

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2014年5月30日(30.05.2014)



(10) 国際公開番号
WO 2014/080687 A1

- (51) 国際特許分類:
C12P 7/18 (2006.01) C12N 1/21 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/075513
- (22) 国際出願日: 2013年9月20日(20.09.2013)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2012-257882 2012年11月26日(26.11.2012) JP
- (71) 出願人: 昭和電工株式会社(SHOWA DENKO K.K.)
[JP/JP]; 〒1058518 東京都港区芝大門1丁目13番9号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 青木 裕史(AOKI, Hirobumi); 〒1058518 東京都港区芝大門1丁目13番9号 昭和電工株式会社内 Tokyo (JP). 小木戸 謙(KOKIDO, Yuzuru); 〒1058518 東京都港区芝大門1丁目13番9号 昭和電工株式会社内 Tokyo (JP). 橋本陽子(HASHIMOTO, Yoko); 〒1058518 東京都港区芝大門1丁目13番9号 昭和電工株式会社内 Tokyo (JP). 米田 正(YONEDA, Tadashi); 〒1058518 東京都港区芝大門1丁目13番9号 昭和電工株式会社内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 伊東 忠重, 外(ITO, Tadashige et al.); 〒1000005 東京都千代田区丸の内二丁目1番1号
- 丸の内 M Y P L A Z A (明治安田生命ビル) 16階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第21条(3))
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))



WO 2014/080687 A1

(54) Title: 1,4-BUTANEDIOL MANUFACTURING METHOD AND MICROORGANISM

(54) 発明の名称: 1, 4-ブタンジオールの製造方法及び微生物

(57) Abstract: A method in which, using a microorganism and/or a culture thereof, an enzymatic reaction system using an acyl-CoA reductase is used to manufacture 1,4-butanediol by way of 3-hydroxybutyryl-CoA, crotonyl-CoA, and 4-hydroxybutyryl-CoA, in that order. Said method is characterized in that the reactivity of the acyl-CoA reductase with respect to 4-hydroxybutyryl-CoA is greater than or equal to 0.05 times the reactivity thereof with respect to 3-hydroxybutyryl-CoA.

(57) 要約: 微生物及び/又はその培養物を用いて、3-ヒドロキシブチリルCoA、クロトニルCoA、4-ヒドロキシブチリルCoAを順次経由して、アシルCoA還元酵素を用いた酵素反応系により1, 4-ブタンジオールを製造する方法であって、前記アシルCoA還元酵素の4-ヒドロキシブチリルCoAに対する反応性は、3-ヒドロキシブチリルCoAに対する反応性に対して0.05倍以上であることを特徴とする、1, 4-ブタンジオールの製造方法。

明 細 書

発明の名称： 1， 4－ブタンジオール¹の製造方法及び微生物

技術分野

[0001] 本発明は1， 4－ブタンジオール¹の製造方法及び微生物に関する。

背景技術

[0002] 近年、化石資源の枯渇や地球温暖化対策などの観点から、再生可能資源を原料とした化合物製造プロセスが注目されている。特に、バイオマスを原料として、生物化学的プロセスで種々のポリマー原料化合物や化学品原料化合物を製造する、所謂バイオリファイナリーが広く検討されている。

[0003] バイオマスへの原料転換が期待されている化合物として、1， 4－ブタンジオール¹が挙げられる。1， 4－ブタンジオール¹は、精密有機化学品の合成原料、ポリエステル及びエンジニアリングプラスチックのモノマー単位などで広く使用されており、その市場規模は大きい。そのため、バイオマスなどの再生可能資源を原料とした生物化学的プロセスで、効率良く1， 4－ブタンジオール¹を製造する方法に対する要求が大きくなっている。

[0004] 生物化学的プロセスを用いた1， 4－ブタンジオール¹の製造方法としては、例えば、特許文献1乃至2及び非特許文献1に記載された方法が挙げられる。

特許文献1：特許第4380704号明細書

特許文献2：国際公開2008/115840号公報

非特許文献1：Harry Yim et al., Metabolic engineering of Escherichia coli for direct production of 1,4-butanediol, Nature Chemical Biology, 7, 445-452 (2011).

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0005] しかしながら、特許文献 1 乃至 2 及び非特許文献 1 に記載された方法は、プロセスが複雑である。

[0006] 上記課題に対して、経済的に 1, 4-ブタンジオールを得ることができる、新規な 1, 4-ブタンジオールの製造方法を提供する。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明は以下のものを含む。

[1] 微生物及び／又はその培養物を用いて、3-ヒドロキシブチリルCoA、クロトニルCoA、4-ヒドロキシブチリルCoAを順次経由して、アシルCoA還元酵素を用いた酵素反応系により 1, 4-ブタンジオールを製造する方法であって、

前記アシルCoA還元酵素の4-ヒドロキシブチリルCoAに対する反応性は、3-ヒドロキシブチリルCoAに対する反応性に対して0.05倍以上であることを特徴とする、

1, 4-ブタンジオールの製造方法。

[0008] [2] 前記アシルCoA還元酵素は、アルデヒドデヒドロゲナーゼ（アシル化）（EC番号：1.2.1.10）である、

[1] に記載の 1, 4-ブタンジオールの製造方法。

[0009] [3] 前記微生物は、下記（a）～（c）のいずれかに記載の、前記アシルCoA還元酵素をコードする遺伝子を含む、[1] に記載の 1, 4-ブタンジオールの製造方法。

（a）配列番号6の塩基配列を有する遺伝子

（b）配列番号6の塩基配列において1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を有する遺伝子であって、配列番号6の塩基配列に対して90%以上の同一性の塩基配列を有する遺伝子

（c）配列番号6に記載の塩基配列を有する遺伝子と相補的な塩基配列を有する遺伝子とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする遺伝子

[0010] [4] 前記微生物は、大腸菌、酵母、コリネ型細菌、クロストリジウム属細菌である、

[1]に記載の1, 4-ブタンジオールの製造方法。

[0011] [5] 3-ヒドロキシブチリルC_oA、クロトニルC_oA、4-ヒドロキシブチリルC_oAを順次経由して、アシルC_oA還元酵素を用いた酵素反応系により1, 4-ブタンジオールを製造する微生物であって、

前記アシルC_oA還元酵素の4-ヒドロキシブチリルC_oAに対する反応性は、3-ヒドロキシブチリルC_oAに対する反応性に対して0.05倍以上であることを特徴とする、微生物。

[0012] [6] 前記微生物は、大腸菌、酵母、コリネ型細菌、クロストリジウム属細菌である、

[5]に記載の微生物。

発明の効果

[0013] 経済的な1, 4-ブタンジオールの製造方法を提供できる。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]本実施形態の1, 4-ブタンジオールの製造方法の酵素系の一例である。

