

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4579502号
(P4579502)

(45) 発行日 平成22年11月10日(2010.11.10)

(24) 登録日 平成22年9月3日(2010.9.3)

(51) Int.Cl.

F 1

H01F 1/06	(2006.01)	H01F 1/06	K
G03G 9/08	(2006.01)	G03G 9/08	365
C08G 63/06	(2006.01)	G03G 9/08	311
C08G 63/685	(2006.01)	C08G 63/06	
C08G 63/688	(2006.01)	C08G 63/685	

請求項の数 42 (全 79 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号

特願2003-127508 (P2003-127508)

(22) 出願日

平成15年5月2日(2003.5.2)

(65) 公開番号

特開2004-333710 (P2004-333710A)

(43) 公開日

平成16年11月25日(2004.11.25)

審査請求日

平成18年5月1日(2006.5.1)

微生物の受託番号 FERM BP-7373

微生物の受託番号 FERM BP-7374

微生物の受託番号 FERM BP-7376

微生物の受託番号 FERM P-17370

微生物の受託番号 FERM P-17371

(73) 特許権者 000001007

キヤノン株式会社

東京都大田区下丸子3丁目30番2号

(74) 代理人 100123788

弁理士 宮崎 昭夫

(74) 代理人 100106297

弁理士 伊藤 克博

(74) 代理人 100106138

弁理士 石橋 政幸

(72) 発明者 矢野 哲哉

東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内

(72) 発明者 本間 務

東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内

最終頁に続く

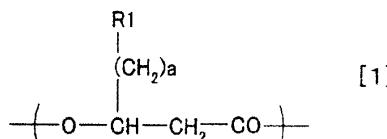
(54) 【発明の名称】構造体及びその製造方法、該構造体を含むトナー並びにそれを用いた画像形成方法及び装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

化学式 [1] から化学式 [8] に示すモノマーユニットからなる群より選択される少なくとも一つを含有するポリヒドロキシアルカノエートが基材の少なくとも一部を被覆しており、前記基材が粒状の磁性体であることを特徴とする構造体。

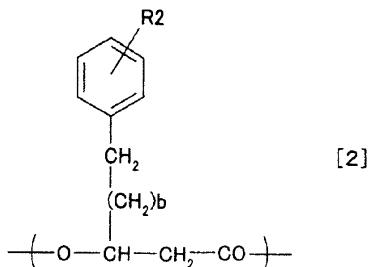
【化 1】



10

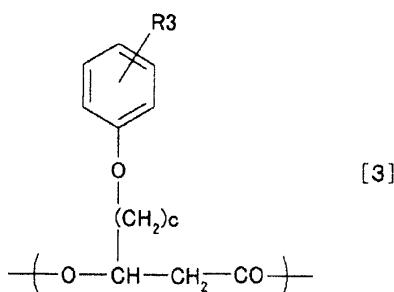
(ただし、該モノマーユニットは、式中 R 1 および a の組合せが下記のいずれかであるモノマーユニットからなる群より選択される少なくとも一つである。 R 1 がビニル基であり a が 1 から 10 の整数のいずれかであるモノマーユニットである。)

【化 2】



(ただし、式中 b は 0 から 7 の整数のいずれかを表し、R 2 は C H₃ 基、C₂H₅ 基、C₃H₇ 基、ビニル基、エポキシ基、COOR₂₁ (R₂₁ : H 原子、Na 原子、K 原子のいずれかを表す) からなる群から選ばれたいずれか 1 つを表し、複数のユニットが存在する場合、各ユニット毎に独立して上記の意味を表す。) 10

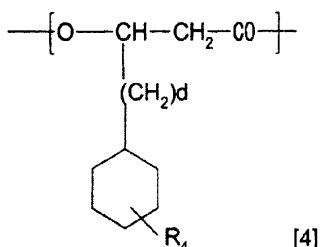
【化 3】



20

(ただし、式中 c は 1 から 8 の整数のいずれかを表し、R 3 は C H₃ 基、C₂H₅ 基、C₃H₇ 基、SC H₃ 基からなる群から選ばれたいずれか 1 つを表し、複数のユニットが存在する場合、各ユニット毎に独立して上記の意味を表す。)

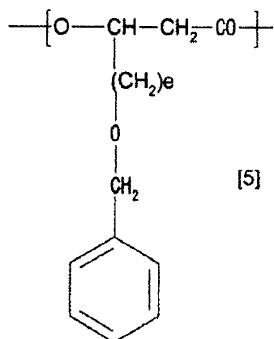
【化 4】



30

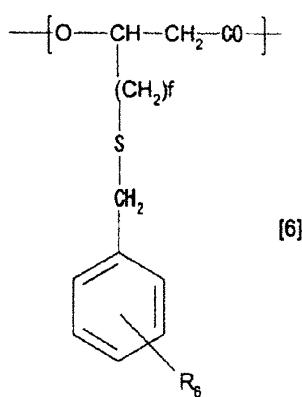
(ただし、式中 d は 0 から 8 の整数のいずれかを表し、R 4 は、d が 0 の場合、H 原子、CN 基、NO₂ 基、ハロゲン原子、C H₃ 基、C₂H₅ 基、C₃H₇ 基、CF₃ 基、C₂F₅ 基またはC₃F₇ 基からなる群から選ばれ、d が 1 - 8 の場合、C H₃ 基、C₂H₅ 基、C₃H₇ 基からなる群から選ばれたいずれか 1 つを表し、複数のユニットが存在する場合、各ユニット毎に独立して上記の意味を表す。) 40

【化5】



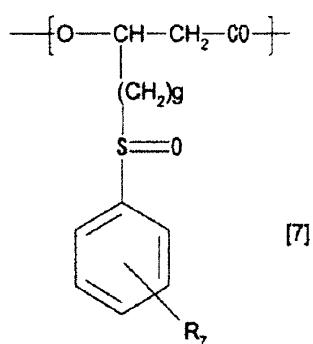
(ただし、式中eは1から8の整数のいずれかを表す。)

【化6】



(ただし、式中fは1から8の整数のいずれかを表し、R6はCH3基、C2H5基、C3H7基、(CH3)2-CH基または(CH3)3-CH基からなる群から選ばれたいずれか1つを表し、複数のユニットが存在する場合、各ユニット毎に独立して上記の意味を表す。)

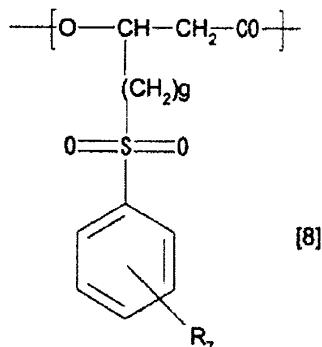
【化7】



(ただし、式中gは1から8の整数のいずれかを表し、R7はH原子、ハロゲン原子、CN基、NO2基、COOR71、SO2R72(R71:H、Na、K、CH3、C2H5のいずれかを表し、R72:OH、ONa、OK、ハロゲン原子、OCH3、OC2H5のいずれかを表す)、CH3基、C2H5基、C3H7基、(CH3)2-CH基または(CH3)3-CH基であり、複数のユニットが存在する場合、各ユニット毎に独立して上記の意味を表す。)

40

【化 8】



10

(ただし、式中 g は 1 から 8 の整数のいずれかを表し、 R_7 は H 原子、ハロゲン原子、C N 基、 NO_2 基、 $COOR$ 7 1、 SO_2R 7 2 (R 7 1 : H、Na、K、 CH_3 、 C_2H_5 のいずれかを表し、 R 7 2 : OH、ONa、OK、ハロゲン原子、 OCH_3 、 OC_2H_5 のいずれかを表す)、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 $(CH_3)_2-CH$ 基または $(CH_3)_3-C$ 基であり、複数のユニットが存在する場合、各ユニット毎に独立して上記の意味を表す。)

【請求項 2】

前記ポリヒドロキシアルカノエートの少なくとも一部が、化学修飾されたポリヒドロキシアルカノエートであることを特徴とする、請求項 1 に記載の構造体。

20

【請求項 3】

前記の化学修飾されたポリヒドロキシアルカノエートが、少なくともグラフト鎖を有するポリヒドロキシアルカノエートであることを特徴とする、請求項 2 に記載の構造体。

【請求項 4】

前記グラフト鎖が、ハロゲン原子、ビニル基、エポキシ基あるいはカルボキシル基を有するモノマーユニットの少なくとも何れかを含むポリヒドロキシアルカノエートの化学修飾によるグラフト鎖であることを特徴とする、請求項 3 に記載の構造体。

【請求項 5】

前記グラフト鎖が、チオール基、水酸基あるいはアミノ基の少なくとも何れかを有する化合物のグラフト鎖であることを特徴とする、請求項 3 または請求項 4 に記載の構造体。

30

【請求項 6】

前記ポリヒドロキシアルカノエートの少なくとも一部が、架橋化されたポリヒドロキシアルカノエートであることを特徴とする、請求項 2 に記載の構造体。

【請求項 7】

前記の架橋化されたポリヒドロキシアルカノエートが、ビニル基あるいはエポキシ基を有するモノマーユニットの少なくとも何れかを含むポリヒドロキシアルカノエートが架橋化されたポリヒドロキシアルカノエートであることを特徴とする、請求項 6 に記載の構造体。

【請求項 8】

前記基材が着色剤を含有していることを特徴とする、請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の構造体。

40

【請求項 9】

前記着色剤が顔料であることを特徴とする、請求項 8 に記載の構造体。

【請求項 10】

前記着色剤が染料であることを特徴とする、請求項 8 に記載の構造体。

【請求項 11】

前記磁性体が磁性を有する金属または金属化合物からなることを特徴とする、請求項 1 に記載の構造体。

【請求項 12】

50

前記ポリヒドロキシアルカノエートのモノマーユニット組成が前記構造体の内側から外側に向かう方向において変化していることを特徴とする請求項 1 ~ 1 1 のいずれかに記載の構造体。

【請求項 1 3】

前記基材にポリヒドロキシアルカノエート合成酵素が固定されていることを特徴とする請求項 1 ~ 1 2 のいずれかに記載の構造体。

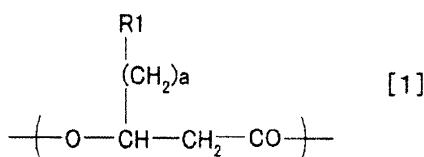
【請求項 1 4】

前記ポリヒドロキシアルカノエートの分子量が 1 , 0 0 0 から 1 0 , 0 0 0 , 0 0 0 であることを特徴とする請求項 1 ~ 1 3 のいずれかに記載の構造体。

【請求項 1 5】

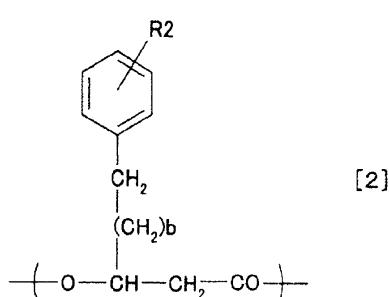
中鎖長ポリヒドロキシアルカノエート合成酵素を粒状の磁性体からなる基材表面に固定し、該酵素により 3 - ヒドロキシアシル補酵素 A を重合させてポリヒドロキシアルカノエートを合成することにより、前記基材の少なくとも一部をポリヒドロキシアルカノエートで被覆することを特徴とする構造体の製造方法において、前記ポリヒドロキシアルカノエートが、化学式 [1] から化学式 [8] に示すモノマーユニットからなる群より選択される少なくとも一つを含有するポリヒドロキシアルカノエートであり、前記ユニットのそれぞれに対して対応する 3 - ヒドロキシアシル補酵素 A が順に化学式 [9] から化学式 [1 5] に示す 3 - ヒドロキシアシル補酵素 A であり、前記ポリヒドロキシアルカノエートが、化学式 [2] の構造において R 2 がエボキシ基、COOR₂ (R₂: H 原子、Na 原子、K 原子のいずれかを表す) からなる群から選ばれたいずれかのユニットを少なくとも含む場合は、化学式 [2] の構造において R 2 がビニル基であるユニットを少なくとも含むポリヒドロキシアルカノエートにより被覆された構造体の該ビニル基の酸化反応により、また、前記ポリヒドロキシアルカノエートが、化学式 [7] および [8] の構造からなる群から選ばれたいずれかのユニットを少なくとも含む場合は、化学式 [1 5] に示す 3 - ヒドロキシアシル補酵素 A を少なくとも含んだ系での重合により得られる、化学式 [1 6] に示すフェニルスルファニル基を有するユニットを少なくとも含むポリヒドロキシアルカノエートにより被覆された構造体の該フェニルスルファニル基の酸化反応による、構造体の製造方法。

【化 9】



(ただし、該モノマーユニットは、式中 R 1 および a の組合せが下記のいずれかであるモノマーユニットからなる群より選択される少なくとも一つである。R 1 がビニル基であり a が 1 から 1 0 の整数のいずれかであるモノマーユニットである。)

【化 1 0】



(ただし、式中 b は 0 から 7 の整数のいずれかを表し、R 2 は CH3 基、C2H5 基、C3H7 基

10

20

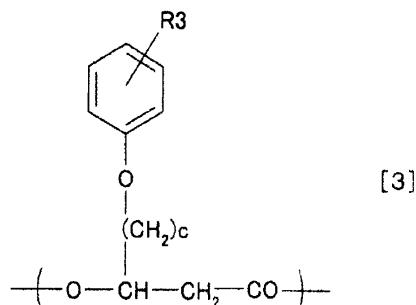
30

40

50

₇基、ビニル基、エポキシ基、COOR₂₁(R₂₁:H原子、Na原子、K原子のいずれかを表す)からなる群から選ばれたいずれか1つを表し、複数のユニットが存在する場合、各ユニット毎に独立して上記の意味を表す。)

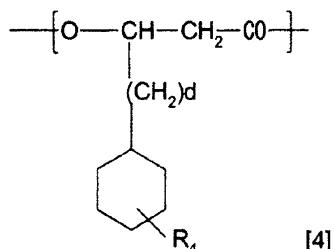
【化11】



10

(ただし、式中cは1から8の整数のいずれかを表し、R₃はCH₃基、C₂H₅基、C₃H₇基、SC₂H₅基からなる群から選ばれたいずれか1つを表し、複数のユニットが存在する場合、各ユニット毎に独立して上記の意味を表す。)

【化12】

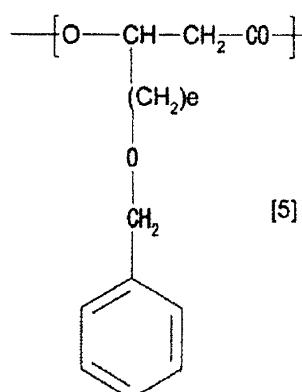


20

(ただし、式中dは0から8の整数のいずれかを表し、R₄は、dが0の場合、H原子、CN基、NO₂基、ハロゲン原子、CH₃基、C₂H₅基、C₃H₇基、CF₃基、C₂F₅基またはC₃F₇基からなる群から選ばれ、dが1-8の場合、CH₃基、C₂H₅基、C₃H₇基からなる群から選ばれたいずれか1つを表し、複数のユニットが存在する場合、各ユニット毎に独立して上記の意味を表す。)

30

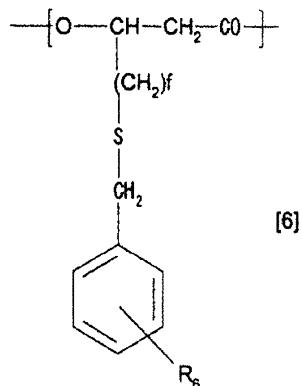
【化13】



40

(ただし、式中eは1から8の整数のいずれかを表す。)

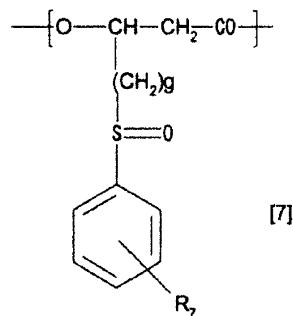
【化14】



10

(ただし、式中 f は 1 から 8 の整数のいずれかを表し、R 6 は C H₃ 基、C₂H₅ 基、C₃H₇ 基、(C H₃)₂-C H 基または(C H₃)₃-C 基からなる群から選ばれたいずれか 1 つを表し、複数のユニットが存在する場合、各ユニット毎に独立して上記の意味を表す。)

【化15】

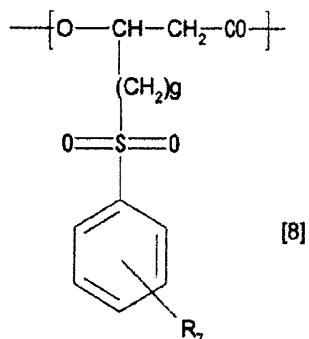


20

(ただし、式中 g は 1 から 8 の整数のいずれかを表し、R 7 は H 原子、ハロゲン原子、C N 基、N O₂ 基、C O O R 7 1、S O₂ R 7 2 (R 7 1 : H、N a、K、C H₃、C₂H₅ のいずれかを表し、R 7 2 : OH、O N a、O K、ハロゲン原子、O C H₃、O C₂H₅ のいずれかを表す)、C H₃ 基、C₂H₅ 基、C₃H₇ 基、(C H₃)₂-C H 基または(C H₃)₃-C 基であり、複数のユニットが存在する場合、各ユニット毎に独立して上記の意味を表す。)

30

【化16】



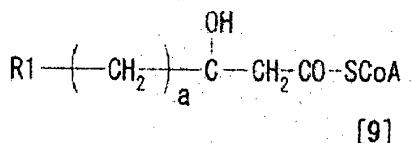
40

(ただし、式中 g は 1 から 8 の整数のいずれかを表し、R 7 は H 原子、ハロゲン原子、C N 基、N O₂ 基、C O O R 7 1、S O₂ R 7 2 (R 7 1 : H、N a、K、C H₃、C₂H₅ のいずれかを表し、R 7 2 : OH、O N a、O K、ハロゲン原子、O C H₃、O C₂H₅ のいずれかを表す)、C H₃ 基、C₂H₅ 基、C₃H₇ 基、(C H₃)₂-C H 基または(C H₃)₃-C 基であり、複数のユニットが存在する場合、各ユニット毎に独立して上記の意味を表す。)

50

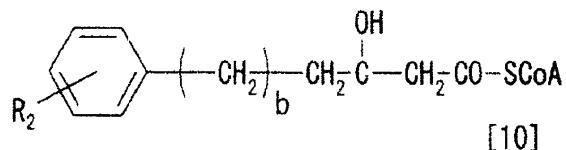
す。)

【化17】



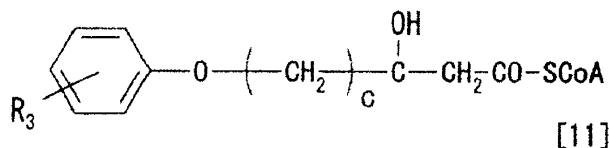
(ただし、前記化学式中 - S C o A はアルカン酸に結合した補酵素 A を表し、a は前記化学式 [1] で表されるモノマーユニットにおける a と対応する 1 から 10 の整数のいずれかを表し、R 1 はビニル基である。)

【化18】



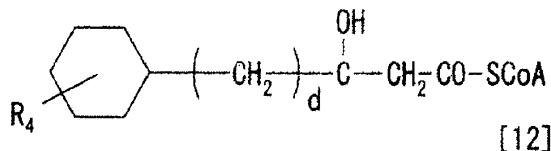
(ただし、式中 - S C o A はアルカン酸に結合した補酵素 A を表し、b は前記化学式 [2] で表されるモノマーユニットにおける b と対応する 0 から 7 の整数のいずれかを表し、R 2 は前記化学式 [2] で表されるモノマーユニットにおける R 2 と対応する、C H₃ 基、C₂H₅ 基、C₃H₇ 基、ビニル基からなる群から選ばれたいずれか 1 つを表す。)

【化19】



(ただし、式中 - S C o A はアルカン酸に結合した補酵素 A を表し、c は前記化学式 [3] で表されるモノマーユニットにおける c と対応する 1 から 8 の整数のいずれかを表し、R 3 は前記化学式 [3] で表されるモノマーユニットにおける R 3 と対応する、C H₃ 基、C₂H₅ 基、C₃H₇ 基、S C H₃ 基からなる群から選ばれたいずれか 1 つを表す。)

【化20】



(ただし、式中 - S C o A はアルカン酸に結合した補酵素 A を表し、d は前記化学式 [4] で表されるモノマーユニットにおける d と対応する 0 から 8 の整数のいずれかを表し、R 4 は前記化学式 [4] で表されるモノマーユニットにおける R 4 と対応し、d が 0 の場合、H 原子、C N 基、N O₂ 基、ハロゲン原子、C H₃ 基、C₂H₅ 基、C₃H₇ 基、C F₃ 基、C₂F₅ 基またはC₃F₇ 基からなる群から選ばれ、d が 1 - 8 の場合、C H₃ 基、C₂H₅ 基、C₃H₇ 基からなる群から選ばれたいずれか 1 つを表す。)

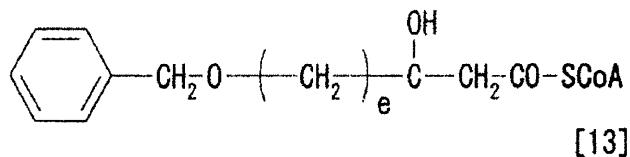
10

20

30

40

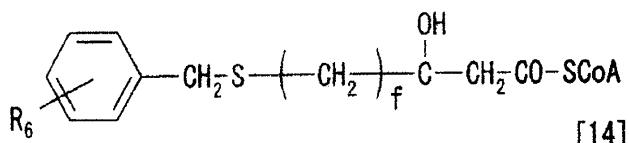
【化 2 1】



(ただし、式中 - S C o A はアルカン酸に結合した補酵素 A を表し、e は前記化学式 [5] で表されるモノマーユニットにおける e と対応する 1 から 8 の整数のいずれかを表す。)

10

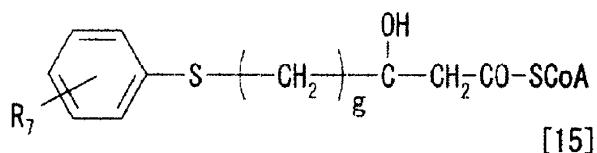
【化 2 2】



(ただし、式中 - S C o A はアルカン酸に結合した補酵素 A を表し、f は前記化学式 [6] で表されるモノマーユニットにおける f と対応する 1 から 8 の整数のいずれかを表し、R 6 は前記化学式 [6] で表されるモノマーユニットにおける R 6 と対応する、C H₃ 基、C₂H₅ 基、C₃H₇ 基、(C H₃)₂-C H 基または(C H₃)₃-C 基からなる群から選ばれたいずれか 1 つを表す。)

20

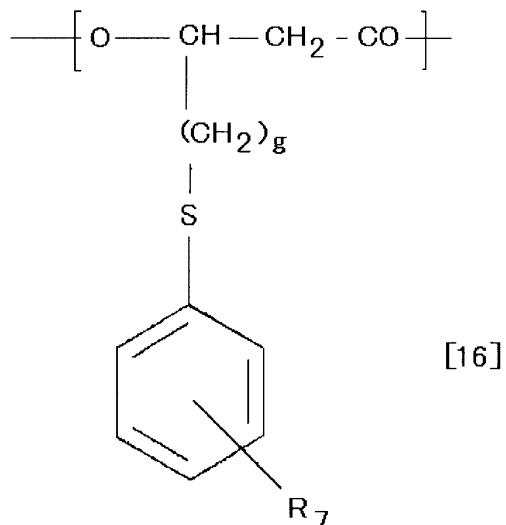
【化 2 3】



(ただし、式中 - S C o A はアルカン酸に結合した補酵素 A を表し、g は前記化学式 [7] および [8] で表されるモノマーユニットにおける g と対応する 1 から 8 の整数のいずれかを表し、R 7 は前記化学式 [7] および [8] で表されるモノマーユニットにおける R 7 と対応する、H 原子、ハロゲン原子、C N 基、N O₂ 基、C O O R 7 1、S O₂ R 7 2 (R 7 1 : H、N a、K、C H₃、C₂H₅ のいずれかを表し、R 7 2 : O H、O N a、O K、ハロゲン原子、O C H₃、O C₂H₅ のいずれかを表す)、C H₃ 基、C₂H₅ 基、C₃H₇ 基、(C H₃)₂-C H 基または(C H₃)₃-C 基からなる群から選ばれたいずれか 1 つを表す。)

30

【化 2 4】



10

(ただし、式中 g は 1 から 8 の整数のいずれかを表し、R 7 は H 原子、ハロゲン原子、C N 基、N O₂基、COOR 7 1、SO₂R 7 2 (R 7 1 : H、Na、K、C H₃、C₂H₅のいずれかを表し、R 7 2 : OH、ONa、OK、ハロゲン原子、O C H₃、O C₂H₅のいずれかを表す)、C H₃基、C₂H₅基、C₃H₇基、(C H₃)₂-C H 基または(C H₃)₃-C 基であり、複数のユニットが存在する場合、各ユニット毎に独立して上記の意味を表す。)

20

【請求項 1 6】

前記基材を被覆する前記ポリヒドロキシアルカノエートの少なくとも一部に化学修飾を施す工程をさらに有する、請求項 1 5 に記載の構造体の製造方法。

【請求項 1 7】

前記化学修飾を施す工程が、前記ポリヒドロキシアルカノエートの少なくとも一部にグラフト鎖を付加することを特徴とする、請求項 1 6 に記載の構造体の製造方法。

30

【請求項 1 8】

前記グラフト鎖を付加する工程が、前記ポリヒドロキシアルカノエートの少なくとも一部と、末端に反応性官能基を有する化合物とを反応させる工程であることを特徴とする、請求項 1 7 に記載の構造体の製造方法。

【請求項 1 9】

前記ポリヒドロキシアルカノエートが、ハロゲン原子、ビニル基、エポキシ基あるいはカルボキシル基を有するモノマーユニットの少なくとも何れかを含むポリヒドロキシアルカノエートであることを特徴とする、請求項 1 8 に記載の構造体の製造方法。

【請求項 2 0】

前記末端に反応性官能基を有する化合物が、チオール基、水酸基あるいはアミノ基の少なくとも何れかを有する化合物であることを特徴とする、請求項 1 7 または 1 8 に記載の構造体の製造方法。

40

【請求項 2 1】

前記化学修飾を施す工程が、前記ポリヒドロキシアルカノエートの少なくとも一部を架橋化することを特徴とする、請求項 1 6 に記載の構造体の製造方法。

【請求項 2 2】

前記ポリヒドロキシアルカノエートが、ビニル基あるいはエポキシ基を有するモノマーユニットの少なくとも何れかを含むポリヒドロキシアルカノエートであることを特徴とする、請求項 2 1 に記載の構造体の製造方法。

【請求項 2 3】

前記架橋化工程が、前記ポリヒドロキシアルカノエートの少なくとも一部と架橋剤とを

50

反応させる工程であることを特徴とする、請求項 2 1 または 2 2 に記載の構造体の製造方法。

【請求項 2 4】

前記架橋化工程が、前記ポリヒドロキシアルカノエートに電子線を照射する工程であることを特徴とする、請求項 2 1 または 2 2 に記載の構造体の製造方法。

【請求項 2 5】

前記基材は着色剤を含有する、請求項 1 5 に記載の構造体の製造方法。

【請求項 2 6】

前記着色剤は顔料を含有する、請求項 2 5 に記載の構造体の製造方法。

【請求項 2 7】

前記着色剤は染料を含有する、請求項 2 5 に記載の構造体の製造方法。

【請求項 2 8】

前記磁性体が磁性を有する金属または金属化合物からなる、請求項 1 5 に記載の構造体の製造方法。

【請求項 2 9】

前記 3 - ヒドロキシアシル補酵素 A の組成を経時に変化させることにより、前記ポリヒドロキシアルカノエートのモノマーエニット組成を前記構造体の内側から外側に向かう方向において変化させることを特徴とする請求項 1 5 ~ 2 8 のいずれかに記載の構造体の製造方法。

【請求項 3 0】

前記ポリヒドロキシアルカノエート合成酵素を該酵素の生産能を有する微生物を使って生産する、請求項 1 5 ~ 2 9 のいずれかに記載の構造体の製造方法。

【請求項 3 1】

前記ポリヒドロキシアルカノエート合成酵素を該酵素の生産能に関与する遺伝子を導入した形質転換体により生産する、請求項 1 5 ~ 2 9 のいずれかに記載の構造体の製造方法。

【請求項 3 2】

前記遺伝子はポリヒドロキシアルカノエート合成酵素の生産能を有する微生物から得られた遺伝子であることを特徴とする請求項 3 1 に記載の構造体の製造方法。

【請求項 3 3】

前記ポリヒドロキシアルカノエート合成酵素の生産能を有する微生物が、シュードモナス属 (*Pseudomonas* sp.) に属する微生物である、請求項 3 0 または 3 2 に記載の構造体の製造方法。

【請求項 3 4】

前記シュードモナス属 (*Pseudomonas* sp.) に属する微生物が、シュードモナス・プチダ・P 91 株 (*Pseudomonas putida* P 91, FERM BP - 7373)、シュードモナス・チコリアイ・H 45 株 (*Pseudomonas cichorii* H 45, FERM BP - 7374)、シュードモナス・チコリアイ・YN 2 株 (*Pseudomonas cichorii* YN 2, FERM BP - 7375)、シュードモナス・ジェッセニイ・P 161 株 (*Pseudomonas jessenii* P 161, FERM BP - 7376) からなる群から選択される少なくとも 1 つの微生物である、請求項 3 3 に記載の構造体の製造方法。

【請求項 3 5】

前記ポリヒドロキシアルカノエート合成酵素の生産能を有する微生物が、バークホルデリア属 (*Burkholderia* sp.) に属する微生物である、請求項 3 0 または 3 2 に記載の構造体の製造方法。

【請求項 3 6】

前記バークホルデリア属に属する微生物が、バークホルデリア属・OK 3 株 (*Burkholderia* sp. OK 3, FERM P - 17370)、バークホルデリア属・OK 4 株 (*Burkholderia* sp. OK 4, FERM P - 17371)

10

20

30

40

50

からなる群から選択される少なくとも1つの微生物である、請求項35に記載の構造体の製造方法。

【請求項37】

前記ポリヒドロキシアルカノエート合成酵素の生産能を有する形質転換体の宿主微生物が、大腸菌(*E. coli*)である、請求項32または33に記載の構造体の製造方法。

【請求項38】

請求項1から14のいずれかに記載の構造体を含むトナー。

【請求項39】

請求項1から14のいずれかに記載の構造体からなるトナー。 10

【請求項40】

請求項15から28のいずれかに記載の粒状の構造体を製造する工程を含む、トナーの製造方法。

【請求項41】

請求項38または39に記載のトナーを被記録媒体に付与することで画像を形成する画像形成方法。

【請求項42】

請求項38または39に記載のトナーを被記録媒体に付与することで画像を形成する画像形成装置。 20

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ポリヒドロキシアルカノエートと粒状の磁性体からなる基材とを備え、該ポリヒドロキシアルカノエートが該基材の少なくとも一部を被覆した構造を有していることを特徴とする構造体及びその製造方法、ならびに該構造体を含むトナー及びそれを用いた画像形成方法及び装置に関するものである。

