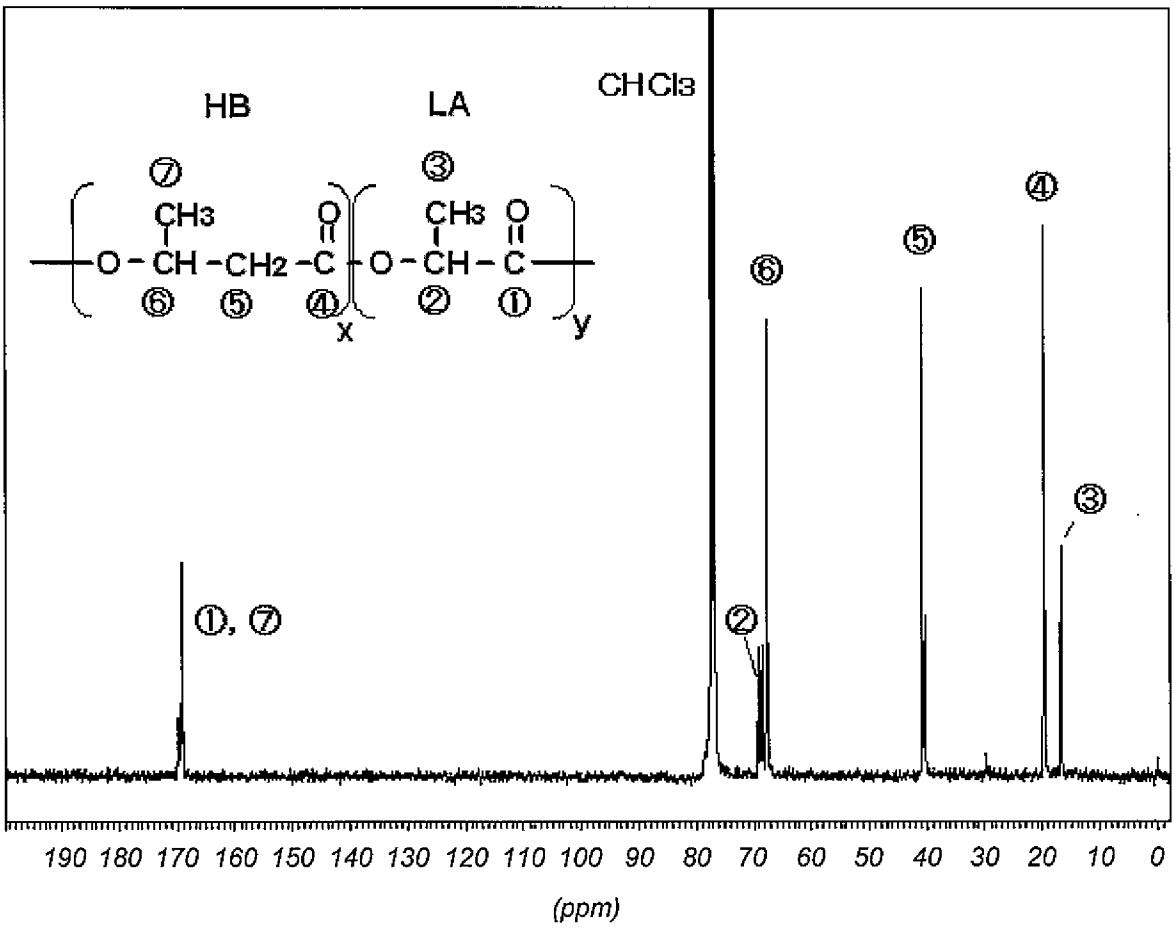
[図14b]


HB
LA
⑤
②
CH3
O
O-CH-CH2-C-O-CH-C
④
③
①
x
y
⑤
③
②
④
①
9.0
8.0
7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
(ppm)

