

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7646119号
(P7646119)

(45)発行日 令和7年3月17日(2025.3.17)

(24)登録日 令和7年3月7日(2025.3.7)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	Z N A
C 1 2 P	7/42 (2006.01)	C 1 2 P	7/42	
C 1 2 P	7/44 (2006.01)	C 1 2 P	7/44	
C 1 2 N	9/02 (2006.01)	C 1 2 N	9/02	
C 1 2 N	15/53 (2006.01)	C 1 2 N	15/53	

請求項の数 4 (全69頁)

(21)出願番号	特願2020-546516(P2020-546516)	(73)特許権者	000003159 東レ株式会社 東京都中央区日本橋室町2丁目1番1号
(86)(22)出願日	令和2年5月8日(2020.5.8)	(74)代理人	110001656 弁理士法人谷川国際特許事務所
(86)国際出願番号	PCT/JP2020/018665	(72)発明者	磯部 匡平 神奈川県鎌倉市手広6丁目10番1号 東レ株式会社 基礎研究センター内
(87)国際公開番号	WO2020/230719	(72)発明者	河村 健司 神奈川県鎌倉市手広6丁目10番1号 東レ株式会社 基礎研究センター内
(87)国際公開日	令和2年11月19日(2020.11.19)	(72)発明者	山田 勝成 神奈川県鎌倉市手広6丁目10番1号 東レ株式会社 基礎研究センター内
審査請求日	令和5年4月25日(2023.4.25)	審査官	野村 英雄
(31)優先権主張番号	特願2019-89771(P2019-89771)		
(32)優先日	令和1年5月10日(2019.5.10)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)		

最終頁に続く

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

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

3 - ヒドロキシアジピン酸、 - ヒドロムコン酸および/またはアジピン酸を製造する能力を有する遺伝子改変微生物であって、ピルビン酸キナーゼの機能が欠損し、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼの活性、アセチル - C o A およびスクシニル - C o A から 3 - オキサジピル - C o A および補酵素 A を生成する反応を触媒する酵素の活性および 3 - オキサジピル - C o A を還元して 3 - ヒドロキシアジピル - C o A を生成する反応を触媒する酵素の活性が強化され、以下の (i) ~ (i i i) のいずれかの酵素の活性が強化された、遺伝子改変微生物。

(i) 3 - ヒドロキシアジピル - C o A から 3 - ヒドロキシアジピン酸を生成する反応を触媒する酵素

10

(i i) 3 - ヒドロキシアジピル - C o A から 2 , 3 - デヒドロアジピル - C o A を生成する反応を触媒する酵素および 2 , 3 - デヒドロアジピル - C o A から - ヒドロムコン酸を生成する反応を触媒する酵素

(i i i) 3 - ヒドロキシアジピル - C o A から 2 , 3 - デヒドロアジピル - C o A を生成する反応を触媒する酵素、 2 , 3 - デヒドロアジピル - C o A からアジピル - C o A を生成する反応を触媒する酵素およびアジピル - C o A からアジピン酸を生成する反応を触媒する酵素

【請求項2】

さらに E C 2 . 7 . 1 . 1 9 9 に分類される、プロテイン - N p i - ホスホヒスチジン

20

- D - グルコースホストランスフェラーゼの機能が欠損した、請求項 1 に記載の遺伝子改変微生物。

【請求項 3】

前記 3 - オキソアジピル - C o A を還元して 3 - ヒドロキシアジピル - C o A を生成する反応を触媒する酵素が、以下 (a) ~ (c) のいずれかである請求項 1 または 2 に記載の遺伝子改変微生物。

(a) 配列番号 1 ~ 7 のいずれかのアミノ酸配列からなるポリペプチド

(b) 配列番号 1 ~ 7 のいずれかのアミノ酸配列において、1 もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ 3 - オキソアジピル - C o A を還元して 3 - ヒドロキシアジピル - C o A を生成する反応を触媒する酵素活性を有するポリペプチド

10

(c) 配列番号 1 ~ 7 のいずれかのアミノ酸配列に対して 90 % 以上の配列同一性を有し、かつ 3 - オキソアジピル - C o A を還元して 3 - ヒドロキシアジピル - C o A を生成する反応を触媒する酵素活性を有するポリペプチド

【請求項 4】

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

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

20

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

【背景技術】

【0002】

3 - ヒドロキシアジピン酸 (I U P A C 名 : 3 - h y d r o x y h e x a n e d i o i c a c i d) および - ヒドロムコン酸 (I U P A C 名 : (E) - h e x - 2 - e n e d i o i c a c i d) は炭素数 6 のジカルボン酸である。これらは多価アルコールと重合することでポリエステルとして、また多価アミンと重合することでポリアミドの原料として用いることができる。また、これらの末端にアンモニアを付加してラクタム化した化合物もポリアミドの原料として用いることができる。

30

【0003】

微生物を利用した 3 - ヒドロキシアジピン酸または - ヒドロムコン酸の製造に関連して以下の文献が知られている。

【0004】

特許文献 1 には、代謝経路を改変した微生物を用いた 1 , 3 - ブタジエンの製造方法が記載されており、当該文献中では、アセチル - C o A およびスクシニル - C o A から 1 , 3 - ブタジエンが生合成される代謝経路における代謝中間体として 3 - ヒドロキシアジピン酸 (3 - ヒドロキシアジベート) が記載されている。

【0005】

40

特許文献 2 には、代謝経路を改変した微生物を用いたムコン酸の製造方法が記載されており、当該文献中では、アセチル - C o A およびスクシニル - C o A から t r a n s , t r a n s - ムコン酸が生合成される代謝経路における代謝中間体として - ヒドロムコン酸 (2 , 3 - デヒドロアジベート) が記載されている。

【0006】

特許文献 3、4 には、非天然の微生物を用いたアジピン酸やヘキサメチレンジアミン (H M D A) の製造方法が記載されており、当該文献中で、これらの物質は、アセチル - C o A およびスクシニル - C o A から 3 - オキソアジピル - C o A が合成される反応が生合成経路に含まれる点で共通しているが、3 - オキソアジピル - C o A 以降の生合成経路は別々であると記載されている。さらに、特許文献 3 では、HMDA の製造において、増殖

50

と共役したHMDAの形成を改善するための追加的な遺伝子欠失としてピルビン酸キナーゼが記載されているが、ピルビン酸キナーゼの欠損が、アジピン酸の生産性向上に関するとの記載はない。

【0007】

また、特許文献1から4に記載された生合成経路では、いずれも3-オキソアジピル-COAを3-ヒドロキシアジピル-COAへと還元する酵素反応を経由するとの記載がある。

【0008】

特許文献5および特許文献6には、セラチア属微生物を用いた3-ヒドロキシアジピン酸と、 α -ヒドロムコン酸の製造方法がそれぞれ記載されている。当該文献中には、特に、アセチル-COAおよびスクシニル-COAより3-オキソアジピル-COAを生じる反応を触媒するアシルトランスフェラーゼの活性を強化することにより、3-ヒドロキシアジピン酸と α -ヒドロムコン酸の生産効率を向上させることが可能であることが開示されているが、ピルビン酸キナーゼに関する記載はない。

10

【0009】

また、特許文献7には、インシリコ分析に基づく微生物の改良方法が開示されており、大腸菌のピルビン酸キナーゼおよびホストランスフェラーゼ系酵素をコードする遺伝子であるpykF、pykA、ptsGを欠失させ、嫌気条件下で培養することにより、コハク酸の生産性が向上することが開示されている。

20

【先行技術文献】

【特許文献】

【0010】

【文献】特表2013-535203号公報

【文献】米国特許出願公開第2011/0124911A1号明細書

【文献】特開2015-146810号公報

【文献】特表2011-515111号公報

【文献】国際公開第2017/209102号

【文献】国際公開第2017/209103号

【文献】特表2008-527991号公報

【発明の概要】

30

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

特許文献1または2には、微生物内で3-ヒドロキシアジピン酸または α -ヒドロムコン酸が生成しうる代謝経路の記載はあるが、代謝を3-ヒドロキシアジピン酸または α -ヒドロムコン酸で止め、培養液中に分泌させるという記載はない。また、特許文献1から4に記載された3-オキソアジピル-COAを3-ヒドロキシアジピル-COAへと還元する反応を触媒する酵素をコードする核酸を導入して代謝経路を改変した微生物を用いた場合に、実際に3-ヒドロキシアジピン酸または α -ヒドロムコン酸が製造できるかどうかの検証はなされていない。特許文献3から6には、3-ヒドロキシアジピン酸、 α -ヒドロムコン酸あるいはアジピン酸の生産性の向上に関与する酵素遺伝子の発現強化について開示されているが、発現を強化する酵素遺伝子はいずれも生合成経路においてアセチル-COAおよびスクシニル-COAより下流の反応に限られ、それらより上流の代謝経路における酵素活性の強化についての記載はない。

40

【0012】

そこで本発明では、3-オキソアジピル-COAを基質とした還元反応において優れた活性を示す酵素をコードする核酸を導入、または当該酵素の発現を増強して当該酵素活性を強化した遺伝子改変微生物を基に、さらに上記の上流の代謝経路を改変して、3-ヒドロキシアジピン酸、 α -ヒドロムコン酸および/またはアジピン酸を高い収率で製造するための遺伝子改変微生物及び当該改変微生物を用いた物質製造方法を提供することを目的とする。

50

【課題を解決するための手段】**【0013】**

本発明者らは上記目的を達成するため鋭意検討した結果、3-ヒドロキシアジピン酸、
-ヒドロムコン酸および/またはアジピン酸を製造する能力を有し、かつピルビン酸キナーゼの機能が欠損し、かつホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ、および3-オキソアジピル-C o Aを還元して3-ヒドロキシアジピル-C o Aを生成する反応を触媒する酵素の活性が強化された遺伝子改変微生物が3-ヒドロキシアジピン酸、
-ヒドロムコン酸および/またはアジピン酸の優れた生産能を持つことを見出し、本発明を完成させるに至った。

【0014】

すなわち、本発明は以下のものを提供する。

(1) 3-ヒドロキシアジピン酸、
-ヒドロムコン酸および/またはアジピン酸を製造する能力を有し、かつピルビン酸キナーゼの機能が欠損し、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼの活性および3-オキソアジピル-C o Aを還元して3-ヒドロキシアジピル-C o Aを生成する反応を触媒する酵素の活性が強化された、遺伝子改変微生物。

(2) さらにホスホトランスフェラーゼ系酵素の機能が欠損した、(1)に記載の遺伝子改変微生物。

(3) 前記3-オキソアジピル-C o Aを還元して3-ヒドロキシアジピル-C o Aを生成する反応を触媒する酵素が、以下(a)~(c)のいずれかである(1)または(2)に記載の遺伝子改変微生物。

(a) 配列番号1~7のいずれかのアミノ酸配列からなるポリペプチド

(b) 配列番号1~7のいずれかのアミノ酸配列において、1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ3-オキソアジピル-C o Aを還元して3-ヒドロキシアジピル-C o Aを生成する反応を触媒する酵素活性を有するポリペプチド

(c) 配列番号1~7のいずれかのアミノ酸配列に対して70%以上の配列同一性を有し、かつ3-オキソアジピル-C o Aを還元して3-ヒドロキシアジピル-C o Aを生成する反応を触媒する酵素活性を有するポリペプチド

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

【発明の効果】**【0015】**

3-ヒドロキシアジピン酸、
-ヒドロムコン酸および/またはアジピン酸を製造する能力を有し、かつピルビン酸キナーゼの機能が欠損し、かつホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼの活性および3-オキソアジピル-C o Aを還元して3-ヒドロキシアジピル-C o Aを生成する反応を触媒する酵素の活性が強化された遺伝子改変微生物は、当該遺伝子を改変していない親株の微生物と比較して、3-ヒドロキシアジピン酸、
-ヒドロムコン酸および/またはアジピン酸を高い収率で生産することができる。

【発明を実施するための形態】**【0016】**

本発明では、3-ヒドロキシアジピン酸、
-ヒドロムコン酸および/またはアジピン酸を製造する能力を有する微生物において、当該微生物のピルビン酸キナーゼの機能を欠損させ、かつホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼの活性および3-オキソアジピル-C o Aを還元して3-ヒドロキシアジピル-C o Aを生成する反応を触媒する酵素の活性を強化させると、3-ヒドロキシアジピン酸、
-ヒドロムコン酸および/またはアジピン酸を高い収率で製造できることを見出した。

【0017】

以下、本明細書中では3-オキソアジピル-C o Aを還元して3-ヒドロキシアジピル-C o Aを生成する反応を触媒する酵素を「3-オキソアジピル-C o Aレダクターゼ」と記載する場合がある。また、本明細書ではホスホエノールピルビン酸をPEP、3-ヒ

10

20

30

40

50

ドロキシアジピン酸を3HA、 β -ヒドロムコン酸をHMA、アジピン酸をADAと略すことがある。

【0018】

本発明でホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼの活性および3-オキソアジピル-COAを還元して3-ヒドロキシアジピル-COAを生成する反応を触媒する酵素の活性を強化するとは、これらのポリペプチドをコードする核酸を宿主微生物の菌体外から菌体内へと導入したり、当該ポリペプチドをコードする核酸のコピー数を増加させたり、当該ポリペプチドのコーディング領域上流のプロモーター領域やリボソーム結合配列を改変させたりする方法などが挙げられる。これらの方法は単独で行ってもよいし、組み合わせてもよい。核酸を導入する方法は特に限定されず、微生物内で自律複製可能な発現ベクターに当該核酸を組み込み宿主微生物に導入する方法や、微生物のゲノムに当該核酸を組み込む方法などを用いることができる。

10

【0019】

導入する核酸は1種類でも複数種類でもよい。また核酸の導入と発現の増強を組み合わせてもよい。

【0020】

本発明で発現させるポリペプチドをコードする核酸を発現ベクターまたは宿主微生物ゲノムに組み込む場合、当該発現ベクターまたはゲノム組み込み用核酸はプロモーター、リボソーム結合配列、発現させるポリペプチドをコードする核酸、転写終結配列により構成されていることが好ましい。また、プロモーター活性を制御する遺伝子が含まれていてもよい。

20

【0021】

本発明で用いるプロモーターは、宿主微生物内で酵素を発現させられるものであれば特に限定されないが、例えばgapプロモーター、trpプロモーター、lacプロモーター、tacプロモーター、T7プロモーターなどが挙げられる。

【0022】

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

30

【0023】

本発明でゲノム組み込み用核酸を用いて核酸の導入や、ポリペプチドの発現の増強を行う場合は、部位特異的相同組換えを用いて導入する。部位相同組換えの方法は特に限定されないが、例えばRedレコンビナーゼおよびFLPレコンビナーゼを用いる方法(Proc Natl Acad Sci USA, 2000 Jun 6; 97(12): 6640-6645.)、RedレコンビナーゼおよびsacB遺伝子を用いる方法(Biosci Biotechnol Biochem, 2007 Dec; 71(12): 2905-11.)が挙げられる。

【0024】

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

40

【0025】

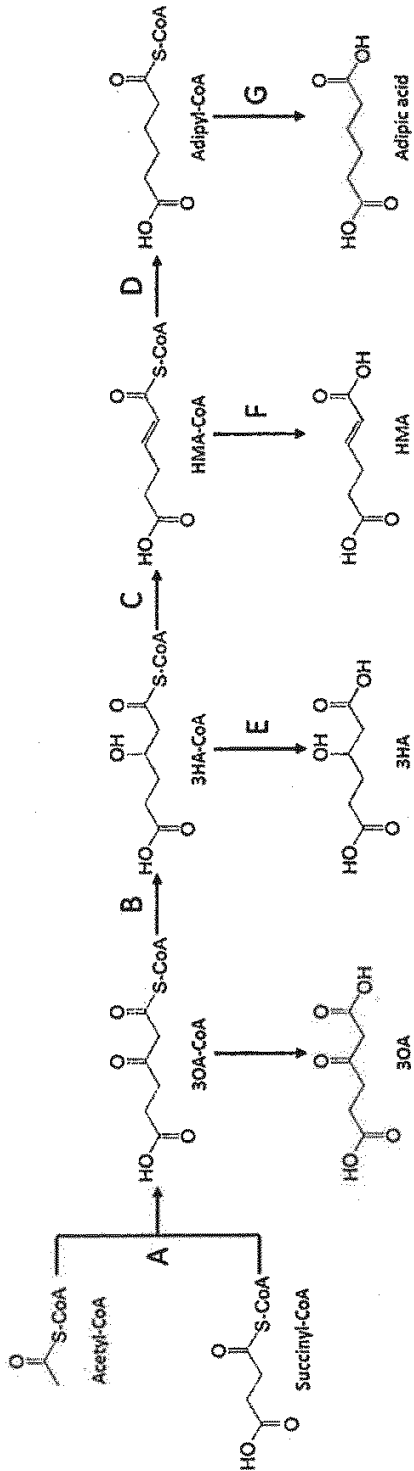
下記スキーム1は、3-ヒドロキシアジピン酸、 β -ヒドロムコン酸、および/またはアジピン酸を生産するために必要な反応経路の例を示している。ここで、反応Aは、アセチル-COAおよびスクシニル-COAから3-オキソアジピル-COAおよび補酵素Aを生成する反応を示す。反応Bは、3-オキソアジピル-COAを還元して3-ヒドロキ

50

シアジピル - CoA を生成する反応を示す。反応 C は、3 - ヒドロキシアジピル - CoA から 2, 3 - デヒドロアジピル - CoA を生成する反応を示す。反応 D は、2, 3 - デヒドロアジピル - CoA から アジピル - CoA を生成する反応を示す。反応 E は 3 - ヒドロキシアジピル - CoA から 3 - ヒドロキシアジピン酸 を生成する反応を示す。反応 F は、2, 3 - デヒドロアジピル - CoA から - ヒドロムコン酸 を生成する反応を示す。反応 G は、アジピル - CoA から アジピン酸 を生成する反応を示す。

【 0 0 2 6 】

【 化 1 】



10

20

30

40

【 0 0 2 7 】

微生物が、3 - ヒドロキシアジピン酸、 - ヒドロムコン酸、および / または アジピン

50

酸を製造する能力を有している場合、上記スキーム 1 に示す生合成経路のうち、少なくとも反応 A を触媒する酵素を有していることが知られている。3 - オキソアジピル CoA から 3 - ヒドロキシアジピン酸、 α - ヒドロムコン酸またはアジピン酸を生成する反応については、スキーム 1 に示す生合成経路を有していることが好ましい。つまり、本発明の遺伝子改変微生物が、3 - ヒドロキシアジピン酸を製造する能力を有している場合、遺伝子改変微生物の宿主微生物としては、アセチル - CoA およびスクシニル - CoA から 3 - オキソアジピル - CoA および補酵素 A を生成（反応 A）する能力、3 - オキソアジピル - CoA を還元して 3 - ヒドロキシアジピル - CoA を生成（反応 B）する能力、3 - ヒドロキシアジピル - CoA から 3 - ヒドロキシアジピン酸を生成（反応 E）する能力を有していることが好ましい。また、本発明の遺伝子改変微生物が、 α - ヒドロムコン酸を製造する能力を有している場合、遺伝子改変微生物の宿主微生物としては、アセチル - CoA およびスクシニル - CoA から 3 - オキソアジピル - CoA および補酵素 A を生成（反応 A）する能力、3 - オキソアジピル - CoA を還元して 3 - ヒドロキシアジピル - CoA を生成（反応 B）する能力、3 - ヒドロキシアジピル - CoA から 2, 3 - デヒドロアジピル - CoA を生成（反応 C）する能力、2, 3 - デヒドロアジピル - CoA から α - ヒドロムコン酸を生成（反応 F）する能力を有していることが好ましい。さらに、本発明の遺伝子改変微生物が、アジピン酸を製造する能力を有している場合、遺伝子改変微生物の宿主微生物としては、アセチル - CoA およびスクシニル - CoA から 3 - オキソアジピル - CoA および補酵素 A を生成（反応 A）する能力、3 - オキソアジピル - CoA を還元して 3 - ヒドロキシアジピル - CoA を生成（反応 B）する能力、3 - ヒドロキシアジピル - CoA から 2, 3 - デヒドロアジピル - CoA を生成（反応 C）する能力、2, 3 - デヒドロアジピル - CoA から アジピル - CoA を生成（反応 D）する能力、アジピル - CoA から アジピン酸を生成（反応 G）する能力を有していることが好ましい。

10

20

【0028】

これらの生合成経路を有する微生物を宿主微生物に対して、ピルビン酸キナーゼの機能を欠損させ、かつ PEP カルボキシキナーゼの活性および 3 - オキソアジピル - CoA を還元して 3 - ヒドロキシアジピル - CoA を生成する反応を触媒する酵素の活性を強化すれば、3 - ヒドロキシアジピン酸、 α - ヒドロムコン酸、および / もしくはアジピン酸を高生産することができる遺伝子改変微生物を取得することができる。

【0029】

30

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

Escherichia fergusonii、*Escherichia coli* などの *Escherichia* 属。

Pseudomonas chlororaphis、*Pseudomonas putida*、*Pseudomonas azotiformans*、*Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* などの *Pseudomonas* 属。

Hafnia alvei などの *Hafnia* 属。

Corynebacterium acetophilum、*Corynebacterium acetoglutamicum*、*Corynebacterium ammoniagenes*、*Corynebacterium glutamicum* などの *Corynebacterium* 属。

40

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

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

Cupriavidus metallidurans、*Cupriavidus necator*、*Cupriavidus oxalaticus* などの *Cupriavidus*

50

us 属。

Acinetobacter baylyi、*Acinetobacter radioresistens*などの*Acinetobacter*属。

*Alcaligenes faecalis*などの*Alcaligenes*属。

*Nocardioides albus*などの*Nocardioides*属。

*Brevibacterium iodinum*などの*Brevibacterium*属。

*Delftia acidovorans*などの*Delftia*属。

*Shimwellia blattae*などの*Shimwellia*属。

*Aerobacter cloacae*などの*Aerobacter*属。

*Rhizobium radiobacter*などの*Rhizobium*属。

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

【0030】

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

【0031】

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

Escherichia fergusonii、*Escherichia coli*などの*Escherichia*属。

Pseudomonas fluorescens、*Pseudomonas putida*、*Pseudomonas azotiformans*、*Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens*などの*Pseudomonas*属。

*Hafnia alvei*などの*Hafnia*属。

*Bacillus badius*などの*Bacillus*属。

Cupriavidus metallidurans、*Cupriavidus nuzumensis*、*Cupriavidus oxalaticus*などの*Cupriavidus*属。

Acinetobacter baylyi、*Acinetobacter radioresistens*などの*Acinetobacter*属。

*Alcaligenes faecalis*などの*Alcaligenes*属。

*Delftia acidovorans*などの*Delftia*属。

*Shimwellia blattae*などの*Shimwellia*属。

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

【0032】

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

【0033】

アジピン酸を製造する能力を元来有すると推定される微生物としては*Thermobifida fusca*などの*Thermobifida*属に属する微生物が挙げられる。

本発明の遺伝子改変微生物がアジピン酸を製造する能力を元来有していない場合には、反

10

20

30

40

50

応A、B、C、D、Gを触媒する酵素をコードする核酸を適当に組み合わせて微生物に導入することで、これらの生成能を付与することができる。

【0034】

本発明で遺伝子改変微生物を得るための宿主として用いることができる微生物は、上記に挙げた微生物が好ましく、特に好ましくは、*Escherichia*属、*Serratia*属、*Hafnia*属、*Pseudomonas*属、*Corynebacterium*属、*Bacillus*属、*Streptomyces*属、*Cupriavidus*属、*Acinetobacter*属、*Alcaligenes*属、*Brevibacterium*属、*Delftia*属、*Shimwellia*属、*Aerobacter*属、*Rhizobium*属、*Thermobifida*属、*Clostridium*属、*Schizosaccharomyces*属、*Kluyveromyces*属、*Pichia*属および*Candida*属に属する微生物である。これらの中でも、*Escherichia*属、*Serratia*属、*Hafnia*属、*Pseudomonas*属に属する微生物が特に好ましい。

10

【0035】

3 - オキソアジピル - CoAを還元して3 - ヒドロキシアジピル - CoAを生成する反応を触媒する酵素の具体例としては、以下(a) ~ (c)に記載のポリペプチドが挙げられる。

【0036】

- (a) 配列番号1 ~ 7のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド
- (b) 配列番号1 ~ 7のいずれかに記載のアミノ酸配列において、1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ3 - オキソアジピル - CoAを還元して3 - ヒドロキシアジピル - CoAを生成する反応を触媒する酵素活性を有するポリペプチド
- (c) 配列番号1 ~ 7のいずれかに記載のアミノ酸配列に対して70%以上の配列同一性を有し、かつ3 - オキソアジピル - CoAを還元して3 - ヒドロキシアジピル - CoAを生成する活性を有するポリペプチド

20

【0037】

さらに、3 - ヒドロキシアシル - CoAデヒドロゲナーゼとしてEC1.1.1.35に分類される酵素、3 - ヒドロキシブチリル - CoAデヒドロゲナーゼとしてEC1.1.1.157に分類される酵素も、3 - オキソアジピル - CoAレダクターゼ活性を有する酵素として用いることができる。具体的には、*Pseudomonas putida* KT2440株由来のPaaH (NCBI - ProteinID: NP_745425.1)、*Escherichia coli* str. K-12 substr. MG1655株由来のPaaH (NCBI - ProteinID: NP_415913.1)、*Acinetobacter baylyi* ADP1株由来のDcaH (NCBI - ProteinID: CAG68533.1)、*Serratia plymuthica* NBRC102599株由来のPaaH (NCBI - ProteinID: WP_063197120)、*Serratia nematodiphila* DSM21420株由来のポリペプチド (NCBI - ProteinID: WP_033633399.1)も3 - オキソアジピル - CoAを還元して3 - ヒドロキシアジピル - CoAを生成する反応を触媒する酵素として挙げられる。これらの中でも、上記(a) ~ (c)に記載のポリペプチドが好ましい。

