

(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
2022年5月19日(19.05.2022)



(10) 国際公開番号

WO 2022/102635 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 1/21 (2006.01) *C12P 7/44* (2006.01)
C12N 15/52 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2021/041257

(22) 国際出願日: 2021年11月10日(10.11.2021)

(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 2020-187848 2020年11月11日(11.11.2020) JP

(71) 出願人: 東レ株式会社 (**TORAY INDUSTRIES, INC.**) [JP/JP]; 〒1038666 東京都中央区日本橋室町2丁目1番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 磯部 匡平 (**ISOBE, Kyohei**); 〒2488555 神奈川県鎌倉市手広6丁目10番1号 東レ株式会社 基礎研究センター内 Kanagawa (JP). 河村 健司 (**KAWAMURA, Kenji**); 〒2488555 神奈川県鎌倉市手広6丁目10番1号 東レ株式会社 基礎研究センター内 Kanagawa (JP). 山田 勝成 (**YAMADA, Katsushige**); 〒2488555 神奈川県鎌倉市手広6丁目10番1号 東レ株式会社 基礎研究センター内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人 谷川 国際特許事務所 (**TANIGAWA AND PARTNERS, PATENT FIRM**); 〒1020072 東京都千代田区飯田橋一丁目7番10号 山京別館801 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, 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))

(54) **Title:** GENETICALLY MODIFIED MICROORGANISM FOR PRODUCING 3-HYDROXYADIPIC ACID AND/OR α -HYDROMUCONIC ACID, AND METHOD FOR PRODUCING CHEMICAL PRODUCT

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

(57) **Abstract:** Disclosed are: a genetically modified microorganism capable of producing 3-hydroxyadipic acid and/or α -hydromuconic acid at a high yield; and said genetically modified microorganism. The genetically modified microorganism is obtained by enhancing the reaction from producing acetyl-CoA from pyruvic acid, and reducing the function of a catalyst of a pyruvic acid kinase and/or phosphotransferase-based catalyst, in a microorganism having an ability to produce 3-hydroxyadipic acid and/or α -hydromuconic acid.

(57) 要約: 要約 3-ヒドロキシアジピン酸および/または α -ヒドロムコン酸を高い収率で生産することが可能な遺伝子改変微生物及び当該遺伝子改変微生物が開示されている。遺伝子改変微生物は、3-ヒドロキシアジピン酸および/または α -ヒドロムコン酸を製造する能力を有する微生物において、ピルビン酸からアセチルCoAを生成する反応を強化し、ならびにピルビン酸キナーゼおよび/またはホスホトランスフェラーゼ系酵素の機能を低下させたものである。

WO 2022/102635 A1

明 細 書

発明の名称：

3-ヒドロキシアジピン酸および／または α -ヒドロムコン酸を生産するための遺伝子改変微生物および当該化学品の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、3-ヒドロキシアジピン酸および／または α -ヒドロムコン酸を高生産する遺伝子改変微生物および当該遺伝子改変微生物を用いた3-ヒドロキシアジピン酸および／または α -ヒドロムコン酸の製造方法に関する。

背景技術

[0002] 3-ヒドロキシアジピン酸（IUPAC名：3-hydroxyhexanedioic acid）および α -ヒドロムコン酸（IUPAC名：（E）-hex-2-enedioic acid）は炭素数6のジカルボン酸である。これらは多価アルコールと重合することでポリエステルとして、また多価アミンと重合することでポリアミドの原料として用いることができる。また、これらの末端にアンモニアを付加してラクタム化した化合物もポリアミドの原料として用いることができる。

[0003] 微生物を利用した3-ヒドロキシアジピン酸または α -ヒドロムコン酸の製造に関連して以下の文献が知られている。

[0004] 微生物を利用した炭素数6のジカルボン酸の製造に関連する文献として、特許文献1には、3-オキソアジピルーC_oAから3-ヒドロキシアジピルーC_oAへの還元反応を触媒する優れた活性を示すポリペプチドを用いた3-ヒドロキシアジピン酸、 α -ヒドロムコン酸および／またはアジピン酸の製造方法が記載されており、これら物質の生合成経路として、3-オキソアジピルーC_oAを3-ヒドロキシアジピルーC_oAへと還元する酵素反応を経由するとの記載がある。一方、特許文献1において改変する遺伝子はいずれも細胞内における前記生合成経路上の反応に限られ、それらより上流の代

謝経路における酵素活性の低下あるいは強化についての記載はない。

- [0005] 特許文献2には、代謝経路を改変した微生物を用いた1, 3-ブタジエンの製造方法が記載されており、当該文献中では、アセチル-C o Aおよびスクシニル-C o Aから1, 3-ブタジエンが生合成される代謝経路における代謝中間体として3-ヒドロキシアジピン酸（3-ヒドロキシアジペート）が記載されている。
- [0006] 特許文献3には、代謝経路を改変した微生物を用いたムコン酸の製造方法が記載されており、当該文献中では、アセチル-C o Aおよびスクシニル-C o Aからtrans, trans-ムコン酸が生合成される代謝経路における代謝中間体として α -ヒドロムコン酸（2, 3-デヒドロアジペート）が記載されている。
- [0007] 特許文献2および3に記載された生合成経路では、いずれも3-オキソアジピル-C o Aを3-ヒドロキシアジピル-C o Aへと還元する酵素反応を経由するとの記載がある。
- [0008] 特許文献4および5には、非天然の微生物を用いたアジピン酸やヘキサメチレンジアミン（HMDA）の製造方法が記載されており、当該文献中で、これらの物質は、アセチル-C o Aおよびスクシニル-C o Aから3-オキソアジピル-C o Aが合成される反応が生合成経路に含まれる点で共通しているが、3-オキソアジピル-C o Aから3-ヒドロキシアジピン酸または α -ヒドロムコン酸までは別の生合成経路が記載されている。
- [0009] 特許文献4には、HMDAの製造において、増殖と共役したHMDAの形成を改善するための追加的な遺伝子欠失としてピルビン酸キナーゼが、収率を改善するための追加的な遺伝子欠失としてホスホトランスフェラーゼ酵素が記載されている。一方、アジピン酸の製造においては、増殖と共役したアジピン酸の形成を改善するための追加的な遺伝子欠失としてホスホトランスフェラーゼ酵素が記載されているが、ピルビン酸キナーゼの記載はない。HMDAおよびアジピン酸の製造いずれにおいても、ピルビン酸からアセチル-C o Aを生成する反応の強化についての記載はない。

[0010] 特許文献5には、ホスホケトラーゼを有する非天然の微生物を用いたアジピン酸の製造において、ホスホトランスフェラーゼ酵素およびピルビン酸キナーゼ活性の減衰あるいは除去が記載されている。また、ホスホケトラーゼ存在下でのNADH産生のためにピルビン酸からアセチルCoAを生成する反応の強化を含む遺伝子改変が記載されている。

[0011] 特許文献6には、インシリコ分析に基づく微生物の改良方法が開示されており、大腸菌のピルビン酸キナーゼおよびホスホトランスフェラーゼ酵素をコードする遺伝子であるpykF、pykA、ptsGを欠失させ、嫌気条件下で培養することにより、コハク酸の産生が増大することが開示されている。

[0012] 非特許文献1には、大腸菌のピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体の転写抑制因子をコードする遺伝子であるpdhRを削除することにより、2-オキソグルタル酸の産生が増大することが開示されている。

先行技術文献

特許文献

[0013] 特許文献1：国際公開第2019/107516号

特許文献2：特表2013-535203号公報

特許文献3：米国特許出願公開第2011/0124911A1号明細書

特許文献4：特開2015-146810号公報

特許文献5：米国特許出願公開第2017/0298363A1号明細書

特許文献6：特表2008-527991号公報

非特許文献

[0014] 非特許文献1：J Biosci Bioeng. 2017 Apr; 123 (4) : 437-443.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0015] 特許文献1には、3-ヒドロキシアジピン酸あるいは α -ヒドロムコン酸

の生産性の向上に關与する酵素遺伝子の発現強化について開示されているが、発現を強化する酵素遺伝子はいずれも生合成経路においてアセチル-C o Aおよびスクシニル-C o Aより下流の反応に限られ、それらより上流の代謝経路における酵素活性の強化についての記載はない。特許文献2または3には、微生物内で3-ヒドロキシアジピン酸または α -ヒドロムコン酸が生成しうる代謝経路の記載はあるが、代謝を3-ヒドロキシアジピン酸または α -ヒドロムコン酸で止め、培養液中に分泌させるという記載はない。また、特許文献2から5に記載された3-オキソアジピル-C o Aを3-ヒドロキシアジピル-C o Aへと還元する反応を触媒する酵素遺伝子を導入した微生物を用いた場合に、実際に3-ヒドロキシアジピン酸または α -ヒドロムコン酸が製造できるかどうかの検証はなされていない。特許文献6および非特許文献1には、3-ヒドロキシアジピン酸あるいは α -ヒドロムコン酸についての記載はない。

[0016] そこで本発明では、3-オキソアジピル-C o A還元酵素をコードする遺伝子を導入、または当該遺伝子の発現を増強して当該酵素活性を強化した遺伝子改変微生物を基に、さらに上流の代謝経路を改変して、3-ヒドロキシアジピン酸および／または α -ヒドロムコン酸を高い収率で製造するための遺伝子改変微生物及び当該改変微生物を用いた物質製造方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0017] 本発明者は上記目的を達成するため鋭意検討した結果、3-ヒドロキシアジピン酸および／または α -ヒドロムコン酸を製造する能力を有し、ピルビン酸からアセチル-C o Aを生成する反応を強化し、ならびにピルビン酸キナーゼおよび／またはホスホトランスフェラーゼ酵素の機能を低下させた遺伝子改変微生物が、3-ヒドロキシアジピン酸および／または α -ヒドロムコン酸の優れた生産能を持つことを見出し、本発明を完成させるに至った。

[0018] すなわち、本発明は以下のものを提供する。

(1) 3-ヒドロキシアジピン酸および／または α -ヒドロムコン酸を製造

する能力を有する微生物において、ピルビン酸からアセチルC○Aを生成する反応を強化し、ならびにピルビン酸キナーゼおよび／またはホスホトランスフェラーゼ酵素の機能を低下させた、遺伝子改変微生物。

(2) 前記ピルビン酸からアセチルC○Aを生成する反応の強化が、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体が触媒する反応の強化および／またはピルビン酸ギ酸リアーゼが触媒する反応の強化である、(1)に記載の遺伝子改変微生物。

(3) 前記ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体が触媒する反応の強化が、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体の発現量の増大および／またはピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体の活性増強による強化である、(2)に記載の遺伝子改変微生物。

(4) 前記ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体の発現量の増大が、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体転写抑制因子の機能を低下させることにより行われる、(3)に記載の遺伝子改変微生物。

(5) 前記ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体の活性増強が、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体のNADHへの感受性を低減させることにより行われる、(3)に記載の遺伝子改変微生物。

(6) 前記ピルビン酸ギ酸リアーゼが触媒する反応の強化が、ピルビン酸ギ酸リアーゼの発現量の増大による強化により行われる、(2)に記載の遺伝子改変微生物。

(7) さらに3-オキソアジピルーC○Aを還元して3-ヒドロキシアジピルーC○Aを生成する反応を強化した、(1)から(6)のいずれかに記載の遺伝子改変微生物。

(8) さらにホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼの反応を強化した、(1)から(7)のいずれかに記載の遺伝子改変微生物。

