

(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
2023年9月28日(28.09.2023)



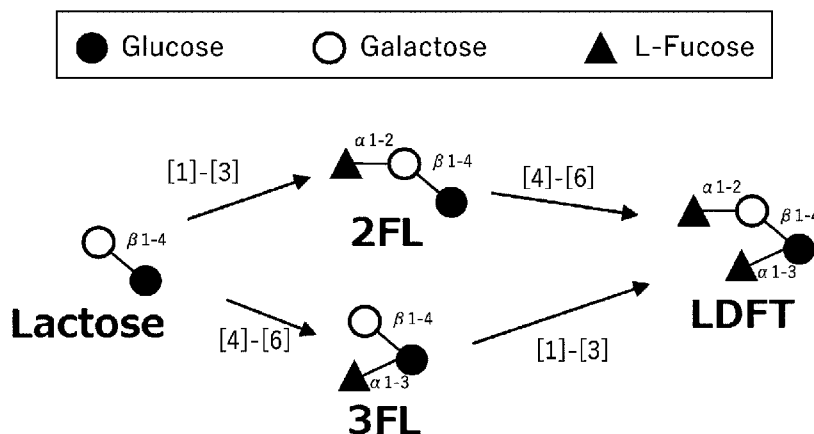
(10) 国際公開番号

WO 2023/182527 A1

- (51) 国際特許分類:
C12P 19/00 (2006.01) C12N 1/21 (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01) C12N 15/31 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01) C12N 15/54 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2023/012041
- (22) 国際出願日: 2023年3月24日(24.03.2023)
- (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 2022-050799 2022年3月25日(25.03.2022) JP
- (71) 出願人: キリンホールディングス株式会社 (KIRIN HOLDINGS KABUSHIKI KAISHA)
[JP/JP]; 〒1640001 東京都中野区中野四丁
目 1 0 番 2 号 中野セントラルパーク
サウス Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 杉 田 智 惇 (SUGITA Tomotoshi);
〒1640001 東京都中野区中野四丁目 1 0 番
2 号 中野セントラルパークサウス キリ
ンホールディングス株式会社内 Tokyo (JP).
三平 崇太郎 (SANPEI Sotaro); 〒1640001 東京
都中野区中野四丁目 1 0 番 2 号 中野セ
ントラルパークサウス キリンホールディ
ングス株式会社内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 弁 理 士 法 人 栄 光 事 務 所 (Eikoh,
P.C.); 〒1050003 東京都港区西新橋一丁
目 7 番 1 3 号 虎ノ門イーストビルデ
ィング 1 0 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,

(54) Title: PRODUCTION METHOD FOR LACTODIFUCOTETRAOSE (LDFT)

(54) 発明の名称: ラクトジフコテトラオース (L D F T) の製造法



(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide a microorganism excelling in LDFT productivity. The present invention relates to a microorganism in which the activity of one among [1] a protein composed of an amino acid sequence represented by sequence number 8, and a mutant protein or homologous protein thereof and [4] a protein composed of an amino acid sequence represented by sequence number 2, and a mutant protein or homologous protein thereof is heightened, and which has improved lactodifucotetraose (LDFT) productivity compared to a parent strain.

(57) 要約: L D F T の生産性に優れる微生物の提供を目的とする。本発明は、[1] 配列番号 8 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質及びその変異蛋白質又は相同蛋白質並びに [4] 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質及びその変異蛋白質又は相同蛋白質のいずれか 1 の活性が増強され、かつ、親株に比べてラクトジフコテトラオース (L D F T) の生産性が向上した微生物に関する。

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))

明 細 書

発明の名称：ラクトジフコテトラオース（L D F T）の製造法 技術分野

[0001] 本発明は、ラクトジフコテトラオース（L D F T）の製造法に関する。

背景技術

[0002] ヒト母乳中に含まれるオリゴ糖（HMO）はプレバイオティクス効果、乳幼児の腸内環境や免疫機能の調節、感染防御、また認知機能の発達などにおいて有用であると考えられている（非特許文献1）。

[0003] ラクトジフコテトラオース（以下、L D F Tという。）はHMOの1種であり、ラクトースのガラクトース2位とグルコース3位に、フコースがそれぞれ α 1, 2結合又は α 1, 3結合した、4糖のフコシル化オリゴ糖である。同じくフコシル化オリゴ糖として知られる2'-フコシルラクトース（以下、2' F Lという。）と3-フコシルラクトース（以下、3 F Lという。）の構造を併せ持ったHMOである。

[0004] ヒトの母乳において、L D F Tは初乳から成乳への移行乳中に0.5 g/L程度含まれていることが報告されている（非特許文献2）。L D F Tの機能性としては、Group B Streptococcusへの強い抗菌作用などが知られている（非特許文献3）が、機能性研究は未だ発展途上である。

[0005] L D F Tの製造法としては、フコシルトランスフェラーゼを発現する微生物を用いた、ラクトースを基質とする微生物発酵法が広く知られている。該微生物発酵法においては、フコシルトランスフェラーゼとして α 1, 2-フコシルトランスフェラーゼ単独、または、 α 1, 2-フコシルトランスフェラーゼ及び α 1, 3-フコシルトランスフェラーゼを組み合わせることで、効率的にL D F Tを生産できることが報告されている（特許文献1、2、非特許文献4）。

[0006] 前記微生物発酵法において単独で使用する α 1, 2-フコシルトランスフ

エラーゼとしては、例えば*Helicobacter pylori*（ヘリコバクター・ピロリ）に由来するFutC（特許文献1）が挙げられる。

[0007] 前記微生物発酵法において α 1, 2-フコシルトランスフェラーゼ及び α 1, 3-フコシルトランスフェラーゼを組み合わせる使用の際の α 1, 2-フコシルトランスフェラーゼとしては、例えば*Escherichia coli* O126（エシェリヒア・コリ O126）に由来するWbgL（特許文献2、非特許文献4）が挙げられる。

[0008] 前記微生物発酵法において α 1, 2-フコシルトランスフェラーゼ及び α 1, 3-フコシルトランスフェラーゼを組み合わせる使用の際の α 1, 3-フコシルトランスフェラーゼとしては、例えば*Bacteroides fragilis*（バクテロイデス・フラジリス）に由来するCafA、*Bacteroides nordii*（バクテロイデス・ノルジ）に由来するCafC、*Akkermansia muciniphila*（アッカーマンシア・ムシニフィラ）に由来するCafF（いずれも特許文献2）又は*Helicobacter pylori* UA948（ヘリコバクター・ピロリ UA948）に由来するHp3/4FT（非特許文献4）などが挙げられる。

[0009] 非特許文献4には、LDFTの中間体である3FLを基質として利用できない、ラクトースに基質特異的な α 1, 2-フコシルトランスフェラーゼWbgL、および、2'FLを基質とする α 1, 3-フコシルトランスフェラーゼHp3/4FTを用いて、ラクトースから2'FLを経由し単一フローでLDFTを生産するプロセスが開示されている。

先行技術文献

特許文献

[0010] 特許文献1：国際公開第2015/032413号

特許文献2：日本国特表2017-527311号公報

非特許文献

[0011] 非特許文献1：Trends in Food Science & Techn

ology, 118 (2021) 374–387

非特許文献2: Nutrients, 2021, 13 (8) 2737

非特許文献3: Accounts of Chemical Research, 2019, 52 (3) 760–768

非特許文献4: Metabolic Engineering, 66 (2021) 12–20

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0012] しかし上記した非特許文献4に記載の方法では、Hp3/4FTがラクトースにも反応し副生成物として3FLが多く蓄積されること、またHp3/4FTによるLDFTへの変換活性が不十分なために2'FLが副生成物として残存することが課題となる。

[0013] LDFTをより効率的に製造するためには、中間体である2'FL又は3FLをラクトースと同様に基質として認識でき、かつ、2'FL又は3FLを高効率で速やかにLDFTへ変換できる、 α 1, 2-フコシルトランスフェラーゼ及び α 1, 3-フコシルトランスフェラーゼの探索が求められる。

[0014] したがって、本発明は、LDFTの生産性に優れる微生物の提供を目的とする。

課題を解決するための手段

[0015] 本発明者らは、特定のアミノ酸配列からなる蛋白質の活性を増強した微生物は、親株に比べて、LDFTの生産性が向上することを見出し、本発明を完成させた。

[0016] すなわち、本発明は以下の通りである。

1. 下記[1]～[3]のいずれか1に記載の蛋白質及び下記[4]～[6]のいずれか1に記載の蛋白質の活性が増強され、かつ、親株に比べてラクトジフコテトラオース(LDFT)の生産性が向上した微生物。

[1] 配列番号8で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質。

[2] 配列番号8で表されるアミノ酸配列において、1～20個のアミノ酸

が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ $\alpha 1$, 2-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する変異蛋白質。

[3] 配列番号8で表されるアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ $\alpha 1$, 2-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する相同蛋白質。

[4] 配列番号2で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質。

[5] 配列番号2で表されるアミノ酸配列において、1~20個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ $\alpha 1$, 3-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する変異蛋白質。

[6] 配列番号2で表されるアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ $\alpha 1$, 3-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する相同蛋白質。

2. 前記1に記載の微生物を調製すること、及び当該微生物を用いて培養物中にLDF Tを生成することを含む、LDF Tの製造方法。

3. 下記(i)~(iii)の工程を含む、前記1に記載の微生物を培養し得た培養物からのLDF Tの結晶の製造方法。

(i) 前記培養物を遠心分離して菌体が除去された上清を得る工程

(ii) 工程(i)で得られた上清を陽イオン交換および陰イオン交換して、上清からイオンが除去された溶液を得る工程

(iii) 工程(ii)で得られた溶液からLDF Tの結晶を得る工程

発明の効果

[0017] 本発明に係る微生物は、特定のアミノ酸配列からなる2つの蛋白質の活性が増強されている。当該2つの蛋白質の一方は、LDF Tの中間体である3FLをラクトースと同様に基質として認識でき、3FLを高効率で速やかにLDF Tへ変換できる $\alpha 1$, 2-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する。また、当該2つの蛋白質のもう一方は、LDF Tの中間体である2'FLをラクトースと同様に基質として認識でき、2'FLを高効率で速やかにLDF Tへ変換できる $\alpha 1$, 3-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する。

これら2つの蛋白質の活性が増強されていることにより、本発明に係る微生物は、中間体である2'FL及び3FLが副生成物として残存するのを抑制し、LDFTの生産性を向上し得る。

図面の簡単な説明

[0018] [図1]本発明の一実施形態におけるラクトースからLDFTまでの生合成経路を図1に示す。

[図2]図2は、実施例7で得られた、LDFT結晶の糖分析結果を表す。縦軸は強度を、横軸は分析時間を表す。

[図3]図3は、LDFT・7.2水和物結晶のOak Ridge Thermal Ellipsoid Plot (ORTEP) 図を示す。

発明を実施するための形態

[0019] <微生物>

本発明に係る微生物は、下記[1]～[3]のいずれか1に記載の蛋白質及び下記[4]～[6]のいずれか1に記載の蛋白質の活性が増強され、かつ、親株に比べてラクトジフコテトラオース(LDFT)の生産性が向上していることを特徴とする。

[1] 配列番号8で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質。

[2] 配列番号8で表されるアミノ酸配列において、1～20個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ $\alpha 1$, 2-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する変異蛋白質。

[3] 配列番号8で表されるアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ $\alpha 1$, 2-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する相同蛋白質。

[4] 配列番号2で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質。

[5] 配列番号2で表されるアミノ酸配列において、1～20個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ $\alpha 1$, 3-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する変異蛋白質。

[6] 配列番号2で表されるアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するア

ミノ酸配列からなり、かつ $\alpha 1, 3$ -フコシルトランスフェラーゼ活性を有する相同蛋白質。

[0020] 配列番号8で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質は、実施例において後述する*Helicobacter mustelae* ATCC43772株由来 $\alpha 1, 2$ -フコシルトランスフェラーゼHMFTである。

配列番号2で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質は、実施例において後述する*Bacteroides reticulotermitis*及び*Bacteroides fragilis*由来のcBrFucTである。

[0021] 本発明の一実施形態におけるラクトースからLDFTまでの生合成経路を図1に示す。

上記した[1]～[3]の蛋白質は、ラクトースと同様に中間体である3FLを基質として認識でき、(ラクトース $\rightarrow$ 2'FL)の生合成反応、及び(3FL $\rightarrow$ LDFT)の生合成反応を触媒し得る $\alpha 1, 2$ -フコシルトランスフェラーゼ活性を有する。

上記した[4]～[6]の蛋白質は、ラクトースと同様に中間体である2FLを基質として認識でき、(ラクトース $\rightarrow$ 3FL)の生合成反応、及び(2'FL $\rightarrow$ LDFT)の生合成反応を触媒し得る $\alpha 1, 3$ -フコシルトランスフェラーゼ活性を有する。

したがって、本発明に係る微生物は、下記[1]～[3]のいずれか1に記載の蛋白質及び下記[4]～[6]のいずれか1に記載の蛋白質の活性が増強されていることにより、中間体である2'FL及び3FLが副生成物として残存するのを抑制し、2'FL又は3FLを高効率で速やかにLDFTへ変換できる。

[0022] 本明細書において、 $\alpha 1, 2$ -フコシルトランスフェラーゼ活性とは、ドナー基質であるGDP-フコースから、アクセプター分子のN-アセチルグルコサミン水酸基に $\alpha 1, 2$ -結合でフコース残基を転移し、フコース含有糖質を生成する活性をいう。

[0023] 本実施形態において、 $\alpha 1, 2$ -フコシルトランスフェラーゼのアクセプ

ター分子としては、ラクトース、3FLが好ましい。アクセプター分子がラクトースである場合のフコース含有糖質としては、2FLが好ましい。また、アクセプター分子が3FLである場合のフコース含有糖質としては、LDF Tが好ましい。

[0024] 上記した変異蛋白質又は相同蛋白質が、 $\alpha 1, 2$ -フコシルトランスフェラーゼ活性を有することは、例えば以下の方法により確認できる。

まず、後述の方法により、上記活性を確認しようとする変異蛋白質又は相同蛋白質をコードするDNAを有する組換え体DNAを作製する。次に、該組換え体DNAで、親株を形質転換することにより該親株より該蛋白質の活性が高い形質転換体を作製し、該親株又は該形質転換体の培養液中に生成、蓄積したフコース含有糖質の量を比較することによって確認できる。フコース含有糖質としては、具体的には、2FL及びLDF Tが挙げられる。

[0025] 本明細書において、 $\alpha 1, 3$ -フコシルトランスフェラーゼ活性とは、ドナー基質からであるGDP-フコースから、アクセプター分子のN-アセチルグルコサミン水酸基に $\alpha 1, 3$ -結合でフコース残基を転移し、フコース含有糖質を生成する活性をいう。

[0026] 本実施形態において、 $\alpha 1, 3$ -フコシルトランスフェラーゼのアクセプター分子としては、ラクトース、2'FLが好ましい。アクセプター分子がラクトースである場合のフコース含有糖質としては、3FLが好ましい。また、アクセプター分子が2'FLである場合のフコース含有糖質としては、LDF Tが好ましい。

[0027] 上記した変異蛋白質又は相同蛋白質が、 $\alpha 1, 3$ -フコシルトランスフェラーゼ活性を有することは、例えば以下の方法により確認できる。

まず、後述の方法により、上記活性を確認しようとする変異蛋白質又は相同蛋白質をコードするDNAを有する組換え体DNAを作製する。次に、該組換え体DNAで、親株を形質転換することにより該親株より該蛋白質の活性が高い形質転換体を作製し、該親株又は該形質転換体の培養液中に生成、蓄積したフコース含有糖質の量を比較することによって確認できる。フコー