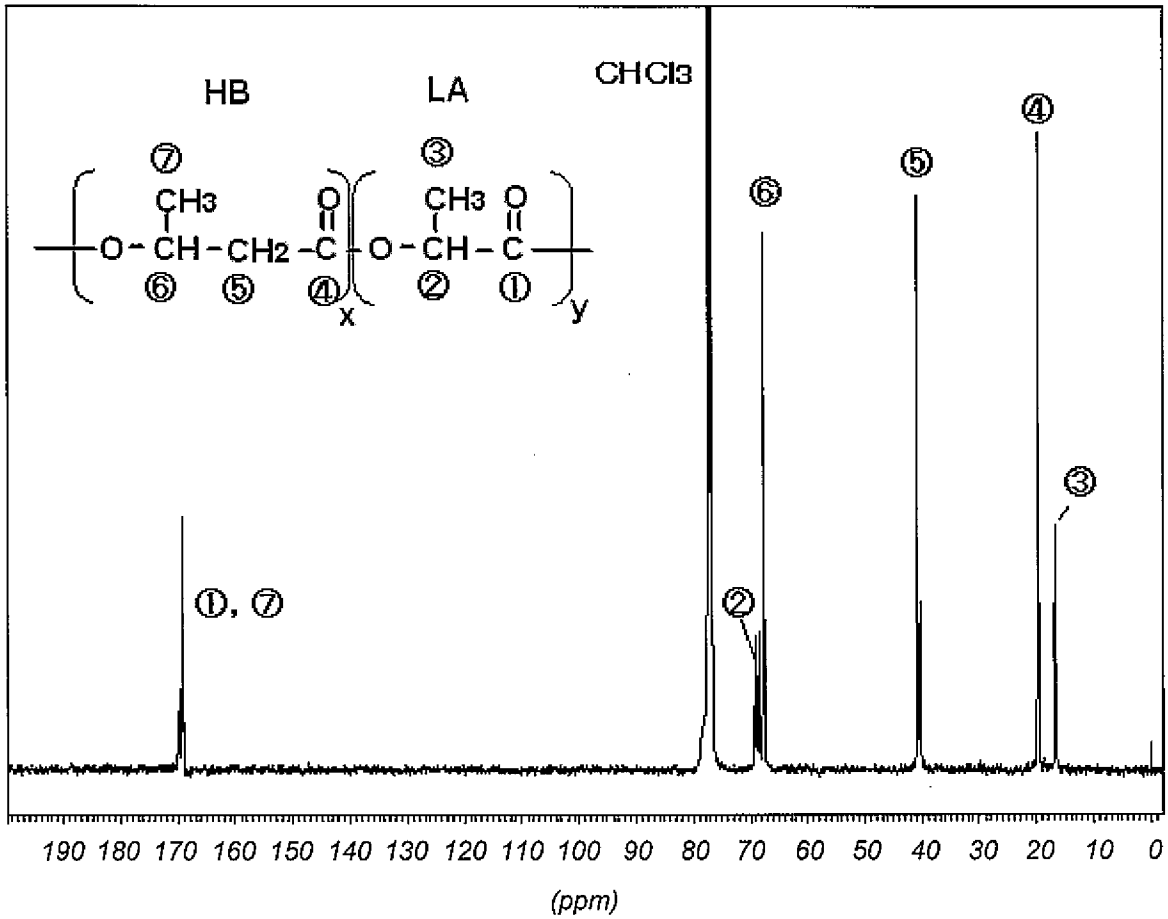
[図14c]


HB
LA
⑤
CH3
O
CH
CH2
C
O
②
CH3
O
CH
C
④
③
x
①
y
⑤
②
③
④
①
9.0
8.0
7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
(ppm)

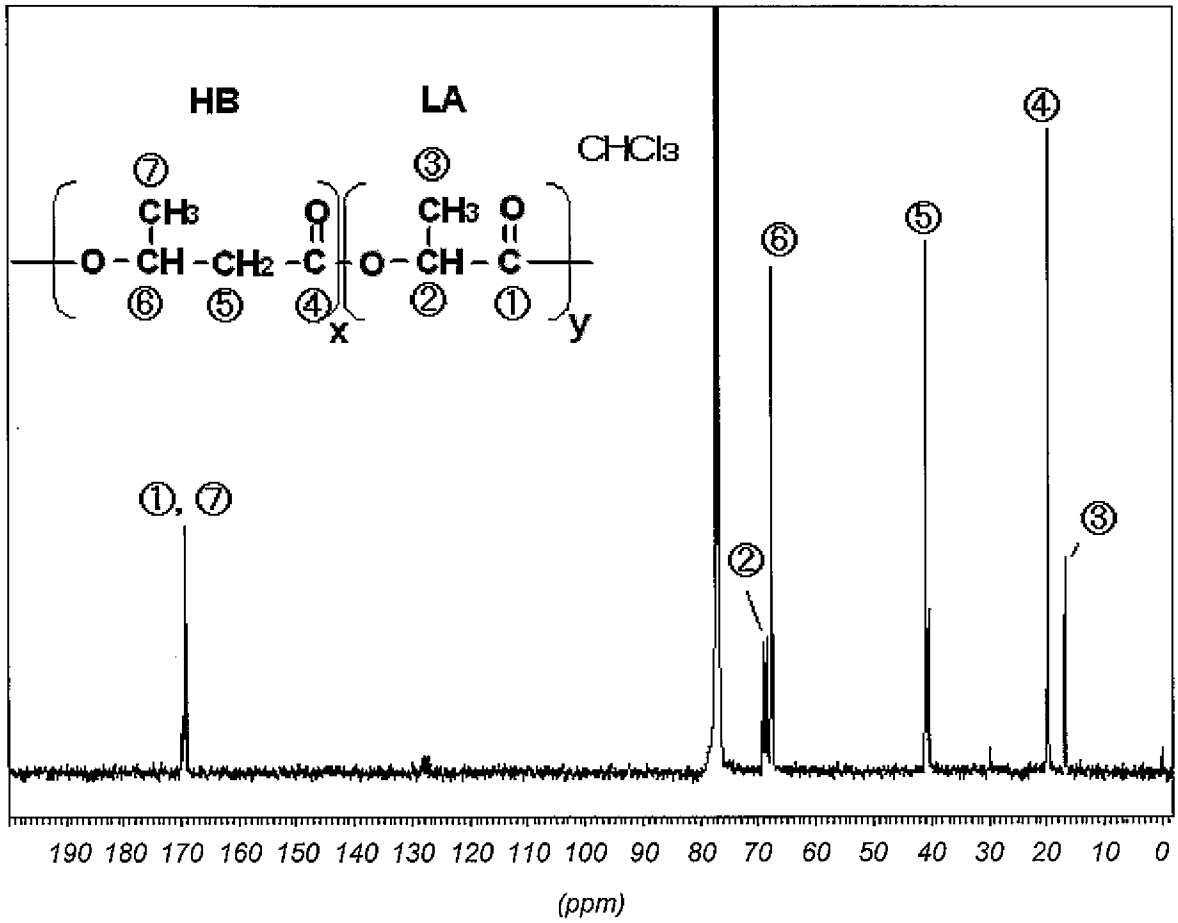
[図15a]