発明を実施するための最良の形態

[0015] 以下、本発明を詳細に説明する。なお、本明細書において、「C_oA」とは、「コエンザイムA」を意味する。また、「%」は、特に記載のない限り、「質量%」を意味する。「ppm」は質量基準である。

[0016] 本実施形態では、微生物を用いて、アセトアセチルC_oA、3-ヒドロキシブチリルC_oA、クロトニルC_oA、4-ヒドロキシブチリルC_oAを順次経由して、1, 4-ブタンジオールを製造する酵素反応系を利用する。ここで、本発明の特徴の1つは、1, 4-ブタンジオールを選択的に、高い生産性で製造し得る微生物又はその培養物を用いる方法である。

[0017] 本発明者らは、上記課題を解決する手段を鋭意研究した結果、微生物を用いて酵素反応系により、3-ヒドロキシブチリルC_oAを基質（中間体、前駆体などであっても良い。）として、クロトニルC_oA、4-ヒドロキシブチリルC_oAを順次経由して、1, 4-ブタンジオールを製造する方法にお

いて、アシルC₀A還元酵素をコードする遺伝子を適切に選択することにより、より高い4-ヒドロキシブチリルC₀Aに対する反応選択性を有する1, 4-ブタンジオールの製造方法を提供できることを見出した。その結果、3-ヒドロキシブチリルC₀Aから1, 3-ブタンジオールへの生成が抑制され、1, 4-ブタンジオールの生産性が向上することがわかった。

[0018] また、本発明の好ましい実施形態において、アシルC₀A還元酵素をコードする遺伝子を適切に選択することにより、3-ヒドロキシブチリルC₀Aに対する反応性に対して、少なくとも0.05倍以上の4-ヒドロキシブチリルC₀Aに対する反応性を有する1, 4-ブタンジオールの製造方法を提供することができる。

[0019] 以下、本実施形態で使用される、微生物の特徴、微生物の作製方法、微生物の使用方法（即ち、1, 4-ブタンジオールの製造方法）及び製造された1, 4-ブタンジオールの取得方法などについて、説明する。

[0020] （宿主微生物）

本実施形態で使用される宿主微生物は、後述する種々の遺伝子を導入することができる宿主微生物であり、遺伝子組み換え技術を適用することができる宿主微生物であれば、特に限定されない。

[0021] より具体的には、3-ヒドロキシブチリルC₀Aを基質として、クロトニルC₀A、4-ヒドロキシブチリルC₀Aを順次経由して、後述する適切な培養条件下で、1, 4-ブタンジオールを生産することができる微生物に形質転換できるものである。

[0022] 産業上の利用の観点から、具体例としては、大腸菌、酵母、コリネ型細菌、クロストリジウム属細菌が挙げられる。酵母としては、サッカロマイセス・セレビシエ、シゾサッカロマイセス・ポンベ、クリベロマイセス・ラクティス、クリベロマイセス・マルキシアヌス等が挙げられる。コリネ型細菌としては、コリネバクテリウム・グルタミカム、コリネバクテリウム・エフィシエンス、ブレバクテリウム・ディバリカタム、ブレバクテリウム・サッカロリティカム、ブレバクテリウム・インマリオフィルム、ブレバク

テリウム・ラクトファーメンタム、ブレバクテリウム・ロゼウム、ブレバクテリウム・フラバム、ブレバクテリウム・チオゲニタリス、コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム、コリネバクテリウム・アセトグルタミカム、コリネバクテリウム・カルナエ、コリネバクテリウム・リリウム、コリネバクテリウム・メラセコーラ、ミクロバクテリウム・アンモニアフィラム等が挙げられる。クロストリジウム属細菌としては、クロストリジウム・クリベリ、クロストリジウム・アセトブチリカム、クロストリジウム・アミノブチリカム、クロストリジウム・ベイジェリンキー、クロストリジウム・サッカロパーブチルアセトニカムなどが挙げられる。これらの中でも、大腸菌、サッカロマイセス・セレピシエ、シゾサッカロマイセス・ポンベ、コリネバクテリウム・グルタミカムを使用することが、形質転換が容易であるため、好ましく、大腸菌を使用することが、より好ましい。

[0023] また、本実施形態における形質転換微生物は、微生物培養菌体そのもの又はその培養物の各種形態で使用されても良い。本実施形態における微生物の培養物は、具体的には、微生物培養菌体の培地・緩衝液等媒体による懸濁物、微生物培養菌体からの無細胞抽出液、さらにこの無細胞抽出液から当該反応を触媒する成分を濃縮・精製・抽出したもの等の処理物を含む。本実施形態における微生物の培養物は更に、前記の微生物の処理物を難溶性の担体に固定化したものを含む。このような固定化担体としては、ポリアクリルアミド、ポリビニルアルコール、ポリ-N-ビニルホルムアミド、ポリアリルアミン、ポリエチレンイミン、メチルセルロース、グルコマンナン、アルギン酸塩、カラギーナン等、更にこれらの共重合、架橋化物など、前述の微生物菌体もしくはその処理物を包含した水難溶性の固形分を形成するような化合物が挙げられる。これらは1種類を単独で使用しても良く、2種類以上を混合して使用しても良い。また、活性炭、多孔質セラミックス、グラスファイバー、多孔質ポリマー成形体、ニトロセルロース膜など、予め固形物として形成された物体上に微生物もしくはその抽出液・抽出成分を保持させたものも、微生物の培養物として用いることもできる。

[0024] (形質転換微生物)

本実施形態で使用される形質転換微生物は、宿主微生物が本来有する酵素系の他に、更に少なくとも、3-ヒドロキシブチリルC○Aを基質として、クロトニルC○A、4-ヒドロキシブチリルC○Aを順次経由して、1,4-ブタンジオールを生産することができる酵素反応系の各々の酵素系を有する。以下、各々の酵素系をコードする遺伝子について説明する。

[0025] [エノイルC○Aヒドラターゼをコードする遺伝子]

本実施形態で使用されるエノイルC○Aヒドラターゼをコードする遺伝子は、3-ヒドロキシブチリルC○Aを基質として脱水し、クロトニルC○Aを生成する反応を触媒する酵素をコードする遺伝子であれば、特に限定されない。