30

40

【0038】

本発明で用いる、配列番号1 ~ 7のいずれかに記載のアミノ酸配列において、1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ3 - オキソアジピル - CoAレダクターゼの酵素活性を有するポリペプチドついて、「1もしくは数個」の範囲は、10個以内が好ましく、さらに好ましくは5個以内、特に好ましくは4個以内、最も好ましくは1個又は2個以内である。ここで、アミノ酸が置換される場合、性質が類似したアミノ酸に置換された場合(いわゆる保存的置換)にポリペ

50

プチドの活性が維持される可能性が高くなる。すなわち、アミノ酸が置換する場合、類似した性質のアミノ酸に置換しても生理活性が維持される場合が多いので、置換の場合は、類似した性質のアミノ酸に置換したものが好ましい。すなわち、天然のタンパク質を構成する20種類のアミノ酸は、低極性側鎖を有する中性アミノ酸 (Gly, Ile, Val, Leu, Ala, Met, Pro)、親水性側鎖を有する中性アミノ酸 (Asn, Gln, Thr, Ser, Tyr, Cys)、酸性アミノ酸 (Asp, Glu)、塩基性アミノ酸 (Arg, Lys, His)、芳香族アミノ酸 (Phe, Tyr, Trp) のように類似の性質を有するものにグループ分けでき、これらの間での置換であればポリペプチドの性質が変化しないことが多い。

【0039】

本発明で用いる、配列番号1~7のいずれかのアミノ酸配列に対して70%以上の配列同一性を有し、かつ3-オキソアジピル-CoAレダクターゼの酵素活性を有するポリペプチドについて、配列同一性の好ましい範囲は、80%以上が好ましく、より好ましくは85%以上、さらに好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、さらに好ましくは97%以上、さらに好ましくは99%以上である。

【0040】

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

【0041】

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

【0042】

式(1)に従い、Genetyxの機能 (% Identity Matrix) を用いて配列番号1~7に記載のアミノ酸配列間の配列同一性を算出すると、最も配列同一性の値が低い配列番号2と4との値は71.51%となり、配列番号1~7に記載のアミノ酸配列は、お互いに少なくとも70%以上の配列同一性を有している。Genetyxを用いた配列同一性の算出結果を表1に示す。なお、下記表1において、一番左側の数字は配列番号を示す。

【0043】

10

20

30

40

50

【表 1】

[GENETYX : %Identity Matrix]		1 Serratia 2 Serratia 3 Serratia 4 Serratia 5 Serratia 6 Serratia 7 Serratia						
*Gaps are NOT taken into account.								
[%]								
1 Serratia marcescens ATCC13880	*							
2 Serratia nematodiphila DSM21420	98.23	*						
3 Serratia plymuthica NBRC102599	72.10	71.51	*					
4 Serratia proteamaculans 568	72.29	71.51	86.24	*				
5 Serratia ureilytica Lr5/4	90.76	90.76	72.88	73.28	*			
6 Serratia sp. BW106	72.29	71.90	87.03	92.33	73.67	*		
7 Serratia liquefaciens FK01	72.29	71.70	84.67	86.83	73.47	87.81	*	
[Match Count/Length]								
1 Serratia marcescens ATCC13880	*							
2 Serratia nematodiphila DSM21420	500/509	*						
3 Serratia plymuthica NBRC102599	367/509	364/509	*					
4 Serratia proteamaculans 568	368/509	364/509	439/509	*				
5 Serratia ureilytica Lr5/4	462/509	462/509	371/509	373/509	*			
6 Serratia sp. BW106	368/509	366/509	443/509	470/509	375/509	*		
7 Serratia liquefaciens FK01	368/509	365/509	431/509	442/509	374/509	447/509	*	

【 0 0 4 4 】

配列番号 1 ~ 7 に記載の各アミノ酸配列を Query として、NCBI のアミノ酸データベース (Non-redundant protein sequences) に登録されている全アミノ酸配列との配列同一性を、BLASTP を用いて調べた結果、配列同一性が 70% 以上の配列は全て Serratia 属細菌由来であった。

【 0 0 4 5 】

前記 (a) の配列番号 1 ~ 7 に記載のポリペプチドは、いずれも N 末端側からのアミノ酸残基 15 ~ 38 番目 (以下、便宜的に、N 末端側から何番目のアミノ酸残基かを、「a . a .」で表すことがある。したがって、例えば、N 末端側からのアミノ酸残基 15 ~ 3

10

20

30

40

50

8番目は、単に「15～38 a . a .」と表すことがある)において配列番号173に示す24アミノ酸残基からなる共通配列1を有している。共通配列1において、X a aは任意のアミノ酸残基であるが、13 a . a .は好ましくはフェニルアラニンまたはロイシンであり、15 a . a .は好ましくはロイシンまたはグルタミンであり、16 a . a .は好ましくはリシンまたはアスパラギンであり、17 a . a .はグリシンまたはセリン、より好ましくはグリシンであり、19 a . a .は好ましくはプロリンまたはアルギニンであり、21 a . a .は好ましくはロイシン、メチオニンまたはバリンである。共通配列1は、N A D + 結合残基およびその周辺のアミノ酸残基にあたる。N A D + 結合残基は、B i o c h i m i e . 2 0 1 2 F e b ; 9 4 (2) : 4 7 1 - 8 . で示されているように、共通配列1の24番目のアミノ酸残基がアスパラギン酸であるが、共通配列1ではアスパラギンである点が特徴である。共通配列1を有することによって、配列番号1～7に記載のポリペプチドは、3 - オキソアジピル - C o A レダクターゼとしての優れた酵素活性を示すと考える。

10

【0046】

前記(b)および(c)に記載のポリペプチドについても、1～200 a . a .以内に配列番号173に示す24アミノ酸残基からなる共通配列1を有していることが好ましい。より好ましい共通配列の位置は、1～150 a . a .以内であり、さらに好ましくは、1～100 a . a .以内である。その具体例としては、配列番号8～86のアミノ酸配列が挙げられる。配列番号8～86のアミノ酸配列は、15～38 a . a .において配列番号173に示す24アミノ酸残基からなる共通配列1を有している。なお、配列番号8～86のアミノ酸配列は、配列番号1～7のいずれかのアミノ酸配列と配列同一性が90%以上である。G e n e t y xを用いた配列同一性の算出結果を表2 - 1から表2 - 3および表3 - 1から表3 - 3に示す。

20

【0047】

30

40

50

【表 2 - 1】

[GENETYX : %Identity Matrix]

*Gaps are NOT taken into account.

[%]

	1 Serratia 2 Serratia 3 Serratia 4 Serratia 5 Serratia 6 Serratia 7 Serratia
1 Serratia marcescens ATCC13880	98.23 *
2 Serratia nematodiphila DSM21420	72.10 71.51 *
3 Serratia plymuthica NBRC102599	72.29 71.51 86.24 *
4 Serratia proteamaculans 568	90.76 90.76 72.88 73.28 *
5 Serratia ureilytica Lr5/4	72.29 71.90 87.03 92.33 73.67 *
6 Serratia sp. BW106	72.29 71.70 84.67 86.83 73.47 87.81 *
7 Serratia liquefaciens FK01	94.89 94.30 72.88 72.49 91.55 73.08 72.88
8 Serratia sp. S119	92.33 92.33 72.49 72.49 93.51 72.69 72.88
9 Serratia sp. Y025	98.62 99.60 71.70 71.70 91.15 72.10 72.10
10 Serratia sp. FS14	94.89 94.30 73.28 73.28 91.35 73.47 73.47
11 Serratia sp. HMSC15F11	90.76 90.76 72.69 73.08 99.41 73.47 73.28
12 Serratia sp. JK000199	90.56 90.56 72.88 73.28 99.80 73.67 73.47
13 Serratia sp. TEL	90.56 90.56 72.49 73.08 99.41 73.47 73.28
14 Serratia sp. ISTD04	90.76 90.76 72.88 73.28 99.60 73.47 73.47
15 Serratia sp. SC81	72.10 71.31 86.44 98.62 73.08 91.94 86.64
16 Serratia sp. S4	72.49 71.90 98.03 86.05 73.28 86.64 84.08
17 Serratia sp. C-1	99.80 98.03 72.29 72.10 90.56 72.10 72.10
18 Serratia marcescens 532	99.60 97.83 72.10 72.29 90.37 72.10 72.29
19 Serratia marcescens 2890STDY5683033	98.42 98.41 71.90 71.90 90.96 72.29 71.90
20 Serratia marcescens WW4	98.23 98.21 71.31 71.31 90.96 71.70 71.70
21 Serratia marcescens K27	98.42 99.41 71.70 71.70 90.96 72.10 72.10
22 Serratia marcescens 280	98.42 99.41 71.51 71.70 90.96 72.10 72.10
23 Serratia marcescens 19F	98.23 99.60 71.31 71.31 90.37 71.70 71.51
24 Serratia marcescens 1185	98.23 99.60 71.31 71.31 90.37 71.70 71.51

【 0 0 4 8 】

10

20

30

40

50

【表 2 - 2】

25	Serratia marcescens S217	98.23	99.21	71.31	71.51	90.96	71.90	71.90
26	Serratia marcescens KHC0-24B	98.03	99.80	71.31	71.31	90.56	71.70	71.90
27	Serratia marcescens Z6	98.03	99.01	71.70	71.90	90.56	72.29	71.90
28	Serratia marcescens 546	97.83	99.21	71.51	71.70	90.37	72.10	71.70
29	Serratia nematodiphila MB307	98.03	99.80	71.31	71.51	90.56	71.90	71.70
30	Serratia marcescens VGH107	98.03	99.01	71.31	71.51	90.56	71.90	71.90
31	Serratia marcescens MCB	95.48	95.28	72.29	72.69	91.15	72.88	72.69
32	Serratia marcescens AH0650	95.67	95.48	72.29	72.69	90.76	73.28	72.69
33	Serratia marcescens UMH12	95.48	95.28	72.10	72.49	90.56	73.08	72.49
34	Serratia sp. OMLW3	95.48	95.28	72.29	72.49	90.76	73.28	72.69
35	Serratia marcescens UMH11	95.28	95.08	72.10	72.69	90.56	73.47	72.49
36	Serratia marcescens UMH1	95.08	94.89	72.29	72.49	90.17	73.08	72.29
37	Serratia marcescens 2880STDY5683020	95.48	94.89	73.08	72.69	92.14	73.28	73.08
38	Serratia marcescens 99	95.48	94.69	73.28	72.88	91.55	73.67	73.28
39	Serratia marcescens 374	94.89	94.69	72.29	72.29	90.17	73.08	72.29
40	Serratia marcescens 2880STDY5683036	95.28	94.49	73.08	72.69	91.35	73.47	73.08
41	Serratia marcescens 2880STDY5683034	95.28	94.69	73.08	72.69	91.94	73.28	73.08
42	Serratia marcescens 2880STDY5682892	95.28	94.69	73.28	72.88	91.94	73.47	73.28
43	Serratia marcescens SM39	95.08	94.49	73.28	72.69	92.14	73.28	73.28
44	Serratia marcescens 189	95.08	94.49	73.28	72.88	92.14	73.47	73.28
45	Serratia marcescens SMB2099	95.08	94.49	73.47	72.69	91.74	73.67	73.47
46	Serratia marcescens 2880STDY5682862	94.89	94.30	73.47	72.88	91.55	73.47	73.47
47	Serratia marcescens SE4145	94.89	94.30	73.08	72.49	91.94	73.08	73.08
48	Serratia marcescens 2880STDY5682876	95.08	94.49	73.28	72.88	91.74	73.47	73.28
49	Serratia marcescens 709	95.08	94.49	73.08	72.69	91.74	73.28	73.08
50	Serratia marcescens MGH136	94.89	94.30	72.88	72.49	91.94	73.08	72.88
51	Serratia marcescens 2880STDY5682884	94.69	94.10	72.88	72.49	91.74	73.08	73.08
52	Serratia marcescens D-3	95.08	94.49	73.08	72.69	91.74	73.28	73.08
53	Serratia marcescens 2880STDY5682957	94.89	94.30	72.88	72.69	91.55	73.28	72.88
54	Serratia marcescens YDC563	94.69	94.10	72.88	72.69	91.35	73.28	72.88
55	Serratia marcescens 2880STDY5683035	94.89	94.30	73.08	72.69	91.55	73.28	73.08

【 0 0 4 9 】

10

20

30

40

50

【表 2 - 3】

56	Serratia marcescens 2880STDY5682930	94.69	94.10	72.88	72.49	91.35	73.08	72.88
57	Serratia marcescens 790	94.49	94.30	73.28	72.88	91.35	73.47	73.28
58	Serratia marcescens UM45	93.51	92.92	72.69	72.88	90.37	72.69	72.49
59	Serratia marcescens 2880STDY5682988	93.32	92.73	72.69	72.88	90.17	72.69	72.49
60	Serratia marcescens 945154301	94.89	94.30	73.28	73.28	91.35	73.67	73.47
61	Serratia marcescens at10508	94.69	94.10	73.47	73.47	91.15	73.67	73.67
62	Serratia marcescens ML2637	94.49	93.90	73.28	73.47	90.96	73.67	73.67
63	Serratia marcescens SM1978	94.30	93.71	73.28	73.28	90.76	73.67	73.67
64	Serratia marcescens PWN146	94.10	93.51	72.88	72.88	90.96	72.88	73.28
65	Serratia marcescens H1q	92.53	92.53	72.49	72.49	93.51	72.69	73.08
66	Serratia marcescens UM46	91.15	91.15	72.69	73.08	99.60	73.47	73.28
67	Serratia nematodiphila WCU338	91.15	91.15	72.69	73.08	99.41	73.47	73.28
68	Serratia sp. QLEL1	90.96	90.96	72.88	73.28	99.80	73.67	73.47
69	Serratia marcescens 7209	90.96	90.96	72.49	72.88	99.41	73.28	73.08
70	Serratia marcescens sicaria (Ss1)	90.96	90.96	72.69	73.08	99.41	73.28	73.28
71	Serratia sp. QLEL2	90.76	90.76	72.69	73.08	99.60	73.47	73.28
72	Serratia marcescens BIDMC 81	90.76	90.76	72.88	73.28	99.60	73.67	73.47
73	Serratia marcescens BIDMC 50	90.76	90.76	72.69	73.08	99.21	73.47	73.28
74	Serratia marcescens UM7	90.56	90.56	72.88	73.28	99.80	73.67	73.47
75	Serratia marcescens RSC-14	90.56	90.56	72.88	73.47	99.21	73.87	73.67
76	Serratia marcescens SM03	92.33	92.33	72.29	72.29	93.51	72.49	72.88
77	Serratia marcescens 90-166	90.17	89.78	72.49	73.47	96.66	73.67	73.08
78	Serratia marcescens UM2	90.76	90.76	72.88	73.28	99.21	73.67	73.47
79	Serratia plymuthica AS9	72.49	71.90	96.66	85.06	73.47	86.05	83.69
80	Serratia plymuthica tumat 205	72.69	72.10	98.03	86.24	73.47	86.64	84.28
81	Serratia plymuthica A30	72.29	71.70	98.82	85.65	72.88	86.44	84.08
82	Serratia plymuthica 4Rx13	72.29	71.70	97.83	85.85	73.08	86.44	84.28
83	Serratia plymuthica V4	72.29	71.70	98.42	85.85	73.08	86.44	84.28
84	Serratia plymuthica 3Rp8	72.29	71.70	98.62	86.05	73.08	86.64	84.08
85	Serratia proteamaculans MFPA44A14	72.29	71.90	87.03	92.53	73.28	98.82	87.22
86	Serratia plymuthica A153	72.10	71.51	99.21	86.05	72.88	86.64	84.47

【 0 0 5 0 】

10

20

30

40

50

【表 3 - 1】

[Match Count/Length]	1 Serratia 2 Serratia 3 Serratia 4 Serratia 5 Serratia 6 Serratia 7 Serratia
1 Serratia marcescens ATCC13880	* 500/509
2 Serratia nematodiphila DSM21420	* 367/509
3 Serratia plymuthica NBRC102599	* 364/509
4 Serratia proteamaculans 568	* 368/509
5 Serratia ureilytica Lr5/4	462/509
6 Serratia sp. BW106	368/509
7 Serratia liquefaciens FK01	368/509
8 Serratia sp. S119	483/509
9 Serratia sp. YD25	470/509
10 Serratia sp. FS14	502/509
11 Serratia sp. HMSC15F11	483/509
12 Serratia sp. JKS000199	462/509
13 Serratia sp. TEL	461/509
14 Serratia sp. IST004	461/509
15 Serratia sp. SCB1	462/509
16 Serratia sp. S4	367/509
17 Serratia sp. C-1	369/509
18 Serratia marcescens 532	508/509
19 Serratia marcescens 2880STDY5683033	507/509
20 Serratia marcescens WW4	501/509
21 Serratia marcescens K27	500/509
22 Serratia marcescens 280	501/509
23 Serratia marcescens 19F	501/509
24 Serratia marcescens 1185	500/509

【 0 0 5 1】

10

20

30

40

50

【表 3 - 2】

25	<i>Serratia marcescens</i> S217	500/509	505/509	363/509	364/509	463/509	366/509	366/509
26	<i>Serratia marcescens</i> KHC0-24B	499/509	508/509	363/509	363/509	461/509	365/509	366/509
27	<i>Serratia marcescens</i> Z6	499/509	504/509	365/509	366/509	461/509	368/509	366/509
28	<i>Serratia marcescens</i> 546	498/509	505/509	364/509	365/509	460/509	367/509	365/509
29	<i>Serratia nematodiphila</i> MB307	499/509	508/509	363/509	364/509	461/509	366/509	365/509
30	<i>Serratia marcescens</i> VGH107	499/509	504/509	363/509	364/509	461/509	366/509	366/509
31	<i>Serratia marcescens</i> MC8	486/509	485/509	368/509	370/509	464/509	371/509	370/509
32	<i>Serratia marcescens</i> AH0650	487/509	486/509	368/509	370/509	462/509	373/509	370/509
33	<i>Serratia marcescens</i> UMH12	486/509	485/509	367/509	369/509	461/509	372/509	369/509
34	<i>Serratia</i> sp. OMLW3	486/509	485/509	368/509	369/509	462/509	373/509	370/509
35	<i>Serratia marcescens</i> UMH11	485/509	484/509	367/509	370/509	461/509	374/509	369/509
36	<i>Serratia marcescens</i> UMH1	484/509	483/509	368/509	369/509	459/509	372/509	368/509
37	<i>Serratia marcescens</i> 2880STDY5683020	486/509	483/509	372/509	370/509	469/509	373/509	372/509
38	<i>Serratia marcescens</i> 99	486/509	482/509	373/509	371/509	466/509	375/509	373/509
39	<i>Serratia marcescens</i> 374	483/509	482/509	368/509	368/509	459/509	372/509	368/509
40	<i>Serratia marcescens</i> 2880STDY5683036	485/509	481/509	372/509	370/509	465/509	374/509	372/509
41	<i>Serratia marcescens</i> 2880STDY5683034	485/509	482/509	372/509	370/509	468/509	373/509	372/509
42	<i>Serratia marcescens</i> 2880STDY5682892	485/509	482/509	373/509	371/509	468/509	374/509	373/509
43	<i>Serratia marcescens</i> SM39	484/509	481/509	373/509	370/509	469/509	373/509	373/509
44	<i>Serratia marcescens</i> 189	484/509	481/509	373/509	371/509	469/509	374/509	373/509
45	<i>Serratia marcescens</i> SMB2099	484/509	481/509	374/509	370/509	467/509	375/509	374/509
46	<i>Serratia marcescens</i> 2880STDY5682862	483/509	480/509	374/509	371/509	466/509	374/509	374/509
47	<i>Serratia marcescens</i> SE4145	483/509	480/509	372/509	369/509	468/509	372/509	372/509
48	<i>Serratia marcescens</i> 2880STDY5682876	484/509	481/509	373/509	371/509	467/509	374/509	373/509
49	<i>Serratia marcescens</i> 709	484/509	481/509	372/509	370/509	467/509	373/509	372/509
50	<i>Serratia marcescens</i> MGH136	483/509	480/509	371/509	369/509	468/509	372/509	371/509
51	<i>Serratia marcescens</i> 2880STDY5682884	482/509	479/509	371/509	369/509	467/509	372/509	372/509
52	<i>Serratia marcescens</i> D-3	484/509	481/509	372/509	370/509	467/509	373/509	372/509
53	<i>Serratia marcescens</i> 2880STDY5682957	483/509	480/509	371/509	370/509	466/509	373/509	371/509
54	<i>Serratia marcescens</i> YDC563	482/509	479/509	371/509	370/509	465/509	373/509	371/509
55	<i>Serratia marcescens</i> 2880STDY5683035	483/509	480/509	372/509	370/509	466/509	373/509	372/509

【 0 0 5 2 】

10

20

30

40

50

【表 3 - 3】

56	<i>Serratia marcescens</i>	2880STDY5682930	482/509	479/509	371/509	369/509	465/509	372/509	371/509
57	<i>Serratia marcescens</i>	790	481/509	480/509	373/509	371/509	465/509	374/509	373/509
58	<i>Serratia marcescens</i>	UMH5	476/509	473/509	370/509	371/509	460/509	370/509	369/509
59	<i>Serratia marcescens</i>	2880STDY5682988	475/509	472/509	370/509	371/509	459/509	370/509	369/509
60	<i>Serratia marcescens</i>	945154301	483/509	480/509	373/509	373/509	465/509	375/509	374/509
61	<i>Serratia marcescens</i>	at10508	482/509	479/509	374/509	374/509	464/509	375/509	375/509
62	<i>Serratia marcescens</i>	ML2837	481/509	478/509	373/509	374/509	463/509	375/509	375/509
63	<i>Serratia marcescens</i>	SM1978	480/509	477/509	373/509	373/509	462/509	375/509	375/509
64	<i>Serratia marcescens</i>	PWN146	479/509	476/509	371/509	371/509	463/509	371/509	373/509
65	<i>Serratia marcescens</i>	H1q	471/509	471/509	369/509	369/509	476/509	370/509	372/509
66	<i>Serratia marcescens</i>	UMH6	464/509	464/509	370/509	372/509	507/509	374/509	373/509
67	<i>Serratia nematodiphila</i>	WCU338	464/509	464/509	370/509	372/509	506/509	374/509	373/509
68	<i>Serratia</i> sp.	OLEL1	463/509	463/509	371/509	373/509	508/509	375/509	374/509
69	<i>Serratia marcescens</i>	7209	463/509	463/509	369/509	371/509	506/509	373/509	372/509
70	<i>Serratia marcescens</i>	sicaria (Ss1)	463/509	463/509	370/509	372/509	506/509	373/509	373/509
71	<i>Serratia</i> sp.	OLFL2	462/509	462/509	370/509	372/509	507/509	374/509	373/509
72	<i>Serratia marcescens</i>	BIDMC 81	462/509	462/509	371/509	373/509	507/509	375/509	374/509
73	<i>Serratia marcescens</i>	BIDMC 50	462/509	462/509	370/509	372/509	505/509	374/509	373/509
74	<i>Serratia marcescens</i>	UMH7	461/509	461/509	371/509	373/509	508/509	375/509	374/509
75	<i>Serratia marcescens</i>	RSC-14	461/509	461/509	371/509	374/509	505/509	376/509	375/509
76	<i>Serratia marcescens</i>	SM03	470/509	470/509	368/509	368/509	476/509	369/509	371/509
77	<i>Serratia marcescens</i>	90-166	459/509	457/509	369/509	374/509	492/509	375/509	372/509
78	<i>Serratia marcescens</i>	UMH2	462/509	462/509	371/509	373/509	505/509	375/509	374/509
79	<i>Serratia plymuthica</i>	AS9	369/509	366/509	492/509	433/509	374/509	438/509	426/509
80	<i>Serratia plymuthica</i>	tumat 205	370/509	367/509	499/509	439/509	374/509	441/509	429/509
81	<i>Serratia plymuthica</i>	A30	368/509	365/509	503/509	436/509	371/509	440/509	428/509
82	<i>Serratia plymuthica</i>	4Rx13	368/509	365/509	498/509	437/509	372/509	440/509	429/509
83	<i>Serratia plymuthica</i>	V4	368/509	365/509	501/509	437/509	372/509	440/509	429/509
84	<i>Serratia plymuthica</i>	3Rp8	368/509	365/509	502/509	438/509	372/509	441/509	428/509
85	<i>Serratia proteamaculans</i>	MFP44A14	368/509	366/509	443/509	471/509	373/509	503/509	444/509
86	<i>Serratia plymuthica</i>	A153	367/509	364/509	505/509	438/509	371/509	441/509	430/509

10

20

30

40

【 0 0 5 3 】

本発明の (a) ~ (c) に記載のポリペプチドをコードする核酸は、当該ポリペプチドの N 末端及び / 又は C 末端にさらなるペプチド又はタンパク質が付加されるような配列を含んでいてもよい。このようなペプチド又はタンパク質としては、例えば、分泌シグナル配列、輸送タンパク質、結合タンパク質、精製のタグペプチド、蛍光タンパク質等を含むものが例示できる。こうしたペプチド又はタンパク質に関しては、当業者が目的に応じて、付加する機能を有するペプチド又はタンパク質を選択して、本発明のポリペプチドに付加することができる。なお、アミノ酸配列の配列同一性には、このようなペプチド又はタンパク質は含まれない。

50

【 0 0 5 4 】

配列番号 1 ~ 8 6 に記載のポリペプチドをコードする核酸は、配列番号 1 ~ 8 6 に記載のアミノ酸配列に翻訳されうるような塩基配列であれば特に限定されず、各アミノ酸に対応するコドン（標準遺伝暗号）を参考に決定することができる。その際、本発明に使用する宿主微生物にとってよく使用されているコドンで塩基配列を再設計してもよい。