HB
LA
CHCl3
⑦
CH3
O
CH
CH2
C
O
③
CH3
O
CH
C
⑥
⑤
④
x
②
①
y
⑥
⑤
④
③
①, ⑦
②
190 180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0
(ppm)

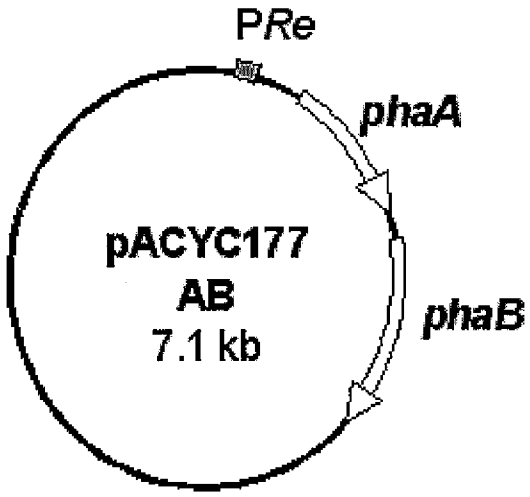
[図15b]


HB
LA
CHCl3
①, ⑦
②
③
④
⑤
⑥
190 180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0
(ppm)

[図15c]

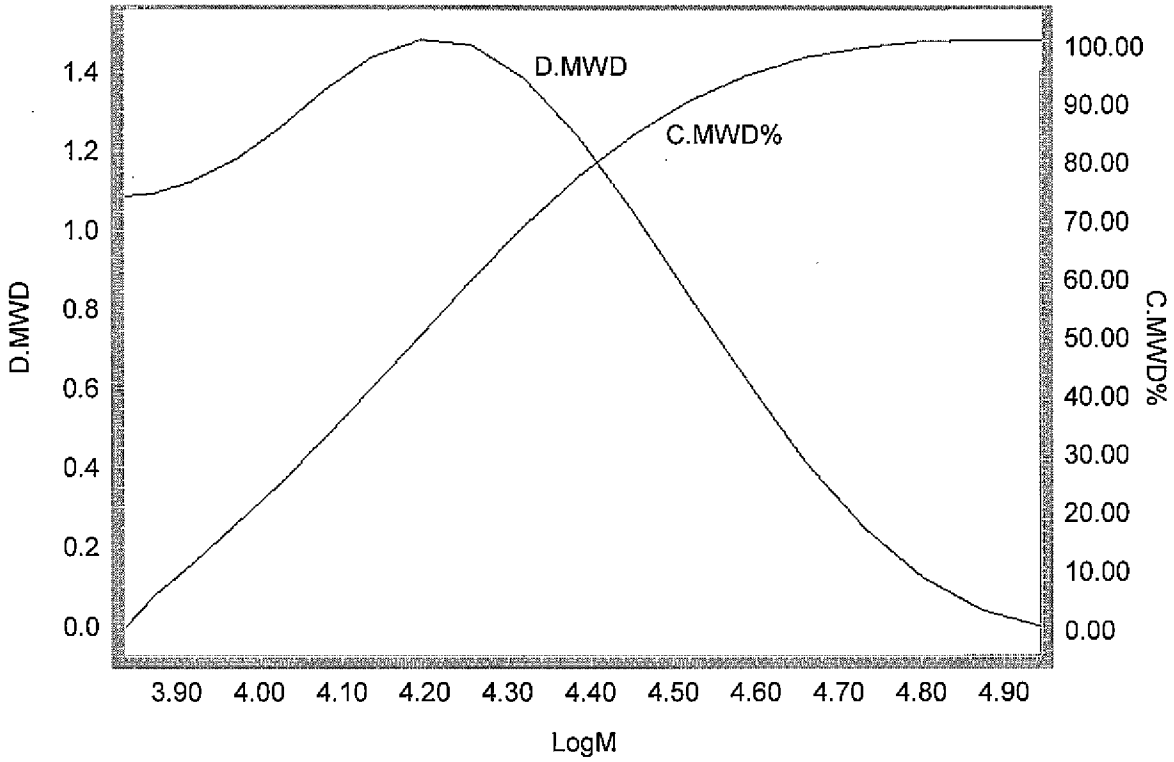

HB
LA
CHCl3
①, ⑦
②
③
④
⑤
⑥
190 180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0
(ppm)