ス含有糖質としては、具体的には、3FL及びLDFTが挙げられる。

[0028] 本明細書において、変異蛋白質とは、元となる蛋白質中のアミノ酸残基を人為的に欠失若しくは置換、または該蛋白質中にアミノ酸残基を挿入若しくは付加して得られる蛋白質をいう。

[0029] 上記[2]及び[5]の変異蛋白質において、アミノ酸が欠失、置換、挿入または付加されたとは、同一配列中の任意の位置において、好ましくは1～20個のアミノ酸が欠失、置換、挿入または付加されていてもよい。欠失、置換、挿入または付加されるアミノ酸の数は好ましくは1～20個、より好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～8個、最も好ましくは1～5個である。

[0030] 欠失、置換、挿入または付加されるアミノ酸は天然型と非天然型とを問わない。天然型アミノ酸としては、L-アラニン、L-アスパラギン、L-アスパラギン酸、L-グルタミン、L-グルタミン酸、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン、L-アルギニン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン、L-システインなどが挙げられる。

[0031] 以下に、相互に置換可能なアミノ酸の例を示す。同一群に含まれるアミノ酸は相互に置換可能である。

A群：ロイシン、イソロイシン、ノルロイシン、バリン、ノルバリン、アラニン、2-アミノブタン酸、メチオニン、O-メチルセリン、t-ブチルグリシン、t-ブチルアラニン、シクロヘキシルアラニン

B群：アスパラギン酸、グルタミン酸、イソアスパラギン酸、イソグルタミン酸、2-アミノアジピン酸、2-アミノスベリン酸

C群：アスパラギン、グルタミン

D群：リジン、アルギニン、オルニチン、2,4-ジアミノブタン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸

E群：プロリン、3-ヒドロキシプロリン、4-ヒドロキシプロリン

F群：セリン、スレオニン、ホモセリン

G群：フェニルアラニン、チロシン

[0032] 上記〔2〕及び〔5〕の変異蛋白質において、置換されるアミノ酸残基として、例えば、17番目のアスパラギン残基が挙げられる。

[0033] 本明細書において、相同蛋白質とは、元となる蛋白質と構造および機能が類似することにより、その蛋白質をコードする遺伝子が進化上の起源を元の蛋白質をコードする遺伝子と同一にすると考えられる蛋白質であって、自然界に存在する生物が有する蛋白質をいう。

[0034] 相同蛋白質としては、例えば、対象となる蛋白質が有するアミノ酸配列と好ましくは90%以上、より好ましくは93%以上、さらに好ましくは95%、特に好ましくは97%以上の同一性を有するアミノ酸配列が挙げられる。

[0035] アミノ酸配列および塩基配列の同一性は、Karlin and AltschulによるアルゴリズムBLAST [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 5873 (1993)] やFASTA [Methods Enzymol., 183, 63 (1990)] を用いて決定できる。このアルゴリズムBLASTに基づいて、BLASTNやBLASTXとよばれるプログラムが開発されている [J. Mol. Biol., 215, 403 (1990)]。BLASTに基づいてBLASTNによって塩基配列を解析する場合には、パラメータは例えばScore=100、wordlength=12とする。また、BLASTに基づいてBLASTXによってアミノ酸配列を解析する場合には、パラメータは例えばscore=50、wordlength=3とする。BLASTとGapped BLASTプログラムを用いる場合には、各プログラムのデフォルトパラメーターを用いる。これらの解析方法の具体的な手法は公知である。

[0036] 本明細書において、「親株」とは、遺伝子改変及び形質転換等の対象となる元株をいう。

[0037] 本明細書において、親株としては、好ましくは原核生物または酵母菌株を、より好ましくは、エシェリヒア属、セラチア属、バチルス属、ブレヴィバクテリウム属、コリネバクテリウム属、ミクロバクテリウム属、若しくはシュードモナス属等に属する原核生物、またはサッカロマイセス属、シゾサッカロマイセス属、クルイベロミセス属、トリコスポロン属、シワニオミセス属、ピチア属、若しくはキャンディダ属等に属する酵母菌株を、最も好ましくは、*Escherichia coli* MG1655、*Escherichia coli* XL1-Blue、*Escherichia coli* XL2-Blue、*Escherichia coli* DH1、*Escherichia coli* MC1000、*Escherichia coli* KY3276、*Escherichia coli* W1485、*Escherichia coli* JM109、*Escherichia coli* HB101、*Escherichia coli* No. 49、*Escherichia coli* W3110、*Escherichia coli* NY49、*Escherichia coli* BL21 codon plus (ストラタジーン社製)、*Escherichia coli* W3110S3GK (NBRC114657)、*Serratia ficaria*、*Serratia fonticola*、*Serratia liquefaciens*、*Serratia marcescens*、*Bacillus subtilis*、*Bacillus amyloliquefaciens*、*Brevibacterium immariophilum* ATCC14068、*Brevibacterium saccharolyticum* ATCC14066、*Corynebacterium ammoniagenes*、*Corynebacterium glutamicum* ATCC13032、*Corynebacterium glutamicum* ATCC14067、*Corynebacterium glutamicum* ATCC13869、*Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC13

870、*Microbacterium ammoniaphilum* ATCC 15354、若しくは *Pseudomonas* sp. D-0110等の原核生物、または *Saccharomyces cerevisiae*、*Schizosaccharomyces pombe*、*Kluyveromyces lactis*、*Trichosporon pullulans*、*Schwanniomyces alluvius*、*Pichia pastoris*、若しくは *Candida utilis*等の酵母菌株を挙げることができる。

[0038] 親株は、GDPーフコース及び／又はラクトースを生成する微生物であれば、野生株であってもよい。野生株がGDPーフコース及び／又はラクトースを生成する能力を有しない場合は、GDPーフコース及び／又はラクトースを供給する能力を人工的に付与した育種株であってもよい。

[0039] 親株として用いる微生物としては、例えば、以下の1)及び2)が挙げられる。

1) $\alpha 1$, 2-フコシルトランスフェラーゼ/ $\alpha 1$, 3-フコシルトランスフェラーゼのドナー基質であるGDPーフコースを供給する能力が人工的に付与又は増強された微生物

2) $\alpha 1$, 2-フコシルトランスフェラーゼ/ $\alpha 1$, 3-フコシルトランスフェラーゼの受容体糖質であるラクトースを供給する能力が人工的に付与又は増強された微生物

以下、説明する。

[0040] 1) $\alpha 1$, 2-フコシルトランスフェラーゼ/ $\alpha 1$, 3-フコシルトランスフェラーゼのドナー基質であるGDPーフコースを供給する能力が人工的に付与又は増強された微生物 親株としては、好ましくは、 $\alpha 1$, 2-フコシルトランスフェラーゼ/ $\alpha 1$, 3-フコシルトランスフェラーゼの反応基質であるGDPーフコースを供給する能力を人工的に付与又は増強された微生物が挙げられる。親株として用いる微生物において、GDPーフコースを供給する能力を付与又は増強する方法の具体例としては、各種遺伝子操作によ

る方法 (Metabolic Engineering (2017) 41 : 23-38) 等、公知の方法が挙げられる。

[0041] GDP-フコースを供給する能力としては、糖からGDP-フコースを生産する能力が挙げられる。親株として用いる微生物に、糖からGDP-フコースを生産する能力を人工的に付与又は増強する方法としては、例えば、以下の(1a)～(1d)の方法が挙げられる。これらの方法は単独または組み合わせて用いてもよい。

(1a) 糖からGDP-フコースを生成する生合成経路を制御する機構の少なくとも1つを緩和又は解除する方法

(1b) 糖からGDP-フコースを生成する生合成経路に関与する酵素の少なくとも1つについて発現を増強する方法

(1c) 糖からGDP-フコースを生成する生合成経路に関与する酵素をコードする遺伝子の少なくとも1つのコピー数を増加させる方法

(1d) 糖からGDP-フコースを生成する生合成経路から該目的物質以外の代謝産物へ分岐する代謝経路の少なくとも1つを弱化又は遮断する方法

[0042] 糖からGDP-フコースを生成する生合成経路を制御する機構の具体例としては、例えば、当該生合成経路の制御に関わる転写調節因子（例えば、RcsA等）による制御機構等、公知の機構が挙げられる。RcsAは、GDP-フコースを中間体とするコラン酸生合成経路全体をアップレギュレートする調節因子である。後述のようにコラン酸生合成経路のうちGDP-フコースより下流の経路を遮断した状態でrcsAを強化することで、GDP-フコースを多く蓄積させることができる。

[0043] 糖からGDP-フコースを生成する生合成経路に関与する酵素の具体例としては、例えば、マンノース-6-リン酸イソメラーゼ、ホスホマンノムターゼ、マンノース-1-リン酸グアニリルトランスフェラーゼ、GDPマンノース-4, 6-デヒドラターゼ、GDP-ル-フコースシンターゼ等、公知の酵素が挙げられる。

[0044] 糖からGDP-フコースを生成する生合成経路から該目的物質以外の代謝

産物へ分岐する代謝経路の具体例としては、例えば、GDP-フコースからコラン酸へのコラン酸生合成経路等、公知の代謝経路が挙げられる。特にコラン酸生合成経路のうちGDP-フコースより下流の経路であるWcaJ、WzxC、WcaK、WcaL又はWcaMを遮断することで、GDP-フコースの供給を高めることができる。

[0045] 親株として用いる微生物は、その細胞膜を横断する外因性L-フコースの移入を促進するように改変されていてもよい。例えば、FucPをコードする塩基配列（アクセッション番号A1Z90162）を発現又は過剰発現させることにより、細胞膜を横断する外来性L-フコースの細胞への取り込みを向上し、これによりGDP-フコースを生産するためのフコース量を高め得る。

[0046] 親株として用いる微生物は、それぞれL-フコースイソメラーゼ及びL-フクロースキナーゼをコードする遺伝子fucI及び／又はfucKが欠失していて、fucI及び／又はfucKのヌクレオチド配列が対応するポリペプチドの酵素活性を不可逆的に不活性化するように変更されているか、又はfucI及び／又はfucKの発現が損なわれているように改変されていてもよい。FucI及び／又はFucKの細胞内合成を消失させると、該細胞におけるフコース代謝が消失し、これによりGDP-フコースを生産するためのフコースの量を高め得る。

[0047] 2) α 1, 2-フコシルトランスフェラーゼ／ α 1, 3-フコシルトランスフェラーゼの受容体糖質であるラクトースを供給する能力を人工的に付与又は増強された微生物

親株として用いる微生物に、ラクトースを供給する能力を人工的に付与する方法としては、例えば、下記(2a)～(2e)などの方法を挙げることができる。

(2a) ラクトースを分解する機構の少なくとも1つを緩和又は解除する方法

(2b) ラクトースの細胞内取り込みに関与する酵素の少なくとも1つにつ

いて発現を増強する方法

(2c) ラクトースの細胞内取り込みに関与する酵素をコードする遺伝子の少なくとも1つのコピー数を増加させる方法

(2d) ラクトースの生合成経路から該目的物質以外の代謝産物へ分岐する代謝経路の少なくとも1つを弱化又は遮断する方法

(2e) 野生株に比べ、ラクトースのアナログに対する耐性度が高い細胞株を選択する方法

[0048] ラクトースを分解する機構の具体例としては、例えば、ラクトースの加水分解を触媒しグルコース及びガラクトースを生成する β -ガラクトシダーゼ等、公知の酵素が挙げられる。具体的には例えば、ラクトースを加水分解する β -ガラクトシダーゼ（以下、lacZという）が挙げられ、lacZの活性を喪失させることで、ラクトース供給の低下を抑制できる。

[0049] ラクトースの細胞内取り込みに関与する酵素としては、ラクトースパーミターゼ等、公知の酵素が挙げられる。具体的には、ラクトースの細胞内取り込みに関与するラクトースパーミターゼ（以下、lacYという）が挙げられる。lacYは、ラクトースを細胞内に取り込む膜タンパク質である。lacYの活性が強化されていることで、ラクトース供給を増強し得る。

[0050] 微生物がGDP-フコース及び／又はラクトースを生成し得る微生物であることは、該微生物を培地に培養し、培養物中に蓄積したGDP-フコース及び／又はラクトースを、後述の糖分析装置または高速液体クロマトグラフ質量分析計等の一般的な手法を用いて検出することにより確認できる。

[0051] 本発明の親株として用いる微生物は、 α 1, 2-フコシルトランスフェラーゼ／ α 1, 3-フコシルトランスフェラーゼの反応基質であるGDP-フコース及び／又はラクトースを供給する能力が人工的に付与又は増強された微生物であることが好ましい。従って、本発明における1実施形態では、好ましくはrcsAをコードする塩基配列（アクセッション番号BAA15776.1）、マンノース-6-リン酸イソメラーゼをコードする塩基配列（アクセッション番号BAA15361.1）、ホスホマンノムターゼをコー

ドする塩基配列（アクセッション番号B A A 1 5 9 0 1. 1）、マンノースー1ーリン酸グアニリルトランスフェラーゼをコードする塩基配列（アクセッション番号B A A 1 5 9 0 5. 1）、GDPマンノースー4, 6ーデヒドラターゼをコードする塩基配列（アクセッション番号B A A 1 5 9 0 9. 1）、GDPーLーフコースシンターゼをコードする塩基配列（アクセッション番号B A A 1 5 9 0 8. 1）およびl a c Yをコードする塩基配列（アクセッション番号B A E 7 6 1 2 5. 1）から選ばれる少なくとも1の塩基配列を含む、遺伝的に改変された微生物を親株とすることが好ましい。

[0052] 特に、好ましくはl a c Yをコードする塩基配列およびr c s Aをコードする塩基配列を含む、遺伝的に改変された微生物を親株とすることがより好ましい。本発明の1実施形態において、前記遺伝的に改変された微生物は、GDPーフコース及び／又はラクトースの産生能が、遺伝的に改変されていない親株に比較して上昇していることが好ましい。

[0053] l a c Y活性およびr c s A活性性から選ばれる少なくとも1の活性を有している、またはその活性が強化されている微生物を製造する方法としては公知の方法を用いればよい。具体的には例えば、各種遺伝子操作による方法（Syst Microbiol Biomanufact, 2021, 1, 291）等が挙げられる。

[0054] また、親株ではさらに、上述のようにl a c Z活性および／またはコラン酸合成活性が低下又は欠失していることが好ましい。従って、本発明の一実施態様では、好ましくはl a c Z活性および／またはコラン酸合成活性が低下または欠失しており、より好ましくはl a c Zをコードする塩基配列および／またはコラン酸生成関連蛋白質をコードする塩基配列であるw c a J、w z x C、w c a K、w c a L又はw c a M遺伝子をコードする塩基配列を含まない、遺伝的に改変された微生物を親株とすることが好ましい。

[0055] 本発明の一実施形態において、前記遺伝的に改変された微生物は、GDPーフコース及び／又はラクトースの産生能が、遺伝的に改変されていない親株に比較して上昇していることが好ましい。