【 0 0 5 5 】

配列番号 1 ~ 8 6 に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする核酸の塩基配列の具体例としては、それぞれ、配列番号 8 7 ~ 1 7 2 に記載の塩基配列が挙げられる。

【 0 0 5 6 】

本発明において、ある核酸がコードするポリペプチドが、3 - オキソアジピル - C o A レダクターゼ活性を有しているかどうかは、以下の形質転換株 A と形質転換株 B を作製し、培養試験の結果、培養液中に 3 - ヒドロキシアジピン酸または - ヒドロムコン酸を確認することができれば、当該核酸が 3 - オキソアジピル - C o A レダクターゼ活性を有するポリペプチドをコードしていると判断する。判断方法を上記スキーム 1 に示す生合成経路を用いて説明する。

10

【 0 0 5 7 】

形質転換株 A は、反応 A , 反応 E および反応 F を触媒する酵素を有する。形質転換株 B は、反応 A、反応 C、反応 E および反応 F を触媒する酵素を有する。

【 0 0 5 8 】

まず、形質転換株 A を作製する。反応 A、反応 E および反応 F をそれぞれ触媒する酵素を発現するプラスミドを作製する。なお、反応 E と F は同一の酵素で反応を触媒することが可能である。当該プラスミドを、3 - ヒドロキシアジピン酸、 - ヒドロムコン酸、及びアジピン酸のいずれも生産する能力のない微生物株である *E s c h e r i c h i a c o l i* B L 2 1 (D E 3) 株に導入する。得られた形質転換株に対し、酵素活性の有無を調べる対象となるポリペプチドをコードする核酸を適当なプロモーターの下流に組み込んだ発現プラスミドを導入し、形質転換株 A を得る。形質転換株 A を培養し、培養後の培養液に 3 - ヒドロキシアジピン酸が含まれているかどうかを確認する。3 - ヒドロキシアジピン酸が培養液中に確認できた場合、次に形質転換株 B を作製する。形質転換株 B は、形質転換株 A に対し、反応 C を触媒する酵素を発現するプラスミドを作製して導入することで得る。形質転換株 B を培養し、培養後の培養液に - ヒドロムコン酸が含まれているかどうかを確認する。培養後の培養液に - ヒドロムコン酸が含まれることを確認することができれば、形質転換株 A が生産した 3 - ヒドロキシアジピン酸および形質転換株 B が生産した - ヒドロムコン酸は、3 - ヒドロキシアジピル - C o A を経由して生成されたことがわかるため、対象となるポリペプチドが 3 - オキソアジピル - C o A レダクターゼ活性を有していると判断する。

20

30

【 0 0 5 9 】

反応 A を触媒する酵素をコードする遺伝子として、*P s e u d o m o n a s p u t i d a* K T 2 4 4 0 株由来の *p c a F* (N C B I G e n e I D : 1 0 4 1 7 5 5、配列番号 1 7 4) を用いる。

【 0 0 6 0 】

反応 E および F を触媒する酵素をコードする遺伝子として、*P s e u d o m o n a s p u t i d a* K T 2 4 4 0 株由来の *p c a I* および *p c a J* (N C B I G e n e I D : 1 0 4 6 6 1 3、1 0 4 6 6 1 2、配列番号 1 7 5、1 7 6) の全長を含む連続した配列を用いる。*p c a I* および *p c a J* がコードするポリペプチドは、複合体を形成することによって反応 E と反応 F を触媒する。

40

【 0 0 6 1 】

反応 C を触媒する酵素をコードする核酸として、*P s e u d o m o n a s p u t i d a* K T 2 4 4 0 株遺伝子 *p a a F* (N C B I G e n e I D : 1 0 4 6 9 3 2、配列番号 1 7 7) を用いる。

【 0 0 6 2 】

50

形質転換株 A、形質転換株 B の培養方法は、以下のとおりである。なお培養の際には、プラスミドを安定に保持するための抗生物質や、組み込んだ核酸がコードするポリペプチドの発現を誘導する物質を適宜加えることができる。pH 7 に調整した培地 I (B a c t o トリプトン (D i f c o L a b o r a t o r i e s 社製) 10 g / L、B a c t o 酵母エキス (D i f c o L a b o r a t o r i e s 社製) 5 g / L、塩化ナトリウム 5 g / L) 5 mL に、形質転換株 A または B を一白金耳植菌し、30、120 min⁻¹ で 18 時間振とう培養し、前培養液とする。続いて当該前培養液 0.25 mL を pH 6.5 に調整した培地 II (コハク酸 10 g / L、グルコース 10 g / L、硫酸アンモニウム 1 g / L、リン酸カリウム 50 mM、硫酸マグネシウム 0.025 g / L、硫酸鉄 0.0625 mg / L、硫酸マンガン 2.7 mg / L、塩化カルシウム 0.33 mg / L、塩化ナトリウム 1.25 g / L、B a c t o トリプトン 2.5 g / L、B a c t o 酵母エキス 1.25 g / L) 5 mL に添加し、30、120 min⁻¹ で 24 時間振とう培養する。得られた培養液中に 3 - ヒドロキシアジピン酸または - ヒドロムコン酸が含まれているかを確認する。

【0063】

培養液中に 3 - ヒドロキシアジピン酸または - ヒドロムコン酸が含まれることは、培養液を遠心し、上清を LC - MS / MS で分析することにより確認できる。分析の条件は以下のとおりである。

【0064】

・ HPLC : 1290 Infinity (Agilent Technologies 社製)

カラム : Synergi hydro - RP (Phenomenex 社製)、長さ 100 mm、内径 3 mm、粒径 2.5 μm

移動相 : 0.1% 甲酸水溶液 / メタノール = 70 / 30

流速 : 0.3 mL / 分

カラム温度 : 40

LC 検出器 : DAD (210 nm)

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

イオン化法 : ESI ネガティブモード。

【0065】

3 - オキソアジピル - CoA レダクターゼの活性の値は、3 - オキソアジピン酸から酵素反応で調製した 3 - オキソアジピル - CoA を基質として、精製 3 - オキソアジピル - CoA レダクターゼを用いて生成する 3 - ヒドロキシアジピル - CoA を測定することで算出できる。具体的な方法は、以下の通りである。

【0066】

3 - オキソアジピン酸は公知の方法 (例えば、WO 2017 / 099209 の参考例 1 に記載された方法) により調製することができる。

【0067】

3 - オキソアジピル - CoA 溶液の調製 : 常法に従い *Pseudomonas putida* KT 2440 株のゲノム DNA を鋳型とした PCR を行い、CoA トランスフェラーゼをコードする核酸 (p c a I および p c a J、NCBI - Gene ID : 1046613 および 1046612) の全長を増幅する。なお、この PCR で用いるプライマーの塩基配列は、例えば配列番号 194 および 195 である。当該増幅断片を大腸菌用発現ベクターである pRSF - 1b (Novagen 社製) の KpnI サイトに、ヒスチジンタグ配列と同じフレームとなるよう挿入する。当該プラスミドを大腸菌 BL 21 (DE 3) に導入し、常法に従いイソプロピル - - チオガラクトピラノシド (IPTG) による当該酵素の発現誘導、続いて培養液からのヒスチジンタグを利用した精製を行い、CoA トランスフェラーゼ溶液を得る。当該溶液を用いて以下組成の 3 - オキソアジピル - CoA 調製用酵素反応溶液を調製し、25 で 3 分反応させた後、UF 膜 (Amicon

10

20

30

40

50

Ultra - 0.5 mL 10K、Merck Millipore社製)で処理することで酵素を除去し、得られた透過液を3 - オキソアジピル - CoA 溶液とする。

【0068】

(酵素反応溶液)

100 mM Tris - HCl (pH 8.2)

10 mM MgCl₂

0.5 mM succinyl - CoA

5 mM 3 - oxoadipic acid sodium salt

2 μM CoA transferase.

【0069】

3 - オキソアジピル - CoAレダクターゼ活性の確認：常法に従い対象とする微生物株のゲノムDNAを鋳型としたPCRを行い、3 - オキソアジピル - CoAレダクターゼをコードする核酸全長を増幅する。なお、このPCRで用いるプライマーの塩基配列は、例えば配列番号196および197である。当該増幅断片を大腸菌用発現ベクターpACYCDuet - 1 (Novagen社製)のBamHIサイトに、ヒスチジntag配列と同じフレームとなるよう挿入する。当該プラスミドを大腸菌BL21 (DE3)に導入し、常法に従いイソプロピル - チオガラクトピラノシド (IPTG) による当該酵素の発現誘導、続いて培養液からのヒスチジntagを利用した精製を行い、3 - オキソアジピル - CoAレダクターゼ溶液を得る。3 - オキソアジピル - CoAレダクターゼ活性は、本酵素溶液を用いて以下組成の酵素反応溶液を調製し、25 °Cにおける3 - ヒドロキシアジピル - CoAの生成量を測定することで確認できる。

【0070】

(酵素反応溶液)

100 mM Tris - HCl (pH 8.2)

10 mM MgCl₂

150 μL/mL 3 - oxoadipyl - CoA solution

0.5 mM NADH

1 mM dithiothreitol

10 μM 3 - oxoadipyl - CoA reductase.

【0071】

続いて、反応A、C ~ Gを触媒する酵素の具体例を示す。3 - オキソアジピル - CoAを生成する反応Aを触媒する酵素は、例えば、アシルトランスフェラーゼ (α - ケトチオラーゼ) などを用いることができる。アシルトランスフェラーゼとしてはEC番号による分類上の限定は特にないが、EC 2.3.1. - に分類されるアシルトランスフェラーゼが好ましく、具体的には3 - オキソアジピル - CoAチオラーゼとしてEC 2.3.1.174に分類される酵素、アセチル - CoA C - アセチルトランスフェラーゼとしてEC 2.3.1.9に分類される酵素、アセチル - CoA C - アシルトランスフェラーゼとしてEC 2.3.1.16に分類される酵素が挙げられる。これらの中でも *Escherichia coli* MG1655株由来のPaaJ (NCBI - Protein ID: NP_415915)、*Pseudomonas putida* KT2440株由来のPcaF (NCBI - Protein ID: NP_743536)などを好ましく用いることができる。

【0072】

上記のアシルトランスフェラーゼが、スクシニル - CoAおよびアセチル - CoAを基質として、3 - オキソアジピル - CoAを生成できるかどうかは、精製アシルトランスフェラーゼによる3 - オキソアジピル - CoA生成反応と、3 - オキソアジピル - CoAを基質とした精製3 - オキソアジピル - CoAレダクターゼによる還元反応を組み合わせ、3 - オキソアジピル - CoAの還基に伴うNADHの減少量を測定することで確認できる。具体的な測定方法は、例えば以下の通りである。

【0073】

10

20

30

40

50

アシルトランスフェラーゼ活性の確認：常法に従い対象とする微生物株のゲノムDNAを鋳型としたPCRを行い、アシルトランスフェラーゼをコードする核酸全長を増幅する。当該増幅断片を大腸菌用発現ベクターpACYCDuet-1(Novagen社製)のSacIサイトに、ヒスチジンタグ配列と同じフレームとなるよう挿入する。当該プラスミドを大腸菌BL21(DE3)に導入し、常法に従いイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド(IPTG)による当該酵素の発現誘導、続いて培養液からのヒスチジンタグを利用した精製を行い、アシルトランスフェラーゼ溶液を得る。アシルトランスフェラーゼ活性は、当該酵素溶液を用いて以下組成の酵素反応溶液を調製し、30℃におけるNADHの酸化に伴う340nm吸収の減少を測定することで確認できる。

【0074】

100mM Tris-HCl (pH 8.0)
 10mM MgCl₂
 0.1mM succinyl-CoA
 0.2mM acetyl-CoA
 0.2mM NADH
 1mM dithiothreitol
 10μg/mL 3-oxoadipyl-CoA reductase
 5μg/mL acyltransferase。

10

【0075】

微生物が有する酵素がアシルトランスフェラーゼ活性を有しているかどうかは、精製アシルトランスフェラーゼの代わりにCFEを用いて上述の測定を行うことで確認できる。大腸菌を対象とした具体的な測定方法は、例えば以下の通りである。

20

【0076】

CFEの調製：pH7に調整した培地(培地組成：トリプトン10g/L、酵母エキス5g/L、塩化ナトリウム5g/L)5mLに活性測定の対象となる大腸菌MG1655株を一白金耳植菌し、30℃で18時間振とう培養する。得られた培養液をpH7に調整した培地(培地組成：トリプトン10g/L、酵母エキス5g/L、塩化ナトリウム5g/L、フェルラ酸2.5mM、p-クマル酸2.5mM、安息香酸2.5mM、cis,cis-ムコン酸2.5mM、プロトカテク酸2.5mM、カテコール2.5mM、3-OA2.5mM、3-ヒドロキシアジピン酸2.5mM、β-ヒドロムコン酸2.5mM、アジピン酸2.5mM、フェニルエチルアミン2.5mM)5mLに添加し、30℃で3時間振とう培養する。

30

【0077】

得られた培養液に10mLの0.9%塩化ナトリウムを加え、菌体を遠心分離して上清を取り除く操作を3回を行い、菌体を洗浄する。洗浄後の菌体をTris-HCl(pH8.0)100mM、dithiothreitol1mMからなるTris-HClバッファー1mLに懸濁し、得られた懸濁液にガラスビーズ(0.1mm)を加え、超音波破碎機を用い4分間で菌体を破碎する。菌体破碎液を遠心して得られる上清のうち0.5mLをUF膜(Amicon Ultra-0.5mL 10K、Merck Millipore社製)に通し、透過液を除去したのちTris-HClバッファー0.4mLを添加することを3回繰り返すことで低分子量の夾雑物を除去した後、Tris-HClバッファーで再懸濁して液量を0.1mLとしたものをCFEとする。精製酵素の代わりに当該CFEを全量0.1mLの酵素反応溶液に対して0.05mL添加し、酵素活性の確認を行う。

40

【0078】

2,3-デヒドロアジピル-CoAを生成する反応Cを触媒する酵素は、例えば、エノイル-CoAヒドラターゼなどを用いることができる。エノイル-CoAヒドラターゼとしては、EC番号による分類上の限定は特にないが、EC番号4.2.1.-に分類されるエノイル-CoAヒドラターゼが好ましく、具体的にはエノイル-CoAヒドラターゼまたは2,3-デヒドロアジピル-CoAヒドラターゼとしてEC4.2.1.17に分

50

類される酵素が挙げられる。これらの中でも *Escherichia coli* MG1655 株由来の PaaF (NCBI-ProteinID: NP_415911)、*Pseudomonas putida* KT2440 株由来の PaaF (NCBI-ProteinID: NP_745427) などを好ましく用いることができる。

【0079】

エノイル-CoAヒドラーゼが触媒する反応は一般的に可逆反応であることから、エノイル-CoAヒドラーゼが、3-ヒドロキシアジビル-CoAを基質として2,3-デヒドロアジビル-CoAが生成する反応を触媒する活性を有することは、 α -ヒドロムコン酸から酵素反応で調製した2,3-デヒドロアジビル-CoAを基質として、精製エノイル-CoAヒドラーゼを用いて生成する3-ヒドロキシアジビル-CoAを検出することで確認することができる。具体的な測定方法は、例えば以下の通りである。

10

【0080】

α -ヒドロムコン酸の調製： α -ヒドロムコン酸はWO2016/199858A1の参考例1に記載された方法により調製する。

【0081】

2,3-デヒドロアジビル-CoA溶液の調製：常法に従い *Pseudomonas putida* KT2440 株のゲノムDNAを鋳型としたPCRを行い、CoAトランスフェラーゼをコードする核酸(pcaIおよびpcaJ、NCBI-GeneID: 1046613および1046612)の全長を増幅する。当該増幅断片を大腸菌用発現ベクターであるpRSF-1b(Novagen社製)のKpnIサイトに、ヒスチジンタグ配列と同じフレームとなるよう挿入する。当該プラスミドを大腸菌BL21(DE3)に導入し、常法に従いイソプロピル- β -チオガラクトピラノシド(IPTG)による当該酵素の発現誘導、続いて培養液からのヒスチジンタグを利用した精製を行い、CoAトランスフェラーゼ溶液を得る。当該溶液を用いて以下組成の2,3-デヒドロアジビル-CoA調製用酵素反応溶液を調製し、30℃で10分反応させた後、UF膜(Amicon Ultra-0.5mL 10K、Merck Millipore社製)で処理することで酵素を除去し、得られた透過液を2,3-デヒドロアジビル-CoA溶液とする。

20

【0082】

2,3-デヒドロアジビル-CoA調製用酵素反応溶液

100mM Tris-HCl (pH8.0)

10mM MgCl₂

0.4mM succinyl-CoA

2mM α -hydromuconic acid sodium salt

20 μ g/mL CoA transferase。

30

【0083】

エノイル-CoAヒドラーゼ活性の確認：常法に従い対象とする微生物株のゲノムDNAを鋳型としたPCRを行い、エノイル-CoAヒドラーゼをコードする核酸全長を増幅する。当該増幅断片を大腸菌用発現ベクターpET-16b(Novagen社製)のNdeIサイトに、ヒスチジンタグ配列と同じフレームとなるよう挿入する。当該プラスミドを大腸菌BL21(DE3)に導入し、常法に従いイソプロピル- β -チオガラクトピラノシド(IPTG)による当該酵素の発現誘導、続いて培養液からのヒスチジンタグを利用した精製を行い、エノイル-CoAヒドラーゼ溶液を得る。エノイル-CoAヒドラーゼ活性は、当該溶液を用いて以下組成の酵素反応溶液を調製し、30℃で10分反応させた後、UF膜(Amicon Ultra-0.5mL 10K、Merck Millipore社製)で処理することで酵素を除去し、得られた透過液中の3-ヒドロキシアジビル-CoAを高速液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析計(LC-MS/MS)(Agilent社)で検出することで確認できる。

40

【0084】

100mM Tris-HCl (pH8.0)

10mM MgCl₂

50

300 μ L/mL 2,3-dehydroadipyl-CoA solution
 1mM dithiothreitol
 20 μ g/mL enoyl-CoA hydratase。

【0085】

本発明で用いる宿主微生物において元来発現する酵素がエノイル-CoAヒドラーゼ活性を有しているかどうかは、精製エノイル-CoAヒドラーゼの代わりにCFEを全量0.1mLの酵素反応溶液に対して0.05mL添加して上述の測定を行うことで確認できる。大腸菌を対象としたCFEの調製方法の具体例はアシルトランスフェラーゼ活性の確認方法に記載した通りである。

【0086】

アジピル-CoAを生成する反応Dを触媒する酵素は、例えば、エノイル-CoAレダクターゼなどを用いることができる。エノイル-CoAレダクターゼとしては、EC番号による分類上の限定は特にないが、EC番号1.3.-.-に分類されるエノイル-CoAレダクターゼが好ましく、具体的にはtrans-2-エノイル-CoAレダクターゼとしてEC1.3.1.44に分類される酵素、アシル-CoAデヒドロゲナーゼとしてEC1.3.8.7に分類される酵素が挙げられる。これらの具体例は、例えば特表2011-515111、J Appl Microbiol. 2015 Oct;119(4):1057-63.などに開示されているが、中でもEuglena gracilis Z株由来のTER(UniProtKB:Q5EU90)、Thermobifida fusca YX株由来のTfu_1647(NCBI-ProteinID:AAZ55682)、Acinetobacter baylyi ADP1株由来のDcaA(NCBI-ProteinID:AAL09094.1)などを好ましく用いることができる。

【0087】

エノイル-CoAレダクターゼが、2,3-デヒドロアジピル-CoAを基質とした場合、アジピル-CoAが生成する活性を有することは、-ヒドロムコン酸から酵素反応で調製した2,3-デヒドロアジピル-CoAを基質として、精製エノイル-CoAレダクターゼを用いて2,3-デヒドロアジピル-CoAの還元に伴うNADHの減少量を測定することで確認できる。

【0088】

-ヒドロムコン酸の調製と、2,3-デヒドロアジピル-CoA溶液の調製は、上記と同様に行うことができる。

【0089】

エノイル-CoAレダクターゼ活性の確認：常法に従い対象とする微生物株のゲノムDNAを鋳型としたPCRを行い、エノイル-CoAレダクターゼをコードする核酸全長を増幅する。当該増幅断片を大腸菌用発現ベクターpET-16b(Novagen社製)のNdeIサイトに、ヒスチジンタグ配列と同じフレームとなるよう挿入する。当該プラスミドを大腸菌BL21(DE3)に導入し、常法に従いイソプロピル- β -チオガラクトピラノシド(IPTG)による当該酵素の発現誘導、続いて培養液からのヒスチジンタグを利用した精製を行い、エノイル-CoAレダクターゼ溶液を得る。エノイル-CoAレダクターゼ活性は、本酵素溶液を用いて以下組成の酵素反応溶液を調製し、30におけるNADHの酸化に伴う340nm吸収の減少を測定することで確認できる。

【0090】

100mM Tris-HCl(pH8.0)
 10mM MgCl₂
 300 μ L/mL 2,3-dehydroadipyl-CoA solution0.
 2mM NADH
 1mM dithiothreitol
 20 μ g/mL enoyl-CoA reductase。

【0091】

10

20

30

40

50

本発明で用いる宿主微生物において元来発現する酵素がエノイル - C o A レダクターゼ活性を有しているかどうかは、精製エノイル - C o A レダクターゼの代わりに C F E を全量 0 . 1 m L の酵素反応溶液に対して 0 . 0 5 m L 添加して上述の測定を行うことで確認できる。大腸菌を対象とした C F E の調製方法の具体例はアシルトランスフェラーゼ活性の確認方法に記載した通りである。

【 0 0 9 2 】

3 - ヒドロキシアジピン酸を生成する反応 E、 α - ヒドロムコン酸を生成する反応 F、アジピン酸を生成する反応 G を触媒する酵素は、例えば、C o A トランスフェラーゼあるいはアシル - C o A ヒドロラーゼなどを用いることができるが、C o A トランスフェラーゼが好ましい。

10

【 0 0 9 3 】

C o A トランスフェラーゼとしては、E C 番号による分類上の限定は特にないが、E C 番号 2 . 8 . 3 . - に分類される C o A トランスフェラーゼが好ましく、具体的には C o A トランスフェラーゼまたはアシル - C o A トランスフェラーゼとして E C 2 . 8 . 3 . 6 に分類される酵素などが挙げられる。

【 0 0 9 4 】

本発明において、「C o A トランスフェラーゼ」とは、アシル - C o A およびコハク酸を基質としてカルボン酸およびスクシニル - C o A を生成する反応の触媒活性 (C o A トランスフェラーゼ活性) を有する酵素を意味する。

【 0 0 9 5 】

3 - ヒドロキシアジピン酸を生成する反応 E、 α - ヒドロムコン酸を生成する反応 F を触媒する酵素には、中でも *Pseudomonas putida* K T 2 4 4 0 株由来の P c a I および P c a J (N C B I - P r o t e i n I D : N P _ 7 4 6 0 8 1 および N P _ 7 4 6 0 8 2) 等を好ましく用いることができる。

20

【 0 0 9 6 】

また、アジピン酸を生成する反応 G を触媒する酵素には、*Acinetobacter baylyi* A D P 1 株由来の D c a I および D c a J (N C B I - P r o t e i n I D : C A G 6 8 5 3 8 および C A G 6 8 5 3 9) などを好ましく用いることができる。

【 0 0 9 7 】

3 - ヒドロキシアジピル - C o A、2, 3 - デヒドロアジピル - C o A またはアジピル - C o A を基質とする C o A トランスフェラーゼ活性は、本酵素反応が可逆反応であることから、3 - ヒドロキシアジピン酸およびスクシニル - C o A、 α - ヒドロムコン酸およびスクシニル - C o A、またはアジピン酸およびスクシニル - C o A を基質として、精製 C o A トランスフェラーゼを用いて生成する 3 - ヒドロキシアジピル - C o A、2, 3 - デヒドロアジピル - C o A またはアジピル - C o A を検出することで確認することができる。具体的な測定方法は、例えば以下の通りである。

30

【 0 0 9 8 】

3 - ヒドロキシアジピン酸の調製：3 - ヒドロキシアジピン酸は W O 2 0 1 6 / 1 9 9 8 5 6 A 1 の参考例 1 に記載された方法により調製する。

【 0 0 9 9 】

3 - ヒドロキシアジピン酸を基質とした C o A トランスフェラーゼ活性の確認：常法に従い対象とする微生物株のゲノム DNA を鋳型とした P C R を行い、C o A トランスフェラーゼをコードする核酸全長を増幅する。当該増幅断片を大腸菌用発現ベクターである p R S F - 1 b (N o v a g e n 社製) の K p n I サイトに、ヒスチジンタグ配列と同じフレームとなるよう挿入する。当該プラスミドを大腸菌 B L 2 1 (D E 3) に導入し、常法に従いイソプロピル - β - チオガラクトピラノシド (I P T G) による当該酵素の発現誘導、続いて培養液からのヒスチジンタグを利用した精製を行い、C o A トランスフェラーゼ溶液を得る。当該溶液を用いて以下組成の酵素反応溶液を調製し、30℃で10分反応させた後、UF膜 (A m i c o n U l t r a - 0 . 5 m L 1 0 K、M e r c k M i l l i p o r e 社製) で処理することで酵素を除去し、透過液中の 3 - ヒドロキシアジピル

40

50

- CoAを高速液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析計(LC-MS/MS)(Agilent社)で検出することで確認できる。

【0100】

100mM Tris-HCl(pH8.0)
10mM MgCl₂
0.4mM succinyl-CoA
2mM 3-hydroxyadipic acid sodium salt
20µg/mL CoA transferase。