[図16]

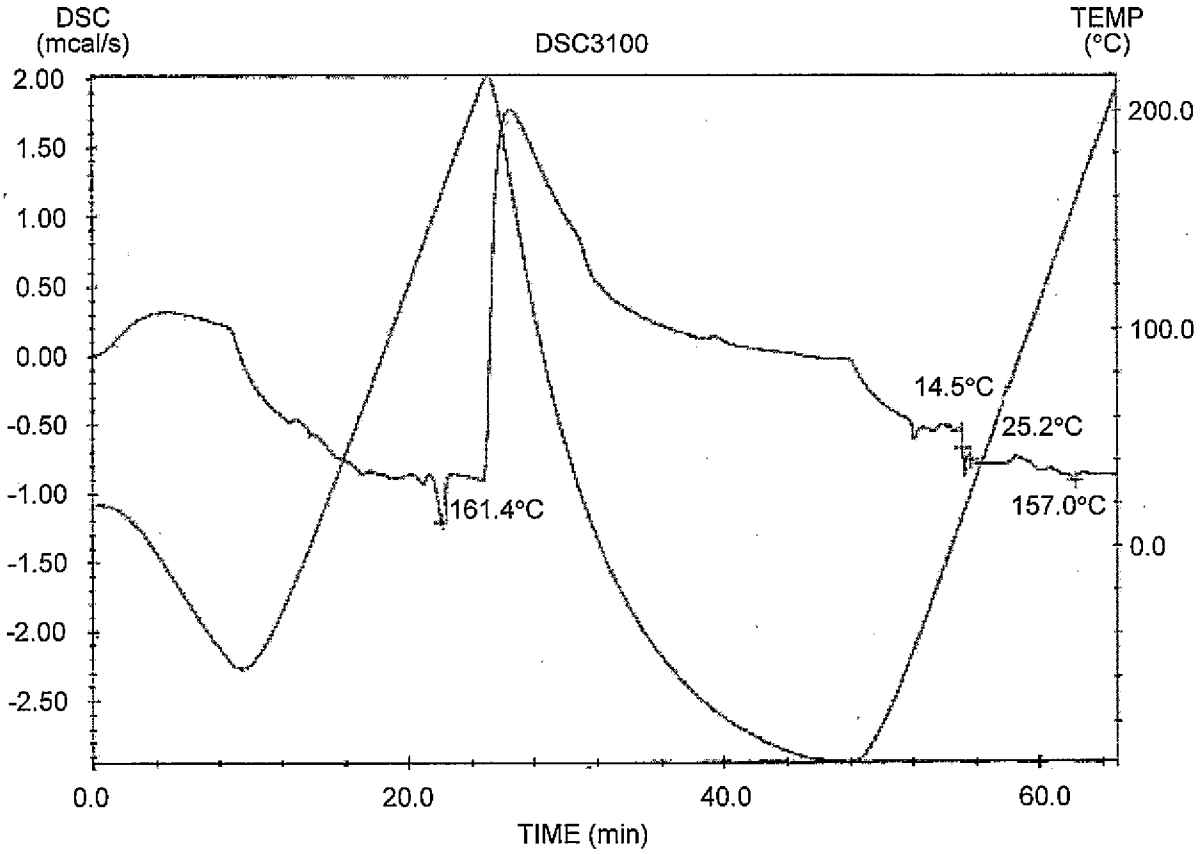


[図17]