- [0056] β -ガラクトシダーゼ活性および／またはコラン酸合成活性が低下または喪失した大腸菌を製造する方法としては公知の方法を用いればよい。具体的には例えば、各種遺伝子操作による方法（Metabolic Engineering, 2017, 41:23-38）等が挙げられる。
- [0057] 親株の微生物に比べ前記[1]～[3]のいずれか1に記載の蛋白質及び前記[4]～[6]のいずれか1に記載の蛋白質の活性が増強された微生物としては、該蛋白質をコードするDNAを含む組換え体DNAで親株の微生物を形質転換することにより得られる、親株よりも該遺伝子のコピー数が増大した微生物が挙げられる。
- [0058] 前記[1]～[3]のいずれか1に記載の蛋白質及び前記[4]～[6]のいずれか1に記載の蛋白質をそれぞれコードするDNAを含む組換え体DNAで親株の微生物を形質転換することにより得られる、親株よりも該遺伝子のコピー数が増大した微生物としては、前記[1]～[3]のいずれか1に記載の蛋白質及び前記[4]～[6]のいずれか1に記載の蛋白質をそれぞれコードするDNAを含む組換え体DNAで親株の微生物を形質転換することにより、染色体DNA上において前記遺伝子のコピー数が増大した微生物、およびプラスミドDNAとして染色体DNA外に前記遺伝子を保有させた微生物が挙げられる。
- [0059] 前記[1]～[3]のいずれか1に記載の蛋白質をコードするDNAとしては、前記[1]～[3]のいずれか1に記載の蛋白質の活性を有する蛋白質をコードするDNAであればいずれでもよいが、具体的には以下の[7]～[10]からなる群より選ばれる1のDNAが挙げられる。
- [7] 前記[1]～[3]のいずれか1に記載の蛋白質をコードするDNA
- [8] 配列番号7で表される塩基配列からなるDNA
- [9] 配列番号7で表される塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ α 1, 2-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する相同蛋白質をコードするDNA
- [10] 配列番号7で表される塩基配列と95%以上、好ましくは97%以

上、より好ましくは98%以上、最も好ましくは99%以上の同一性を有する塩基配列からなり、かつ、 $\alpha 1$, 2-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する相同蛋白質をコードするDNA

[0060] 前記[4]～[6]のいずれか1に記載の蛋白質をコードするDNAとしては、前記[4]～[6]のいずれか1に記載の蛋白質の活性を有する蛋白質をコードするDNAであればいずれでもよいが、具体的には以下の[11]～[14]からなる群より選ばれる1のDNAが挙げられる。

[11] 前記[4]～[6]のいずれか1に記載の蛋白質をコードするDNA

[12] 配列番号1で表される塩基配列からなるDNA

[13] 配列番号1で表される塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ $\alpha 1$, 2-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する相同蛋白質をコードするDNA

[14] 配列番号1で表される塩基配列と95%以上、好ましくは97%以上、より好ましくは98%以上、最も好ましくは99%以上の同一性を有する塩基配列からなり、かつ、 $\alpha 1$, 2-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する相同蛋白質をコードするDNA

[0061] 上記[9]および[13]において「ハイブリダイズする」とは、特定の塩基配列を有するDNAまたは該DNAの一部にDNAがハイブリダイズすることである。したがって、該特定の塩基配列を有するDNAまたはその一部は、ノーザンまたはサザンブロット解析のプローブとして用いることができ、またPCR解析のオリゴヌクレオチドプライマーとして使用できるDNAである。

[0062] プローブとして用いられるDNAとしては、少なくとも100塩基以上、好ましくは200塩基以上、より好ましくは500塩基以上のDNAを挙げることができる。プライマーとして用いられるDNAとしては、少なくとも10塩基以上、好ましくは15塩基以上のDNAを上げることができる。

[0063] DNAのハイブリダイゼーション実験の方法はよく知られており、例えば

当業者であれば本明細書に従い、ハイブリダイゼーションの条件を決定できる。該ハイブリダイゼーションの条件は、モレキュラー・クローニング第4版（2012年）、Methods for General and Molecular Bacteriology, ASM Press（1994）、Immunology methods manual, Academic press（1996）に記載の他、多数の他の標準的な教科書に従っておこなうことができる。

[0064] また、市販のハイブリダイゼーションキットに付属した説明書に従うことによっても、ストリンジেন্টな条件下でハイブリダイズするDNAを取得できる。市販のハイブリダイゼーションキットとしては、例えばランダムプライム法によりプローブを作製し、ストリンジেন্টな条件でハイブリダイゼーションを行うランダムプライムドDNAラベリングキット（ロシュ・ダイアグノスティックス社製）などを挙げるることができる。

[0065] 上記のストリンジेंटな条件とは、DNAを固定化したフィルターとプローブDNAとを50%ホルムアミド、5×SSC（750mmol/Lの塩化ナトリウム、75mmol/Lのクエン酸ナトリウム）、50mmol/Lのリン酸ナトリウム（pH7.6）、5×デンハルト溶液、10%の硫酸デキストラン、および20μg/Lの変性させたサケ精子DNAを含む溶液中で42℃にて一晩、インキュベートした後、例えば約65℃の0.2×SSC溶液中で該フィルターを洗浄する条件を挙げるることができる。

[0066] 上記したストリンジेंटな条件下でハイブリダイズ可能なDNAとしては、例えばBLASTやFASTA等を用いて上記したパラメータ等に基づいて計算したときに、配列番号7又は1で表される塩基配列からなるDNAと少なくとも95%以上、好ましくは97%以上、より好ましくは98%以上、最も好ましくは99%以上の同一性を有するDNAを挙げるることができる。

[0067] 上記[1]の蛋白質をコードするDNAは、例えば、配列番号7で表される塩基配列に基づき設計できるプローブDNAを用いた、微生物、好ましく

は、*Helicobacter* 属に属する微生物、より好ましくは、*Helicobacter mustelae* ATCC 43772 株株の染色体 DNA ライブラリーに対するサザンハイブリダイゼーション法、または該塩基配列に基づき設計できるプライマー DNA を用いた、上記微生物の染色体 DNA を鋳型とした PCR [PCR Protocols, Academic Press (1990)] により取得できる。

[0068] 上記 [4] の蛋白質のうち、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列をコードする DNA は、例えば、以下の (i) または (ii) に示すフュージョン PCR によるキメラ化により取得できる。

(i) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質をコードする DNA の塩基配列に基づいて設計できるプローブを用い、各染色体 DNA ライブラリーに対するサザンハイブリダイゼーションによって得られた下記 (i-1) ~ (i-3) の合計 3 つの DNA 断片のフュージョン PCR によるキメラ化

(i-1) 微生物、好ましくはバクテロイデス属、より好ましくは *Bacteroides reticulotermitis* JCM10512 株の染色体 DNA ライブラリーに対するサザンハイブリダイゼーションによって得られた配列番号 3 で表される塩基配列のうち、1~342 番目の塩基配列からなる DNA 断片

(i-2) 微生物、好ましくはバクテロイデス属、より好ましくは *Bacteroides reticulotermitis* JCM10512 株の染色体 DNA ライブラリーに対するサザンハイブリダイゼーションによって得られた配列番号 3 で表される塩基配列のうち、607~954 番目の塩基配列からなる DNA 断片

(i-3) *Bacteroides fragilis* ATCC25285 株の染色体 DNA ライブラリーに対するサザンハイブリダイゼーションによって得られた配列番号 6 で表されるアミノ酸配列のうち、127~214 番目のアミノ酸配列をコードする塩基配列を、大腸菌内で発現させるためにコ

ドン最適化した塩基配列からなるDNA断片

(ii) 配列番号4で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするDNAに基づき設計できるプライマーDNAを用い、各染色体DNAを鋳型としたPCRによって得られた下記(ii-1)～(ii-3)の合計3つのDNA断片のフュージョンPCRによるキメラ化

(ii-1) 微生物、好ましくはバクテロイデス属、より好ましくは*Bacteroides reticulotermitis* JCM10512株の染色体DNAを鋳型としたPCRによって得られた配列番号3で表される塩基配列のうち、1～342番目の塩基配列からなるDNA断片

(ii-2) 微生物、好ましくはバクテロイデス属、より好ましくは*Bacteroides reticulotermitis* JCM10512株の染色体DNAを鋳型としたPCRによって得られた配列番号3で表される塩基配列のうち、607～954番目の塩基配列からなるDNA断片

(ii-3) *Bacteroides fragilis* ATCC25285株の染色体DNAを鋳型としたPCRによって得られた配列番号6で表されるアミノ酸配列のうち、127～214番目のアミノ酸配列をコードする塩基配列を、大腸菌内で発現させるためにコドン最適化した塩基配列からなるDNA断片

[0069] 配列番号2で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするDNAとしては、具体的には、配列番号1で表される塩基配列を有するDNAが挙げられる。

[0070] 上記[2]の変異蛋白質をコードするDNAは、例えば、配列番号7で表される塩基配列からなるDNAを鋳型としてエラープローンPCR等に従うことにより取得できる。上記[5]の変異蛋白質をコードするDNAは、例えば、配列番号1で表される塩基配列からなるDNAを鋳型としてエラープローンPCR等に従うことにより取得できる。

[0071] または、目的の変異(欠失、置換、挿入または付加)が導入されるように設計した塩基配列をそれぞれの5'端に持つ1組のPCRプライマーを用い

たPCR [Gene, 77, 51 (1989)]によっても、上記[2]及び[5]のDNAを取得できる。

[0072] また、市販の部分特異的変異導入キットに付属した説明書に従うことによっても、該DNAを取得できる。市販の部分特異的変異導入キットとしては、例えば、目的の変異を導入したい位置に変異（欠失、置換、挿入又は付加）を導入できるPrimeSTAR（登録商標）Mutagenesis Basal Kit（タカラバイオ社製）が挙げられる。

[0073] すなわち、まず、目的の変異（欠失、置換、挿入又は付加）が導入されるように設計した塩基配列を有するプラスミドを鋳型に、5'側が15塩基オーバーラップした一対の変異導入用プライマーを設計する。このとき、オーバーラップ部分には目的の変異を含む。次に、該変異導入用プライマーを用いて、目的の変異を導入したい塩基配列を有するプラスミドを鋳型にPCRを行う。これにより得られた増幅断片を大腸菌に形質転換すると、目的の変異が導入された塩基配列を有するプラスミドが得られる。

[0074] 上記[3]の相同蛋白質をコードするDNA、並びに上記[9]および[10]のDNAは、例えば、各種の遺伝子配列データベースに対して配列番号7で表される塩基配列と95%以上、好ましくは97%以上、さらに好ましくは98%以上、最も好ましくは99%以上の同一性を有する塩基配列を検索し、または、各種の蛋白質配列データベースに対して配列番号8で表されるアミノ酸配列と95%以上、好ましくは97%以上、さらに好ましくは98%以上、最も好ましくは99%以上の同一性を有するアミノ酸配列を検索し、該検索によって得られた塩基配列またはアミノ酸配列に基づいて設計できるプローブDNAまたはプライマーDNA、および当該DNAを有する微生物を用いて、上記のDNAを取得する方法と同様の方法によって取得できる。

[0075] 上記[6]の相同蛋白質をコードするDNA、並びに上記[13]および[14]のDNAは、例えば、各種の遺伝子配列データベースに対して配列番号1で表される塩基配列と95%以上、好ましくは97%以上、さらに好

ましくは98%以上、最も好ましくは99%以上の同一性を有する塩基配列を検索し、または、各種の蛋白質配列データベースに対して配列番号2で表されるアミノ酸配列と95%以上、好ましくは97%以上、さらに好ましくは98%以上、最も好ましくは99%以上の同一性を有するアミノ酸配列を検索し、該検索によって得られた塩基配列またはアミノ酸配列に基づいて設計できるプローブDNAまたはプライマーDNA、および当該DNAを有する微生物を用いて、上記のDNAを取得する方法と同様の方法によって取得できる。

[0076] 取得した上記の[7]～[14]のいずれか1に記載のDNAは、そのまま、または適当な制限酵素などで切断し、常法によりベクターに組み込み、得られた組換え体DNAを宿主細胞に導入した後、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばジデオキシ法[Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 74, 5463 (1977)]またはアプライド・バイオシステムズ3500ジェネティックアナライザやアプライド・バイオシステムズ3730DNAアナライザ(いずれもサーモフィッシャー・サイエンティフィック社製)等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより、該DNAの塩基配列を決定できる。

[0077] 前記、DNAの塩基配列を決定する際に用いることができる宿主細胞としては、前記ベクターを導入し増殖可能なものであれば何でもよいが、例えば、*Escherichia coli* DH5 α 、*Escherichia coli* HST08Premium、*Escherichia coli* HST02、*Escherichia coli* HST04 dam $-$ /dcm $-$ 、*Escherichia coli* JM109、*Escherichia coli* HB101、*Escherichia coli* CJ236、*Escherichia coli* BMH71-18 mutS、*Escherichia coli* MV1184、*Escherichia coli* TH2(いずれもタカラバイオ社製)、*Escherichia coli* XL1-Blue、*Escherichia c*

oli XL2-Blue (いずれもアジレント・テクノロジー社製)、Escherichia coli DH1、Escherichia coli MC1000、Escherichia coli W1485、Escherichia coli W3110、Escherichia coli MP347、Escherichia coli NM522等が挙げられる。

[0078] 上記のベクターとしては、例えば、pBluescript II KS (+)、pPCR-Script Amp SK (+) (いずれもアジレント・テクノロジー社製)、pT7Blue (メルクミリポア社製)、pCRII (サーモフィッシャー・サイエンティフィック社製)、pCR-TRAP (ジーンハンター社製)、及びpDIRECT (Nucleic Acids Res., 18, 6069, 1990) 等が挙げられる。

[0079] 組換え体DNAの導入方法としては、宿主細胞へDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、カルシウムイオンを用いる方法 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 69, 2110 (1972)]、プロトプラスト法 (日本国特開昭63-248394号公報)、エレクトロポレーション法 [Nucleic Acids Res., 16, 6127 (1988)] 等が挙げられる。

[0080] 塩基配列を決定した結果、取得されたDNAが部分長であった場合は、該部分長DNAをプローブに用いた、染色体DNAライブラリーに対するザンハイブリダイゼーション法等により、全長DNAを取得できる。

[0081] 更に、決定されたDNAの塩基配列に基づいて、日本テクノサービス社製 NTS MシリーズDNA合成装置等を用いて化学合成することにより目的とするDNAを調製することもできる。

[0082] 前記 [1] ~ [3] のいずれか1に記載の蛋白質および前記 [4] ~ [6] のいずれか1に記載の蛋白質について、該蛋白質をコードするDNAを含む組換え体DNAとは、該DNAが、親株において自律複製可能または染色体中への組込が可能で、該DNAを転写できる位置にプロモーターを含有し

ている発現ベクターに組み込まれている組換え体DNAをいう。

[0083] 組換え体DNAが、染色体への組込が可能な組換え体DNAである場合は、プロモーターを含有していなくてもよい。

[0084] 前記蛋白質をコードするDNAを含む組換え体DNAで親株の微生物を形質転換することにより得られる、親株よりも該遺伝子のコピー数が増大した微生物は、以下の方法で取得できる。

[0085] 上記の方法で得られる前記蛋白質をコードするDNAをもとにして、必要に応じて、該蛋白質をコードする部分を含む適当な長さのDNA断片を調製する。また、該蛋白質をコードする部分の塩基配列を、宿主細胞での発現に最適なコドンとなるように、塩基を置換することにより、生産率が向上した形質転換体を取得できる。

[0086] 前記DNA断片を適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換え体DNAを作製する。該組換え体DNAで親株を形質転換することにより、親株よりも該蛋白質をコードする遺伝子のコピー数が増大した微生物を取得できる。