【0101】

- ヒドロムコン酸の調製： - ヒドロムコン酸はWO2016/199858A1の参考例1に記載された方法により調製する。

10

【0102】

- ヒドロムコン酸を基質としたCoAトランスフェラーゼ活性の確認：常法に従い対象とする微生物株のゲノムDNAを鋳型としたPCRを行い、CoAトランスフェラーゼをコードする核酸全長を増幅する。当該増幅断片を大腸菌用発現ベクターであるpRSF-1b(Novagen社製)のKpnIサイトに、ヒスチジンタグ配列と同じフレームとなるよう挿入する。当該プラスミドを大腸菌BL21(DE3)に導入し、常法に従いイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド(IPTG)による当該酵素の発現誘導、続いて培養液からのヒスチジンタグを利用した精製を行い、CoAトランスフェラーゼ溶液を得る。当該溶液を用いて以下組成の酵素反応溶液を調製し、30℃で10分反応させた後、UF膜(Amicon Ultra-0.5mL 10K, Merck Millipore社製)で処理することで酵素を除去し、透過液中の2,3-デヒドロアジピル-CoAを高速液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析計(LC-MS/MS)(Agilent社)で検出することで確認できる。

20

【0103】

100mM Tris-HCl(pH8.0)
10mM MgCl₂
0.4mM succinyl-CoA
2mM 3-hydroxyadipic acid sodium salt
20µg/mL CoA transferase。

30

【0104】

アジピン酸を基質としたCoAトランスフェラーゼ活性の確認：常法に従い対象とする微生物株のゲノムDNAを鋳型としたPCRを行い、CoAトランスフェラーゼをコードする核酸全長を増幅する。当該増幅断片を大腸菌用発現ベクターであるpRSF-1b(Novagen社製)のKpnIサイトに、ヒスチジンタグ配列と同じフレームとなるよう挿入する。当該プラスミドを大腸菌BL21(DE3)に導入し、常法に従いイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド(IPTG)による当該酵素の発現誘導、続いて培養液からのヒスチジンタグを利用した精製を行い、CoAトランスフェラーゼ溶液を得る。当該溶液を用いて以下組成の酵素反応溶液を調製し、30℃で10分反応させた後、UF膜(Amicon Ultra-0.5mL 10K, Merck Millipore社製)で処理することで酵素を除去し、透過液中のアジピル-CoAを高速液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析計(LC-MS/MS)(Agilent社)で検出することで確認できる。

40

【0105】

100mM Tris-HCl(pH8.0)
10mM MgCl₂
0.4mM succinyl-CoA
2mM adipic acid sodium salt
20µg/mL CoA transferase。

【0106】

50

本発明で用いる宿主微生物において元来発現する酵素がCoAトランスフェラーゼ活性を有しているかどうかは、精製CoAトランスフェラーゼの代わりにCFEを全量0.1 mLの酵素反応溶液に対して0.05 mL添加して上述の測定を行うことで確認できる。大腸菌を対象としたCFEの調製方法の具体例はアシルトランスフェラーゼ活性の確認方法に記載した通りである。

【0107】

本発明においてPEPカルボキシキナーゼ、アシルトランスフェラーゼ、3-オキソアジピル-CoAレダクターゼ、エノイル-CoAヒドラターゼ、エノイル-CoAレダクターゼ、CoAトランスフェラーゼのいずれかをコードする核酸を宿主微生物に導入する場合、当該核酸はデータベース上に存在する当該酵素のアミノ酸配列を基に人工的に合成してもよいし、天然から分離してもよい。人工的に合成する場合、導入する宿主微生物に合わせて各アミノ酸に対応するコドンの使用頻度を変更してもよい。

10

【0108】

当該酵素をコードする核酸を天然から分離する場合、遺伝子源となる生物は特に限定されないが、例えば、*Acinetobacter baylyi*、*Acinetobacter radioresistens*などの*Acinetobacter*属、*Aerobacter cloacae*などの*Aerobacter*属、*Alcaligenes faecalis*などの*Alcaligenes*属、*Bacillus badius*、*Bacillus megaterium*、*Bacillus roseus*などの*Bacillus*属、*Brevibacterium iodinum*などの*Brevibacterium*属、*Corynebacterium acetoacidophilum*、*Corynebacterium acetoglutamicum*、*Corynebacterium ammoniagenes*、*Corynebacterium glutamicum*などの*Corynebacterium*属、*Cupriavidus metallidurans*、*Cupriavidus necator*、*Cupriavidus numazuensis*、*Cupriavidus oxalaticus*などの*Cupriavidus*属、*Delftia acidovorans*などの*Delftia*属、*Escherichia coli*、*Escherichia fergusonii*などの*Escherichia*属、*Hafnia alvei*などの*Hafnia*属、*Microbacterium ammoniaphilum*などの*Microbacterium*属、*Nocardioides albus*などの*Nocardioides*属、*Planomicrobium okeanokoites*などの*Planomicrobium*属、*Pseudomonas azotoformans*、*Pseudomonas chlororaphis*、*Pseudomonas fluorescens*、*Pseudomonas fragi*、*Pseudomonas putida*、*Pseudomonas reptilivora*などの*Pseudomonas*属、*Rhizobium radiobacter*などの*Rhizobium*属、*Rhodospiridium toruloides*などの*Rhodospiridium*属、*Saccharomyces cerevisiae*などの*Saccharomyces*属、*Serratia entomophila*、*Serratia ficaria*、*Serratia fonticola*、*Serratia grimesii*、*Serratia nematodiphila*、*Serratia odorifera*、*Serratia plymuthica*などの*Serratia*属、*Shimwellia blattae*などの*Shimwellia*属、*Streptomyces karnatakensis*、*Streptomyces olivaceus*、*Streptomyces vinaceus*などの*Streptomyces*属、*Yarrowia lipolytica*などの*Yarrowia*属、*Yersinia ruckeri*などの*Yersinia*属、*Euglena gracilis*などの*Euglena*属、*Thermobifida fusca*などの*Thermobifida*属が挙げられ、好ましくは*Acinetobacter*属、*Corynebacterium*属、*Escherichi*

20

30

40

50

a属、Pseudomonas属、Serratia属、Euglena属、Thermobifida属である。

【0109】

本発明でピルビン酸キナーゼやホスホトランスフェラーゼ系酵素の機能を欠損させるとは、これら酵素活性を欠損させることである。機能を欠損させる方法は特に限定されないが、例えば、当該酵素をコードする遺伝子を、遺伝子変異剤、紫外線照射などによる遺伝子変異処理、部位特異的変異法等による塩基配列の一部や全部の欠損処理、塩基配列へのフレームシフト変異の導入、塩基配列へのストップコドンの挿入等により、欠損させることにより行うことができる。また、遺伝子組換え技術を用いて、塩基配列の全部又は一部を除去したり、他の塩基配列と置換したりすることでも遺伝子の欠損を行うことができる。これらの中で好ましくは塩基配列の一部もしくは全体を欠損させる方法が好ましい。

10

【0110】

ピルビン酸キナーゼはEC 2.7.1.40に分類され、ホスホエノールピルビン酸を脱リン酸化し、ピルビン酸およびATPに変換する反応を触媒する酵素である。具体的には、Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655株由来のpykF (NCBI-ProteinID: NP_416191、配列番号178)、pykA (NCBI-ProteinID: NP_416368、配列番号179)、およびSerratia grimesii NBRC13537株由来のpykF (配列番号180)、pykA (配列番号181)などが挙げられる。下記スキーム2の代謝経路に示されるように、本発明で用いる微生物がピルビン酸キナーゼをコードする遺伝子を2個以上有する場合は、全てのピルビン酸キナーゼの機能を欠損させることが好ましい。本発明で用いる微生物が有する遺伝子がコードするポリペプチドがピルビン酸キナーゼであるかどうかは、NCBI (National Center for Biotechnology Information) やKEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) などのウェブサイトでBLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 検索を行えばよい。

20

【0111】

ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼはEC 4.1.1.49に分類され、ホスホエノールピルビン酸、二酸化炭素およびADPからオキサロ酢酸およびATPを生成する反応を触媒する酵素である。具体的には、Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655株由来のpck (NCBI-ProteinID: NP_417862、配列番号182)、およびSerratia grimesii NBRC13537株由来のpckA_1 (配列番号183)、pckA_2 (配列番号184)などが挙げられる。

30

【0112】

PEPカルボキシキナーゼは、生理的には糖新生において脂肪酸からグルコースを生産する際の主要な反応を担っている。PEPカルボキシキナーゼが触媒する反応は可逆反応であるが、糖新生において、当該反応はオキサロ酢酸をPEPおよび二酸化炭素に変換する方向に進行する。

40

【0113】

本発明で用いる酵素遺伝子がコードするポリペプチドがPEPカルボキシキナーゼであるかどうかは、NCBI (National Center for Biotechnology Information) やKEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) などのウェブサイトでBLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 検索を行えばよい。

【0114】

特開2015-146810号公報には、代謝ネットワークモデルを用いてアセチル-CoAおよびスクシニル-CoAからアジピン酸を高収率で生産する微生物株をインシリコで作製するにあたり、PEPカルボキシキナーゼ遺伝子の欠損が有効であることが記載

50

されている。また、特表2015-504688号公報には、PEPを經由して生合成されるムコン酸の製造において、PEPプールの増加を目的としてPEPカルボキシキナーゼの活性を強化させることが記載されている。すなわち、PEPカルボキシキナーゼが触媒する反応はオキサロ酢酸からPEPを生成する方向に進行すると記載された当該記載から、当業者であれば、PEPカルボキシキナーゼ遺伝子の発現増強による同酵素活性の強化は3-ヒドロキシアジピン酸、 γ -ヒドロムコン酸、および/またはアジピン酸の収率を低下させると予想すると考える。しかし、本発明では、上記の予想に反して、3-ヒドロキシアジピン酸、 γ -ヒドロムコン酸、および/またはアジピン酸を製造する能力を有し、かつピルビン酸キナーゼが欠損し、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ遺伝子および3-オキソアジピル-CoAを還元して3-ヒドロキシアジピル-CoAを生成する反応を触媒する酵素遺伝子の発現を増強した遺伝子改変微生物を培養すると、3-ヒドロキシアジピン酸、 γ -ヒドロムコン酸、および/またはアジピン酸の生産量が向上することを見出した。

10

【0115】

本発明の遺伝子改変微生物は、さらにホスホトランスフェラーゼ系酵素の機能が欠損していることが好ましい。ホスホトランスフェラーゼ系酵素とは、phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system (PTS) を指す(本明細書中では、PTS酵素と記載することがある)。PTSは、下記スキーム2の代謝経路に示されるように、ヘキソース、ヘキシトール、二糖などの炭水化物を細胞内に取り込むための主要な仕組みである。PTSにおいて、炭水化物は細胞内に取り込まれると同時にリン酸エステルへと変換され、一方リン酸供与体であるPEPはピルビン酸へと変換される。

20

【0116】

3-ヒドロキシアジピン酸、 γ -ヒドロムコン酸、および/またはアジピン酸の生合成における中間体であるアセチル-CoAは、PTS酵素の機能によりPEPからピルビン酸を經由して合成することができる。

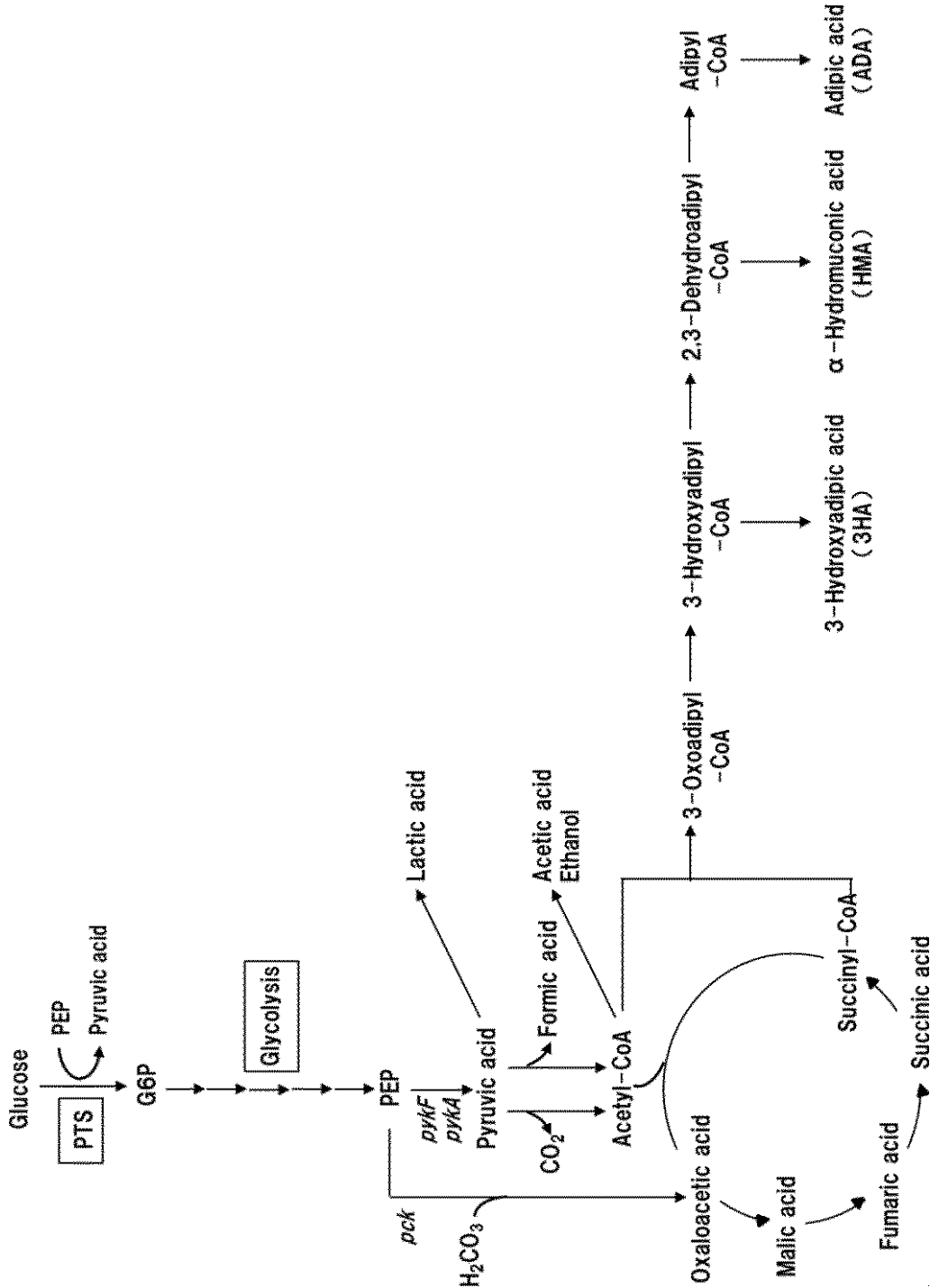
【0117】

30

40

50

【化2】



10

20

30

【0118】

PTS 酵素は、炭水化物の種類によらず機能する phosphoenolpyruvate sugar phosphotransferase enzyme I および phosphocarrier protein HPr の 2 種類の共通酵素と、特定の炭水化物に特異的な membrane-bound sugar specific permeases (enzyme II) で構成される。enzyme II はさらに sugar-specific IIA、IIB、および IIC component で構成される。enzyme II の酵素は生物種によって個別あるいは複数ドメインタンパクとしてつながった状態で存在する。

40

【0119】

微生物では、phosphoenolpyruvate sugar phosphot

50

ransferase enzyme IはptsI遺伝子、phosphocarrier protein HPrはptsH遺伝子、グルコース特異的IIAはcrr遺伝子、同じくグルコース特異的IIBおよびIICはptsG遺伝子にそれぞれコードされている。

【0120】

ptsG遺伝子がコードする酵素は、EC 2.7.1.199に分類され、protein-Npi-phosphohistidine-D-glucose phosphotransferaseと呼ばれ、Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655株由来のPtsG (NCBI-ProteinID: NP_415619)、Serratia grimesii NBRC13537株由来のPtsG (配列番号185)などが挙げられる。本発明で用いる微生物が有する遺伝子がコードするポリペプチドがPTS酵素であるかどうかは、NCBIやKEGGなどのウェブサイトでBLAST検索を行えばよい。

10

【0121】

本発明では、上記のPTS酵素遺伝子のうち、1種類を欠損させてもよいし、複数欠損させてもよい。上記のPTS酵素遺伝子のいずれを欠損させてもよいが、好ましくはグルコースの取り込みに関与する酵素遺伝子を欠損させることが好ましく、特にptsG遺伝子を欠損させることが好ましい。ptsG遺伝子の具体例には、Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655株由来のptsG (NCBI-GeneID: 945651)およびSerratia grimesii NBRC13537株由来のptsG (配列番号243)などが挙げられる。

20

【0122】

前述のとおり、大腸菌は3-ヒドロキシアジピン酸および-ヒドロムコン酸を製造する能力を有する微生物であるが、特表2008-527991号公報では、大腸菌のピルビン酸キナーゼをコードするpykFおよびpykA並びにホスホトランスフェラーゼ系酵素をコードするptsG遺伝子を欠損させた変異株を作製したこと、また当該変異株を嫌氣的条件で培養すると、コハク酸の収率が増加し、酢酸およびエタノールの収率が減少することが記載されている。ここで、酢酸およびエタノールは、上記スキーム2の代謝経路に示すように、アセチル-CoAから代謝される化合物である。つまり、特表2008-527991号公報では、大腸菌のptsG、pkF、pykA遺伝子を欠損させることにより、アセチル-CoAの供給量が低下し、酢酸およびエタノールの収率が低下したと推定される。

30

【0123】

一方、本発明の方法で製造する3-ヒドロキシアジピン酸、-ヒドロムコン酸および/またはアジピン酸は、前述のとおり、アセチル-CoAおよびスクシニル-CoAから反応Aによって生産される3-オキソアジピル-CoAから複数の反応を介して代謝される化合物である。よって、特表2008-527991号公報の記載から、ピルビン酸キナーゼとホスホトランスフェラーゼ系酵素の遺伝子を欠損させると、アセチル-CoAの供給量の低下により3-ヒドロキシアジピン酸、-ヒドロムコン酸および/またはアジピン酸の収率も低下することが予想される。しかし、本発明では、上記の予想に反して、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼの活性および3-オキソアジピル-CoAを還元して3-ヒドロキシアジピル-CoAを生成する反応を触媒する酵素の活性が強化された遺伝子改変微生物において、ピルビン酸キナーゼおよびホスホトランスフェラーゼ系酵素の遺伝子を欠損させることで、3-ヒドロキシアジピン酸、-ヒドロムコン酸および/またはアジピン酸の収率が向上し、かつ酢酸およびの収率も向上する。

40

【0124】

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

50

のいずれでも利用できる。

【0125】

発酵原料とは、当該遺伝子改変微生物が代謝し得る原料である。「代謝」とは、微生物が細胞外から取り入れた、あるいは細胞内で別の化学化合物より生じたある化学化合物が、酵素反応により別の化学化合物へと変換されることを指す。炭素源としては、糖類を好ましく用いることができる。糖類の具体例としては、グルコース、シュクロース、フルクトース、ガラクトース、マンノース、キシロース、アラビノース等の単糖類、これら単糖類が結合した二糖類、多糖類、およびこれらを含む澱粉糖化液、糖蜜、セルロース含有バイオマス糖化液などが挙げられる。

【0126】

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

【0127】

当該遺伝子改変微生物の培養に用いる窒素源としては、例えば、アンモニアガス、アンモニア水、アンモニウム塩類、尿素、硝酸塩類、その他補助的に使用される有機窒素源、例えば、油粕類、大豆加水分解液、カゼイン分解物、その他のアミノ酸、ビタミン類、コーンステープリカー、酵母または酵母エキス、肉エキス、ペプトン等のペプチド類、各種発酵菌体およびその加水分解物などが使用できる。培地中の窒素源の濃度は、特に限定されないが、好ましくは、0.1 g / L ~ 50 g / Lである。

【0128】

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

【0129】

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

【0130】

培養におけるpHの範囲は当該遺伝子改変微生物が生育することができれば特に制限はないが、好ましくはpH 5 ~ 8、より好ましくはpH 5.5 ~ 6.8である。

【0131】

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

【0132】

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

【0133】

前記微生物の培養物中に、3 - ヒドロキシアジピン酸、 γ - ヒドロムコン酸および/またはアジピン酸が回収可能な量まで生産された後、生産された当該生産物を回収することができる。生産された当該生産物の回収、例えば単離は、蓄積量が適度に高まった時点で培養を停止し、その培養物から、発酵生産物を採取する一般的な方法に準じて行うことができる。具体的には、遠心分離、ろ過などにより菌体を分離したのち、カラムクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、活性炭処理、結晶化、膜分離、蒸留などにより、当該生産物を培養物から単離することができる。より具体的には、当該生産物の塩に酸成分を添加して析出物を回収する方法、培養物を逆浸透膜やエバポレーターなどを用いた濃縮操作により水を除去して当該生産物の濃度を高めた後、冷却結晶化や断熱結晶化に

10

20

30

40

50

より当該生産物および/または当該生産物の塩の結晶を析出させ、遠心分離やろ過などにより当該生産物および/または当該生産物の塩の結晶を得る方法、培養物にアルコールを添加して当該生産物をエステルとした後、蒸留操作により当該生産物のエステルを回収後、加水分解により当該生産物を得る方法等を挙げることができるがこれらに限定されるものではない。また、これらの回収方法は生成物の物性などにより適当に選択して最適化することができる。

【実施例】

【0134】

以下、実施例を挙げて本発明を具体的に説明する。

【0135】

参考例1

3 - オキソアジピル - CoA および補酵素Aを生成する反応(反応A)を触媒する酵素、および3 - ヒドロキシアジピル - CoA から3 - ヒドロキシアジピン酸を生成する反応(反応E)かつ2, 3 - デヒドロアジピル - CoA から - ヒドロムコン酸を生成する反応(反応F)を触媒する酵素、および配列番号1、2、3、4、5、6、7に記載のポリペプチドを発現するプラスミドの作製

大腸菌内で自律複製可能なベクター pBBR1MCS-2 (ME Kovach, (1995), Gene 166: 175-176) を XhoI で切断し、pBBR1MCS-2 / XhoI を得た。当該ベクターに構成的な発現プロモーターを組み込むために、Escherichia coli K-12 MG1655 のゲノムDNA を鋳型として gapA (NCBI Gene ID: NC_000913.3) の上流域 200b (配列番号186) を PCR 増幅するためのプライマーを設計し(配列番号187、188)、常法に従って PCR 反応を行った。得られた断片および pBBR1MCS-2 / XhoI を、In-Fusion HD Cloning Kit (タカラバイオ株式会社製) を用いて連結し、大腸菌株 DH5 に導入した。得られた組換え大腸菌株から当該プラスミドを抽出し、常法により塩基配列を確認したプラスミドを pBBR1MCS-2::Pgap とした。続いて pBBR1MCS-2::Pgap を ScaI で切断し、pBBR1MCS-2::Pgap / ScaI を得た。反応Aを触媒する酵素をコードする遺伝子を増幅するために、Pseudomonas putida KT2440 株のゲノムDNA を鋳型としてアシルトランスフェラーゼ遺伝子 pcaF (NCBI Gene ID: 1041755、配列番号189) の全長を PCR 増幅するためのプライマーを設計し(配列番号190、191)、常法に従って PCR 反応を行った。得られた断片および pBBR1MCS-2::Pgap / ScaI を、In-Fusion HD Cloning Kit を用いて連結し、大腸菌株 DH5 に導入した。得られた組換え株から当該プラスミドを抽出し、常法により塩基配列を確認したプラスミドを pBBR1MCS-2::AT とした。続いて pBBR1MCS-2::AT を HpaI で切断し、pBBR1MCS-2::AT / HpaI を得た。反応Dおよび反応Eを触媒する酵素をコードする遺伝子を増幅するために、Pseudomonas putida KT2440 株のゲノムDNA を鋳型として CoA トランスフェラーゼ遺伝子 pcaI および pcaJ (NCBI Gene ID: 1046613、1046612、配列番号192、193) の全長を含む連続した配列を PCR 増幅するためのプライマーを設計し(配列番号194、195)、常法に従って PCR 反応を行った。得られた断片および pBBR1MCS-2::AT / HpaI を、In-Fusion HD Cloning Kit を用いて連結し、大腸菌株 DH5 に導入した。得られた組換え株から当該プラスミドを抽出し、常法により塩基配列を確認したプラスミドを pBBR1MCS-2::ATCT とした。

【0136】

pBBR1MCS-2::ATCT を ScaI で切断し、pBBR1MCS-2::ATCT / ScaI を得た。配列番号1のポリペプチドをコードする核酸を増幅するために、Serratia marcescens ATCC13880 株のゲノムDNA を鋳型として、配列番号87に記載の核酸を増幅するためのプライマーを設計し(配列番号19

10

20

30

40

50

6、197)、常法に従ってPCR反応を行った。配列番号2のポリペプチドをコードする核酸を増幅させるために、*Serratia nematodiphila* DSM 21420株のゲノムDNAを鋳型として、配列番号88に記載の核酸を増幅するためのプライマーを設計し(配列番号198、199)、常法に従ってPCR反応を行った。配列番号3のポリペプチドをコードする核酸を増幅させるために、*Serratia plymuthica* NBRC 102599株のゲノムDNAを鋳型として、配列番号89に記載の核酸を増幅するためのプライマーを設計し(配列番号200、201)、常法に従ってPCR反応を行った。配列番号4のポリペプチドをコードする核酸を増幅させるために、*Serratia proteamaculans* 568株のゲノムDNAを鋳型として、配列番号90に記載の核酸を増幅するためのプライマーを設計し(配列番号202、203)、常法に従ってPCR反応を行った。配列番号5のポリペプチドをコードする核酸を増幅させるために、*Serratia ureilytica* Lr5/4株のゲノムDNAを鋳型として、配列番号91に記載の核酸を増幅するためのプライマーを設計し(配列番号204、205)、常法に従ってPCR反応を行った。配列番号6のポリペプチドをコードする核酸を増幅させるために、*Serratia* sp. BW106株のゲノムDNAを鋳型として、配列番号92に記載の核酸を増幅するためのプライマーを設計し(配列番号206、207)、常法に従ってPCR反応を行った。配列番号7のポリペプチドをコードする核酸を増幅させるために、*Serratia liquefaciens* FK01株のゲノムDNAを鋳型として、配列番号93に記載の核酸を増幅するためのプライマーを設計し(配列番号208、209)、常法に従ってPCR反応を行った。得られたそれぞれの断片およびpBBR1MCS-2::ATCT/ScaIを、In-Fusion HD Cloning Kit(タカラバイオ株式会社製)を用いて連結し、大腸菌株DH5に導入した。得られた組換え株から当該プラスミドを抽出し、常法により塩基配列を確認した。