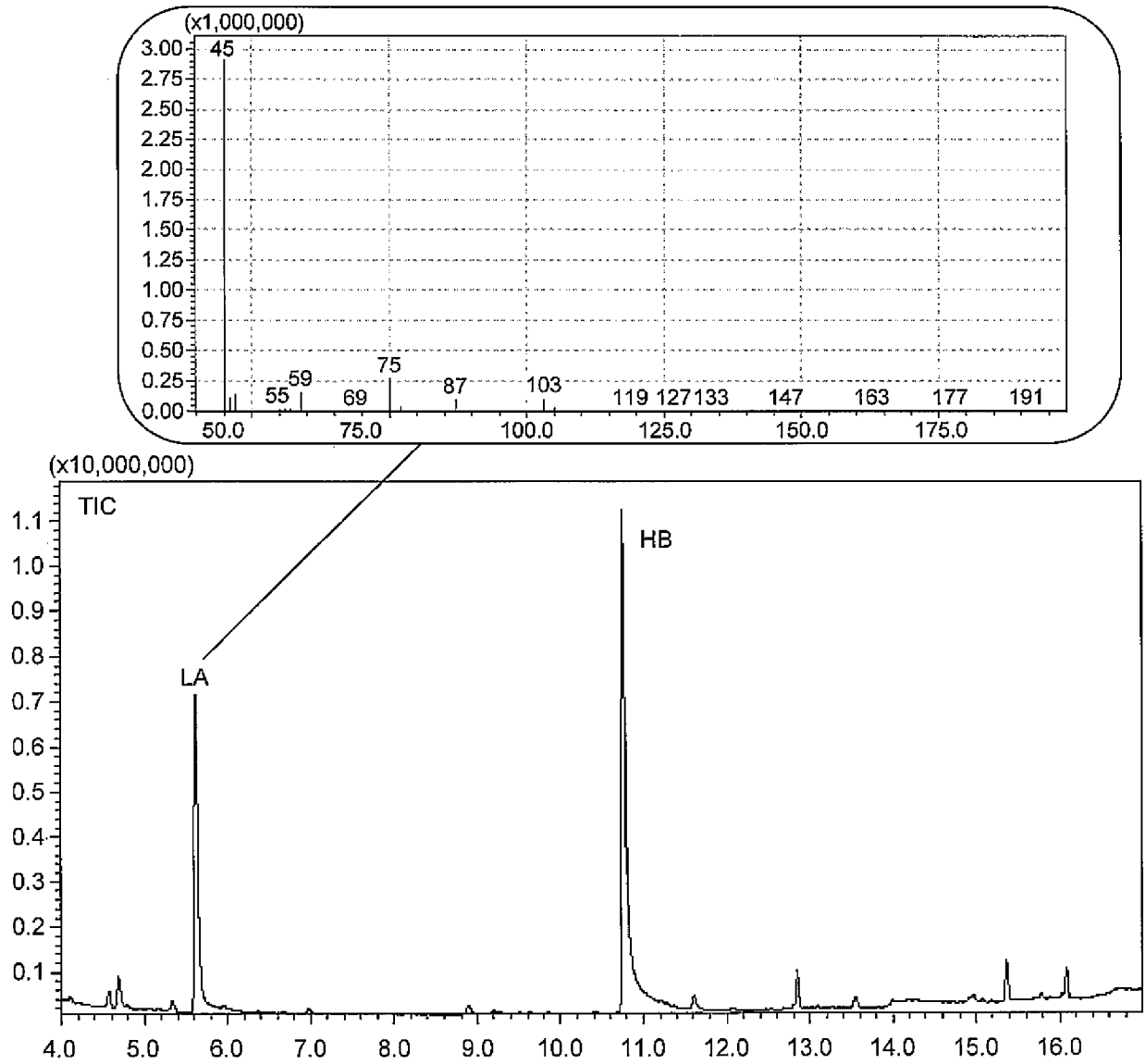
分子量分布曲線



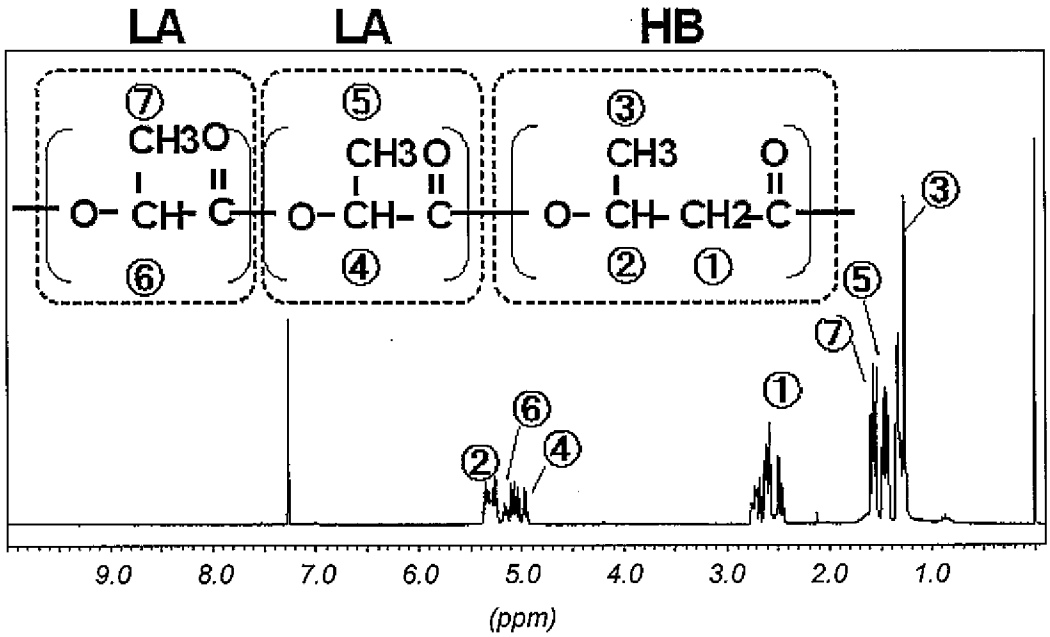
[図18]