(9) ホスホケトラーゼ経路による糖代謝をしない微生物である、(1)から(8)のいずれかに記載の遺伝子改変微生物。

(10) (1)から(9)のいずれかに記載の遺伝子改変微生物を培養する

工程を含む、3-ヒドロキシアジピン酸および／または α -ヒドロムコン酸の製造方法。

(11) 遺伝子改変により微生物に内在する機能を強化または低下させる工程を含む3-ヒドロキシアジピン酸および／または α -ヒドロムコン酸を製造する能力を有する遺伝子改変微生物の製造方法であって、前記工程として、ピルビン酸からアセチルCoAを生成する反応を強化する工程(a)、ならびにピルビン酸キナーゼおよび／またはホスホトランスフェラーゼ酵素の機能を低下させる工程(b)を含む、方法。

(12) さらに3-オキソアジピル-CoAを還元して3-ヒドロキシアジピル-CoAを生成する反応を強化する工程(c)を含む、(11)に記載の方法。

(13) さらにホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼの反応を強化する工程(d)を含む、(11)または(12)に記載の方法。

発明の効果

[0019] 3-ヒドロキシアジピン酸および／または α -ヒドロムコン酸を製造する能力を有する微生物において、ピルビン酸からアセチルCoAを生成する反応を強化し、ならびにピルビン酸キナーゼおよび／またはホスホトランスフェラーゼ酵素の機能を低下させる遺伝子改変により、当該遺伝子を改変していない親株の微生物と比較して、3-ヒドロキシアジピン酸および／または α -ヒドロムコン酸を高い収率で生産することができる。

発明を実施するための形態

[0020] 本発明では、3-ヒドロキシアジピン酸および／または α -ヒドロムコン酸を製造する能力を有する微生物において、当該微生物のピルビン酸からアセチルCoAを生成する反応を強化し、ならびにピルビン酸キナーゼおよび／またはホスホトランスフェラーゼ酵素の機能を低下させると、3-ヒドロキシアジピン酸および／または α -ヒドロムコン酸を高い収率で製造できることを見出した。

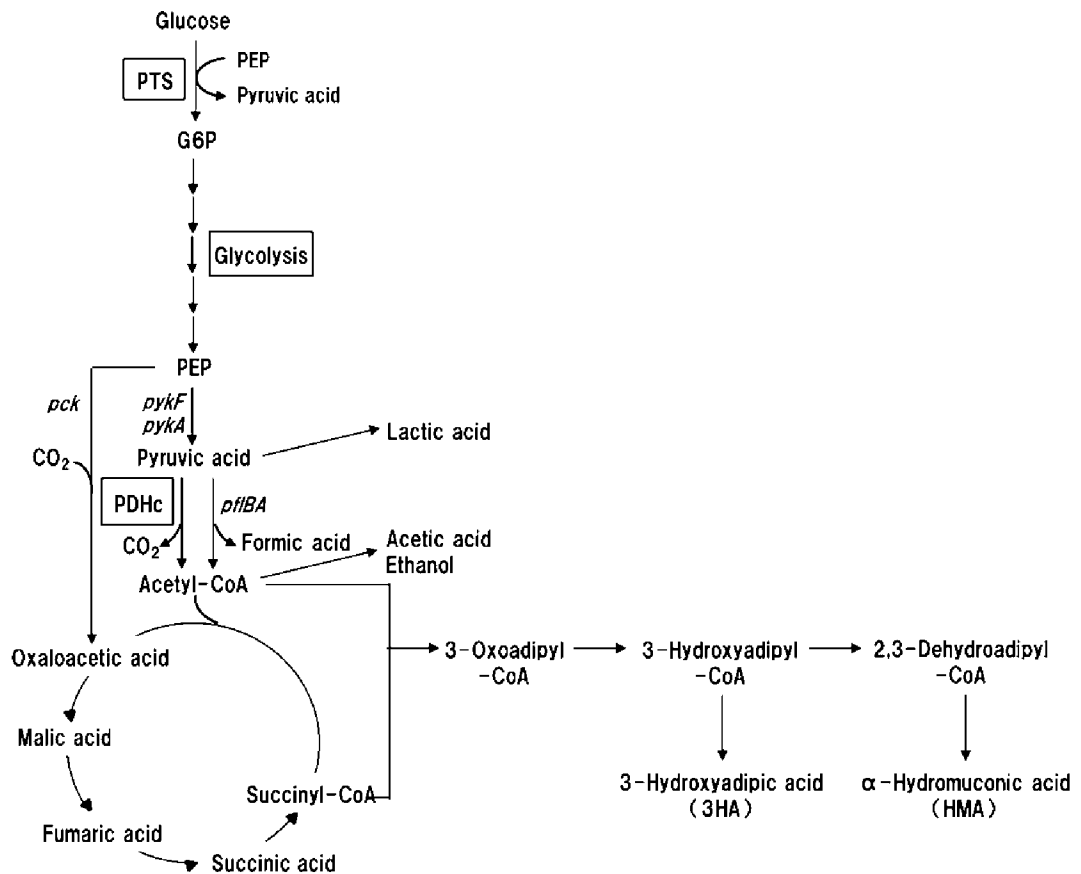
[0021] 以下、本明細書では3-ヒドロキシアジピン酸を3HA、 α -ヒドロムコ

ン酸をHMAと略すことがある。また、3-オキソアジピル-COAを3OA-COA、3-ヒドロキシアジピル-COAを3HA-COA、2,3-デヒドロアジピル-COAをHMA-COAと略すことがある。また、ホスホエノールピルビン酸をPEPと略すことがある。また、3-オキソアジピル-COAを還元して3-ヒドロキシアジピル-COAを生成する反応を触媒する酵素を「3-オキソアジピル-COAレダクターゼ」と記載する場合がある。また、単一プロモーターの存在下でaceE、aceFおよびlpd遺伝子がコードするタンパク質の複合体をピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体と記載し、PDHcと略すことがある。また、aceE、aceFおよびlpd遺伝子を総称してPDHc遺伝子群と記載することがある。また、ピルビン酸ギ酸リアーゼおよびピルビン酸ギ酸リアーゼ活性化酵素を総称してピルビン酸ギ酸リアーゼと記載し、PFLまたはPflと略すことがある。また、ピルビン酸キナーゼをPyk、ホスホトランスフェラーゼ酵素をPTSと略すことがある。また、機能を持つポリペプチドをコードする核酸のことを遺伝子と記載することがある。

[0022] 本発明の遺伝子改変微生物は、以下の代謝経路に示されるとおりアセチル-COAおよびスクシニル-COAを中間体として、3-ヒドロキシアジピン酸および／または α -ヒドロムコン酸を生合成することができる。グルコースからアセチル-COAまでの代謝経路は解糖系、スクシニル-COAまでの代謝経路はTCA回路として周知である。

[0023]

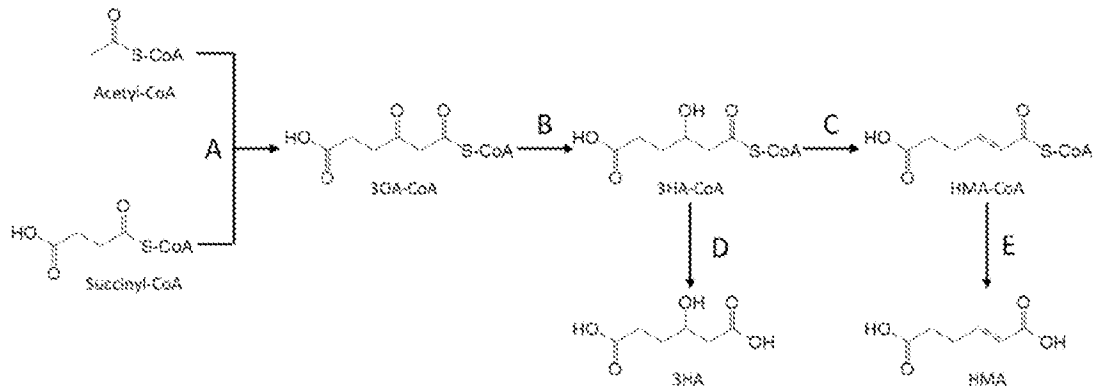
[化1]



[0024] 解糖系で得られるアセチル-C○AおよびTCA回路で得られるスクシニル-C○Aから3-ヒドロキシアジピン酸および／またはα-ヒドロムコン酸を生産する代謝経路を、代謝産物を化学式で表示したものを以下に示す。ここで、反応Aは、アセチル-C○Aおよびスクシニル-C○Aから3-オキソアジピル-C○Aを生成する反応を示す。反応Bは、3-オキソアジピル-C○Aを還元して3-ヒドロキシアジピル-C○Aを生成する反応を示す。反応Cは、3-ヒドロキシアジピル-C○Aから2,3-デヒドロアジピル-C○Aを生成する反応を示す。反応Dは、3-ヒドロキシアジピル-C○Aから3-ヒドロキシアジピン酸を生成する反応を示す。反応Eは、2,3-デヒドロアジピル-C○Aからα-ヒドロムコン酸を生成する反応を示す。以下の代謝経路での各反応を触媒する酵素、ならびに以下の代謝経路を利用した3-ヒドロキシアジピン酸および／またはα-ヒドロムコン酸を

生産する能力を有する微生物を創出する方法は、国際公開第2019/107516号に詳述されている。

[0025] [化2]



[0026] 本発明でピルビン酸からアセチルCoAを生成する反応を強化する1つの方法としては、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体(PDHc)が触媒する反応を強化することが挙げられる。強化の対象であるPDHcは、ピルビン酸からアセチルCoAを生成する触媒活性を有していれば特に制限されないが、例えば*Escherichia*属や*Serratia*属などのバクテリアでは、PDHcはpyruvate dehydrogenase (E1、EC1.2.4.1)、dihydrolipoyl transacetylase (E2、EC2.3.1.12)、およびdihydrolipoyl dehydrogenase (E3、EC1.8.1.4)から構成され、それぞれaceE、aceF、lpd遺伝子にコードされている。PDHcは全体としてピルビン酸、補酵素AおよびNAD⁺からアセチルCoA、CO₂、およびNADHを生成する反応を触媒する。これらのPDHc遺伝子群はオペロンを形成しており、PDHc遺伝子群の発現はpdhR遺伝子にコードされるPDHc転写抑制因子(PdhR)により制御されている。PdhR存在下ではPDHc遺伝子群の転写が抑制されるため、PDHcの発現量は低下する。一方、PdhR非存在下ではPDHc遺伝子群の転写は阻害されず、PDHcの発現量は増大する。

[0027] PDHcの具体例としては、*Escherichia coli* str

. K-12 substr. MG1655株由来のAceE (NCBI-ProteinID: NP_414656)、AceF (NCBI-ProteinID: NP_414657)、Lpd (NCBI-ProteinID: NP_414658) や、*Serratia grimesii* NBRC13537株由来のAceE (配列番号1)、AceF (配列番号2)、Lpd (配列番号3)、*Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* MGH 78578株由来のLpdA (NCBI-ProteinID: ABR75580) などが挙げられる。本発明で用いる微生物が有する遺伝子がコードするポリペプチドがPDHcであるかどうかは、NCBI (National Center for Biotechnology Information) やKEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) などにおける公共データベース上でBLAST検索を行えばよい。

[0028] PDHc転写抑制因子の具体例としては、*Escherichia coli* str. K-12 substr. MG1655株由来のPdhR (NCBI-ProteinID: NP_414655) や、*Serratia grimesii* NBRC13537株由来のPdhR (配列番号4) などが挙げられる。本発明で用いる微生物が有する遺伝子がコードするポリペプチドがPDHc転写抑制因子であるかどうかは、NCBI (National Center for Biotechnology Information) やKEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) などにおける公共データベース上でBLAST検索を行えばよい。

[0029] PDHcが触媒する反応を強化する方法としては、例えば、PDHcを構成する少なくとも1つ以上の酵素の発現量を増加させることが挙げられる。PDHcを構成する少なくとも1つ以上の酵素の発現量を増加させる方法としては、例えば、PDHc遺伝子群を構成する少なくとも1つ以上の遺伝子を宿主