【0137】

配列番号1に記載のポリペプチドを発現するためのプラスミドを「pBBR1MCS-2::ATCTOR1」、配列番号2に記載のポリペプチドを発現するためのプラスミドを「pBBR1MCS-2::ATCTOR2」、配列番号3に記載のポリペプチドを発現するためのプラスミドを「pBBR1MCS-2::ATCTOR3」、配列番号4に記載のポリペプチドを発現するためのプラスミドを「pBBR1MCS-2::ATCTOR4」、配列番号5に記載のポリペプチドを発現するためのプラスミドを「pBBR1MCS-2::ATCTOR5」、配列番号6に記載のポリペプチドを発現するためのプラスミドを「pBBR1MCS-2::ATCTOR6」、配列番号7に記載のポリペプチドを発現するためのプラスミドを「pBBR1MCS-2::ATCTOR7」とし、これらのプラスミドについて表4に示す。

【0138】

10

20

30

40

50

【表 4】

プラスミド	由来生物	Gene ID	配列番号
pBBR1MCS-2::ATC TOR1	<i>Serratia marcescens</i> ATCC 13880	JMPQ01000047.1	87
pBBR1MCS-2::ATC TOR2	<i>Serratia nematodiphila</i> DSM21420	JPUX00000000.1	88
pBBR1MCS-2::ATC TOR3	<i>Serratia plymuthica</i> NBRC102599	BCTU01000013.1	89
pBBR1MCS-2::ATC TOR4	<i>Serratia proteamaculans</i> 568	CP000826.1	90
pBBR1MCS-2::ATC TOR5	<i>Serratia ureilytica</i> Lr5/4	JSFB01000001	91
pBBR1MCS-2::ATC TOR6	<i>Serratia</i> sp. BW106	MCGS01000002.1	92
pBBR1MCS-2::ATC TOR7	<i>Serratia liquefaciens</i> FK01	CP006252.1	93

10

【0139】

参考例 2

20

3 - ヒドロキシアジピル - CoA から 2 , 3 - デヒドロアジピル - CoA を生成する反応 (反応 C) を触媒する酵素を発現するためのプラスミドの作製

大腸菌内で自律複製可能な発現ベクター pMW119 (ニッポンジーン社製) を SacI で切断し、pMW119 / SacI を得た。当該ベクターに構成的な発現プロモーターを組み込むために、*Escherichia coli* K - 12 MG1655 のゲノム DNA を鋳型として gapA (NCBI Gene ID : NC_000913.3) の上流域 200b (配列番号 186) を PCR 増幅するためのプライマーを設計し (配列番号 210、211)、常法に従って PCR 反応を行った。得られた断片および pMW119 / SacI を、In-Fusion HD Cloning Kit (タカラバイオ株式会社製) を用いて連結し、大腸菌株 DH5 に導入した。得られた組換え大腸菌株から当該プラスミドを抽出し、常法により塩基配列を確認したプラスミドを pMW119 :: Pgap とした。続いて pMW119 :: Pgap を SphI で切断し、pMW119 :: Pgap / SphI を得た。反応 C を触媒する酵素をコードする遺伝子を増幅するために、*Pseudomonas putida* KT2440 株のゲノム DNA を鋳型としてエノイル - CoA ヒドラターゼ遺伝子 paaF (NCBI Gene ID : 1046932、配列番号 176) の全長を PCR 増幅するためのプライマーを設計し (配列番号 212、213)、常法に従って PCR 反応を行った。得られた断片および pMW119 :: Pgap / SphI を、In-Fusion HD Cloning Kit (タカラバイオ株式会社製) を用いて連結し、大腸菌株 DH5 に導入した。得られた組換え株から当該プラスミドを抽出し、常法により塩基配列を確認した。得られたプラスミドを「pMW119 :: EH」とした。

30

40

【0140】

参考例 3

アセチル - CoA およびスクシニル - CoA から 3 - オキソアジピル - CoA および補酵素 A を生成する反応 (反応 A) を触媒する酵素、およびアジピル - CoA からアジピン酸を生成する反応 (反応 G) を触媒する酵素、および配列番号 1、2、3、4、5、6、7、に記載のポリペプチドを発現するプラスミドの作製

反応 G を触媒する酵素をコードする遺伝子を増幅するために、*Acinetobacter baylyi* ADP1 株のゲノム DNA を鋳型として CoA トランスフェラーゼ遺伝子 dcaI および dcaJ (NCBI Gene ID : CR543861.1、配列番

50

号239、240)の全長を含む連続した配列をPCR増幅するためのプライマーを設計し(配列番号241、242)、常法に従ってPCR反応を行った。得られた断片および参考例1で作製したpBBR1MCS-2::ATCTOR1、pBBR1MCS-2::ATCTOR2、pBBR1MCS-2::ATCTOR3、pBBR1MCS-2::ATCTOR4、pBBR1MCS-2::ATCTOR5、pBBR1MCS-2::ATCTOR6、pBBR1MCS-2::ATCTOR7をそれぞれHpaIで切断して得られる断片を、In-Fusion HD Cloning Kitを用いて連結し、大腸菌株DH5に導入した。得られた組換え株から当該プラスミドを抽出し、常法により塩基配列を確認したプラスミドをそれぞれpBBR1MCS-2::ATCT2OR1、pBBR1MCS-2::ATCT2OR2、pBBR1MCS-2::ATCT2OR3、pBBR1MCS-2::ATCT2OR4、pBBR1MCS-2::ATCT2OR5、pBBR1MCS-2::ATCT2OR6、pBBR1MCS-2::ATCT2OR7とした。

10

【0141】

参考例4

3-ヒドロキシアジピル-CoAから2,3-デヒドロアジピル-CoAを生成する反応(反応C)および2,3-デヒドロアジピル-CoAからアジピル-CoAを生成する反応(反応D)を触媒する酵素を発現するためのプラスミドの作製

pMW119::EHをHindIIIで切断し、pMW119::EH/HindIIIを得た。反応Dを触媒する酵素をコードする遺伝子を増幅するために、Acinetobacter baylyi ADP1株由来のdcaA(NCBI-Protein ID: AAL09094.1、配列番号214)の全長をPCR増幅するためのプライマーを設計し(配列番号215、216)、常法に従ってPCR反応を行った。得られた断片およびpMW119::EH/HindIIIを、In-Fusion HD Cloning Kit(タカラバイオ株式会社製)を用いて連結し、大腸菌株DH5に導入した。得られた組換え株から当該プラスミドを抽出し、常法により塩基配列を確認したプラスミドをpMW119::EHERとした。

20

【0142】

参考例5

PEPカルボキシキナーゼ、3-オキソアジピル-CoAおよび補酵素Aを生成する反応(反応A)を触媒する酵素、および3-ヒドロキシアジピル-CoAから3-ヒドロキシアジピン酸を生成する反応(反応E)かつ2,3-デヒドロアジピル-CoAから3-ヒドロムコン酸を生成する反応(反応F)を触媒する酵素、および配列番号1、2、3、4、5、6、7に記載のポリペプチドを発現するプラスミドの作製

30

PEPカルボキシキナーゼを構成的に発現させるプロモーターを組み込むために、Escherichia coli K-12 MG1655のゲノムDNAを鋳型としてgapA(NCBI Gene ID: NC_000913.3)の上流域200b(配列番号186)をPCR増幅するためのプライマーを設計し(配列番号217、218)、常法に従ってPCR反応を行った。得られた断片および参考例1で作製したpBBR1MCS-2::ATCTOR1、pBBR1MCS-2::ATCTOR2、pBBR1MCS-2::ATCTOR3、pBBR1MCS-2::ATCTOR4、pBBR1MCS-2::ATCTOR5、pBBR1MCS-2::ATCTOR6、pBBR1MCS-2::ATCTOR7をそれぞれSacIで切断して得られる断片を、In-Fusion HD Cloning Kitを用いて連結し、大腸菌株DH5に導入した。得られた組換え株から当該プラスミドを抽出し、常法により塩基配列を確認したプラスミドをそれぞれpBBR1MCS-2::ATCTOR1Pgap、pBBR1MCS-2::ATCTOR2Pgap、pBBR1MCS-2::ATCTOR3Pgap、pBBR1MCS-2::ATCTOR4Pgap、pBBR1MCS-2::ATCTOR5Pgap、pBBR1MCS-2::ATCTOR6Pgap、pBBR1MCS-2::ATCTOR7Pgapとした。続いてPEPカルボキシキナーゼをコードする遺伝子

40

50

を増幅するために、*Serratia grimesii* NBRC 13537株のゲノムDNAを鋳型としてPEPカルボキシキナーゼ遺伝子(配列番号219)の全長を含む連続した配列をPCR増幅するためのプライマーを設計し(配列番号220、221)、常法に従ってPCR反応を行った。得られた断片およびpBBR1MCS-2::ATCTOR1Pgap、pBBR1MCS-2::ATCTOR2Pgap、pBBR1MCS-2::ATCTOR3Pgap、pBBR1MCS-2::ATCTOR4Pgap、pBBR1MCS-2::ATCTOR5Pgap、pBBR1MCS-2::ATCTOR6Pgap、pBBR1MCS-2::ATCTOR7PgapをそれぞれSacIで切断して得られる断片を、In-Fusion HD Cloning Kitを用いて連結し、大腸菌株DH5に導入した。得られた組換え株から当該プラスミドを抽出し、常法により塩基配列を確認したプラスミドをそれぞれpBBR1MCS-2::ATCTOR1PCK、pBBR1MCS-2::ATCTOR2PCK、pBBR1MCS-2::ATCTOR3PCK、pBBR1MCS-2::ATCTOR4PCK、pBBR1MCS-2::ATCTOR5PCK、pBBR1MCS-2::ATCTOR6PCK、pBBR1MCS-2::ATCTOR7PCKとした。

10

【0143】

参考例6

PEPカルボキシキナーゼ、アセチル-CoAおよびスクシニル-CoAから3-オキソアジピル-CoAおよび補酵素Aを生成する反応(反応A)を触媒する酵素、およびアジピル-CoAからアジピン酸を生成する反応(反応G)を触媒する酵素、および配列番号1、2、3、4、5、6、7、に記載のポリペプチドを発現するプラスミドの作製

20

参考例5と同様の方法およびプライマーを用いて、参考例3で作製したpBBR1MCS-2::ATCT2OR1、pBBR1MCS-2::ATCT2OR2、pBBR1MCS-2::ATCT2OR3、pBBR1MCS-2::ATCT2OR4、pBBR1MCS-2::ATCT2OR5、pBBR1MCS-2::ATCT2OR6、pBBR1MCS-2::ATCT2OR7に*Escherichia coli* K-12 MG1655のゲノムDNAを鋳型としてgapA(NCBI Gene ID: NC_000913.3)の上流域200bおよび*Serratia grimesii* NBRC 13537株由来のPEPカルボキシキナーゼ遺伝子を挿入した。得られたプラスミドをそれぞれpBBR1MCS-2::ATCT2OR1PCK、pBBR1MCS-2::ATCT2OR2PCK、pBBR1MCS-2::ATCT2OR3PCK、pBBR1MCS-2::ATCT2OR4PCK、pBBR1MCS-2::ATCT2OR5PCK、pBBR1MCS-2::ATCT2OR6PCK、pBBR1MCS-2::ATCT2OR7PCKとした。

30

【0144】

実施例1

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損したセラチア属微生物変異体の作製

セラチア属微生物のピルビン酸キナーゼをコードする遺伝子であるpykFおよびpykAを欠損させ、ピルビン酸キナーゼの機能が欠損したセラチア属微生物変異体を作製した。

40

【0145】

pykFおよびpykAの欠損方法は、Proc Natl Acad Sci USA. 2000 Jun 6; 97(12): 6640-6645.に記載の方法に従った。

【0146】

pykFを欠損したセラチア属微生物変異体の作製

pKD4を鋳型として、プライマーとして配列番号222および223のオリゴDNAを用いてPCRを行い、pykF欠損のための配列長1.6kbのPCR断片を得た。FRT recombinase発現プラスミドであるpKD46を、*Serratia grimesii* NBRC 13537株に導入し、アンピシリン耐性株を取得した。得られた株をアンピシリン500μg/mLを含む5mLのLB培地に植菌し、30℃で1日

50

振とう培養した。培養液 0.5 mL をアンピシリン 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ およびアラビノース 50 mM を含む 50 mL の LB 培地に植菌し、30 で 2 時間、回旋培養した。培養液を 20 分間氷冷したのち、菌体を 10% (w/w) グリセロールで 3 回洗浄した。洗浄後のペレットを 100 μL の 10% (w/w) グリセロールで懸濁し、5 μL の PCR 断片と混合したのちエレクトロポレーションキュベット内で 10 分間氷冷した。Gene pulser (Bio-rad 社製) を用いてエレクトロポレーションを実施した (3 kV、200、25 μF) 後、即座に 1 mL の SOC 培地を添加し、30 で 2 時間振とう培養した。全量をカナマイシン 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を含む LB 寒天培地に塗布し、30 で 1 日インキュベートした。得られたカナマイシン耐性株を用いてコロニーダイレクト PCR を行い、バンド長より目的遺伝子の欠損およびカナマイシン耐性遺伝子の挿入を確認した。プライマーは配列番号 224 および 226 のオリゴ DNA を使用した。

10

【0147】

続いて当該カナマイシン耐性株を 5 mL の LB 培地に植菌し、37 にて 2 回継代培養することで pKD46 を脱落させ、アンピシリン感受性株を得た。アンピシリン感受性株に pCP20 を導入し、再びアンピシリン耐性株を取得した。得られた株を 40 で培養した後にコロニーダイレクト PCR を行い、バンド長よりカナマイシン耐性遺伝子の脱落を確認した。プライマーは配列番号 225 および 226 のオリゴ DNA を使用した。カナマイシン感受性株を 5 mL の LB 培地に植菌し、37 にて 2 回継代培養することで pCP20 を脱落させた。得られた株を *Serratia grimesii* NBRC13537 pykF とした。

20

【0148】

pykA を欠損したセラチア属微生物変異体の作製

pKD4 を鋳型として、プライマーとして配列番号 227 および 228 のオリゴ DNA を用いて PCR を行い、配列長 1.6 kb の pykA 欠損用 PCR 断片を得た。

【0149】

pykF 欠損株の作製と同様の方法にて、*Serratia grimesii* NBRC13537 pykF 株の pykA を欠損させた。当該株に pKD46 を導入したのち、pykA 欠損用 PCR 断片を導入した。得られたカナマイシン耐性株を用いてコロニーダイレクト PCR を行い、バンド長より目的遺伝子の欠損およびカナマイシン耐性遺伝子の挿入を確認した。プライマーは配列番号 224 および 230 のオリゴ DNA を使用した。

30

【0150】

続いて pKD46 を脱落させ、アンピシリン感受性株を得た。アンピシリン感受性株に pCP20 を導入し、再びアンピシリン耐性株を取得した。得られた株を用いてコロニーダイレクト PCR を行い、バンド長よりカナマイシン耐性遺伝子の脱落を確認した。プライマーは配列番号 229 および 230 のオリゴ DNA を使用した。カナマイシン感受性株より pCP20 を脱落させた。得られた株を Sg PP とした。

【0151】

実施例 2

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損し、かつ PEP カルボキシキナーゼ、反応 A、B、E および F を触媒する酵素を発現するプラスミドを導入したセラチア属微生物変異体の作製

40

実施例 1 で作製した Sg PP に対して、参考例 1 で作製したプラスミドをそれぞれ導入し、セラチア属微生物変異体を作製した。

【0152】

Sg PP を 5 mL の LB 培地に植菌し、30 で 1 日振とう培養した。培養液 0.5 mL を 5 mL の LB 培地に植菌し、30 で 2 時間、振とう培養した。培養液を 20 分間氷冷したのち、菌体を 10% (w/w) グリセロールで 3 回洗浄した。洗浄後のペレットを 100 μL の 10% (w/w) グリセロールで懸濁し、1 μL の pBBR1MCS-2 : : ATCTOR1PCK、pBBR1MCS-2 : : ATCTOR2PCK、pBBR1MCS-2 : : ATCTOR3PCK、pBBR1MCS-2 : : ATCTOR4PCK、pBBR1MCS-2 : : ATCTOR5PCK、pBBR1MCS-2 : : ATC

50

TOR6PCK、またはpBBR1MCS-2::ATCTOR7PCKと混合したのちエレクトロポレーションキュベット内で10分間氷冷した。Gene pulser (Bio-rad社製)を用いてエレクトロポレーションを実施した(3kV、200、25μF)後、即座に1mLのSOC培地を添加し、30で1時間振とう培養した。50μLをカナマイシン25μg/mLを含むLB寒天培地に塗布し、30で1日インキュベートした。得られた株をそれぞれSg PP/3HA1PCK、Sg PP/3HA2PCK、Sg PP/3HA3PCK、Sg PP/3HA4PCK、Sg PP/3HA5PCK、Sg PP/3HA6PCK、Sg PP/3HA7PCKとした。

【0153】

参考例7

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損しておらず、かつPEPカルボキシキナーゼ、反応A、B、EおよびFを触媒する酵素を発現するプラスミドを導入したセラチア属微生物変異体の作製

実施例2と同様の方法にて、*Serratia grimesii* NBRC13537にpBBR1MCS-2::ATCTOR1PCK、pBBR1MCS-2::ATCTOR2PCK、pBBR1MCS-2::ATCTOR3PCK、pBBR1MCS-2::ATCTOR4PCK、pBBR1MCS-2::ATCTOR5PCK、pBBR1MCS-2::ATCTOR6PCK、またはpBBR1MCS-2::ATCTOR7PCKを導入した。またコントロールとして、*Serratia grimesii* NBRC13537に空ベクターであるpBBR1MCS-2を導入した株を作製した。得られた株をそれぞれSg/3HA1PCK、Sg/3HA2PCK、Sg/3HA3PCK、Sg/3HA4PCK、Sg/3HA5PCK、Sg/3HA6PCK、Sg/3HA7PCK、Sg/pBBR(ネガティブコントロール)とした。

【0154】

参考例8

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損し、かつ反応A、B、EおよびFを触媒する酵素を発現するプラスミドを導入したセラチア属微生物変異体の作製

実施例2と同様の方法にて、Sg PPにpBBR1MCS-2::ATCTOR1、pBBR1MCS-2::ATCTOR2、pBBR1MCS-2::ATCTOR3、pBBR1MCS-2::ATCTOR4、pBBR1MCS-2::ATCTOR5、pBBR1MCS-2::ATCTOR6、またはpBBR1MCS-2::ATCTOR7を導入した。またコントロールとして、Sg PPに空ベクターであるpBBR1MCS-2を導入した株を作製した。得られた株をそれぞれSg PP/3HA1、Sg PP/3HA2、Sg PP/3HA3、Sg PP/3HA4、Sg PP/3HA5、Sg PP/3HA6、Sg PP/3HA7、Sg PP/pBBR(ネガティブコントロール)とした。

【0155】

実施例3

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損し、かつPEPカルボキシキナーゼの活性が強化されたセラチア属微生物変異体を用いた3-ヒドロキシアジピン酸および-ヒドロムコン酸の生産試験

実施例2で作製したセラチア属微生物変異体を用いて、3-ヒドロキシアジピン酸および-ヒドロムコン酸の生産試験を行った。

【0156】

pH7に調整した培地I(Bactotripton(Difco Laboratories社製)10g/L、Bacto酵母エキス(Difco Laboratories社製)5g/L、塩化ナトリウム5g/L、カナマイシン25μg/mL)5mL(18mmガラス試験管、アルミ栓)に、実施例2で作製した変異体を一白金耳植菌し、30、120min-1で24時間振とう培養した。当該培養液0.25mLをpH6.5に調整した培地II(グルコース50g/L、硫酸アンモニウム1g/L、リン酸カリウ

10

20

30

40

50

ム 50 mM、硫酸マグネシウム 0.025 g/L、硫酸鉄 0.0625 mg/L、硫酸マンガン 2.7 mg/L、塩化カルシウム 0.33 mg/L、塩化ナトリウム 1.25 g/L、Bactoトリプトン 2.5 g/L、Bacto酵母エキス 1.25 g/L、カナマイシン 25 µg/mL) 5 mL (18 mm ガラス試験管、アルミ栓) に添加し、30、120 min⁻¹ で 24 時間振とう培養した。

【0157】

基質および生成物の定量分析

当該培養液より菌体を遠心分離した上清を Millex-GV (0.22 µm、PVD F、Merck 社製) を用いて膜処理し、透過液を以下の方法で分析することで培養上清中に蓄積した 3-ヒドロキシアジピン酸、⁻ヒドロムコン酸および他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。さらに、その結果を元に以下の式(2)を用いて算出した 3-ヒドロキシアジピン酸および⁻ヒドロムコン酸の収率を表5に示す。

10

【0158】

ただし、LC-MS/MSによる定量分析において 0.1 mg/L 以下であった場合は検出限界以下とし、表中には以下 N.D. と表す。

【0159】

収率(%) = 生成物の生成量(mol) / 糖の消費量(mol) × 100・・・式(2)。

【0160】

20

LC-MS/MSによる3-ヒドロキシアジピン酸および⁻ヒドロムコン酸の定量分析・HPLC: 1290 Infinity (Agilent Technologies 社製)

カラム: Synergi hydro-RP (Phenomenex 社製)、長さ 100 mm、内径 3 mm、粒径 2.5 µm

移動相: 0.1% ギ酸水溶液 / メタノール = 70 / 30

流速: 0.3 mL / 分

カラム温度: 40

LC 検出器: 1260 DAD VL+ (210 nm)

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

30

イオン化法: ESI ネガティブモード。

【0161】

HPLCによる有機酸の定量分析

・HPLC: LC-10A (島津製作所製)

カラム: Shim-pack SPR-H (島津ジーエルシー社製)、長さ 250 mm、内径 7.8 mm、粒径 8 µm

Shim-pack SCR-101H (島津ジーエルシー社製) 長さ 250 mm、内径 7.8 mm、粒径 10 µm

移動相: 5 mM p-トルエンスルホン酸

40

反応液: 5 mM p-トルエンスルホン酸、0.1 mM EDTA、20 mM Bis-Tris

流速: 0.8 mL / min

カラム温度: 45

検出器: CDD-10Avp (島津製作所製)

【0162】

HPLCによる糖およびアルコールの定量分析

・HPLC: Shimazu Prominence (島津製作所製)

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

50

移動相：0.05 M 硫酸水溶液

流速：0.6 mL/min

カラム温度：65

検出器：RID-10A（島津製作所製）。

【0163】

比較例 1

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損しておらず、かつPEPカルボキシキナーゼの活性が強化されたセラチア属微生物変異体を用いた3-ヒドロキシアジピン酸および -ヒドロムコン酸の生産試験

実施例3と同様の方法にて、参考例7で作製した変異体を培養した。培養上清中に蓄積した3-ヒドロキシアジピン酸、 -ヒドロムコン酸および他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。さらに、その結果を元に式(2)を用いて算出した3-ヒドロキシアジピン酸および -ヒドロムコン酸の収率を表5に示す。

10

【0164】

比較例 2

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損し、かつPEPカルボキシキナーゼの活性が強化されていないセラチア属微生物変異体を用いた3-ヒドロキシアジピン酸および -ヒドロムコン酸の生産試験

実施例3と同様の方法にて、参考例8で作製した変異体を培養した。培養上清中に蓄積した3-ヒドロキシアジピン酸、 -ヒドロムコン酸および他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。さらに、その結果を元に式(2)を用いて算出した3-ヒドロキシアジピン酸および -ヒドロムコン酸の収率を表5に示す。

20

【0165】

比較例1および2の結果と実施例3の結果を比較すると、セラチア属微生物のピルビン酸キナーゼの機能を欠損させ、かつPEPカルボキシキナーゼの活性を強化することにより、3-ヒドロキシアジピン酸および -ヒドロムコン酸の収率が向上することがわかった。

【0166】

30

40

50

【表 5】

	株	3HA収率(%)	HMA収率(%)
実施例3	Sg Δ PP/3HA1PCK	6.84	0.103
	Sg Δ PP/3HA2 PCK	7.91	0.132
	Sg Δ PP/3HA3 PCK	7.43	0.148
	Sg Δ PP/3HA4 PCK	7.12	0.103
	Sg Δ PP/3HA5 PCK	7.03	0.127
	Sg Δ PP/3HA6 PCK	8.13	0.149
	Sg Δ PP/3HA7 PCK	6.70	0.127
比較例1	Sg/pBBR	N.D.	N.D.
	Sg/3HA1 PCK	0.568	0.0206
	Sg/3HA2 PCK	0.857	0.0336
	Sg/3HA3 PCK	0.684	0.0330
	Sg/3HA4 PCK	0.635	0.0298
	Sg/3HA5 PCK	0.733	0.0290
	Sg/3HA6 PCK	0.750	0.0260
	Sg/3HA7 PCK	0.685	0.0165
比較例2	Sg Δ PP/pBBR	0.0362	0.0113
	Sg Δ PP/3HA1	3.47	0.0782
	Sg Δ PP/3HA2	5.78	0.0960
	Sg Δ PP/3HA3	5.24	0.0846
	Sg Δ PP/3HA4	5.10	0.0909
	Sg Δ PP/3HA5	6.21	0.107
	Sg Δ PP/3HA6	6.28	0.103
	Sg Δ PP/3HA7	4.96	0.0638