[0026] 本実施形態で使用される(S)-3-ヒドロキシブチリルC○AからクロトニルC○Aを生成する反応を触媒する酵素をコードする遺伝子の具体例としては、特に限定されないが、エノイルC○Aヒドラターゼ(EC番号: 4.2.1.17)をコードする遺伝子又はそのホモログが挙げられる。上記酵素の詳細については、Moskowitz, G. J. and Merrick, J. M. Metabolism of poly- β -hydroxybutyrate. II. Enzymatic synthesis of D-(-)- β -hydroxybutyryl coenzyme A by an enoyl hydratase from *Rhodospirillum rubrum*. Biochemistry 8 (1969) 2748-2755. の非特許文献などを参照することができる。

[0027] また、本実施形態で使用される(R)-3-ヒドロキシブチリルC○AからクロトニルC○Aを生成する反応を触媒する酵素をコードする遺伝子の具体例としては、特に限定されないが、エノイルC○Aヒドラターゼ(EC番号: 4.2.1.55 (3-ヒドロキシブチリルC○Aデヒドラターゼ)又はEC番号: 4.2.1.119)をコードする遺伝子又はそのホモログな

どが挙げられる。上記酵素の詳細については、Fukui, T., Shiomi, N. and Doi, Y. Expression and characterization of (R)-specific enoyl coenzyme A hydratase involved in polyhydroxyalkanoate biosynthesis by *Aeromonas caviae*. *J. Bacteriol.* 180 (1998) 667-673.、またはMetabolism of poly-beta-hydroxybutyrate. II. Enzymatic synthesis of D-(-)-beta hydroxybutyryl coenzyme A by an enoyl hydratase from *Rhodospirillum rubrum*. , Moskowitz GJ, Merrick JM. *Journal Biochemistry.* , 8 2748-2755 (1969). 等の非特許文献などを参照することができる。

[0028] [ビニルアセチルCoAデルタイソメラーゼをコードする遺伝子]

本実施形態において、ビニルアセチルCoAデルタイソメラーゼをコードする遺伝子は、クロトニルCoAのオレフィンを転位してビニルアセチルCoAを生成する反応を触媒する酵素をコードする遺伝子であれば、特に限定されない。

[0029] 上述した反応を触媒する酵素の具体例としては、限定されないが、ビニルアセチルCoAデルタイソメラーゼ (EC番号: 5. 3. 3. 3) 又はそのホモログなどが挙げられる。上記酵素の詳細については、例えば、Fermentation of 4-aminobutyrate by *Clostridium aminobutyricum*: cloning of two genes involved in the formation and dehydration of 4-hydroxybutyryl-CoA, *Archives of Microbiolog*

y, 174 (3) 189-199 (2000). などの非特許文献を参照することができる。

[0030] [4-ヒドロキシブチリルCoAデヒドラターゼをコードする遺伝子]

本実施形態において、4-ヒドロキシブチリルCoAデヒドラターゼをコードする遺伝子は、ビニルアセチルCoAを水和して4-ヒドロキシブチリルCoAを生成する反応を触媒する酵素をコードする遺伝子であれば、特に限定されない。

[0031] 上述した反応を触媒する酵素の具体例としては、限定されないが、4-ヒドロキシブチリルCoAデヒドラターゼ (EC番号: 4. 2. 1. 120) 又はそのホモログなどが挙げられる。上記酵素の詳細については、例えば、Fermentation of 4-aminobutyrate by *Clostridium aminobutyricum*: cloning of two genes involved in the formation and dehydration of 4-hydroxybutyryl-CoA, Archives of Microbiology, 174 (3) 189-199 (2000). などの非特許文献を参照することができる。なお、この非特許文献における事例は、4-ヒドロキシブチリルCoAデヒドラターゼと、前述のビニルアセチルCoAデルタイソメラーゼ (EC番号: 5. 3. 3. 3) との複合酵素及びこれをコードする遺伝子に関するものである。しかしながら、各々の酵素の機能を適切に提供することができれば、各々の酵素もしくは触媒サブユニットタンパク質をコードする個別の遺伝子を使用しても良い。

[0032] [アシルCoA還元酵素をコードする遺伝子]

本実施形態において、アシルCoA還元酵素をコードする遺伝子は、4-ヒドロキシブチリルCoAを還元して4-ヒドロキシブタナールを生成する反応を触媒する酵素をコードする遺伝子であって、4-ヒドロキシブチリルCoA選択的アシルCoA還元酵素であれば、特に限定されない。なお、得られた4-ヒドロキシブタナールは、後述する宿主が通常有するアルコール

還元酵素により、1, 4-ブタンジオールへと導かれるが、アルコール還元酵素をコードする遺伝子を追加的に発現させて、1, 4-ブタンジオールを製造しても良い。

[0033] 上述した反応を触媒する酵素の具体例としては、アルデヒドデヒドロゲナーゼ（アシル化）（EC番号：1. 2. 1. 10）又はそのホモログが挙げられる。

[0034] 本実施形態において、「4-ヒドロキシブチリルCoA選択的アシルCoA還元酵素」とは、4-ヒドロキシブチリルCoAに対する反応性が高い酵素である限りにおいて制限はないが、好ましくは4-ヒドロキシブチリルCoAに対する反応性が3-ヒドロキシブチリルCoAに対する反応性に対して0. 05倍以上、より好ましくは0. 07倍以上、更に好ましくは0. 2倍以上であるものを指す。

[0035] なお、酵素の基質特異性は、各々の基質を用いた還元反応により一定時間に生じた遊離のCoAを、発色色素DTNB（5, 5'-ジチオビス（2-ニトロ安息香酸））とのカップリングで呈色させ、その吸光度を測定する方法などで確認することができる。他にも、還元反応の進行に伴い逐次生成するCoAを定量するための常法を使用しても良い。さらに、本実施形態の一部又は全部を実施する過程で生じる1, 3-ブタンジオール、1, 4-ブタンジオールの生成量の比率、又は3-ヒドロキシブタナール、4-ヒドロキシブタナールの生成量の比率を、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）やガスクロマトグラフィー（GC）等の情報により把握することでも、当該還元工程を担う酵素が所望の4-ヒドロキシブチリルCoA選択的アシルCoA還元酵素であることを相対的に評価することができる。

[0036] （形質転換微生物の作製方法）

宿主微生物への遺伝子の導入は種々の知られた方法、例えば制限酵素／ライゲーションに基づく方法、In-Fusionクローニング方法などを適宜組み合わせて用いることで、上記遺伝子又はその一部を適当なベクターに連結し、得られた組換えベクターを目的の遺伝子が発現し得るように宿主中

に導入することにより可能である。又は相同組換えによってゲノム上の任意の位置に目的の遺伝子又はその一部を挿入することにより可能である。「一部」とは、宿主中に導入された場合に各遺伝子がコードするタンパク質を発現することができる各遺伝子の一部分を指す。本発明において遺伝子には、DNA及びRNAが包含され、好ましくはDNAである。