微生物の菌体外から菌体内へと導入したり、当該遺伝子群のコピー数を増加させたり、当該遺伝子群のコーディング領域上流のプロモーター領域やリボソーム結合配列を改変させたりする方法などが挙げられる。これらの方法は単独で行ってもよいし、組み合わせてもよい。また、PDHcの発現量増加は、PDHc転写抑制因子の機能低下によっても行うことができる。

[0030] PDHcが触媒する反応を増強する別の方法としては、例えば、PDHcの活性を増強することが挙げられる。PDHcの活性を増強するには、PDHcを構成する少なくとも1つ以上の酵素の触媒活性を増強すればよい。PDHc活性を増強する具体的な方法としては、例えば、NADHに対する感受性を低減することが挙げられる。NADHに対する感受性が低減されたとは、例えば、その酵素のNADHに対する K_i 値がコントロールに対して2倍以上高いことを指す。NADHに対する感受性を低減したPDHcは、Kimら、J. Bacteriol. 190:3851-3858 (2008)に記載された*Escherichia coli* str. K-12由来Lpd (NCBI-ProteinID: NP_414658)におけるE354Kおよび／またはH322Y変異体や、嫌気環境下で機能することが知られている*Klebsiella pneumoniae*由来のLpd (NCBI-ProteinID: ABR75580) またはその一部を用いることで得られる。触媒活性が増強された当該酵素遺伝子は、製造に用いる微生物が本来有している野生型遺伝子と置き換えてもよいし、共存させてもよい。また、当該酵素遺伝子のコピー数を増加させたり、当該酵素遺伝子のコーディング領域上流のプロモーター領域やリボソーム結合配列を改変させてもよい。これらの方法は単独で行ってもよいし、組み合わせてもよい。

[0031] 本発明でピルビン酸からアセチルCoAを生成する反応を強化するもう1つの方法としては、ピルビン酸ギ酸リアーゼが触媒する反応を強化することが挙げられる。強化の対象であるピルビン酸ギ酸リアーゼは、ピルビン酸からアセチルCoAを生成する触媒活性を有していれば特に制限されないが、

例えば *Escherichia* 属や *Serratia* 属などのバクテリアでは、ピルビン酸ギ酸リアーゼ (Pyruvate formate-lyase、EC 2.3.1.54) はピルビン酸ギ酸リアーゼ活性化酵素 (Pyruvate formate-lyase activating enzyme、EC 1.97.1.4) 存在下で機能し、それぞれ *pflB*、*pflA* 遺伝子にコードされている。ピルビン酸ギ酸リアーゼはピルビン酸および補酵素 A からアセチル CoA およびギ酸を生成する反応を触媒する。*pflB* および *pflA* はオペロンを形成している。

[0032] ピルビン酸ギ酸リアーゼの具体例としては、*Escherichia coli* str. K-12 substr. MG1655 株由来の *PflB* (NCBI-ProteinID: NP_415423)、*PflA* (NCBI-ProteinID: NP_415422) や、*Serratia grimesii* NBRC13537 株由来の *PflB* (配列番号 5)、*PflA* (配列番号 6) などが挙げられる。本発明で用いる微生物が有する遺伝子がコードするポリペプチドがピルビン酸ギ酸リアーゼであるかどうかは、NCBI や KEGG などにおける公共データベース上で BLAST 検索を行えばよい。

[0033] ピルビン酸ギ酸リアーゼが触媒する反応を強化する方法としては、例えば、ピルビン酸ギ酸リアーゼ自体の触媒活性を増強することや、ピルビン酸ギ酸リアーゼの発現量を増加させることが挙げられるが、ピルビン酸ギ酸リアーゼの発現量を増加させることが好ましい。ピルビン酸ギ酸リアーゼの発現量を増加させる方法としては、例えば、ピルビン酸ギ酸リアーゼ遺伝子を宿主微生物の菌体外から菌体内へと導入したり、当該遺伝子のコピー数を増加させたり、当該遺伝子のコーディング領域上流のプロモーター領域やリボソーム結合配列を改変させたりする方法などが挙げられる。これらの方法は単独で行ってもよいし、組み合わせてもよい。

[0034] ところで、米国特許出願公開第 2017/0298363 A1 号明細書には、ホスホケトラーゼ経路を有する微生物の代謝を改変し、エネルギー効率

を向上させた非天然微生物を用いてアジピン酸を製造することが記載されている。当該文献には、解糖系経路での糖代謝はNADHが産生されるのに対し、ホスホケトラーゼ経路での糖代謝はNADHを産生しないため、ホスホケトラーゼ経路を有する微生物を用いて還元化合物を生産する場合には、当該微生物の代謝におけるNADH不足を改善するために、PDHcあるいはピルビン酸ギ酸リアーゼおよびNAD(P)H産生型ギ酸デヒドロゲナーゼの発現もしくは活性を増強することが記載されている。ここで、アジピン酸は3-ヒドロキシアジピン酸および α -ヒドロムコン酸より還元状態にある化合物であることから、当業者であれば、3-ヒドロキシアジピン酸および／または α -ヒドロムコン酸を製造する場合には、PDHcおよび／またはピルビン酸ギ酸リアーゼの反応を強化することは酸化還元バランスの不均衡を招き、当該化合物の収率が低下すると予想すると考える。しかし、本発明では、3-ヒドロキシアジピン酸および／または α -ヒドロムコン酸を製造する能力を有する微生物において、ピルビン酸からアセチルCoAを生成する反応を強化した遺伝子改変微生物を培養すると、3-ヒドロキシアジピン酸および／または α -ヒドロムコン酸の生産量が向上するという予想外の効果が得られる。

[0035] 本発明でピルビン酸キナーゼおよび／またはホスホトランスフェラーゼ酵素の機能を低下させるとは、これら酵素活性を低下させることである。機能を低下させる方法は特に限定されないが、例えば、当該酵素をコードする遺伝子を、遺伝子変異剤、紫外線照射などによる遺伝子変異処理、部位特異的変異法等による塩基配列の一部や全部の欠損処理、塩基配列へのフレームシフト変異の導入、塩基配列へのストップコドンの挿入等により、低下させることにより行うことができる。また、遺伝子組換え技術を用いて、塩基配列の全部又は一部を除去したり、他の塩基配列と置換したりすることでも低下させることができる。これらの中で好ましくは塩基配列の一部もしくは全体を除去させる方法が好ましい。

[0036] ピルビン酸キナーゼ(Pyk)はEC 2. 7. 1. 40に分類され、ホス

ホエノールピルビン酸を脱リン酸化し、ピルビン酸およびATPに変換する反応を触媒する酵素である。具体的には、*Escherichia coli* str. K-12 substr. MG1655株由来のPykF (NCBI-ProteinID: NP_416191)、PykA (NCBI-ProteinID: NP_416368)、および*Serratia grimesii* NBRC13537株由来のPykF (配列番号7)、PykA (配列番号

[0037] 8)などが挙げられる。本発明で用いる微生物がピルビン酸キナーゼをコードする遺伝子を2個以上有する場合は、全てのピルビン酸キナーゼの機能を低下させることが好ましい。本発明で用いる微生物が有する遺伝子がコードするポリペプチドがピルビン酸キナーゼであるかどうかは、NCBIやKEGGなどにおける公共データベース上でBLAST検索を行えばよい。

[0038] ホスホトランスフェラーゼ酵素 (Phosphotransferase system, PTS) は、ヘキソース、ヘキシトール、二糖などの炭水化物を細胞内に取り込むための主要な仕組みである。PTSにおいて、炭水化物は細胞内に取り込まれると同時にリン酸エステルへと変換され、一方リン酸供与体であるホスホエノールピルビン酸 (PEP) はピルビン酸へと変換される。

[0039] PTS酵素は、炭水化物の種類によらず機能するphosphoenolpyruvate sugar phosphotransferase enzyme Iおよびphospho carrier protein HPrの2種類の共通酵素と、特定の炭水化物に特異的なmembrane-bound sugar specific permeases (enzyme II) で構成される。enzyme IIはさらにsugar-specific IIA、IIB、およびIIC componentで構成される。enzyme IIの酵素は生物種によって個別あるいは複数ドメインタンパクとしてつながった状態で存在する。微生物では、phosphoenolpyruvate sugar phosphotransfer

ase enzyme I は pts I 遺伝子、phospho carrier protein HPr は pts H 遺伝子、グルコース特異的 II A は crr 遺伝子、同じくグルコース特異的 II B および II C は pts G 遺伝子にそれぞれコードされている。

[0040] pts G 遺伝子がコードする酵素は、EC 2. 7. 1. 199 に分類され、protein-Npi-phosphohistidine-D-glucose phosphotransferase と呼ばれ、Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655 株由来の Pts G (NCBI-Protein ID: NP_415619)、Serratia grimesii NBRC13537 株由来の Pts G (配列番号 9) などが挙げられる。本発明で用いる微生物が有する遺伝子がコードするポリペプチドが PTS 酵素であるかどうかは、NCBI や KEGG などのウェブサイトでも BLAST 検索を行えばよい。

[0041] 本発明では、上記の PTS 酵素のうち、1 種類の機能を低下させてもよいし、複数の機能を低下させてもよい。上記の PTS 酵素機能のいずれを低下させてもよいが、好ましくはグルコースの取り込みに関与する酵素機能を低下させることが好ましく、特に pts G の機能を低下させることが好ましい。pts G 遺伝子の具体例には、Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655 株由来の pts G (NCBI-Gene ID: 945651) および Serratia grimesii NBRC13537 株由来の pts G (配列番号 10) などが挙げられる。

[0042] 後述の通り、大腸菌は 3-ヒドロキシアジピン酸および α -ヒドロムコン酸を製造する能力を有する微生物であるが、特表 2008-527991 号公報では、大腸菌のピルビン酸キナーゼをコードする pyk F および pyk A 並びにホスホトランスフェラーゼ酵素をコードする pts G 遺伝子を欠失させた変異株を作製したこと、また当該変異株を嫌気的条件下で培養すると、コハク酸の収率が増加し、酢酸およびエタノールの収率が減少することが記

載されている。ここで、酢酸およびエタノールは、上記スキーム2の代謝経路に示すように、アセチル-C o Aから代謝される化合物である。つまり、特表2008-527991号公報では、大腸菌の *ptsG*、*pkF*、*pykA* 遺伝子を欠失させることにより、アセチル-C o Aの供給量が低下し、酢酸およびエタノールの収率が低下したと推定される。

[0043] 一方、本発明の方法で製造する3-ヒドロキシアジピン酸および／または α -ヒドロムコン酸は、前述のとおり、アセチル-C o Aおよびスクシニル-C o Aから生産される3-オキソアジピル-C o Aから複数の反応を介して代謝される化合物である。よって、特表2008-527991号公報の記載から、ピルビン酸キナーゼおよびホスホトランスフェラーゼ酵素の遺伝子を欠失させると、アセチル-C o Aの供給量の低下により3-ヒドロキシアジピン酸および／または α -ヒドロムコン酸の収率も低下することが予想される。しかし、本発明では、上記の予想に反して、ピルビン酸からアセチル-C o Aを生成する反応を強化し、3-オキソアジピル-C o Aを還元して3-ヒドロキシアジピル-C o Aを生成する反応を強化した遺伝子改変微生物において、ピルビン酸キナーゼおよび／またはホスホトランスフェラーゼ酵素の機能を低下させることで、3-ヒドロキシアジピン酸および／または α -ヒドロムコン酸の収率が向上する。