[0087] 細菌等の原核生物を親株として用いる場合は、該組換え体DNAは、プロモーター、リボソーム結合配列、前記[1]～[3]のいずれか1に記載の蛋白質については上記の[7]～[10]のいずれか1に記載のDNA、前記[4]～[6]のいずれか1に記載の蛋白質については上記の[11]～[14]のいずれか1に記載のDNA、および転写終結配列により構成された組換え体DNAであることが好ましい。プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

[0088] リボソーム結合配列であるシャインーダルガノ（Shine-Dalgarno）配列と開始コドンとの間を適当な距離（例えば6～18塩基）に調節したプラスミドを用いることが好ましい。該組換え体DNAにおいては、該DNAの発現には転写終結配列は必ずしも必要ではないが、構造遺伝子の直下に転写終結配列を配置することが好ましい。

[0089] また、 $\alpha 1$ ，2-フコシルトランスフェラーゼ活性又は $\alpha 1$ ，3-フコシ

ルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードする部分の塩基配列を宿主の発現に最適なコドンとなるように塩基を置換することにより、 $\alpha 1$, 2-フコシルトランスフェラーゼ活性又は $\alpha 1$, 3-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質の発現量を向上し得る。 $\alpha 1$, 2-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質としては、例えば前記[1]～[3]のいずれか1に記載の蛋白質が挙げられる。 $\alpha 1$, 3-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質としては、例えば前記[4]～[6]のいずれか1に記載の蛋白質が挙げられる。本発明に用いられる親株におけるコドン使用頻度の情報は、公共のデータベースを通じて入手できる。

[0090] 発現ベクターとしては、目的DNAを宿主に導入し、増殖、発現させるための適当な核酸分子であれば特に限定されず、プラスミドのみならず、例えば、人工染色体、トランスポゾンを用いたベクター、コスミドを用いてもよい。

[0091] 親株にエシェリヒア属に属する微生物を用いる場合は、発現ベクターとしては、例えば、pCol d1、pSTV28、pSTV29、pUC118（いずれもタカラバイオ社製）、pMW118、pMW119（いずれもニッポンジーン社製）、pET21a、pCOLADuet-1、pCDFDuet-1、pCDF-1b、pRSF-1b（いずれもメルクミリポア社製）、pMAL-c5x（ニューイングランドバイオラブス社製）、pGEX-4T-1、pTrc99A（いずれもジーイーヘルスケアバイオサイエンス社製）、pTrcHis、pSE280（いずれもサーモフィッシャー・サイエンティフィック社製）、pGEMEX-1（プロメガ社製）、pQE-30、pQE80L（いずれもキアゲン社製）、pET-3、pBluescript11 SK(+）、pBluescript11 KS(-）（いずれもアジレント・テクノロジー社製）、pUAKQE31（Appl. Environ. Microbiol. 2007, 73:6378-6385）、pKYP10（日本国特開昭58-110600号公報）、pKYP200 [Agric. Biol. Chem., 48, 669 (

1984)]、pLSA1 [A g r i c. B i o l. C h e m., 53, 277 (1989)]、pGEL1 [P r o c. N a t l. A c a d. S c i., U S A, 82, 4306 (1985)]、pBluescript II SK (+)、pBluescript II KS (−) (ストラタジーン社製)、pTrS30 [エシェリヒア・コリ JM109/pTrS30 (FERM BP-5407) より調製]、pTrS32 [エシェリヒア・コリ JM109/pTrS32 (FERM BP-5408) より調製]、pTK31 [APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY、2007、Vol. 73、No. 20、p. 6378-6385]、pPAC31 (国際公開第1998/12343号)、pUC19 [Gene, 33, 103 (1985)]、pPA1 (日本国特開昭63-233798号公報)) pKD46 [P r o c. N a t l. A c a d. S c i., U S A, 97, 6640-6645 (2000)] 等を挙げることができる。

[0092] 上記発現ベクターを用いる場合のプロモーターとしては、エシェリヒア属に属する微生物の細胞中で機能するものであればいかなるものでもよいが、例えば、trpプロモーターやilvプロモーター等のアミノ酸生合成に関与する遺伝子のプロモーター、uspA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、PSEプロモーター等のEscherichia coliやファージ等に由来するプロモーターを用いることができる。また、例えば、trpプロモーターを2つ直列させたプロモーター、tacプロモーター、trcプロモーター、lacT7プロモーター、letIプロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーターが挙げられる。

[0093] 親株にコリネバクテリウム属に属する微生物を用いる場合は、発現ベクターとしては、例えば、pCG1 (日本国特開昭57-134500号公報)、pCG2 (日本国特開昭58-35197号公報)、pCG4 (日本国特開昭57-183799号公報)、pCG11 (日本国特開昭57-134

500号公報)、pCG116、pCE54、pCB101 (いずれも日本特開昭58-105999号公報)、pCE51、pCE52、pCE53 [いずれもMolecular and General Genetics, 196, 175 (1984)]等を挙げることができる。

[0094] 上記発現ベクターを用いる場合のプロモーターとしては、コリネバクテリウム属に属する微生物の細胞中で機能するものであればいかなるものでもよいが、例えば、P54-6プロモーター [Appl. Microbiol. Biotechnol., 53, 674-679 (2000)]を用いることができる。

[0095] 親株に酵母菌株を用いる場合には、発現ベクターとしては、例えば、YEp13 (ATCC37115)、YEp24 (ATCC37051)、YCP50 (ATCC37419)、pHS19、pHS15等を挙げることができる。

[0096] 上記発現ベクターを用いる場合のプロモーターとしては、酵母菌株の細胞中で機能するものであればいかなるものでもよいが、例えば、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター、gal1プロモーター、gal10プロモーター、ヒートショックポリペプチドプロモーター、MF α 1プロモーター、CUP1プロモーター等のプロモーターを挙げることができる。

[0097] 上記の[7]～[10]のいずれか1に記載のDNA断片および上記の[11]～[14]のいずれか1に記載のDNA断片を適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、本発明の製造法に用いられる組換え体DNAを作製できる。

[0098] 組換え体DNAを親株において自律複製可能なプラスミドとして導入させる方法としては、例えば、カルシウムイオンを用いる方法 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 69, 2110 (1972)]、プロトプラスト法 (日本国特開昭63-248394号公報) およびエレクトロポレーション法 [Nucleic Acids Res.,

16, 6127 (1988)]等の方法が挙げられる。

[0099] 組換え体DNAを宿主細胞の染色体中に組み込む方法としては、例えば、相同組換え法が挙げられる。相同組換え法としては、例えば、導入したい宿主細胞内では自律複製できない薬剤耐性遺伝子を有するプラスミドDNAと連結して作製できる相同組換え用プラスミドを用いる方法が挙げられる。E *scherichia coli*で頻用される相同組換えを利用した方法としては、例えば、ラムダファージの相同組換え系を利用して、組換え体DNAを導入する方法 [P *roc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 6640-6645 (2000)] が挙げられる。

[0100] さらに、組換え体DNAと共に染色体上に組み込まれた枯草菌レバンシュークラゼによって大腸菌がスクロース感受性となることを利用した選択法や、ストレプトマイシン耐性の変異 *rpsL* 遺伝子を有する大腸菌に野生型 *rpsL* 遺伝子を組み込むことによって大腸菌がストレプトマイシン感受性となることを利用した選択法 [M *ol. Microbiol.*, 55, 137 (2005)、B *iosci. Biotechnol. Biochem.*, 71, 2905 (2007)] 等を用いて、宿主細胞の染色体DNA上の目的の領域が組換え体DNAに置換された大腸菌を取得できる。

[0101] 該組換え体DNAが、親株において自律複製可能なプラスミドとして導入されたこと、または親株の染色体中に組み込まれたことは、例えば、微生物が元来、染色体DNA上に有する該遺伝子を増幅することはできないが、形質転換により導入された該遺伝子は増幅可能なプライマーセットを用いてPCRにより増幅産物を確認する方法等により確認できる。また、該DNAの転写量若しくは該DNAがコードする蛋白質の生産量が増大したことは、該微生物の該遺伝子の転写量をノーザン・ブロッティングにより、または該微生物の該蛋白質の生産量をウェスタン・ブロッティングにより、親株のそれと比較する方法等により確認できる。

[0102] 上記の方法で造成した微生物が、上記 [1] ~ [3] のいずれか1に記載の蛋白質及び上記 [4] ~ [6] のいずれか1に記載の蛋白質の活性が増強

され、かつ親株に比べてL D F Tの生産性が向上した微生物であることは、該微生物の培養後、培養液を適宜希釈後に遠心分離し、上清又は菌体内に含まれるL D F Tを後述の糖分析装置または高速液体クロマトグラフ質量分析計にて分析することにより、親株のそれと比較することにより確認できる。

[0103] 上記した微生物は、親株よりも上記〔1〕～〔3〕のいずれか1に記載の蛋白質及び上記〔4〕～〔6〕のいずれか1に記載の蛋白質の活性が増強していることにより、2' F L及び3 F Lが副生成物として残存するのを抑制でき、L D F Tの生産性を向上し得る。このような微生物としては、例えば、実施例において後述するc B r F u c T遺伝子及びH M F T遺伝子の発現を強化したF U C／p c B r F u c T－H M F T株が挙げられる。

[0104] このような微生物の例である、c B r F u c T蛋白質及びH M F T蛋白質の活性を増強した微生物では、c B r F u c T蛋白質による3 F Lを高効率L D F Tに変換する活性が増強されるとともに、H M F T蛋白質による2' F Lを高効率でL D F Tに変換する活性が増強され、2' F L及び3 F Lが副生成物として残存するのを抑制でき、L D F Tの生産性を向上できる。

[0105] <L D F Tの製造方法>

本発明のL D F Tの製造方法（以下、本発明の方法とも略す）としては、上記した形質転換体を調製すること、および該形質転換体を用いて培養物中にオリゴ糖を生成することを含む、フコース含有糖質の製造方法が挙げられる。

[0106] 上記した形質転換体を培養する方法は、微生物の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。形質転換体を培養する培地としては、該微生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、該形質転換体の培養を効率的に行うことができる培地であれば、天然培地と合成培地のいずれを用いてもよい。

[0107] 炭素源としては、微生物が資化し得るものであればよく、例えば、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含有する糖蜜、デンプン若しくはデンプン加水分解物等の糖、酢酸若しくはプロピオン酸等の有機酸、又は

、グリセロール、エタノール若しくはプロパノール等のアルコール類等が挙げられる。

[0108] 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、酢酸アンモニウム又はリン酸アンモニウム等の無機酸若しくは有機酸のアンモニウム塩、その他の含窒素化合物、並びに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスチープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕、大豆粕加水分解物、各種発酵菌体及びその消化物等が挙げられる。

[0109] 無機塩としては、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、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等が挙げられる。

[0110] L D F Tの製造方法に用いる形質転換体として、グルコース、ラクトース、またはラクトースー水和物等を生成する能力を有する微生物を用いてもよい。

[0111] L D F Tの製造方法において、培養中に、グルコース、ラクトースまたはラクトースー水和物等を培地に添加してもよい。

[0112] L D F Tの製造方法に用いる形質転換体が、G D Pーフコース及び／又はラクトースを生成する能力を有していない場合は、G D Pーフコース、ラクトースまたはラクトースー水和物を培地に添加してもよい。

[0113] また、L D F Tの製造方法において、培養中に、グルコース、ラクトースまたはラクトースー水和物等を培地に添加する代わりに、糖からグルコース、ラクトースまたはラクトースー水和物等を生成する能力を有する微生物を、本発明の形質転換体と同時に培養することにより、本発明の形質転換体にグルコース、ラクトースまたはラクトースー水和物等を供給してもよい。

[0114] L D F Tの製造方法において、培地中には β -ガラクトシダーゼおよびW c a Jが存在しないことが好ましい。

[0115] 培養は、通常、振盪培養、深部通気攪拌培養またはジャーファーメンター等の好氣的条件下で行うことが好ましい。培養温度は、通常30～37℃であり、培養時間は、通常24時間～3日間である。培養中の培養液pHは、

通常6.0～8.0に保持する。pHの調整は、無機又は有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニア等を用いて行う。

[0116] 上記の培養により、培養物中にL D F Tを生成することにより、L D F Tを製造できる。

[0117] 通常、該培養物の遠心分離後、上清よりL D F Tを採取できる。なお、菌体内にL D F Tが蓄積する場合には、例えば菌体を超音波などにより破碎し、遠心分離によって菌体を除去して得られる上清からイオン交換樹脂法などによって、L D F Tを採取できる。

[0118] また、培養物中のL D F T又は採取したL D F Tに、さらに他の糖を付加することにより所望のフコース含有糖質を製造することもできる。

[0119] <L D F T結晶の製造方法>

本発明のL D F Tの結晶の製造方法としては、以下の方法が挙げられる。

下記(i)～(iv)の工程を含む、上記に記載の微生物を培養し得た培養物からのL D F Tの結晶の製造方法。

(i) 培養物を遠心分離して菌体が除去された上清を得る工程

(ii) 工程(i)で得られた上清を、陽イオン交換および陰イオン交換して、上清からイオンが除去された溶液を得る工程

(iii) 工程(ii)で得られた溶液を、エバポレータにより濃縮する工程、および

(iv) 工程(iii)で得られた溶液からL D F Tの結晶を得る工程

以下、各工程について説明する。

[0120] (i) 培養物を遠心分離して菌体が除去された上清を得る工程

工程(i)は、上記した微生物の培養物を遠心分離して、菌体が除去された上清を得る工程である。培養物は、遠心分離の前にpHを好ましくは3.0～4.0に調整した後、好ましくは60～80℃にて30～120分間加熱することが好ましい。

[0121] 遠心分離の条件は特に制限されないが、通常、好ましくは0～30℃、より好ましくは0～10℃にて、好ましくは4000～12000Gまたは6

000～10000rpmで、好ましくは5～30分間とする。

[0122] (ii) 工程(i) で得られた上清を陽イオン交換および陰イオン交換して、上清からイオンが除去された溶液を得る工程

工程(ii) は、工程(i) で得られた菌体が除去された上清を、陽イオン交換および陰イオン交換して、上清に含まれるイオンを除去した溶液を得る工程である。工程(ii) は室温又はより低温で行ってもよいが、好ましくは低温である。

[0123] 陽イオン交換樹脂としては、特に限定されず、各種イオン交換樹脂を適宜用いることができるが、強酸性陽イオン交換樹脂が好ましい。強酸性陽イオン交換樹脂は、例えば架橋したスチレン骨格にスルホン酸基を持つ。より具体的には、ダイヤイオンUBK550(H⁺形) (三菱ケミカル社製)、Marathon C(H⁺形) (Dow Chemical社製)、などの樹脂が挙げられる。

[0124] 陰イオン交換樹脂としては、特に限定されず、各種イオン交換樹脂を適宜用いることができるが、弱塩基性陰イオン交換樹脂が好ましい。弱塩基性陰イオン交換樹脂は、例えば架橋したスチレン骨格に1～3級アミン基を持つか、または架橋したアクリル骨格にカルボン酸を持つ。より具体的には、A111S(OH⁻形) (Prolite社製)、A845S(OH⁻形) (Prolite社製)、WA30(OH⁻形) (三菱ケミカル社製)などの樹脂が挙げられる。

[0125] また、陽イオン交換および陰イオン交換においては、陽イオン交換樹脂および陰イオン交換樹脂1種ずつ用いて行ってもよい。必要に応じ、複数の陽イオン交換樹脂および複数の陰イオン交換樹脂を適宜組み合わせて用いることもできる。陽イオン交換を行った後、陰イオン交換を行ってもよい。または、陰イオン交換を行った後、陽イオン交換を行ってもよい。