[0037] 前記遺伝子を連結するベクターとしては、宿主で複製可能なものであれば特に限定されず、例えば大腸菌において外来遺伝子導入に利用されているプラスミド、ファージ及びコスミド等が挙げられる。プラスミドとしては、例えば、pHSG398、pUC18、pBR322、pSC101、pUC19、pUC118、pUC119、pACYC117、pBluescript IISK(+)、pET17b、pETDuet-1、pACYCDuet-1、pCDFDuet-1、pRSFDuet-1、pCOLADuet-1等が挙げられ、ファージとしては、例えばλgt10、Charon 4A、EMBL-、M13mp18、M13mp19等が挙げられる。これらのいくつかは市販されており、市販品（キット）をその手順書に従いそのまま、又は適宜改変して使用することができる。

[0038] 上記ベクターにおいては、挿入した遺伝子が確実に発現されるようにするため、該遺伝子上流に適当な発現プロモーターを接続してもよい。使用する発現プロモーターは、特に制限されず、宿主に応じて当業者が適宜選択可能である。例えば大腸菌において外来遺伝子発現に利用されているT7プロモーター、lacプロモーター、trpプロモーター、trcプロモーター、λ-PLプロモーター、又は大腸菌由来の硝酸呼吸に関与する硝酸還元遺伝子narGHJIオペロンのNarプロモーター領域や、大腸菌の硝酸還元酵素遺伝子であるFrd遺伝子のプロモーター領域を利用することもできる。

[0039] また場合により宿主微生物の本来の遺伝子を破壊してその遺伝子を発現させないようにすることも好ましい。遺伝子破壊の方法については、大腸菌における遺伝子破壊に利用されている公知の方法を使用できる。具体的には、

標的遺伝子の任意の位置で相同組換えを起こすベクター（ターゲティングベクター）を用いて当該遺伝子を破壊する方法（ジーンターゲティング法）や、標的遺伝子の任意の位置にトラップベクター（プロモーターを持たないレポーター遺伝子）を挿入して当該遺伝子を破壊しその機能を失わせる方法（遺伝子トラップ法）、それらを組み合わせた方法等の当技術分野でノックアウト細胞等を作製する際に用いられる方法を用いることができる。

[0040] 相同置換を起こす位置又はトラップベクターを挿入する位置は、破壊したい標的遺伝子の発現を消失させる変異を生じる位置であれば特に限定されないが、好ましくは転写調節領域である。

[0041] さらに、前記ベクターの宿主への導入方法としては、特に制限されないが、例えば、大腸菌へのベクター導入に一般的に利用されているカルシウムイオンを用いる方法、プロトプラスト法、エレクトロポレーション法等を挙げることができる。

[0042] 相同組換えによってゲノム上の任意の位置に目的の遺伝子を挿入する方法は、ゲノム上の配列と相同な配列に目的遺伝子をプロモーターとともに挿入し、この核酸断片をエレクトロポレーションによって細胞内に導入して相同組換えを起こさせることにより実施できる。ゲノムへの導入の際には目的遺伝子と薬剤耐性遺伝子を連結した核酸断片を用いると容易に相同組換えが起こった株を選抜することができる。また、薬剤耐性遺伝子と特定の条件下で致死的になる遺伝子を連結した遺伝子をゲノム上に上記の方法で相同組換えによって挿入し、その後、薬剤耐性遺伝子と特定の条件下で致死的になる遺伝子を置き換える形で目的遺伝子を相同組換えにより導入することもできる。

[0043] さらに目的とする遺伝子が導入された組換え微生物を選択する方法は、特に制限されないが、目的とする遺伝子が導入された組換え微生物のみを、容易に選択できる手法によるものが好ましい。

[0044] （1，4-ブタンジオールの製造のための微生物の使用法、培養条件及び得られた1，4-ブタンジオールの取得方法）

図1に、本実施形態の1, 4-ブタンジオールの製造方法の酵素系の一例を示す。本実施形態において、1, 4-ブタンジオールは、前述した一連の遺伝子を形質転換などにより微生物体内で発現させた培養物を用いて得ることができる。なお、遺伝子は、個別に又は一連のクラスターとして、任意のベクターに挿入して宿主微生物を形質転換する。得られた形質転換体を、適当な炭素源、例えばグルコースを炭素源として培地中で培養することで、各遺伝子を発現させる。宿主で構成発現し得る遺伝子の場合には、培地中で形質転換体を培養することで、遺伝子が発現する。一方、各遺伝子をベクター上に配されたレギュレーターの制御下で構成した場合には、誘導基質を添加し、誘導的環境へ移行することにより、各々のコードする遺伝子が発現する。なお、本実施形態における培養とは、通常の微生物培養の培養条件を全て含み、また、培養するステップとは、微生物が1, 4-ブタンジオールを製造するための十分な時間及び条件で培養することを意味する。

[0045] 通常、本実施形態の遺伝子がコードする一般的な酵素の組み合わせにより生成するブタンジオールは、1, 3-ブタンジオールと1, 4-ブタンジオールとの併産による混合物となる。即ち、前駆体（又は中間体）3-ヒドロキシブチリルC_oAの存在下、エノイルC_oAヒドラターゼ、4-ヒドロキシブチリルC_oAデヒドラターゼが作用すると、それらの作用により速やかに3-ヒドロキシブチリルC_oAと4-ヒドロキシブチリルC_oAの平衡状態が形成される。この平衡状態下で、アシルC_oA還元酵素を作用させると、これら両アシルC_oA体を基質としたC_oA依存的なアルデヒドへの還元反応によって、平衡比依存的に3-ヒドロキシブタナール、4-ヒドロキシブタナールが生成する。これらのアルデヒド体は、宿主由来のアルコール還元酵素などにより、1, 3-ブタンジオール、1, 4-ブタンジオールへと導かれる。本実施形態においては、この還元工程において、4-ヒドロキシブチリルC_oA選択的アシルC_oA還元酵素を作用させることにより、3-ヒドロキシブタナール、4-ヒドロキシブタナールの生成過程における3-ヒドロキシブタナールの生成比率を低減し、かつ4-ヒドロキシブタナール

比率を向上することができ、結果、1, 4-ブタンジオールの生産性が向上する。

[0046] [3-ヒドロキシブチリルCoAの供給]