[0044] その他、本発明においては3-ヒドロキシアジピン酸および／または α -ヒドロムコン酸の生産能を増強するためにホスホエノールピルビン酸（PEP）カルボキシキナーゼ（Pck）の反応が強化されていることが好ましい。PEPカルボキシキナーゼの反応を強化するとは、例えば、本反応を触媒する酵素の活性を強化することが挙げられる。酵素の活性を強化する方法としては、例えば、本酵素遺伝子を宿主微生物の菌体外から菌体内へと導入したり、当該遺伝子のコピー数を増加させたり、当該遺伝子のコーディング領域上流のプロモーター領域やリボソーム結合配列を改変させたりする方法などが挙げられる。これらの方法は単独で行ってもよいし、組み合わせてもよいが、国際公開第2019/107516号（米国特許出願公開第2020

／291435A1号明細書）に記載される方法により本酵素遺伝子を宿主微生物の菌体外から菌体内へ導入することが好ましい。国際公開第2019／107516号（米国特許出願公開第2020／291435A1号明細書）は、参照により本明細書に組み入れられたものとする。

[0045] PEPカルボキシキナーゼはEC 4. 1. 1. 49に分類され、PEP、二酸化炭素およびADPからオキサロ酢酸およびATPを生成する反応を触媒する酵素である。具体的には、*Escherichia coli* str. K-12 substr. MG1655株由来のPck (NCBI-ProteinID: NP_417862)、および*Serratia grimesii* NBRC13537株由来のPckA__1（配列番号11）、PckA__2（配列番号12）などが挙げられる。

[0046] PEPカルボキシキナーゼは、生理的には糖新生において脂肪酸からグルコースを生産する際の主要な反応を担っている。ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼが触媒する反応は可逆反応であるが、3-ヒドロキシアジピン酸および／または α -ヒドロムコン酸の生産において、当該反応はホスホエノールピルビン酸および二酸化炭素をオキサロ酢酸に変換する方向に進行する。

[0047] 本発明で用いる酵素遺伝子がコードするポリペプチドがホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼであるかどうかは、NCBIやKEGGなどのウェブサイトではBLAST検索を行えばよい。

[0048] 特開2015-146810号公報には、代謝ネットワークモデルを用いてアセチル-CoAおよびスクシニル-CoAからアジピン酸を高収率で生産する微生物株をインシリコで作製するにあたり、PEPカルボキシキナーゼ遺伝子の欠損が有効であることが記載されている。また、特表2015-504688号公報には、PEPを経由して生合成されるムコン酸の製造において、PEPプールの増加を目的としてPEPカルボキシキナーゼの活性を強化させることが記載されている。さらに、米国特許出願公開第2017／0298363A1号明細書には、PEPを経由して生合成されるアジピ

ン酸の製造において、PEPの可用性を向上させるためにPEPカルボキシキナーゼの活性を強化させることが記載されている。すなわち、PEPカルボキシキナーゼが触媒する反応はオキサロ酢酸からPEPを生成する方向に進行すると記載された当該記載から、当業者であれば、PEPカルボキシキナーゼ遺伝子の発現増強による同酵素活性の強化は、3-ヒドロキシアジピン酸および／または α -ヒドロムコン酸の収率を低下させると予想すると考える。しかし、本発明では、上記の予想に反して、3-ヒドロキシアジピン酸および／または α -ヒドロムコン酸を製造する能力を有する微生物において、ピルビン酸からアセチルCoAを生成する反応を強化し、3-オキソアジピルーCoAを還元して3-ヒドロキシアジピルーCoAを生成する反応を強化し、ならびにピルビン酸キナーゼおよび／またはホスホトランスフェラーゼ酵素の機能を低下させ、かつホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼの反応を強化した遺伝子改変微生物を培養すると、3-ヒドロキシアジピン酸および／または α -ヒドロムコン酸の生産量が向上することを見出した。

[0049] また、本発明では3-オキソアジピルーCoAを還元して3-ヒドロキシアジピルーCoAを生成する反応を強化することが好ましい。3-オキソアジピルーCoAを還元して3-ヒドロキシアジピルーCoAを生成する反応を強化するとは、例えば、本反応を触媒する酵素の活性を強化することが挙げられる。酵素の活性を強化する方法としては、例えば、本酵素遺伝子を宿主微生物の菌体外から菌体内へと導入したり、当該遺伝子のコピー数を増加させたり、当該遺伝子のコーディング領域上流のプロモーター領域やリボソーム結合配列を改変させたりする方法などが挙げられる。これらの方法は単独で行ってもよいし、組み合わせてもよいが、国際公開第2019/107516号（米国特許出願公開第2020/291435A1号明細書）に記載される方法により本酵素遺伝子を宿主微生物の菌体外から菌体内へ導入することが好ましい。

[0050] 3-オキソアジピルーCoAを還元して3-ヒドロキシアジピルーCoA

を生成する反応を触媒する3-オキソアジピル-CοAレダクターゼの具体例としては、3-ヒドロキシアシル-CοAデヒドロゲナーゼとしてEC 1. 1. 1. 35に分類される酵素、3-ヒドロキシブチリル-CοAデヒドロゲナーゼとしてEC 1. 1. 1. 157に分類される酵素、および国際公開第2019/107516号（米国特許出願公開第2020/291435A1号明細書）に開示された配列番号1～6および213のいずれかのアミノ酸配列に対して70%以上の配列同一性を有し、かつ3-オキソアジピル-CοAレダクターゼ活性を有する酵素などが挙げられる。具体例として、*Pseudomonas putida* KT2440株由来のPaaH（NCBI-ProteinID: NP_745425. 1）、*Escherichia coli* str. K-12 substr. MG1655株由来のPaaH（NCBI-ProteinID: NP_415913. 1）、*Acinetobacter baylyi* ADP1株由来のDcaH（NCBI-ProteinID: CAG68533. 1）、*Serratia plymuthica* NBRC102599株由来のPaaH（NCBI-ProteinID: WP_063197120）、*Serratia marcescens* ATCC13880株由来のポリペプチド（NCBI-ProteinID: KFD11732. 1）が3-オキソアジピル-CοAを還元して3-ヒドロキシアジピル-CοAを生成する反応を触媒する酵素として挙げられる。

[0051] また、本発明の遺伝子改変微生物は、3-ヒドロキシアジピン酸および／または α -ヒドロムコン酸の生産性の観点から、ホスホケトラーゼ経路による糖代謝をしない微生物であることが好ましい。このような微生物は自然界に存在しており、ホスホケトラーゼ経路によって糖代謝をしない本発明の遺伝子微生物を創出する際の宿主として好ましく利用できる。また、本発明の遺伝子改変微生物を創出後に、当業者に周知の手法により当該微生物のホスホケトラーゼ遺伝子をノックアウトする方法によってホスホケトラーゼ経路による糖代謝をしない微生物を創出してもよい。

[0052] 3-ヒドロキシアジピン酸を製造する能力を元来有する微生物としては、以下の微生物が挙げられる。

[0053] *Escherichia fergusonii*、*Escherichia coli*などの*Escherichia*属。

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

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

*Hafnia alvei*などの*Hafnia*属。

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

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

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

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

Acinetobacter baylyi、*Acinetobacte*

*r radioresistens*などの*Acinetobacter*属。

*Alcaligenes faecalis*などの*Alcaligenes*属。

*Nocardioides albus*などの*Nocardioides*属。

*Brevibacterium iodinum*などの*Brevibacterium*属。

*Delftia acidovorans*などの*Delftia*属。

*Shimwellia blattae*などの*Shimwellia*属。

*Aerobacter cloacae*などの*Aerobacter*属。

*Rhizobium radiobacter*などの*Rhizobium*属。

[0054] 前記3-ヒドロキシアジピン酸を製造する能力を元来有する微生物の中でも、本発明では、ホスホケトラーゼ経路による糖代謝をしない微生物である*Escherichia*属、*Serratia*属、*Hafnia*属、*Corynebacterium acetoacidophilum*、*Corynebacterium acetoglutamicum*、*Corynebacterium ammoniagenes*、*Corynebacterium glutamicum*などの*Corynebacterium*属、*Brevibacterium*属、*Shimwellia*属、*Aerobacter*属が好ましく、*Escherichia*属または*Serratia*属に属する微生物がより好ましく利用される。

[0055] α -ヒドロムコン酸を製造する能力を元来有すると推定される微生物としては、以下の微生物が挙げられる。

[0056] *Escherichia fergusonii*、*Escherichia coli*などの*Escherichia*属。

Serratia grimesii、*Serratia ficaria*、*Serratia fonticola*、*Serratia odor*

ifera、*Serratia plymuthica*、*Serratia entomophila*または*Serratia nematodiphila*などの*Serratia*属。

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

*Hafnia alvei*などの*Hafnia*属。

*Bacillus badius*などの*Bacillus*属。

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

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

*Alcaligenes faecalis*などの*Alcaligenes*属。

*Delftia acidovorans*などの*Delftia*属。

*Shimwellia blattae*などの*Shimwellia*属。

[0057] 前記 α -ヒドロムコン酸を製造する能力を元来有する微生物の中でも、本発明では、ホスホケトラーゼ経路による糖代謝をしない微生物である*Escherichia*属、*Serratia*属、*Hafnia*属、*Shimwellia*属が好ましく、*Escherichia*属または*Serratia*属に属する微生物がより好ましく利用される。

[0058] 本発明の遺伝子改変微生物が、3-ヒドロキシアジピン酸を製造する能力を元来有していない場合には、反応A、B、Dを触媒する酵素をコードする核酸を適当に組み合わせて微生物に導入することで、これらの製造能を付与することができ、また、 α -ヒドロムコン酸を製造する能力を元来有していない場合には、反応A、B、C、Eを触媒する酵素をコードする核酸を適当

に組み合わせて微生物に導入することで、これらの生成能を付与することができる。

[0059] 本発明で遺伝子改変微生物を得るための宿主として用いることができる微生物は、遺伝子改変が可能な微生物であれば特に制限はなく、3-ヒドロキシアジピン酸および／または α -ヒドロムコン酸を製造する能力を有する微生物であってもそうでない微生物であってもよいが、*Escherichia*属、*Serratia*属、*Hafnia*属、*Pseudomonas*属、*Corynebacterium*属、*Bacillus*属、*Streptomyces*属、*Cupriavidus*属、*Acinetobacter*属、*Alcaligenes*属、*Brevibacterium*属、*Delftia*属、*Shimwellia*属、*Aerobacter*属、*Rhizobium*属、*Thermobifida*属、*Clostridium*属、*Schizosaccharomyces*属、*Kluyveromyces*属、*Pichia*属および*Candida*属に属する微生物が好ましく、*Escherichia*属、*Serratia*属、*Hafnia*属、*Pseudomonas*属に属する微生物がより好ましく、*Escherichia*属または*Serratia*属に属する微生物が特に好ましい。

[0060] 本発明の遺伝子改変微生物を創出するために遺伝子を導入する方法は特に限定されず、微生物内で自律複製可能な発現ベクターに当該遺伝子を組み込み、宿主微生物に導入する方法や、微生物のゲノムに当該遺伝子を組み込む方法などを用いることができる。

[0061] 導入する遺伝子は1種類でも複数種類でもよい。また遺伝子の導入と発現の増強を組み合わせてもよい。

[0062] 本発明で発現させる遺伝子を発現ベクターまたは宿主微生物ゲノムに組み込む場合、当該発現ベクターまたはゲノム組み込み用核酸はプロモーター、リボソーム結合配列、発現させる遺伝子、転写終結配列により構成されることが好ましい。また、プロモーター活性を制御する遺伝子が含まれていてもよい。