[0126] 陽イオン交換のpHは特に制限されないが、通常、好ましくはpH0～10、より好ましくはpH0～5である。陰イオン交換のpHは特に制限されないが、通常、好ましくはpH4～14、より好ましくはpH9～14であ

る。

[0127] 陽イオン交換樹脂を充填するカラムとしては、化学物質の精製に用いられるカラムであればどのようなものでもよいが、イオン交換樹脂をカラムに充填した際に、樹脂層高さ／カラム内径が大きくなるように選択することが好ましく、樹脂層高さ／カラム内径が3以上になるように選択することがより好ましい。

[0128] 陰イオン交換樹脂を充填するカラムとしては、化学物質の精製に用いられるカラムであればどのようなものでもよいが、イオン交換樹脂をカラムに充填した際に、樹脂層高さ／カラム内径が大きくなるように選択することが好ましく、樹脂層高さ／カラム内径が3以上になるように選択することがより好ましい。

[0129] 工程(i)で得られた、菌体が除去された上清を、陽イオン交換樹脂を充填したカラムに通塔するには、例えば、イオン交換樹脂を充填したカラムの上部、いわゆるカラムベッド上層から該溶液を通塔しても、カラムの下部、いわゆるカラムベッド下層から通塔してもよく、カラムの上部から通塔するのがより好ましい。通塔速度としては、空間速度5[1/時間]以下が好ましく、3[1/時間]以下がより好ましい。

[0130] 工程(i)で得られた、菌体が除去された上清を、陰イオン交換樹脂を充填したカラムに通塔するには、例えば、イオン交換樹脂を充填したカラムの上部、いわゆるカラムベッド上層から該溶液を通塔しても、カラムの下部、いわゆるカラムベッド下層から通塔してもよく、カラムの上部から通塔するのがより好ましい。通塔速度としては、空間速度5[1/時間]以下が好ましく、3[1/時間]以下がより好ましい。

[0131] 陽イオン交換および陰イオン交換の後に得られた画分は、濾過してもよい。濾過には、MF膜(HVLP06225、メルク社製)、MF膜モジュール(PSP-003、旭化成社製)、UF膜(VVLP06225、メルク社製)、UF膜モジュール(SIP-0013、旭化成社製)、または上記に類する濾過膜を用いることができる。

[0132] (i i i) 工程 (i i) で得られた溶液を、エバポレータにより濃縮する工程

工程 (i i i) は、工程 (i i) で得られた溶液をエバポレータにより濃縮し、L D F T を高純度で含む溶液を得る工程である。

[0133] L D F T を高純度で含む溶液を得るために、濃縮工程を実施する。濃縮工程は、一般に、真空下で、例えば 0 ～ 2 ミリバール、好ましくは 0 ～ 1. 2 ミリバールの範囲の圧力で実施される。この真空は、蒸発のために必要とされる温度を下げることに、及びこの濃縮工程の継続時間を減らすことを可能にする。それは、5 ～ 6 0 °C、好ましくは 5 ～ 5 0 °C、さらに好ましくは 5 ～ 4 0 °C の範囲の温度で実施できる。

[0134] この濃縮工程は、一段階エバポレータ、多段階エバポレータ、例えば二段階エバポレータで実施できる。この濃縮工程は、連続的に実施できる。

[0135] L D F T を高純度で含む溶液における、L D F T の純度は、好ましくは 5 0 % 以上、さらに好ましくは 8 0 % 以上である。

[0136] (i v) 工程 (i i i) で得られた溶液から L D F T の結晶を得る工程

工程 (i v) は、工程 (i i i) で得られた L D F T を含む溶液から L D F T 結晶を得る工程である。

[0137] L D F T を含む溶液に、種晶として L D F T 結晶を添加する。種晶として添加する L D F T 結晶としては、本発明の方法で取得した結晶を用いることができる。種晶は、該溶液中に L D F T 結晶が析出する前であれば、結晶を析出させる工程の前に添加しても、結晶を析出させる工程において添加してもよい。種晶は、溶液中の濃度が通常 0. 1 ～ 1 0 重量%、好ましくは 0. 1 ～ 2. 0 重量% となるように添加する。

[0138] 該溶液中に、L D F T 結晶を析出させる方法としては、例えば、該溶液に貧溶媒を滴下する方法等を挙げることができる。貧溶媒とは、化学物質の溶解度が低い溶媒をいう。貧溶媒と溶媒との混合物であってもよい。貧溶媒は、好ましくはエタノール、メタノール、n-プロパノール、イソプロピルアルコール、アセトン等であってもよい。溶液を混合すると、溶媒混合物への

物質の溶解性が低下し、それを析出させることになる。

[0139] 上記のようにしてL D F T結晶を析出させた後、析出した結晶を採取する工程の前に、さらに析出した結晶を通常0.5～12時間、好ましくは2～12時間、最も好ましくは2～6時間熟成させてもよい。

[0140] 熟成させるとは、L D F T結晶を析出させる工程を一旦停止して、結晶を成長させることをいう。結晶を熟成させた後は、L D F T結晶を析出させる工程を再開してもよい。

[0141] L D F T結晶を採取する方法としては、特に限定されないが、例えば、濾取、加圧濾過、吸引濾過または遠心分離等を挙げることができる。さらに結晶への母液の付着を低減し、結晶の品質を向上させるために、結晶を採取した後、適宜、結晶を洗浄できる。結晶洗浄に用いる溶液に特に制限はないが、水、メタノール、エタノール、アセトン、n-プロパノール、イソプロピルアルコールおよびそれらから選ばれる1種類または複数種類を任意の割合で混合した溶液を用いることができる。

[0142] このようにして得られた湿晶を乾燥させることにより、本発明の結晶を取得できる。すなわち、本発明の結晶の製造法は、L D F T結晶を乾燥する工程をさらに含んでもよい。

[0143] 乾燥条件としては、L D F T結晶の形態を保持できる方法ならばいずれでもよく、例えば、減圧乾燥、真空乾燥、流動層乾燥または通風乾燥等が挙げられる。

[0144] 乾燥温度としては、付着水分または溶液を除去できる範囲ならばいずれでもよいが、好ましくは80℃以下、より好ましくは60℃以下、さらに好ましくは10℃以下を挙げることができる。

[0145] 上記の方法によって、高純度のL D F T結晶を取得できる。本発明の結晶として、好ましくは、L D F T・7.2水和物結晶である。

[0146] 本発明の結晶が7.2水和物結晶であることは、後述の単結晶X線解析により確認できる。得られたL D F T結晶の純度としては、通常80%以上、好ましくは90%、より好ましくは以下順に97%以上、98%以上、さら

に好ましくは99%以上、最も好ましくは99.5%以上を挙げることができる。

[0147] 得られたL D F Tの結晶の構造を解析する方法としては、例えば、X線源としてC u K α を用いた粉末X線回折、単結晶X線回折が挙げられる。

[0148] 工程(i v)において、工程(i i i)で得られた溶液に貧溶媒を滴下ことによりL D F T結晶を得る際に、貧溶媒として水以外、例えばエタノール、メタノール、n-プロパノール、イソプロピルアルコールまたはアセトンを用いる場合、上記の方法で得られるL D F Tの結晶としては、具体的にはX線源としてC u K α を用いた粉末X線回折において、下記(i)に記載の回折角(2 θ)にピークを有するL D F T結晶が好ましく、下記(i)に記載の回折角(2 θ)に加えてさらに下記(i i)に記載の回折角(2 θ)にピークを有するL D F T結晶がより好ましい。

(i) 11.1、15.8、18.4、18.7、21.7

(i i) 22.8、16.6、23.0、22.6、20.0

[0149] [分析例]

(1) L D F T、2' F L、3 F L又はラクトースの分析、定量

実施例において、L D F T、2' F L、3 F L又はラクトースの分析、定量は以下に示す手順で行った。

培養後の微生物を含む培養液を遠心分離し、上清を回収した。該上清に含まれるL D F T、2' F L、3 F L又はラクトースを糖分析装置ICS-5000(サーモフィッシャー・サイエンティフィック社製)にて分析した。

[分析条件]

カラム: C a r b o P A C P A 1

カラム温度: 25℃

移動相:

(移動相A) 水

(移動相B) 500mmol/L 水酸化ナトリウム

(移動相C) 300mmol/L 酢酸ナトリウム

移動相 A、移動相 B 及び移動相 C 混合比：

(0～10分) 80：20：0

(10～15分) 80：20：0から70：20：10の勾配

(15～17分) 70：20：10から0：20：80の勾配

(17～25分) 0：20：80

(25～35分) 80：20：0

流速：1.0 mL/min

検出器：パルスドアンペロメトリー検出器

[0150] (2) 単結晶 X 線構造解析

単結晶 X 線構造解析は、単結晶 X 線回折装置 Synergy-R (リガク社製) を用い、測定は使用説明書に従って行った。

[0151] (3) 粉末 X 線回折

粉末 X 線回折は、粉末 X 線回折装置 (XRD) Ultima IV (リガク社製) を用い、測定は使用説明書に従って行った。

実施例

[0152] 以下に本発明の実施例を示すが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

[0153] [実施例 1] LDF T 生産に有用な $\alpha 1$, 2-フコシルトランスフェラーゼの取得

ラクトース又は 3FL へのフコース転移活性を指標として、LDF T 生産に有用な $\alpha 1$, 2-フコシルトランスフェラーゼをスクリーニングした。

[0154] (1) 評価用宿主株の造成

<遺伝子欠損の際にマーカーとして用いる DNA 断片の取得>

配列番号 15 及び 16 で表される塩基配列からなる DNA をプライマーセットとして、pCatSac (Appl Environ Microbiol (2013) 79, 3033-3039) を鋳型として PCR を行い、クロラムフェニコール耐性 cat 遺伝子およびスクロース感受性 sacB 遺伝子を含む、cat-sacB 断片を得た。

[0155] <β-ガラクトシダーゼ活性、ラクトースパーミアーゼ活性、及びコラン酸合成活性が喪失した大腸菌の造成>

β-ガラクトシダーゼをコードするDNA（以下、lacZ遺伝子という。）、ラクトースパーミアーゼをコードするDNA（以下、lacY遺伝子という。）、及びコラン酸生成関連蛋白質をコードするDNA（以下、wcaJ、wzx C、wcaK、wcaL又はwcaM遺伝子という。）を欠損した大腸菌を、以下の方法で造成した。なお、lacZ及びlacY（以下、lacZYという。）、ならびに、wcaJ、wzx C、wcaK、wcaL及びwcaM（以下、wcaJ-wzx C-wcaKLMという。）は大腸菌ゲノム上でそれぞれオペロンを形成している。

[0156] 常法により調製した*Escherichia coli* W3110株のゲノムDNAを鋳型として、表1の「プライマーセット」で表される塩基配列からなるDNAをプライマーセットとしてPCRを行い、各DNA断片を増幅した。

[0157] [表1]

プライマーセット (配列番号)	増幅 DNA 断片	備考
17 及び 18	lacZ 上流 1	配列番号 15 及び 17 で表される塩基配列の5'末端の配列は相補的である
19 及び 20	lacY 下流 1	配列番号 16 及び 19 で表される塩基配列の5'末端の配列は相補的である
18 及び 21	lacZ 上流 2	配列番号 21 及び 22 で表される塩基配列の5'末端の配列は相補的である
20 及び 22	lacY 下流 2	

[0158] lacZ上流1およびlacZ上流2は、lacZ遺伝子の開始コドンから開始コドンの上流約1000bpまでの領域を含む。lacY下流1およびlacY下流2は、lacY遺伝子の終止コドン下流約50bpから約1000bpまでの領域を含む。

[0159] lacZ上流1、lacY下流1、およびcat-sacB断片を等モルの比率で混合したものを鋳型とし、配列番号18及び20で表される塩基配

列からなるDNAをプライマーセットに用いてPCRを行い、*lacZ*及び
*lacY*遺伝子周辺領域の配列に*cat-sacB*断片が挿入された配列か
らなるDNA（以下、*lacZY::cat-sacB*という。）断片を得
た。

[0160] *lacZ*上流2および*lacY*下流2を等モルの比率で混合したものを鋳
型とし、配列番号18及び20で表される塩基配列からなるDNAをプライ
マーセットに用いてPCRを行い、*lacZY*を含まず、*lacZ*上流と
*lacY*下流が直接連結した配列からなるDNA（以下、 $\Delta lacZY$ という
。）断片を得た。

[0161] *lacZY::cat-sacB*断片を、 λ リコンビナーゼをコードする
遺伝子を含むプラスミドpKD46 [Datsenko, K. A., Warner,
B. L., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, Vol. 97, 6640-6645 (2000)]を保持するW3110株に
、エレクトロポレーション法により導入し、クロラムフェニコール耐性かつ
シュクロース感受性を示した形質転換体（*lacZY*遺伝子が*lacZY*：
：*cat-sacB*に置換した形質転換体）を得た。

[0162] $\Delta lacZY$ 断片を、当該形質転換体にエレクトロポレーション法により
導入し、クロラムフェニコール感受性かつシュクロース耐性を示す形質転換
体（*lacZY::cat-sacB*が $\Delta lacZY$ に置換した形質転換体
）を得た。それらのうちからさらに、アンピシリン感受性を示す形質転換体
（pKD46が脱落した形質転換体）を得た。当該形質転換体をW3110
 $\Delta lacZY$ と命名した。

[0163] 同様に、W3110株のゲノムDNAを鋳型として、表2の「プライマー
セット」で表わされる塩基配列からなるDNAをプライマーセットとして用
いてPCRを行い、各増幅DNA断片を得た。

[0164]

[表2]

プライマーセット (配列番号)	増幅 DNA 断片	備考
23 及び 24	wcaJ 上流 1	配列番号 15 及び 23 で表される塩基配列の 5'末端の配列は相補的である
25 及び 26	wcaM 下流 1	配列番号 16 及び 25 で表される塩基配列の 5'末端の配列は相補的である
24 及び 27	wcaJ 上流 2	配列番号 27 及び 28 で表される塩基配列の 5'末端の配列は相補的である
26 及び 28	wcaM 下流 2	

[0165] w c a J 上流 1 および w c a J 上流 2 は、w c a J 遺伝子の開始コドンから開始コドン上流約 1 0 0 0 b p までの領域を含む。w c a M 下流 1 および w c a M 下流 2 は、w c a M 遺伝子の終止コドンから終止コドン下流約 1 0 0 0 b p までの領域を含む。

[0166] w c a J 上流 1、w c a M 下流 1 および c a t - s a c B 断片を等モルの比率で混合したものを鋳型とし、配列番号 2 4 及び 2 6 で表される塩基配列からなる DNA をプライマーセットに用いて P C R を行い、w c a J - w z x C - w c a K L M オペロン周辺領域の配列に c a t - s a c B 断片が挿入された配列からなる DNA (以下、w c a J - w z x C - w c a K L M : : c a t - s a c B という。)断片を得た。

[0167] w c a J 上流 2 および w c a M 下流 2 を等モルの比率で混合したものを鋳型とし、配列番号 2 4 及び 2 6 で表される塩基配列からなる DNA をプライマーセットに用いて P C R を行い、w c a J - w z x C - w c a K L M を含まず、w c a J 上流と w c a M 下流が直接連結した配列からなる DNA (以下、 Δ w c a J - w z x C - w c a K L M という。)断片を得た。