本実施形態の1, 4-ブタンジオールの製造方法における、3-ヒドロキシブチリルCoAの供給方法には特に制限はなく、既知の様々な方法が用いられる。

[0047] 一例として、先ず、解糖系などの既知の反応経路により得られるアセチルCoAの供給下で、2分子のアセチルCoAから1分子のCoAが脱離し、アセトアセチルCoAを与える、 β -ケトチオラーゼ（EC番号：2. 3. 1. 9）をコードする遺伝子又はそのホモログを用いた酵素反応を利用してアセトアセチルCoAを供給する。また、アセチルCoA及びマロニルCoAを基質として、不可逆的にアセトアセチルCoAを生成する反応を触媒するアセトアセチルCoA合成酵素（EC番号：2. 3. 1. 194）をコードする遺伝子又はそのホモログを使用して、アセトアセチルCoAを供給しても良い。アセトアセチルCoA合成酵素の詳細については、例えば *Unprecedented acetoacetyl-coenzyme A synthesizing enzyme of the thiolase superfamily involved in the mevalonate pathway.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.* 107, 11265-11270 (2010). などの非特許文献を参照することができる。次に、得られたアセトアセチルCoAを還元して3-ヒドロキシブチリルCoAを与える反応を触媒するアセトアセチルCoAレダクターゼ（EC番号：1. 1. 1. 36）、3-ヒドロキシブチリルCoAデヒドロゲナーゼ（EC番号：1. 1. 1. 35）、3-ヒドロキシアシルCoAデヒドロゲナーゼ（EC番号：1. 1. 1. 157）又はこれらのホモログを用いた酵素反応により、3-ヒドロキシブチリルCoAを得ることができる。なお、アセトアセチルCoAレダクターゼ（EC番号：1. 1. 1. 36）を使用した場合、(R)-3-ヒ

ドロキシブチリルC o Aを得ることができ、3-ヒドロキシブチリルC o Aデヒドロゲナーゼ（EC番号：1. 1. 1. 35）又は3-ヒドロキシアシルC o Aデヒドロゲナーゼ（EC番号：1. 1. 1. 157）を使用した場合、（S）-3-ヒドロキシブチリルC o Aを得ることができる。

[0048] また、他の例として、3-ヒドロキシブタン酸に直接C o Aを転移する酵素として、プロピオン酸C o A転移酵素（EC番号：2. 8. 3. 1）が知られている。プロピオン酸C o A転移酵素をコードする遺伝子又はそのホモログの発現下、かつ、C o A転移反応のドナーとなるアセチルC o Aの供給下で、微生物又は該微生物を含む培養物に3-ヒドロキシブタン酸を供給することにより、3-ヒドロキシブチリルC o Aを生成することができる。

[0049] 本実施形態におけるホモログは、オーソログ及びパラログを含む。オーソログとは、共通祖先の遺伝子から種分化により生じた種間で対応する遺伝子及びその遺伝子より得られる酵素の組を指す。パラログとは、同種内において、種分化でなく遺伝子重複によって生じた種間で対応する遺伝子及びその遺伝子より得られる酵素を指す。ホモログとは、オーソログ、パラログに関係なく配列に同一性を有する遺伝子及びその遺伝子より得られる酵素を指す。

[0050] より具体的には、上述した遺伝子のホモログ（遺伝子）は、当該遺伝子に対して90%以上の同一性、好ましくは95%以上の同一性のある塩基配列を有する遺伝子、より好ましくは、その遺伝子と全く同一又はその塩基の1個若しくは数個が欠失、置換又は付加された遺伝子を指す。

[0051] また、ホモログ遺伝子は、対象の遺伝子と相補的な塩基配列を有する遺伝子とストリンジントな条件下でハイブリダイズする遺伝子を含む。具体的には、公知のデータベースに対するホモロジー検索プログラム（例えば、BLAST、FASTA）を適用して、又は、同定遺伝子の少なくとも一部から成るプローブ（当該遺伝子の塩基配列からなるDNAと相補的な塩基配列からなるDNA）を用いたストリンジントな条件下でのハイブリダイゼーション若しくはポリメラーゼ連鎖反応（PCR）などの常法に基づいて、遺伝

子又はその遺伝子による形質転換で得られる酵素として取得することができる。また、当業者であれば、塩基配列を置換等することによって、自ら設計することが可能である。なお、ここで言うストリンジントな条件としては、例えば、Molecular Cloning – A LABORATORY MANUAL THIRD EDITION (Joseph Sambrook, David W. Russell., Cold Spring Harbor Laboratory Press) の非特許文献に記載されたハイブリダイズさせる条件が挙げられる。ハイブリダイズさせる条件とは、より具体的には、6×SSC (1×SSCの組成：0.15M 塩化ナトリウム、0.015M クエン酸ナトリウムで、pH：7.0)、0.5% SDS、5×デンハート溶液及び100mg/mL ニシン精子DNAを含む溶液に、プローブとともに65℃で8～16時間恒温保持し、ハイブリダイズさせる条件である。

[0052] [培養方法]

本発明の反応は、もっとも簡便には、例えば形質転換体をLB培地などの栄養培地で15℃～40℃、望ましくは18℃～37℃の温度で24時間程度培養したのち、通常炭素源、例えば0.01～50%、望ましくは0.1～30%のグルコースを炭素源とする培地に移殖し、引き続き同様の温度で1時間～200時間程度培養し、その過程で培養液中に1,4-ブタンジオールを蓄積させることにより達せられる。また菌の増殖・反応の進行による炭素源の消費に応じて、連続的あるいは間欠的に炭素源を添加してもよく、この場合の炭素源の反応液中濃度は前記の限りではない。

[0053] 微生物を培養するための培地炭素源としては、グルコースやシュークロース、フルクトース等の糖類、グリセロール等のポリオール、エタノールや酢酸、クエン酸、コハク酸、乳酸、安息香酸、脂肪酸などの有機物またはこれらのアルカリ金属塩、n-パラフィンなどの脂肪族炭化水素類、芳香族炭化水素類、または例えばペプトン、肉エキス、魚エキス、大豆粉、ふすま等の天然有機物を、単独、あるいはこれらの組み合わせにより、通常0.01%

～30%、望ましくは0.1%～20%程度の濃度で用いることができる。

[0054] 微生物を培養するための培地窒素源としては、例えば硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウム、硝酸ナトリウム、硝酸カリウムなどの無機窒素化合物、また尿素、尿酸などの含窒素有機物、ペプトン、肉エキス、魚エキス、大豆粉等の天然有機物を単独、あるいはこれらの組み合わせにより、通常0.01%～20%、望ましくは0.1%～10%程度の濃度で用いることができる。