DSC
(mcal/s)
DSC3100
TEMP
(°C)
2.00
1.50
1.00
0.50
0.00
-0.50
-1.00
-1.50
-2.00
-2.50
200.0
100.0
0.0
14.5°C
25.2°C
161.4°C
157.0°C
0.0
20.0
40.0
60.0
TIME (min)

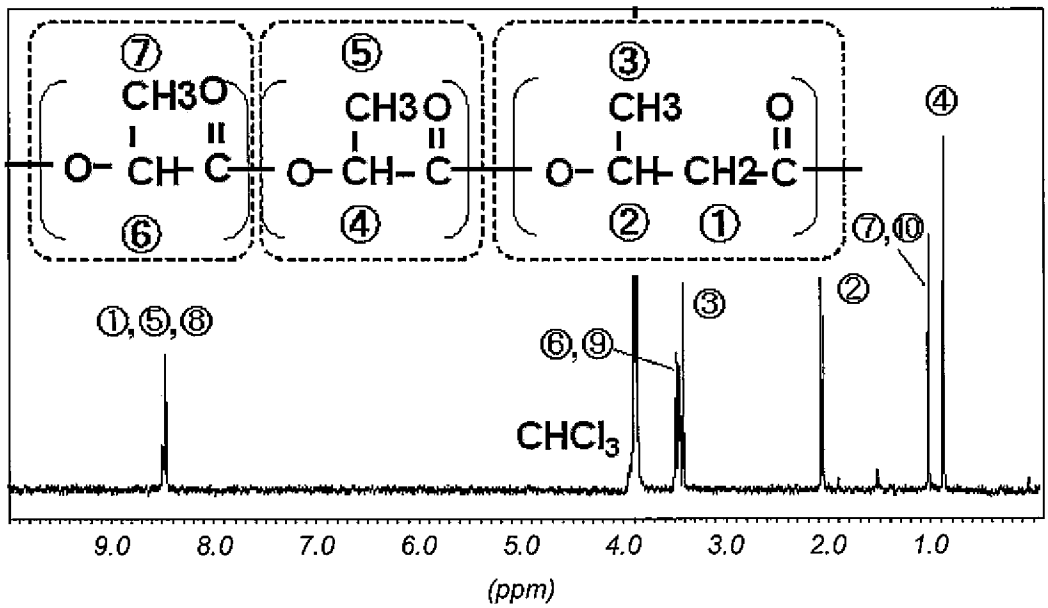
[図19]


(x1,000,000)
45
75
59
55
69
87
103
119 127133
147
163
177
191
(x10,000,000)
TIC
HB
LA

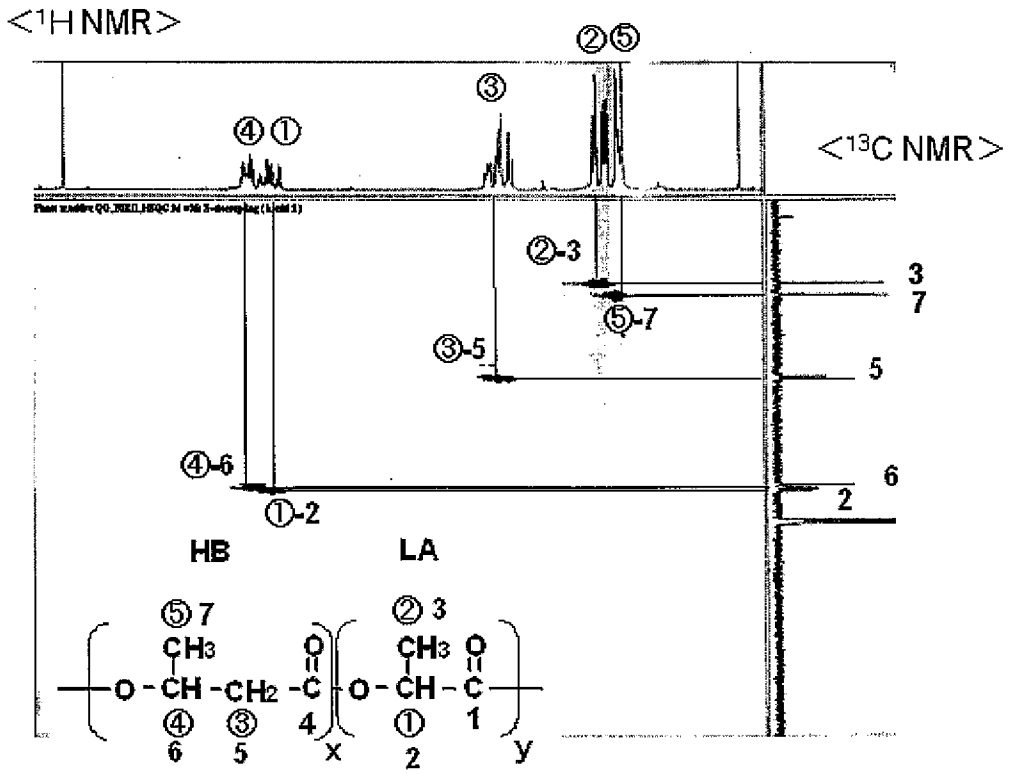
[図20]