[0168] w c a J - w z x C - w c a K L M : : c a t - s a c B 断片を、上記で造成した W 3 1 1 0 Δ l a c Z Y 株に、エレクトロポレーション法により導入し、クロラムフェニコール耐性、かつシュクロース感受性を示した形質転換体 (w c a J - w z x C - w c a K L M が w c a J - w z x C - w c a K L M : : c a t - s a c B に置換した形質転換体)を得た。

[0169] $\Delta wcaJ-wzxC-wcaKLM$ 断片を、当該形質転換体にエレクトロポレーション法により導入し、クロラムフェニコール感受性かつシュクロース耐性を示す形質転換体 ($wcaJ-wzxC-wcaKLM::cat-sacB$ が $\Delta wcaJ-wzxC-wcaKLM$ に置換した形質転換体)を得た。さらに、アンピシリン感受性を示す形質転換体 ($pKD46$ が脱落した形質転換体)を得た。当該形質転換体をFUC株と命名した。

[0170] (2) $\alpha 1, 2$ -フコシルトランスフェラーゼ活性を有する微生物の造成
 $uspA$ プロモーター下に各種 $\alpha 1, 2$ -フコシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子を配置した、該遺伝子発現用プラスミドを有する大腸菌を、以下の方法で造成した。

[0171] <発現ベクターの造成>

常法により調製したW3110株のゲノムDNAを鋳型として、表3の「プライマーセット」で表される塩基配列からなるDNAをプライマーセットとして用いてPCRを行い、各増幅DNA断片を得た。

[0172] [表3]

プライマーセット (配列番号)	増幅 DNA 断片	備考
35 及び 36	<i>rcaA</i>	配列番号 36 及び 37 で表される塩基配列の5'末端の配列は相補的である
37 及び 38	<i>lacY</i>	

[0173] *rcaA*断片及び*lacY*断片を等モルの比率で混合したものを鋳型とし、配列番号35及び38で表される塩基配列からなるDNAをプライマーセットに用いてPCRを行い、2断片を連結したDNA (以下、*rcaA-lacY*という。)断片を得た。

[0174] 配列番号33及び34で表わされる塩基配列からなるDNAをプライマーセットとして、プラスミドpUAKQE31 (Appl. Environ. Microbiol. 2007, 73: 6378-6385)を鋳型にPCRを行い、約4.7 kbのベクター断片を得た。

このとき、配列番号33及び35、配列番号34及び38で表される塩基配

列は、それぞれの5'末端に相補的な配列を含む。

[0175] 上記で得られた *rcsA-lacY* 断片とベクター断片を、In-Fusion HD Cloning Kit (タカラバイオ社製) を用いて連結することにより、発現ベクター *pUAKQE-rcsA-lacY* を得た。

[0176] < α 1, 2-フコシルトランスフェラーゼ発現用プラスミドの造成>

表4の「プライマーセット」で表される塩基配列からなるDNAをプライマーセットとして、表4の「鋳型」に記載されたDNAを鋳型としてPCRを行い、各増幅DNA断片を得た。

[0177] [表4]

プライマーセット (配列番号)	鋳型	増幅 DNA 断片
40 及び 41	<i>Helicobacter mustelae</i> ATCC 43772 のゲノム DNA	HMFT (配列番号 7)
42 及び 43	配列番号 9 で表される DNA	FutC (配列番号 9)
44 及び 45	配列番号 11 で表される DNA	Te2FT (配列番号 11)

[0178] *Helicobacter mustelae* ATCC 43772 株のゲノムDNAは常法により調製した。

[0179] 配列番号 9 で表されるDNAは、配列番号 10 で表される *Helicobacter pylori* 26695 株由来 α 1, 2-フコシルトランスフェラーゼ FutC をコードする遺伝子の塩基配列であり、人工合成により調製した。

[0180] 配列番号 11 で表されるDNAは、配列番号 12 で表される *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 株由来 α 1, 2-フコシルトランスフェラーゼ Te2FT をコードする遺伝子の塩基配列を、大腸菌で発現させるためにコドン最適化したDNAであり、人工合成により調製した。

[0181] 上述の方法にて造成した発現ベクター *pUAKQE-rcsA-lacY*

を鋳型として、配列番号33及び39で表される塩基配列からなるDNAをプライマーセットとして用いてPCRを行い、約6.7kbのベクター断片を得た。配列番号40、42、44及び33、配列番号41、43、45及び39で表される塩基配列は、それぞれの5'末端に相補的な配列を含む。

[0182] 上記で得られた各種増幅DNA断片とベクター断片をIn-Fusion HD Cloning Kit（タカラバイオ社製）を用いて連結することにより、各種 $\alpha 1$, 2-フコシルトランスフェラーゼを発現するプラスミド、pHMFT、pFutC及びpTe2FTを造成した。

[0183] < $\alpha 1$, 2-フコシルトランスフェラーゼ発現用プラスミドを有する大腸菌の造成>

上記で得られた $\alpha 1$, 2-フコシルトランスフェラーゼ発現用プラスミド、pHMFT、pFutC及びpTe2FT、並びに、ベクターコントロールとしてpUAKQE-rcsA-lacYを用い、実施例1(1)で造成したFUC株を形質転換することで、各種プラスミドを有する大腸菌を造成し、それぞれFUC/pHMFT株、FUC/pFutC株、FUC/pTe2FT株及びFUC/Ctrl株と命名した。

[0184] (3) 2'FL及びLDFTの生産性を指標とする各種 $\alpha 1$, 2-フコシルトランスフェラーゼの評価

上記(2)で得られたFUC/pHMFT株、FUC/pFutC株、FUC/pTe2FT株及びFUC/Ctrl株について、2'FL及びLDFTの生産性を評価した。

[0185] 各菌株をそれぞれ100mg/Lのカナマイシンを含むLBプレート上で37℃にて16時間培養し、100mg/Lのカナマイシンを含むLB培地2mLが入った試験管に植菌して30℃で16時間、振盪培養した。その後、得られた培養液を100mg/Lのカナマイシンを含む生産培地〔グルコース30g/L、ラクトース水和物又は3FL10g/L、硫酸マグネシウム七水和物2g/L、リン酸水素二カリウム16g/L、リン酸二水素カリウム14g/L、硫酸アンモニウム2g/L、クエン酸1g/L、カザミ

ノ酸 5 g/L、チアミン塩酸塩 10 mg/L、硫酸第一鉄七水和物 50 mg/L、硫酸マンガン五水和物 10 mg/L（グルコース、ラクトースー水和物、3 FL 及び硫酸マグネシウム七水和物以外については、水酸化ナトリウム水溶液により pH 7.2 に調整した後オートクレーブした）（グルコース、ラクトースー水和物、3 FL 及び硫酸マグネシウム七水和物含有水溶液は別途調製した後オートクレーブし、それぞれ冷却後、混合した）] が 4 mL 入った大型試験管に 0.2 mL 植菌し、30℃で 29 時間振盪培養した。

[0186] このとき、2' FL の生産性を評価する場合にはラクトースー水和物を含む生産培地、LDFT の生産性を評価する場合には 3 FL を含む生産培地をそれぞれ使用した。培養終了後、培養液を遠心分離後に適宜希釈し、上清に含まれる 2' FL 又は LDFT を糖分析装置 ICS-5000 にて分析した。結果を表 5 に示す。

[0187] [表5]

菌株	2'FL [g/L]	LDFT [g/L]
FUC/pHMFT	8.25	0.22
FUC/pFutC	2.62	0.69
FUC/pTe2FT	1.28	N.D.
FUC/Ctrl	N.D.	N.D.

[0188] まず、ラクトース添加条件においては、いずれの $\alpha 1, 2$ -フコシルトランスフェラーゼ発現株も 2' FL 生産能を有することを確認した。このうち FUC/pHMFT 株は最も 2' FL 生産性が高かったことから、ラクトースからの LDFT 生産プロセスにおいて、HMFT は中間体 2' FL を供給するための有用な $\alpha 1, 2$ -フコシルトランスフェラーゼであることが示された。

[0189] 次に、3 FL 添加条件においては、FUC/pTe2FT 株は LDFT の生産が確認できなかったものの、FUC/pHMFT 株及び FUC/pFutC 株は微量ではあるが LDFT を生産できることが分かった。

[0190] [実施例 2] LDFT 生産に有用な $\alpha 1, 3$ -フコシルトランスフェラーゼ

の取得

ラクトース又は2' F Lへのフコース転移活性を指標として、L D F T生産に有用な α 1, 3-フコシルトランスフェラーゼをスクリーニングした。

[0191] (1) 評価用宿主株の造成

3 F L生産性を評価するため、配列番号14で表されるアミノ酸配列からなるW3110株由来のドラッグ：H+アンチポーター-1ファミリーに属する3 F Lのトランスポーター（以下、M d f Aという。）をコードする遺伝子発現用プラスミドを有する大腸菌を、以下の方法で造成した。

[0192] 配列番号31及び32で表される塩基配列からなるDNAをプライマーセットとして、常法により調製したW3110株のゲノムDNAを鋳型としてPCRを行い、m d f A断片を得た。配列番号29及び30で表わされる塩基配列からなるDNAをプライマーセットとして、プラスミドpMW118（ニッポンジーン社製）を鋳型にPCRを行い、約4.1 kbのベクター断片を得た。このとき、配列番号29及び31、配列番号30及び32で表される塩基配列は、それぞれの5'末端に相補的な配列を含む。

[0193] 上記で得られたm d f A断片とベクター断片を、In-Fusion HD Cloning Kit（タカラバイオ社製）を用いて連結することにより、M d f A発現プラスミドpMW118__m d f Aを得た。

[0194] 上記、発現プラスミドpMW118__m d f Aを用いて、実施例1（1）で造成したFUC株を形質転換することで、pMW118__m d f Aを有する大腸菌を造成し、FUCM株と命名した。

[0195] (2) α 1, 3-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する微生物の造成
u s p Aプロモーター下に各種 α 1, 3-フコシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子を配置した、該遺伝子発現用プラスミドを有する大腸菌を、以下の方法で造成した。

[0196] < α 1, 3-フコシルトランスフェラーゼ発現用プラスミドの造成>

表6の「プライマーセット」で表される塩基配列からなるDNAをプライマーセットとして、表6の「鋳型」に記載されたDNAを鋳型としてPCR

を行い、各増幅DNA断片を得た。

[0197] [表6]

プライマーセット (配列番号)	鋳型	増幅 DNA 断片
46 及び 47	<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285 のゲノム DNA	BfFucT (配列番号 5)
48 及び 49	配列番号 3 で表される DNA	HpFutA (配列番号 3)

[0198] *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 株のゲノムDNAは常法により調製した。

配列番号 3 で表されるDNAは、配列番号 4 で表される *Helicobacter pylori* 26695 株由来 $\alpha 1$, 3-フコシルトランスフェラーゼ HpFutA をコードする遺伝子の塩基配列であり、人工合成により調製した。

[0199] 続いて、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなる改変型 $\alpha 1$, 3-フコシルトランスフェラーゼ、cBrFucT をコードする遺伝子を、以下の方法で調製した。

表 7 の「プライマーセット」で表される塩基配列からなるDNAをプライマーセットとして、表 7 の「鋳型」に記載されたDNAを鋳型としてPCRを行い、各増幅DNA断片を得た。

[0200] [表7]

プライマーセット (配列番号)	鋳型	増幅 DNA 断片
50 及び 51	<i>Bacteroides reticulotermitis</i> JCM10512 株 のゲノム DNA	cBrFucT 上流
52 及び 53	配列番号 64 で表される塩基配列からなる DNA	cBrFucT 中流
54 及び 55	<i>Bacteroides reticulotermitis</i> JCM10512 株 のゲノム DNA	cBrFucT 下流

[0201] *Bacteroides reticulotermitis* JCM 1

0512株のゲノムDNAは常法により調製した。配列番号64で表される塩基配列からなるDNAは、*Bacteroides fragilis*由来 $\alpha 1$, 3-フコシルトランスフェラーゼ（以下、BfFucTという。）をコードする遺伝子の部分配列を、大腸菌で発現させるためにコドン最適化したDNAである。また、配列番号51及び52、配列番号53及び54で表される塩基配列は、それぞれの5'末端に相補的な配列を含む。

[0202] cBrFucT上流、cBrFucT中流及びcBrFucT下流の3断片を等モルの比率で混合したものを鋳型とし、配列番号50及び55で表される塩基配列からなるDNAをプライマーセットに用いてPCRを行い、3断片を連結したDNA（以下、cBrFucT断片という。）断片を得た。

[0203] 上述の方法にて造成した発現ベクターpUAKQE-rcsA-lacYを鋳型として、配列番号33及び39で表される塩基配列からなるDNAをプライマーセットとして用いてPCRを行い、約6.7kbのベクター断片を得た。配列番号46、48、50及び33、配列番号47、49、55及び39で表される塩基配列は、それぞれの5'末端に相補的な配列を含む。

[0204] 上記で得られた各種増幅DNA断片BfFucT、HpFutA又はcBrFucTとベクター断片をIn-Fusion HD Cloning Kit（タカラバイオ社製）を用いて連結することにより、各種 $\alpha 1$, 3-フコシルトランスフェラーゼを発現するプラスミド、pBfFucT、pHpFutA及びpcBrFucTを造成した。

[0205] < $\alpha 1$, 3-フコシルトランスフェラーゼ発現用プラスミドを有する大腸菌の造成>

上記で得られた $\alpha 1$, 3-フコシルトランスフェラーゼ発現用プラスミド、pBfFucT、pHpFutA及びpcBrFucT、並びに、ベクターコントロールとしてpUAKQE-rcsA-lacYを用い、上記（1）で造成したFUCM株を形質転換することで、各種プラスミドを有する大腸菌を造成し、それぞれFUCM/pBfFucT、FUCM/pHpFutA株、FUCM/pcBrFucT株及びFUCM/Ctrl株と命名し

た。

[0206] (3) 3FL及びLDF Tの生産性を指標とする各種 α 1, 3-フコシルトランスフェラーゼの評価

上記(2)で得たFUCM/pBfFucT、FUCM/pHpFutA株、FUCM/pcBrFucT株及びFUCM/Ctrl株について、3FL及びLDF Tの生産性を評価した。

[0207] 各菌株をそれぞれ100mg/Lのカナマイシン及び100mg/Lのアンピシリンを含むLBプレート上で37℃にて16時間培養し、100mg/Lのカナマイシン及び100mg/Lのアンピシリンを含むLB培地2mLが入った試験管に植菌して30℃で16時間、振盪培養した。

[0208] その後、得られた培養液を100mg/Lのカナマイシン及び100mg/Lのアンピシリンを含む生産培地〔グルコース30g/L、ラクトース一水和物又は2'FL10g/L、硫酸マグネシウム七水和物2g/L、リン酸水素二カリウム16g/L、リン酸二水素カリウム14g/L、硫酸アンモニウム2g/L、クエン酸1g/L、カザミノ酸5g/L、チアミン塩酸塩10mg/L、硫酸第一鉄七水和物50mg/L、硫酸マンガン五水和物10mg/L（グルコース、ラクトース一水和物、2FL及び硫酸マグネシウム七水和物以外については、水酸化ナトリウム水溶液によりpH7.2に調整した後オートクレーブした）（グルコース、ラクトース一水和物、2FL及び硫酸マグネシウム七水和物含有水溶液は別途調製した後オートクレーブし、それぞれ冷却後、混合した）〕が4mL入った大型試験管に0.2mL植菌し、30℃で29時間振盪培養した。FUCM株由来生産菌については、培養開始6時間後にIPTGを終濃度1mMとなるよう添加した。

[0209] このとき、3FLの生産性を評価する場合にはラクトース一水和物を含む生産培地、LDF Tの生産性を評価する場合には2'FLを含む生産培地をそれぞれ使用した。

[0210] 培養終了後、培養液を遠心分離後に適宜希釈し、上清に含まれる3FL又はLDF Tを糖分析装置ICS-5000にて分析した。結果を表8および

9に示す。

[0211] [表8]

菌株	3FL [g/L]	LDFT [g/L]
FUCM/pBfFucT	0.88	0.98
FUCM/pHpFutA	0.33	0.32
FUCM/Ctrl	N.D.	N.D.