[0055] さらに必要に応じて、リン酸2水素カリウム等のリン酸塩、硫酸マグネシウム、硫酸第一鉄、酢酸カルシウム、塩化マンガン、硫酸銅、硫酸亜鉛、硫酸コバルト、硫酸ニッケルなどの金属塩を菌の生育、酵素活性の改善のために添加することができる。添加濃度は培養条件により異なるが、通常、リン酸塩に関しては0.01%～5%、マグネシウム塩においては10ppm～1%、他の化合物では0.1ppm～1,000ppm程度である。また選択する培地により、ビタミン類、アミノ酸、核酸などの供給源として例えば酵母エキス、カザミノ酸、酵母核酸を1ppm～100ppm程度、菌の生育、酵素活性を改善のために添加することができる。

[0056] 培地のpHは、4.5～9、望ましくは5～8に調整することが望ましい。また前記のような培地であらかじめ培養された微生物菌体を、遠心分離、膜ろ過などの方法により培養液から分取し、反応原料を含む水、生理食塩水、または培養のpHと同等のpHに調整されたリン酸、酢酸、ホウ酸、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンなどとこれらの塩よりなる緩衝液などに再度懸濁し、反応させることは、反応液中の夾雑物を低減し、後の生成物の分取を簡便にするために有用である。反応中のpHは、十分な濃度の緩衝液を用いる場合においては通常維持されうるが、反応の進行により上記pHを逸脱する場合においては、同様のpHとなるよう水酸化ナトリウム、アンモニアなどを用いて適宜調整することが望ましい。

[0057] 反応液中に1,4-ブタンジオールが蓄積することにより、反応速度が低下する場合、生成物の濃度に応じて反応液中に、水、生理食塩水、反応緩衝

液等を追加し連続的に希釈してゆく方法は好適である。また反応速度が低下した時点で菌を分取し、上清を生産物溶液として回収し、分取した菌は再度反応原料を含む溶液あるいは懸濁液に戻すことにより、反応速度を回復することができる。この操作は、遠心分離器や分離膜等を用いて連続的に、あるいは回分的にも実施することができる。

[0058] 反応液中に生成した1,4-ブタンジオールの分離回収および精製は、1,4-ブタンジオールの生成量が実質的な量に達した時点で、反応液から菌体を遠心分離により除去してから、あるいはそのままの反応液に、一般の有機化合物の分離回収および精製の手段を用いることで行うことができる。例えば、培養液から菌体その他を除去したろ液より、適当な有機溶媒を用いて抽出する。この抽出物をそのまま留去するほか、更に適当な溶媒で再抽出する、あるいはシリカゲル等のクロマトグラフィーを用いて精製する、もしくは多段蒸留等に供することにより、高純度の1,4-ブタンジオールが得られる。

実施例

[0059] 次に、実施例を説明することにより、本発明をより詳細に説明する。

[0060] 表1に、想定する反応工程と、各々の反応工程を触媒する酵素と、該酵素をコードする使用した遺伝子の配列番号についてまとめたものを示す。なお、遺伝子における配列番号は、配列表における配列番号に対応している。

[0061]

[表1]

配列番号	コードする酵素	由来
配列番号1	β -ケトチオラーゼ (EC番号: 2. 3. 1. 9)	atoB (<i>Escherichia coli</i> K12株由来配列、人工合成)
配列番号2	3-ヒドロキシブチリルCoAデヒドロゲナーゼ (EC番号: 1. 1. 1. 35)	hbd (<i>Clostridium kluyveri</i> DSM555由来配列、人工合成)
配列番号3	エノイルCoAヒドラーゼ (EC番号: 4. 2. 1. 17)	crt (<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824由来配列、人工合成)
配列番号4	ピニルアセチルCoAデルタインメラーゼ (EC番号: 5. 3. 3. 3) + 4-ヒドロキシブチリルCoAデヒドラーゼ (EC番号: 4. 2. 1. 120)	発明者らにより提供(人工合成)
配列番号5	アシルCoA還元酵素 (EC番号: 1. 2. 1. 10)	bld (<i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i> ATCC27021由来配列、人工合成)
配列番号6	アシルCoA還元酵素 (EC番号: 1. 2. 1. 10)	ald (<i>Clostridium beijerinckii</i> NRRL B592由来配列、人工合成)

[比較例1]

配列番号1 (β -ケトチオラーゼに対応) で示される遺伝子配列の上下流に、発現ベクター pET17b (ノバジェン社製) のマルチクローニングサイト中、NdeIサイトの上下流側CAT、下流側ATGをそれぞれ含む上流

側、下流側15塩基対分に対応する配列をそれぞれ5'末端側、3'末端側に付加した平滑末端断片を常法により調製した。この断片と、pET17b（ノバジェン社製）をNdeI処理した断片とをIn-Fusion HD Cloning Kit（タカラバイオ社製）によりライゲーションし、プラスミドpETBD1を得た。

[0062] pETBD1と同様の方法により、配列番号2（3-ヒドロキシブチリルCoAデヒドロゲナーゼに対応）で示される遺伝子配列をpET17bのNdeIサイトをターゲットとして挿入した、配列2を含むプラスミドpETBD2を得た。

[0063] pETBD1の配列1の終止コドン下流に位置する、pET17bマルチクローニングサイト由来のEcoRIサイトを制限酵素処理により切断し、pETBD1の開環断片を調製した。次にpETBD2の配列2の領域と上流のpET17b由来T7プロモーターを含む領域の上下流に、前記pETBD1のEcoRIサイトを含む上流側15bp分、下流側15bp分に対応する配列を付加した断片を、PCRにより調製した。得られた2つの断片を、In-Fusion HD Cloning Kitによりライゲーションし、配列1及び2を含むプラスミドpETBD1-2を得た。

[0064] 以下同様にして、配列番号3（エノイルCoAヒドラターゼに対応）、配列番号4（ビニルアセチルCoAデルタイソメラーゼ、4-ヒドロキシブチリルCoAデヒドラターゼに対応）、配列番号5（アシルCoA還元酵素に対応）を順次追加し、プラスミドpETBD1-2-3-4-5を得た。なお、配列の追加に際して、被挿入側プラスミドの開環は、挿入済配列を切断しない適切な制限酵素サイトがベクター上にある場合はその制限酵素による切断で、またそのようなサイトがない場合は目的挿入部位からのインバースPCRにより行った。これにより大腸菌JM109（DE3）株を形質転換した、大腸菌pETBD1-2-3-4-5/JM109（DE3）を得た。

[0065] [実施例1]

比較例 1 と同様の方法により、プラスミド pETBD 1-2-3-4-5 上の配列 5 の遺伝子を、由来の異なるアシル CoA 還元酵素をコードする配列番号 6 の遺伝子で置換した、プラスミド pETBD 1-2-3-4-6 で形質転換した、大腸菌 pETBD 1-2-3-4-6 / JM109 (DE3) を得た。