LA
LA
HB
(ppm)

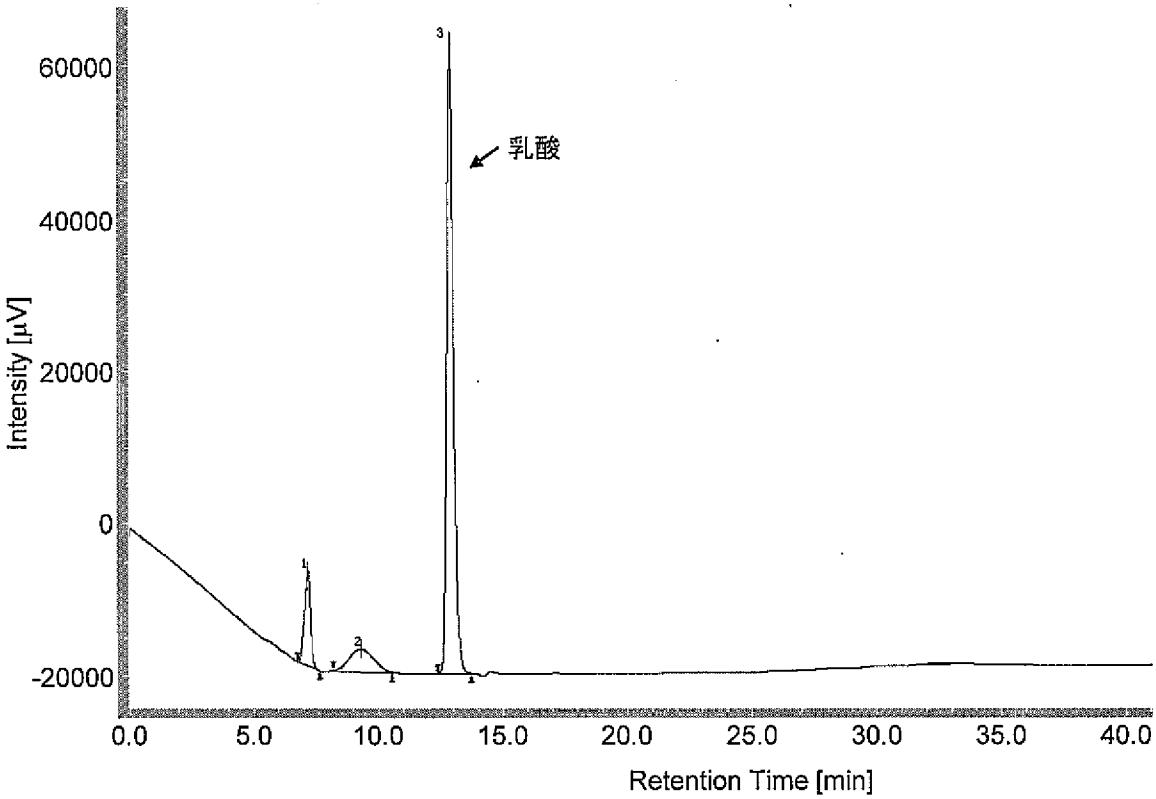
[図21]


⑦
CH3O
O
CH
C
⑥
⑤
CH3O
O
CH
C
④
③
CH3
O
O
CH
CH2
C
② ①
④
⑦,⑩
②
③
①,⑤,⑧
⑥,⑨
CHCl3
9.0 8.0 7.0 6.0 5.0 4.0 3.0 2.0 1.0
(ppm)

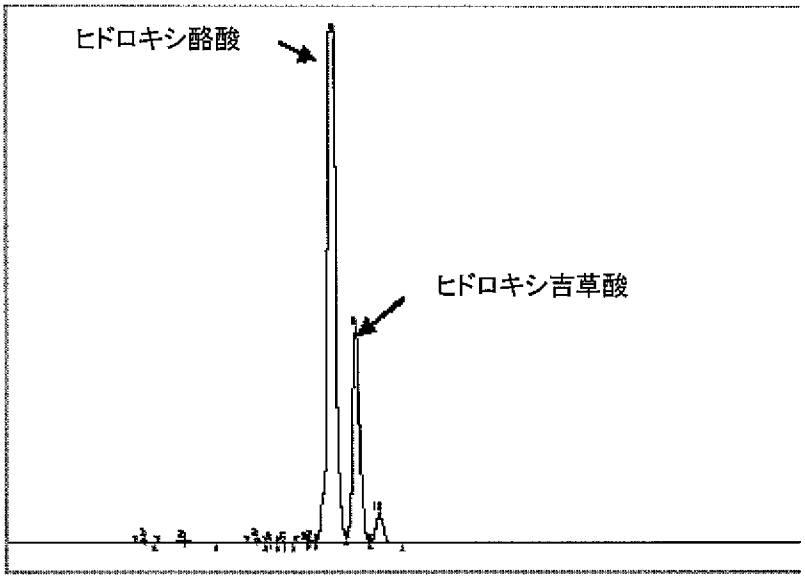
[図22]