[0212] [表9]

菌株	3FL [g/L]
FUCM/pcBrFucT	2.14
FUCM/pBfFucT	0.92
FUCM/Ctrl	N.D.

[0213] まず、ラクトース添加条件においては、いずれの $\alpha 1$, 3-フコシルトランスフェラーゼ発現株も3FL生産能を有することを確認した。このうちFUCM/pcBrFucT株は最も3FL生産性が高かったことから、ラクトースからのLDFT生産プロセスにおいて、cBrFucTは中間体3FLを供給するための有用な $\alpha 1$, 3フコシルトランスフェラーゼであることが示唆された。

[0214] 次に、2'FL添加条件においては、FUCM/pBfFucT株及びFUCM/pHpFucA株で3FLと概ね等量のLDFT生産が確認できた。この結果から、BfFucT及びHpFucAはラクトースと2'FLを基質として同等に利用できる可能性が示唆された。

[0215] [実施例3] LDFTの生産に用いる微生物の造成

実施例1及び2で用いた、 $\alpha 1$, 3-フコシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子及び $\alpha 1$, 2-フコシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子を共発現するプラスミドを有する大腸菌を、以下の方法で造成した。

[0216] 表10の「鋳型」に記載された、実施例1又は2で造成したプラスミドDNAを鋳型として、表10の「プライマーセット」で表される塩基配列から

なるDNAをプライマーセットとしてPCRを行い、各DNA断片を増幅した。

[0217] [表10]

プライマーセット (配列番号)	鋳型	増幅 DNA 断片	作製プラスミド
50 及び 56	pcBrFucT	cBrFucT (配列番号 1)	pcBrFucT-HMFT
57 及び 41	pHMFT	HMFT (配列番号 7)	
46 及び 58	pBfFucT	BfFucT (配列番号 5)	pBfFucT-HMFT
57 及び 41	pHMFT	HMFT (配列番号 7)	
48 及び 59	pHpFutA	HpFutA (配列番号 3)	pHpFutA-HMFT
57 及び 41	pHMFT	HMFT (配列番号 7)	
50 及び 60	pcBrFucT	cBrFucT (配列番号 1)	pcBrFucT-FutC
61 及び 43	pFutC	FutC (配列番号 9)	
50 及び 62	pcBrFucT	cBrFucT (配列番号 1)	pcBrFucT-Te2FT
63 及び 45	pTe2FT	Te2FT (配列番号 11)	

[0218] 配列番号 56 及び 57、配列番号 58 及び 57、配列番号 59 及び 57、配列番号 60 及び 61、配列番号 62 及び 63 で表される塩基配列は、それぞれの 5' 末端に相補的な配列を含む。

[0219] 各増幅DNA断片を、cBrFucT及びHMFT、BfFucT及びHMFT、HpFutA及びHMFT、cBrFucT及びFutC、又は、cBrFucT及びTe2FTの組合せで等モルの比率で混合したものを鋳型とし、配列番号 50 及び 41、46 及び 41、48 及び 41、50 及び 43、又は、50 及び 45 で表される塩基配列からなるDNAをそれぞれプライマーセットに用いてPCRを行い、各 α 1, 3-フコシルトランスフェラ

ーゼ断片と各 $\alpha 1$, 2-フコシルトランスフェラーゼ断片を連結したDNA断片、cBrFucT-HMFT、BfFucT-HMFT、HpFutA-HMFT、cBrFucT-FutC、及びcBrFucT-Te2FTを得た。

[0220] 実施例1(2)で造成した発現ベクターpUAKQE-rcsA-lacYを鋳型として、配列番号33及び39で表される塩基配列からなるDNAをプライマーセットとして用いてPCRを行い、約6.7kbのベクター断片を得た。配列番号50、46、48、及び33配列番号41、43、45、及び39で表される塩基配列は、それぞれの5'末端に相補的な配列を含む。

[0221] 上記で連結して得られた各DNA断片とベクター断片をIn-Fusion HD Cloning Kit(タカラバイオ社製)を用いて連結することにより、 $\alpha 1$, 3-フコシルトランスフェラーゼ及び $\alpha 1$, 2-フコシルトランスフェラーゼを共発現するプラスミド、pcBrFucT-HMFT、pBfFucT-HMFT、pHpFutA-HMFT、pcBrFucT-FutC及びpcBrFucT-Te2FTを得た。

[0222] 造成したプラスミドpcBrFucT-HMFT、pBfFucT-HMFT、pHpFutA-HMFT、pcBrFucT-FutC、pcBrFucT-Te2FT及び実施例1(2)で造成したpUAKQE-rcsA-lacYを用いて、実施例1(1)で造成したFUC株を形質転換することで、FUC/pcBrFucT-HMFT株、FUC/pBfFucT-HMFT株、FUC/pHpFutA-HMFT株、FUC/pcBrFucT-FutC株、FUC/pcBrFucT-Te2FT株及びFUC/Ctrl株をそれぞれ取得した。

[0223] [実施例4] LDFTの製造

実施例3で得られたFUC/pcBrFucT-HMFT株、FUC/pBfFucT-HMFT株、FUC/pHpFutA-HMFT株、FUC/pcBrFucT-FutC株、FUC/pcBrFucT-Te2FT

株及びFUC/Ctrl株について、ラクトースからのLDFTの生産性を評価した。

[0224] 各菌株をそれぞれ100mg/Lのカナマイシンを含むLBプレート上で37℃にて16時間培養し、100mg/Lのカナマイシンを含むLB培地2mLが入った試験管に植菌して30℃で15時間、振盪培養した。

[0225] その後、得られた培養液を100mg/Lのカナマイシンを含む生産培地〔グルコース30g/L、ラクトース一水和物10g/L、硫酸マグネシウム七水和物2g/L、リン酸水素二カリウム16g/L、リン酸二水素カリウム14g/L、硫酸アンモニウム2g/L、クエン酸1g/L、カザミノ酸5g/L、チアミン塩酸塩10mg/L、硫酸第一鉄七水和物50mg/L、硫酸マンガン五水和物10mg/L（グルコース、ラクトース一水和物及び硫酸マグネシウム七水和物以外については、水酸化ナトリウム水溶液によりpH7.2に調整した後オートクレーブした）（グルコース、ラクトース一水和物及び硫酸マグネシウム七水和物含有水溶液は別途調製した後オートクレーブし、それぞれ冷却後、混合した）〕が4mL入った大型試験管に0.2mL植菌し、30℃で29時間振盪培養した。

[0226] 培養終了後、培養液を遠心分離後に適宜希釈し、上清に含まれるLDFT、2'FL又は3FLを糖分析装置ICS-5000にて分析した。結果を表11に示す。

[0227] [表11]

菌株	LDFT [g/L]	2'FL [g/L]	3FL [g/L]
FUC/pcBrFucT-HMFT	3.87	0.85	1.38
FUC/pBfFucT-HMFT	0.57	4.43	0.20
FUC/pHpFutA-HMFT	0.79	2.32	0.20
FUC/pcBrFucT-FutC	0.64	0	2.45
FUC/pcBrFucT-Te2FT	0.78	0.14	2.68
FUC/Ctrl	N.D.	N.D.	N.D.

[0228] 表11に示すように、FUC/pcBrFucT-HMFT株のみ、LD

F Tを多量に蓄積していることが分かった。以上より、 $\alpha 1$, 2-フコシルトランスフェラーゼHMF T及び $\alpha 1$, 3-フコシルトランスフェラーゼcBrFu c Tを組み合わせることで、LDF Tを高生産できることが示された。

[0229] [実施例5] 高純度LDF T含有水溶液の調製

実施例2で造成したLDF T生産能を有する大腸菌を培地に培養し得られた培養液を、硫酸を用いてpHを3.0に調整し、70℃で40分間加熱した。続いて、遠心分離(4℃、6000G、7000rpm、10分)により菌体を除去し、上清を回収した。

[0230] 前記上清を、陽イオン交換樹脂を充填したカラム、陰イオン交換樹脂を充填したカラムの順に通液し、LDF Tを含む画分を回収した。このとき、陽イオン交換樹脂としてダイヤイオンUBK550(H⁺形)(三菱ケミカル社製)、陰イオン交換樹脂としてA111S(OH⁻形)(Prolite社製)を使用した。

[0231] UF膜モジュール(SIP-0013、旭化成社製)を用いて得られた画分を濾過し、得られた濾液をエバポレータにて濃縮することで、LDF Tの濃度400g/L、HPLC純度80.5%(面積%)のLDF T含有水溶液を得た。

[0232] [実施例6] LDF Tの結晶性固体の取得

実施例4で得たLDF T含有水溶液を用いて、凍結乾燥法によりLDF T粉末を得た。得られたLDF T粉末に、50%エタノール水溶液を、粉末が溶けなくなるまで添加した。4℃条件下で1ヵ月間静置し、結晶性の固体を析出させた。同様の手順で、50%エタノール水溶液におけるエタノール濃度を60%、80%または100%とした場合にも、結晶性の固体が析出できた。

[0233] [実施例7] 貧溶媒添加法によるLDF T結晶の製造

実施例4で得たLDF T溶液25mLを40℃に維持しつつ攪拌し、貧溶媒として30mLの100%エタノールを滴下添加した。続いて実施例5で

得た結晶性固体を種晶として添加し、結晶を析出させた。当該結晶を室温下で72時間攪拌し熟成させた後、4℃条件下でさらに24時間攪拌した。その後、結晶性スラリーをバスケット型遠心分離機（コクサン社製）にて遠心分離し、8.7gの湿晶を得た。得られた湿晶を真空条件下30℃にて減圧乾燥することにより、5.2gの結晶を得た。当該結晶性固体のLDFT含量は85.5%（HPLC純度92.4%）であった。当該結晶を糖分析装置ICS-6000にて分析した際のクロマトグラムを図2に示す。

[0234] 続いて、当該結晶の構造を決定するために、単結晶X線構造解析を実施した。得られた回折データの解析は、ソフトウェア（CrysAlisPro、リガク）を用いて積分および吸収補正を行った後、SHELXT（Acta Crystallogr. Sect. A 2015, 71, 3–8）により初期構造を取得し、SHELXL（Acta Crystallogr. Sect. C 2015, 71, 3–8）を用いて精密化した。結果を表12に、またORTEP図を図3に示す。

[0235]

[表12]

結晶系	単斜
Empirical formula	$C_{24}H_{56}O_{26}$
$a(\text{\AA})$	8.5351(10)
$b(\text{\AA})$	17.9853(3)
$c(\text{\AA})$	11.9099(10)
$\beta(^{\circ})$	107.573(10)
$V(\text{\AA}^3)$	1742.93(4)
測定温度(K)	100.00(10)
Z	2
空間群	$P2_1$
R _{int}	0.0550
R ₁	0.0403
wR ₂	0.0952
GoF	1.030
Flack パラメータ (Parsons)	-0.029(68)

[0236] 上記解析の結果、当該結晶がL D F Tの結晶構造であり、単位格子内に7 . 2個の水分子を有するL D F T · 7 . 2水和物であることが確認された。続いて、当該結晶の粉末X線回折測定を実施した。回折結果より、相対強度比 (I/I_0) が20以上であったピークの回折角を表13に示す。表中、「 2θ 」は回折角 ($2\theta^{\circ}$) を、「相対強度」は、相対強度比 (I/I_0) を示す。

[0237]

[表13]

2 θ	相対強度	2 θ	相対強度	2 θ	相対強度
7.7	27	18.7	73	26.1	36
9.1	59	19.1	45	26.9	46
9.7	22	19.5	49	27.7	34
10.7	30	20.0	64	28.5	51
11.1	100	21.1	57	29.1	36
11.8	43	21.4	53	31.5	34
12.2	48	21.7	72	32.9	33
12.5	36	22.6	64	33.3	28
14.5	60	22.8	72	35.0	29
14.8	46	23.0	66	36.7	31
15.8	96	23.4	48	37.5	29
16.6	72	24.6	31	38.1	31
18.4	92	25.4	47		

[0238] 表13に示す結果から、得られたLDFT結晶は、日本国特許第4347042号公報に記載されたLDFT結晶と同一であることを確認した。

[0239] 本発明を詳細にまた特定の実施態様を参照して説明したが、本発明の精神と範囲を逸脱することなく様々な変更や修正を加え得ることは、当業者にとって明らかである。なお、本出願は、2022年3月25日付けで出願された日本特許出願（特願2022-050799）に基づいており、その全体が引用により援用される。また、ここに引用されるすべての参照は全体として取り込まれる。

請求の範囲

〔請求項1〕 下記〔1〕～〔3〕のいずれか1に記載の蛋白質及び下記〔4〕～〔6〕のいずれか1に記載の蛋白質の活性が増強され、かつ、親株に比べてラクトジフコテトラオース（L D F T）の生産性が向上した微生物。

〔1〕 配列番号8で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質。

〔2〕 配列番号8で表されるアミノ酸配列において、1～20個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ α 1, 2-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する変異蛋白質。

〔3〕 配列番号8で表されるアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ α 1, 2-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する相同蛋白質。

〔4〕 配列番号2で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質。

〔5〕 配列番号2で表されるアミノ酸配列において、1～20個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ α 1, 3-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する変異蛋白質。

〔6〕 配列番号2で表されるアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ α 1, 3-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する相同蛋白質。

〔請求項2〕 請求項1に記載の微生物を調製すること、及び当該微生物を用いて培養物中にL D F Tを生成することを含む、L D F Tの製造方法。

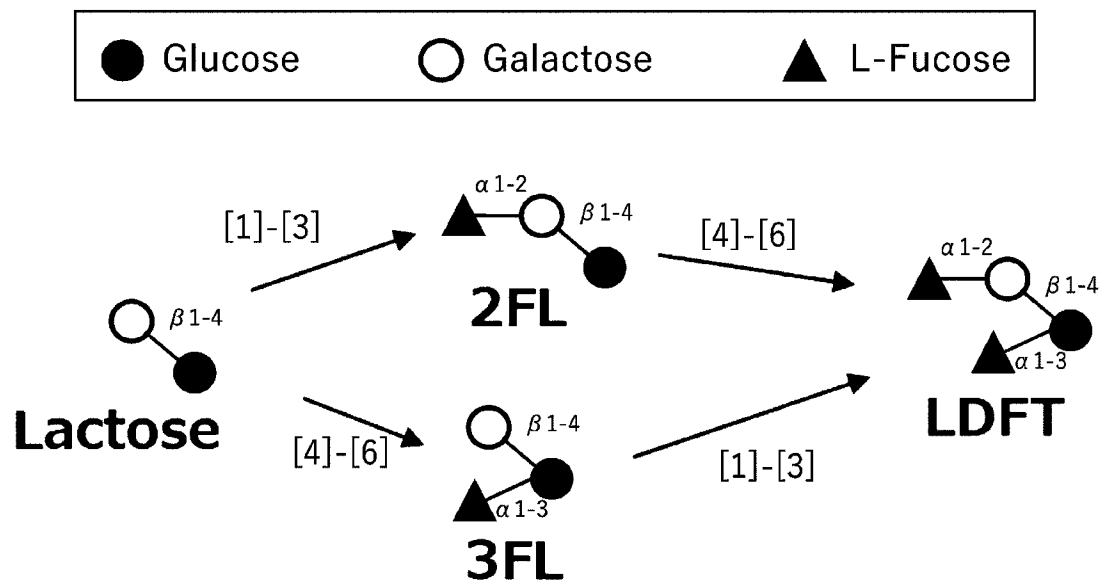
〔請求項3〕 下記（i）～（iii）の工程を含む、請求項1に記載の微生物を培養し得た培養物からのL D F Tの結晶の製造方法。