【0002】

【背景技術】

高分子材料は現代の産業や生活に不可欠のものであり、安価軽量であること、成形性が良いこと等から、家電品の筐体をはじめ包装材や緩衝材、あるいは繊維材料等、多岐に渡って利用されている。一方、これら高分子材料の安定な性質を利用して、高分子の分子鎖に様々な機能を発現する置換基を配して、液晶材料やコート剤等の各種機能材料も得られている。これら機能材料は構造材料としての高分子よりも付加価値が高いため、少量生産でも大きな市場ニーズが期待できる。このような高分子機能材料は、これまで高分子の合成プロセスの中で、あるいは合成した高分子を置換基で修飾することにより、有機合成化学的手法により得られている。高分子機能材料の基本骨格となる高分子はほとんどの場合、石油系原料から有機合成化学的手法によって得られている。ポリエチレン、ポリエチレンテレフタレート、ポリエステル、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、ポリアクリルアミド等がその典型的な例である。 30

【0003】

[重層構造体]

ところで、本願発明者らは高分子化合物に大きな付加価値を与えるための一つの要素技術として、高分子化合物により基材を被覆した重層構造体に着目してきた。このように高分子化合物で特定の基材を被覆することによって、極めて有用な機能性を有する複合構造体を得ることができる。このような構造体の具体的な用途としては、例えば高分子化合物にトナー成分を内包させたマイクロカプセル構造体からなる電子写真用カプセルトナー、高分子化合物に磁性体を内包させたマイクロカプセル構造体からなる生体物質の分離精製あるいはスクリーニング用担体、高分子化合物でシート状の基材を被覆したインクジェット記録方式用記録媒体、高分子化合物でシート状の磁性体を被覆した磁気記録媒体等が考えられる。 40 50

【0004】

一般に、電子写真法は光導電性物質を利用し、種々の手段により感光体上に電気的潜像を形成し、次いで該潜像をトナーを用いて現像し、必要に応じて紙等の転写材にトナー画像を転写した後、加熱、圧力、加熱圧力、あるいは溶剤蒸気等により定着し複写画像を得るものである。この目的に用いるトナーとして、従来、熱可塑性樹脂中に染・顔料からなる着色剤を溶融混合し、均一に分散した後、微粉碎装置および分級機により所望の粒径とする「粉碎トナー」が用いられてきた。該トナーは優れた能力を有するものではあるが、その製造工程上、脆性が要求されるため、材料の選択範囲等に一定の制限がある等の課題があった。このような課題を克服するため、特公昭36-10231号公報(特許文献)により懸濁重合法による「重合トナー」の製造が提案されている。懸濁重合法においては、重合性単量体、着色剤、重合開始剤、さらに必要に応じて架橋剤、荷電制御剤等を均一に溶解または分散せしめた後、分散安定剤を含有する連続相(例えば水相)に攪拌機で分散し、同時に重合反応を行わせ、所望のトナーを得る。この方法は、粉碎工程が含まれないため、トナーに脆性が必要でなく、軟質の材料を使用できる等の利点がある。しかし、このような微小粒径の重合トナーでは、着色剤や電荷制御剤がトナー表層へ露出し易いため、着色剤の影響が生じ易くなり、また、帯電の均一性の低下が懸念された。これらの課題を解決するため、重合体粒子表面を高分子化合物からなる一層あるいは複数層の外被で被覆した、いわゆる「カプセルトナー」が提案されている。

10

【0005】

[カプセル構造体]

このようなカプセルトナーとしては、特開平8-286416号公報(特許文献1)において、極性樹脂を含有する外被で重合粒子を被覆した静電荷現像用カプセルトナー及びその製造方法が開示されている。この方法は、トナー成分を含む重合粒子からなるコアのまわりに、有機合成化学的手法により外被を形成させたものであり、上記の課題を改善し、画質耐久性の向上、帯電の均一化及び安定化を実現させた優れた静電荷現像用カプセルトナーが供給できる。また、特開平9-292735号公報(特許文献2)では、強固な外被樹脂によって、離型剤材料および熱膨張の大きな材料からなるコアを被覆した画像形成用カプセルトナーが開示されている。前記トナーは、定着時の過熱によってコア内の熱膨張性材料が膨張して、外被を破壊することによって、内包する離型剤材料を外部に押し出すように構成された機能性マイクロカプセルであり、フィルム加熱型の定着装置を用いる場合にはオフセットを生じることがなく、また、ローラー定着器を使用した場合には低加圧での定着を可能としあつ紙シワを低減することができる等の効果が期待できる。同様に、高分子化合物を外被とするカプセルトナーとその製造方法としては、特開平5-119531号公報、特開平5-249725号公報、特開平6-332225号公報、特開平9-43896号公報、特開平10-78676号公報、特開平11-7163号公報、特開2000-66444号公報、特開2000-112174号公報、特開2000-330321号公報(以上、特許文献3~11)が開示されており、いずれも懸濁重合法、乳化重合法、沈殿重合法、分散重合法、ソープフリー乳化重合法、シード重合法等の有機合成化学的手法により所望のカプセル構造体を製造している。

20

【0006】

しかしながら、これらカプセルトナーの製造方法においては、その製造工程が極めて複雑となる、製造工程において大量の溶媒類や界面活性剤を使用する等の課題もあった。

40

【0007】

基材に磁性体を用いた磁性体含有カプセル構造体は、磁力により容易に捕集される点から、主に生化学分野において、医療診断薬担体、細菌あるいは細胞分離担体、核酸あるいは蛋白分離精製担体、ドラッグデリバリー担体、酵素反応担体、細胞培養担体等としての優れた効果が期待されている。磁性体含有カプセル構造体の合成法については、親油化処理した磁性体を重合性モノマー中に分散し、これを懸濁重合する方法(特開昭59-221302号公報(特許文献12))、同じく親油化処理した磁性体を重合性モノマー中に分散し、ホモジナイザーで水中に均質化して重合することにより、比較的小粒子径の磁性粒子を得る方法(特公平4-3088号公報(特許文献13)))、あるいは特定の官能基を有する多孔性ポリマー粒子

50

の存在下で、鉄化合物を析出させたのち酸化することにより、多孔性ポリマー粒子内部に磁性体を導入し、大粒径かつ均一径の磁性粒子を得る方法(特公平5-10808号公報(特許文献14))が挙げられる。

【0008】

しかしながら、これらの合成法により得られた磁性体含有カプセル構造体を医療診断薬担体等に用いると、磁性体の多くがカプセル構造体内部に存在する場合でも、感度が大幅に低下したり、非特異的反応を示したりして、十分な実用性能が得られない場合が多い。これは、磁性体含有カプセル構造体表面に磁性体が部分的に露出し、あるいは構造体表面と内部の磁性体の間にミクロパスが形成されるため、磁性体成分が溶出し、実用性能を損なうためであると考えられる。一般に、磁性体はポリマー粒子よりも親水性が高く、従来の合成法では、磁性体がカプセル構造体の表面あるいは表面近傍へ局在することが、実用性能を損なう大きな原因の1つであると考えられる。このように、従来の磁性体含有カプセル構造体においては、含まれる磁性体成分の表面への露出、ミクロパスの形成、等による磁性体成分の溶出を抑えることが困難であり、その溶出が問題とならない分野に限定して使用せざるをえないのが実状であった。10

【0009】

[磁性体表面改質]

また、磁性体の表面特性を改質し、重合トナー中の磁性体の分散性向上を図る試みが数多く報告されている。特開昭59-200254号公報、特開昭59-200256号公報、特開昭59-200257号公報、(以上、特許文献15~18)に磁性体の各種シランカップリング剤処理技術が提案されており、特開昭63-250660号公報(特許文献19)、特開平10-239897号公報(特許文献20)では、ケイ素元素含有磁性体粒子をシランカップリング剤で処理する技術が開示されている。20

【0010】

しかしながら、これらの処理により磁性体の分散性はある程度向上するものの、磁性体表面の疎水化を均一に行なうことが困難であるという問題があり、したがって、磁性体同士の合一や疎水化されていない磁性体粒子の発生を避けることができず、磁性体の分散性を良好なレベルにまで向上させるには不十分である。

【0011】

また、疎水化磁性酸化鉄を用いる例として特公昭60-3181号公報(特許文献21)にアルキルトリアルコキシシランで処理した磁性酸化鉄を含有するトナーが提案されている。この磁性酸化鉄の添加により、確かにトナーの電子写真諸特性は向上しているものの、磁性酸化鉄の表面活性は元来小さく、処理の段階で合一粒子が生じたり、疎水化が不均一であったりで、必ずしも満足のいくものではなかった。30

【0012】

[記録媒体]

一方、高分子化合物でシート状の基材を被覆した積層構造体からなる記録媒体としては、例えばインクジェット記録方式における記録媒体が挙げられる。インクジェット記録方式は、種々の作動原理によりインクの微小液滴を飛翔させて紙等の記録媒体に付着させ、画像、文字等の記録を行うものである。該記録方式では、インク中に水、水と有機溶剤の混合液といった多量の溶媒を含んでいるので、高色濃度を得るためにには大量のインクを用いる必要がある。また、インク液滴は連続的に射出されるので、最初の液滴が射出されると、インク液滴が融合してインクのドットが接合するビーディング現象が生じて画像が乱れる。このため、インクジェット記録用媒体には、インク吸収量が大きく吸収速度が高いことが要求される。40

【0013】

このため、基材上にインク受容層を形成してインク吸収性を高めた記録媒体が提案されている。特開昭55-146786号公報(特許文献22)では、基材をポリビニルアルコールやポリビニルピロリドン等の水溶性樹脂で被覆した記録媒体が提案されている。また、特開平5-221112号公報(特許文献23)では、耐水性樹脂を用いた記録媒体が提案されている。さらに50

、イオン性樹脂をインク受容層として用いた記録媒体が提唱されており(特開平11-78221号公報(特許文献24)、特開2000-190631号公報(特許文献25))、水に対する濡れ性や耐水性、染料定着性等に優れ、インクの吸収乾燥性や画像鮮明性に優れた記録媒体が得られている。

【0014】

インク吸収層を基材上に形成させる方法としては、従来は塗沫による方法が一般的であり、例えば、ブレードコート方式、エアナイフコート方式、ロールコート方式、フラッシュコート方式、グラビアコート方式、キスコート方式、ダイコート方式、エクストルージョン方式、スライドホッパー方式、カーテンコート方式、スプレー方式等を用いた方法により行われてきた。

10

【0015】

なお、以上に例示したいずれの方法においても、基材の被覆のために用いる高分子化合物は有機合成的手法により合成・構造体化され、これに種々の機能が付加されている。

【0016】

[P H A]

ところで、近年、生物工学的手法によって高分子化合物を製造する研究が活発に行われてきており、また、一部で実用化されている。例えば、微生物由来の高分子化合物として、ポリ-3-ヒドロキシ-n-酪酸(以下、P H Bと略す場合もある)や3-ヒドロキシ-n-酪酸と3-ヒドロキシ-n-吉草酸との共重合体(以下、P H B/Vと略す場合もある)等のポリヒドロキシアルカノエート(以下、P H Aと略す場合がある)、バクテリアセルロースやプルラン等の多糖類、ポリ-L-グルタミン酸やポリリジン等のポリアミノ酸等が知られている。特にP H Aは、従来のプラスチックと同様に、溶融加工等により各種製品に利用することができるうえ、生体適合性にも優れており、医療用軟質部材等としての応用も期待されている。

20

【0017】

これまで、多くの微生物がP H Aを生産し菌体内に蓄積することが報告してきた。アルカリゲネス・ユウトロファス・H16株(*Alcaligenes eutrophus* H16、ATCC No.17699)、メチロバクテリウム属(*Methylobacterium* sp.)、パラコッカス属(*Paracoccus* sp.)、アルカリゲネス属(*Alcaligenes* sp.)、シュードモナス属(*Pseudomonas* sp.)の微生物によるP H B/Vの生産が報告されている(特開平5-74492号公報、特公平6-15604号公報、特公平7-14352号公報、特公平8-19227号公報(以上、特許文献26~29)。また、コマモナス・アシドボランス・IFO13852株(*Comamonas acidovorans* IFO13852)が、3-ヒドロキシ-n-酪酸と4-ヒドロキシ-n-酪酸とをモノマーユニットを持つP H Aを生産することが開示されている(特開平9-191893号公報(特許文献30))。さらに、アエロモナス・キャビエ(*Aeromonas caviae*)により、3-ヒドロキシ-n-酪酸と3-ヒドロキシヘキサン酸との共重合体を生産することが開示されている。

30

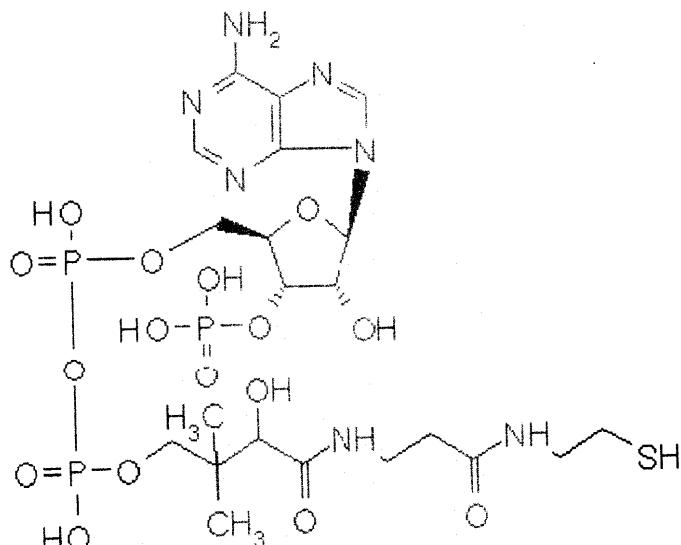
【0018】

これらP H BやP H B/Vの生合成は、種々の炭素源から、生体内の様々な代謝経路を経て生成された(R)-3-ヒドロキシブチリルCoAまたは(R)-3-ヒドロキシバレリルCoAを基質とした、酵素による重合反応によって行われる。この重合反応を触媒する酵素がP H B合成酵素(P H Bポリメラーゼ、P H Bシンターゼともいう)である。なお、CoAとは補酵素A(coenzyme A)の略称であり、その化学構造は下記化学式の通りである。

40

【0019】

【化25】



10

【0020】

また、近年、炭素数が3から12程度までの中鎖長(medium-chain-length)の3-ヒドロキシアルカン酸ユニットからなるポリヒドロキシアルカノエート(以下、mcl-PHAと略す場合がある)についての研究が精力的に行われている。

20

【0021】

特許第2642937号公報(特許文献33)では、シュードモナス・オレオボランス・ATCC29347株(*Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347)に非環状脂肪族炭化水素を与えることにより、炭素数が6から12までの3-ヒドロキシアルカン酸のモノマーウニットを有するPHAが生産されることが開示されている。また、*Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 746 (1992)(非特許文献1)には、シュードモナス・レジノボランス(*Pseudomonas resinovorans*)が、オクタン酸を单一炭素源として、3-ヒドロキシ-n-酪酸, 3-ヒドロキシヘキサン酸, 3-ヒドロキシオクタン酸, 3-ヒドロキシデカン酸をモノマーウニットとするPHAを生産し、また、ヘキサン酸を单一炭素源として、3-ヒドロキシ-n-酪酸, 3-ヒドロキシヘキサン酸, 3-ヒドロキシオクタン酸, 3-ヒドロキシデカン酸をユニットとするPHAを生産することが報告されている。ここで、原料の脂肪酸よりも鎖長の長い3-ヒドロキシアルカン酸モノマーウニットの導入は、後述の脂肪酸合成経路を経由していると考えられる。

30

【0022】

Int. J. Biol. Macromol., 16(3), 119(1994)(非特許文献2)には、シュードモナスsp.61-3株(*Pseudomonas sp. strain61-3*)が、グルコン酸ナトリウムを单一炭素源として、3-ヒドロキシ-n-酪酸, 3-ヒドロキシヘキサン酸, 3-ヒドロキシオクタン酸, 3-ヒドロキシデカン酸, 3-ヒドロキシドデカン酸といった3-ヒドロキシアルカン酸、および、3-ヒドロキシ-5-cis-デセン酸, 3-ヒドロキシ-5-cis-ドデセン酸といった3-ヒドロキシアルケン酸をユニットとするPHAを生産することが報告されている。

40

【0023】

上記のPHAは側鎖にアルキル基を有するモノマーウニットからなるPHA(以下、usual-PHAと略す場合がある)、あるいはそれに準じるもの(例えば他に末端部以外に二重結合をもつアルケニル基を側鎖にもつもの)である。しかし、より広範囲な応用、例えば機能性ポリマーとしての応用を考慮した場合、アルキル基以外の置換基(例えば、フェニル基、不飽和炭化水素、エステル基、アリル基、シアノ基、ハロゲン化炭化水素、エポキシド等)を側鎖に導入したPHA(以下、unusual-PHAと略す場合がある)が極めて有用である。

【0024】

フェニル基を有するunusual-PHAの合成の例としては、*Macromolecules*, 24, 5256-5260(1991), *Macromol. Chem.*, 191, 1957-1965(1990), *Chirality*, 3, 492-494(1991) (

50

以上、非特許文献3～5)で、シュードモナス・オレオボランスが、5-フェニル吉草酸から、3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸ユニットを含むP H Aを生産すると報告されている。また、Macromolecules,29, 1762-1766(1996)(非特許文献6)で、シュードモナス・オレオボランスが、5-(4-トリル)吉草酸(5-(4-メチルフェニル)吉草酸)から、3-ヒドロキシ-5-(4-トリル)吉草酸ユニットを含むP H Aを生産すると報告されている。さらに、Macromolecules,32, 2889-2895(1999)(非特許文献7)には、シュードモナス・オレオボランスが、5-(2,4-ジニトロフェニル)吉草酸から、3-ヒドロキシ-5-(2,4-ジニトロフェニル)吉草酸ユニットおよび3-ヒドロキシ-5-(4-ニトロフェニル)吉草酸ユニットを含むP H Aを生産すると報告されている。

【0025】

10

また、フェノキシ基を有するunusual-P H Aの例としては、Macromol. Chem. Phys., 1995, 1665-1672(1994)(非特許文献8)で、シュードモナス・オレオボランスが、11-フェノキシウンデカン酸から3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸ユニットおよび3-ヒドロキシ-9-フェノキシノナン酸ユニットを含むP H Aを生産すると報告されている。また、Macromolecules,29, 3432-3435(1996)(非特許文献9)には、シュードモナス・オレオボランスが、6-フェノキシヘキサン酸から3-ヒドロキシ-4-フェノキシ酪酸ユニットおよび3-ヒドロキシ-6-フェノキシヘキサン酸ユニットを含むP H Aを、8-フェノキシオクタン酸から3-ヒドロキシ-4-フェノキシ酪酸ユニット, 3-ヒドロキシ-6-フェノキシヘキサン酸ユニットおよび3-ヒドロキシ-8-フェノキシオクタン酸ユニットを含むP H Aを、1-1-フェノキシウンデカン酸から3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸ユニットおよび3-ヒドロキシ-7-フェノキシヘプタン酸ユニットを含むP H Aを生産することが報告されている。さらに、Can. J. Microbiol., 41, 32-43(1995)(非特許文献10)では、シュードモナス・オレオボランス・ATCC 29347株及びシュードモナス・プチダ・KT2442株(*Pseudomonas putida* KT2442)が、p-シアノフェノキシヘキサン酸またはp-ニトロフェノキシヘキサン酸から、3-ヒドロキシ-p-シアノフェノキシヘキサン酸ユニットまたは3-ヒドロキシ-p-ニトロフェノキシヘキサン酸ユニットを含むP H Aを生産すると報告している。特許第2989175号公報(特許文献34)には、3-ヒドロキシ-5-(モノフルオロフェノキシ)吉草酸ユニットあるいは3-ヒドロキシ-5-(ジフルオロフェノキシ)吉草酸ユニットからなるホモポリマー、少なくとも3-ヒドロキシ-5-(モノフルオロフェノキシ)ペントノエートユニットあるいは3-ヒドロキシ-5-(ジフルオロフェノキシ)ペントノエートユニットを含有するコポリマーとその製造方法が記載されており、その効果として、融点が高く良好な加工性を保ちつつ、立体規則性、撥水性を付与することができるとしている。

【0026】

20

また、シクロヘキシリル基を有するunusual-P H Aの例としては、Macromolecules, 30, 1611-1615(1997)(非特許文献11)に、シュードモナス・オレオボランスが、シクロヘキシリル酪酸またはシクロヘキシリル吉草酸から該P H Aを生産するとの報告がある。

【0027】

30

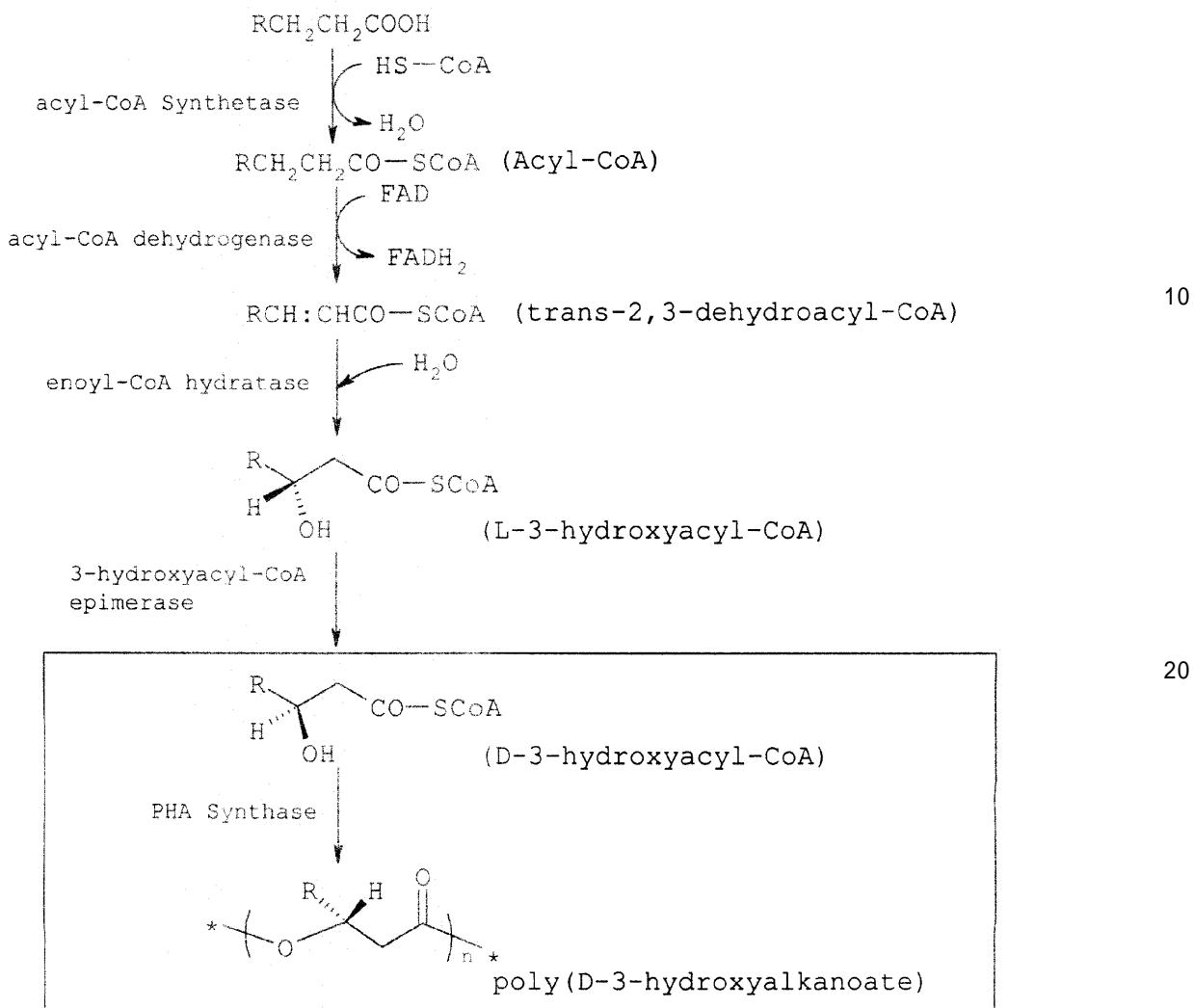
[P H A合成のメカニズム]

これらmcl-P H Aやunusual-P H Aの生合成は、原料となる各種アルカン酸から、生体内の様々な代謝経路(例えば、酸化系や脂肪酸合成経路)を経て生成された(R)-3-ヒドロキシアシルCoAを基質とした、酵素による重合反応によって行われる。この重合反応を触媒する酵素がP H A合成酵素(P H Aポリメラーゼ、P H Aシンターゼともいう)である。以下に、酸化系およびP H A合成酵素による重合反応を経て、アルカン酸がP H Aとなるまでの反応を示す。

【0028】

40

【化26】



【0029】

一方、脂肪酸合成経路を経る場合は、該経路中に生じた(R)-3-ヒドロキシアシル-ACP(ACPとはアシルキャリアプロテインのことである)から変換された(R)-3-ヒドロキシアシルCoAを基質として、同様にPHA合成酵素によりPHAが合成されると考えられる。

【0030】

[酵素を利用した無細胞系PHA合成]

近年、上記のPHB合成酵素やPHA合成酵素を菌体外に取り出して、無細胞系(in vitro)でPHAを合成しようとする試みが始まっている。

【0031】

Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 92, 6279-6283(1995)(非特許文献12)では、アルカリゲネス・ユウトロファス(*Alcaligenes eutrophus*)由来のPHB合成酵素に3-ヒドロキシブチリルCoAを作用させることにより、3-ヒドロキシ-n-酪酸ユニットからなるPHBを合成することに成功している。また、Int. J. Biol. Macromol., 25, 55-60(1999)(非特許文献13)では、アルカリゲネス・ユウトロファス由来のPHB合成酵素に、3-ヒドロキシブチリルCoAや3-ヒドロキシバレリルCoAを作用させることにより、3-ヒドロキシ-n-酪酸ユニットや3-ヒドロキシ-n-吉草酸ユニットからなるPHAの合成に成功している。さらにこの報告では、ラセミ体の3-ヒドロキシブチリルCoAを作用させたところ、酵素の立体選択性によって、R体の3-ヒドロキシ-n-酪酸ユニットのみからなるPHBが合成されたとしている。Macromol. Rapid Commun., 21, 77-84(2000)(非特許文献14)

10

20

30

40

50

4)においても、アルカリゲネス・ユウトロファス由来のPHB合成酵素を用いた細胞外でのPHB合成が報告されている。

【0032】

また、FEMS Microbiol. Lett., 168, 319-324(1998)(非特許文献15)では、クロマチウム・ビノサム(*Chromatium vinosum*)由来のPHB合成酵素に3-ヒドロキシブチリルCoAを作用させることにより、3-ヒドロキシ-n-酪酸ユニットからなるPHBを合成することに成功している。

【0033】

Appl. Microbiol. Biotechnol., 54, 37-43(2000)(非特許文献16)では、シュードモナス・アエルギノーサ(*Pseudomonas aeruginosa*)のPHA合成酵素に3-ヒドロキシデカノイルCoAを作用させることにより、3-ヒドロキシデカン酸ユニットからなるPHAを合成している。

【0034】

[他の先行文献等]

上記のほか、本願発明では下記特許文献35～36、非特許文献17～26の記載が援用されている。

【0035】

【特許文献1】

特開平8-286416号公報

【特許文献2】

特開平9-292735号公報

【特許文献3】

特開平5-119531号公報

【特許文献4】

特開平5-249725号公報

【特許文献5】

特開平6-332225号公報

【特許文献6】

特開平9-43896号公報

【特許文献7】

特開平10-78676号公報

【特許文献8】

特開平11-7163号公報

【特許文献9】

特開2000-66444号公報

【特許文献10】

特開2000-112174号公報

【特許文献11】

特開2000-330321号公報

【特許文献12】

特開昭59-221302号公報

【特許文献13】

特公平4-3088号公報

【特許文献14】

特公平5-10808号公報

【特許文献15】

特開昭59-200254号公報

【特許文献16】

特開昭59-200256号公報

【特許文献17】

10

20

30

40

50

特開昭59-200257号公報 【特許文献 1 8】	
特開昭59-224102号公報 【特許文献 1 9】	
特開昭63-250660号公報 【特許文献 2 0】	
特開平10-239897号公報 【特許文献 2 1】	
特公昭60-3181号公報 【特許文献 2 2】	10
特開昭55-146786号公報 【特許文献 2 3】	
特開平5-221112号公報 【特許文献 2 4】	
特開平11-78221号公報 【特許文献 2 5】	
特開2000-190631号公報 【特許文献 2 6】	
特開平5-74492号公報 【特許文献 2 7】	20
特公平6-15604号公報 【特許文献 2 8】	
特公平7-14352号公報 【特許文献 2 9】	
特公平8-19227号公報 【特許文献 3 0】	
特開平9-191893号公報 【特許文献 3 1】	
特開平5-93049号公報 【特許文献 3 2】	30
特開平7-265065号公報 【特許文献 3 3】	
特許第2642937号公報 【特許文献 3 4】	
特許第2989175号公報 【特許文献 3 5】	
特開2001-78753号公報 【特許文献 3 6】	
特開2001-69968号公報 【非特許文献 1】	40
Appl. Environ. Microbiol., 58, 746 (1992) 【非特許文献 2】	
Int. J. Biol. Macromol., 16(3), 119 (1994) 【非特許文献 3】	
Macromolecules, 24, 5256-5260 (1991) 【非特許文献 4】	
Macromol. Chem., 191, 1957-1965 (1990) 【非特許文献 5】	
Chirality, 3, 492-494 (1991) 【非特許文献 6】	50

Macromolecules, 29, 1762-1766(1996)

【非特許文献 7】

Macromolecules, 32, 2889-2895(1999)

【非特許文献 8】

Macromol. Chem. Phys., 195, 1665-1672(1994)

【非特許文献 9】

Macromolecules, 29, 3432-3435(1996)

【非特許文献 10】

Can. J. Microbiol., 41, 32-43(1995)

【非特許文献 11】

Macromolecules, 30, 1611-1615(1997)

【非特許文献 12】

Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 92, 6279-6283(1995)

【非特許文献 13】

Int. J. Biol. Macromol., 25, 55-60(1999)

【非特許文献 14】

Macromol. Rapid Commun., 21, 77-84(2000)

【非特許文献 15】

FEMS Microbiol. Lett., 168, 319-324(1998)

【非特許文献 16】

Appl. Microbiol. Biotechnol., 54, 37-43(2000)

【非特許文献 17】

Eur. J. Biochem., 250, 432-439(1997)

【非特許文献 18】

J. Biol. Chem., 218, 97-106(1956)

【非特許文献 19】

J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 806(1973)

【非特許文献 20】

Org. Synth., 4, 698(1963)

【非特許文献 21】

J. Org. Chem., 46, 19(1981)

【非特許文献 22】

J. Am. Chem. Soc., 81, 4273(1959)

【非特許文献 23】

Macromolecular chemistry, 4, 289-293(2001)

【非特許文献 24】

J. Amer. Chem. Soc., 78, 2278(1956)

【非特許文献 25】

Appl. Environ. Microbiol., 44, 238-241(1982)

【非特許文献 26】

Molecular Cloning, 1, 572, (1989); Cold Spring Harbor Laboratory出版

【0036】

【発明が解決しようとする課題】

前述のように、生物工学的手法を高分子化合物の合成に適用することによって、従来の有機合成的手法では実現が困難であった新たな高分子化合物の合成や、新たな機能・構造の付与が可能になると期待されている。また、従来の有機合成化学的手法では多段階に渡る反応を要していた製造工程を、1段階の工程のみで実現できる場合も多くあり、製造プロセスの簡略化やコストダウン、所要時間の短縮等の効果も期待されている。さらに、有機溶剤や酸・アルカリ、界面活性剤等の使用削減、温和な反応条件の設定、非石油系原料や低純度原料からの合成等が可能となり、より環境低負荷かつ資源循環型の合成プロセス