[0066] 比較例 1 及び実施例 1 で得られた形質転換体をそれぞれ、アンピシリン 100 mg/L を含む LB 培地 5 mL で 37°C、12 時間、好気下で培養した。培養液 0.1 mL を、グルコース 1%、アンピシリン 100 mg/L、IPTG 0.2 mM を含む LB 培地 5 mL に移植し、30°C、48 時間、好気下で培養した。培養液上清を、高速液体クロマトグラフィー (HPLC: カラム; Shodex SH-1011 (昭和電工製)、カラム温度: 60°C、溶離液: 25 mM 硫酸水溶液、流速 0.6 mL/min、検出: 示差屈折検出器) に供試した。用いた形質転換体のプラスミドを構成する遺伝子と、培養液中に生成した 1,4-ブタンジオール量との間の関係をまとめたものを、表 2 に示す。

[0067]

[表2]

	比較例1	実施例1
形質転換遺伝子 (配列番号)	1	1
	2	2
	3	3
	4	4
	5	6
	998	970
	36	68
	0.036	0.070

表2より明らかであるように、実施例1と比較例1とでは、アシルCoA還元酵素以外の構成が全く同等であり、3-ヒドロキシブチリルCoAと4-ヒドロキシブチリルCoAの平衡状態までは全く同等に形成されていると考えられる。即ち、実施例1において用いた遺伝子に由来するアシルCoA

還元酵素は、より4-ヒドロキシブチリルCoA選択的であり、これにより1,4-ブタンジオールの生成比が向上したことがわかる。

[0068] 本出願は、2012年11月26日に日本国特許庁に出願された特願2012-257882号に基づく優先権を主張するものであり、特願2012-257882号の全内容を本出願に援用する。

請求の範囲

- [請求項1] 微生物及び／又はその培養物を用いて、3-ヒドロキシブチリルC_oA、クロトニルC_oA、4-ヒドロキシブチリルC_oAを順次経由して、アシルC_oA還元酵素を用いた酵素反応系により1, 4-ブタンジオールを製造する方法であって、
- 前記アシルC_oA還元酵素の4-ヒドロキシブチリルC_oAに対する反応性は、3-ヒドロキシブチリルC_oAに対する反応性に対して0.05倍以上であることを特徴とする、
- 1, 4-ブタンジオールの製造方法。
- [請求項2] 前記アシルC_oA還元酵素は、アルデヒドデヒドロゲナーゼ（アシル化）（EC番号：1.2.1.10）である、
- 請求項1に記載の1, 4-ブタンジオールの製造方法。
- [請求項3] 前記微生物は、下記（a）～（c）のいずれかに記載の、前記アシルC_oA還元酵素をコードする遺伝子を含む、請求項1に記載の1, 4-ブタンジオールの製造方法。
- （a）配列番号6の塩基配列を有する遺伝子
- （b）配列番号6の塩基配列において1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を有する遺伝子であって、配列番号6の塩基配列に対して90%以上の同一性の塩基配列を有する遺伝子
- （c）配列番号6に記載の塩基配列を有する遺伝子と相補的な塩基配列を有する遺伝子とストリンジентな条件下でハイブリダイズする遺伝子
- [請求項4] 前記微生物は、大腸菌、酵母、コリネ型細菌、クロストリジウム属細菌である、
- 請求項1に記載の1, 4-ブタンジオールの製造方法。
- [請求項5] 3-ヒドロキシブチリルC_oA、クロトニルC_oA、4-ヒドロキシブチリルC_oAを順次経由して、アシルC_oA還元酵素を用いた酵

素反応系により 1, 4-ブタンジオールを製造する微生物であって、

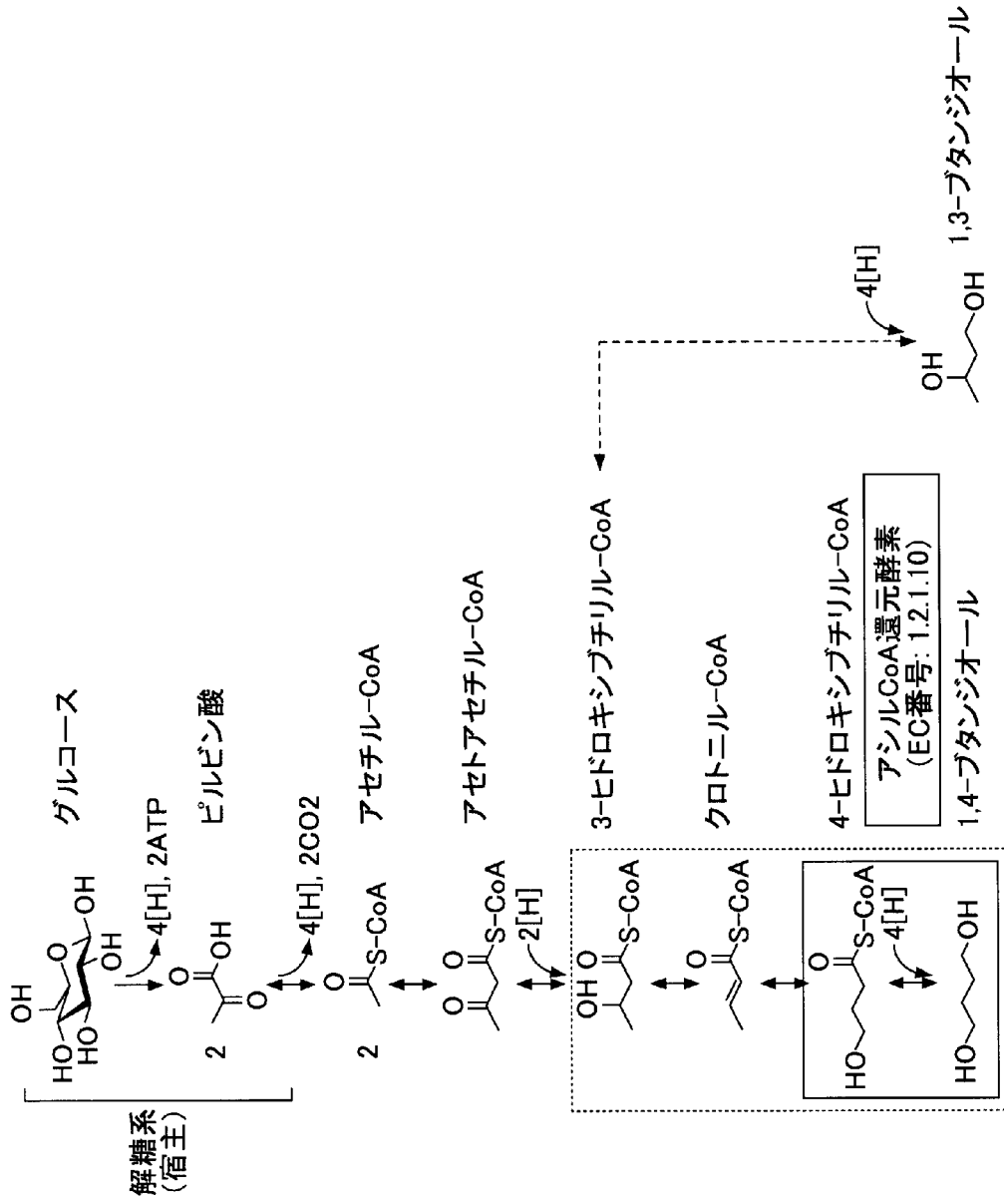
前記アシルCoA還元酵素の4-ヒドロキシブチリルCoAに対する反応性は、3-ヒドロキシブチリルCoAに対する反応性に対して0.05倍以上であることを特徴とする、微生物。