（i）前記培養物を遠心分離して菌体が除去された上清を得る工程

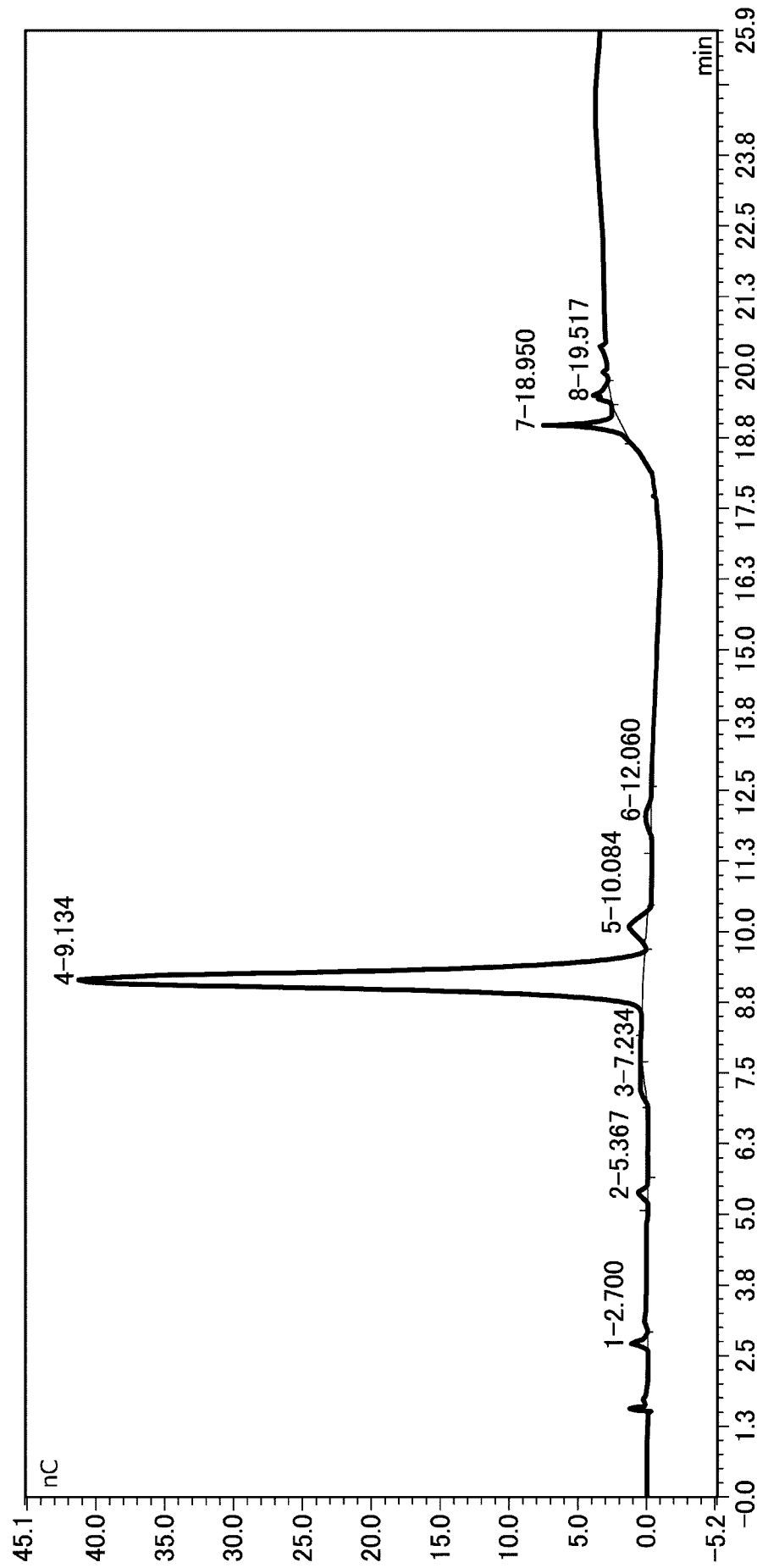
（ii）工程（i）で得られた上清を陽イオン交換および陰イオン交換して、上清からイオンが除去された溶液を得る工程

（iii）工程（ii）で得られた溶液からL D F Tの結晶を得る工程

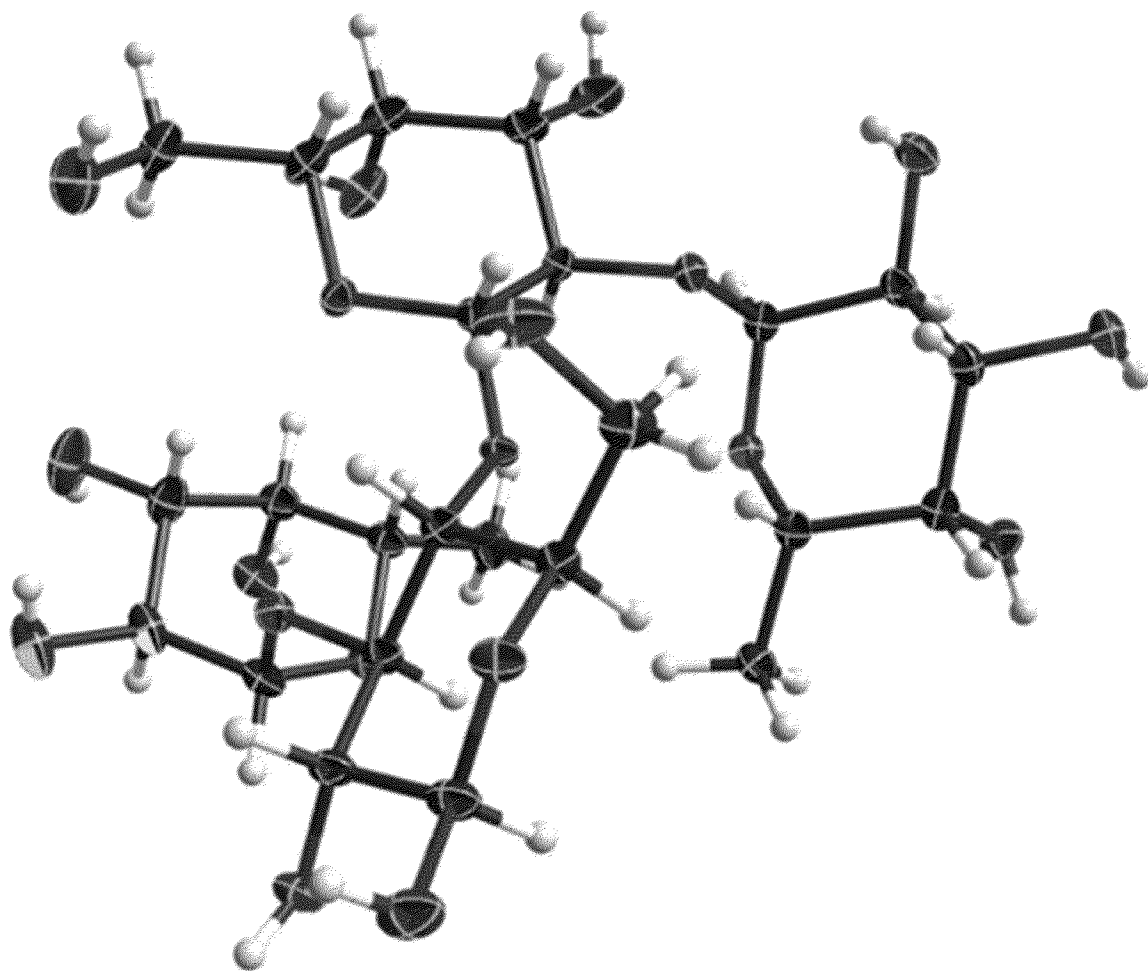
[図1]



[図2]



[図3]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/012041

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P 19/00(2006.01)i; *C12N 1/15*(2006.01)i; *C12N 1/19*(2006.01)i; *C12N 1/21*(2006.01)i; *C12N 15/31*(2006.01)i;
C12N 15/54(2006.01)i

FI: C12N1/21; C12N1/15; C12N1/19; C12N15/31; C12N15/54; C12P19/00 ZNA

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)

C12P19/00; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N15/00-15/90

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 1971-2023
 Registered utility model specifications of Japan 1996-2023
 Published registered utility model applications of Japan 1994-2023

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ZHANG, A. et al. Microbial production of human milk oligosaccharide lactodifucotetraose. METABOLIC ENGINEERING. 01 April 2021, vol. 66, pp. 12-20 p. 14, right column, the last paragraph to p. 15, left column, 1st paragraph, fig. 1, 6, etc.	1-3
Y	JP 2015-529453 A (GLYCOSYN LLC) 08 October 2015 (2015-10-08) in particular, SEQ ID NO: 7	1-3
Y	JP 2022-512574 A (ZIMITECH, INC.) 07 February 2022 (2022-02-07) in particular, SEQ ID NO: 55	1-3
Y	WO 2022/034073 A1 (INBIOSE N.V.) 17 February 2022 (2022-02-17) in particular, SEQ ID NO: 94	1-3
Y	Database UniProtKB [online]. Accession No. W4UPQ1. internet: <URL: https://www.uniprot.org/uniprot/W4UPQ1>. 19 March 2014 uploaded, [retrieved on 13 April 2022] in particular, column "Sequence"	1-3



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

31 May 2023

Date of mailing of the international search report

13 June 2023

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/JP2023/012041**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2017-506065 A (JENNEWEIN BIOTECHNOLOGIE GMBH) 02 March 2017 (2017-03-02) claims 1, 13	3
P, Y	WO 2022/168992 A1 (KYOWA HAKKO BIO CO LTD) 11 August 2022 (2022-08-11) in particular, SEQ ID NO: 4	1-3
A	JP 2017-527311 A (GLYCOSYN LLC) 21 September 2017 (2017-09-21) entire text	1-3
A	US 2006/0073542 A1 (BAYER, R. J., MENDOZA, G.) 06 April 2006 (2006-04-06) entire text	1-3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/012041

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:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

"The form of Annex C/ST.25 text file" above shall read as "the form of ST.26."

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2023/012041

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)
JP	2015-529453	A	08 October 2015	US	2014/0031541	A1
				in particular, SEQ ID NO: 7		
				WO	2014/018596	A2
				EP	2877574	A2
JP	2022-512574	A	07 February 2022	US	2022/0064686	A1
				in particular, SEQ ID NO: 55		
				WO	2020/072617	A1
				EP	3861123	A1
				CN	113056562	A
				KR	10-2021-0095128	A
WO	2022/034073	A1	17 February 2022	EP	3954778	A1
				KR	10-2023-0048380	A
				CN	116096911	A
JP	2017-506065	A	02 March 2017	US	2016/0333042	A1
				WO	2015/106943	A1
				claims 1, 13		
				EP	2896628	A1
				CN	106132977	A
				KR	10-2016-0132009	A
WO	2022/168992	A1	11 August 2022	(Family: none)		
JP	2017-527311	A	21 September 2017	US	2017/0306373	A1
				entire text		
				WO	2016/040531	A1
				EP	3191499	A1
US	2006/0073542	A1	06 April 2006	WO	2003/093448	A2
				EP	1504023	A2

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12P 19/00(2006.01)i; C12N 1/15(2006.01)i; C12N 1/19(2006.01)i; C12N 1/21(2006.01)i; C12N 15/31(2006.01)i; C12N 15/54(2006.01)i FI: C12N1/21; C12N1/15; C12N1/19; C12N15/31; C12N15/54; C12P19/00 ZNA		
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）） C12P19/00; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N15/00-15/90		
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 1971-2023年 日本国実用新案登録公報 1996-2023年 日本国登録実用新案公報 1994-2023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); CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOISIS (STN); GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	ZHANG A., et al., Microbial production of human milk oligosaccharide lactodifucotetraose, METABOLIC ENGINEERING, 2021.04.01, Vol. 66, pp. 12-20 p. 14右欄最終段落-p. 15左欄第1段落, Fig. 1及び6等	1-3
Y	JP 2015-529453 A (グリコシン リミテッド ライアビリティー カンパニー) 08.10.2015 (2015-10-08) 特に配列番号7	1-3
Y	JP 2022-512574 A (ジミテック, インコーポレーテッド) 07.02.2022 (2022-02-07) 特に配列番号55	1-3
Y	WO 2022/034073 A1 (INBIOSE N.V.) 17.02.2022 (2022-02-17) 特にSEQ ID NO: 94	1-3
Y	Database UniProtKB [online], Accession No. W4UPQ1, インターネット: <URL: https://www.uniprot.org/uniprot/W4UPQ1 >, 2014-03-19 uploaded, [retrieved on 2022-04-13] 特に「Sequence」欄	1-3
☒ 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、一般的な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 31.05.2023		国際調査報告の発送日 13.06.2023
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） 鈴木 崇之 4B 4152 電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2017-506065 A (イエンネワイン バイオテクノロジー ゲーエムペーハー) 02.03.2017 (2017 - 03 - 02) 請求項 1 及び 1 3	3
P, Y	WO 2022/168992 A1 (協和発酵バイオ株式会社) 11.08.2022 (2022 - 08 - 11) 特に配列番号 4	1-3
A	JP 2017-527311 A (グリコシン リミテッド ライアビリティー カンパニー) 21.09.2017 (2017 - 09 - 21) 全文	1-3
A	US 2006/0073542 A1 (BAYER R. J., MENDOZA G.) 06.04.2006 (2006 - 04 - 06) 全文	1-3

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

☒ 附属書C/ST.25テキストファイル形式

☐ 紙形式又はイメージファイル形式

b. ☐ 国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表

c. ☐ 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表

☐ 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))

☐ 紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)

2. ☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:

上記「附属書C/ST.25 テキストファイル形式」は「ST.26 形式」と読み替える。

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/JP2023/012041

引用文献			公表日	パテントファミリー文献		公表日
JP	2015-529453	A	08.10.2015	US	2014/0031541	A1
				特にSEQ ID NO 7		
				WO	2014/018596	A2
				EP	2877574	A2
JP	2022-512574	A	07.02.2022	US	2022/0064686	A1
				特にSEQ ID NO 55		
				WO	2020/072617	A1
				EP	3861123	A1
				CN	113056562	A
				KR	10-2021-0095128	A
WO	2022/034073	A1	17.02.2022	EP	3954778	A1
				KR	10-2023-0048380	A
				CN	116096911	A
JP	2017-506065	A	02.03.2017	US	2016/0333042	A1
				WO	2015/106943	A1
				Claims 1 and 13		
				EP	2896628	A1
				CN	106132977	A
				KR	10-2016-0132009	A
WO	2022/168992	A1	11.08.2022	(ファミリーなし)		
JP	2017-527311	A	21.09.2017	US	2017/0306373	A1
				全文		
				WO	2016/040531	A1
				EP	3191499	A1
US	2006/0073542	A1	06.04.2006	WO	2003/093448	A2
				EP	1504023	A2