- [0063] 本発明で用いるプロモーターは、宿主微生物内で遺伝子を発現させられるものであれば特に限定されないが、例えば *g a p* プロモーター、*t r p* プロモーター、*l a c* プロモーター、*t a c* プロモーター、*T 7* プロモーターなどが挙げられる。
- [0064] 本発明で発現ベクターを用いて遺伝子の導入や、遺伝子の発現の増強を行う場合は、当該微生物中で自律複製可能であれば特に限定されないが、例えば *p B B R 1 M C S* ベクター、*p B R 3 2 2* ベクター、*p M W* ベクター、*p E T* ベクター、*p R S F* ベクター、*p C D F* ベクター、*p A C Y C* ベクター、および上述のベクターの派生型などが挙げられる。
- [0065] 本発明でゲノム組み込み用核酸を用いて遺伝子の導入や、遺伝子の発現の増強を行う場合は、部位特異的相同組換えを用いて導入する。部位相同組換えの方法は特に限定されないが、例えば λ *Red* レコンビナーゼおよび *F L P* レコンビナーゼを用いる方法 (*P r o c N a t l A c a d S c i U S A*, 2000 Jun 6; 97 (12): 6640-6645.)、 λ *Red* レコンビナーゼおよび *s a c B* 遺伝子を用いる方法 (*B i o s c i B i o t e c h n o l B i o c h e m*, 2007 Dec; 71 (12): 2905-11.) が挙げられる。
- [0066] 発現ベクターまたはゲノム組み込み用核酸の導入方法は、微生物に核酸を導入する方法であれば特に限定されないが、例えばカルシウムイオン法 (*J o u r n a l o f M o l e c u l a r B i o l o g y*, 53, 159 (1970))、エレクトロポレーション法 (*N M C a l v i n, P C H a n a w a l t. J. B a c t e r i o l*, 170 (1988), p p. 2796-2801) などが挙げられる。
- [0067] 本発明の遺伝子改変微生物は、通常の微生物が利用し得る炭素源を発酵原料として含有する培地、好ましくは液体培地中において培養する。当該遺伝子改変微生物が利用し得る炭素源の他には、窒素源、無機塩および必要に応じてアミノ酸やビタミンなどの有機微量栄養素を程よく含有した培地を用いる。上記栄養素を含有していれば天然培地、合成培地のいずれでも利用できる。

る。

- [0068] 発酵原料とは、当該遺伝子改変微生物が代謝し得る原料である。「代謝」とは、微生物が細胞外から取り入れた、あるいは細胞内で別の化学化合物より生じたある化学化合物が、酵素反応により別の化学化合物へと変換されることを指す。炭素源としては、糖類を好ましく用いることができる。糖類の具体例としては、グルコース、シュクロース、フルクトース、ガラクトース、マンノース、キシロース、アラビノース等の単糖類、これら単糖類が結合した二糖類、多糖類、およびこれらを含む澱粉糖化液、糖蜜、セルロース含有バイオマス糖化液などが挙げられる。
- [0069] 上記に挙げた炭素源は、一種類のみ用いてもよいし、組み合わせて用いてもよいが、特にグルコースを含む培地で培養することが好ましい。炭素源の添加において、培地中の炭素源の濃度は、特に限定されず、炭素源の種類などに応じて適宜設定することができる。グルコースの好ましい濃度は、5～300 g/Lである。
- [0070] 当該遺伝子改変微生物の培養に用いる窒素源としては、例えば、アンモニアガス、アンモニア水、アンモニウム塩類、尿素、硝酸塩類、その他補助的に使用される有機窒素源、例えば、油粕類、大豆加水分解液、カゼイン分解物、その他のアミノ酸、ビタミン類、コーンステープリカー、酵母または酵母エキス、肉エキス、ペプトン等のペプチド類、各種発酵菌体およびその加水分解物などが使用できる。培地中の窒素源の濃度は、特に限定されないが、好ましくは、0.1～50 g/Lである。
- [0071] 当該遺伝子改変微生物の培養に用いる無機塩類としては、例えば、リン酸塩、マグネシウム塩、カルシウム塩、鉄塩およびマンガン塩等を適宜添加使用することができる。
- [0072] 3-ヒドロキシアジピン酸および/または α -ヒドロムコン酸を生産するための遺伝子改変微生物の培養条件は、前記成分組成の培地、培養温度、攪拌速度、pH、通気量、植菌量などを、当該遺伝子改変微生物の種類および外部条件などに応じて、適宜調節あるいは選択して設定する。

- [0073] 培養におけるpHの範囲は当該遺伝子改変微生物が生育することができれば特に制限はないが、好ましくはpH5～8、より好ましくはpH5.5～6.8である。
- [0074] 培養における通気条件の範囲は3-ヒドロキシアジピン酸および／または α -ヒドロムコン酸を生産することができれば特に制限はないが、当該微生物変異体を良好に生育させるために、少なくとも培養開始時において培養容器内の気相および／または液相に酸素が残存していることが好ましい。
- [0075] 液体培養において発泡がある場合には、鉱油、シリコーン油および界面活性剤などの消泡剤を適宜培地に配合することができる。
- [0076] 前記微生物の培養物中に、3-ヒドロキシアジピン酸および／または α -ヒドロムコン酸が回収可能な量まで生産された後、生産された当該生産物を回収することができる。生産された当該生産物の回収、例えば単離は、蓄積量が適度に高まった時点で培養を停止し、その培養物から、発酵生産物を採取する一般的な方法に準じて行うことができる。具体的には、遠心分離、ろ過などにより菌体を分離したのち、カラムクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、活性炭処理、結晶化、膜分離、蒸留などにより、当該生産物を培養物から単離することができる。より具体的には、当該生産物の塩に酸成分を添加して析出物を回収する方法、培養物を逆浸透膜やエバポレーターなどを用いた濃縮操作により水を除去して当該生産物の濃度を高めた後、冷却結晶化や断熱結晶化により当該生産物および／または当該生産物の塩の結晶を析出させ、遠心分離やろ過などにより当該生産物および／または当該生産物の塩の結晶を得る方法、培養物にアルコールを添加して当該生産物をエステルとした後、蒸留操作により当該生産物のエステルを回収後、加水分解により当該生産物を得る方法等を挙げることができるがこれらに限定されるものではない。また、これらの回収方法は生成物の物性などにより適当に選択して最適化することができる。

実施例

- [0077] 以下、実施例を挙げて本発明を具体的に説明する。

[0078] 参考例 1

アセチル-CoA およびスクシニル-CoA から 3-OA-CoA および補酵素 A を生成する反応（反応 A）を触媒する酵素、3-OA-CoA から 3-HA-CoA を生成する反応（反応 B）、および 3-HA-CoA から 3-ヒドロキシアジピン酸を生成する反応（反応 D）かつ HMA-CoA から α -ヒドロムコン酸を生成する反応（反応 E）を触媒する酵素を発現するプラスミドの作製

[0079] 大腸菌内で自律複製可能なベクター pBBR1MCS-2 (ME Kovach, (1995), Gene 166: 175-176) を XhoI で切断し、pBBR1MCS-2/XhoI を得た。当該ベクターに構成的な発現プロモーターを組み込むために、Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655 のゲノム DNA を鋳型として gapA (NCBI-GeneID: NC_000913.3) の上流域 200b (配列番号 13) を PCR 増幅するためのプライマーを設計し (配列番号 14、15)、常法に従って PCR 反応を行った。得られた断片および pBBR1MCS-2/XhoI を、In-Fusion HD Cloning Kit (タカラバイオ株式会社製) を用いて連結し、大腸菌株 DH5 α に導入した。得られた組換え大腸菌株から当該プラスミドを抽出し、常法により塩基配列を確認したプラスミドを pBBR1MCS-2::Pgap とした。続いて pBBR1MCS-2::Pgap を ScaI で切断し、pBBR1MCS-2::Pgap/ScaI を得た。反応 A を触媒する酵素をコードする遺伝子を増幅するために、Pseudomonas putida KT2440 株のゲノム DNA を鋳型としてアシルトランスフェラーゼ遺伝子 pcaF (NCBI-GeneID: 1041755) の全長を PCR 増幅するためのプライマーを設計し (配列番号 16、17)、常法に従って PCR 反応を行った。得られた断片および pBBR1MCS-2::Pgap/ScaI を、In-Fusion HD Cloning Kit を用いて連結し、大腸菌株 DH5 α に導入した。得ら

れた組換え株から当該プラスミドを抽出し、常法により塩基配列を確認したプラスミドを pBBR1MCS-2::AT とした。続いて pBBR1MCS-2::AT を HpaI で切断し、pBBR1MCS-2::AT/HpaI を得た。反応 D および反応 E を触媒する酵素をコードする遺伝子を増幅するために、*Pseudomonas putida* KT2440 株のゲノム DNA を鋳型として CoA トランスフェラーゼ遺伝子 pcaI および pcaJ (NCBI-GeneID: 1046613、1046612) の全長を含む連続した配列を PCR 増幅するためのプライマーを設計し (配列番号 18、19)、常法に従って PCR 反応を行った。得られた断片および pBBR1MCS-2::AT/HpaI を、In-Fusion HD Cloning Kit を用いて連結し、大腸菌株 DH5 α に導入した。得られた組換え株から当該プラスミドを抽出し、常法により塩基配列を確認したプラスミドを pBBR1MCS-2::ATCT とした。

[0080] pBBR1MCS-2::ATCT を ScaI で切断し、pBBR1MCS-2::ATCT/ScaI を得た。*Serratia marcescens* ATCC13880 株のゲノム DNA を鋳型として、配列番号 20 に記載の核酸を増幅するためのプライマーを設計し (配列番号 21、22)、常法に従って PCR 反応を行った。得られた断片および pBBR1MCS-2::ATCT/ScaI を、In-Fusion HD Cloning Kit (タカラバイオ株式会社製) を用いて連結し、大腸菌株 DH5 α に導入した。得られた組換え株から当該プラスミドを抽出し、常法により塩基配列を確認したプラスミドを pBBR1MCS-2::ATCTOR とした。

[0081] 実施例 1

ピルビン酸キナーゼの機能が低下した *Serratia* 属微生物変異体の作製

Serratia 属微生物のピルビン酸キナーゼをコードする遺伝子である pykF および pykA を欠損させ、ピルビン酸キナーゼの機能が低下し

た *Serratia* 属微生物変異体を作製した。

[0082] *pykF* および *pykA* の欠損方法は、*Proc Natl Acad Sci USA*, 2000 Jun 6; 97 (12): 6640-6645. に記載の方法に従った。

[0083] *pykF* 欠損

pKD4 を鋳型として、プライマーとして配列番号 23 および 24 のオリゴDNAを用いてPCRを行い、*pykF* 欠損のためのPCR断片を得た。*FRT recombinase* 発現プラスミドである *pKD46* を、*Serratia grimesii* NBRC13537株に導入し、アンピシリン耐性株を取得した。得られた株をアンピシリン 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を含む 5 mL の LB 培地に植菌し、30°C で 1 日振とう培養した。培養液 0.5 mL をアンピシリン 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ およびアラビノース 50 mM を含む 50 mL の LB 培地に植菌し、30°C で 2 時間、回旋培養した。培養液を 20 分間氷冷したのち、菌体を 10% (w/w) グリセロールで 3 回洗浄した。洗浄後のペレットを 100 μL の 10% (w/w) グリセロールで懸濁し、5 μL の PCR 断片と混合したのちエレクトロポレーションキュベット内で 10 分間氷冷した。*Gene pulser* (Bio-rad 社製) を用いてエレクトロポレーションを実施した (3 kV、200 Ω 、25 μF) 後、即座に 1 mL の SOC 培地を添加し、30°C で 2 時間振とう培養した。全量をカナマイシン 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を含む LB 寒天培地に塗布し、30°C で 1 日インキュベートした。得られたカナマイシン耐性株を用いてコロニーダイレクトPCRを行い、バンド長より目的遺伝子の欠損およびカナマイシン耐性遺伝子の挿入を確認した。プライマーは配列番号 25 および 27 のオリゴDNAを使用した。