10

20

30

40

50

の実現が可能となる。なお、低純度原料からの合成についてさらに詳しく説明すれば、生物工学的合成プロセスでは一般に、触媒である酵素の基質特異性が高いため、低純度の原料を用いても所望の反応を選択的に進めることができるのであり、よって、廃棄物やリサイクル原料等の使用も期待できる。

【0037】

一方、前記の通り、本願発明者らは高分子化合物に大きな付加価値を与えるための要素技術として、高分子化合物で基材を被覆した構造体に着目してきた。このように高分子化合物で特定の基材を被覆することによって、極めて有用な機能性を有する複合構造体を得ることができる。前記の如き構造体を作出する試みは従来、有機合成的手法によって多くなされてきたが、該手法には一定の限界があった。

10

【0038】

仮に、かかる構造体を前述のような生物工学的手法により製造することができれば、従来の有機合成的手法では実現が困難であった新たな高分子化合物の利用や、新たな機能・構造の付与が可能になると期待できるうえ、より環境低負荷かつ資源循環型の製造プロセスを低コストで実現できるものと考えられる。例えば、生物の触媒作用に特有の極めて厳密な分子認識能や立体選択性を利用して、従来の有機合成化学的手法では実現が困難であった新たな機能性高分子化合物や、極めてキラリティーの高い高分子化合物により被覆されたカプセル構造体や積層構造体を、極めて簡便かつ環境低負荷なプロセスで製造することが可能になる。

【0039】

20

従って、本発明は、生物工学的手法により製造することのできる高機能な高分子化合物構造体を提供するものである。また本発明は、機能性複合構造体として広範囲に利用可能な、高分子化合物により基材を被覆した構造体の効率的な製造方法を提供するものである。

【0040】

さらには、基材が磁性体である場合については、磁性を有する金属および金属化合物に親油化処理を施すことなく、均一分散性に優れる、磁性体を被覆した構造体ならびにその製造方法を提供するものである。

【0041】

30

また、前述のように、従来の合成法により得られる磁性体含有カプセル構造体は、金属イオンの外部への溶出という課題を有するために、金属イオンの溶出による影響を受けない用途・分野にしか適用することができないのが現状である。本発明は、磁性体の分散性および磁気応答性に優れ、金属イオンが外部に溶出されにくく、種々の用途・分野に幅広く適用することのできる、磁性体を被覆したカプセル構造体ならびにその製造方法を提供するものである。

【0042】

【課題を解決するための手段】

上記課題を達成するため、本発明者らが鋭意検討した結果、PHA合成酵素を基材表面に固定化し、ここに3-ヒドロキシアシルCoAを加えて反応させることにより、基材表面に所望のPHAを合成させ、基材をPHAで被覆した構造体を得ることができることを見出し、本発明を完成するに至った。また、該PHAに化学修飾を施すことにより、各種の特性等を改良した構造体を得ることができることを見出した。さらに詳しくは、例えば、該PHAにグラフト鎖を導入することにより、該グラフト鎖に起因する各種の特性を備えたPHAが、基材の少なくとも一部を被覆した構造体を得できることを見出した。また、該PHAを架橋化せしめることにより、所望の物理化学的性質(例えば、機械的強度、耐薬品性、耐熱性等)を備えたPHAが、基材の少なくとも一部を被覆した構造体を得できることを見出した。なお、本発明における化学修飾(Chemical modification)とは、高分子材料の分子内または分子間、あるいは高分子材料と他の化学物質との間で化学反応を行わせることにより、該高分子材料の分子構造を変更することを指す。また、架橋(crosslinking)とは、高分子材料の分子内または分子間を化学的にあるいは物理化学的に結合せしめて網状構造をつくることを指す。架橋剤(crosslinking agent)とは、

40

50

前記架橋反応を行うために添加する、前記高分子材料と一定の反応性を有する物質を言う。

【0043】

即ち本発明は、3-ヒドロキシアルカン酸ユニットを含有するポリヒドロキシアルカノエートが粒状の磁性体からなる基材の少なくとも一部を被覆していることを特徴とする構造体に関する。

【0044】

また本発明は中鎖長ポリヒドロキシアルカノエート合成酵素を粒状の磁性体からなる基材表面に固定し、該酵素により3-ヒドロキシアシル補酵素Aを重合させてポリヒドロキシアルカノエートを合成することにより、前記基材の少なくとも一部をポリヒドロキシアルカノエートで被覆することを特徴とする構造体の製造方法に関する。 10

【0045】

また本発明は、粒状の磁性体からなる基材をコア（芯材料）とし、mcl-PHAやunusual-PHAを外被とするカプセル構造体に関し、さらに詳しくは、コアに着色剤を少なくとも含有していることを特徴とするカプセル構造体、該着色剤が顔料を少なくとも含有しているカプセル構造体、または、コアが顔料であるカプセル構造体に関する。

【0046】

また本発明は、前記カプセル構造体からなる電子写真用カプセルトナーに関する。

【0047】

さらに本発明は前記トナーを用いた画像形成方法、画像形成装置に関する。 20

【0048】

より詳細には、

後述する化学式[1]から化学式[8]に示すモノマーユニットからなる群より選択される少なくとも一つを含有するポリヒドロキシアルカノエートが粒状の磁性体からなる基材の少なくとも一部を被覆していることを特徴とする構造体に関する。

【0064】

好ましくは、

前記ポリヒドロキシアルカノエートの少なくとも一部が、化学修飾された構造体に関し、さらに、

前記の化学修飾されたポリヒドロキシアルカノエートが、少なくともグラフト鎖を有する構造体に関し、加えて、 30

前記グラフト鎖が、ハロゲン原子、ビニル基、エポキシ基あるいはカルボキシル基を有するモノマーユニットの少なくとも何れかを含むポリヒドロキシアルカノエートの化学修飾によるグラフト鎖である構造体に関する。

【0065】

また好ましくは、

前記グラフト鎖が、チオール基、水酸基あるいはアミノ基の少なくとも何れかを有する化合物のグラフト鎖である構造体に関する。

【0066】

別の好ましい形態としては、

前記ポリヒドロキシアルカノエートの少なくとも一部が、架橋化されたポリヒドロキシアルカノエートである構造体に関し、さらに、 40

前記の架橋化されたポリヒドロキシアルカノエートが、ビニル基あるいはエポキシ基を有するモノマーユニットの少なくとも何れかを含むポリヒドロキシアルカノエートが架橋化されたポリヒドロキシアルカノエートである構造体に関する。

【0067】

さらに、好ましくは、

前記基材が着色剤を含有している構造体に関し、加えて、

前記着色剤が顔料である構造体に関し、または、

前記着色剤が染料である構造体に関する。 50

【0068】

あるいは、前記磁性体が磁性を有する金属または金属化合物からなる構造体に関する。

【0070】

さらに、好ましくは、

前記ポリヒドロキシアルカノエートのモノマーユニット組成が前記構造体の内側から外側に向かう方向において変化している構造体に関する。

【0071】

さらに、好ましくは、

前記基材にポリヒドロキシアルカノエート合成酵素が固定されている構造体に関する。

【0072】

10

加えて、

前記ポリヒドロキシアルカノエートの分子量が1,000から10,000,000である構造体に関する。

【0073】

また、本発明は、

中鎖長ポリヒドロキシアルカノエート合成酵素を基材表面に固定し、該酵素により3-ヒドロキシアシル補酵素Aを重合させてポリヒドロキシアルカノエートを合成することにより、前記基材の少なくとも一部をポリヒドロキシアルカノエートで被覆することを特徴とする構造体の製造方法において、前記ポリヒドロキシアルカノエートが、後述する化学式[1]から化学式[8]に示すモノマーユニットからなる群より選択される少なくとも一つを含有するポリヒドロキシアルカノエートであり、前記ユニットのそれぞれに対して対応する3-ヒドロキシアシル補酵素Aが順に後述する化学式[9]から化学式[15]に示す3-ヒドロキシアシル補酵素Aであり、前記ポリヒドロキシアルカノエートが、化学式[2]の構造においてR₂がエポキシ基、COOR₂（R₂：H原子、Na原子、K原子のいずれかを表す）からなる群から選ばれたいずれかのユニットを少なくとも含む場合は、化学式[2]の構造においてR₂がビニル基であるユニットを少なくとも含むポリヒドロキシアルカノエートにより被覆された構造体の該ビニル基の酸化反応により、また、前記ポリヒドロキシアルカノエートが、化学式[7]および[8]の構造からなる群から選ばれたいずれかのユニットを少なくとも含む場合は、化学式[15]に示す3-ヒドロキシアシル補酵素Aを少なくとも含んだ系での重合により得られる、後述する化学式[16]に示すフェニルスルファニル基を有するユニットを少なくとも含むポリヒドロキシアルカノエートにより被覆された構造体の該フェニルスルファニル基の酸化反応による、構造体の製造方法に関する。

20

【0105】

30

好ましくは、

前記基材を被覆する前記ポリヒドロキシアルカノエートの少なくとも一部に化学修飾を施す工程をさらに有する構造体の製造方法に関し、さらに、

前記化学修飾を施す工程が、前記ポリヒドロキシアルカノエートの少なくとも一部にグラフト鎖を付加する工程である構造体の製造方法に関し、加えて、

前記グラフト鎖を付加する工程が、前記ポリヒドロキシアルカノエートの少なくとも一部と、末端に反応性官能基を有する化合物とを反応させる工程である構造体の製造方法に関し、その上さらに、

40

前記ポリヒドロキシアルカノエートが、ハロゲン原子、ビニル基、エポキシ基あるいはカルボキシル基を有するモノマーユニットの少なくとも何れかを含むポリヒドロキシアルカノエートである構造体の製造方法に関する。

【0106】

また好ましくは、

前記末端に反応性官能基を有する化合物が、チオール基、水酸基あるいはアミノ基の少なくとも何れかを有する化合物である構造体の製造方法に関する。

【0107】

50

別の好ましい形態としては、

前記化学修飾を施す工程が、前記ポリヒドロキシアルカノエートの少なくとも一部を架橋化する工程である構造体の製造方法に関し、さらに、

前記ポリヒドロキシアルカノエートが、ビニル基あるいはエポキシ基を有するモノマーユニットの少なくとも何れかを含むポリヒドロキシアルカノエートである構造体の製造方法に関する。

【0108】

また好ましくは、

前記架橋化工程が、前記ポリヒドロキシアルカノエートの少なくとも一部と架橋剤とを反応させる工程である構造体の製造方法、または、

10

前記架橋化工程が、前記ポリヒドロキシアルカノエートに電子線を照射する工程である構造体の製造方法に関する。

【0109】

さらに、好ましくは、

前記基材は着色剤を含有する構造体の製造方法に関し、加えて、

前記着色剤は顔料を含有する構造体の製造方法、または、

前記着色剤は染料を含有する構造体の製造方法に関する。

【0110】

あるいは、

前記磁性体が磁性を有する金属または金属化合物からなる構造体の製造方法に関する。

20

【0112】

さらに、好ましくは、

前記3-ヒドロキシアルコール補酵素Aの組成を経時的に変化させることにより、前記ポリヒドロキシアルカノエートのモノマーユニット組成を前記構造体の内側から外側に向かう方向において変化させる構造体の製造方法に関する。

【0113】

また、好ましくは、

前記ポリヒドロキシアルカノエート合成酵素を該酵素の生産能を有する微生物を使って生産する構造体の製造方法に関し、または；

30

前記ポリヒドロキシアルカノエート合成酵素を該酵素の生産能に関与する遺伝子を導入した形質転換体により生産する構造体の製造方法に関し、さらに、

前記遺伝子はポリヒドロキシアルカノエート合成酵素の生産能を有する微生物から得られた遺伝子である構造体の製造方法に関する。

【0114】

さらに、好ましくは、

前記ポリヒドロキシアルカノエート合成酵素の生産能を有する微生物が、シードモナス属（*Pseudomonas* sp.）に属する微生物である構造体の製造方法に関し、さらに、

前記シードモナス属（*Pseudomonas* sp.）に属する微生物が、シードモナス・ブチダ・P91株（*Pseudomonas putida* P91、FERM BP-7373）、シードモナス・チコリアイ・H45株（*Pseudomonas cichorii* H45、FERM BP-7374）、シードモナス・チコリアイ・YN2株（*Pseudomonas cichorii* YN2、FERM BP-7375）、シードモナス・ジェッセニイ・P161株（*Pseudomonas jesseni* P161、FERM BP-7376）からなる群から選択される少なくとも1つの微生物である構造体の製造方法に関する。

40

【0115】

あるいは、

前記ポリヒドロキシアルカノエート合成酵素の生産能を有する微生物が、バーグホルデリア属（*Burkholderia* sp.）に属する微生物である構造体の製造方法に

50

関し、さらに、

前記バークホルデリア属に属する微生物が、バークホルデリア属・OK3株(Burkholderia sp. OK3、FERMP-17370)、バークホルデリア属・OK4株(Burkholderia sp. OK4、FERMP-17371)からなる群から選択される少なくとも1つの微生物である構造体の製造方法に関する。

【0116】

さらに、好ましくは、

前記ポリヒドロキシアルカノエート合成酵素の生産能を有する形質転換体の宿主微生物が、大腸菌(Escherichia coli)である構造体の製造方法に関する。

【0117】

10

また、本発明は、

前記構造体を含むトナー、あるいは、

前記構造体からなるトナーに関する。

【0118】

さらに、本発明は、

前記粒状の構造体を製造する工程を含む、トナーの製造方法に関する。

【0119】

またさらに、本発明は、

前記トナーを被記録媒体に付与することで画像を形成する画像形成方法、並びに、

前記トナーを被記録媒体に付与することで画像を形成する画像形成装置に関する。

20

【0120】

【発明の実施の形態】

本発明の構造体は、置換基を側鎖に有する多様な構造のモノマーユニットを含むPHAにより基材が被覆された形態を有する構造体であり、電子写真用カプセルトナーや記録媒体等の高機能性構造体として極めて有用である。また、基材が磁性体の場合は、磁性体が被覆された形態を有する構造体であり、細菌、細胞、核酸、蛋白質、その他生体物質の分離精製あるいはスクリーニング用担体、生体中での移動を制御できる医療診断薬担体、薬剤を患者の疾患部に移動させるドラックデリバリー担体、固定化酵素担体、磁性トナー、磁性インク、磁性塗料、磁気記録媒体等の各種機能性構造体として極めて有用である。

【0121】

30

以下に、本発明をより詳細に説明する。

【0122】

<PHA> 本発明に利用可能なPHAとしては、mcl-PHAの合成反応に関するPHA合成酵素によって合成され得るPHA(即ち、各種のmcl-PHAやunusual-PHA等)である。前述の通り、PHA合成酵素は、生物体内でのPHA合成反応系における最終段階を触媒する酵素であり、従って、生物体内において合成され得ることが知られているPHAであれば、いずれも該酵素による触媒作用を受けて合成されていることになる。よって、所望のPHAに対応する3-ヒドロキシアシルCoAを、本発明における基材に固定化された該酵素に作用させることによって、生物体内において合成され得ることが知られているPHAで基材を被覆した構造体を作成することが可能である。

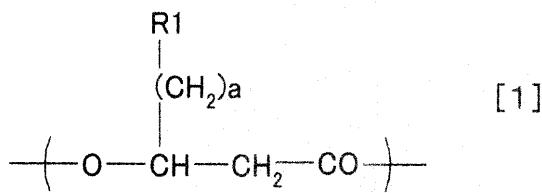
40

【0123】

このようなPHAとして、具体的には、下記化学式[1]から[8]で表されるモノマーユニットを少なくとも含むPHAを例示することができる。

【0124】

【化51】

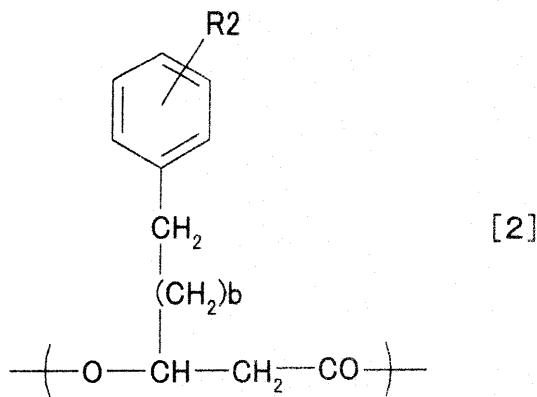


【0125】

(ただし、該モノマーユニットは、式中R1およびaの組合せが下記のいずれかであるモノマーユニットからなる群より選択される少なくとも一つである。R1がビニル基でありaが1から10の整数のいずれかであるモノマーユニットである。)

【0126】

【化52】

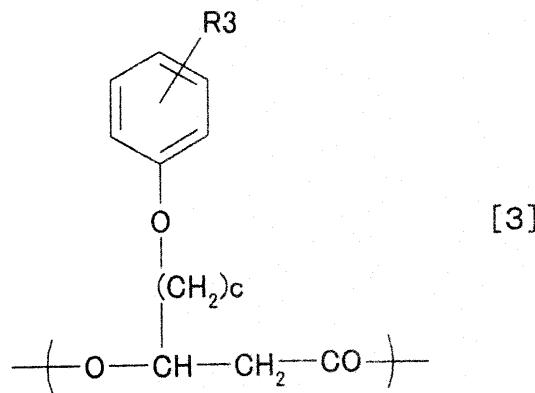


【0127】

(ただし、式中bは0から7の整数のいずれかを表し、R2はCH₃基、C₂H₅基、C₃H₇基、ビニル基、エポキシ基、COOR21(R21: H原子、Na原子、K原子のいずれかを表す)からなる群から選ばれたいずれか1つを表し、複数のユニットが存在する場合、各ユニット毎に独立して上記の意味を表す。)

【0128】

【化53】



【0129】

(ただし、式中cは1から8の整数のいずれかを表し、R3はCH₃基、C₂H₅基、C₃H₇基、SC₃H₇基からなる群から選ばれたいずれか1つを表し、複数のユニットが存在する場合、各ユニット毎に独立して上記の意味を表す。)

【0130】

【化54】

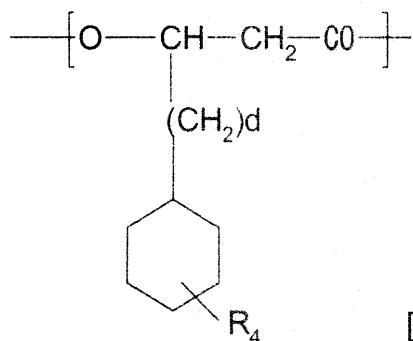
10

20

30

40

50



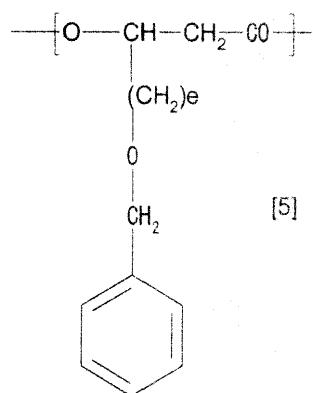
10

【0131】

(ただし、式中dは0から8の整数のいずれかを表し、R4は、dが0の場合、H原子、C N基、NO₂基、ハロゲン原子、CH₃基、C₂H₅基、C₃H₇基、CF₃基、C₂F₅基またはC₃F₇基からなる群から選ばれ、dが1-8の場合、CH₃基、C₂H₅基、C₃H₇基からなる群から選ばれたいずれか1つを表し、複数のユニットが存在する場合、各ユニット毎に独立して上記の意味を表す。)

【0132】

【化55】



20

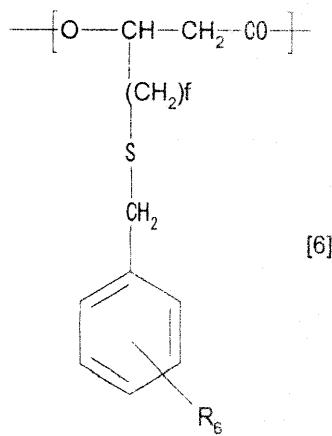
30

【0133】

(ただし、式中eは1から8の整数のいずれかを表す。)

【0134】

【化56】



40

【0135】

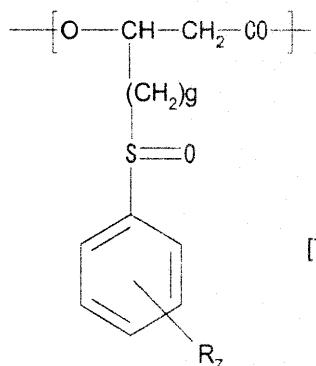
(ただし、式中fは1から8の整数のいずれかを表し、R6はCH₃基、C₂H₅基、C₃H₇

50

基、 $(\text{CH}_3)_2-\text{C}\text{H}$ 基または $(\text{CH}_3)_3-\text{C}$ 基からなる群から選ばれたいずれか1つを表し、複数のユニットが存在する場合、各ユニット毎に独立して上記の意味を表す。)

【0136】

【化57】



[7]

10

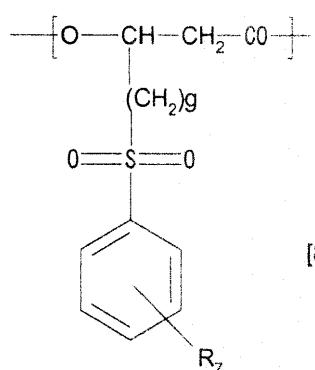
【0137】

(ただし、式中gは1から8の整数のいずれかを表し、R7はH原子、ハロゲン原子、CN基、NO₂基、COOR71、SO₂R72(R71:H、Na、K、CH₃、C₂H₅のいずれかを表し、R72:OH、ONa、OK、ハロゲン原子、OCH₃、OC₂H₅のいずれかを表す)、CH₃基、C₂H₅基、C₃H₇基、(CH₃)₂-CH基または(CH₃)₃-C基であり、複数のユニットが存在する場合、各ユニット毎に独立して上記の意味を表す。)

20

【0138】

【化58】



[8]

30

【0139】

(ただし、式中gは1から8の整数のいずれかを表し、R7はH原子、ハロゲン原子、CN基、NO₂基、COOR71、SO₂R72(R71:H、Na、K、CH₃、C₂H₅のいずれかを表し、R72:OH、ONa、OK、ハロゲン原子、OCH₃、OC₂H₅のいずれかを表す)、CH₃基、C₂H₅基、C₃H₇基、(CH₃)₂-CH基または(CH₃)₃-C基であり、複数のユニットが存在する場合、ユニット毎に独立して上記の意味を表す。)

40

本発明において用いられるPHAとしては上記モノマーユニットを複数含むランダム共重合体やブロック共重合体を用いることも可能であり、各モノマーユニットや含まれる官能基の特性を利用したPHAの物性制御や複数の機能の付与、官能基間の相互作用を利用した新たな機能の発現等が可能となる。

【0140】

さらに、基質である3-ヒドロキシアシルCoAの種類や濃度等の組成を経時的に変化させることによって、構造体の形状が粒状であれば内側から外側に向かう方向に、構造体の形状が平面状であれば垂直方向に、PHAのモノマーユニット組成を変化させることも可能である。

50

【0141】

これによって、例えばカプセルトナーの場合、ガラス転移温度の高いP H Aをトナー表層に、ガラス転移温度の低いP H Aをそれより内側の層に形成させることで、保存時には耐プロッキング性に優れ、定着時には低温定着性に優れる等の複数の機能を同時に保有させることが可能となる。

【0142】

また例えば、基材と親和性の低いP H Aで被覆構造体を形成する必要がある場合、まず基材を基材と親和性の高いP H Aで被覆し、その基材と親和性の高いP H Aのモノマーユニット組成を、目的とするP H Aのモノマーユニット組成に、内側から外側に向かう方向もしくは垂直方向に変化、例えば多層構造あるいはグラディエント構造とすることで、基材との結合を強固にしたP H A被膜を形成することが可能となる。 10

【0143】

また、3-ヒドロキシプロピオン酸ユニット、3-ヒドロキシ-n-酪酸ユニット、3-ヒドロキシ-n-吉草酸ユニット、4-ヒドロキシ-n-酪酸ユニット等は、それらのみからなるP H Aとしてはmcl-P H Aやunusual-P H Aには該当しないが、これらのモノマーユニットが先に例示したようなモノマーユニット中に混在しているP H Aについては、本発明において利用可能である。また必要に応じて、P H Aを合成したのち、あるいは、合成中に、さらに化学修飾等を施しても良い。P H Aの分子量は、数平均分子量で1,000から1,000万程度、仮に該構造体を電子写真用カプセルトナーとして使用する場合は3,000から100万程度とするのが望ましい。 20

【0144】

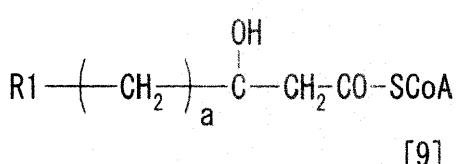
なお、本発明の構造体に用いる、P H A合成酵素により合成されるP H Aは、一般にR体のみから構成されるアイソタクチックなポリマーである。

【0145】

<3-ヒドロキシアシルCoA> 本発明のP H A合成酵素の基質として用いる3-ヒドロキシアシルCoAとして、具体的には、下記化学式[9]から[15]で表される3-ヒドロキシアシルCoAを例示することができる。 30

【0146】

【化59】

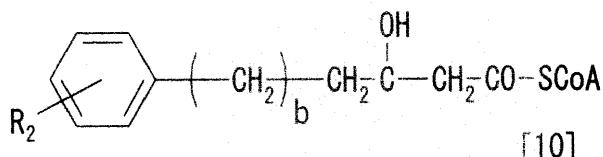


【0147】

(ただし、前記化学式中-S CoAはアルカン酸に結合した補酵素Aを表し、aは前記化学式[1]で表されるモノマーユニットにおけるaと対応する1から10の整数のいずれかを表し、R1はビニル基である。)

【0148】

【化60】



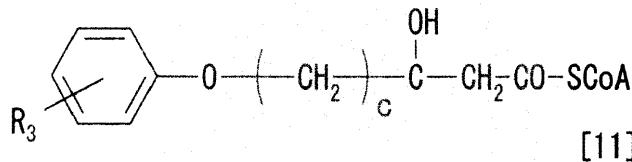
【0149】

(ただし、式中-S CoAはアルカン酸に結合した補酵素Aを表し、bは前記化学式[2]で表されるモノマーユニットにおけるbと対応する0から7の整数のいずれかを表し、R2 40

は前記化学式[2]で表されるモノマーユニットにおけるR2と対応する、CH₃基、C₂H基、C₃H₇基、ビニル基からなる群から選ばれたいずれか1つを表す。)

【0150】

【化61】



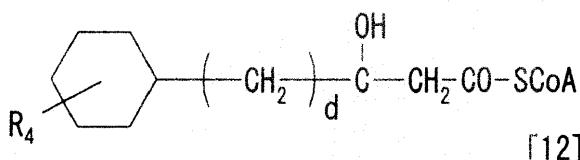
10

【0151】

(ただし、式中-S CoA はアルカン酸に結合した補酵素Aを表し、cは前記化学式[3]で表されるモノマーユニットにおけるcと対応する1から8の整数のいずれかを表し、R3は前記化学式[3]で表されるモノマーユニットにおけるR3と対応する、CH₃基、C₂H基、C₃H₇基、SCH₃基からなる群から選ばれたいずれか1つを表す。)

【0152】

【化62】



20

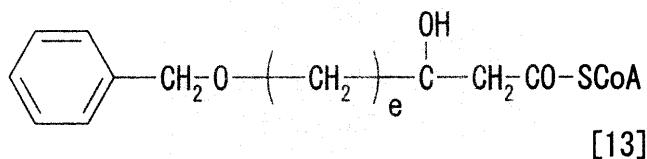
【0153】

(ただし、式中-S CoA はアルカン酸に結合した補酵素Aを表し、dは前記化学式[4]で表されるモノマーユニットにおけるdと対応する0から8の整数のいずれかを表し、R4は前記化学式[4]で表されるモノマーユニットにおけるR4と対応し、dが0の場合、H原子、CN基、NO₂基、ハロゲン原子、CH₃基、C₂H₅基、C₃H₇基、CF₃基、C₂F₅基またはC₃F₇基からなる群から選ばれ、dが1-8の場合、CH₃基、C₂H₅基、C₃H₇基からなる群から選ばれたいずれか1つを表す。)

30

【0154】

【化63】



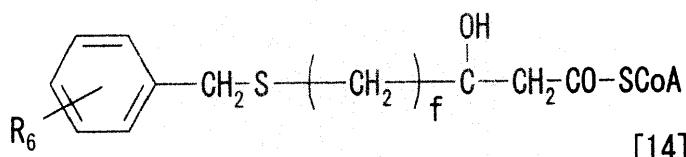
【0155】

(ただし、式中-S CoA はアルカン酸に結合した補酵素Aを表し、eは前記化学式[5]で表されるモノマーユニットにおけるeと対応する1から8の整数のいずれかを表す。)

40

【0156】

【化64】



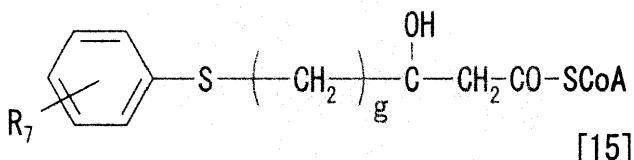
【0157】

50

(ただし、式中-S CoA はアルカン酸に結合した補酵素 A を表し、f は前記化学式[6]で表されるモノマーユニットにおけるfと対応する1から8の整数のいずれかを表し、R6 は前記化学式[6]で表されるモノマーユニットにおけるR6と対応する、CH₃基、C₂H₅基、C₃H₇基、(CH₃)₂-CH基または(CH₃)₃-C基からなる群から選ばれたいずれか1つを表す。)

【0158】

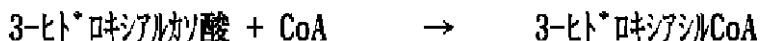
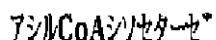
【化65】



【0159】

(ただし、式中-S CoA はアルカン酸に結合した補酵素 A を表し、g は前記化学式[7]および[8]で表されるモノマーユニットにおけるgと対応する1から8の整数のいずれかを表し、R7 は前記化学式[7]および[8]で表されるモノマーユニットにおけるR7と対応する、H原子、ハロゲン原子、CN基、NO₂基、COOR71、SO₂R72(R71:H、Na、K、CH₃、C₂H₅のいずれかを表し、R72:OH、ONa、OK、ハロゲン原子、OC H₃、OC₂H₅のいずれかを表す)、CH₃基、C₂H₅基、C₃H₇基、(CH₃)₂-CH基または(CH₃)₃-C基からなる群から選ばれたいずれか1つを表す。)

これらの3-ヒドロキシアシルCoAは、例えば、酵素を用いたin vitro合成法、微生物や植物等の生物体を用いたin vivo合成法、化学合成法等の中から適宜選択した方法で合成して用いることができる。特に、酵素合成法は該基質の合成に一般に用いられている方法であり、市販のアシルCoAシンセターゼ(アシルCoAリガーゼ、E.C.6.2.1.3)を用いた下記反応、