10

20

【0167】

実施例 4

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損した大腸菌変異体の作製

大腸菌のピルビン酸キナーゼをコードする遺伝子である *pykF* および *pykA* を欠損させ、ピルビン酸キナーゼの機能が欠損した大腸菌変異体を作製した。*pykF* および *pykA* の欠損方法は、*Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Jun 6; 97(12): 6640-6645. に記載の方法に従った。

【0168】

pykF を欠損した大腸菌変異体の作製

pKD4 を鋳型として、プライマーとして配列番号 231 および 232 のオリゴDNA を用いてPCRを行い、*pykF* 欠損のための配列長 1.6 kb のPCR断片を得た。

【0169】

FRT recombinase 発現プラスミドである *pKD46* を、*Escherichia coli* MG1655 株に導入し、アンピシリン耐性株を取得した。得られた株をアンピシリン 100 μg/mL を含む 5 mL のLB培地に植菌し、30 °C で1日振とう培養した。培養液 0.5 mL をアンピシリン 100 μg/mL およびアラビノース 50 mM を含む 50 mL のLB培地に植菌し、30 °C で2時間、回旋培養した。培養液を20分間氷冷したのち、菌体を10% (w/w) グリセロールで3回洗浄した。洗浄後のペレットを100 μL の10% (w/w) グリセロールで懸濁し、5 μL のPCR断片と混合したのちエレクトロポレーションキュベット内で10分間氷冷した。*Gene pulser* (Bio-rad社製) を用いてエレクトロポレーションを実施した(3 kV、200 μs、25 μF) 後、即座に1 mL のSOC培地を添加し、30 °C で2時間振とう培養し

30

40

50

た。全量をカナマイシン 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を含む LB 寒天培地に塗布し、30 で1日インキュベートした。得られたカナマイシン耐性株を用いてコロニーダイレクトPCRを行い、バンド長より目的遺伝子の欠損およびカナマイシン耐性遺伝子の挿入を確認した。プライマーは配列番号 224 および 234 のオリゴDNAを使用した。

【0170】

続いて当該カナマイシン耐性株を5 mLのLB培地に植菌し、37 にて2回継代培養することでpKD46を脱落させ、アンピシリン感受性株を得た。アンピシリン感受性株にpCP20を導入し、再びアンピシリン耐性株を取得した。得られた株を40 で培養した後にコロニーダイレクトPCRを行い、バンド長よりカナマイシン耐性遺伝子の脱落を確認した。プライマーは配列番号 233 および 234 のオリゴDNAを使用した。カナマイシン感受性株を5 mLのLB培地に植菌し、37 にて2回継代培養することでpCP20を脱落させた。得られた株を*Escherichia coli* MG1655 pykFとした。

10

【0171】

pykAを欠損した大腸菌変異体の作製

pKD4を鋳型として、プライマーとして配列番号 235 および 236 のオリゴDNAを用いてPCRを行い、配列長 1.6 kbのpykA欠損用PCR断片を得た。

【0172】

pykF欠損株の作製と同様の方法にて、*Escherichia coli* MG1655 pykF株のpykAを欠損させた。当該株にpKD46を導入したのち、pykA欠損用PCR断片を導入した。得られたカナマイシン耐性株を用いてコロニーダイレクトPCRを行い、バンド長より目的遺伝子の欠損およびカナマイシン耐性遺伝子の挿入を確認した。プライマーは配列番号 224 および 238 のオリゴDNAを使用した。

20

【0173】

続いてpKD46を脱落させ、アンピシリン感受性株を得た。アンピシリン感受性株にpCP20を導入し、再びアンピシリン耐性株を取得した。得られた株を用いてコロニーダイレクトPCRを行い、バンド長よりカナマイシン耐性遺伝子の脱落を確認した。プライマーは配列番号 237 および 238 のオリゴDNAを使用した。カナマイシン感受性株よりpCP20を脱落させた。得られた株をEc PPとした。

【0174】

30

実施例 5

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損し、かつPEPカルボキシキナーゼ、反応A、B、EおよびFを触媒する酵素を発現するプラスミドを導入した大腸菌変異体の作製

実施例 4で作製したEc PPに対して、参考例 1で作製したプラスミドをそれぞれ導入し、大腸菌変異体を作製した。

【0175】

Ec PPを5 mLのLB培地に植菌し、30 で1日振とう培養した。培養液 0.5 mLを5 mLのLB培地に植菌し、30 で2時間、振とう培養した。培養液を20分間氷冷したのち、菌体を10% (w/w) グリセロールで3回洗浄した。洗浄後のペレットを100 μL の10% (w/w) グリセロールで懸濁し、1 μL のpBBR1MCS-2 : : ATCTOR1PCK、pBBR1MCS-2 : : ATCTOR2PCK、pBBR1MCS-2 : : ATCTOR3PCK、pBBR1MCS-2 : : ATCTOR4PCK、pBBR1MCS-2 : : ATCTOR5PCK、pBBR1MCS-2 : : ATCTOR6PCK、またはpBBR1MCS-2 : : ATCTOR7PCKと混合したのちエレクトロポレーションキュベット内で10分間氷冷した。Gene pulser (Bio-rad社製)を用いてエレクトロポレーションを実施した(3 kV、200 、25 μF)後、即座に1 mLのSOC培地を添加し、30 で1時間振とう培養した。50 μL をカナマイシン 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を含むLB寒天培地に塗布し、30 で1日インキュベートした。得られた株をそれぞれEc PP/3HA1PCK、Ec PP/3HA2PCK、Ec PP/3HA3PCK、Ec PP/3HA4PCK、Ec PP/3H

40

50

A5PCK、Ec PP/3HA6PCK、Ec PP/3HA7PCKとした。

【0176】

参考例9

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損しておらず、かつPEPカルボキシキナーゼ、反応A、B、EおよびFを触媒する酵素を発現するプラスミドを導入した大腸菌変異体の作製

実施例5と同様の方法にて、Escherichia coli MG1655にpBBR1MCS-2::ATCTOR1PCK、pBBR1MCS-2::ATCTOR2PCK、pBBR1MCS-2::ATCTOR3PCK、pBBR1MCS-2::ATCTOR4PCK、pBBR1MCS-2::ATCTOR5PCK、pBBR1MCS-2::ATCTOR6PCK、またはpBBR1MCS-2::ATCTOR7PCKを導入した。またコントロールとして、Escherichia coli MG1655に空ベクターであるpBBR1MCS-2を導入した株を作製した。得られた株をそれぞれEc/3HA1PCK、Ec/3HA2PCK、Ec/3HA3PCK、Ec/3HA4PCK、Ec/3HA5PCK、Ec/3HA6PCK、Ec/3HA7PCK、Ec/pBBR(ネガティブコントロール)とした。

10

【0177】

参考例10

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損し、かつ反応A、B、EおよびFを触媒する酵素を発現するプラスミドを導入した大腸菌変異体の作製

実施例5と同様の方法にて、Ec PPにpBBR1MCS-2::ATCTOR1、pBBR1MCS-2::ATCTOR2、pBBR1MCS-2::ATCTOR3、pBBR1MCS-2::ATCTOR4、pBBR1MCS-2::ATCTOR5、pBBR1MCS-2::ATCTOR6、またはpBBR1MCS-2::ATCTOR7を導入した。またコントロールとして、Ec PPに空ベクターであるpBBR1MCS-2を導入した株を作製した。得られた株をそれぞれEc PP/3HA1、Ec PP/3HA2、Ec PP/3HA3、Ec PP/3HA4、Ec PP/3HA5、Ec PP/3HA6、Ec PP/3HA7、Ec PP/pBBR(ネガティブコントロール)とした。

20

【0178】

実施例6

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損し、かつPEPカルボキシキナーゼの活性が強化された大腸菌変異体を用いた3-ヒドロキシアジピン酸および-ヒドロムコン酸の生産試験

実施例3と同様の方法にて、実施例5で作製した変異体を培養した。培養上清中に蓄積した3-ヒドロキシアジピン酸、-ヒドロムコン酸および他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。その値を元に式(2)を用いて算出した3-ヒドロキシアジピン酸および-ヒドロムコン酸の収率を表6に示す。

30

【0179】

比較例3

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損しておらず、かつPEPカルボキシキナーゼの活性が強化された大腸菌変異体を用いた3-ヒドロキシアジピン酸および-ヒドロムコン酸の生産試験

40

実施例3と同様の方法にて、参考例9で作製した変異体を培養した。培養上清中に蓄積した3-ヒドロキシアジピン酸、-ヒドロムコン酸および他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。その値を元に式(2)を用いて算出した3-ヒドロキシアジピン酸および-ヒドロムコン酸の収率を表6に示す。

【0180】

比較例4

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損しており、かつPEPカルボキシキナーゼの活性が強化されていない大腸菌変異体を用いた3-ヒドロキシアジピン酸および-ヒドロムコン酸の生産試験

50

実施例 3 と同様の方法にて、参考例 10 で作製した変異体を培養した。培養上清中に蓄積した 3 - ヒドロキシアジピン酸、 - ヒドロムコン酸および他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。さらに、その結果を元に式 (2) を用いて算出した 3 - ヒドロキシアジピン酸および - ヒドロムコン酸の収率を表 6 に示す。

【 0 1 8 1 】

比較例 3 および 4 の結果と実施例 6 の結果を比較すると、大腸菌のピルビン酸キナーゼの機能を欠損させ、かつ P E P カルボキシキナーゼの活性を強化することにより、3 - ヒドロキシアジピン酸および - ヒドロムコン酸の収率が向上することがわかった。

【 0 1 8 2 】

【表 6】

	株	3HA収率(%)	HMA収率(%)
実施例5	Ec Δ PP/3HA1PCK	4.76	0.0370
	Ec Δ PP/3HA2 PCK	5.31	0.0380
	Ec Δ PP/3HA3 PCK	4.35	0.0323
	Ec Δ PP/3HA4 PCK	4.60	0.0375
	Ec Δ PP/3HA5 PCK	5.14	0.0389
	Ec Δ PP/3HA6 PCK	5.54	0.0389
	Ec Δ PP/3HA7 PCK	4.65	0.0362
比較例3	Ec/pBBR	N.D.	N.D.
	Ec/3HA1 PCK	1.08	0.0124
	Ec/3HA2 PCK	1.91	0.0116
	Ec/3HA3 PCK	2.15	0.0124
	Ec/3HA4 PCK	1.44	0.0147
	Ec/3HA5 PCK	1.72	0.0109
	Ec/3HA6 PCK	1.86	0.0148
比較例4	Ec Δ PP/pBBR	0.0427	0.0132
	Ec Δ PP/3HA1	2.54	0.0292
	Ec Δ PP/3HA2	3.97	0.0333
	Ec Δ PP/3HA3	3.64	0.0273
	Ec Δ PP/3HA4	2.86	0.0257
	Ec Δ PP/3HA5	3.67	0.0269
	Ec Δ PP/3HA6	3.57	0.0348
	Ec Δ PP/3HA7	3.13	0.0274

【 0 1 8 3 】

実施例 7

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損し、かつ P E P カルボキシキナーゼ、反応 A、B、C、E および F を触媒する酵素を発現するプラスミドを導入したセラチア属微生物変異体の作製

実施例 2 で作製したセラチア属微生物変異体それぞれに対して、参考例 2 で作製したプラスミド p M W 1 1 9 : : E H を導入し、セラチア属微生物変異体を作製した。

【 0 1 8 4 】

S g P P / 3 H A 1 P C K、S g P P / 3 H A 2 P C K、S g P P / 3 H A 3 P C K、S g P P / 3 H A 4 P C K、S g P P / 3 H A 5 P C K、S g P P / 3 H A 6 P C K、S g P P / 3 H A 7 P C K を、カナマイシン 25 μ g / m L を含む 5 m L の L B 培地に植菌し、30 で 1 日 振とう培養した。培養液 0 . 5 m L をカナマイシン 25 μ g / m L を含む 5 m L の L B 培地に植菌し、30 で 2 時間、振とう培養した。培養液を 20 分間氷冷したのち、菌体を 10 % (w / w) グリセロールで 3 回洗浄した。洗浄後

のペレットを100 μ Lの10% (w/w) グリセロールで懸濁し、1 μ LのpMW119::EHと混合したのちエレクトロポレーションキュベット内で10分間氷冷した。Gene pulser (Bio-rad社製)を用いてエレクトロポレーションを実施した(3kV、200、25 μ F)後、即座に1mLのSOC培地を添加し、30で1時間振とう培養した。50 μ Lをアンピシリン500 μ g/mLおよびカナマイシン25 μ g/mLを含むLB寒天培地に塗布し、30で1日インキュベートした。得られた株をそれぞれSg PP/HMA1PCK、Sg PP/HMA2PCK、Sg PP/HMA3PCK、Sg PP/HMA4PCK、Sg PP/HMA5PCK、Sg PP/HMA6PCK、Sg PP/HMA7PCKとした。

【0185】

参考例11

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損しておらず、かつPEPカルボキシキナーゼ、反応A、B、C、EおよびFを触媒する酵素を発現するプラスミドを導入したセラチア属微生物変異体の作製

実施例7と同様の方法にて、Sg/3HA1PCK、Sg/3HA2PCK、Sg/3HA3PCK、Sg/3HA4PCK、Sg/3HA5PCK、Sg/3HA6PCK、Sg/3HA7PCKにpMW119::EHを導入した。またコントロールとして、Sg/pBBRに空ベクターであるpMW119を導入した株を作製した。得られた株をそれぞれSg/HMA1PCK、Sg/HMA2PCK、Sg/HMA3PCK、Sg/HMA4PCK、Sg/HMA5PCK、Sg/HMA6PCK、Sg/HMA7PCK、Sg/pBBRpMW(ネガティブコントロール)とした。

【0186】

参考例12

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損し、かつ反応A、B、C、EおよびFを触媒する酵素を発現するプラスミドを導入したセラチア属微生物変異体の作製

実施例7と同様の方法にて、Sg PP/3HA1、Sg PP/3HA2、Sg PP/3HA3、Sg PP/3HA4、Sg PP/3HA5、Sg PP/3HA6、Sg PP/3HA7にpMW119::EHを導入した。またコントロールとして、Sg PP/pBBRに空ベクターであるpMW119を導入した株を作製した。得られた株をそれぞれSg PP/HMA1、Sg PP/HMA2、Sg PP/HMA3、Sg PP/HMA4、Sg PP/HMA5、Sg PP/HMA6、Sg PP/HMA7、Sg PP/pBBRpMW(ネガティブコントロール)とした。

【0187】

実施例8

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損し、かつPEPカルボキシキナーゼの活性が強化されたセラチア属微生物変異体を用いた - ヒドロムコン酸の生産試験

培地にアンピシリンを500 μ g/mLとなるように添加した以外は実施例3と同様の方法にて、実施例7で作製した変異体を培養した。培養上清中に蓄積した - ヒドロムコン酸および他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。その値を元に式(2)を用いて算出した - ヒドロムコン酸の収率を表7に示す。

【0188】

比較例5

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損しておらず、かつPEPカルボキシキナーゼの活性が強化されたセラチア属微生物変異体を用いた - ヒドロムコン酸の生産試験

実施例8と同様の方法にて、参考例11で作製した変異体を培養した。培養上清中に蓄積した - ヒドロムコン酸および他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。その値を元に式(2)を用いて算出した - ヒドロムコン酸の収率を表7に示す。

【0189】

比較例6

10

20

30

40

50

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損し、かつPEPカルボキシキナーゼの活性が強化されていないセラチア属微生物変異体を用いた - ヒドロムコン酸の生産試験

実施例8と同様の方法にて、参考例12で作製した変異体を培養した。培養上清中に蓄積した - ヒドロムコン酸および他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。さらに、その結果を元に式(2)を用いて算出した - ヒドロムコン酸の収率を表7に示す。

【0190】

比較例5および6の結果と実施例8の結果を比較すると、セラチア属微生物のピルビン酸キナーゼ遺伝子を欠損させ、かつPEPカルボキシキナーゼの活性を強化することにより、 - ヒドロムコン酸の収率が向上することがわかった。

10

【0191】

【表7】

	株	HMA収率(%)
実施例8	Sg Δ PP/HMA1PCK	0.182
	Sg Δ PP/HMA2 PCK	0.205
	Sg Δ PP/HMA3 PCK	0.218
	Sg Δ PP/HMA4 PCK	0.221
	Sg Δ PP/HMA5 PCK	0.246
	Sg Δ PP/HMA6 PCK	0.294
	Sg Δ PP/HMA7 PCK	0.216
比較例5	Sg/pBBRpMW	N.D.
	Sg/HMA1 PCK	0.0355
	Sg/HMA2 PCK	0.0420
	Sg/HMA3 PCK	0.0310
	Sg/HMA4 PCK	0.0376
	Sg/HMA5 PCK	0.0423
	Sg/HMA6 PCK	0.0445
比較例6	Sg Δ PP/pBBRpMW	0.0119
	Sg Δ PP/HMA1	0.156
	Sg Δ PP/HMA2	0.179
	Sg Δ PP/HMA3	0.153
	Sg Δ PP/HMA4	0.118
	Sg Δ PP/HMA5	0.217
	Sg Δ PP/HMA6	0.241
	Sg Δ PP/HMA7	0.140

20

30

【0192】

実施例9

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損し、かつPEPカルボキシキナーゼ、反応A、B、C、EおよびFを触媒する酵素を発現するプラスミドを導入した大腸菌変異体の作製

実施例5で作製した大腸菌変異体それぞれに対して、参考例2で作製したプラスミドpMW119::EHを導入し、大腸菌変異体を作製した。

【0193】

Ec PP/3HA1PCK、Ec PP/3HA2PCK、Ec PP/3HA3PCK、Ec PP/3HA4PCK、Ec PP/3HA5PCK、Ec PP/3HA6PCK、Ec PP/3HA7PCKを、カナマイシン25 μg/mLを含む5 mLのLB培地に植菌し、30 で1日振とう培養した。培養液0.5 mLをカナマイシン25

40

50

$\mu\text{g}/\text{mL}$ を含む 5mL のLB培地に植菌し、 30°C で2時間、振とう培養した。培養液を20分間氷冷したのち、菌体を 10% (w/w)グリセロールで3回洗浄した。洗浄後のペレットを $100\mu\text{L}$ の 10% (w/w)グリセロールで懸濁し、 $1\mu\text{L}$ のpMW119::EHと混合したのちエレクトロポレーションキュベット内で10分間氷冷した。Gene pulser (Bio-rad社製)を用いてエレクトロポレーションを実施した(3kV 、 $200\mu\text{s}$ 、 $25\mu\text{F}$)後、即座に 1mL のSOC培地を添加し、 30°C で1時間振とう培養した。 $50\mu\text{L}$ をアンピシリン $100\mu\text{g}/\text{mL}$ およびカナマイシン $25\mu\text{g}/\text{mL}$ を含むLB寒天培地に塗布し、 30°C で1日インキュベートした。得られた株をそれぞれEc PP/HMA1PCK、Ec PP/HMA2PCK、Ec PP/HMA3PCK、Ec PP/HMA4PCK、Ec PP/HMA5PCK、Ec PP/HMA6PCK、Ec PP/HMA7PCKとした。

10

【0194】

参考例13

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損しておらず、かつPEPカルボキシキナーゼ、反応A、B、C、EおよびFを触媒する酵素を発現するプラスミドを導入した大腸菌変異体の作製
実施例9と同様の方法にて、Ec/3HA1PCK、Ec/3HA2PCK、Ec/3HA3PCK、Ec/3HA4PCK、Ec/3HA5PCK、Ec/3HA6PCK、Ec/3HA7PCKにpMW119::EHを導入した。またコントロールとして、Ec/pBBRに空ベクターであるpMW119を導入した株を作製した。得られた株をそれぞれEc/HMA1PCK、Ec/HMA2PCK、Ec/HMA3PCK、Ec/HMA4PCK、Ec/HMA5PCK、Ec/HMA6PCK、Ec/HMA7PCK、Ec/pBBRpMW(ネガティブコントロール)とした。

20

【0195】

参考例14

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損し、かつ反応A、B、C、EおよびFを触媒する酵素を発現するプラスミドを導入した大腸菌変異体の作製

実施例9と同様の方法にて、Ec PP/3HA1、Ec PP/3HA2、Ec PP/3HA3、Ec PP/3HA4、Ec PP/3HA5、Ec PP/3HA6、Ec PP/3HA7にpMW119::EHを導入した。またコントロールとして、Ec PP/pBBRに空ベクターであるpMW119を導入した株を作製した。得られた株をそれぞれEc PP/HMA1、Ec PP/HMA2、Ec PP/HMA3、Ec PP/HMA4、Ec PP/HMA5、Ec PP/HMA6、Ec PP/HMA7、Ec PP/pBBRpMW(ネガティブコントロール)とした。

30

【0196】

実施例10

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損し、かつPEPカルボキシキナーゼの活性が強化された大腸菌変異体を用いた - ヒドロムコン酸の生産試験

培地にアンピシリンを $100\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように添加した以外は実施例6と同様の方法にて、実施例9で作製した変異体を培養した。培養上清中に蓄積した - ヒドロムコン酸および他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。その値を元に式(2)を用いて算出した - ヒドロムコン酸の収率を表8に示す。

40

【0197】

比較例7

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損しておらず、かつPEPカルボキシキナーゼの活性が強化された大腸菌変異体を用いた - ヒドロムコン酸の生産試験

実施例10と同様の方法にて、参考例13で作製した変異体を培養した。培養上清中に蓄積した - ヒドロムコン酸および他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。その値を元に式(2)を用いて算出した - ヒドロムコン酸の収率を表8に示す。

【0198】

50

比較例 8

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損し、かつ P E P カルボキシキナーゼの活性が強化されていない大腸菌変異体を用いた - ヒドロムコン酸の生産試験

実施例 10 と同様の方法にて、参考例 14 で作製した変異体を培養した。培養上清中に蓄積した - ヒドロムコン酸および他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。さらに、その結果を元に式 (2) を用いて算出した - ヒドロムコン酸の収率を表 8 に示す。

【 0 1 9 9 】

比較例 7 および 8 の結果と実施例 10 の結果を比較すると、大腸菌のピルビン酸キナーゼの機能を欠損させ、かつ P E P カルボキシキナーゼの活性を強化することにより、 - ヒドロムコン酸の収率が向上することがわかった。

【 0 2 0 0 】

【表 8】

	株	HMA収率(%)
実施例10	Ec Δ PP/HMA1PCK	0.154
	Ec Δ PP/HMA2 PCK	0.176
	Ec Δ PP/HMA3 PCK	0.174
	Ec Δ PP/HMA4 PCK	0.125
	Ec Δ PP/HMA5 PCK	0.213
	Ec Δ PP/HMA6 PCK	0.214
	Ec Δ PP/HMA7 PCK	0.191
比較例7	Ec/pBBRpMW	N.D.
	Ec/HMA1 PCK	0.0257
	Ec/HMA2 PCK	0.0459
	Ec/HMA3 PCK	0.0409
	Ec/HMA4 PCK	0.0459
	Ec/HMA5 PCK	0.0448
	Ec/HMA6 PCK	0.0462
比較例8	Ec Δ PP/pBBRpMW	0.0167
	Ec Δ PP/HMA1	0.0511
	Ec Δ PP/HMA2	0.0818
	Ec Δ PP/HMA3	0.0717
	Ec Δ PP/HMA4	0.0688
	Ec Δ PP/HMA5	0.0765
	Ec Δ PP/HMA6	0.0761
Ec Δ PP/HMA7	0.0599	

【 0 2 0 1 】

実施例 11

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損し、かつ P E P カルボキシキナーゼ、反応 A、B、C、D、および G を触媒する酵素を発現するプラスミドを導入したセラチア属微生物変異体の作製

実施例 2 と同様の方法にて、S g P P に対して参考例 6 で作成した p B B R 1 M C S - 2 : : A T C T 2 O R 1 P C K、p B B R 1 M C S - 2 : : A T C T 2 O R 2 P C K、p B B R 1 M C S - 2 : : A T C T 2 O R 3 P C K、p B B R 1 M C S - 2 : : A T C T 2 O R 4 P C K、p B B R 1 M C S - 2 : : A T C T 2 O R 5 P C K、p B B R 1 M C S - 2 : : A T C T 2 O R 6 P C K、または p B B R 1 M C S - 2 : : A T C T 2 O R 7 P

CKを導入した。得られた変異体それぞれに対して、実施例7と同様の方法にて、参考例4で作製したプラスミドpMW119::EHERを導入し、セラチア属微生物変異体を作製した。得られた株をそれぞれSg PP/ADA1PCK、Sg PP/ADA2PCK、Sg PP/ADA3PCK、Sg PP/ADA4PCK、Sg PP/ADA5PCK、Sg PP/ADA6PCK、Sg PP/ADA7PCKとした。

【0202】

参考例15

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損しておらず、かつPEPカルボキシキナーゼ、反応A、B、C、D、およびGを触媒する酵素を発現するプラスミドを導入したセラチア属微生物変異体の作製

実施例2と同様の方法にて、*Serratia grimesii* NBRC13537に対して参考例6で作成したpBBR1MCS-2::ATCT2OR1PCK、pBBR1MCS-2::ATCT2OR2PCK、pBBR1MCS-2::ATCT2OR3PCK、pBBR1MCS-2::ATCT2OR4PCK、pBBR1MCS-2::ATCT2OR5PCK、pBBR1MCS-2::ATCT2OR6PCK、またはpBBR1MCS-2::ATCT2OR7PCKを導入した。得られた変異体それぞれに対して、実施例7と同様の方法にて、参考例4で作製したプラスミドpMW119::EHERを導入し、セラチア属微生物変異体を作製した。得られた株をそれぞれSg/ADA1PCK、Sg/ADA2PCK、Sg/ADA3PCK、Sg/ADA4PCK、Sg/ADA5PCK、Sg/ADA6PCK、Sg/ADA7PCKとした。

【0203】

参考例16

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損し、かつ反応A、B、C、D、およびGを触媒する酵素を発現するプラスミドを導入したセラチア属微生物変異体の作製