<1H NMR>
<13C NMR>
②⑤
③
④①
②-3
⑤-7
③-5
④-6
①-2
3
7
5
6
2
HB
LA
⑤7
CH3
O
CH
CH2
C
④ ③
6 5
4
x
② 3
CH3
O
CH
C
① 1
2
y

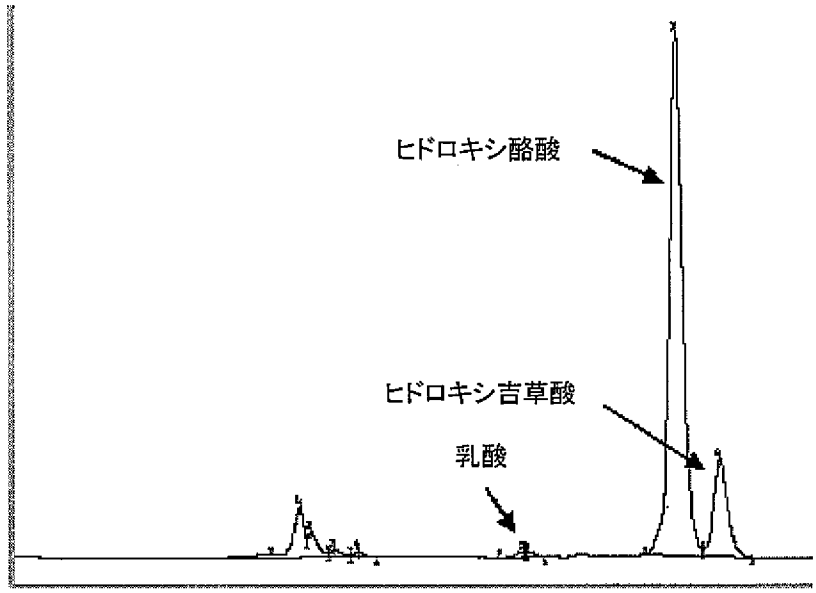
[図23]


60000
40000
20000
0
-20000
Intensity [μV]
0.0
5.0
10.0
15.0
20.0
25.0
30.0
35.0
40.0
Retention Time [min]
乳酸

[図24]


ヒドロキシ酪酸
ヒドロキシ吉草酸

[図25]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2009/058092

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N15/09(2006.01)i, *C12N1/21*(2006.01)i, *C12P7/62*(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N15/09, C12N1/21, C12P7/62

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 1996-2009
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2009 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2009

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), Science Direct,
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), Wiley InterScience,

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2006/126796 A1 (LG Chem, Ltd.), 30 November, 2006 (30.11.06), & JP 2008-541719 A & EP 1885857 A1	1-33
Y	WO 2003/100055 A1 (Riken, Japan), 04 December, 2003 (04.12.03), & US 2007/0054386 A1	1-33
Y	JP 2004-514431 A (Cargil Inc.), 20 May, 2004 (20.05.04), & US 2004/0076982 A1 & EP 1343874 A1	1-33

☐ 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
"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
09 June, 2009 (09.06.09)	16 June, 2009 (16.06.09)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2009/058092

Continuation of B. FIELDS SEARCHED
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

ACS PUBLICATIONS, GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２００９／０５８０９２

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N15/09(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12P7/62(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, C12N1/21, C12P7/62

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	１９７１－２００９年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２００９年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２００９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）

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), Science Direct,
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), Wiley InterScience, ACS PUBLICATIONS
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
Y	WO 2006/126796 A1 (エルジー・ケム・リミテッド) 2006.11.30, & JP 2008-541719 A & EP 1885857 A1	1-33
Y	WO 2003/100055 A1 (独立行政法人理化学研究所) 2003.12.04, & US 2007/0054386 A1	1-33
Y	JP 2004-514431 A (カーギル　インコーポレイテッド) 2004.05.20, & US 2004/0076982 A1 & EP 1343874 A1	1-33

☐　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
「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
「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
０９．０６．２００９	１６．０６．２００９

国際調査機関の名称及びあて先	特許庁審査官（権限のある職員）	４Ｂ	３５３９
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 郵便番号１００－８９１５ 東京都千代田区霞が関三丁目４番３号	福間　信子 電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８		