[0084] 続いて当該カナマイシン耐性株を 5 mL の LB 培地に植菌し、37°C にて 2 回継代培養することで *pKD46* を脱落させ、アンピシリン感受性株を得た。アンピシリン感受性株に *pCP20* を導入し、再びアンピシリン耐性株を取得した。得られた株を 40°C で培養した後にコロニーダイレクトPCR

を行い、バンド長よりカナマイシン耐性遺伝子の脱落を確認した。プライマーは配列番号26および27のオリゴDNAを使用した。カナマイシン感受性株を5 mLのLB培地に植菌し、37℃にて2回継代培養することでpCP20を脱落させた。得られた株をSgΔPfとした。

[0085] pykA欠損

pKD4を鋳型として、プライマーとして配列番号28および29のオリゴDNAを用いてPCRを行い、pykA欠損用PCR断片を得た。

[0086] pykF欠損株の作製と同様の方法にて、*Serratia grimesii* NBRC13537ΔpykF株のpykAを欠損させた。当該株にpKD46を導入したのち、pykA欠損用PCR断片を導入した。得られたカナマイシン耐性株を用いてコロニーダイレクトPCRを行い、バンド長より目的遺伝子の欠損およびカナマイシン耐性遺伝子の挿入を確認した。プライマーは配列番号25および31のオリゴDNAを使用した。

[0087] 続いてpKD46を脱落させ、アンピシリン感受性株を得た。アンピシリン感受性株にpCP20を導入し、再びアンピシリン耐性株を取得した。得られた株を用いてコロニーダイレクトPCRを行い、バンド長よりカナマイシン耐性遺伝子の脱落を確認した。プライマーは配列番号30および31のオリゴDNAを使用した。カナマイシン感受性株よりpCP20を脱落させた。得られた株をSgΔPPとした。

[0088] 実施例2

ホスホトランスフェラーゼ酵素の機能が低下した*Serratia*属微生物変異体の作製

*Serratia*属微生物のホスホトランスフェラーゼをコードする遺伝子であるptsGを欠損させ、ホスホトランスフェラーゼ酵素の機能が低下した*Serratia*属微生物変異体を作製した。

[0089] pKD4を鋳型として、プライマーとして配列番号32および33のオリゴDNAを用いてPCRを行い、ptsG欠損のためのPCR断片を得た。*Serratia grimesii* NBRC13537およびSgΔP

PにpKD46を導入したのち、ptsG欠損用PCR断片を導入した。得られたカナマイシン耐性株を用いてコロニーダイレクトPCRを行い、バンド長より目的遺伝子の欠損およびカナマイシン耐性遺伝子の挿入を確認した。プライマーは配列番号25および35のオリゴDNAを使用した。

[0090] 続いてpKD46を脱落させ、アンピシリン感受性株を得た。アンピシリン感受性株にpCP20を導入し、再びアンピシリン耐性株を取得した。得られた株を用いてコロニーダイレクトPCRを行い、バンド長よりカナマイシン耐性遺伝子の脱落を確認した。プライマーは配列番号34および35のオリゴDNAを使用した。カナマイシン感受性株よりpCP20を脱落させた。得られた株をそれぞれSgΔGおよびSgΔPPGとした。

[0091] 実施例3

ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体転写抑制因子の機能が低下した*Serratia*属微生物変異体の作製

*Serratia*属微生物のピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体転写抑制因子をコードする遺伝子であるpdhR（配列番号36）を欠損させ、PDHcの発現量が増大した*Serratia*属微生物変異体を作製した。

[0092] pKD4を鋳型として、プライマーとして配列番号37および38のオリゴDNAを用いてPCRを行い、pdhR欠損のためのPCR断片を得た。SgΔPP、SgΔG、SgΔGPPそれぞれにpKD46を導入したのち、pdhR欠損用PCR断片を導入した。得られたカナマイシン耐性株を用いてコロニーダイレクトPCRを行い、バンド長より目的遺伝子の欠損およびカナマイシン耐性遺伝子の挿入を確認した。プライマーは配列番号25および40のオリゴDNAを使用した。

[0093] 続いてpKD46を脱落させ、アンピシリン感受性株を得た。アンピシリン感受性株にpCP20を導入し、再びアンピシリン耐性株を取得した。得られた株を用いてコロニーダイレクトPCRを行い、バンド長よりカナマイシン耐性遺伝子の脱落を確認した。プライマーは配列番号39および40のオリゴDNAを使用した。カナマイシン感受性株よりpCP20を脱落させ

た。得られた株をそれぞれ *Sg* Δ P P R、*Sg* Δ G R、*Sg* Δ G P P Rとした。

[0094] 実施例 4

ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体転写抑制因子の機能が低下し、かつ反応 A、B、D および E を触媒する酵素を発現するプラスミドを導入した *Serratia* 属微生物変異体の作製

実施例 3 で作製した株に対して、参考例 1 で作製したプラスミドをそれぞれ導入し、*Serratia* 属微生物変異体を作製した。

[0095] *Sg* Δ P P R、*Sg* Δ G R、*Sg* Δ G P P R を 5 mL の L B 培地に植菌し、30℃で1日振とう培養した。培養液 0.5 mL を 5 mL の L B 培地に植菌し、30℃で2時間、振とう培養した。培養液を20分間氷冷したのち、菌体を10% (w/w) グリセロールで3回洗浄した。洗浄後のペレットを100 μ L の10% (w/w) グリセロールで懸濁し、1 μ L の p B B R 1 M C S - 2 : : A T C T O R と混合したのちエレクトロポレーションキュベット内で10分間氷冷した。Gene pulser (Bio-rad 社製) を用いてエレクトロポレーションを実施した (3 k V、200 Ω 、25 μ F) 後、即座に1 mL の S O C 培地を添加し、30℃で1時間振とう培養した。50 μ L をカナマイシン 25 μ g / mL を含む L B 寒天培地に塗布し、30℃で1日インキュベートした。得られた株をそれぞれ *Sg* Δ P P R / 3 H A、*Sg* Δ G R / 3 H A、*Sg* Δ G P P R / 3 H A とした。

[0096] 実施例 5

ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体転写抑制因子の機能が低下し、かつ反応 A、B、D および E を触媒する酵素を発現するプラスミドを導入した *Serratia* 属微生物変異体を用いた 3-ヒドロキシアジピン酸および α -ヒドロムコン酸の生産試験

実施例 4 で作製した *Serratia* 属微生物変異体を用いて、3-ヒドロキシアジピン酸および α -ヒドロムコン酸の生産試験を行った。

[0097] pH 7 に調整した培地 I (Bactotripton (Difco Labo

r a t o r i e s 社製) 10 g/L、B a c t o 酵母エキス (D i f c o
L a b o r a t o r i e s 社製) 5 g/L、塩化ナトリウム 5 g/L、カナ
マイシン 25 μ g/mL) 5 mL (ϕ 18 mm ガラス試験管、アルミ栓) に
、実施例 2 で作製した変異体を一白金耳植菌し、30℃、120 min⁻¹
で 24 時間振とう培養した。当該培養液 0.25 mL を pH 6.5 に調整し
た培地 II (グルコース 50 g/L、硫酸アンモニウム 1 g/L、リン酸カ
リウム 50 mM、硫酸マグネシウム 0.025 g/L、硫酸鉄 0.0625
mg/L、硫酸マンガン 2.7 mg/L、塩化カルシウム 0.33 mg/L
、塩化ナトリウム 1.25 g/L、B a c t o トリプトン 2.5 g/L、B
a c t o 酵母エキス 1.25 g/L、カナマイシン 25 μ g/mL) 5 mL
(ϕ 18 mm ガラス試験管、アルミ栓) に添加し、30℃で振とう培養した
。

[0098] 基質および生成物の定量分析

当該培養液より菌体を遠心分離した上清を M i l l e x - G V (0.22
 μ m、P V D F、M e r c k 社製) を用いて膜処理し、透過液を以下の方法
で分析することで培養上清中に蓄積した 3-ヒドロキシアジピン酸および α -
ヒドロムコン酸、他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃
度を定量した。さらに、その結果を元に以下の式 (1) を用いて算出した 3-
ヒドロキシアジピン酸および α -ヒドロムコン酸の収率を表 1 に示す。

[0099] 収率 (%) = 生成物の生成量 (mol) / 糖の消費量 (mol) $\times$ 100
・ ・ 式 (1) 。

(LC-MS/MS による 3-ヒドロキシアジピン酸および α -ヒドロム
コン酸の定量分析)

・ HPLC: 1290 Infinity (Agilent Technologies 社製)

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

移動相: 0.1% ギ酸水溶液 / メタノール = 70 / 30

流速：0.3 mL／分

カラム温度：40℃

LC検出器：1260DAD VL+ (210nm)

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

イオン化法：ESI ネガティブモード。

[0100] HPLCによる有機酸の定量分析

・HPLC：LC-10A (株式会社島津製作所製)

カラム：Shim-pack SPR-H (株式会社島津ジーエルシー製)、長さ250mm、内径7.8mm、粒径8μm

Shim-pack SCR-101H (株式会社島津ジーエルシー製) 長さ250mm、内径7.8mm、粒径10μm

移動相：5mM p-トルエンスルホン酸

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

流速：0.8 mL／min

カラム温度：45℃

検出器：CDD-10Avp (株式会社島津製作所製)。

[0101] HPLCによる糖の定量分析

・HPLC：Shimazu Prominence (株式会社島津製作所製)

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

移動相：0.05M 硫酸水溶液

流速：0.6 mL／min

カラム温度：65℃

検出器：RID-10A (株式会社島津製作所製)。

[0102] 参考例2

ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体転写抑制因子の機能が低下しておらず、かつ反応A、B、DおよびEを触媒する酵素を発現するプラスミドを導入した*Serratia*属微生物変異体の作製

実施例1、2で作製した株に対して、実施例4と同様の方法にて、参考例1で作製したプラスミドをそれぞれ導入し、*Serratia*属微生物変異体を作製した。得られた株をそれぞれSgΔPP/3HA、SgΔG/3HA、SgΔGPP/3HAとした。

[0103] 比較例1

ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体転写抑制因子の機能が低下しておらず、かつ反応A、B、DおよびEを触媒する酵素を発現するプラスミドを導入した*Serratia*属微生物変異体を用いた3-ヒドロキシアジピン酸およびα-ヒドロムコン酸の生産試験

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

[0104] 表1より、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体転写抑制因子の機能が低下し、かつ反応A、B、DおよびEを触媒する酵素を発現するプラスミドを導入した*Serratia*属微生物変異体では、3-ヒドロキシアジピン酸およびα-ヒドロムコン酸の収率が向上することがわかった。

[0105] [表1]

	株	3HA収率 (%)	HMA収率 (%)
比較例1	SgΔPP/3HA	4.73	0.104
	SgΔG/3HA	0.934	0.058
	SgΔGPP/3HA	2.43	0.126
実施例5	SgΔPPR/3HA	5.81	0.160
	SgΔGR/3HA	1.69	0.066
	SgΔGPPR/3HA	14.4	0.311

[0106] 実施例6

ピルビン酸キナーゼの機能が低下した *Echerichia* 属微生物変異体の作製

Echerichia 属微生物のピルビン酸キナーゼをコードする遺伝子である *pykF* (NCBI-GeneID: 946179) および *pykA* (NCBI-GeneID: 946527) を欠損させ、ピルビン酸キナーゼの機能が低下した *Echerichia* 属微生物変異体を作製した。

[0107] *pykF* および *pykA* の欠損方法は、Proc Natl Acad Sci USA, 2000 Jun 6; 97 (12): 6640-6645. に記載の方法に従った。