実施例2と同様の方法にて、Sg PPに対して参考例3で作成したpBBR1MCS-2::ATCT2OR1、pBBR1MCS-2::ATCT2OR2、pBBR1MCS-2::ATCT2OR3、pBBR1MCS-2::ATCT2OR4、pBBR1MCS-2::ATCT2OR5、pBBR1MCS-2::ATCT2OR6、またはpBBR1MCS-2::ATCT2OR7を導入した。得られた変異体それぞれに対して、実施例7と同様の方法にて、参考例4で作製したプラスミドpMW119::EHERを導入し、セラチア属微生物変異体を作製した。得られた株をそれぞれSg PP/ADA1、Sg PP/ADA2、Sg PP/ADA3、Sg PP/ADA4、Sg PP/ADA5、Sg PP/ADA6、Sg PP/ADA7とした。

【0204】

実施例12

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損し、かつPEPカルボキシキナーゼの活性が強化されたセラチア属微生物変異体を用いたアジピン酸の生産試験

培地にアンピシリンを500μg/mLとなるように添加した以外は実施例3と同様の方法にて、実施例11で作製した変異体を培養した。培養上清中に蓄積したアジピン酸および他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。なおアジピン酸の定量はLC-MS/MSを用いて3-ヒドロキシアジピン酸および-ヒドロムコン酸と同様の条件にて行った。その値を元に式(2)を用いて算出したアジピン収率を表9に示す。

【0205】

比較例9

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損しておらず、かつPEPカルボキシキナーゼの活性が強化されたセラチア属微生物変異体を用いたアジピン酸の生産試験

実施例12と同様の方法にて、参考例15で作製した変異体およびSg/pBBRpMWを培養した。培養上清中に蓄積したアジピン酸および他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。その値を元に式(2)を用いて算出したアジピン酸

10

20

30

40

50

の収率を表 9 に示す。

【 0 2 0 6 】

比較例 1 0

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損し、かつ P E P カルボキシキナーゼの活性が強化されていないセラチア属微生物変異体を用いたアジピン酸の生産試験

実施例 1 2 と同様の方法にて、参考例 1 6 で作製した変異体および S g P P / p B B R p M W を培養した。培養上清中に蓄積したアジピン酸および他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。さらに、その結果を元に式 (2) を用いて算出したアジピンの収率を表 9 に示す。

【 0 2 0 7 】

比較例 9 および 1 0 の結果と実施例 1 2 の結果を比較すると、セラチア属微生物のピルビン酸キナーゼの機能を欠損させ、かつ P E P カルボキシキナーゼの活性を強化することにより、アジピン酸の収率が向上することがわかった。

【 0 2 0 8 】

【表 9】

	株	ADA収率(%)
実施例12	SgΔPP/ADA1PCK	0.170
	SgΔPP/ ADA 2 PCK	0.187
	SgΔPP/ ADA 3 PCK	0.176
	SgΔPP/ ADA 4 PCK	0.168
	SgΔPP/ ADA 5 PCK	0.172
	SgΔPP/ ADA 6 PCK	0.205
	SgΔPP/ ADA 7 PCK	0.159
比較例9	Sg/pBBRpMW	N.D.
	Sg/ ADA 1 PCK	0.0170
	Sg/ ADA 2 PCK	0.0229
	Sg/ ADA 3 PCK	0.0177
	Sg/ ADA 4 PCK	0.0171
	Sg/ ADA 5 PCK	0.0221
	Sg/ ADA 6 PCK	0.0185
比較例10	SgΔPP/pBBRpMW	N.D.
	SgΔPP/ ADA 1	0.0783
	SgΔPP/ ADA 2	0.110
	SgΔPP/ ADA 3	0.0861
	SgΔPP/ ADA 4	0.116
	SgΔPP/ ADA 5	0.108
	SgΔPP/ ADA 6	0.136
	SgΔPP/ ADA 7	0.0958

【 0 2 0 9 】

実施例 1 3

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損し、かつ P E P カルボキシキナーゼ、反応 A、B、C、D、および G を触媒する酵素を発現するプラスミドを導入した大腸菌変異体の作製

実施例 5 と同様の方法にて、E c P P に対して参考例 6 で作成した p B B R 1 M C S - 2 : : A T C T 2 O R 1 P C K、p B B R 1 M C S - 2 : : A T C T 2 O R 2 P C K、p B B R 1 M C S - 2 : : A T C T 2 O R 3 P C K、p B B R 1 M C S - 2 : : A T C T 2 O R 4 P C K、p B B R 1 M C S - 2 : : A T C T 2 O R 5 P C K、p B B R 1 M C S

10

20

30

40

50

- 2 : : A T C T 2 O R 6 P C K、または p B B R 1 M C S - 2 : : A T C T 2 O R 7 P C K を導入した。得られた変異体それぞれに対して、実施例 9 と同様の方法にて、参考例 4 で作製したプラスミド p M W 1 1 9 : : E H E R を導入し、変異体を作製した。得られた株をそれぞれ E c P P / A D A 1 P C K、E c P P / A D A 2 P C K、E c P P / A D A 3 P C K、E c P P / A D A 4 P C K、E c P P / A D A 5 P C K、E c P P / A D A 6 P C K、E c P P / A D A 7 P C K とした。

【 0 2 1 0 】

参考例 1 7

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損しておらず、かつ P E P カルボキシキナーゼ、反応 A、B、C、D、および G を触媒する酵素を発現するプラスミドを導入した大腸菌変異体の作製

実施例 5 と同様の方法にて、E s c h e r i c h i a c o l i M G 1 6 5 5 に対して参考例 6 で作成した p B B R 1 M C S - 2 : : A T C T 2 O R 1 P C K、p B B R 1 M C S - 2 : : A T C T 2 O R 2 P C K、p B B R 1 M C S - 2 : : A T C T 2 O R 3 P C K、p B B R 1 M C S - 2 : : A T C T 2 O R 4 P C K、p B B R 1 M C S - 2 : : A T C T 2 O R 5 P C K、p B B R 1 M C S - 2 : : A T C T 2 O R 6 P C K、または p B B R 1 M C S - 2 : : A T C T 2 O R 7 P C K を導入した。得られた変異体それぞれに対して、実施例 9 と同様の方法にて、参考例 4 で作製したプラスミド p M W 1 1 9 : : E H E R を導入し、変異体を作製した。得られた株をそれぞれ E c / A D A 1 P C K、E c / A D A 2 P C K、E c / A D A 3 P C K、E c / A D A 4 P C K、E c / A D A 5 P C K、E c / A D A 6 P C K、E c / A D A 7 P C K とした。

【 0 2 1 1 】

参考例 1 8

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損し、かつ反応 A、B、C、D、および G を触媒する酵素を発現するプラスミドを導入した大腸菌変異体の作製

実施例 5 と同様の方法にて、E c P P に対して参考例 3 で作成した p B B R 1 M C S - 2 : : A T C T 2 O R 1、p B B R 1 M C S - 2 : : A T C T 2 O R 2、p B B R 1 M C S - 2 : : A T C T 2 O R 3、p B B R 1 M C S - 2 : : A T C T 2 O R 4、p B B R 1 M C S - 2 : : A T C T 2 O R 5、p B B R 1 M C S - 2 : : A T C T 2 O R 6、または p B B R 1 M C S - 2 : : A T C T 2 O R 7 を導入した。得られた変異体それぞれに対して、実施例 9 と同様の方法にて、参考例 4 で作製したプラスミド p M W 1 1 9 : : E H E R を導入し、変異体を作製した。得られた株をそれぞれ E c P P / A D A 1、E c P P / A D A 2、E c P P / A D A 3、E c P P / A D A 4、E c P P / A D A 5、E c P P / A D A 6、E c P P / A D A 7 とした。

【 0 2 1 2 】

実施例 1 4

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損し、かつ P E P カルボキシキナーゼの活性が強化された大腸菌の変異体を用いたアジピン酸の生産試験

培地にアンピシリンを 5 0 0 μ g / m L となるように添加した以外は実施例 6 と同様の方法にて、実施例 1 3 で作製した変異体を培養した。培養上清中に蓄積したアジピン酸および他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。なおアジピン酸の定量は L C - M S / M S を用いて 3 - ヒドロキシアジピン酸および - ヒドロムコン酸と同様の条件にて行った。その値を元に式 (2) を用いて算出したアジピン収率を表 1 0 に示す。

【 0 2 1 3 】

比較例 1 1

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損しておらず、かつ P E P カルボキシキナーゼの活性が強化された大腸菌変異体を用いたアジピン酸の生産試験

実施例 1 4 と同様の方法にて、参考例 1 7 で作製した変異体を培養した。培養上清中に蓄積したアジピン酸および他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。その値を元に式 (2) を用いて算出したアジピン酸の収率を表 1 0 に示す。

【 0 2 1 4 】

比較例 1 2

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損し、かつ P E P カルボキシキナーゼの活性が強化されていない大腸菌変異体を用いたアジピン酸の生産試験

実施例 1 4 と同様の方法にて、参考例 1 8 で作製した変異体を培養した。培養上清中に蓄積したアジピン酸および他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。さらに、その結果を元に式 (2) を用いて算出したアジピンの収率を表 1 0 に示す。

【 0 2 1 5 】

比較例 1 1 および 1 2 の結果と実施例 1 4 の結果を比較すると、大腸菌のピルビン酸キナーゼの機能を欠損させ、かつ P E P カルボキシキナーゼの活性を強化することにより、アジピン酸の収率が向上することがわかった。

【 0 2 1 6 】

【表 1 0】

	株	ADA収率(%)
実施例14	Ec Δ PP/ADA1PCK	0.0374
	Ec Δ PP/ ADA 2 PCK	0.0479
	Ec Δ PP/ ADA 3 PCK	0.0391
	Ec Δ PP/ ADA 4 PCK	0.0372
	Ec Δ PP/ ADA 5 PCK	0.0436
	Ec Δ PP/ ADA 6 PCK	0.0500
	Ec Δ PP/ ADA 7 PCK	0.0345
比較例11	Ec/pBBRpMW	N.D.
	Ec/ ADA 1 PCK	0.0109
	Ec/ ADA 2 PCK	0.0115
	Ec/ ADA 3 PCK	0.00993
	Ec/ ADA 4 PCK	0.0131
	Ec/ ADA 5 PCK	0.00920
	Ec/ ADA 6 PCK	0.0104
	Ec/ ADA 7 PCK	0.0113
比較例12	Ec Δ PP/pBBRpMW	N.D.
	Ec Δ PP/ ADA 1	0.0213
	Ec Δ PP/ ADA 2	0.0338
	Ec Δ PP/ ADA 3	0.0293
	Ec Δ PP/ ADA 4	0.0315
	Ec Δ PP/ ADA 5	0.0382
	Ec Δ PP/ ADA 6	0.0407
	Ec Δ PP/ ADA 7	0.0235

【 0 2 1 7 】

実施例 1 5

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損し、かつ P E P カルボキシキナーゼの活性が強化されたセラチア属微生物変異体を用いた 3 - ヒドロキシアジピン酸および - ヒドロムコン酸の生産試験 2

実施例 2 で作製したセラチア属微生物変異体を用いて、嫌気条件下での 3 - ヒドロキシアジピン酸および - ヒドロムコン酸の生産試験を行った。

【 0 2 1 8 】

培地 I I を用いた培養を静置にて行った以外は実施例 3 と同様の方法にて、実施例 2 で

作製したセラチア属微生物変異体を培養した。培養上清中に蓄積した3-ヒドロキシアジピン酸および-ヒドロムコン酸および他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。その値を元に式(2)を用いて算出した3-ヒドロキシアジピン酸および-ヒドロムコン酸の収率を表11に示す。

【0219】

比較例13

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損しておらず、かつPEPカルボキシキナーゼの活性が強化されたセラチア属微生物変異体を用いた3-ヒドロキシアジピン酸および-ヒドロムコン酸の生産試験2

実施例15と同様の方法にて、参考例7で作製した変異体を培養した。培養上清中に蓄積した3-ヒドロキシアジピン酸および-ヒドロムコン酸および他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。その値を元に式(2)を用いて算出した3-ヒドロキシアジピン酸および-ヒドロムコン酸の収率を表11に示す。

10

【0220】

比較例14

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損しており、かつPEPカルボキシキナーゼの活性が強化されていないセラチア属微生物変異体を用いた3-ヒドロキシアジピン酸および-ヒドロムコン酸の生産試験2

実施例15と同様の方法にて、参考例8で作製した変異体を培養した。培養上清中に蓄積した3-ヒドロキシアジピン酸および-ヒドロムコン酸および他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。その値を元に式(2)を用いて算出した3-ヒドロキシアジピン酸および-ヒドロムコン酸の収率を表11に示す。

20

【0221】

比較例13および14の結果と実施例15の結果を比較すると、セラチア属微生物のピルビン酸キナーゼの機能を欠損させ、かつPEPカルボキシキナーゼの活性を強化することにより、嫌気条件下でも3-ヒドロキシアジピン酸および-ヒドロムコン酸の収率が向上することがわかった。

【0222】

30

40

50

【表 1 1】

	株	3HA収率(%)	HMA収率(%)
実施例15	SgΔPP/3HA1PCK	6.22	0.233
	SgΔPP/3HA2 PCK	7.34	0.239
	SgΔPP/3HA3 PCK	7.30	0.245
	SgΔPP/3HA4 PCK	7.50	0.267
	SgΔPP/3HA5 PCK	6.45	0.233
	SgΔPP/3HA6 PCK	6.70	0.256
	SgΔPP/3HA7 PCK	6.85	0.224
比較例13	Sg/pBBR	N.D.	N.D.
	Sg/3HA1 PCK	1.14	0.0345
	Sg/3HA2 PCK	1.71	0.0415
	Sg/3HA3 PCK	1.33	0.0337
	Sg/3HA4 PCK	1.37	0.0378
	Sg/3HA5 PCK	1.59	0.3750
	Sg/3HA6 PCK	2.07	0.0452
比較例14	SgΔPP/pBBR	0.0485	0.0224
	SgΔPP/3HA1	4.84	0.159
	SgΔPP/3HA2	6.07	0.171
	SgΔPP/3HA3	5.99	0.143
	SgΔPP/3HA4	5.30	0.195
	SgΔPP/3HA5	5.84	0.180
	SgΔPP/3HA6	6.02	0.202
SgΔPP/3HA7	5.98	0.160	

10

20

【0 2 2 3】

実施例 1 6

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損した大腸菌変異体を用いた 3 - ヒドロキシアジピン酸および - ヒドロムコン酸の生産試験 2

実施例 5 で作製した大腸菌変異体を用いて、嫌気条件下での 3 - ヒドロキシアジピン酸および - ヒドロムコン酸の生産試験を行った。

【0 2 2 4】

培地 I I を用いた培養を静置にて行った以外は実施例 6 と同様の方法にて、実施例 5 で作製した大腸菌変異体を培養した。培養上清中に蓄積した 3 - ヒドロキシアジピン酸および - ヒドロムコン酸および他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。その値を元に式 (2) を用いて算出した 3 - ヒドロキシアジピン酸および - ヒドロムコン酸の収率を表 1 2 に示す。

40

【0 2 2 5】

比較例 1 5

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損しておらず、かつ P E P カルボキシキナーゼの活性が強化された大腸菌変異体を用いた 3 - ヒドロキシアジピン酸および - ヒドロムコン酸の生産試験 2

実施例 1 6 と同様の方法にて、参考例 9 で作製した変異体を培養した。培養上清中に蓄積した 3 - ヒドロキシアジピン酸および - ヒドロムコン酸および他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。その値を元に式 (2) を用いて算出した 3 - ヒドロキシアジピン酸および - ヒドロムコン酸の収率を表 1 2 に示す。

【0 2 2 6】

50

比較例 1 6

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損し、かつ P E P カルボキシキナーゼの活性が強化されていない大腸菌変異体を用いた 3 - ヒドロキシアジピン酸および - ヒドロムコン酸の生産試験 2

実施例 1 6 と同様の方法にて、参考例 1 0 で作製した変異体を培養した。培養上清中に蓄積した 3 - ヒドロキシアジピン酸および - ヒドロムコン酸および他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。その値を元に式 (2) を用いて算出した 3 - ヒドロキシアジピン酸および - ヒドロムコン酸の収率を表 1 2 に示す。

【 0 2 2 7 】

比較例 1 5 および 1 6 の結果と実施例 1 6 の結果を比較すると、大腸菌のピルビン酸キナーゼの機能を欠損させ、かつ P E P カルボキシキナーゼの活性を強化することにより、嫌気条件下でも 3 - ヒドロキシアジピン酸および - ヒドロムコン酸の収率が向上することがわかった。

【 0 2 2 8 】

【表 1 2】

	株	3HA収率(%)	HMA収率(%)
実施例16	Ec Δ PP/3HA1 PCK	15.6	0.0289
	Ec Δ PP/3HA2 PCK	16.8	0.0334
	Ec Δ PP/3HA3 PCK	15.5	0.0355
	Ec Δ PP/3HA4 PCK	15.8	0.0295
	Ec Δ PP/3HA5 PCK	16.2	0.0326
	Ec Δ PP/3HA6 PCK	17.2	0.0279
	Ec Δ PP/3HA7 PCK	16.4	0.0270
比較例15	Ec/pBBR	N.D.	N.D.
	Ec/3HA1 PCK	0.963	0.0116
	Ec/3HA2 PCK	1.46	0.0103
	Ec/3HA3 PCK	1.34	0.0106
	Ec/3HA4 PCK	1.09	0.0102
	Ec/3HA5 PCK	1.49	0.0120
	Ec/3HA6 PCK	1.20	0.1120
比較例16	Ec Δ PP/pBBR	0.0669	0.0113
	Ec Δ PP/3HA1	13.2	0.0213
	Ec Δ PP/3HA2	14.9	0.0277
	Ec Δ PP/3HA3	13.9	0.0268
	Ec Δ PP/3HA4	14.1	0.0224
	Ec Δ PP/3HA5	14.3	0.0259
	Ec Δ PP/3HA6	14.7	0.0226
	Ec Δ PP/3HA7	13.2	0.0213

【 0 2 2 9 】

実施例 1 7

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損し、かつ P E P カルボキシキナーゼの活性が強化されたセラチア属微生物変異体を用いたアジピン酸の生産試験 2

実施例 1 1 で作製したセラチア属微生物変異体を用いて、嫌気条件下でのアジピン酸の生産試験を行った。

【 0 2 3 0 】

培地 I I を用いた培養を静置にて行った以外は実施例 1 2 と同様の方法にて、実施例 1

10

20

30

40

50

1で作製したセラチア属微生物変異体を培養した。培養上清中に蓄積したアジピン酸および他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。その値を元に式(2)を用いて算出したアジピン酸の収率を表13に示す。

【0231】

比較例17

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損しておらず、かつPEPカルボキシキナーゼの活性が強化されたセラチア属微生物変異体を用いたアジピン酸の生産試験2

実施例17と同様の方法にて、参考例15で作製した変異体を培養した。培養上清中に蓄積したアジピン酸および他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。その値を元に式(2)を用いて算出したアジピン酸の収率を表13に示す。

10

【0232】

比較例18

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損しており、かつPEPカルボキシキナーゼの活性が強化されていないセラチア属微生物変異体を用いたアジピン酸の生産試験2

実施例17と同様の方法にて、参考例16で作製した変異体を培養した。培養上清中に蓄積したアジピン酸および他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。その値を元に式(2)を用いて算出したアジピン酸の収率を表13に示す。

【0233】

比較例17および18の結果と実施例17の結果を比較すると、セラチア属微生物のピルビン酸キナーゼの機能を欠損させ、かつPEPカルボキシキナーゼの活性を強化することにより、嫌気条件下でもアジピン酸の収率が向上することがわかった。

20

【0234】

【表13】

	株	ADA収率(%)
実施例17	SgΔPP/ADA1PCK	0.0699
	SgΔPP/ ADA 2 PCK	0.0720
	SgΔPP/ ADA 3 PCK	0.0591
	SgΔPP/ ADA 4 PCK	0.0613
	SgΔPP/ ADA 5 PCK	0.0628
	SgΔPP/ ADA 6 PCK	0.0637
	SgΔPP/ ADA 7 PCK	0.0518
比較例17	Sg/pBBRpMW	N.D.
	Sg/ ADA 1 PCK	0.0102
	Sg/ ADA 2 PCK	0.0123
	Sg/ ADA 3 PCK	0.0129
	Sg/ ADA 4 PCK	0.0122
	Sg/ ADA 5 PCK	0.0107
	Sg/ ADA 6 PCK	0.0103
比較例18	SgΔPP/pBBRpMW	N.D.
	SgΔPP/ ADA 1	0.0359
	SgΔPP/ ADA 2	0.0480
	SgΔPP/ ADA 3	0.0379
	SgΔPP/ ADA 4	0.0395
	SgΔPP/ ADA 5	0.0431
	SgΔPP/ ADA 6	0.0490
SgΔPP/ ADA 7	0.0375	

30

40

50

【 0 2 3 5 】

実施例 1 8

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損した大腸菌変異体を用いたアジピン酸の生産試験 2

実施例 1 3 で作製した大腸菌変異体を用いて、嫌気条件下でのアジピン酸の生産試験を行った。培地 I I を用いた培養を静置にて行った以外は実施例 1 4 と同様の方法にて、実施例 1 3 で作製した大腸菌変異体を培養した。培養上清中に蓄積したアジピン酸および他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。その値を元に式 (2) を用いて算出したアジピン酸の収率を表 1 4 に示す。

【 0 2 3 6 】

比較例 1 9

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損しておらず、かつ P E P カルボキシキナーゼの活性が強化された大腸菌変異体を用いたアジピン酸の生産試験 2

実施例 1 8 と同様の方法にて、参考例 1 7 で作製した変異体を培養した。培養上清中に蓄積したアジピン酸および他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。その値を元に式 (2) を用いて算出したアジピン酸の収率を表 1 4 に示す。

【 0 2 3 7 】

比較例 2 0

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損し、かつ P E P カルボキシキナーゼの活性が強化されていない大腸菌変異体を用いたアジピン酸の生産試験 2

実施例 1 8 と同様の方法にて、参考例 1 8 で作製した変異体を培養した。培養上清中に蓄積したアジピン酸および他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。その値を元に式 (2) を用いて算出したアジピン酸の収率を表 1 4 に示す。

【 0 2 3 8 】

比較例 1 9 および 2 0 の結果と実施例 1 8 の結果を比較すると、大腸菌のピルビン酸キナーゼの機能を欠損させ、かつ P E P カルボキシキナーゼの活性を強化することにより、嫌気条件下でもアジピン酸の収率が向上することがわかった。

【 0 2 3 9 】

10

20

30

40

50

【表 1 4】

	株	ADA収率(%)
実施例18	Ec ΔPP/ADA1PCK	0.0311
	Ec ΔPP/ ADA 2 PCK	0.0384
	Ec ΔPP/ ADA 3 PCK	0.0304
	Ec ΔPP/ ADA 4 PCK	0.0274
	Ec ΔPP/ ADA 5 PCK	0.0254
	Ec ΔPP/ ADA 6 PCK	0.0345
	Ec ΔPP/ ADA 7 PCK	0.0324
比較例19	Ec/pBBRpMW	N.D.
	Ec/ ADA 1 PCK	0.0112
	Ec/ ADA 2 PCK	0.0123
	Ec/ ADA 3 PCK	0.0103
	Ec/ ADA 4 PCK	0.00990
	Ec/ ADA 5 PCK	0.0109
	Ec/ ADA 6 PCK	0.0151
比較例20	Ec ΔPP/pBBRpMW	N.D.
	Ec ΔPP/ ADA 1	0.0255
	Ec ΔPP/ ADA 2	0.0254
	Ec ΔPP/ ADA 3	0.0269
	Ec ΔPP/ ADA 4	0.0248
	Ec ΔPP/ ADA 5	0.0212
	Ec ΔPP/ ADA 6	0.0278
	Ec ΔPP/ ADA 7	0.0212

10

20

【0240】

参考例 1 9

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損しておらず、かつ反応A、B、EおよびFを触媒する酵素を発現するプラスミドを導入したセラチア属微生物変異体の作製

実施例2と同様の方法にて、*Serratia grimesii* NBRC13537にpBBR1MCS-2(コントロール)、pBBR1MCS-2::ATCTOR1、pBBR1MCS-2::ATCTOR2、pBBR1MCS-2::ATCTOR3、pBBR1MCS-2::ATCTOR4、pBBR1MCS-2::ATCTOR5、pBBR1MCS-2::ATCTOR6、またはpBBR1MCS-2::ATCTOR7を導入した。得られた株をそれぞれSg/pBBR(ネガティブコントロール)、Sg/3HA1、Sg/3HA2、Sg/3HA3、Sg/3HA4、Sg/3HA5、Sg/3HA6、Sg/3HA7とした。

【0241】

比較例 2 1

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損していないセラチア属微生物変異体を用いた3-ヒドロキシアジピン酸および -ヒドロムコン酸の生産試験

実施例3と同様の方法にて、参考例19で作製したセラチア属微生物変異体を培養した。培養上清中に蓄積した3-ヒドロキシアジピン酸、 -ヒドロムコン酸および他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。さらに、その結果を元に上記式(2)を用いて算出した3-ヒドロキシアジピン酸および -ヒドロムコン酸の収率を表15に示す。

【0242】

30

40

50

本比較例 2 1 の結果と比較例 1 の結果を比較すると、ピルビン酸キナーゼの機能を欠損させていないセラチア属微生物の P E P カルボキシキナーゼの活性を強化した場合は、強化していない場合と比べて 3 - ヒドロキシアジピン酸および - ヒドロムコン酸の収率が低下することがわかった。

【 0 2 4 3 】

【表 1 5 】

	株	3HA収率(%)	HMA収率(%)
比較例21	Sg/pBBR	N.D.	N.D.
	Sg/3HA1	0.784	0.0293
	Sg/3HA2	1.15	0.0470
	Sg/3HA3	0.942	0.0461
	Sg/3HA4	0.875	0.0418
	Sg/3HA5	1.01	0.0529
	Sg/3HA6	1.03	0.0366
	Sg/3HA7	0.943	0.0237