を用いた方法等が知られている(Eur. J. Biochem., 250, 432-439(1997) (非特許文献17)、Appl. Microbiol. Biotechnol., 54, 37-43(2000) (前記・非特許文献16)等)。酵素や生物体を用いた合成工程には、バッチ式の合成方法を用いても良く、また、固定化酵素や固定化細胞を用いて連続生産してもよい。

【0160】

<酸化反応によるPHA構造の変換> また、本発明のPHAが、化学式[2]の構造においてR2がエポキシ基、COOR21(R21:H原子、Na原子、K原子のいずれかを表す)からなる群から選ばれたいずれかのユニットを少なくとも含む場合は、化学式[2]の構造においてR2がビニル基であるユニットを少なくとも含むPHAにより被覆された構造体の該ビニル基の酸化反応により、該PHAで被覆された構造体を得ることができる。

【0161】

また、本発明のPHAが、化学式[7]および[8]の構造からなる群から選ばれたいずれかのユニットを少なくとも含む場合は、化学式[15]に示す3-ヒドロキシアシル補酵素Aを少なくとも含んだ系での重合により得られる、下記化学式[16]に示すフェニルスルファニル基を有するユニットを少なくとも含むPHAにより被覆された構造体の該フェニルスルファニル基の酸化反応により、該PHAで被覆された構造体を得ることができる。

【0162】

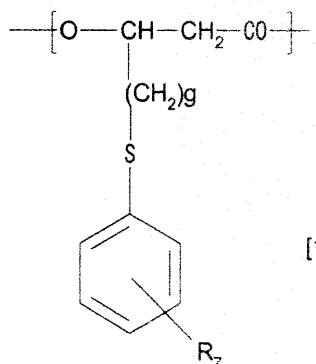
【化66】

10

20

30

40



10

【0163】

(ただし、式中gは1から8の整数のいずれかを表し、R₇はH原子、ハロゲン原子、C N基、N O₂基、C O O R₇₁、S O₂ R₇₂(R₇₁: H、Na、K、C H₃、C₂H₅のいずれかを表し、R₇₂: O H、O Na、O K、ハロゲン原子、O C H₃、O C₂H₅のいずれかを表す)、C H₃基、C₂H₅基、C₃H₇基、(C H₃)₂-C H基または(C H₃)₃-C 基であり、複数のユニットが存在する場合、各ユニット毎に独立して上記の意味を表す。)

< P H A 合成酵素およびその生産菌> 本発明に用いるP H A 合成酵素は、該酵素を生産する微生物から適宜選択された微生物、あるいは、それら微生物のP H A 合成酵素遺伝子を導入した形質転換体により生産されたものを用いることができる。

20

【0164】

P H A 合成酵素を生産する微生物としては、例えば、mcl-P H A やunusual-P H A の生産菌を用いることができ、このような微生物として、前述のシュードモナス・オレオボランス、シュードモナス・レジノボランス、シュードモナス属61-3株、シュードモナス・プチダ・K T 2442株、シュードモナス・アエルギノーサ等のほかに、本発明者らにより分離された、シュードモナス・プチダ・P 91株(*Pseudomonas putida* P 91)、シュードモナス・チコリアイ・H 45株(*Pseudomonas cichorii* H 45)、シュードモナス・チコリアイ・Y N 2株(*Pseudomonas cichorii* Y N 2)、シュードモナス・ジェッセニイ・P 161株(*Pseudomonas jessenii* P 161)等のシュードモナス属微生物や、特開2001-78753号公報(特許文献35)に記載のバークホルデリア属・O K 3株(*Burkholderia* sp. O K 3、F E R M P -17370)、特開2001-69968号公報(特許文献36)に記載のバークホルデリア属・O K 4株(*Burkholderia* sp. O K 4、F E R M P -17371)等のバークホルデリア属微生物を用いることができる。また、これら微生物に加えて、アエロモナス属(*Aeromonas* sp.)、コマモナス属(*Comamonas* sp.)等に属し、mcl-P H A やunusual-P H A を生産する微生物を用いることも可能である。

30

【0165】

なお、P 91株は寄託番号F E R M B P -7373として、H 45株は寄託番号F E R M B P -7374として、Y N 2株は寄託番号F E R M B P -7375として、P 161株は寄託番号F E R M B P -7376として、特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブタペスト条約に基づき、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター(経済産業省産業技術総合研究所(旧通商産業省工業技術院)生命工学工業技術研究所特許微生物寄託センター)に国際寄託されている。

40

【0166】

なお、前記のP 91株、H 45株、Y N 2株およびP 161株の菌学的性質を列挙すれば以下の通りである。また、P 161株については、16 S r R N A の塩基配列を配列番号: 1に示す。

【0167】

(シュードモナス・プチダ・P 91株の菌学的性質)

(1) 形態学的性質

細胞の形と大きさ : 桿菌、0.6 μ m × 1.5 μ m

50

細胞の多形性 : なし
 運動性 : あり
 胞子形成 : なし
 グラム染色性 : 陰性
 コロニー形状 : 円形、全縁なめらか、低凸状、
 表層なめらか、光沢、クリーム色

(2) 生理学的性質

カタラーゼ	: 陽性
オキシダーゼ	: 陽性
O/F 試験	: 酸化型
硝酸塩の還元	: 陰性
インドールの生成	: 陰性
ブドウ糖酸性化	: 陰性
アルギニンジヒドロラーゼ	: 陽性
ウレアーゼ	: 陰性
エスクリン加水分解	: 陰性
ゼラチン加水分解	: 陰性
-ガラクトシダーゼ	: 陰性
King's B 寒天での蛍光色素産生	: 陽性

10

(3) 基質資化能

ブドウ糖	: 陽性
L-アラビノース	: 陰性
D-マンノース	: 陰性
D-マンニトール	: 陰性
N-アセチル-D-グルコサミン	: 陰性
マルトース	: 陰性
グルコン酸カリウム	: 陽性
n-カプリン酸	: 陽性
アジピン酸	: 陰性
dL-リンゴ酸	: 陽性
クエン酸ナトリウム	: 陽性
酢酸フェニル	: 陽性。

20

【0168】

(シュードモナス・チコリアイ・H45株の菌学的性質)

(1) 形態学的性質

細胞の形と大きさ : 桿菌、 $0.8 \mu m \times 1.0 \sim 1.2 \mu m$
 細胞の多形性 : なし
 運動性 : あり
 胞子形成 : なし
 グラム染色性 : 陰性
 コロニー形状 : 円形、全縁なめらか、低凸状、
 表層なめらか、光沢、クリーム色

30

(2) 生理学的性質

カタラーゼ	: 陽性
オキシダーゼ	: 陽性
O/F 試験	: 酸化型
硝酸塩の還元	: 陰性
インドールの生成	: 陰性
ブドウ糖酸性化	: 陰性
アルギニンジヒドロラーゼ	: 陰性

40

50

ウレアーゼ	:陰性	
エスクリン加水分解	:陰性	
ゼラチン加水分解	:陰性	
-ガラクトシダーゼ	:陰性	
King's B 寒天での蛍光色素産生	:陽性	
4% NaClでの生育	:陰性	
ポリ- -ヒドロキシ酪酸の蓄積	:陰性	
(3)基質資化能		
ブドウ糖	:陽性	
L-アラビノース	:陰性	10
D-マンノース	:陽性	
D-マンニトール	:陽性	
N-アセチル-D-グルコサミン	:陽性	
マルトース	:陰性	
グルコン酸カリウム	:陽性	
n-カプリン酸	:陽性	
アジピン酸	:陰性	
dL-リンゴ酸	:陽性	
クエン酸ナトリウム	:陽性	
酢酸フェニル	:陽性。	20
【0169】		
(ショードモナス・チコリアイ・YN2株の菌学的性質)		
(1)形態学的性質		
細胞の形と大きさ	:桿菌、0.8 μm × 1.5 ~ 2.0 μm	
細胞の多形性	:なし	
運動性	:あり	
胞子形成	:なし	
グラム染色性	:陰性	
コロニー形状	:円形、全縁なめらか、低凸状、表層なめらか、光沢、半透明	30
(2)生理学的性質		
カタラーゼ	:陽性	
オキシダーゼ	:陽性	
O/F試験	:酸化型	
硝酸塩の還元	:陰性	
インドールの生成	:陽性	
ブドウ糖酸性化	:陰性	
アルギニンジヒドロラーゼ	:陰性	
ゼラチン加水分解	:陰性	
-ガラクトシダーゼ	:陰性	40
King's B 寒天での蛍光色素産生	:陽性	
4% NaClでの生育	:陽性(弱い生育)	
ポリ- -ヒドロキシ酪酸の蓄積	:陰性	
Tween 80の加水分解	:陽性	
(3)基質資化能		
ブドウ糖	:陽性	
L-アラビノース	:陽性	
D-マンノース	:陰性	
D-マンニトール	:陰性	
N-アセチル-D-グルコサミン	:陰性	50

マルトース	:陰性
グルコン酸カリウム	:陽性
n-カプリン酸	:陽性
アジピン酸	:陰性
dL-リンゴ酸	:陽性
クエン酸ナトリウム	:陽性
酢酸フェニル	:陽性。

【 0 1 7 0 】

(シュードモナス・ジェッセニイ・P161株の菌学的性質)

(1) 形態学的性質

細胞の形と大きさ : 球状 $0.6 \mu m$ 、桿状 $0.6 \mu m \times 1.5 \sim 2.0 \mu m$

細胞の多形性 : あり(伸長型)

運動性 : あり

胞子形成 : なし

グラム染色性 : 陰性

コロニー形状 : 円形、全縁なめらか、低凸状、

表層なめらか、淡黄色

(2) 生理学的性質

カタラーゼ : 陽性

オキシダーゼ : 陽性

O/F 試験 : 酸化型

硝酸塩の還元 : 陽性

インドールの生成 : 陰性

アルギニンジヒドロラーゼ : 陽性

ウレアーゼ : 陰性

エスクリン加水分解 : 陰性

ゼラチン加水分解 : 陰性

-ガラクトシダーゼ : 陰性

King's B 寒天での蛍光色素産生 : 陽性

(3) 基質資化能

ブドウ糖 : 陽性

L-アラビノース : 陽性

D-マンノース : 陽性

D-マンニトール : 陽性

N-アセチル-D-グルコサミン : 陽性

マルトース : 陰性

グルコン酸カリウム : 陽性

n-カプリン酸 : 陽性

アジピン酸 : 陰性

dL-リンゴ酸 : 陽性

クエン酸ナトリウム : 陽性

酢酸フェニル : 陽性。

【 0 1 7 1 】

本発明にかかるPHA合成酵素の生産に用いる微生物の通常の培養、例えば、保存菌株の作成、PHA合成酵素の生産に必要とされる菌数や活性状態を確保するための増殖等には、用いる微生物の増殖に必要な成分を含有する培地を適宜選択して用いる。例えば、微生物の生育や生存に悪影響を及ぼすものでない限り、一般的な天然培地(肉汁培地、酵母エキス等)や、栄養源を添加した合成培地等、いかなる種類の培地をも用いることができる。

【 0 1 7 2 】

10

20

30

40

50

培養は液体培養や固体培養等、該微生物が増殖する方法であればいかなる方法をも用いることができる。さらに、バッチ培養、フェドバッチ培養、半連續培養、連續培養等の種類も問わない。液体バッチ培養の形態としては、振とうフラスコによって振とうさせて酸素を供給する方法、ジャーファーメンターによる攪拌通気方式の酸素供給方法がある。また、これらの工程を複数段接続した多段方式を採用してもよい。

【0173】

前記したような P H A 生産微生物を用いて、P H A 合成酵素を生産する場合は、例えば、オクタン酸やノナン酸等のアルカン酸を含む無機培地で該微生物を増殖させ、対数増殖期から定常期初期にかけての微生物を遠心分離等で回収して所望の酵素を抽出する方法等を用いることができる。なお、上記のような条件で培養を行うと、添加したアルカン酸に由来する mcl-P H A が菌体内に合成されることになるが、この場合、一般に、P H A 合成酵素は菌体内に形成される P H A の微粒子に結合して存在するとされている。しかし、本発明者らの検討によると、上記の方法で培養した菌体の破碎液を遠心分離した上清液にも、相当程度の酵素活性が存在していることがわかっている。これは、前記の如き対数増殖期から定常期初期にかけての比較的培養初期には、菌体内で該酵素が活発に生産され続けているため、遊離状態の P H A 合成酵素も相当程度存在するためと推定される。

10

【0174】

上記の培養方法に用いる無機培地としては、リン源(例えば、リン酸塩等)、窒素源(例えば、アンモニウム塩、硝酸塩等)など、微生物が増殖し得る成分を含んでいるものであればいかなるものでも良く、例えば無機塩培地としては、M S B 培地、E 培地(J. Biol. Chem., 218, 97-106(1956)(非特許文献18)), M 9 培地等を挙げることができる。なお、本発明における実施例で用いる M 9 培地の組成は以下の通りである。

20

[M 9 培地]

N _a ₂ H P O ₄	:	6.2 g
K H ₂ P O ₄	:	3.0 g
N a C l	:	0.5 g
N H ₄ C l	:	1.0 g

(培地 1 リットル中、pH 7.0)。

【0175】

さらに、良好な増殖及び P H A 合成酵素の生産のためには、上記の無機塩培地に培地に以下に示す微量成分溶液を 0.3% (v/v) 程度添加するのが好ましい。

30

(微量成分溶液)

ニトリロ三酢酸	:	1.5 g
M g S O ₄	:	3.0 g
M n S O ₄	:	0.5 g
N a C l	:	1.0 g
F e S O ₄	:	0.1 g
C a C l ₂	:	0.1 g
C o C l ₂	:	0.1 g
Z n S O ₄	:	0.1 g
C u S O ₄	:	0.1 g
A I K (S O ₄) ₂	:	0.1 g
H ₃ B O ₃	:	0.1 g
N a ₂ M o O ₄	:	0.1 g
N i C l ₂	:	0.1 g

(1 リットル中)。

40

【0176】

培養温度としては上記の菌株が良好に増殖可能な温度であれば良く、例えば 14 ~ 40 °C 、好ましくは 20 ~ 35 °C 程度が適当である。

【0177】

50

また、前述の P H A 生産菌の持つ P H A 合成酵素遺伝子を導入した形質転換体を用いて、所望の P H A 合成酵素を生産することも可能である。 P H A 合成酵素遺伝子のクローニング、発現ベクターの作製、および、形質転換体の作製は、定法に従って行うことができる。大腸菌等の細菌を宿主として得られた形質転換体においては、培養に用いる培地として、天然培地あるいは合成培地、例えば、L B 培地、M 9 培地等が挙げられる。また、培養温度は25から37 の範囲で、好気的に8 ~ 27時間培養することにより、微生物の増殖を図る。その後集菌し、菌体内に蓄積された P H A 合成酵素の回収を行うことができる。培地には、必要に応じて、カナマイシン、アンピシリン、テトラサイクリン、クロラムフェニコール、ストレプトマイシン等の抗生物質を添加しても良い。また、発現ベクターにおいて、誘導性のプロモーターを用いている場合は、形質転換体を培養する際に、該プロモーターの対応する誘導物質を培地に添加して発現を促しても良い。例えば、イソプロピル-D-チオガラクトピラノシド(I P T G)、テトラサイクリン、インドールアクリル酸(I A A)等が誘導物質として挙げられる。
10

【 0 1 7 8 】

P H A 合成酵素としては、微生物の菌体破碎液や、硫酸アンモニウム等によりタンパク質成分を沈殿・回収した硫安塩析物等の粗酵素を用いても良く、また、各種方法で精製した精製酵素を用いても良い。該酵素には必要に応じて、金属塩、グリセリン、ジチオスレイトール、E D T A、ウシ血清アルブミン(B S A)等の安定化剤、付活剤を適宜添加して用いることができる。
20

【 0 1 7 9 】

P H A 合成酵素の分離・精製方法は、P H A 合成酵素の酵素活性が保持される方法であればいかなる方法をも用いることができる。例えば、得られた微生物菌体を、フレンチプレス、超音波破碎機、リゾチームや各種界面活性剤等を用いて破碎したのち、遠心分離して得られた粗酵素液、またはここから調製した硫安塩析物について、アフィニティクロマトグラフィー、陽イオンまたは陰イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過等の手段を単独または適宜組み合わせることによって精製酵素を得ることができる。特に、遺伝子組換えタンパク質は、N末端やC末端にヒスチジン残基等の「タグ」を結合した融合タンパク質の形で発現させ、このタグを介して親和性樹脂に結合させることによって、より簡便に精製することができる。融合タンパク質から目的のタンパク質を分離するには、トロンビン、血液凝固因子Xa等のプロテアーゼで切断する、pH を低下せしめる、結合競合剤として高濃度のイミダゾールを添加する等の方法を用いると良い。あるいは、発現ベクターとしてp T Y B 1(New England Biolab社製)を用いた場合のようにタグがインティエンを含む場合はdithiothreitol等で還元条件として切断する。アフィニティクロマトグラフィーによる精製を可能とする融合タンパク質には、ヒスチジンタグの他にグルタチオンS-トランスフェラーゼ(G S T)、キチン結合ドメイン(C B D)、マルトース結合タンパク(M B P)、あるいはチオレドキシン(T R X)等も公知である。G S T 融合タンパク質は、G S T 親和性レジンによって精製することができる。
30

【 0 1 8 0 】

P H A 合成酵素の活性測定は、既報の各種方法を用いることができるが、例えば、3-ヒドロキシアシルCoAがP H A 合成酵素の触媒作用により重合してP H A になる過程で放出されるCoAを、5,5'-ジチオビス-(2-ニトロ安息香酸)で発色させて測定することを測定原理とする、以下に示す方法によって測定することができる。試薬1:ウシ血清アルブミン(Sigma社製)を0.1mol/L トリス塩酸バッファー(pH 8.0)に3.0 mg/ml溶解、試薬2:3-ヒドロキシオクタノイルCoAを0.1mol/L トリス塩酸バッファー(pH 8.0)に3.0 mmol/L溶解、試薬3:トリクロロ酢酸を0.1mol/L トリス塩酸バッファー(pH 8.0)に10 mg/ml溶解、試薬4:5,5'-ジチオビス-(2-ニトロ安息香酸)を0.1mol/L トリス塩酸バッファー(pH 8.0)に2.0 mmol/L溶解。第1反応(P H A 合成反応):試料(酵素)溶液100 μlに試薬1を100 μl添加して混合し、30 で1分間プレインキュベートする。ここに、試薬2を100 μl添加して混合し、30 で1~30分間インキュベートしたのち、試薬3を添加して反応を停止させる。第2反応(遊離CoAの発色反応):反応停止した第1反応
40
50

液を遠心分離(15,000×g、10分間)し、この上清500μlに試薬4を500μl添加し、30℃で10分間インキュベートしたのち、412nmの吸光度を測定する。酵素活性の算出：1分間に1μmolのCoAを放出させる酵素量を1単位(U)とする。

【0181】

なお、該酵素により合成されるPHAは、一般にR体のみから構成されるアイソタクチックなポリマーである。

【0182】

<基材>

基材としては、PHA合成酵素を固定化することのできるものであれば、一般的な高分子化合物や無機系固体物、例えば、樹脂、ガラス、金属等から適宜選択して用いることができる。また、PHA合成酵素の固定化方法や、作製した構造体の応用の形態等に応じて、基材の種類や構造を適宜選択して用いることができる。基材用の各種材料を以下に例示するが、本発明では、基材として粒状の磁性体が用いられる。

【0183】

例えれば、本発明のカプセル構造体における基材(コア)として、スチレン、-メチルスチレン、-メチルスチレン、o-メチルスチレン、m-メチルスチレン、p-メチルスチレン、2,4-ジメチルスチレン、p-n-ブチルスチレン、p-tert-ブチルスチレン、p-n-ヘキシルスチレン、p-n-オクチルスチレン、p-n-ノニルスチレン、p-n-デシルスチレン、p-n-ドデシルスチレン、p-メトキシスチレン、p-フェニルスチレン等のスチレン系重合性モノマー、メチルアクリレート、エチルアクリレート、n-プロピルアクリレート、iso-プロピルアクリレート、n-ブチルアクリレート、iso-ブチルアクリレート、tert-ブチルアクリレート、n-アミルアクリレート、n-ヘキシルアクリレート、2-エチルヘキシルアクリレート、n-オクチルアクリレート、n-ノニルアクリレート、シクロヘキシルアクリレート、ベンジルアクリレート、ジメチルフォスフェートエチルアクリレート、ジエチルfosfateエチルアクリレート、ジブチルfosfateエチルアクリレート、2-ベンゾイルオキシエチルアクリレート等のアクリル系重合性モノマー、メチルメタクリレート、エチルメタクリレート、n-プロピルメタクリレート、iso-プロピルメタクリレート、n-ブチルメタクリレート、iso-ブチルメタクリレート、tert-ブチルメタクリレート、n-アミルメタクリレート、n-ヘキシルメタクリレート、2-エチルヘキシルメタクリレート、n-オクチルメタクリレート、n-ノニルメタクリレート、ジエチルfosfateエチルメタクリレート、ジブチルfosfateエチルメタクリレート等のメタクリル系重合性モノマー、メチレン脂肪族モノカルボン酸エステル類、酢酸ビニル、プロピオン酸ビニル、ベンゾエ酸ビニル、酪酸ビニル、安息香酸ビニル、ギ酸ビニル等のビニルエステル類、ビニルメチルエーテル、ビニルエチルエーテル、ビニルイソブチルエーテル等のビニルエーテル類、ビニルメチルケトン、ビニルヘキシルケトン、ビニルイソブロピルケトン等のビニルケトン類等のビニル系重合性モノマー、からなる群より選択された重合性モノマーを重合させて製造された樹脂微粒子、あるいは、上記モノマー系に極性基重合体や着色剤等の各種添加剤を添加して製造された樹脂微粒子、パラフィンワックス、ポリオレフィンワックス、フィッシャートロピッシュワックス、アミドワックス、高級脂肪酸、エステルワックス及びこれらの誘導体又はこれらのグラフトまたはブロック化合物等を含有する微粒子、カオリナイト、ベントナイト、タルク、雲母等の粘土鉱物、アルミナ、二酸化チタン等の金属酸化物、シリカゲル、ヒドロキシアパタイト、リン酸カルシウムゲル等の不溶性無機塩、カーボンブラック、酸化銅、二酸化マンガン、アニリンブラック、活性炭、非磁性フェライト、マグネタイト等の黒色顔料、黄鉛、亜鉛黄、黄色酸化鉄、カドミウムイエロー、ミネラルファストイエロー、ニッケルチタンイエロー、ネーブルスイエロー、ナフトールイエローS、ハンザイエローG、ハンザイエロー10G、ベンジジンイエローG、ベンジジンイエローGR、キノリンイエローレーク、パーマネントイエローNC G、タートラジンレーク等の黄色顔料、赤色黄鉛、モリブデンオレンジ、パーマネントオレンジGTR、ピラゾロンオレンジ、バルカンオレンジ、ベンジジンオレンジG、インダスレンブリリアントオレンジRK、インダスレンブリリアントオレンジGK等の橙色顔料、ベンカラ、カドミウムレッド鉛丹、硫化水銀、カドミウム、パーマネントレッド4R、リソールレッド、ピラゾロンレッド

10

20

30

40

50

ド, ウォッチングレッド, カルシウム塩, レーキレッドC, レーキレッドD, ブリリアントカーミン6B, ブリリアントカーミン3B, エオキシンレーキ, ローダミンレーキB, アリザリンレーキ等の赤色顔料、紺青, コバルトブルー, アルカリブルーレーキ, ピクトリアブルーレーキ, フタロシアニンブルー, 無金属フタロシアニンブルー, フタロシアニンブルー一部塩素化合物, ファーストスカイブルー, インダスレンブルーBC等の青色顔料、マンガン紫, ファストバイオレットB, メチルバイオレットレーキ等の紫色顔料、酸化クロム, クロムグリーン, ピグメントグリーンB, マラカイトグリーンレーキ, ファイナルイエローグリーンG等の緑色顔料、亜鉛華, 酸化チタン, アンチモン白, 硫化亜鉛等の白色顔料、バライト粉, 炭酸バリウム, クレー, シリカ, ホワイトカーボン, タルク, アルミナホワイト等の体质顔料等を用いることができるが、もちろんこれらに限定されるものではない。コアの形状は、その用途に応じて適宜選択可能であるが、例えば、粒径1.0nmから1.0mmの範囲内の粒径を有する粒子を用いると良い。さらに、該構造体を電子写真用のカプセルトナーとして用いる場合には、その粒径を3.0μmから10μmの範囲内で選択するとよい。10

【0184】

また、本発明の基材に用いる磁性体としては、PHA合成酵素を固定化することのできるものであれば、何れについても適宜選択して用いることができる。また、PHA合成酵素の固定化方法や、作製した構造体の応用の形態等に応じて、磁性体の種類や構造を適宜選択して用いることができる。

【0185】

本発明の構造体を構成する磁性体としては、例えば、磁性を有する金属または金属化合物が挙げられ、さらに具体的には、四三酸化鉄(Fe_3O_4)、 $\text{-}\text{Fe}_2\text{O}_3$ 、MnZnフェライト、NiZnフェライト、YFeガーネット、GaFeガーネット、Baフェライト、Srフェライト等各種フェライト、鉄、マンガン、コバルト、ニッケル、クロム等の金属、鉄、マンガン、コバルト、ニッケル等の合金を挙げることができ、これらに限定されるものではない。ここで、例えば生体物質を固定する場合、あるいは生体内に投与する場合等については、生体に対する適合性の良好なマグネタイト(Fe_3O_4)のほか、必要に応じてマグネタイトの金属元素の一部を少なくとも1種類の他の金属元素で置換した各種フェライト組成等が好適に適用可能である。これら磁性体の形状は、生成条件によって変化し、多面体、8面体、6面体、球状、棒状、鱗片状等等があるが、異方性の少ない構造が機能の安定発現のためにより好ましい。本発明の構造体を構成する磁性体の一次粒子の粒子径は、その用途に応じて適宜選択可能であるが、例えば、0.001~10μmの範囲内の粒径を有する粒子を用いると良い。2030

【0186】

また、本発明の磁性体としては、超常磁性を有するものについても好ましく用いることができる。例えば、フェライトの粒子径が20nm程度以下と小さい場合には、フェライトは熱擾乱影響を受け超常磁性を示すようになり、残留磁化や保磁力を持たなくなる。超常磁性であっても磁界を印加することにより磁気的操作が可能であり、また超常磁性であれば残留磁化や保磁力を持たないので、磁界のないときに磁気的な凝集の生じるおそれがない。

【0187】

また、磁性体は金属または金属化合物を含むマトリックス等のような複合材料であってもよく、マトリックスは有機または無機の各種材料から構成されるものである。

【0188】

その他、粒子表面を脂肪酸で被覆する方法、シランカップリング剤処理に代表される各種カップリング剤処理を行う方法等、各種手法により疎水化処理を行った磁性体についても、本発明の磁性体として利用することができます。

【0189】

なお、参考までに、基材としては、ポリエチレンテレフタレート(PET), ジアセテート, トリアセテート, セロハン, セルロイド, ポリカーボネート, ポリイミド, ポリビニルクロライド, ポリビニリデンクロライド, ポリアクリレート, ポリエチレン, ポリブ4050

ロピレン、ポリエステル等のプラスチックからなるフィルム、ポリビニルクロライド、ポリビニアルコール、アセチルセルロース、ポリカーボネート、ナイロン、ポリプロピレン、ポリエチレン、テフロン（登録商標）等からなる多孔性高分子膜、木板、ガラス板、木綿、レーヨン、アクリル、絹、ポリエステル等の布、上質紙、中質紙、アート紙、ボンド紙、再生紙、パライタ紙、キャストコート紙、ダンボール紙、レジンコート紙等の紙を用いることができる。なお、前記基材の表面が滑らかなものであっても、凹凸のついたものであっても良いし、透明、半透明、不透明のいずれであっても良い。また、これら前記基材の中より2種類以上を互いに張り合わせたものであっても良い。

【0190】

また、積層構造体の基材として上に挙げた磁性体を利用することが可能であり、磁性体は金属または金属化合物を含むマトリックス等のような複合材料であってもよく、マトリックスは有機または無機の各種材料から構成されるものである。10

【0191】

<構造体の作製> 本発明の構造体の製造方法には、基材にPHA合成酵素を固定化する工程と、該固定化PHA合成酵素に3-ヒドロキシアルコールCoAを反応させてPHAを合成させる工程とを含むものである。

【0192】

基材にPHA合成酵素を固定化する方法としては、該酵素の活性が保持され得るものであり、かつ、所望の基材において適用可能なものであれば、通常行われている酵素固定化方法の中から任意に選択して用いることができる。例えば、共有結合法、イオン吸着法、疎水吸着法、物理的吸着法、アフィニティ吸着法、架橋法、格子型包括法等を例示することができるが、特にイオン吸着や疎水吸着を利用した固定化方法が簡便である。20

【0193】

PHA合成酵素等の酵素タンパク質は、アミノ酸が多数結合したポリペプチドであり、リシン、ヒスチジン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸等の遊離のイオン性基を有するアミノ酸によってイオン吸着体としての性質を示し、またアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、トリプトファン、フェニルアラニン、プロリン等の遊離の疎水性基を有するアミノ酸によって、また有機高分子であるという点で疎水吸着体としての性質を有している。従って、程度の差はあるが、イオン性や疎水性、もしくはイオン性と疎水性の両方の性質を有する固体表面に吸着させることができる。30

【0194】

主にイオン吸着法によってPHA合成酵素を固定化する方法では、イオン性官能基を表面に発現しているコアを用いれば良く、例えば、カオリナイト、ベントナイト、タルク、雲母等の粘土鉱物、アルミナ、二酸化チタン等の金属酸化物、シリカゲル、ヒドロキシアパタイト、リン酸カルシウムゲル等の不溶性無機塩等をコアとして用いることができる。また、これらを主要な成分とする無機顔料、イオン交換樹脂、キトサン、ポリアミノポリスチレン等の、イオン性官能基を有する重合体もイオン吸着性コアとして用いることができる。

【0195】

本発明において基材が磁性体の場合、例えばフェライト等の金属酸化物においては表面に水酸基が存在しており、PHA合成酵素表面のカルボキシル基との水素結合による固定化法等が好適に用いられる。40

【0196】

また、主に疎水吸着によってPHA合成酵素を固定化する方法では、表面が非極性であるコアを用いればよく、例えば、スチレン系ポリマー、アクリル系ポリマー、メタクリル系ポリマー、ビニルエステル類、ビニル系ポリマー等、イオン性官能基を表面に発現していない、もしくは疎水性官能基を表面に発現している多くの重合体をコアとして用いることができる。芳香環を複数有するアゾ顔料や縮合多環のフタロシアニン系顔料、アントラキノン系顔料等の有機顔料、カーボンブラック等は疎水吸着性である。また、親油化処理を施した磁性体にも用いることが可能である。

【0197】

50

20

30

40

50

イオン吸着法または疎水吸着法による P H A 合成酵素のコアへの固定化は、該酵素とコアとを所定の反応液中で混合することによって達成される。このとき、該酵素がコアの表面に均等に吸着されるよう、反応容器を適当な強度で振盪あるいは攪拌することが望ましい。