[0108] *pykF* 欠損

pKD4 を鋳型として、プライマーとして配列番号 41 および 42 のオリゴDNAを用いてPCRを行い、*pykF* 欠損のためのPCR断片を得た。FRT recombinase 発現プラスミドである pKD46 を、*Escherichia coli* str. K-12 substr. MG1655 株に導入し、アンピシリン耐性株を取得した。得られた株をアンピシリン 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を含む 5 mL の LB 培地に植菌し、30°C で 1 日振とう培養した。培養液 0.5 mL をアンピシリン 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ およびアラビノース 50 mM を含む 50 mL の LB 培地に植菌し、30°C で 2 時間、回旋培養した。培養液を 20 分間氷冷したのち、菌体を 10% (w/w) グリセロールで 3 回洗浄した。洗浄後のペレットを 100 μL の 10% (w/w) グリセロールで懸濁し、5 μL の PCR 断片と混合したのちエレクトロポレーションキュベット内で 10 分間氷冷した。Gene pulser (Bio-rad 社製) を用いてエレクトロポレーションを実施した (3 kV、200 Ω 、25 μF) 後、即座に 1 mL の SOC 培地を添加し、30°C で 2 時間振とう培養した。全量をカナマイシン 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を含む LB 寒天培地に塗布し、30°C で 1 日インキュベートした。得られたカナマイシン耐性株を用いてコロニーダイレクトPCRを行い、バンド長より目的遺伝子の欠損およびカナマイシン耐性遺伝子の挿入を確認した。プライマーは配列

番号25および44のオリゴDNAを使用した。

[0109] 続いて当該カナマイシン耐性株を5 mLのLB培地に植菌し、37℃にて2回継代培養することでpKD46を脱落させ、アンピシリン感受性株を得た。アンピシリン感受性株にpCP20を導入し、再びアンピシリン耐性株を取得した。得られた株を40℃で培養した後にコロニーダイレクトPCRを行い、バンド長よりカナマイシン耐性遺伝子の脱落を確認した。プライマーは配列番号43および44のオリゴDNAを使用した。カナマイシン感受性株を5 mLのLB培地に植菌し、37℃にて2回継代培養することでpCP20を脱落させた。得られた株をEcΔPfとした。

[0110] pykA欠損

pKD4を鋳型として、プライマーとして配列番号45および46のオリゴDNAを用いてPCRを行い、pykA欠損用PCR断片を得た。

[0111] pykF欠損株の作製と同様の方法にて、*Escherichia coli* str. K-12 substr. MG1655ΔpykF株のpykAを欠損させた。当該株にpKD46を導入したのち、pykA欠損用PCR断片を導入した。得られたカナマイシン耐性株を用いてコロニーダイレクトPCRを行い、バンド長より目的遺伝子の欠損およびカナマイシン耐性遺伝子の挿入を確認した。プライマーは配列番号25および48のオリゴDNAを使用した。

[0112] 続いてpKD46を脱落させ、アンピシリン感受性株を得た。アンピシリン感受性株にpCP20を導入し、再びアンピシリン耐性株を取得した。得られた株を用いてコロニーダイレクトPCRを行い、バンド長よりカナマイシン耐性遺伝子の脱落を確認した。プライマーは配列番号47および48のオリゴDNAを使用した。カナマイシン感受性株よりpCP20を脱落させた。得られた株をEcΔPPとした。

[0113] 実施例7

ホストトランスフェラーゼ酵素の機能が低下した*Escherichia*属微生物変異体の作製

Escherichia 属微生物のホストランスフェラーゼをコードする遺伝子である *ptsG* を欠損させ、ホストランスフェラーゼ酵素の機能が低下した *Escherichia* 属微生物変異体を作製した。

[0114] *pKD4* を鋳型として、プライマーとして配列番号 49 および 50 のオリゴDNAを用いてPCRを行い、*ptsG* 欠損のためのPCR断片を得た。*Escherichia coli* str. K-12 substr. MG1655 および *EcΔPP* に *pKD46* を導入したのち、*ptsG* 欠損用PCR断片を導入した。得られたカナマイシン耐性株を用いてコロニーダイレクトPCRを行い、バンド長より目的遺伝子の欠損およびカナマイシン耐性遺伝子の挿入を確認した。プライマーは配列番号 25 および 52 のオリゴDNAを使用した。

[0115] 続いて *pKD46* を脱落させ、アンピシリン感受性株を得た。アンピシリン感受性株に *pCP20* を導入し、再びアンピシリン耐性株を取得した。得られた株を用いてコロニーダイレクトPCRを行い、バンド長よりカナマイシン耐性遺伝子の脱落を確認した。プライマーは配列番号 51 および 52 のオリゴDNAを使用した。カナマイシン感受性株より *pCP20* を脱落させた。得られた株をそれぞれ *EcΔG* および *EcΔPPG* とした。

[0116] 実施例 8

ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体転写抑制因子の機能が低下した *Escherichia* 属微生物変異体の作製

Escherichia 属微生物のピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体転写抑制因子をコードする遺伝子である *pdhR* (NCBI-GeneID: 944827) を欠損させ、PDHcの発現量が増大した *Escherichia* 属微生物変異体を作製した。

[0117] *pKD4* を鋳型として、プライマーとして配列番号 53 および 54 のオリゴDNAを用いてPCRを行い、*pdhR* 欠損のためのPCR断片を得た。*EcΔPP*、*EcΔG*、*EcΔGPP* それぞれに *pKD46* を導入したのち、*pdhR* 欠損用PCR断片を導入した。得られたカナマイシン耐性株を用

いてコロニーダイレクトPCRを行い、バンド長より目的遺伝子の欠損およびカナマイシン耐性遺伝子の挿入を確認した。プライマーは配列番号25および56のオリゴDNAを使用した。

[0118] 続いてpKD46を脱落させ、アンピシリン感受性株を得た。アンピシリン感受性株にpCP20を導入し、再びアンピシリン耐性株を取得した。得られた株を用いてコロニーダイレクトPCRを行い、バンド長よりカナマイシン耐性遺伝子の脱落を確認した。プライマーは配列番号55および56のオリゴDNAを使用した。カナマイシン感受性株よりpCP20を脱落させた。得られた株をそれぞれEcΔPPR、EcΔGR、EcΔGPPRとした。

[0119] 実施例9

ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体転写抑制因子の機能が低下し、かつ反応A、B、DおよびEを触媒する酵素を発現するプラスミドを導入した*Escherichia*属微生物変異体の作製

実施例8で作製した株に対して、参考例1で作製したプラスミドをそれぞれ導入し、*Escherichia*属微生物変異体を作製した。

[0120] EcΔPPR、EcΔGR、EcΔGPPRを5mLのLB培地に植菌し、30℃で1日振とう培養した。培養液0.5mLを5mLのLB培地に植菌し、30℃で2時間、振とう培養した。培養液を20分間氷冷したのち、菌体を10% (w/w) グリセロールで3回洗浄した。洗浄後のペレットを100μLの10% (w/w) グリセロールで懸濁し、1μLのpBBR1 MCS-2::ATCTORと混合したのちエレクトロポレーションキュベット内で10分間氷冷した。Gene pulser (Bio-rad社製) を用いてエレクトロポレーションを実施した (3kV、200Ω、25μF) 後、即座に1mLのSOC培地を添加し、30℃で1時間振とう培養した。50μLをカナマイシン25μg/mLを含むLB寒天培地に塗布し、30℃で1日インキュベートした。得られた株をそれぞれEcΔPPR/3HA、EcΔGR/3HA、EcΔGPPR/3HAとした。

[0121] 実施例 10

ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体転写抑制因子の機能が低下し、かつ反応 A、B、D および E を触媒する酵素を発現するプラスミドを導入した *Escherichia* 属微生物変異体を用いた 3-ヒドロキシアジピン酸および α -ヒドロムコン酸の生産試験

実施例 9 で作製した *Escherichia* 属微生物変異体を、実施例 5 と同様の方法にて培養した。培養上清中に蓄積した 3-ヒドロキシアジピン酸および α -ヒドロムコン酸、他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。さらに、その結果を元に式 (1) を用いて算出した 3-ヒドロキシアジピン酸および α -ヒドロムコン酸の収率を表 2 に示す。

[0122] 参考例 3

ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体転写抑制因子の機能が低下しておらず、かつ反応 A、B、D および E を触媒する酵素を発現するプラスミドを導入した *Escherichia* 属微生物変異体の作製

実施例 6、7 で作製した株に対して、実施例 9 と同様の方法にて、参考例 1 で作製したプラスミドをそれぞれ導入し、*Escherichia* 属微生物変異体を作製した。得られた株をそれぞれ *Ec* Δ PP / 3 HA、*Ec* Δ G / 3 HA、*Ec* Δ G PP / 3 HA とした。

[0123] 比較例 2

ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体転写抑制因子の機能が低下しておらず、かつ反応 A、B、D および E を触媒する酵素を発現するプラスミドを導入した *Escherichia* 属微生物変異体を用いた 3-ヒドロキシアジピン酸および α -ヒドロムコン酸の生産試験

参考例 3 で作製した *Escherichia* 属微生物変異体を、実施例 5 と同様の方法にて培養した。培養上清中に蓄積した 3-ヒドロキシアジピン酸および α -ヒドロムコン酸、他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。さらに、その結果を元に式 (1) を用いて算出し

た3-ヒドロキシアジピン酸および α -ヒドロムコン酸の収率を表2に示す。

[0124] 表2より、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体転写抑制因子の機能が低下し、かつ反応A、B、DおよびEを触媒する酵素を発現するプラスミドを導入した*Escherichia*属微生物変異体では、3-ヒドロキシアジピン酸および α -ヒドロムコン酸の収率が向上することがわかった。

[0125] [表2]

	株	3HA収率 (%)	HMA収率 (%)
比較例2	<i>Ec</i> Δ PP / 3HA	3.01	0.004
	<i>Ec</i> Δ G / 3HA	4.38	0.013
	<i>Ec</i> Δ GPP / 3HA	8.27	0.055
実施例10	<i>Ec</i> Δ PPR / 3HA	3.75	0.005
	<i>Ec</i> Δ GR / 3HA	5.24	0.014
	<i>Ec</i> Δ GPPR / 3HA	13.5	0.087

[0126] 参考例4

ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体転写抑制因子の機能のみが低下した*Escherichia*属微生物変異体の作製

実施例8と同様の方法にて、*Escherichia coli* str. K-12 substr. MG1655の*pdhR*遺伝子を欠損させた。得られた株を*Ec* Δ Rとした。

[0127] 参考例5

ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体転写抑制因子の機能のみが低下し、かつ反応A、B、DおよびEを触媒する酵素を発現するプラスミドを導入した*Escherichia*属微生物変異体、および反応A、B、DおよびEを触媒する酵素を発現するプラスミドを導入した*Escherichia*属微生物変異体の作製

Ec Δ R株および*Escherichia coli* str. K-12 substr. MG1655に対して、実施例9と同様の方法にて、参考例1で作製したプラスミドをそれぞれ導入し、*Escherichia*属微生物変異体を作製した。得られた株をそれぞれ*Ec* WT / 3HA、*Ec*

$\Delta R / 3HA$ とした。

[0128] 参考例 6

ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体転写抑制因子の機能のみが低下し、かつ反応 A、B、D および E を触媒する酵素を発現するプラスミドを導入した *Escherichia* 属微生物変異体、および反応 A、B、D および E を触媒する酵素を発現するプラスミドを導入した *Escherichia* 属微生物変異体を用いた 3-ヒドロキシアジピン酸および α -ヒドロムコン酸の生産試験