10

【 0 2 4 4 】

参考例 2 0

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損しておらず、かつ反応 A、B、E および F を触媒する酵素を発現するプラスミドを導入した大腸菌変異体の作製

20

実施例 5 と同様の方法にて、*Escherichia coli* MG1655 に pBBR1MCS-2 (コントロール)、pBBR1MCS-2::ATCTOR1、pBBR1MCS-2::ATCTOR2、pBBR1MCS-2::ATCTOR3、pBBR1MCS-2::ATCTOR4、pBBR1MCS-2::ATCTOR5、pBBR1MCS-2::ATCTOR6、または pBBR1MCS-2::ATCTOR7 を導入した。得られた株をそれぞれ Ec/pBBR (ネガティブコントロール)、Ec/3HA1、Ec/3HA2、Ec/3HA3、Ec/3HA4、Ec/3HA5、Ec/3HA6、Ec/3HA7 とした。

【 0 2 4 5 】

30

比較例 2 2

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損していない大腸菌の変異体を用いた 3 - ヒドロキシアジピン酸および - ヒドロムコン酸の生産試験

実施例 6 と同様の方法にて、参考例 2 0 で作製した変異体を培養した。培養上清中に蓄積した 3 - ヒドロキシアジピン酸、 - ヒドロムコン酸および他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。その値を元に上記式 (2) を用いて算出した 3 - ヒドロキシアジピン酸および - ヒドロムコン酸の収率を表 1 6 に示す。

【 0 2 4 6 】

本比較例 2 2 の結果と比較例 3 の結果を比較すると、ピルビン酸キナーゼの機能を欠損させていない大腸菌の P E P カルボキシキナーゼの活性を強化した場合は、強化していない場合と比べて 3 - ヒドロキシアジピン酸および - ヒドロムコン酸の収率が低下することがわかった。

40

【 0 2 4 7 】

50

【表 1 6】

	株	3HA収率(%)	HMA収率(%)
比較例22	Ec/pBBR	N.D.	N.D.
	Ec/3HA1	1.48	0.0172
	Ec/3HA2	2.59	0.0160
	Ec/3HA3	2.64	0.0167
	Ec/3HA4	1.82	0.0186
	Ec/3HA5	2.47	0.0166
	Ec/3HA6	2.66	0.0228
	Ec/3HA7	1.78	0.0172

10

【0248】

参考例 2 1

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損しておらず、かつ反応 A、B、C、E および F を触媒する酵素を発現するプラスミドを導入したセラチア属微生物変異体の作製

実施例 7 と同様の方法にて、Sg / pBBR、Sg / 3HA1、Sg / 3HA2、Sg / 3HA3、Sg / 3HA4、Sg / 3HA5、Sg / 3HA6、Sg / 3HA7 に pMW119 (コントロール)、または pMW119 : : EH を導入した。得られた株をそれぞれ Sg / pBBRpMW (ネガティブコントロール)、Sg / HMA1、Sg / HMA2、Sg / HMA3、Sg / HMA4、Sg / HMA5、Sg / HMA6、Sg / HMA7 とした。

20

【0249】

比較例 2 3

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損していないセラチア属微生物の変異体を用いた - ヒドロムコン酸の生産試験

実施例 8 と同様の方法にて、参考例 2 1 で作製した変異体を培養した。培養上清中に蓄積した - ヒドロムコン酸および他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。その値を元に上記式 (2) を用いて算出した - ヒドロムコン酸の収率を表 1 7 に示す。

30

【0250】

本比較例 2 3 の結果と比較例 5 の結果を比較すると、ピルビン酸キナーゼの機能を欠損させていないセラチア属微生物の PEPカルボキシキナーゼの活性を強化した場合は、強化していない場合と比べて - ヒドロムコン酸の収率が低下することがわかった。

【0251】

【表 1 7】

	株	HMA収率(%)
比較例23	Sg/pBBRpMW	N.D.
	Sg/HMA1	0.0495
	Sg/HMA2	0.0584
	Sg/HMA3	0.0434
	Sg/HMA4	0.0524
	Sg/HMA5	0.0587
	Sg/HMA6	0.0618
	Sg/HMA7	0.0519

40

【0252】

参考例 2 2

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損しておらず、かつ反応 A、B、C、E および F を触媒す

50

る酵素を発現するプラスミドを導入した大腸菌変異体の作製

実施例 9 と同様の方法にて、Ec / pBBR、Ec / 3HA1、Ec / 3HA2、Ec / 3HA3、Ec / 3HA4、Ec / 3HA5、Ec / 3HA6、Ec / 3HA7 に pMW119 (コントロール)、または pMW119 : : EH を導入した。得られた株をそれぞれ Ec / pBBR pMW (ネガティブコントロール)、Ec / HMA1、Ec / HMA2、Ec / HMA3、Ec / HMA4、Ec / HMA5、Ec / HMA6、Ec / HMA7 とした。

【0253】

比較例 24

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損していない大腸菌の変異体を用いた - ヒドロムコン酸の生産試験

10

実施例 10 と同様の方法にて、参考例 22 で作製した変異体を培養した。培養上清中に蓄積した - ヒドロムコン酸および他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。その値を元に上記式 (2) を用いて算出した - ヒドロムコン酸の収率を表 18 に示す。

【0254】

本比較例 24 の結果と比較例 7 の結果を比較すると、ピルビン酸キナーゼの機能を欠損させていない大腸菌の PEPカルボキシキナーゼの活性を強化した場合は、強化していない場合と比べて - ヒドロムコン酸の収率が低下することがわかった。

【0255】

20

【表 18】

	株	HMA収率(%)
比較例24	Ec/pBBRpMW	N.D.
	Ec/HMA1	0.0362
	Ec/HMA2	0.0636
	Ec/HMA3	0.0569
	Ec/HMA4	0.0624
	Ec/HMA5	0.0621
	Ec/HMA6	0.0640
	Ec/HMA7	0.0491

30

【0256】

参考例 23

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損しておらず、かつ反応 A、B、C、D、および G を触媒する酵素を発現するプラスミドを導入したセラチア属微生物変異体の作製

実施例 11 と同様の方法にて、*Serratia grimesii* NBRC13537 に対して参考例 3 で作成した pBBR1MCS-2 : : ATCT2OR1、pBBR1MCS-2 : : ATCT2OR2、pBBR1MCS-2 : : ATCT2OR3、pBBR1MCS-2 : : ATCT2OR4、pBBR1MCS-2 : : ATCT2OR5、pBBR1MCS-2 : : ATCT2OR6、または pBBR1MCS-2 : : ATCT2OR7 を導入した。得られた変異体それぞれに対して、実施例 7 と同様の方法にて、参考例 4 で作製したプラスミド pMW119 : : EHER を導入し、セラチア属微生物変異体を作製した。得られた株をそれぞれ Sg / ADA1、Sg / ADA2、Sg / ADA3、Sg / ADA4、Sg / ADA5、Sg / ADA6、Sg / ADA7 とした。

40

【0257】

比較例 25

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損していないセラチア属微生物の変異体を用いたアジピン酸の生産試験

実施例 8 と同様の方法にて、参考例 23 で作製した変異体および Sg / pBBRpMW

50

を培養した。培養上清中に蓄積したアジピン酸および他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。その値を元に上記式(2)を用いて算出したアジピン酸の収率を表19に示す。

【0258】

本比較例25の結果と比較例9の結果を比較すると、ピルビン酸キナーゼの機能を欠損させていないセラチア属微生物のPEPカルボキシキナーゼの活性を強化した場合は、強化していない場合と比べてアジピン酸の収率が低下することがわかった。

【0259】

【表19】

	株	ADA収率(%)
比較例25	Sg/pBBRpMW	N.D.
	Sg/ADA1	0.0244
	Sg/ADA2	0.0325
	Sg/ADA3	0.0254
	Sg/ADA4	0.0246
	Sg/ADA5	0.0314
	Sg/ADA6	0.0264
	Sg/ADA7	0.0289

10

【0260】

参考例24

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損しておらず、かつ反応A、B、C、D、およびGを触媒する酵素を発現するプラスミドを導入した大腸菌変異体の作製

実施例13と同様の方法にて、*Escherichia coli* MG1655に対して参考例3で作成したpBBR1MCS-2::ATCT2OR1、pBBR1MCS-2::ATCT2OR2、pBBR1MCS-2::ATCT2OR3、pBBR1MCS-2::ATCT2OR4、pBBR1MCS-2::ATCT2OR5、pBBR1MCS-2::ATCT2OR6、またはpBBR1MCS-2::ATCT2OR7を導入した。得られた変異体それぞれに対して、実施例9と同様の方法にて、参考例4で作製したプラスミドpMW119::EHERを導入し、大腸菌変異体を作製した。得られた株をそれぞれEc/ADA1、Ec/ADA2、Ec/ADA3、Ec/ADA4、Ec/ADA5、Ec/ADA6、Ec/ADA7とした。

30

【0261】

比較例26

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損していない大腸菌の変異体を用いたアジピン酸の生産試験

実施例10と同様の方法にて、参考例24で作製した変異体およびEc/pBBRpMWを培養した。培養上清中に蓄積したアジピン酸および他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。その値を元に上記式(2)を用いて算出したアジピン酸の収率を表20に示す。

40

【0262】

本比較例26の結果と比較例11の結果を比較すると、ピルビン酸キナーゼの機能を欠損させていない大腸菌のPEPカルボキシキナーゼの活性を強化した場合は、強化していない場合と比べてアジピン酸の収率が低下することがわかった。

【0263】

50

【表 2 0】

	株	ADA収率(%)
比較例26	Ec/pBBRpMW	N.D.
	Ec/ADA1	0.0148
	Ec/ADA2	0.0153
	Ec/ADA3	0.0107
	Ec/ADA4	0.0192
	Ec/ADA5	0.0139
	Ec/ADA6	0.0147
	Ec/ADA7	0.0167

10

【 0 2 6 4】

比較例 2 7

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損していないセラチア属微生物の変異体を用いた 3 - ヒドロキシアジピン酸および - ヒドロムコン酸の生産試験 2

実施例 1 5 と同様の方法にて、参考例 1 9 で作製した変異体を培養した。培養上清中に蓄積した 3 - ヒドロキシアジピン酸および - ヒドロムコン酸および他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。その値を元に上記式 (2) を用いて算出した 3 - ヒドロキシアジピン酸および - ヒドロムコン酸の収率を表 2 1 に示す。

20

【 0 2 6 5】

本比較例 2 7 の結果と比較例 1 3 の結果を比較すると、ピルビン酸キナーゼの機能を欠損させていないセラチア属微生物の P E P カルボキシキナーゼの活性を強化した場合は、嫌気条件下においても、強化していない場合と比べて 3 - ヒドロキシアジピン酸および - ヒドロムコン酸の収率が低下することがわかった。

【 0 2 6 6】

【表 2 1】

	株	3HA収率(%)	HMA収率(%)
比較例27	Sg/pBBR	N.D.	N.D.
	Sg/3HA1	1.68	0.0482
	Sg/3HA2	2.46	0.0577
	Sg/3HA3	1.94	0.0471
	Sg/3HA4	1.99	0.0527
	Sg/3HA5	2.29	0.0523
	Sg/3HA6	2.95	0.0627
	Sg/3HA7	1.66	0.0595

30

【 0 2 6 7】

比較例 2 8

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損していない大腸菌の変異体を用いた 3 - ヒドロキシアジピン酸および - ヒドロムコン酸の生産試験 2

実施例 1 6 と同様の方法にて、参考例 2 0 で作製した変異体を培養した。培養上清中に蓄積した 3 - ヒドロキシアジピン酸および - ヒドロムコン酸および他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。その値を元に上記式 (2) を用いて算出した 3 - ヒドロキシアジピン酸および - ヒドロムコン酸の収率を表 2 2 に示す。

40

【 0 2 6 8】

本比較例 2 8 の結果と比較例 1 5 の結果を比較すると、ピルビン酸キナーゼの機能を欠損させていない大腸菌の P E P カルボキシキナーゼの活性を強化した場合は、嫌気条件下においても、強化していない場合と比べて 3 - ヒドロキシアジピン酸および - ヒドロム

50

コン酸の収率が低下することがわかった。

【 0 2 6 9 】

【表 2 2】

	株	3HA収率(%)	HMA収率(%)
比較例28	Ec/pBBR	N.D.	N.D.
	Ec/3HA1	1.32	0.0171
	Ec/3HA2	2.00	0.0154
	Ec/3HA3	1.82	0.0130
	Ec/3HA4	1.47	0.0136
	Ec/3HA5	2.17	0.0138
	Ec/3HA6	1.77	0.0166
	Ec/3HA7	1.14	0.0179

10

【 0 2 7 0 】

比較例 2 9

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損していないセラチア属微生物の変異体を用いたアジピン酸の生産試験 2

実施例 1 7と同様の方法にて、参考例 2 3で作製した変異体を培養した。培養上清中に蓄積したアジピン酸および他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定

20

【 0 2 7 1 】

本比較例 2 9の結果と比較例 1 7の結果を比較すると、ピルビン酸キナーゼの機能を欠損させていないセラチア属微生物の P E Pカルボキシキナーゼの活性を強化した場合は、嫌気条件下においても、強化していない場合と比べてアジピン酸の収率が低下することがわかった。

【 0 2 7 2 】

【表 2 3】

	株	ADA収率(%)
比較例29	Sg/pBBRpMW	N.D.
	Sg/ADA1	0.0152
	Sg/ADA2	0.0181
	Sg/ADA3	0.0188
	Sg/ADA4	0.0179
	Sg/ADA5	0.0135
	Sg/ADA6	0.0130
	Sg/ADA7	0.00930

30

【 0 2 7 3 】

比較例 3 0

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損していない大腸菌の変異体を用いたアジピン酸の生産試験 2

実施例 1 8と同様の方法にて、参考例 2 4で作製した変異体を培養した。培養上清中に蓄積したアジピン酸および他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定

40

【 0 2 7 4 】

本比較例 3 0の結果と比較例 1 9の結果を比較すると、ピルビン酸キナーゼの機能を欠損させていない大腸菌の P E Pカルボキシキナーゼの活性を強化した場合は、嫌気条件下においても、強化していない場合と比べてアジピン酸の収率が低下することがわかった。

50

【 0 2 7 5 】

【 表 2 4 】

	株	ADA収率(%)
比較例30	Ec/pBBRpMW	N.D.
	Ec/ADA1	0.0166
	Ec/ADA2	0.0180
	Ec/ADA3	0.0140
	Ec/ADA4	0.0161
	Ec/ADA5	0.0148
	Ec/ADA6	0.0219
	Ec/ADA7	0.0123

10

【 0 2 7 6 】

実施例 1 9

ピルビン酸キナーゼ遺伝子およびホストトランスフェラーゼ系酵素遺伝子が欠損したセラチア属微生物の遺伝子変異体の作製

実施例 1 で作製した S g P P 株の有するホストトランスフェラーゼをコードする遺伝子である p t s G を欠損させ、ピルビン酸キナーゼおよびホストトランスフェラーゼ系酵素の機能が欠損したセラチア属微生物変異体を作製した。

20

【 0 2 7 7 】

p K D 4 を鋳型として、プライマーとして配列番号 2 4 4 および 2 4 5 のオリゴDNAを用いてPCRを行い、p t s G 欠損のための配列長 1 . 6 k b のPCR断片を得た。当該株に p K D 4 を導入したのち、p t s G 欠損用PCR断片を導入した。得られたカナマイシン耐性株を用いてコロニーダイレクトPCRを行い、バンド長より目的遺伝子の欠損およびカナマイシン耐性遺伝子の挿入を確認した。プライマーは配列番号 2 2 4 および 2 4 7 のオリゴDNAを使用した。

【 0 2 7 8 】

続いて p K D 4 を脱落させ、アンピシリン感受性株を得た。アンピシリン感受性株に p C P 2 0 を導入し、再びアンピシリン耐性株を取得した。得られた株を用いてコロニーダイレクトPCRを行い、バンド長よりカナマイシン耐性遺伝子の脱落を確認した。プライマーは配列番号 2 4 6 および 2 4 7 のオリゴDNAを使用した。カナマイシン感受性株より p C P 2 0 を脱落させた。得られた株を以降 S g P P G と記載する。

30

【 0 2 7 9 】

実施例 2 0

ピルビン酸キナーゼ遺伝子およびホストトランスフェラーゼ系酵素遺伝子が欠損し、かつ P E P カルボキシキナーゼ、反応 A、B、E および F を触媒する酵素を発現するプラスミドを導入したセラチア属微生物の遺伝子変異体の作製

実施例 1 9 で作製した S g P P G 株に対して、実施例 2 と同様の方法にて参考例 5 で作製したプラスミド p B B R 1 M C S - 2 : : A T C T O R 1 P C K を導入し、得られたセラチア属微生物変異体を S g P P G / 3 H A 1 P C K とした。

40

【 0 2 8 0 】

実施例 2 1

ピルビン酸キナーゼおよびホストトランスフェラーゼ系酵素の機能が欠損し、かつ P E P カルボキシキナーゼ、反応 A、B、E および F を触媒する酵素を発現するプラスミドを導入したセラチア属微生物変異体を用いた 3 - ヒドロキシアジピン酸および - ヒドロムコン酸の生産試験

実施例 2 0 で作製したセラチア属微生物変異体を用いて、実施例 1 5 と同様の方法にて 3 - ヒドロキシアジピン酸および - ヒドロムコン酸の生産試験を行った。

【 0 2 8 1 】

50

比較例 3 1

ピルビン酸キナーゼおよびホスホトランスフェラーゼ系酵素の機能が欠損せず、かつ P E P カルボキシキナーゼ、反応 A、B、E および F を触媒する酵素を発現するプラスミドを導入したセラチア属微生物変異体を用いた 3 - ヒドロキシアジピン酸および - ヒドロムコン酸の生産試験

参考例 7 で作製した S g / 3 H A 1 P C K 株を用いて、比較例 1 3 と同様の方法にて 3 - ヒドロキシアジピン酸および - ヒドロムコン酸の生産試験を行った。

【 0 2 8 2 】

実施例 2 1 の結果と実施例 1 5 の結果を比較すると、ピルビン酸キナーゼおよびホスホトランスフェラーゼ系酵素の遺伝子が欠損し、かつ P E P カルボキシキナーゼ、および 3 - オキソアジピル - C o A を還元して 3 - ヒドロキシアジピル - C o A を生成する反応を触媒する酵素活性を強化したセラチア属微生物変異体では、3 - ヒドロキシアジピン酸および - ヒドロムコン酸の収率がさらに向上することがわかった。また、実施例 2 1 と比較例 3 1 の結果を比較すると、ピルビン酸キナーゼおよびホスホトランスフェラーゼ系酵素の遺伝子が欠損した変異体では、アセチル - C o A が変換されて生成する酢酸およびエタノールの収率も向上することもわかった。

【 0 2 8 3 】

【表 2 5 】

	株	3HA収率 (%)	HMA収率 (%)	コハク酸収率 (%)	酢酸収率 (%)	エタノール収率 (%)
実施例21	SgΔPPG/3HA1 PCK	8.21	0.467	45.6	43.2	50.2
比較例31	Sg/3HA1 PCK	1.14	0.0345	12.65	28.5	34.9

【 0 2 8 4 】

実施例 2 2

ピルビン酸キナーゼ遺伝子およびホスホトランスフェラーゼ系酵素遺伝子が欠損した大腸菌の変異体の作製

実施例 4 で作製した E c P P 株の有するホスホトランスフェラーゼをコードする遺伝子である p t s G を欠損させ、ピルビン酸キナーゼおよびホスホトランスフェラーゼ系酵素の機能が欠損した大腸菌の変異体を作製した。

【 0 2 8 5 】

p K D 4 を鋳型として、プライマーとして配列番号 2 4 8 および 2 4 9 のオリゴ D N A を用いて P C R を行い、p t s G 欠損のための配列長 1 . 6 k b の P C R 断片を得た。当該株に p K D 4 を導入したのち、p t s G 欠損用 P C R 断片を導入した。得られたカナマイシン耐性株を用いてコロニーダイレクト P C R を行い、バンド長より目的遺伝子の欠損およびカナマイシン耐性遺伝子の挿入を確認した。プライマーは配列番号 2 2 4 および 2 5 1 のオリゴ D N A を使用した。

【 0 2 8 6 】

続いて p K D 4 を脱落させ、アンピシリン感受性株を得た。アンピシリン感受性株に p C P 2 0 を導入し、再びアンピシリン耐性株を取得した。得られた株を用いてコロニーダイレクト P C R を行い、バンド長よりカナマイシン耐性遺伝子の脱落を確認した。プライマーは配列番号 2 5 0 および 2 5 1 のオリゴ D N A を使用した。カナマイシン感受性株より p C P 2 0 を脱落させた。得られた株を得られた株を以降 E c P P G と記載する。

【 0 2 8 7 】

実施例 2 3

ピルビン酸キナーゼ遺伝子およびホスホトランスフェラーゼ系酵素遺伝子が欠損し、かつ

PEPカルボキシキナーゼ、反応A、B、EおよびFを触媒する酵素を発現するプラスミドを導入した大腸菌の変異体の作製

実施例22で作製したEc PPG株に対して、実施例5と同様の方法にて参考例5で作製したpBBR1MCS-2::ACTOR1PCKを導入し、得られた大腸菌変異体をEc PPG/3HA1PCKとした。

【0288】

実施例24

ピルビン酸キナーゼおよびホスホトランスフェラーゼ系酵素の機能が欠損し、かつPEPカルボキシキナーゼ、反応A、B、EおよびFを触媒する酵素を発現するプラスミドを導入した大腸菌変異体を用いた3-ヒドロキシアジピン酸および-ヒドロムコン酸の生産試験

10

実施例23で作製した大腸菌変異体を用いて、実施例16と同様の方法にて3-ヒドロキシアジピン酸および-ヒドロムコン酸の生産試験を行った。

【0289】

比較例32

ピルビン酸キナーゼおよびホスホトランスフェラーゼ系酵素の機能が欠損せず、かつPEPカルボキシキナーゼ、反応A、B、EおよびFを触媒する酵素を発現するプラスミドを導入した大腸菌変異体を用いた3-ヒドロキシアジピン酸および-ヒドロムコン酸の生産試験

参考例9で作製したEc/3HA1を用いて、比較例15と同様の方法にて3-ヒドロキシアジピン酸および-ヒドロムコン酸の生産試験を行った。

20

【0290】

実施例24の結果と実施例16の結果を比較すると、ピルビン酸キナーゼおよびホスホトランスフェラーゼ系酵素の遺伝子が欠損し、かつ3-オキソアジピル-COAを還元して3-ヒドロキシアジピル-COAを生成する反応を触媒する酵素活性を強化した大腸菌変異体では、3-ヒドロキシアジピン酸および-ヒドロムコン酸の収率がさらに向上することがわかった。また、実施例24と比較例32の結果を比較すると、ピルビン酸キナーゼおよびホスホトランスフェラーゼ系酵素の遺伝子が欠損した変異体では、アセチル-COAが変換されて生成する酢酸およびエタノールの収率も向上することもわかった。

【0291】

30

【表26】

	株	3HA収率 (%)	HMA収率 (%)	コハク酸収率 (%)	酢酸収率 (%)	エタノール収率 (%)
実施例24	Ec ΔPPG/3HA1 PCK	18.0	0.0596	57.4	53.9	42.4
比較例32	Ec/3HA1PCK	0.963	0.0116	20.0	33.4	38.5

【配列表】

0007646119000001.app

40

50

フロントページの続き

- (56)参考文献 国際公開第 2 0 0 9 / 1 5 1 7 2 8 (W O , A 2)
 国際公開第 2 0 1 7 / 2 0 9 1 0 3 (W O , A 1)
 国際公開第 2 0 1 7 / 2 0 9 1 0 2 (W O , A 1)
 国際公開第 2 0 1 6 / 1 9 9 8 5 8 (W O , A 1)
 国際公開第 2 0 1 6 / 1 9 9 8 5 6 (W O , A 1)
 "3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase [Serratia liquifaciens].", [online], Database GenBank, 2016年02月11日, Accession No. AMG98270.1, インターネット URL: <https://www.ncbi.nlm.gov/protein/991935067?sat=4&satkey=158110186>, [検索日 2019.02.06]
 "3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase [Serratia marcescens].", [online], Database GenBank, 2017年02月28日, Accession No. ALL37524.1, インターネット URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/943365850>, [検索日 2019.02.06]
 "3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase [Serratia nematodiphila DZ0503SBS1].", [online], Database GenBank, 2014年08月07日, Accession No. KFF90258.1, インターネット URL: <https://www.ncbi.nlm.gov/protein/KFF90258.1>, [検索日 2019.02.06]
 "3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase [Serratia plymuthica S13].", [online], Database GenBank, 2014年01月30日, Accession No. AGP43956.1, インターネット URL: <https://www.ncbi.nlm.gov/protein/AGP43956.1>, [検索日 2019.02.06]
 "3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase [Serratia marcescens].", [online], Database GenBank, 2017年07月18日, Accession No. ASM11476.1, インターネット URL: <https://www.ncbi.nlm.gov/protein/ASM11476.1>, [検索日 2019.02.06]
 "3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase [Serratia proteamaculans 568].", [online], Database GenBank, 2014年01月28日, Accession No. ABV40935.1, インターネット URL: <https://www.ncbi.nlm.gov/protein/ABV40935.1>, [検索日 2019.02.06]
- (58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)
 C 1 2 N 1 / 0 0 - 7 / 0 8
 C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
 C 1 2 N 9 / 0 0 - 9 / 9 9
 C 1 2 P 1 / 0 0 - 4 1 / 0 0
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
 C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)
 G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q
 U n i P r o t / G e n e S e q
 P u b M e d