【 0 1 9 8 】

反応液の pH や塩濃度、温度によってコアおよび P H A 合成酵素の表面電荷の正負や電荷量、疎水性が変化するので、用いるコアの性質に合わせて、酵素活性上許容される範囲内で溶液の調整を行うことが望ましい。例えば、コアが主にイオン吸着性である場合には、塩濃度を下げるにより、コアと P H A 合成酵素との吸着に寄与する電荷量を増やすことができる。また、pH を変える事により、両者の反対電荷を増やすことができる。コアが主に疎水吸着性である場合には、塩濃度を上げることによって両者の疎水性を増やすことができる。また、予め電気泳動やぬれ角等を測定し、コアや P H A 合成酵素の荷電状態や疎水性を調べることで、吸着に適した溶液条件を設定をすることもできる。さらに、コアと P H A 合成酵素との吸着量を直接測定して条件を求める事もできる。吸着量の測定は、例えば、コアが分散された溶液に濃度既知の P H A 合成酵素溶液を添加し、吸着処理を行った後、溶液中の P H A 合成酵素濃度を測定し、差し引き法により吸着酵素量を求める等の方法を用いればよい。

【 0 1 9 9 】

イオン吸着法や疎水吸着法によって酵素を固定化し難いコア材質の場合は、操作の煩雑さや酵素の失活の可能性を考慮すれば共有結合法によってもかまわない。例えば、芳香族アミノ基を有する固体粒子をジアゾ化し、これに酵素をジアゾカップリングする方法や、カルボキシル基、アミノ基を有する固体粒子と酵素の間にペプチド結合を形成させる方法、ハロゲン基を有する固体粒子と酵素のアミノ基等との間でアルキル化する方法、臭化シンで活性化した多糖類粒子と酵素のアミノ基を反応させる方法、固体粒子のアミノ基と酵素のアミノ基との間を架橋する方法、アルデヒド基またはケトン基を有する化合物とイソシアニド化合物の存在下、カルボキシル基、アミノ基を有する固体粒子と酵素を反応させる方法、ジスルフィド基を有する固体粒子と酵素のチオール基との間で交換反応させる方法等がある。

【 0 2 0 0 】

また、アフィニティ吸着によって固体粒子に吸着してもよい。アフィニティ吸着とは、生体高分子とそれに特異的な親和力を示す、リガンドと呼ばれる特定物質との間の生物学的吸着で、例えば、酵素と基質、抗体と抗原、レセプターとアセチルコリン等の情報物質、m R N A と t R N A 等がある。一般に、アフィニティ吸着を利用して酵素を固定化する方法として、酵素の基質や反応生成物、拮抗阻害剤、補酵素、アロステリックエフェクター等をリガンドとして固体に結合させ、この固体に酵素を添加してアフィニティ吸着させる方法をとる。しかしながら、P H A 合成酵素においては、例えば基質である 3 - ヒドロキシアシル C o A をリガンドとして用いた場合、該酵素の P H A 合成を触媒する活性部位がリガンドとの結合により塞がれてしまうため、P H A を合成できなくなるという問題を生じる。しかしながら、他の生体高分子を P H A 合成酵素に融合させ、該生体高分子のリガンドをアフィニティ吸着に用いることによって固定化後も P H A 合成酵素の P H A 合成活性を維持することができる。P H A 合成酵素と生体高分子との融合は遺伝子工学的手法によって行っても良く、また P H A 合成酵素に化学的に結合させてもよい。用いる生体高分子としては、対応するリガンドが入手容易で、そのリガンドがコアに容易に結合できるものであればいかなるものでも構わないが、遺伝子組換えによって融合物を発現させる場合には、タンパク質であることが好ましい。具体的には、形質転換によって G S T を発現する遺伝子配列に P H A 合成酵素の遺伝子配列を繋げた大腸菌を用いて、G S T と P H A 合成酵素との融合タンパク質を生産し、これを G S T のリガンドであるグルタチオンを結合した S epharose に添加することで、P H A 合成酵素を S epharose にアフィニティ吸着させることができる。

【 0 2 0 1 】

10

20

30

40

50

また、基材に対して結合能を有するアミノ酸配列を含むペプチドを P H A 合成酵素に融合して提示させ、該基材に対して結合能を有するアミノ酸配列のペプチド部分と、基材との結合性に基づいて、該基材表面に P H A 合成酵素を固定化することもできる。

【 0 2 0 2 】

基材に対する結合能を有するアミノ酸配列は、例えばランダムペプチドライブラーのスクリーニングによって決定することができる。特に例えばM13系ファージの表面蛋白質(例えばgene III 蛋白質)のN末端側遺伝子にランダム合成遺伝子を連結して調製されたファージディスプレイベプチドライブラーを好適に用いることが出来るが、この場合基材に対する結合能を有するアミノ酸配列を決定するには、次のような手順をとる。すなわち、基材あるいは該基材を構成する少なくとも一成分に対してファージディスプレイベプチドライブラーを添加することによって接触させ、その後洗浄により結合ファージと非結合ファージを分離する。基材結合ファージを酸等により溶出し緩衝液で中和した後大腸菌に感染させファージを増幅する。この選別を複数回繰り返すと目的の基材に結合能のある複数のクローンが濃縮される。ここで単一なクローンを得るために再度大腸菌に感染させた状態で培地プレート上にコロニーを作らせる。それぞれの單一コロニーを液体培地で培養した後、培地上清中に存在するファージをポリエチレングリコール等で沈殿精製し、その塩基配列を解析すればペプチドの構造を知ることができる。

10

【 0 2 0 3 】

上記方法により得られた基材に対する結合能を有するペプチドのアミノ酸配列は、通常の遺伝子工学的手法を用いて、P H A 合成酵素に融合して利用される。基材に対する結合能を有するペプチドは P H A 合成酵素の N 末端あるいは C 末端に連結して発現することができる。また適当なスペーサー配列を挿入して発現することもできる。スペーサー配列としては、約 3 ~ 約400 アミノ酸が好ましく、また、スペーサー配列はいかなるアミノ酸を含んでもよい。最も好ましくは、スペーサー配列は、P H A 合成酵素が機能するのを妨害せず、また、P H A 合成酵素が基材に結合するのを妨害しないものである。

20

【 0 2 0 4 】

上記方法により作製された固定化酵素は、そのままでも用いることができるが、さらに凍結乾燥等を施した上で使用することもできる。

【 0 2 0 5 】

3-ヒドロキシアシル CoA の重合により P H A が合成される反応において放出される Co A 量が 1 分間に 1 μ mol となる P H A 合成酵素量を 1 単位(U)としたとき、基材に固定する酵素の量は、例えば基材がカプセル構造体のコアである場合、基材 1 gあたり10単位(U)から1,000単位(U)、望ましくは50 単位(U)から500単位(U)の範囲内に設定すると良い。

30

【 0 2 0 6 】

前記の固定化酵素は所望の P H A の原料となる 3 - ヒドロキシアシル CoA を含む水系反応液中に投入され、基材表面の P H A 合成酵素により P H A が合成されることにより、基材が P H A により被覆された構造体を形成する。上記水系反応液は、P H A 合成酵素の活性を発揮させ得る条件に調整された反応系として構成されるべきであり、例えば通常、pH 5.5からpH 9.0、好ましくはpH 7.0からpH 8.5となるよう、緩衝液により調製する。ただし、使用する P H A 合成酵素の至適pH やpH 安定性によっては、上記範囲以外に条件を設定することも除外されない。緩衝液の種類は、使用する P H A 合成酵素の活性を発揮させ得るものであれば、設定するpH 領域等に応じて適宜選択して用いることができるが、例えば、一般の生化学反応に用いられる緩衝液、具体的には、酢酸バッファー、リン酸バッファー、リン酸カリウムバッファー、3-(N-モルフォリノ)プロパンスルфон酸(MOPS)バッファー、N-トリス(ヒドロキシメチル)メチル-3-アミノプロパンスルfonyl酸(TAPS)バッファー、トリス塩酸バッファー、グリシンバッファー、2-(シクロヘキシルアミノ)エタンスルfonyl酸(ChES)バッファー等を用いると良い。緩衝液の濃度も、使用する P H A 合成酵素の活性を発揮させ得るものであれば特に限定はされないが、通常5.0mmol/Lから1.0mol/L、好ましくは0.1mol/Lから0.2mol/Lの濃度のものを使用すると

40

50

良い。反応温度は、使用する P H A 合成酵素の特性に応じて適宜設定するものであるが、通常、4 から 50 、好ましくは 20 から 40 に設定すると良い。ただし、使用する P H A 合成酵素の至適温度や耐熱性によっては、上記範囲以外に条件を設定することも除外されない。反応時間は、使用する P H A 合成酵素の安定性等にもよるが、通常、1 分間から 24 時間、好ましくは 30 分間から 3 時間の範囲内で適宜選択して設定する。反応液中の 3 - ヒドロキシアシル CoA 濃度は、使用する P H A 合成酵素の活性を発揮させ得る範囲内で適宜設定するものであるが、通常、0.1mmol/L から 1.0mol/L 、好ましくは 0.2mmol/L から 0.2mol/L の範囲内で設定すると良い。なお、反応液中における 3 - ヒドロキシアシル CoA 濃度が高い場合、一般に、反応系の pH が低下する傾向にあるため、3 - ヒドロキシアシル CoA 濃度を高く設定する場合は、前記の緩衝液濃度も高めに設定することが好ましい。10

【 0207 】

また、上記工程において、水系反応液中の 3 - ヒドロキシアシル CoA の種類や濃度等の組成を経時に変化させることによって、構造体の形状が粒状であれば内側から外側に向かう方向に、構造体の形状が平面状であれば垂直方向に、基材を被覆する P H A のモノマーユニット組成を変化させることができる。

【 0208 】

このモノマーユニット組成の変化した構造体の形態として、例えば、 P H A 被膜の組成変化が連続的で、内側から外側に向かう方向もしくは垂直方向に組成の勾配を形成した 1 層の P H A が基材を被覆した形態を挙げることができる。製造方法としては、例えば、 P H A を合成しながら反応液中に別組成の 3 - ヒドロキシアシル CoA を添加する等の方法によればよい。20

【 0209 】

また別の形態として、 P H A 被膜の組成変化が段階的で、組成の異なる P H A が基材を多層に被覆した形態を挙げることができる。この製造方法としては、ある 3 - ヒドロキシアシル CoA の組成で P H A を合成した後、遠心分離等によって調製中の構造体を反応液からいったん回収し、これに異なる 3 - ヒドロキシアシル CoA の組成からなる反応液を再度添加する等の方法によればよい。

【 0210 】

また、 P H A の分子量制御、及び P H A 被覆膜の親水性向上という観点から、反応溶液中に水酸基を有する化合物を適宜添加してもよい。30

【 0211 】

本発明の方法で用いる水酸基を有する化合物は、アルコール類、ジオール類、トリオール類、アルキレングリコール類、ポリエチレングリコール類、ポリエチレンオキサイド類、アルキレングリコールモノエステル類、ポリエチレングリコールモノエステル類、ポリエチレンオキサイドモノエステル類化合物から選ばれる少なくとも 1 種類であるが、更に詳しく述べると以下の通りである。即ち、アルコール類、ジオール類及びトリオール類化合物が、炭素数 3 から 14 の直鎖状及び分岐アルコール、ジオール、トリオールである。アルキレングリコール類及びアルキレングリコールモノエステル類化合物の炭素鎖が、炭素数 2 から 10 の直鎖状及び分岐状構造を有している化合物である。ポリエチレングリコール類、ポリエチレンオキサイド類、ポリエチレングリコールモノエステル類、ポリエチレンオキサイドモノエステル類化合物の数平均分子量が 100 から 20,000 の範囲である。40

【 0212 】

この様な、水酸基を有する化合物の濃度は、 P H A 合成酵素による 3 - ヒドロキシアシル CoA の重合反応が阻害されない濃度であれば特に制限はないが、好ましくは P H A 合成酵素と 3 - ヒドロキシアシル CoA との反応溶液に対して 0.01% から 10% (w/v) 、更に好ましくは 0.02% から 5% (w/v) を添加することがよく、添加方法については反応初期に一括して添加する方法、反応時間内に数回に分けて反応溶液中に添加する方法のいずれでも良い。

【 0213 】

10

20

30

40

50

上記反応により得られた構造体は、必要に応じて、洗浄工程に供する。構造体の洗浄方法は、該構造体製造の目的上好ましくない変化を、該構造体に及ぼすものでない限り、特に限定はされない。構造体が、基材をコアとし P H A を外被とするカプセル構造体である場合は、例えば、遠心分離によって該構造体を沈殿させ、上清を除去することによって、反応液に含まれる不要成分を除去することができる。ここに水、緩衝液、メタノール等の該 P H A が不溶である洗浄剤を添加し、遠心分離をする操作を行うことにより、さらに洗浄することもできる。また、遠心分離の替わりに、ろ過等の手法を用いても良い。一方、構造体が、平板状の基材を P H A で被覆した構造体である場合は、例えば、上記洗浄剤に浸漬する等して洗浄することができる。さらに、上記構造体は、必要に応じて、乾燥工程に供することができる。さらに該構造体に各種二次加工や化学修飾等の処理を施して使用することもできる。

10

【0214】

例えば、基材を被覆した P H A に化学修飾を施すことにより、さらに有用な機能・特性を備えた構造体を得ることができる。

【0215】

<酸化反応による本発明の P H A の合成 -カルボキシル基->

化学式(2)で示すユニットにおいてカルボキシル基を含むユニットは、この化学式(2)で示される、側鎖末端にビニルフェニル基を有するユニットの二重結合部分を選択的に酸化開裂することで製造することができ、化学式(2)で示す側鎖末端にカルボキシフェニル基を有するユニットを含む P H A が得られる。

20

【0216】

このように、炭素-炭素の二重結合を酸化剤を用いて、酸化開裂してカルボン酸を得る方法としては、例えば、過マンガン酸塩を用いる方法(J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 806(1973)(非特許文献19))、重クロム酸塩を用いる方法(Org. Synth., 4, 698(1963)(非特許文献20))、過ヨウ素酸塩を用いる方法(J. Org. Chem., 46, 19(1981)(非特許文献21))硝酸を用いる方法(特開昭59-190945号公報(特許文献37))、オゾンを用いる方法(J. Am. Chem. Soc., 81, 4273(1959)(非特許文献22))等が知られており、更に P H A に関しては、Macromolecular chemistry, 4, 289-293(2001)(非特許文献23)に、P H A の側鎖末端の炭素-炭素二重結合を酸化剤として過マンガン酸カリウムを用い、反応を酸性条件下で行うことで、カルボン酸を得る方法が報告されており、本発明においてもこれらの方

30

【0217】

酸化剤として用いる前記過マンガン酸塩としては、過マンガン酸カリウムが一般的である。過マンガン酸塩の使用量は、酸化開裂反応が化学量論的反応であるため、ビニル基を有する化学式(2)で示すユニット 1 モルに対して、通常 1 モル当量以上、好ましくは、2 ~ 4 モル当量使用するのがよい。

【0218】

反応系を酸性条件下にするためには通常、硫酸、塩酸、酢酸、硝酸等の各種の無機酸や有機酸が用いられる。しかしながら、硫酸、硝酸、塩酸等の酸を用いた場合、P H A の主鎖のエステル結合が切断され、分子量低下を引き起こす恐れがある。そのため酢酸を用いることが好ましい。酸の使用量は、ビニル基を有する化学式(2)で示すユニット 1 モルに対して、通常、0.2 ~ 200 モル当量、好ましくは 0.4 ~ 100 モル当量の範囲で用いられる。0.2 モル当量に満たない場合には低収率となり、200 モル当量を越える場合には酸による分解物が副生するため、いずれの場合も好ましくない。また、反応を促進する目的でクラウン-エーテルを用いることができる。この場合、クラウン-エーテルと過マンガン酸塩とは、錯体を形成し、反応活性が増大する効果が得られる。クラウン-エーテルとしては、ジベニゾ-18-クラウン-6-エーテル、ジシクロ-18-クラウン-6-エーテル、18-クラウン-6-エーテルが一般的に用いられる。クラウン-エーテルの使用量は、過マンガン酸塩 1 モルに対して、通常 1.0 ~ 2.0 モル当量、好ましくは、1.0 ~ 1.5 モル当量の範囲で用いることが望ましい。

40

50

【0219】

本発明の前記酸化反応において、ビニル基を有する化学式(2)で示すユニットを含むP H Aで被覆された構造体と、過マンガン酸塩及び酸は一括して最初からともに仕込んで反応させてもよく、それぞれを連続的若しくは断続的に系内に加えながら反応させてもよい。また、過マンガソ酸塩のみを先に反応系に溶解若しくは懸濁させておき、続いて、構造体及び酸を連続的若しくは断続的に系内に加えて反応させてもよく、構造体のみを先に反応系に懸濁させておき、続いて、過マンガソ酸塩及び酸を連続的若しくは断続的に系内に加えて反応させてもよい。さらには、構造体及び酸を先に仕込んでおき、続いて、過マンガソ酸塩を連続的若しくは断続的に系内に加えて反応させてもよく、過マンガソ酸塩及び酸を先に仕込んでおき、続いて、構造体を連続的若しくは断続的に系内に加えて反応させてもよく、構造体及び過マンガソ酸塩を先に仕込んでおき、続いて、酸を連続的若しくは断続的に系内に加えて反応させてもよい。

10

【0220】

反応温度は、通常-20~40℃、好ましくは0~30℃とするのがよい。反応時間は、ビニル基を有する化学式(2)で示すユニットと過マンガソ酸塩の量論比及び反応温度に依存するが、通常2~48時間とするのがよい。

【0221】

同様の方法で、化学式(1)の-アルケン構造についても、ビニル基からカルボキシル基への変換が可能である。

【0222】

20

<酸化反応による本発明のP H Aの合成 -フェニルスルフィニル/スルホニル基->
化学式(7)に示す3-ヒドロキシ-(フェニルスルフィニル)アルカン酸ユニット、あるいは、化学式(8)に示す3-ヒドロキシ-(フェニルスルホニル)アルカン酸ユニットのうち、少なくとも1種類のユニットを含むポリヒドロキシアルカノエートは、化学式(16)で示される、側鎖末端にフェニルスルファニル基または置換フェニルスルファニル基として、スルファニル基(-S-)を有するユニットの硫黄部分、スルファニル基(-S-)を選択的に酸化することで製造することができ、化学式(7)で示すユニットあるいは化学式(8)で示すユニットの少なくとも1種類を含むP H Aが得られる。

【0223】

このような酸化処理については、例えば、過酸化化合物を利用することができます、本発明の目的、すなわち、フェニルスルファニル基または置換フェニルスルファニル基として存在するスルファニル基(-S-)の酸化に寄与し得るものであれば、いかなる種類の過酸化化合物をも用いることが可能である。その際、酸化効率、P H A(およびそれを含む共重合体)主鎖骨格への影響、処理の簡便さ等を考慮した場合、特に、過酸化水素、過炭酸ナトリウム、メタクロロ過安息香酸、過蟻酸、過酢酸からなる群から選択される過酸化化合物を用いることが好ましい。

30

【0224】

まず、その中でも処理方法が容易な過酸化水素を利用する処理について述べる。最も簡便な過酸化水素による処理方法は、本発明のP H Aの前駆体である、化学式(16)で示されるユニットを含むP H Aにより被覆された構造体をそのまま過酸化水素水に懸濁、場合によつては一定時間加熱、攪拌する方法である。

40

【0225】

本発明の構造体の製造方法で、酸化剤として利用する過酸化水素は、本発明の目的、すなわち、フェニルスルファニル基または置換フェニルスルファニル基として存在するスルファニル基(-S-)の酸化を行える限り、いかなる形態のものも用いることが可能である。なお、製造工程の制御という観点からは、その濃度等が、安定した性状の過酸化水素の溶液、例えば、過酸化水素水等、水系溶媒中に溶解したもの用いることが望ましい。一例として、工業的に多量に安定生産可能な、J I S K-8230に則った過酸化水素水は推奨されるべきものであり、例えば、三菱瓦斯化学(株)製過酸化水素水(31%過酸化水素含有)は、本発明の方法において、好適な過酸化水素の溶液である。

50

【0226】

本発明の構造体の製造方法において、この過酸化水素を用いる酸化処理の条件は、処理される構造体の形状、粒状体の場合はその粒径(比表面積)、被覆しているP H Aの分子構造、等により異なるが、前記、J I S K -8230規格品の過酸化水素水(31%過酸化水素含有)を利用する際、その希釈条件(濃度)、使用量、処理温度、時間等は、下記する範囲に選択することができる。

【0227】

処理液中の過酸化水素濃度については、反応温度にもよるが、8%(約4倍希釈)~31%(原液)、より好ましい濃度範囲としては、16%(約2倍希釈)~31%(原液)反応量であり、前駆体P H Aに含まれる化学式(16)のユニットの比率にも依存するものの、構造体を被覆するP H A 1gに対して、原液過酸化水素水(31%過酸化水素含有)換算で1mL~1000mL¹⁰、より好ましい反応量は、5mL~500mLの範囲である。

【0228】

反応温度については、処理液中の濃度にもよるが、30~100、より好ましい温度としては、50~100の範囲に選択する。反応時間については、その反応温度にもよるが、10分~180分、より好ましい時間としては、30分~120分の範囲である。

【0229】

前記する条件の範囲で、過酸化水素処理を施すことにより、化学式(16)で示されるユニットを含む前駆体P H Aから、化学式(7)ならびに化学式(8)で示されるユニットのうち、少なくとも1種類をポリマー分子中に含むP H A、あるいは、化学式(7)ならびに化学式(8)で示されるユニットに加えて、中間原料のP H Aに由来する化学式(16)で表されるユニットをなお残すP H Aへと変換できる。その場合、過酸化水素処理の反応条件を選択して、酸化の進行速度、反応量を制御することにより、前記三種の各ユニットの存在比を制御することが可能となる。²⁰

【0230】

次に、過酸化化合物として、メタクロロ過安息香酸(M C P B A)を用いる方法について述べる。

【0231】

M C P B Aを用いると、フェニルスルファニル基または置換フェニルスルファニル基として存在するスルファニル基(-S-)の酸化は、化学量論的に進行するため、化学式(7)ならびに化学式(8)で示されるユニットの含有比率の制御が行い易い。また、その反応条件が温和であるため、P H A主鎖骨格の切断や活性部位の架橋反応等、不要な副次反応が起こり難い。従って、本発明のP H Aの製造方法において、高い選択性で目的とするP H Aを製造する上では、メタクロロ過安息香酸(M C P B A)は、非常に好適な過酸化化合物の一つである。³⁰

【0232】

さらに、過酸化化合物として他の化合物を用いる例として、過マンガン酸塩を用いる方法について述べる。酸化剤として用いる前記過マンガン酸塩としては、過マンガン酸カリウムが一般的である。過マンガン酸塩の使用量は、化学式(16)で示すフェニルスルファニル基を含むユニット1モルに対して、通常1モル当量以上、好ましくは、2~4モル当量使用するのがよい。⁴⁰

【0233】

反応系を酸性条件下にするためには通常、硫酸、塩酸、酢酸、硝酸等の各種の無機酸や有機酸が用いられる。しかしながら、硫酸、硝酸、塩酸等の酸を用いた場合、ポリヒドロキシアルカノエートの主鎖のエステル結合が切断され、分子量低下を引き起こす恐れがある。そのため酢酸を用いることが好ましい。酸の使用量は、化学式(16)で示すフェニルスルファニル基を含むユニット1モルに対して、通常、0.2~200モル当量、好ましくは0.4~100モル当量の範囲で用いられる。0.2モル当量に満たない場合には低収率となり、200モル当量を越える場合には酸による分解物が副生するため、いずれの場合も好ましくない。また、反応を促進する目的でクラウン-エーテルを用いることができる。この場合、クラウ⁵⁰

ン-エーテルと過マンガン酸塩とは、錯体を形成し、反応活性が増大する効果が得られる。クラウン-エーテルとしては、ジベンゾ-18-クラウン-6-エーテル、ジシクロ-18-クラウン-6-エーテル、18-クラウン-6-エーテルが一般的に用いられる。クラウン-エーテルの使用量は、過マンガン酸塩1モルに対して、通常1.0～2.0モル当量、好ましくは、1.0～1.5モル当量の範囲で用いることが望ましい。

【0234】

本発明の前記酸化反応において、化学式(16)で示すユニットを含むP H Aで被覆された構造体と、過マンガン酸塩及び酸は一括して最初からともに仕込んで反応させてもよく、それぞれを連続的若しくは断続的に系内に加えながら反応させてよい。また、過マンガ 10
ン酸塩のみを先に反応系に溶解若しくは懸濁させておき、続いて、構造体及び酸を連続的若しくは断続的に系内に加えて反応させてもよく、構造体のみを先に反応系に懸濁させておき、続いて、過マンガ 10
ン酸塩及び酸を連続的若しくは断続的に系内に加えて反応させてもよい。さらには、構造体及び酸を先に仕込んでおき、続いて、過マンガ 10
ン酸塩を連続的若しくは断続的に系内に加えて反応させてもよく、構造体及び過マンガ 10
ン酸塩を先に仕込んでおき、続いて、酸を連続的若しくは断続的に系内に加えて反応させてもよい。

【0235】

反応温度は、通常-20～40℃、好ましくは0～30℃とするのがよい。反応時間は、化学式(16)で示すユニットと過マンガ 20
ン酸塩の量論比及び反応温度に依存するが、通常2～48時間とするのがよい。

【0236】

化学式(16)で示すフェニルスルファニル基の酸化剤処理により、化学式(16)で示されるユ 20
ニットを含む前駆体P H Aから、化学式(7)ならびに化学式(8)で示されるユニットのうち、少なくとも1種類をポリマー分子中に含むP H Aへの変換が可能である。

【0237】

スルフィニル構造(-SO-)あるいはスルホニル構造(-SO₂-)は、かかるユニット末端における、分子中の電子の局在化を強力に促し、その物性は、従来のP H Aと比べ著しく異なる可能性がある。特には、ガラス転移温度の上昇が顕著であり、広範な用途への応用が可能となる。

【0238】

<酸化反応による本発明のP H Aの合成 -エポキシ基->

化学式(2)で示すユニットにおいてエポキシ基を含むユニットは、この化学式(2)で示される、側鎖末端にビニルフェニル基を有するユニットの二重結合部分を選択的に酸化することで製造することができ、化学式(2)で示す側鎖末端にエポキシフェニル基を有するユニットを含むP H Aが得られる。

【0239】

このような酸化処理については、例えば、過酸化化合物を利用することができます、本発明の目的、すなわち、ビニル基の酸化に寄与し得るものであれば、いかなる種類の過酸化化合物をも用いることが可能である。その際、酸化効率、P H A(およびそれを含む共重合体)主鎖骨格への影響、処理の簡便さ等を考慮した場合、特に、過酸化水素、過炭酸ナトリウム、メタクロロ過安息香酸、過蟻酸、過酢酸からなる群から選択される過酸化化合物を用いることが好ましい。

【0240】

過酸化化合物を用いる場合の反応条件は、前記したスルファニル基の酸化条件を参考とすることができる。

【0241】

<構造体の修飾> 例えれば、該P H Aにグラフト鎖を導入することにより、該グラフト鎖に起因する各種の特性を備えたP H Aが、基材の少なくとも一部を被覆した構造体を得ることができる。また、該P H Aを架橋化せしめることにより、構造体の機械的強度、耐薬

10

20

30

40

50

品性、耐熱性等を制御することが可能である。

【0242】

化学修飾の方法は、所望の機能・構造を得る目的を満たす方法であれば特に限定はされないが、例えば、反応性官能基を側鎖に有するPHAを合成し、該官能基の化学反応を利用して化学修飾する方法を、好適な方法として用いることができる。

【0243】

前記の反応性官能基の種類は、所望の機能・構造を得る目的を満たすものであれば特に限定されないが、例えば、前記したエポキシ基を例示することができる。エポキシ基を側鎖に有するPHAは、通常のエポキシ基を有するポリマーと同様の化学的変換を行うことができる。具体的には、例えば水酸基に変換したり、スルホン基を導入したりすることができる。また、チオールやアミンを有する化合物を付加することもでき、例えば、末端に反応性官能基を有する化合物、具体的には、エポキシ基との反応性が高いアミノ基を末端に有する化合物等を添加して反応させることにより、ポリマーのグラフト鎖が形成される。

10

【0244】

アミノ基を末端に有する化合物としては、ポリビニルアミン、ポリエチレンイミン、アミノ変性ポリシロキサン(アミノ変性シリコーンオイル)等のアミノ変性ポリマーを例示することができる。このうち、アミノ変性ポリシロキサンとしては、市販の変性シリコーンオイルを使用しても良く、また、J. Amer. Chem. Soc., 78, 2278(1956)(非特許文献24)等に記載の方法で合成して使用することもでき、該ポリマーのグラフト鎖の付加による耐熱性の向上等の効果が期待できる。

20

【0245】

また、近年、リガンド-レセプター反応が高感度の反応技術として広範囲に用いられている。ここで、リガンド-レセプター反応には抗原-抗体反応、核酸の相補性、ホルモン-受容体、酵素-基質、ビオチン-アビジン等の生理活性物質とその受容体等様々な特異的結合を利用する反応が含まれる。これらは一般にリガントまたはレセプターを担体に結合させ、リガンド-レセプター反応後、相対するレセプターまたはリガンドをその媒体中から分離する方法が用いられる。特にこれらの反応を利用して媒体中に存在する極微量の抗原、ホルモンや特定配列の核酸を分離精製する精製法やそれらを検出するリガンド-レセプターアッセイが広く実施されている。

30

【0246】

これらのリガンド-レセプター反応に用いられるリガンドあるいはレセプターの担持に、本発明のPHAにおける反応性官能基を好適に用いることが可能であり、グラフト化による有用な機能・特性の発現が可能となる。さらには基材に磁性体を用いた場合、分離精製が簡便かつ容易となり、さらに効果的である。

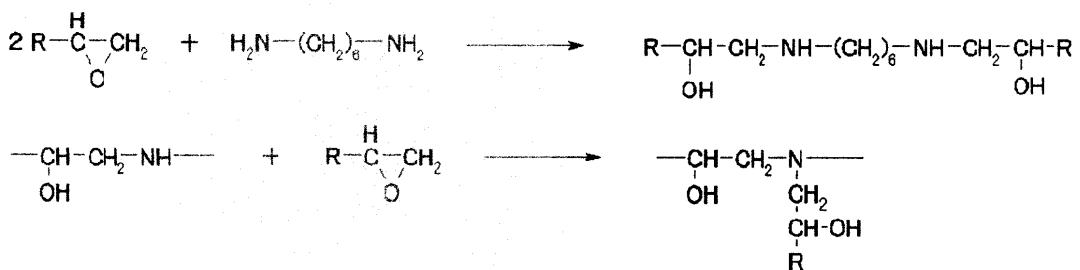
【0247】

また、エポキシ基を有するポリマーの化学的変換の他の例として、ヘキサメチレンジアミン等のジアミン化合物、無水コハク酸、2-エチル-4-メチルイミダゾール、電子線照射等による架橋反応が挙げられる。このうち、エポキシ基を側鎖に有するPHAとヘキサメチレンジアミンとの反応は、下記のスキームに示すような形で進行し、架橋ポリマーが生成する。

40

【0248】

【化67】



【0249】

10

本発明における構造体の含有する基材の量は、その用途、必要な機能を考慮し適宜選択すれば良い。例えば、基材に磁性体を用いた場合、本発明における構造体の含有する磁性体の量は1~80質量%、好ましくは5~70質量%、さらに好ましくは10~60質量%である。磁性体の量が1質量%より少ないと磁気性能が不足して磁性体含有構造体としての性能が不十分となるおそれがあり、また、磁性体含量が80質量%を越えると磁性体が多すぎるため、構造体本来の機能が損なわれ、実用性能の面で満足できなくなるおそれがある。