[請求項6]

前記微生物は、大腸菌、酵母、コリネ型細菌、クロストリジウム属細菌である、

請求項5に記載の微生物。

[図1]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2013/075513

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>C12P7/18(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i</i> According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC										
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) <i>C12P7/18, C12N1/19, C12N1/21, C12N15/09</i>										
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched <table style="width:100%; border:none;"> <tr> <td style="width:33%;"><i>Jitsuyo Shinan Koho</i></td> <td style="width:33%;"><i>1922-1996</i></td> <td style="width:33%;"><i>Jitsuyo Shinan Toroku Koho</i></td> <td style="width:33%;"><i>1996-2013</i></td> </tr> <tr> <td><i>Kokai Jitsuyo Shinan Koho</i></td> <td><i>1971-2013</i></td> <td><i>Toroku Jitsuyo Shinan Koho</i></td> <td><i>1994-2013</i></td> </tr> </table>			<i>Jitsuyo Shinan Koho</i>	<i>1922-1996</i>	<i>Jitsuyo Shinan Toroku Koho</i>	<i>1996-2013</i>	<i>Kokai Jitsuyo Shinan Koho</i>	<i>1971-2013</i>	<i>Toroku Jitsuyo Shinan Koho</i>	<i>1994-2013</i>
<i>Jitsuyo Shinan Koho</i>	<i>1922-1996</i>	<i>Jitsuyo Shinan Toroku Koho</i>	<i>1996-2013</i>							
<i>Kokai Jitsuyo Shinan Koho</i>	<i>1971-2013</i>	<i>Toroku Jitsuyo Shinan Koho</i>	<i>1994-2013</i>							
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) <i>Caplus/REGISTRY/MEDLINE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq, PubMed, Science Direct, WPI</i>										
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT										
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.								
X	JP 2012-529267 A (<i>Genomatica, Inc.</i>), 22 November 2012 (22.11.2012), claims; example 10; fig. 12; table 22; paragraphs [0052], [0076], [0356] & EP 2438178 A & US 2011-0045575 A1	1-6								
A	LAN EI et al., ATP drives direct photosynthetic production of 1-butanol in cyanobacteria, <i>Proc Natl Acad Sci USA.</i> , APR-2012, Vol.109, p.6018- 6023	1-6								
A	MADAN VK et al., Purification and Properties of NADP-Dependent L(+)-3-Hydroxybutyryl-CoA Dehydrogenase from <i>Clostridium kluveri</i> , <i>Eur J Biochem.</i> , 1973, Vol.32, p.51-56	1-6								
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.										
<table style="width:100%; border:none;"> <tr> <td style="width:50%; vertical-align:top;"> * Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed </td> <td style="width:50%; vertical-align:top;"> "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family </td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family						
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family									
Date of the actual completion of the international search 22 October, 2013 (22.10.13)		Date of mailing of the international search report 29 October, 2013 (29.10.13)								
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer								
Facsimile No.		Telephone No.								

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/075513

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SEEDORF H et al., The genome of <i>Clostridium kluyveri</i> , a strict anaerobe with unique metabolic features, Proc Natl Acad Sci USA., 2008, Vol.105, p.2128-2133	1-6
A	YIM H et al., Metabolic engineering of <i>Escherichia coli</i> for direct production of 1,4-butanediol, Nat Chem Biol., 2011, Vol.7, p.445-452	1-6
A	INUI M et al., Expression of <i>Clostridium acetobutylicum</i> butanol synthetic genes in <i>Escherichia coli</i> , Appl Microbiol Biotechnol., 2008, Vol.77, p.1305-1316	1-6

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12P7/18(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12P7/18, C12N1/19, C12N1/21, C12N15/09		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2013年 日本国実用新案登録公報 1996-2013年 日本国登録実用新案公報 1994-2013年		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CAplus/REGISTRY/MEDLINE/BIOSIS(STN), JSTplus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq, PubMed, Science Direct, WPI		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	JP 2012-529267 A (ゲノマチカ, インク.) 2012.11.22, 特許請求の範囲、実施例10、図12、表22、【0052】、【0076】、【0356】 & EP 2438178 A & US 2011-0045575 A1	1-6
A	LAN EI et al., ATP drives direct photosynthetic production of 1-butanol in cyanobacteria, Proc Natl Acad Sci USA., APR-2012, Vol.109, p.6018-6023	1-6
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 22.10.2013	国際調査報告の発送日 29.10.2013	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 北田 祐介 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	4 N 4 8 6 8

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	MADAN VK et al., Purification and Properties of NADP-Dependent L(+)-3-Hydroxybutyryl-CoA Dehydrogenase from <i>Clostridium kluveri</i> , Eur J Biochem., 1973, Vol.32, p.51-56	1-6
A	SEEDORF H et al., The genome of <i>Clostridium kluveri</i> , a strict anaerobe with unique metabolic features, Proc Natl Acad Sci USA., 2008, Vol.105, p.2128-2133	1-6
A	YIM H et al., Metabolic engineering of <i>Escherichia coli</i> for direct production of 1,4-butanediol, Nat Chem Biol., 2011, Vol.7, p.445-452	1-6
A	INUI M et al., Expression of <i>Clostridium acetobutylicum</i> butanol synthetic genes in <i>Escherichia coli</i> , Appl Microbiol Biotechnol., 2008, Vol.77, p.1305-1316	1-6