【0250】

本発明におけるカプセル構造体の粒子径は、例えば、基材に磁性体を用いた場合、用途等に応じて適宜選定されるが、通常、0.02~100μm、好ましくは0.05~20μmである。

【0251】

20

また、本発明における一般的なカプセル構造体および積層構造体の被覆膜の厚みは、用途等に応じて適宜選定されるが、通常、0.02~100μm、好ましくは0.05~20μmである。

【0252】

また、本発明の構造体を、生体関連物質の担持あるいは生体内への投与等に供する場合は、基材が磁性体を含む場合は、磁性体の溶出、生体関連物質の相互作用の阻害等を最小限とするためにも、磁性体がPHAにより完全に被覆される形態がより好ましいものである。

【0253】

得られた構造体において、基材がPHAで被覆されていることを確認する方法としては、一般には、例えば、ガスクロマトグラフィー等による組成分析と電子顕微鏡等による形態観察とを組み合わせた方法や、飛行時間型二次イオン質量分析装置(TOF-SIMS)とイオンスパッタリング技術を用いて、各構成層のマススペクトルから構造を判定する方法等を用いることができる。しかし、さらに直接的かつ簡便な確認方法として、本発明者らによって新たに開発された、ナイルブルーA染色と蛍光顕微鏡観察とを組み合わせた方法を用いることもできる。本発明者らは、PHA合成酵素を用いた無細胞系(*in vitro*)でのPHA合成を簡便に判定できる方法について鋭意検討を続けてきた結果、PHAに特異的に結合して蛍光を発する性質を有する薬剤であり、Appl. Environ. Microbiol., 44, 238-241(1982)(非特許文献25)において微生物細胞(*in vivo*)でのPHA生産の簡易的判別に用いることができると報告されているナイルブルーAが、適切な使用方法および使用条件の設定によって、無細胞系でのPHA合成の判定にも用いることができることを見出し、上記の方法を完成させた。即ち、本方法では、所定濃度のナイルブルーA溶液を濾過したのち、PHAを含む反応液に混合し、蛍光顕微鏡で一定の波長の励起光を照射しながら観察することにより、合成されたPHAのみから蛍光を発せしめ、これを観察することによつて、無細胞系でのPHA合成を簡易に判定することができる。使用した基材が上記条件下で蛍光を発する性質を有するものでない限り、上記方法を本発明の構造体の製造に応用することにより、基材の表面を被覆したPHAを直接的に観察し、評価することができる。

【0254】

また、基材を被覆しているPHAの内側から外側に向かう方向もしくは垂直方向の組成分布は、イオンスパッタリング技術と飛行時間型二次イオン質量分析装置(TOF-SIMS)

30

40

50

)を組み合わせて評価することができる。

【0255】

<構造体の利用>本発明の特徴の一つは、通常の有機合成化学的手法では製造が困難であった構造体の製造を可能にしたことであり、従って、従来の有機合成化学的手法で製造されたカプセル構造体や積層構造体にはない優れた特性を付与した構造体を得ることが可能である。例えば、従来の有機合成的手法では実現が困難であった新たな高分子化合物の利用や、新たな機能・構造の付与が可能になる。さらに具体的には、生物の触媒作用に特有の極めて厳密な分子認識能や立体選択性を利用して、従来の有機合成化学的手法では実現が困難であった新たな機能性高分子化合物や、極めてキラリティーの高い高分子化合物により被覆されたカプセル構造体や積層構造体等を、極めて簡便なプロセスで製造することが可能になる。

10

【0256】

上記の如き構造体の応用の一例としては、電子写真用高機能カプセルトナーが挙げられる。前述の通り、電子写真用カプセルトナーにおいては、その製造工程が極めて複雑となり、また、製造工程において大量の溶媒類や界面活性剤を使用する等の課題があった。本発明の方法により、上記の如き課題を解決し、カプセルトナーを簡便に製造できる方法が提供される。さらに、その外被の厚さやモノマーユニット組成等も比較的容易に制御できる。また、特開平8-286416号公報によれば、カプセルトナーの外被にポリエステル等の極性樹脂を含有させることにより、画質耐久性の向上、帯電の均一化および安定化等の効果が得られるとされているが、本発明の方法により得られるカプセルトナーにおけるP H Aからなる外被にも、上記の如き効果が期待できる。さらに、本発明の方法では、様々な官能基を有するP H Aを外被として用いることができるため、これら官能基によるトナーの表面物性の制御や、新たな機能性の付与等も可能となる。また、コア部分の製造工程を除けば、その製造において有機溶媒や界面活性剤等をほとんど、あるいは、全く使用せず、かつ、反応条件も極めて温和であるため、製造上の環境負荷を大幅に低減することが可能である。

20

【0257】

また、基材に磁性体を含む場合については、磁性を有する金属および金属化合物に親油化処理を施すことなく、均一分散性に優れる磁性体を被覆した構造体を、極めて簡便なプロセスで製造することが可能になる。

30

【0258】

また、磁性体の分散性および磁気応答性に優れ、金属イオンが外部に溶出されにくく、種々の用途・分野に幅広く適用することのできる、磁性体を被覆したカプセル構造体を、極めて簡便なプロセスで製造することが可能になる。

【0259】

本発明の構造体は、粒子の表面および/または表面近傍に磁性体が実質的に存在しないか、存在しても極めて少ないため、使用時の磁性体の溶出による影響が実質上問題となることがない。したがって、本発明の構造体は、金属成分を嫌うことの多い生化学用途においても従来の非磁性粒子と同様の目的に使用することができ、例えば一般的の診断薬用担体および副作用の少ないドラッグデリバリー担体として、広範な抗原、抗体、蛋白、核酸等の担持に適用することが可能である。また、酵素免疫法の診断薬用担体として、磁性体の溶出による非特異的酵素発色が抑えられる等、多様な検出手法に適用できるものであり、極めて実用性能の高いものである。さらに、本発明の構造体は、例えば、粒子表面に特定の核酸を捕捉するための特異的核酸あるいは蛋白プローブを担持し、核酸捕捉担体として使用することも可能である。これらの場合、従来の磁性体含有ポリマー粒子では、金属、特に鉄成分がP C R反応を阻害するため、粒子をP C R法に供することができなかった。これに対して、本発明の構造体は、表面に露出した磁性体が実質上存在しないため、P C R反応に対する阻害作用がなくなり、捕捉された核酸を結合したままでP C R法に供することができるようになった。このため、本発明の構造体は、核酸を用いる研究分野、核酸による検査・診断・治療分野、核酸を利用する産業分野等を含む幅広い技術分野において、極め

40

50

て好適に使用できるものである。

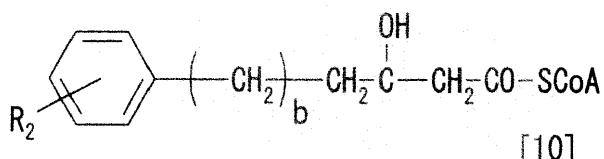
【0260】

本発明の構造体の応用の参考例として、例えばインクジェット記録方式における記録媒体が挙げられる。前述の通り、該記録媒体においてインク吸収層を基材上に形成させる方法としては、従来は塗抹による方法が一般的であった。本発明の方法によって、上記方法を用いることなく、新たに記録媒体を製造することが可能となる。即ち、酵素を固定化した基材と、例えば、下記化学式[10]においてR₂がビニル基である3-ヒドロキシビニルフェニルアシルCoAとを反応させることによって、

【0261】

【化68】

10



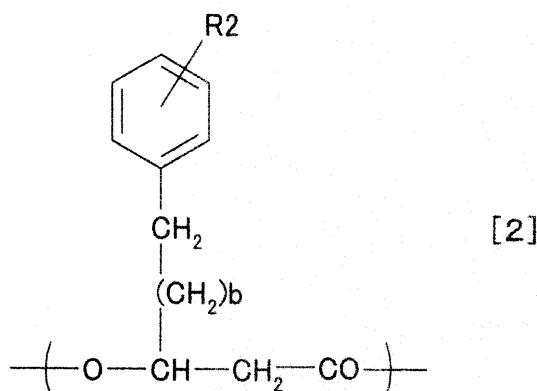
【0262】

下記化学式[2]においてR₂がビニル基であるようなユニットを含むPHAを合成し、

【0263】

【化69】

20



30

【0264】

さらにビニル基の酸化開裂を行うことにより、上記化学式[2]においてR₂がカルボキシ基であるようなユニットを含むPHA、即ち、アニオン性官能基であるカルボキシル基を側鎖に有するPHAをインク受容層として重層した記録媒体を製造することができる。本発明の方法により、従来の手法では製造が困難であった、上記の如き新規機能性記録媒体の製造が可能となる。

【0265】

なお、本発明の構造体およびその利用方法およびその製造方法は、上記の方法に限定されるものではない。

40

【0266】

【実施例】

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。ただし、以下に述べる実施例は本発明の最良の実施形態の一例ではあるが、本発明の技術的範囲はこれら実施例に限定されるものではない。なお、以下における「%」は特に標記した以外は質量基準である。

【0267】

(参考例1) PHA合成酵素生産能を有する形質転換体の作製

YN2株を100mlのLB培地(1%ポリペプトン(日本製薬(株)製)、0.5%酵母エキス(Difco社製)、0.5%塩化ナトリウム、pH 7.4)で30℃、一晩培養後、マーマーらの方法によ

50

り染色体DNAを分離回収した。得られた染色体DNAを制限酵素Hind IIIで完全分解した。ベクターにはpUC18を使用し、制限酵素Hind IIIで切断した。末端の脱リン酸処理(Molecular Cloning, 1, 572, (1989); Cold Spring Harbor Laboratory出版(非特許文献26))ののち、DNAライゲーションキットVer.II(宝酒造(株)製)を用いて、ベクターの切断部位(クローニングサイト)と染色体DNAのHind III完全分解断片とを連結した。この染色体DNA断片を組み込んだプラスミドベクターを用いて、大腸菌(Escherichia coli)HB101株を形質転換し、YN2株のDNAライプラリーを作製した。次に、YN2株のPHA合成酵素遺伝子を含むDNA断片を選択するため、コロニー・ハイブリダイズ用のプローブ調製を行った。配列番号:2および配列番号:3の塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを合成し(アマシャムファルマシア・バイオテク(株))、このオリゴヌクレオチドをプライマーに用いて、染色体DNAをテンプレートとしてPCRを行った。PCR増幅されてきたDNA断片をプローブとして用いた。プローブの標識化は、市販の標識酵素系Alk Phos Direct(アマシャムファルマシア・バイオテク(株)製)を利用して行った。得られた標識化プローブを用いて、YN2株の染色体DNAライプラリーからコロニー・ハイブリダイゼーション法によってPHA合成酵素遺伝子を含む組換えプラスミドを有する大腸菌菌株を選抜した。選抜した菌株から、アルカリ法によってプラスミドを回収することで、PHA合成酵素遺伝子を含むDNA断片を得ることができた。ここで取得した遺伝子DNA断片を、不和合性グループであるIncP、IncQ、あるいはIncWの何れにも属さない広宿主域複製領域を含むベクターpBBR122(MoBiTec)に組み換えた。この組み換えプラスミドをシュードモナス・チコリアイYN2m1株(PHA合成能欠損株)にエレクトロポレーション法により形質転換したところ、YN2m1株のPHA合成能が復帰し、相補性を示した。従って、選抜された遺伝子DNA断片は、シュードモナス・チコリアイYN2m1株において、PHA合成酵素に翻訳可能な、PHA合成酵素遺伝子領域を含むことが確認される。

【0268】

このDNA断片について、サンガー法により塩基配列を決定した。その結果、決定された塩基配列中には、それぞれペプチド鎖をコードする、配列番号:4および配列番号:5で示される塩基配列が存在することが確認された。これらのPHA合成酵素遺伝子について、染色体DNAをテンプレートとしてPCRを行い、PHA合成酵素遺伝子の完全長を再調製した。即ち、配列番号:4で示される塩基配列のPHA合成酵素遺伝子に対する、上流側プライマー(配列番号:6)および下流側プライマー(配列番号:7)、配列番号:5で示される塩基配列のPHA合成酵素遺伝子に対する、上流側プライマー(配列番号:8)および下流側プライマー(配列番号:9)をそれぞれ合成した(アマシャムファルマシア・バイオテク(株))。

【0269】

これらのプライマーを用いて、配列番号:4および配列番号:5で示される塩基配列それについてPCRを行い、PHA合成酵素遺伝子の完全長を増幅した(LA-PCRキット;宝酒造(株)製)。次に、得られたPCR増幅断片および発現ベクターpTrc99Aを制限酵素Hind IIIで切断し、脱リン酸化処理(Molecular Cloning, 1巻, 572頁, 1989年; Cold Spring Harbor Laboratory出版(前記・非特許文献26))したのち、この発現ベクター-pTrc99Aの切断部位に、両末端の不用な塩基配列を除いたPHA合成酵素遺伝子の完全長を含むDNA断片を、DNAライゲーションキットVer.II(宝酒造(株)製)を用いて連結した。

【0270】

得られた組換えプラスミドで大腸菌(Escherichia coli HB101:宝酒造)を塩化カルシウム法により形質転換した。得られた組換え体を培養し、組換えプラスミドの増幅を行い、組換えプラスミドをそれぞれ回収した。配列番号:4の遺伝子DNAを保持する組換えプラスミドをpYN2-C1、配列番号:5の遺伝子DNAを保持する組換えプラスミドをpYN2-C2とした。pYN2-C1、pYN2-C2で大腸菌(Escherichia coli HB101:fB-fadB欠損株)を塩化カルシウム法により形質転換し、それぞれの組換えプラスミドを保

持する組換え大腸菌株、pYN2-C1組換え株、pYN2-C2組換え株を得た。

【0271】

(参考例2) PHA合成酵素の生産1

pYN2-C1に対して、上流側プライマーとなる、オリゴヌクレオチド(配列番号:10)および下流側プライマーとなる、オリゴヌクレオチド(配列番号:11)をそれぞれ設計・合成した(アマシャムファルマシア・バイオテク(株))。このオリゴヌクレオチドをプライマーとして、pYN2-C1をテンプレートとしてPCRを行い、上流にBamHI制限部位、下流にXhoI制限部位を有するPHA合成酵素遺伝子の完全長を増幅した(LA-PCRキット；宝酒造(株)製)。

【0272】

同様にpYN2-C2に対して、上流側プライマーとなる、オリゴヌクレオチド(配列番号:12)および下流側プライマーとなる、オリゴヌクレオチド(配列番号:13)をそれぞれ設計・合成した(アマシャムファルマシア・バイオテク(株))。このオリゴヌクレオチドをプライマーとして、pYN2-C2をテンプレートとしてPCRを行い、上流にBamHI制限部位、下流にXhoI制限部位を有するPHA合成酵素遺伝子の完全長を増幅した(LA-PCRキット；宝酒造(株)製)。

【0273】

精製したそれぞれのPCR増幅産物をBamHIおよびXhoIにより消化し、プラスミドpGEX-6P-1(アマシャムファルマシア・バイオテク(株)製)の対応する部位に挿入した。これらのベクターを用いて大腸菌(JM109)を形質転換し、発現用菌株を得た。菌株の確認は、Miniprep(Wizard Minipreps DNA Purification Systems、Promega社製)を用いて大量に調製したプラスミドDNAをBamHI、XhoIで処理して得られるDNA断片により行った。得られた菌株をLB-Amp培地10mlで一晩プレ・カルチャード後、その0.1mlを、10mlのLB-Amp培地に添加し、37℃、170 rpmで3時間振とう培養した。その後IPTGを添加(終濃度 1mmol/L)し、37℃で4から12時間培養を続けた。

【0274】

IPTG誘導した大腸菌を遠心分離により集菌(78000m/s²(=8000G)、2分、4℃)し、1/10量の4℃リン酸緩衝生理食塩水(PBS; 8g NaCl, 1.44g Na₂HPO₄, 0.24g KH₂PO₄, 0.2g KCl, 1,000ml精製水)に再懸濁した。凍結融解およびソニケーションにより菌体を破碎し、遠心分離(78000m/s²(=8000G)、10分、4℃)して固形夾雑物を取り除いた。目的の発現タンパク質が上清に存在することをSDS-PAGEで確認した後、誘導され発現されたGST融合タンパク質をグルタチオン・セファロース4B(アマシャムファルマシア・バイオテク(株)製)で精製した。使用するグルタチオン・セファロースは、予め非特異的吸着を抑える処理を行った。すなわち、グルタチオン・セファロースを同量のPBSで3回洗浄(遠心分離(78000m/s²(=8000G)、1分、4℃)した後、4%ウシ血清アルブミン含有PBSを同量加えて4℃で1時間処理した。処理後同量のPBSで2回洗浄し、1/2量のPBSに再懸濁した。前処理したグルタチオン・セファロース40μlを、無細胞抽出液1mlに添加し、4℃で静かに攪拌した。これにより、融合タンパク質GST-YN2-C1およびGST-YN2-C2をグルタチオン・セファロースに吸着させた。吸着後、遠心分離(78000m/s²(=8000G)、1分、4℃)してグルタチオン・セファロースを回収し、400μlのPBSで3回洗浄した。その後、10mmol/Lグルタチオン40μlを添加し、4℃で1時間攪拌して、吸着した融合タンパク質を溶出した。遠心分離(78000m/s²(=8000G)、2分、4℃)して上清を回収した後PBSに対して透析し、GST融合タンパク質を精製した。SDS-PAGEにより、シングルバンドを確認した。

【0275】

各GST融合タンパク質500μgをProtease(アマシャムファルマシア・バイオテク(株)製、5U)で消化した後、グルタチオン・セファロースに通してプロテアーゼとGSTとを除去した。フロースルーフィルターをさらに、PBSで平衡化したセファデッ

10

20

30

40

50

クスG200カラムにかけ、発現タンパク質YN2-C1およびYN2-C2の最終精製物を得た。SDS-PAGEによりそれぞれ60.8kDa、および61.5kDaのシングルバンドを確認した。

【0276】

該酵素を生体溶液試料濃縮剤(みずぶとりくんAB-1100、アトー(株)製)を用いて濃縮し、10U/mlの精製酵素溶液を得た。

【0277】

各精製酵素活性は前述の方法で測定した。また、試料中のタンパク質濃度は、マイクロBCAタンパク質定量試薬キット(ピアスケミカル社製)によって測定した。各精製酵素の活性測定の結果を表1に示した。

【0278】

【表1】

表1

	比活性
pYN2-C1	4.1U/mgタンパク質
pYN2-C2	3.6U/mgタンパク質

10

20

【0279】

(参考例3) PHA合成酵素の生産2

P91株、H45株、YN2株またはP161株を、酵母エキス(Difco社製)0.5%、オクタン酸0.1%とを含むM9培地200mlに植菌して、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。24時間後、菌体を遠心分離(4℃、10分間)によって回収し、0.1mol/Lトリス塩酸バッファー(pH 8.0)200mlに再懸濁して再度遠心分離することによって洗浄した。菌体を0.1mol/Lトリス塩酸バッファー(pH 8.0)2.0mlに再懸濁し、超音波破碎機にて破碎したのち、遠心分離(118000m/s²(=12000G)、4℃、10分間)して上清を回収して粗酵素を得た。

【0280】

30

各精製酵素活性は前述の方法で測定し、その結果を表2に示した。

【0281】

【表2】

表2

	活性
P91株	0.1U/ml
H45株	0.2U/ml
YN2株	0.4U/ml
P161株	0.2U/ml

40

【0282】

(参考例4) 磁性体の調製

硫酸第一鉄水溶液中に、鉄イオンに対して1.0~1.1当量の苛性ソーダ溶液を混合し、水酸化第一鉄を含む水溶液を調製した。この水溶液のpHを8前後に維持しながら、空気を吹き込み、80~90℃で酸化反応を行い、種晶を生成させるスラリー液を調製した。

【0283】

次いで、このスラリー液に当初のアルカリ量(苛性ソーダのナトリウム成分)に対し0.9~1

50

.2当量となるよう硫酸第一鉄水溶液を加えた後、スラリー液をpH 8前後に維持して、空気を吹き込みながら酸化反応をすすめ、酸化反応後に生成した磁性酸化鉄粒子を洗浄、濾過、乾燥し、凝集している粒子を解碎し、平均粒径が0.1μmの粒状の磁性体1を得た。

【0284】

以下、本発明にかかる実施例について説明するが、以下の実施例1～6は参考例である。

(実施例1) カプセル構造体の作製1

pYN2-C1組換え株由来のPHA合成酵素溶液(10U/ml)10質量部にアルミナ粒子(粒径0.12μm～135μm)1質量部、PBS39質量部を添加し30にて30分間緩やかに振盪してPHA合成酵素をアルミナ表面に吸着させた。これを遠心分離(98000m/s²(=10000G)、4、10分間)し、沈殿をPBS溶液に懸濁し、再度遠心分離(98000m/s²(=10000G)、4、10分間)して固定化酵素を得た。
10

【0285】

上記固定化酵素を0.1mol/Lリン酸バッファー(pH 7.0)48質量部に懸濁し、(R)-3-ヒドロキシ-3-オクテノイルCoA(Eur. J. Biochem., 250, 432-439(1997)(前記・非特許文献17)に記載の方法で調製)1質量部、ウシ血清アルブミン(Sigma社製)0.1質量部を添加し、30で2時間緩やかに振盪した。

【0286】

上記反応液10μlをスライドグラス上に採取し、1%ナイルブルーA水溶液10μlを添加し、スライドグラス上で混合した後、カバーグラスを載せ、蛍光顕微鏡(330～380nm励起フィルタ、420nmロングパス吸収フィルタ、(株)ニコン製)観察を行った。その結果、アルミナ粒子表面が蛍光を発していることが確認された。従って、該アルミナ粒子はPHAにより表面を被覆されていることがわかった。
20

【0287】

対照として、0.1mol/Lリン酸バッファー(pH 7.0)49質量部にアルミナ粒子1質量部を添加し、30で2.5時間緩やかに振盪した後、同様にナイルブルーAで染色して蛍光顕微鏡観察を行った。その結果、アルミナ粒子表面は全く蛍光を発しなかった。

【0288】

さらに、試料の一部を遠心分離(98000m/s²(=10000G)、4、10分間)により回収し、真空乾燥したのち、クロロホルムに懸濁し、60で20時間攪拌して外被を成すPHAを抽出した。この抽出液について¹H-NMR分析を行った(使用機器:FT-NMR:Bruker DPX400、測定核種:¹H、使用溶媒:重クロロホルム(TMS入り))。その結果、該PHAは(R)-3-ヒドロキシ-3-オクテン酸ユニットからなるPHAであることが確認された。
30

【0289】

さらに、該PHAの分子量をゲルパーキエーションクロマトグラフィー(GPC; 東ソーHLC-8020、カラム; ポリマーラボラトリーピルゲルMIXED-C(5μm)、溶媒; クロロホルム、カラム温度; 40、ポリスチレン換算)により評価した結果、Mn=25,000、Mw=50,000であった。

【0290】

(実施例2) カプセル構造体の作製2

pYN2-C2組換え株由来のPHA合成酵素溶液(10U/ml)10質量部にアルミナ粒子(粒径0.12μm～135μm)1質量部、PBS39質量部を添加し、30にて30分間緩やかに振盪してPHA合成酵素をアルミナ表面に吸着させた。これを遠心分離(98000m/s²(=10000G)、4、10分間)し、沈殿をPBS溶液に懸濁し、再度遠心分離(98000m/s²(=10000G)、4、10分間)して固定化酵素を得た。
40

【0291】

上記固定化酵素を0.1mol/Lリン酸バッファー(pH 7.0)48質量部に懸濁し、(R)-3-ヒドロキシ-3-シクロヘキシリルプロパノイルCoA(Eur. J. Biochem., 250, 432-439(1997)(前記・非特許文献17)に記載の方法で調製)1質量部、ウシ血清アルブミン(Sigma社製)
50

0.1質量部を添加し、30℃で2時間緩やかに振盪した。

【0292】

上記反応液10μlをスライドグラス上に採取し、1%ナイルブルーA水溶液10μlを添加し、スライドグラス上で混合した後、カバーグラスを載せ、蛍光顕微鏡(330~380nm励起フィルタ、420nmロングパス吸収フィルタ、(株)ニコン製)観察を行った。その結果、アルミナ粒子表面が蛍光を発していることが確認された。従って、該アルミナ粒子はPHAにより表面を被覆されていることがわかった。

【0293】

さらに、試料の一部を遠心分離(98000m/s²(=10000G)、4℃、10分間)により回収し、真空乾燥したのち、クロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌して外被を成すPHAを抽出した。この抽出液について¹H-NMR分析を行った(使用機器:FT-NMR:Bruker DPX400、測定核種:¹H、使用溶媒:重クロロホルム(TMS入り))。その結果、該PHAは(R)-3-ヒドロキシ-3-シクロヘキシリルプロピオン酸ユニットからなるPHAであることが確認された。

【0294】

(実施例3) カプセル構造体の作製3

YN2, H45株、P91株またはP161株由来のPHA合成酵素の粗酵素99質量部にアルミナ粒子(粒径0.12μm~135μm)1質量部を添加し、30℃にて30分間緩やかに振とうしてPHA合成酵素をアルミナ表面に吸着させた。これを遠心分離(98000m/s²(=10000G)、4℃、10分間)し、沈殿をPBS溶液に懸濁し、再度遠心分離(98000m/s²(=10000G)、4℃、10分間)して固定化酵素を得た。

【0295】

上記の各固定化酵素を0.1mol/Lリン酸バッファー(pH 7.0)48質量部に懸濁し、(R)-3-ヒドロキシ-5-フェニルメチルオキシバレリルCoA(Eur. J. Biochem., 250, 432-439(1997))(前記・非特許文献17)に記載の方法で調製)1質量部、ウシ血清アルブミン(Sigma社製)0.1質量部を添加し、それぞれ30℃で2時間緩やかに振盪した。

【0296】

上記反応液10μlをスライドグラス上に採取し、1%ナイルブルーA水溶液10μlを添加し、スライドグラス上で混合した後、カバーグラスを載せ、蛍光顕微鏡(330~380nm励起フィルタ、420nmロングパス吸収フィルタ、(株)ニコン製)観察を行った。その結果、いずれの固定化酵素の反応液においても、アルミナ粒子表面が蛍光を発していることが確認された。従って、該アルミナ粒子はいずれも、PHAにより表面を被覆されていることがわかった。

【0297】

さらに、試料の一部を遠心分離(98000m/s²(=10000G)、4℃、10分間)により回収し、真空乾燥したのち、クロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌して外被を成すPHAを抽出した。この抽出液について¹H-NMR分析を行った(使用機器:FT-NMR:Bruker DPX400、測定核種:¹H、使用溶媒:重クロロホルム(TMS入り))。その結果、該PHAは(R)-3-ヒドロキシ-5-フェニルメチルオキシ吉草酸ユニットからなるPHAであることが確認された。

【0298】

(実施例4) カプセル構造体の作製4

pYN2-C1組換え株由来のPHA合成酵素溶液(10U/ml)10質量部にアルミナ粒子(粒径0.12μm~135μm)1質量部、PBS 39質量部を添加し、30℃にて30分間緩やかに振とうしてPHA合成酵素をアルミナ表面に吸着させた。これを遠心分離(98000m/s²(=10000G)、4℃、10分間)し、沈殿をPBS溶液に懸濁し、再度遠心分離(98000m/s²(=10000G)、4℃、10分間)して固定化酵素を得た。

【0299】

上記固定化酵素を0.1mol/Lリン酸バッファー(pH 7.0)48質量部に懸濁し、(R)-3-ヒドロキシ-5-(4-メチルフェニル)バレリルCoA(Eur. J. Biochem., 250, 432-439(1997))

10

20

30

40

50

(前記・非特許文献17)に記載の方法で調製)1質量部、ウシ血清アルブミン(Sigma社製)0.1質量部を添加し、30℃で2時間緩やかに振盪した。

【0300】

上記反応液10μlをスライドグラス上に採取し、1%ナイルブルーA水溶液10μlを添加し、スライドグラス上で混合した後、カバーグラスを載せ、蛍光顕微鏡(330~380nm励起フィルタ、420nmロングパス吸収フィルタ、(株)ニコン製)観察を行った。その結果、アルミニナ粒子表面が蛍光を発していることが確認された。従って、該アルミニナ粒子はPHAにより表面を被覆されていることがわかった。

【0301】

さらに、該粒子の一部を遠心分離(98000m/s²(=10000G)、4℃、10分間)により回収し、真空乾燥したのち、クロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌して外被を成すPHAを抽出した。抽出液を孔径0.45μmのメンブレンフィルターでろ過し、ロータリーエバポレーターで減圧濃縮したのち、常法に従ってメタノリシスを行い、ガスクロマトグラフィー-質量分析装置(GC-MS,島津QP-5050、EI法)で分析し、PHAモノマーユニットのメチルエステル化物の同定を行った。その結果、該PHAは3-ヒドロキシ-5-(4-メチルフェニル)吉草酸ユニットからなるPHAであることが確認された。

【0302】

さらに、該PHAの分子量をゲルパーキエーションクロマトグラフィー(GPC;東ソーHLC-8020、カラム;ポリマーラボラトリーポジカルMIXED-C(5μm)、溶媒;クロロホルム、カラム温度;40℃、ポリスチレン換算)により評価した結果、Mn=15,000、Mw=28,000であった。

【0303】

(実施例5)カプセル構造体の作製5

pYN2-C1組換え株由来のPHA合成酵素溶液(10U/ml)10質量部にアルミニナ粒子(粒径0.12μm~135μm)1質量部、PBS39質量部を添加し、30℃にて30分間緩やかに振とうしてPHA合成酵素をアルミニナ表面に吸着させた。これを遠心分離(98000m/s²(=10000G)、4℃、10分間)し、沈殿をPBS溶液に懸濁し、再度遠心分離(98000m/s²(=10000G)、4℃、10分間)して固定化酵素を得た。

【0304】

上記固定化酵素を0.1mol/Lリン酸バッファー(pH7.0)48質量部に懸濁し、(R)-3-ヒドロキシ-5-(4-メチルフェノキシ)バレリルCoA(Eur.J.Biochem.,250,432-439(1997))(前記・非特許文献17)に記載の方法で調製)1質量部、ウシ血清アルブミン(Sigma社製)0.1質量部を添加し、30℃で2時間緩やかに振盪した。

【0305】

上記反応液10μlをスライドグラス上に採取し、1%ナイルブルーA水溶液10μlを添加し、スライドグラス上で混合した後、カバーグラスを載せ、蛍光顕微鏡(330~380nm励起フィルタ、420nmロングパス吸収フィルタ、(株)ニコン製)観察を行った。その結果、アルミニナ粒子表面が蛍光を発していることが確認された。従って、該アルミニナ粒子はPHAにより表面を被覆されていることがわかった。

【0306】

さらに、該粒子の一部を遠心分離(98000m/s²(=10000G)、4℃、10分間)により回収し、真空乾燥したのち、クロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌して外被を成すPHAを抽出した。抽出液を孔径0.45μmのメンブレンフィルターでろ過し、ロータリーエバポレーターで減圧濃縮したのち、常法に従ってメタノリシスを行い、ガスクロマトグラフィー-質量分析装置(GC-MS,島津QP-5050、EI法)で分析し、PHAモノマーユニットのメチルエステル化物の同定を行った。その結果、当該PHAは3-ヒドロキシ-5-(4-メチルフェノキシ)吉草酸をモノマーユニットとするPHAであることが確認された。

【0307】

(実施例6)カプセル構造体の作製6

pYN2-C1組換え株由来のPHA合成酵素溶液(10U/ml)10質量部に沈降法によって

10

20

30

40

50

粒径をそろえたアルミナ粒子(体積平均粒子径 $1.45\text{ }\mu\text{m}$)1質量部、P B S 39質量部を添加し30にて30分間緩やかに振盪してP H A合成酵素をアルミナ表面に吸着させた。これを遠心分離(98000 m/s^2 (=10000 G)、4、10分間)し、沈殿をP B S溶液に懸濁し、再度遠心分離($10,000 \times g$ 、4、10分間)して固定化酵素を得た。

【0308】

上記固定化酵素を 0.1 mol/L リン酸バッファー(pH 7.0)48質量部に懸濁し、(R)-3-ヒドロキシ-5-(4-メチルフェニル)メチルスルファニルバレリルCoA(Eur. J. Biochem., 250, 432-439(1997)(前記・非特許文献17)に記載の方法で調製)1質量部、ウシ血清アルブミン(Sigma社製) 0.1 質量部を添加し、30で2時間緩やかに振盪した。

【0309】

反応後、上記反応液 $10\text{ }\mu\text{l}$ をスライドグラス上に採取し、1%ナイルブルーA水溶液 $10\text{ }\mu\text{l}$ を添加し、スライドグラス上で混合した後、カバーグラスを載せ、蛍光顕微鏡(330~380nm励起フィルタ、420nmロングパス吸収フィルタ、(株)ニコン製)観察を行った。その結果、アルミナ粒子表面が蛍光を発していることが確認された。従って、該アルミナ粒子はP H Aにより表面を被覆されていることがわかった。

【0310】

さらに、試料の一部を遠心分離(98000 m/s^2 (=10000 G)、4、10分間)により回収し、真空乾燥したのち、クロロホルムに懸濁し、60で20時間攪拌して外被を成すP H Aを抽出した。この抽出液について $^1\text{H-NMR}$ 分析を行った(使用機器:FT-NMR:Bruker DPX400、測定核種: ^1H 、使用溶媒:重クロロホルム(TMS入り))。その結果、該P H Aは(R)-3-ヒドロキシ-5-(4-メチルフェニル)メチルスルファニル吉草酸ユニットからなるP H Aであることが確認された。

【0311】

(実施例7)カプセル構造体の作製7

p Y N 2 - C 1組換え株由来のP H A合成酵素溶液($10\text{ U/m}\text{l}$)10質量部に磁性体1を1質量部、P B S 39質量部を添加し30にて30分間緩やかに振盪してP H A合成酵素を磁性体1表面に吸着させた。これを遠心分離(98000 m/s^2 (=10000 G)、4、10分間)し、沈殿をP B S溶液に懸濁し、再度遠心分離(98000 m/s^2 (=10000 G)、4、10分間)して固定化酵素を得た。

【0312】

上記固定化酵素を 0.1 mol/L リン酸バッファー(pH 7.0)48質量部に懸濁し、(R)-3-ヒドロキシ-5-(4-ビニルフェニル)バレリルCoA(Eur. J. Biochem., 250, 432-439(1997)(前記・非特許文献17)に記載の方法で調製)1質量部、ウシ血清アルブミン(Sigma社製) 0.1 質量部を添加し、30で2時間緩やかに振盪した。

【0313】

反応後、上記反応液 $10\text{ }\mu\text{l}$ をスライドグラス上に採取し、1%ナイルブルーA水溶液 $10\text{ }\mu\text{l}$ を添加し、スライドグラス上で混合した後、カバーグラスを載せ、蛍光顕微鏡(330~380nm励起フィルタ、420nmロングパス吸収フィルタ、(株)ニコン製)観察を行った。その結果、磁性体1粒子表面が蛍光を発していることが確認された。従って、該磁性体1粒子はP H Aにより表面を被覆されていることがわかった。これを磁性カプセル構造体1とした。

【0314】

さらに、試料の一部を遠心分離(98000 m/s^2 (=10000 G)、4、10分間)により回収し、真空乾燥したのち、クロロホルムに懸濁し、60で20時間攪拌して外被を成すP H Aを抽出した。この抽出液について $^1\text{H-NMR}$ 分析を行った(使用機器:FT-NMR:Bruker DPX400、測定核種: ^1H 、使用溶媒:重クロロホルム(TMS入り))。その結果、該P H Aは(R)-3-ヒドロキシ-5-(4-ビニルフェニル)吉草酸ユニットからなるP H Aであることが確認された。

【0315】

ここで、該P H Aの平均分子量をゲルパーミエーションクロマトグラフィー(GPC; 東

10

20

30

40

50

ソーハル C -8020、カラム；ポリマーラボラトリー P L gel M I X E D - C (5 μm)、溶媒；クロロホルム、カラム温度；40℃、ポリスチレン換算)により評価した結果、Mn = 21,000、Mw = 39,000であった。

【0316】

(実施例8) カプセル構造体の作製8

pYN2-C1組換え株由来のPHA合成酵素溶液(10 U/ml)10質量部に気相法で合成した磁性を有する金属として1次粒子径0.02 μmニッケル粉末「Ni(200)UFMP」〔真空冶金(株)製〕(磁性体2とする)を1質量部、PBS 39質量部を添加し30℃にて30分間緩やかに振盪してPHA合成酵素を磁性体2表面に吸着させた。これを遠心分離(98000 m/s²(=10000 G)、4℃、10分間)し、沈殿をPBS溶液に懸濁し、再度遠心分離(98000 m/s²(=10000 G)、4℃、10分間)して固定化酵素を得た。
10

【0317】

上記固定化酵素を0.1 mol/Lリン酸バッファー(pH 7.0)48質量部に懸濁し、(R)-3-ヒドロキシ-5-(4-メチルフェノキシ)バレリルCoA(Eur. J. Biochem., 250, 432-439(1997)) (前記・非特許文献17)に記載の方法で調製)1質量部、ウシ血清アルブミン(Sigma社製)0.1質量部を添加し、30℃で10分間緩やかに振盪した。次いで、30℃で緩やかに振盪しながらこの反応液に(R)-3-ヒドロキシ-5-(4-メチルフェニル)バレリルCoA(Eur. J. Biochem., 250, 432-439(1997)) (前記・非特許文献17)に記載の方法で調製)1質量部、ウシ血清アルブミン(Sigma社製)0.1質量部を含む0.1 mol/Lリン酸バッファー(pH 7.0)をマイクロチューブポンプ(東京理化器械社製MP-3N)を用いて1分間に1質量部の割合で添加した。さらに1時間30分後、生成した粒状体を遠心分離(98000 m/s²(=10000 G)、4℃、10分間)により回収し、上清を除いた後、この粒状体に(R)-3-ヒドロキシ-5-(4-メチルフェニル)バレリルCoA(Eur. J. Biochem., 250, 432-439(1997)) (前記・非特許文献17)に記載の方法で調製)1質量部、ウシ血清アルブミン(Sigma社製)0.1質量部を含む0.1 mol/Lリン酸バッファー(pH 7.0)を25質量部添加し、30℃で20分間緩やかに振盪した。
20

【0318】

反応後、上記反応液10 μlをスライドグラス上に採取し、1%ナイルブルーA水溶液10 μlを添加し、スライドグラス上で混合した後、カバーグラスを載せ、蛍光顕微鏡(330~380nm励起フィルタ、420nmロングパス吸収フィルタ、(株)ニコン製)観察を行った。その結果、磁性体2粒子表面が蛍光を発していることが確認された。従って、該磁性体2粒子はPHAにより表面を被覆されていることがわかった。これを磁性カプセル構造体2とした。
30

【0319】

また、このカプセル構造体を遠心分離(98000 m/s²(=10000 G)、4℃、10分間)により回収し、乾燥処理後、この粒状体の表面に形成されたポリマーの質量を、飛行時間型二次イオン質量分析装置(ToF-SIMS IV、CAMECA製)により測定した。得られたマススペクトルから、カプセル構造体表面はポリヒドロキシ(4-メチルフェニル)吉草酸のホモポリマーで構成されていることがわかった。また、イオンスパッタリングによりカプセル構造体表面を少しずつ削りながら同様にToF-SIMSによりマススペクトルを測定していくところ、(R)-ヒドロキシ-5-(4-メチルフェニル)吉草酸と(R)-ヒドロキシ-5-(4-メチルフェノキシ)吉草酸の共重合体が現れ、粒状体内部にいくにつれて前記共重合体における(R)-ヒドロキシ-5-(4-メチルフェニル)吉草酸の組成比率が次第に減少し、逆に(R)-ヒドロキシ-5-(4-メチルフェノキシ)吉草酸の組成比率が増加して最終的にポリヒドロキシ(4-メチルフェノキシ)吉草酸のホモポリマーに変化することが確認された。これにより、本実施例のカプセル構造体は、基材表面を極性の高いポリヒドロキシ(4-メチルフェノキシ)吉草酸で被覆し、その上を(R)-ヒドロキシ-5-(4-メチルフェノキシ)吉草酸と(R)-ヒドロキシ-5-(4-メチルフェニル)吉草酸の共重合体によって、表層に至るにつれて(R)-ヒドロキシ-5-(4-メチルフェニル)吉草酸の組成比率を高めながら被覆し、さらに最表層を極性の低いポリヒドロキシ(4-メチルフェニル)吉草酸のホモポリマーで被覆した力
40
50

プセル構造体であることがわかった。

【0320】

ここで、該PHAの平均分子量をゲルパーミエーションクロマトグラフィー(GPC; 東ソーHLC-8020、カラム; ポリマー・ラボラトリーピー・エフ・ジーエルゲルMIXED-C(5μm)、溶媒; クロロホルム、カラム温度; 40℃、ポリスチレン換算)により評価した結果、Mn=17,000、Mw=36,000であった。

【0321】

(実施例9)カプセル構造体の作製9

pYN2-C1組換え株由来のPHA合成酵素溶液(10U/ml)10質量部に気相法で合成した1次粒子径0.02μmの-Fe2O3微粉「NanoTek」〔シーアイ化成(株)製〕(磁性体3とする)を1質量部、PBS 39質量部を添加し30℃にて30分間緩やかに振盪してPHA合成酵素を磁性体3表面に吸着させた。これを遠心分離(98000m/s²(=10000G)、4,000分間)し、沈殿をPBS溶液に懸濁し、再度遠心分離(98000m/s²(=10000G)、4,000分間)して固定化酵素を得た。

【0322】

上記固定化酵素を0.1mol/Lリン酸バッファー(pH 7.0)48質量部に懸濁し、(R)-3-ヒドロキシ-5-フェニルスルファニルバレリルCoA(Eur. J. Biochem., 250, 432-439(1997))(前記・非特許文献17)に記載の方法で調製)1質量部、ウシ血清アルブミン(Sigma社製)0.1質量部を添加し、30℃で2時間緩やかに振盪した。

【0323】

反応後、上記反応液10μlをスライドグラス上に採取し、1%ナイルブルーA水溶液10μlを添加し、スライドグラス上で混合した後、カバーグラスを載せ、蛍光顕微鏡(330~380nm励起フィルタ、420nmロングパス吸収フィルタ、(株)ニコン製)観察を行った。その結果、磁性体3粒子表面が蛍光を発していることが確認された。従って、該磁性体3粒子はPHAにより表面を被覆されていることがわかった。これを磁性カプセル構造体3とした。

【0324】

さらに、試料の一部を遠心分離(98000m/s²(=10000G)、4,000分間)により回収し、真空乾燥したのち、クロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌して外被を成すPHAを抽出した。この抽出液について¹H-NMR分析を行った(使用機器: FT-NMR: Bruker DPX 400、測定核種:¹H、使用溶媒:重クロロホルム(TMS入り))。その結果、該PHAは(R)-3-ヒドロキシ-5-フェニルスルファニル吉草酸ユニットからなるPHAであることが確認された。

【0325】

(実施例10)カプセル構造体の作製10

pYN2-C1組換え株由来のPHA合成酵素溶液(10U/ml)10質量部に湿式法で合成した粒子径0.3μmのマグネタイト微粒子「マグネタイトEPT500」〔戸田工業(株)製〕(磁性体4とする)を1質量部、PBS 39質量部を添加し30℃にて30分間緩やかに振盪してPHA合成酵素を磁性体4表面に吸着させた。これを遠心分離(98000m/s²(=10000G)、4,000分間)し、沈殿をPBS溶液に懸濁し、再度遠心分離(98000m/s²(=10000G)、4,000分間)して固定化酵素を得た。

【0326】

上記固定化酵素を0.1mol/Lリン酸バッファー(pH 7.0)48質量部に懸濁し、(R)-3-ヒドロキシ-5-フェニルバレリルCoA(Eur. J. Biochem., 250, 432-439(1997))(前記・非特許文献17)に記載の方法で調製)0.8質量部、(R)-3-ヒドロキシ-5-(4-ビニルフェニル)バレリルCoA(Eur. J. Biochem., 250, 432-439(1997))(前記・非特許文献17)に記載の方法で調製)0.2質量部、ウシ血清アルブミン(Sigma社製)0.1質量部を添加し、30℃で2時間緩やかに振盪して試料1を得た。

【0327】

比較対照として、(R)-3-ヒドロキシ-5-(4-ビニルフェニル)バレリルCoAを、(R)-

10

20

30

40

50

3-ヒドロキシ-5-(4-メチルフェニル)バレリルCoA(Eur. J. Biochem., 250, 432-439(1997) (前記・非特許文献17)に記載の方法で調製)に変更する以外は、上記と同様の方法で試料2を得た。

【0328】

上記の試料 $10\mu\text{l}$ をスライドグラス上に採取し、1%ナイルブルーA水溶液 $10\mu\text{l}$ を添加し、スライドグラス上で混合した後、カバーグラスを載せ、蛍光顕微鏡(330~380nm励起フィルタ、420nmロングパス吸収フィルタ、(株)ニコン製)観察を行った。その結果、いずれの試料においても、磁性体4粒子表面が蛍光を発していることが確認された。従って、該磁性体4粒子はPHAにより表面を被覆されていることがわかった。それぞれを磁性力プセル構造体4および5とした。

10

【0329】

対照として、 0.1mol/L リン酸バッファー(pH 7.0)49質量部に磁性体4粒子1質量部を添加し、30℃で2.5時間緩やかに振盪した後、同様にナイルブルーAで染色して蛍光顕微鏡観察を行った。その結果、磁性体4粒子表面は全く蛍光を発しなかった。

【0330】

さらに、試料の一部を遠心分離(98000m/s^2 (=10000G)、4℃、10分間)により回収し、真空乾燥したのち、クロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌して外被を成すPHAを抽出した。この抽出液について $^1\text{H-NMR}$ 分析を行った(使用機器: FT-NMR: Bruker DPX 400、測定核種: ^1H 、使用溶媒:重クロロホルム(TMS入り))。ここから計算した各側鎖ユニットのユニット%を表3に示す。

20

【0331】

【表3】

表3 カプセル構造体の外被PHAの組成($^1\text{H-NMR}$ 、ユニット%)

モノマー単位	磁性力プセル構造体4	磁性カプセル構造体5
3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸	83%	85%
3-ヒドロキシ-5-(4-ビニルフェニル)吉草酸	17%	-
3-ヒドロキシ-5-(4-メチルフェニル)吉草酸	-	15%

30

【0332】

(実施例11) カプセル構造体の作製11

実施例10で製造した磁性カプセル構造体4についてエポキシ化反応を行った。磁性カプセル構造体4の1質量部を四つ口丸底フラスコに加え、蒸留水6質量部を加えて攪拌した。フラスコ内を40℃に加温し、これに過酢酸30%のヘキサン溶液1質量部を連続的に滴下し、攪拌下40℃で5時間反応させた。反応は磁性カプセル構造体同士が凝集することなく進行した。反応終了後、室温まで冷却し、反応液をろ過することで、磁性カプセル構造体を回収した。この回収した磁性カプセル構造体は蒸留水に再懸濁した後、遠心分離(29400m/s^2 (=3000G)、4℃、30分間)した。分離した後、磁性カプセル構造体を蒸留水に再懸濁し、再度遠心分離を行って洗浄した。更に、この洗浄操作を3回繰り返した。その後、真空乾燥することで、所望する磁性カプセル構造体6を得た。

40

【0333】

さらに、試料の一部を遠心分離(98000m/s^2 (=10000G)、4℃、10分間)により回収し、真空乾燥したのち、クロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌して外被を成すPHAを抽出した。この抽出液について $^1\text{H-NMR}$ 分析を行った(使用機器: FT-NMR: Bruker DPX 400、測定核種: ^1H 、使用溶媒:重クロロホルム(TMS入り))。ここから計算した各側鎖ユニットのユニット%は、3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸85%、3-ヒドロキシ-5-(4-ビニルフェニル)吉草酸11%、3-ヒドロキシ-5-(4-エポキシフェニル)吉草酸4%であった。

【0334】

50

この反応系が不均一反応であるため、カプセル構造体の表面はエポキシ化され、被覆内部は未反応のままであると考えられる。

【0335】

(実施例12) カプセル構造体の架橋反応

実施例11において製造した磁性カプセル構造体6を50質量部、遠心分離($98000\text{m/s}^2 (=10000\text{G})$ 、4、10分間)してカプセル構造体を回収し、精製水50質量部に懸濁する操作を3回繰り返したのち、該懸濁液に架橋剤としてヘキサメチレンジアミン0.5質量部を溶解させた。溶解を確認後、凍結乾燥により水を除去した(これを磁性カプセル構造体7とする)。さらに、磁性カプセル構造体7を70で12時間反応させた(これを磁性カプセル構造体8とする)。

10

【0336】

上記磁性カプセル構造体7及び磁性カプセル構造体8をクロロホルムに懸濁し、60で20時間攪拌して外被を成すPHAを抽出し、真空乾燥によりクロロホルムを除去し、示差走査熱量計(DSC；パーキンエルマー社製、Pyris 1、昇温:10/分)装置で測定を行った。その結果、磁性カプセル構造体7では90付近に明確な発熱ピークがみられ、ポリマー中のエポキシ基とヘキサメチレンジアミンとの反応が起こり、ポリマー同士の架橋が進行していることが示される。一方、磁性カプセル構造体8では明確なヒートフローは見られず、架橋反応がほぼ完了していることが示される。

【0337】

さらに、同様のサンプルにつき、赤外吸収を測定した(FT-IR；パーキンエルマー社製、1720X)。その結果、磁性カプセル構造体7で見られたアミン(3340cm^{-1} 付近)及びエポキシ(822cm^{-1} 付近)のピークが磁性カプセル構造体8では消失している。

20

【0338】

以上の結果より、側鎖にエポキシユニットをもつPHAとヘキサメチレンジアミンを反応させることにより、架橋ポリマーが得られることが明らかとなった。

【0339】

一方、比較対照として磁性カプセル構造体5について同様の評価を行ったが、前記の如き、ポリマー同士の架橋を明確に示す評価結果は得られなかった。

【0340】

(実施例13) カプセル構造体のグラフト化

30

実施例11において製造した磁性カプセル構造体6を50質量部、遠心分離($98000\text{m/s}^2 (=10000\text{G})$ 、4、10分間)してカプセル構造体を回収し、精製水50質量部に懸濁する操作を3回繰り返したのち、凍結乾燥により水を除去した。ここに、末端アミノ変性ポリシロキサン(変性シリコーンオイルTSF4700、GE東芝シリコーン(株)製)を10質量部添加し、70で2時間反応させた。これをメタノールに懸濁し、遠心分離($98000\text{m/s}^2 (=10000\text{G})$ 、4、20分間)する操作を繰り返すことにより洗浄し乾燥することで、ポリシロキサンのグラフト鎖を有する磁性カプセル構造体9を得た。

【0341】

(実施例14) カプセル構造体の作製12

実施例10で製造した磁性カプセル構造体4についてビニル基の酸化開裂反応を行った。磁性カプセル構造体4の10質量部を三つ口フラスコに移して、過酸化水素50ppmを添加した300質量部の蒸留水を加えた。オゾンを1質量部/時間の割りで吹き込み、3時間室温で攪拌した。反応は磁性カプセル構造体同士が凝集することなく進行した。反応終了後、反応液をろ過することで、磁性カプセル構造体を回収した。磁性カプセル構造体は、蒸留水に再懸濁した後、遠心分離($29400\text{m/s}^2 (=3000\text{G})$ 、4、30分間)を行って残余する過酸化水素水を洗浄した。更に、この洗浄操作を2回繰り返した。その後、真空乾燥することで、磁性カプセル構造体10を得た。

40

【0342】

さらに、試料の一部を遠心分離($98000\text{m/s}^2 (=10000\text{G})$ 、4、10分間)により回収し、真空乾燥したのち、クロロホルムに懸濁し、60で20時間攪拌して外被を成すPHAを抽出

50

した。この抽出液について¹H-NMR分析を行った(使用機器: FT-NMR: Bruker DP X 400、測定核種:¹H、使用溶媒:重クロロホルム(TMS入り))。ここから計算した各側鎖ユニットのユニット%は、3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸84%、3-ヒドロキシ-5-(4-ビニルフェニル)吉草酸11%、3-ヒドロキシ-5-(4-カルボキシフェニル)吉草酸5%であった。

【0343】

この反応系が不均一反応であるため、カプセル構造体の表面は酸化開裂され、被覆内部は未反応のままであると考えられる。

【0344】

(実施例15) カプセル構造体の作製13

10

実施例9において製造した磁性カプセル構造体3の1質量部を、市販の過酸化水素水(三菱瓦斯化学(株)製、31%過酸化水素含有、JIS K 8230規格品)150質量部及び脱イオン水30質量部に添加し、なす形フラスコに移して、オイルバス上、100℃、1時間反応させた。反応終了後、室温まで冷却し、磁性カプセル構造体を遠心分離(29400m/s²(=3000G)、4℃、30分間)した。分離した後、磁性カプセル構造体を蒸留水に再懸濁し、再度遠心分離を行って、残余する過酸化水素水を洗浄した。更に、この洗浄操作を2回繰り返した。その後、真空乾燥することで、磁性カプセル構造体11を得た。

【0345】

さらに、試料の一部を遠心分離(98000m/s²(=10000G)、4℃、10分間)により回収し、真空乾燥したのち、クロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌して外被を成すPHAを抽出した。この抽出液について¹H-NMR分析を行った(使用機器: FT-NMR: Bruker DP X 400、測定核種:¹H、使用溶媒:重クロロホルム(TMS入り))。ここから計算した各側鎖ユニットのユニット%は、3-ヒドロキシ-5-フェニルスルファニル吉草酸64%、3-ヒドロキシ-5-フェニルスルフィニル吉草酸16%、3-ヒドロキシ-5-フェニルスルホニル吉草酸20%であった。

20

【0346】

この反応系が不均一反応であるため、カプセル構造体の表面は酸化され、被覆内部は未反応のままであると考えられる。

【0347】

(実施例16) カプセル構造体の作製14

30

実施例9において製造した磁性カプセル構造体3の1質量部を市販の過酸化水素水(三菱瓦斯化学(株)製、31%過酸化水素含有、JIS K-8230規格品)90質量部及び脱イオン水30質量部に添加し、なす形フラスコに移して、オイルバス上、100℃、1時間反応させた。反応終了後、室温まで冷却し、磁性カプセル構造体を遠心分離(29400m/s²(=3000G)、4℃、30分間)した。分離した後、磁性カプセル構造体を蒸留水に再懸濁し、再度遠心分離を行って、残余する過酸化水素水を洗浄した。更に、この洗浄操作を2回繰り返した。その後、真空乾燥することで、磁性カプセル構造体12を得た。

【0348】

さらに、試料の一部を遠心分離(98000m/s²(=10000G)、4℃、10分間)により回収し、真空乾燥したのち、クロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌して外被を成すPHAを抽出した。この抽出液について¹H-NMR分析を行った(使用機器: FT-NMR: Bruker DP X 400、測定核種:¹H、使用溶媒:重クロロホルム(TMS入り))。ここから計算した各側鎖ユニットのユニット%は、3-ヒドロキシ-5-フェニルスルファニル吉草酸61%、3-ヒドロキシ-5-フェニルスルフィニル吉草酸31%、3-ヒドロキシ-5-フェニルスルホニル吉草酸8%であった。

40

【0349】

この反応系が不均一反応であるため、カプセル構造体の表面は酸化され、被覆内部は未反応のままであると考えられる。

【0350】

(実施例17) カプセル構造体の作製15

50

p Y N 2 - C 1 組換え株由来の P H A 合成酵素溶液(10 U / m l)10質量部に磁性体 1 を 1 質量部、 P B S 39質量部を添加し30 にて30分間緩やかに振盪して P H A 合成酵素を磁性体 1 表面に吸着させた。これを遠心分離($98000 \text{m/s}^2 (=10000 \text{G})$ 、4 、10分間)し、沈殿を P B S 溶液に懸濁し、再度遠心分離($98000 \text{m/s}^2 (=10000 \text{G})$ 、4 、10分間)して固定化酵素を得た。

【 0 3 5 1 】

上記固定化酵素を0.1 mol/Lリン酸バッファー(pH 7.0)48質量部に懸濁し、(R)-3-ヒドロキシ-5-(4-ビニルフェニル)バレリルCoA(Eur. J. Biochem., 250, 432-439(1997)(前記・非特許文献17)に記載の方法で調製)1質量部、ポリエチレングリコール200(P E G 200:平均分子量190-210; キシダ化学)1質量部、ウシ血清アルブミン(Sigma社製)0.1質量部を添加し、30 で2時間緩やかに振盪した。
10

【 0 3 5 2 】

上記反応液10 μlをスライドグラス上に採取し、1%ナイルブルーA水溶液10 μlを添加し、スライドグラス上で混合した後、カバーグラスを載せ、蛍光顕微鏡(330~380nm励起フィルタ、420nmロングパス吸収フィルタ、(株)ニコン製)観察を行った。その結果、磁性体 1 粒子表面が蛍光を発していることが確認された。従って、該磁性体 1 粒子は P H A により表面を被覆されていることがわかった。これを磁性カプセル構造体13とした。

【 0 3 5 3 】

対照として、0.1 mol/Lリン酸バッファー(pH 7.0)49質量部に磁性体 1 粒子 1 質量部を添加し、30 で2.5時間緩やかに振盪した後、同様にナイルブルーAで染色して蛍光顕微鏡観察を行った。その結果、磁性体 1 粒子表面は全く蛍光を発しなかった。
20

【 0 3 5 4 】

さらに、試料の一部を遠心分離($98000 \text{m/s}^2 (=10000 \text{G})$ 、4 、10分間)により回収し、真空乾燥したのち、クロロホルムに懸濁し、60 で20時間攪拌して外被を成すP H Aを抽出した。この抽出液について¹H-NMR分析を行った(使用機器: FT-NMR: Bruker DP X 400、測定核種:¹H、使用溶媒:重クロロホルム(TMS入り))。その結果、該P H Aは(R)-3-ヒドロキシ-5-(4-ビニルフェニル)吉草酸ユニットからなるP H Aであることが確認された。また、(R)-3-ヒドロキシ-5-(4-ビニルフェニル)吉草酸ユニットに由来するピーク以外に、3.5-3.8ppm、及び4.2ppm付近にPEGに由来するピークが確認された。
30

【 0 3 5 5 】

さらに、該P H Aの分子量をゲルパーミエーションクロマトグラフィー(GPC; 東ソーHLC-8020、カラム; ポリマーラボラトリーポジカルMIXED-C(5 μm)、溶媒; クロロホルム、カラム温度; 40 、ポリスチレン換算)により評価した結果、Mn = 7,700、Mw = 14,000であり、分子量低下効果が得られた。

【 0 3 5 6 】

(実施例18) 積層構造体の作製

縦30mm × 横30mm × 厚さ3mmのフェライトシート(NP-S01、日本ペイント(株)製、フェライト粒子の樹脂分散体)を1%グルタルアルデヒドに1時間浸漬し、純水洗浄後、p Y N 2 - C 1 組換え株由来のP H A合成酵素溶液(10 U / m l)に30 で30分間浸漬して、該酵素を固定化した。未反応のP H A合成酵素をP B Sで洗浄して除去し、固定化酵素を得た。
40

【 0 3 5 7 】

30mmol/L(R)-3-ヒドロキシ-5-(4-メチルチオ(フェノキシ))バレリルCoA(Eur. J. Biochem., 250, 432-439(1997)(前記・非特許文献17)に記載の方法で調製)、0.1%ウシ血清アルブミン(Sigma社製)を含む0.1mol/Lリン酸バッファー(pH 7.0)に上記固定化酵素を浸漬し、30 で2時間緩やかに振盪した。反応終了後、0.1mol/Lリン酸バッファー(pH 7.0)で洗浄して、未反応物等を除去した。

【 0 3 5 8 】

反応後のガラスシートを1%ナイルブルーA水溶液で染色し、蛍光顕微鏡(330~380nm励
50

起フィルタ、420nmロングパス吸収フィルタ、(株)ニコン製)観察を行った。その結果、フェライトシートの表面に蛍光が認められることから、該シートはフェライトシートからなる基材がP H A からなる膜で被覆された積層構造体であることがわかった。

【0359】

さらに、試料の一部を遠心分離($98000\text{m/s}^2 (=10000\text{G})$ 、4 、10分間)により回収し、真空乾燥したのち、クロロホルムに懸濁し、60 で20時間攪拌して外被を成すP H A を抽出した。この抽出液について¹H-N M R 分析を行った(使用機器:F T -N M R :B ruker D P X 400、測定核種:¹H、使用溶媒:重クロロホルム(T M S入り))。その結果、当該P H A は3-ヒドロキシ-5-(4-メチルチオ(フェノキシ))吉草酸をモノマーユニットとするP H A であることが確認された。10

【0360】

(実施例19)カプセル構造体の被覆性評価

磁性体微粒子が完全にポリマーで保護被覆されているかどうかを確認するため、得られた磁性カプセル構造体1~13、それぞれ、0.1gを、70 に加熱した純水100ミリリットル中に2時間浸漬した後、溶出液中の金属含有率を測定したところ、金属含有率は全ての磁性カプセル構造体において3ppm以下であった。これより、これらの磁性カプセル構造体は「金属イオンを溶出しない」と判定することができる。

【0361】

(実施例20)カプセル構造体の磁性体の分散性評価

磁性体の磁性カプセル構造体における分散状態を確認するため、得られた磁性カプセル構造体1~13、それぞれを、酢酸ウラニルで染色した後、透過型電子顕微鏡により磁性カプセル構造体における磁性体の分散状態を観察したところ、粒子内部に均一に分散しており、粒子表面近傍の一部、または表面近傍の全部への局在化は観察されなかった。20

【0362】

(実施例21)カプセルトナーの製造1

まず、コアとして、下記の方法で重合体微粒子を製造した。イオン交換水710質量部に0.1 mol/L Na₃P O₄水溶液450質量部を投入し、60 に加温した後、T K式ホモミキサー(特殊機化工(株)製)を用いて、12,000 rpmにて攪拌した。これに1.0mol/L CaCl₂水溶液68質量部を徐々に添加し、Ca₃(PO₄)₂を含む水系媒体を得た。次に、スチレンモノマー-1 65質量部、n-ブチルアクリレート35質量部、銅フタロシアニン顔料12質量部、不飽和ポリエステル(フマル酸-プロピレンオキサイド変性ビスフェノールA)10質量部、エステルワックス60質量部。これに重合開始剤2,2'-アゾビス(2,4-ジメチルバレオニトリル)10質量部を溶解し、重合性单量体組成物を調製し、これを60 に加温し、T K式ホモミキサー(特殊機化工(株)製)を用いて、12,000 rpmで均一に溶解、分散した。前記水系媒体中に上記重合性单量体組成物を投入し、60 , N 2 雰囲気下においてT K式ホモミキサーにて10,000 rpmで10分間攪拌し造粒した。その後、パドル攪拌翼で攪拌しつつ、80 に昇温し、10時間反応させた。重合反応終了後、該重合体の懸濁液を冷却し、3.6質量部のNa₂CO₃を添加してpH 11とした。次いで、スチレンモノマー-82質量部、n-ブチルアクリレート12質量部、不飽和ポリエステル(フマル酸-プロピレンオキサイド変性ビスフェノールA)0.05質量部からなる重合性单量体系に重合開始剤として過硫酸カリウム0.3質量部を添加溶解させた溶液を滴下したのち、80 に昇温し更に6 時間重合させた。次いで、これを常温まで冷却し、塩酸を加えてリン酸カルシウム溶解除去させたのち、ろ過、乾燥の各工程を経てトナーのコア成分微粒子を得た。30

【0363】

p Y N 2 - C 1 組換え株由来のP H A 合成酵素溶液(10 U / m l)100質量部に対し、上記微粒子10質量部、P B S 390質量部を添加し、30 にて30分間緩やかに振とうしてP H A 合成酵素を該微粒子表面に吸着させた。これを遠心分離($98000\text{m/s}^2 (=10000\text{G})$ 、4 、10分間)し、沈殿をP B S 溶液に懸濁し、再度遠心分離($98000\text{m/s}^2 (=10000\text{G})$ 、4 、10分間)して固定化酵素を得た。40

【0364】

10

20

30

40

50

上記固定化酵素10質量部を0.1mol/Lリン酸バッファー(pH 7.0)480質量部に懸濁し、(R)-3-ヒドロキシ-5-フェニルスルファニルバレリルCoA(Eur. J. Biochem., 250, 432-439(1997)(前記・非特許文献17)に記載の方法で調製)10質量部、ウシ血清アルブミン(Sigma社製)1質量部を添加し、30℃で2時間緩やかに振盪した。

【0365】

反応終了後、98000m/s²(=10000G)で10分間遠心分離し、沈殿を0.1mol/Lリン酸バッファー(pH 7.0)1000質量部に懸濁し、再び遠心分離する操作を3回繰り返し、沈殿を回収した。ここから、ろ過、乾燥の各工程を経てカプセル構造体Aを得た。

【0366】

ここで、カプセル構造体Aの一部を遠心分離(98000m/s²(=10000G)、4℃、10分間)により回収し、真空乾燥したのち、クロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌して外被を成すPHAを抽出した。この抽出液について¹H-NMR分析を行った(使用機器:FT-NMR:Bruker DPX400、測定核種:¹H、使用溶媒:重クロロホルム(TMS入り))。その結果、当該PHAは3-ヒドロキシ-5-フェニルスルファニル吉草酸をモノマーユニットとするPHAであることが確認された。

【0367】

上記のカプセル構造体10質量部を、市販の過酸化水素水(三菱瓦斯化学(株)製、31%過酸化水素含有、JIS K 8230規格品)500質量部及び脱イオン水100質量部に添加し、なす形フラスコに移して、オイルバス上、100℃、3時間反応させた。反応終了後、室温まで冷却し、カプセル構造体を遠心分離(29400m/s²(=3000G)、4℃、30分間)した。分離した後、カプセル構造体を蒸留水に再懸濁し、再度遠心分離を行って、残余する過酸化水素水を洗浄した。更に、この洗浄操作を2回繰り返した。その後、真空乾燥することで、カプセル構造体Bを得た。

【0368】

ここで、カプセル構造体Bの一部を遠心分離(98000m/s²(=10000G)、4℃、10分間)により回収し、真空乾燥したのち、クロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌して外被を成すPHAを抽出した。この抽出液について¹H-NMR分析を行った(使用機器:FT-NMR:Bruker DPX400、測定核種:¹H、使用溶媒:重クロロホルム(TMS入り))。ここから計算した各側鎖ユニットのユニット%は、3-ヒドロキシ-5-フェニルスルホニル吉草酸61%、3-ヒドロキシ-5-フェニルスルフィニル吉草酸13%、3-ヒドロキシ-5-フェニルスルホニル吉草酸26%であった。

【0369】

得られたカプセル構造体AおよびBそれぞれについて、10質量部に対して、疎水性酸化チタン微粉末0.12質量部を外添し、カプセル構造体表面に酸化チタン微粉末を有するカプセルトナーAおよびBを得た。

【0370】

一方、対照として、前記コア成分微粒子10質量部に対して、疎水性酸化チタン微粉末0.12質量部を外添し、トナー表面に酸化チタン微粉末を有するトナーCを得た。

【0371】

それぞれのトナー6質量部に対して、アクリル樹脂で被覆したフェライトキャリア144質量部を混合して二成分現像剤とした。

【0372】

上記の現像剤を用いて、市販の複写機NP6000(キヤノン(株)製)にて23℃、60%RH環境下、画像を複写し、その画像耐久性、トナー飛散、かぶり等について評価した。その結果を表4に示す。カプセルトナーAおよびBを使用して調製した現像剤では、100,000枚の耐久においても画像濃度低下、トナー飛散、かぶり等の画像欠陥の発生は認められず良好な画質耐久性を示した。また、帯電性についてトリボ値を測定したところ、初期-33mC/kg、耐久後-31mC/kgと安定していた。さらに、定着に関しても問題は認められなかった。一方、トナーCを使用して調製した現像剤では、200枚の耐久においても画像濃度低下、トナー飛散、かぶり等の画像欠陥の発生が認められ、オリジナル原稿に忠実な高精細

10

20

30

40

50

な画質は得られなかった。また、トリボ値を測定したところ、初期-24 mC/kg、耐久後-18 mC/kgと不均一で、安定のない帶電性を示していた。さらに、定着性試験においては、耐高温オフセット性に劣るものであった。

【0373】

【表4】

表4

	製造性	画像濃度	画質	帯電性	定着性
カプセルトナーA	○	○	○	○	○
カプセルトナーB	○	○	○	○	○
トナーC	○	△	△	△	△

10

【0374】

備考 表中の記号； ○：良好、 △：やや不良、 ×：不良。

【0375】

また、カプセルトナーAおよびBの低温定着性の評価を行うために、N P 6000と同じ定着器構成を有する外部定着器による定着試験を行った。定着試験の方法としては、幅2cm、長さ10cmの短冊を作り、その上の未定着画像を、外部定着器の上部ローラーの温度をモニターしながら短冊の長さ方向にそってローラーを通過させることによって定着させ、得られた定着画像について、短冊の後部にオフセットが見られるか否かで定着性を判断した。その結果、カプセルトナーA、トナーBともに定着開始温度が95と低く、低温定着性に優れることがわかった。

20

【0376】

さらに、カプセルトナーAおよびトナーBの耐ブロッキング性の評価を行うために、50~70まで1おきに設定した温度下に、上記トナーをそれぞれ3日間放置した後の凝集性を観察し、各トナーを前述同様に現像化して画像評価を行った。そして、ハイライト領域のガサツキ具合の変化する点を耐ブロッキング温度とした。その結果、カプセルトナーBの耐ブロッキング温度は68、カプセルトナーAの耐ブロッキング温度は57と、カプセルトナーBは耐ブロッキング性においてより優れることがわかった。

30

【0377】

以上から、ガラス転移温度の低いP H Aによってトナーをカプセル化することで低温定着性を実現することができ、さらにガラス転移温度の低いP H Aで被覆されたカプセルをガラス転移温度の高いP H Aで被覆すること(この場合、酸化反応により表面のP H Aの分子構造を変換すること)で、低温定着性と耐ブロッキング性を同時に実現できることがわかった。

【0378】

(実施例22) カプセルトナーの製造 2

3リットルの四つ口セパラブルフラスコに、還流冷却管、温度計、窒素導入管、攪拌機を取り付け、このフラスコ中に、イオン交換水1200部、ポリビニルアルコール15部、ドデシル硫酸ナトリウム0.1部、スチレンモノマー75部、アクリル酸-n-ブチル25部、ジ-tert-ブチルサリチル酸クロム錯塩5部、銅フタロシアニン5部、2,2-アゾビス(2,4-ジメチルバレノトリル)6部からなる混合物を投入し、高速攪拌装置T K - ホモミキサーで10,000 rpm、10分間攪拌して造粒した後、回転数を1,000 rpmに減速し、窒素ガスによるバーリングを十分に行った。次に、攪拌装置を三日月形状の攪拌羽根に変更し、緩やかな攪拌と共に、80に加熱したオイルバス中で16時間重合した。

40

【0379】

重合反応終了後、反応容器を室温まで冷却した後、分散液を5回のデカンテーションにより洗浄し、濾過、水洗、乾燥して青色の粉体であるコア粒子を得た。前記コア粒子に実施例21と同様の方法でp Y N 2 - C 1組換え株由来のP H A合成酵素を固定化し固定化酵素を

50

得た。

【 0 3 8 0 】

上記固定化酵素10質量部を0.1mol/Lリン酸バッファー(pH 7.0)480質量部に懸濁し、(R)-3-ヒドロキシ-5-フェニルバレリルCoA(Eur. J. Biochem., 250, 432-439(1997)) (前記・非特許文献17)に記載の方法で調製)8質量部、(R)-3-ヒドロキシ-5-(4-ビニルフェニル)バレリルCoA(Eur. J. Biochem., 250, 432-439(1997)) (前記・非特許文献17)に記載の方法で調製)2質量部、ウシ血清アルブミン(Sigma社製)1質量部を添加し、30で2時間緩やかに振盪した。

【 0 3 8 1 】

反応終了後、上記反応液を遠心分離(98000m/s²(=10000G)、4、10分間)してカプセル構造体を回収し、精製水100質量部に懸濁する操作を3回繰返し、沈殿を回収し、カプセル構造体Cとした。

【 0 3 8 2 】

カプセル構造体Cの10質量部を四つ口丸底フラスコに加え、蒸留水60質量部を加えて攪拌した。フラスコ内を40に加温し、これに過酢酸30%のヘキサン溶液10質量部を連続的に滴下し、攪拌下40で5時間反応させた。反応はカプセル構造体同士が凝集することなく進行した。反応終了後、室温まで冷却し、反応液をろ過することで、カプセル構造体を回収した。この回収したカプセル構造体は蒸留水に再懸濁した後、遠心分離(29400m/s²(=3000G)、4、30分間)した。分離した後、カプセル構造体を蒸留水に再懸濁し、再度遠心分離を行って洗浄した。更に、この洗浄操作を3回繰り返した。その後、真空乾燥することで、所望するカプセル構造体Dを得た。

【 0 3 8 3 】

ここで、試料の一部を遠心分離(98000m/s²(=10000G)、4、10分間)により回収し、真空乾燥したのち、クロロホルムに懸濁し、60で20時間攪拌して外被を成すPHAを抽出した。この抽出液について¹H-NMR分析を行った(使用機器: FT-NMR: Bruker DPX 400、測定核種:¹H、使用溶媒:重クロロホルム(TMS入り))。ここから計算した各側鎖ユニットのユニット%は、3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸86%、3-ヒドロキシ-5-(4-ビニルフェニル)吉草酸10%、3-ヒドロキシ-5-(4-エポキシフェニル)吉草酸4%であった。

【 0 3 8 4 】

カプセル構造体D 10質量部に対し、解碎処理したBET値360m²/gの疎水性シリカ0.2質量部をヘンシェルミキサーで混合し、外添してカプセルトナーDとした。

【 0 3 8 5 】

さらに、前記カプセル構造体D 10質量部を精製水に懸濁し、架橋剤としてヘキサメチレンジアミン5質量部を溶解させた。溶解を確認後、凍結乾燥により水を除去し、70で12時間反応させた。反応終了後、98000m/s²(=10000G)で10分間遠心分離し、沈殿を0.1mol/Lリン酸バッファー(pH 7.0)1000質量部に懸濁し、再び遠心分離する操作を3回繰り返し、沈殿を回収した。ここから、ろ過、乾燥の各工程を経て青色のカプセル構造体Eを得た。カプセル構造体E 10質量部に対し、解碎処理したBET値360 m²/gの疎水性シリカ0.2質量部をヘンシェルミキサーで混合し、外添してカプセルトナーEとした。

【 0 3 8 6 】

作製したトナーの画像評価を行うため、上記で得たトナー6部に対して、平均粒径が35μmのフェライトコアにシリコーン樹脂をコートしたキャリア94部をポリ瓶に入れ、ターブラーミキサーで混合攪拌して二成分現像剤を作製した。そして、この現像剤をカラーレーザー複写機CLC-500(キヤノン(株)製)改造機に搭載し、23, 60%RH環境下、初期及び1万枚複写後の画像についてSEMで観察し、画質の評価及び現像剤の劣化状態の評価を行った。

【 0 3 8 7 】

画質の評価としては、1画素内でのレーザーのパルス幅変調(PWM)による多値記録により、極小スポットの再現性を顕微鏡観察により評価した。また、1万枚複写後の現像剤を

10

20

30

40

50

走査電子顕微鏡で観察した。

【0388】

また、トナーの耐ブロッキング性の評価を行うために、各種温度条件下に、上記で得たトナーを3日間放置した後の凝集性を観察し、各トナー組成物を前述のキャリアを用いて同様に現像化して画像評価を行った。

【0389】

また、定着性の評価としては、CLC-500と同じ定着器構成を有する外部定着器による定着試験を行った。定着試験の方法としては、幅2cm、長さ10cmの短冊を作り、その上の未定着画像を、外部定着器の上部ローラーの温度をモニターしながら短冊の長さ方向にそつてローラーを通過させることによって定着させ、得られた定着画像について、短冊の後部にオフセットが見られるか否かで定着性を判断した。10

【0390】

さらに、前記カプセル構造体の代わりに、前記コア粒子をカプセル化せずにそのまま用いたトナーFを使用して、前記と同様の評価を行った。その結果を表5に示す。

【0391】

【表5】

表5

	画質	耐ブロッキング性	定着性
カプセルトナーD	◎	○	◎
カプセルトナーE	◎	◎	◎
トナーF	○	○	△

【0392】

備考 表中の記号； ◎：非常に良好、 ○：良好、 △：やや不良、 ×：不良

(ただし、上記の ◎、 ○、 × は、前記実施例21における ◎、 ○、 × とは対応しない)。

【0393】

(実施例23) カプセルトナーの製造 3

実施例14と同様の方法でコア粒子を製造し、pYN2-C1組換え株由来のPHA合成酵素を固定化し固定化酵素を得た。この固定化酵素10質量部を0.1mol/Lリン酸バッファー(pH 7.0)480質量部に懸濁し、(R)-3-ヒドロキシ-5-フェニルバレリルCoA(実施例22と同様の方法で調製)8質量部、(R)-3-ヒドロキシ-5-(4-ビニルフェニル)バレリルCoA(実施例14と同様の方法で調製)2質量部、ウシ血清アルブミン(Sigma社製)1質量部を添加し、30℃で2時間緩やかに振盪した。30

【0394】

反応終了後、上記反応液を遠心分離(98000m/s²(=10000G)、4℃、10分間)してカプセル構造体を回収し、精製水100質量部に懸濁する操作を3回繰返し、沈殿を回収し、カプセル構造体Fとした。

【0395】

カプセル構造体Fの10質量部を四つ口丸底フラスコに加え、蒸留水60質量部を加えて攪拌した。フラスコ内を40℃に加温し、これに過酢酸30%のヘキサン溶液10質量部を連続的に滴下し、攪拌下40℃で5時間反応させた。反応はカプセル構造体同士が凝集することなく進行した。反応終了後、室温まで冷却し、反応液をろ過することで、カプセル構造体を回収した。この回収したカプセル構造体は蒸留水に再懸濁した後、遠心分離(29400m/s²(=3000G)、4℃、30分間)した。分離した後、カプセル構造体を蒸留水に再懸濁し、再度遠心分離を行って洗浄した。更に、この洗浄操作を3回繰り返した。その後、真空乾燥することで、所望するカプセル構造体Gを得た。40

【0396】

ここで、試料の一部を遠心分離(98000m/s²(=10000G)、4℃、10分間)により回収し、真50

空乾燥したのち、クロロホルムに懸濁し、60°で20時間攪拌して外被を成すP H Aを抽出した。この抽出液について¹H-N M R分析を行った(使用機器:F T - N M R:Bruker D P X 400、測定核種:¹H、使用溶媒:重クロロホルム(T M S入り))。ここから計算した各側鎖ユニットのユニット%は、3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸85%、3-ヒドロキシ-5-(4-ビニルフェニル)吉草酸10%、3-ヒドロキシ-5-(4-エポキシフェニル)吉草酸5%であった。

【0397】

カプセル構造体G 10質量部に対し、解碎処理したB E T値360m²/gの疎水性シリカ0.2質量部をヘンシェルミキサーで混合し、外添してカプセルトナーGとした。

【0398】

さらに、カプセル構造体G 10質量部に末端アミノ変性ポリシロキサン(変性シリコーンオイルT S F 4700、G E 東芝シリコーン(株)製)100質量部を添加し、70°で2時間反応させた。これをメタノールに懸濁し、遠心分離(98000m/s²(=10000 G)、4、20分間)する操作を繰り返すことにより洗浄し乾燥することで、ポリシロキサンのグラフト鎖を有する青色のカプセル構造体Hを得た。カプセル構造体H 10質量部に対し、解碎処理したB E T値360m²/gの疎水性シリカ0.2質量部をヘンシェルミキサーで混合し、外添してカプセルトナーHとした。

【0399】

前記トナーは、実施例22と同様の方法で画質の評価及び現像剤の劣化状態の評価を行った。

【0400】

また、前記カプセル構造体の代わりに、前記コア粒子をカプセル化せずにそのまま用いたトナーIを使用して、前記と同様の評価を行った。その結果を表6に示す。

【0401】

【表6】

表6

	画質	耐プロッキング性	定着性
カプセルトナーG	◎	○	◎
カプセルトナーH	◎	○	◎
トナーI	○	○	△

【0402】

備考 表中の記号; ◎:非常に良好、○:良好、△:やや不良、×:不良

(ただし、上記の◎、○、×は、前記実施例21における◎、○、×とは対応しない。)

【0403】

【発明の効果】

本発明における構造体は、磁性体の分散性および磁気応答性に優れ、金属イオンが外部に溶出されにくく、更に生体適合性に優れるため、種々の用途・分野に幅広く適用することが可能である。

【0404】

また、本発明における製造方法は、基材を被覆したカプセル構造体や積層構造体を、極めて簡便かつ環境低負荷なプロセスで製造することが可能である。

【0405】

【配列表】

10

20

30

40

SEQUENCE LISTING

<210> 1

<211> 1501

<212> DNA

<213> Pseudomonas jessenii 161 strain.

<400> 1

tgaacgctgg cggcaggcct aacacatgca agtcgagcgg atgacgggag ctgccttg	60	10
aattcagcgg cggacgggtg agtaatgcct aggaatctgc ctggtagtgg gggacaacgt	120	
ctcgaaaggg acgctaatac cgcatacgtc ctacggaga aagcagggga ccttcggcc	180	
ttgcgtatc agatgagcct aggtcggatt agctagttgg tgaggtaatg gtcacccaag	240	
gcgacgatcc gtaactggtc tgagaggatg atcagtacaca ctggaactiga gacacggtcc	300	
agactcciac gggaggcagc agtggggaa attggacaat gggcgaaagc ctgtatccagc	360	
catgccgcgt gtgtgaagaa ggtcttcgga ttgtaaagca cttaagtgg ggaggaaggg	420	
cattaaccta atacgttagt gttttagt taccgacaga ataagcacccg gctaactctg	480	20
tgccagcagc cgccgtataa cagaggggtgc aagcgtaat cgaaattact gggcgtaaag	540	
cgcgcgtagg tggtttgtt aagtggatgt gaaagccccg ggctcaacct gggactgca	600	
ttcaaaactg acaagctaga gtatggtaga gggtggtgg attttctgtg tagcggtagaa	660	
atgcgttagat ataggaagga acaccagtgg cgaaggcgac cacctggact gatactgaca	720	
ctgaggtgcg aaagcgtggg gagcaaacag gattagatac cctggtagtc cacgccgtaa	780	
acgatgtcaa ctgcgttg ggagccttga gctcttagtgc ggcgcgtttaa cgcatatagt	840	
tgaccgcctg gggagtacgg ccgcgttttaaaactcaaa tgaatttgcg gggcccgca	900	30
caagcggtgg agcatgttgt ttaattcgaa gcaacgcgaa gaaccttacc aggcccttgc	960	
atccaatgaa ctttccagag atggatgggt gccttcggga acattgagac aggtgtgtca	1020	
tggctgttgt cagcttgtgt cgtgagatgt tgggttaagt cccgttaacga ggcgcgttgc	1080	
tgtcccttagt taccagcacg taatggtggg cactctaagg agactgcccgg tgacaaaccg	1140	
gaggaagggtg gggatgacgt caagtcata tggcccttac ggcctgggtt acacacgtgc	1200	
tacaatggtc ggtacagagg gttgccaagc cgccgtgg agctaatccc acaaaaccga	1260	
tctgtatccg gatgcgttgtc tgcaactcgatctgcgttgaa tcgaaatcgatgtatcgat	1320	
aatcagaat gtcgcgttgaa atacgttccc gggcccttgcacacccgttgcacaccat	1380	40

gggagtggtt tgcaccagaa gtagctatc taacccttcgg gaggacggtt accacggtgt 1440
gattcatgac tgggttgaag tcgtaccaag gtagccgtag gggAACCTGC ggctggatca 1500
c 1501
<210> 2
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence 10
<400> 2
tgcttggaaact gatccagtac 20
<210> 3
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence 20
<400> 3
gggtttaggaa tgctctggat gtg 23
<210> 4
<211> 1680
<212> DNA
<213> Pseudomonas cichorii YN2 ; FERM P-17411
<400> 4
atgagtaaca agagtaacga tgagtttgaag tatcaaggct ctgaaaacac 50 30
cttggggctt aatccctgtcg ttgggtcg tggaaaggat ctactggctt 100
ctgctcgaat ggtgcctttagg caggccatca agcaaccggc gcacagcgtc 150
aaacatgtcg cgcactttgg tcttgaactc aagaacgtac tgctggtaa 200
atccgggctg caaccgacca gcgatgaccg tcgcctcgcc gatccggcct 250
ggagccagaaa cccgccttat aaacgttatt tgcaaaccata cctggcggtgg 300
cgcaaggaac tccacgactg gatcgatgaa agtaaccctcg cccccaaagga 350
tgtggcgctt gggcacttcg tgcgttacct catgaccgaa gccatggcgc 400
cgaccaacac cgccggcaac ccggcgccag tcaaacgctt ttgcgaaacc 450 40

ggtggcaaaa gcctgctcg cggcctctcg caccggcca aggatcttgt	500
acacaacggc ggcattgccga gccaggtaa catgggtgca ttcgaggtcg	550
gcaagagcc tggcgigacc gaaggcgccg tggtgtttcg caacgatgtg	600
ctggaactga tccagtaaca gccgaccacc gagcaggtat acgaacgccc	650
gctgctggtg gtgcgcgcg agatcaacaa gttcacgtt ttgcacctga	700
gccccggacaa gagccctggcg cggttctgcc tgcccaacaa cgtgcaaacg	750
ttcatcgta gctggcgaaa tcccaccaag gaacagcgag agtggggct	800
gtcgacctac atcgaagccc tcaaggaagc ggtttagtgc gttaccgcga	850
tcaccggcag caaagacgtg aacatgctcg ggcctgttc cggcggcattc	900
acttgcacccg cgctgctggg ccattacgcg gcgattggcg aaaacaaggt	950
caacgcctg accttgcgtt tgagcgtgct tgataccacc ctgcacagcg	1000
atgttgcctt gttcgtaat gaacagaccc ttgaagccgc caagcgccac	1050
tcttaccagg ccggcgtact ggaaggccgc gacatggcga aggtcttcgc	1100
ctggatgcgc cccaaacgatc tgatctggaa ctactgggtc aacaattacc	1150
tgcctaggcaa cgaaccgcgc ggtttcgaca tcctgttctg gaacaacgac	1200
accacacggt tgccgcggc gttccacggc gaccgtatcg aactgttcaa	1250
aaataaccca ctgatcgcc cgaatgcact ggaagtgtgc ggcacccca	1300
tgcacctcaa gcaggtgacg gccgacatct ttccctggc cggcaccaac	1350
gaccacatca cccctggaa gtcctgtac aagtggcgc aactgttgg	1400
cggcaacgtt gaattcgtgc tgtcgagcag cggccatatc cagagcatcc	1450
tgaacccgccc gggcaatccg aaatcgctt acatgaccag caccgaagtg	1500
gcggaaaatg ccgatgaatg gcaaggaaat gcccaccaagc ataccgattc	1550
ctgggtggctt cactggcagg cctggcaggc ccaacgctcg ggcgagctga	1600
aaaagttcccc gacaaaactg ggcaggcaagg cgtatccggc aggtgaagcg	1650
gcccaggca cgtacgtgca cgaacggtaa	1680
<210> 5	
<211> 1683	
<212> DNA	40
<213> Pseudomonas cichorii YN2 ; FERM P-17411	

<400> 5

atgcgcgata aacctgcgag ggagtcacta cccaccccg ccaagttcat	50
caacgcacaa agtgcgatta ccggcctgcg tggccggat ctggttcga	100
cttgcgcag tgtcccccc catggcctgc gccacccgt gcacaccgcg	150
cgacacgcct tgaaactggg tggtaacttg ggacgcgtgt tgctggcga	200
caccctgcat cccaccaacc cgcaagaccc tcgcattcgac gatccggcgt	250
ggaggctcaa tccctttat cgtcgccagcc tgcaggcgta cctgagctgg	300
cagaaggcagg tcaagagctg gatcgacgaa agcaacatga gcccggatga	350
ccgcgcggcgt ggcgcattcg ctttcgcctt gctcaacgtat gccgtgtcgc	400
cgtccaacag cctgcataat ccgcgtggcga tcaaggaaat ctcaactcc	450
ggcggcaaca gcctggcgcg cgggatcggc catcggcgt atgaccttt	500
gcacaacgt ggcttgcggc ggcaagtcac caggcatgca ttgcagggttg	550
gcaagaccgt cgccaccacc accggcgccg tgggtttcg caacgagctg	600
ctggagctga tccaaataaa gccgatgagc gaaaaggagt attccaaacc	650
gctgctggtg gtgccgcac agatcaacaa gtactacatt ttigacctca	700
gccccataaa cagcttcgtc cagttcgccgc tcaagaacgg cctgcaaacc	750
ttcgtcatca gctggcgcaa tccggatgta cgtcacccgcg aatggggct	800
gtcgacctac gtcgaagcgg tggaaagaagc catgaatgtc tgccggcaa	850
tcacggcgcg ggcgcgaggc aaccgtatgg ggcgcgtgcg tggcggctg	900
accattgctg ccctgcaggg ccacttgcaa gccaaaggcgcg acgtgcgcgg	950
cgtctccagc ggcacgtacc tggtgagcct gctgcacagc caactggaca	1000
gccccggccac actcttcgccc gacgaacaga ccctggaggc ggccaagcgc	1050
cgtctccatcc agaaagggtgt gctggaaaggc cgacatgg ccaaggttt	1100
cgcctggatg cgccccaaacg atttgatctg gagctacttc gtcaacaatt	1150
acctgtatgg caaggagccg ccggcggtcg acatctcta ctggaaacaat	1200
gacaacacac gcctgcccgc cgccctgcat ggtgacttgc tggacttctt	1250
caagcacaac ccgcgtgagcc atccgggtgg cctggaaagtg tgccggcaccc	1300
cgtatcgactt gcaaaaaggc accgtcgaca gttcagcgt ggccggcatc	1350
aacgatcaca tcacgccgtg ggacgcggtg tatgcgtcaa ccctgttgct	1400

cggtggcgag cgtcgcttg tcctggccaa cagcggtcat gtgcagagca 1450
ttctcaaccc gcccgaacaat ccgaaagcca actacctcga aggtgcaaaa 1500
ctaaggcagcg accccagggc ctggtaactac gacgccaaagc ccgtcgacgg 1550
tagctggtgg acgcaatggc tgggctggat tcaggagcgc tcgggcgcgc 1600
aaaaagaaaac ccacaatggcc ctggcaatc agaattatcc accgatggag 1650
gcggcgccccg ggacttacgt gcgcgtgcgc tga 1683

〈210〉 6

10

〈211〉 29

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Primer for PCR multiplication

〈400〉 6

ggaccaagct tctcgctca gggcaatgg 29

20

〈210〉 7

〈211〉 29

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Primer for PCR multiplication

〈400〉 7

30

cgagcaagct tgctccata ggtgaaggc 29

〈210〉 8

〈211〉 29

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Primer for PCR multiplication

〈400〉 8

40

gtattaagct tgaagacgaa ggagtgttg 29
<210> 9
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Primer for PCR multiplication 10
<400> 9
catccaagct tcttatgatc gggtcatgcc 30
<210> 10
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220> 20
<223> Primer for PCR multiplication
<400> 10
cgggatccag taacaagagt aacgatgagt 30
<210> 11
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence 30
<220>
<223> Primer for PCR multiplication
<400> 11
cgatctcgag ttaccgttcg tgcacgtacg 30
<210> 12
<211> 30
<212> DNA 40
<213> Artificial Sequence

⟨220⟩

⟨223⟩ Primer for PCR multiplication

⟨400⟩ 12

cgggatcccg cgataaacct gcgagggagt 30

⟨210⟩ 13

⟨211⟩ 30

⟨212⟩ DNA

10

⟨213⟩ Artificial Sequence

⟨220⟩

⟨223⟩ Primer for PCR multiplication

⟨400⟩ 13

cgatctcgag ggcgcacgcgc acgttaagtcc 30

 フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
C 0 8 K	9/04	(2006.01) C 0 8 G 63/688
C 1 2 P	21/02	(2006.01) C 0 8 K 9/04
G 0 3 G	9/087	(2006.01) C 1 2 P 21/02 C
C 1 2 N	11/08	(2006.01) G 0 3 G 9/08 3 8 1
C 1 2 N	15/09	(2006.01) C 1 2 N 11/08 H
C 1 2 P	7/62	(2006.01) C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 R	1/01	(2006.01) C 1 2 P 7/62
C 1 2 R	1/38	(2006.01) C 1 2 R 1:01
C 1 2 R	1/40	(2006.01) C 1 2 R 1:38
		C 1 2 R 1:40

(72)発明者 古崎 真也

東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内

(72)発明者 野本 賀

東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内

(72)発明者 今村 剛士

東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内

審査官 阪野 誠司

(56)参考文献 特開2003-011312(JP,A)
 特開2003-015359(JP,A)
 特開2004-335622(JP,A)
 特開2004-238601(JP,A)
 特開2004-143288(JP,A)
 特開2002-142791(JP,A)
 特開2003-089720(JP,A)
 特開2003-034716(JP,A)
 特開2003-034717(JP,A)
 特開2003-012778(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

H01F 1/00

C08G 63/00

C08K 9/00

G03G 9/00