参考例 5 で作製した *Escherichia* 属微生物変異体を、実施例 5 と同様の方法にて培養した。培養上清中に蓄積した 3-ヒドロキシアジピン酸および α -ヒドロムコン酸、他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。さらに、その結果を元に式 (1) を用いて算出した 3-ヒドロキシアジピン酸および α -ヒドロムコン酸の収率を表 3 に示す。

[0129] 表 3 より、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体転写抑制因子の機能のみが低下し、かつ反応 A、B、D および E を触媒する酵素を発現するプラスミドを導入した *Escherichia* 属微生物変異体では、コントロール株と比べて 3-ヒドロキシアジピン酸および α -ヒドロムコン酸の収率が低下することが分かった。

[0130] [表 3]

	株	3HA 収率 (%)	HMA 収率 (%)
参考例 6	<i>Ec</i> WT / 3HA	2.86	0.014
	<i>Ec</i> ΔR / 3HA	2.47	0.008

[0131] 参考例 7

PDHc を発現するためのプラスミドの作製

大腸菌内で自律複製可能な発現ベクター pMW119 (株式会社ニッポンジーン製) を SacI で切断し、pMW119 / SacI を得た。当該ベクターに構成的な発現プロモーターを組み込むために、*Escherichia*

*a coli str. K-12 substr. MG1655*のゲノムDNAを鋳型として`gapA` (NCBI-GeneID: NC_000913.3)の上流域200b (配列番号13)をPCR増幅するためのプライマーを設計し (配列番号57、58)、常法に従ってPCR反応を行った。得られた断片および`pMW119/SacI`を、`In-Fusion HD Cloning Kit` (タカラバイオ株式会社製)を用いて連結し、大腸菌株`DH5α`に導入した。得られた組換え大腸菌株から当該プラスミドを抽出し、常法により塩基配列を確認したプラスミドを`pMW119::Pgap`とした。続いて`pMW119::Pgap`を`SphI`で切断し、`pMW119::Pgap/SphI`を得た。ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体をコードする遺伝子を増幅するために、*Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655*のゲノムDNAを鋳型として`aceE` (NCBI-GeneID: 944834)、`aceF` (NCBI-GeneID: 944794) および`lpd` (NCBI-GeneID: 944854) 全長を含む領域をPCR増幅するためのプライマーを設計し (配列番号59、60)、常法に従ってPCR反応を行った。得られた断片および`pMW119::Pgap/SphI`を、`In-Fusion HD Cloning Kit` (タカラバイオ株式会社製)を用いて連結し、大腸菌株`DH5α`に導入した。得られたアンピシリン耐性株から当該プラスミドを抽出し、常法により塩基配列を確認した。得られたプラスミドを「`pMW119::PDHc`」とした。

[0132] 参考例8

PFLを発現するためのプラスミドの作製

PFLをコードする遺伝子を増幅するために、*Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655*のゲノムDNAを鋳型として`pflB` (NCBI-GeneID: 945514) および`pflA` (NCBI-GeneID: 945517) 全長を含む領域をPCR増幅するためのプライマーを設計し (配列番号61、62)、常法に従

ってPCR反応を行った。得られた断片およびpMW119::Pgap/SphIを、In-Fusion HD Cloning Kit（タカラバイオ株式会社製）を用いて連結し、大腸菌株DH5 α に導入した。得られた組換え株から当該プラスミドを抽出し、常法により塩基配列を確認した。得られたプラスミドを「pMW119::PFL」とした。

[0133] 実施例 11

PDHcまたはPFLの発現量が増大し、かつ反応A、B、DおよびEを触媒する酵素を発現するプラスミドを導入した*Serratia*属微生物変異体の作製

参考例2で作製した株に対して、参考例7、8で作製したプラスミドをそれぞれ導入し、*Serratia*属微生物変異体を作製した。

[0134] Sg Δ PP/3HA、Sg Δ G/3HA、Sg Δ GPP/3HAをカナマイシン25 μ g/mLを含む5mLのLB培地に植菌し、30℃で1日振とう培養した。培養液0.5mLをカナマイシン25 μ g/mLを含む5mLのLB培地に植菌し、30℃で2時間、振とう培養した。培養液を20分間氷冷したのち、菌体を10% (w/w) グリセロールで3回洗浄した。洗浄後のペレットを100 μ Lの10% (w/w) グリセロールで懸濁し、1 μ LのpMW119::PDHcあるいはpMW119::PFLと混合したのちエレクトロポレーションキュベット内で10分間氷冷した。Gene pulser (Bio-rad社製)を用いてエレクトロポレーションを実施した(3kV、200 Ω 、25 μ F)後、即座に1mLのSOC培地を添加し、30℃で1時間振とう培養した。50 μ Lをカナマイシン25 μ g/mLおよびアンピシリン500 μ g/mLを含むLB寒天培地に塗布し、30℃で1日インキュベートした。得られたpMW119::PDHc導入株をそれぞれSg Δ PP/3HAPDHc、Sg Δ G/3HAPDHc、Sg Δ GPP/3HAPDHcとした。また得られたpMW119::PFL導入株をそれぞれSg Δ PP/3HAPFL、Sg Δ G/3HAPFL、Sg Δ GPP/3HAPFLとした。

[0135] 実施例 1 2

P D H c または P F L の発現量が増大し、かつ反応 A、B、D および E を触媒する酵素を発現するプラスミドを導入した *S e r r a t i a* 属微生物変異体を用いた 3-ヒドロキシアジピン酸および α -ヒドロムコン酸の生産試験

実施例 1 1 で作製した *S e r r a t i a* 属微生物変異体を、培地にアンピシリン $500 \mu\text{g}/\text{mL}$ を追加で含む以外は実施例 5 と同様の方法にて培養した。培養上清中に蓄積した 3-ヒドロキシアジピン酸および α -ヒドロムコン酸、他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。さらに、その結果を元に式 (1) を用いて算出した 3-ヒドロキシアジピン酸および α -ヒドロムコン酸の収率を表 4 に示す。

[0136] 参考例 9

P D H c または P F L の発現量が増大しておらず、かつ反応 A、B、D および E を触媒する酵素を発現するプラスミドを導入した *S e r r a t i a* 属微生物変異体の作製

参考例 3 で作製した株に対して、ネガティブコントロールとして pMW 1 1 9 を導入した *S e r r a t i a* 属微生物変異体を作製した。

[0137] 実施例 1 1 と同様の方法にて、*S g* Δ P P / 3 H A、*S g* Δ G / 3 H A、*S g* Δ G P P / 3 H A に pMW 1 1 9 を導入した。得られた株をそれぞれ *S g* Δ P P / 3 H A pMW、*S g* Δ G / 3 H A pMW、*S g* Δ G P P / 3 H A pMW とした。

[0138] 比較例 3

P D H c または P F L の発現量が増大しておらず、かつ反応 A、B、D および E を触媒する酵素を発現するプラスミドを導入した *S e r r a t i a* 属微生物変異体を用いた 3-ヒドロキシアジピン酸および α -ヒドロムコン酸の生産試験

参考例 9 で作製した *S e r r a t i a* 属微生物変異体を、培地にアンピシリン $500 \mu\text{g}/\text{mL}$ を追加で含む以外は実施例 5 と同様の方法にて培養した。培養上清中に蓄積した 3-ヒドロキシアジピン酸および α -ヒドロムコ

ン酸、他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。さらに、その結果を元に式（１）を用いて算出した３－ヒドロキシアジピン酸および α －ヒドロムコン酸の収率を表４に示す。

[0139] 表４より、PDHcまたはPFLの発現量が増大し、かつ反応A、B、DおよびEを触媒する酵素を発現するプラスミドを導入した*Serratia*属微生物変異体では、３－ヒドロキシアジピン酸および α －ヒドロムコン酸の収率が向上することが分かった。

[0140] [表4]

	株	3HA収率 (%)	HMA収率 (%)
比較例 3	Sg Δ PP/3HApMW	6.31	0.011
	Sg Δ G/3HApMW	2.35	0.048
	Sg Δ GPP/3HApMW	4.15	0.019
実施例 1 2	Sg Δ PP/3HAPDHc	7.35	0.021
	Sg Δ G/3HAPDHc	2.69	0.106
	Sg Δ GPP/3HAPDHc	7.41	0.158
	Sg Δ PP/3HAPFL	8.46	0.021
	Sg Δ G/3HAPFL	3.03	0.171
	Sg Δ GPP/3HAPFL	6.51	0.197

[0141] 実施例 1 3

PFLの発現量が増大し、かつ反応A、B、DおよびEを触媒する酵素を発現するプラスミドを導入した*Escherichia*属微生物変異体の作製
参考例３で作製した株に対して、参考例７、８で作製したプラスミドをそれぞれ導入し、*Escherichia*属微生物変異体を作製した。

[0142] Ec Δ PP/3HA、Ec Δ G/3HA、Ec Δ GPP/3HAをカナマイシン $25\mu\text{g}/\text{mL}$ を含む 5mL のLB培地に植菌し、 30°C で１日振とう培養した。培養液 0.5mL をカナマイシン $25\mu\text{g}/\text{mL}$ を含む 5mL のLB培地に植菌し、 30°C で２時間、振とう培養した。培養液を２０分間氷冷したのち、菌体を 10% （w/w）グリセロールで３回洗浄した。洗浄後のペレットを $100\mu\text{L}$ の 10% （w/w）グリセロールで懸濁し、 $1\mu\text{L}$ のpMW119：：PFLと混合したのちエレクトロポレーションキュベット内で１０分間氷冷した。Gene pulser（Bio-rad社製

）を用いてエレクトロポレーションを実施した（3 kV、200 Ω 、25 μ F）後、即座に1 mLのSOC培地を添加し、30℃で1時間振とう培養した。50 μ Lをカナマイシン25 μ g/mLおよびアンピシリン100 μ g/mLを含むLB寒天培地に塗布し、30℃で1日インキュベートした。得られたpMW119::PFL導入株をそれぞれEc Δ PP/3HAPFL、Ec Δ G/3HAPFL、Ec Δ GPP/3HAPFLとした。

[0143] 実施例14

PFLの発現量が増大し、かつ反応A、B、DおよびEを触媒する酵素を発現するプラスミドを導入した*Escherichia*属微生物変異体を用いた3-ヒドロキシアジピン酸および α -ヒドロムコン酸の生産試験

実施例13で作製した*Escherichia*属微生物変異体を、培地にアンピシリン100 μ g/mLを追加で含む以外は実施例5と同様の方法にて培養した。培養上清中に蓄積した3-ヒドロキシアジピン酸および α -ヒドロムコン酸、他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。さらに、その結果を元に式（1）を用いて算出した3-ヒドロキシアジピン酸および α -ヒドロムコン酸の収率を表5に示す。

[0144] 参考例10

PDHcまたはPFLの発現量が増大しておらず、かつ反応A、B、DおよびEを触媒する酵素を発現するプラスミドを導入した*Escherichia*属微生物変異体の作製

参考例3で作製した株に対して、ネガティブコントロールとしてpMW119を導入した*Serratia*属微生物変異体を作製した。

[0145] 実施例13と同様の方法にて、Ec Δ PP/3HA、Ec Δ G/3HA、Ec Δ GPP/3HAにpMW119を導入した。得られた株をそれぞれEc Δ PP/3HA pMW、Ec Δ G/3HA pMW、Ec Δ GPP/3HA pMWとした。

[0146] 比較例4

PDHcまたはPFLの発現量が増大しておらず、かつ反応A、B、Dおよ

びEを触媒する酵素を発現するプラスミドを導入した*Escherichia*属微生物変異体を用いた3-ヒドロキシアジピン酸および α -ヒドロムコン酸の生産試験

参考例10で作製した*Escherichia*属微生物変異体を、培地にアンピシリン100 μ g/mLを追加で含む以外は実施例5と同様の方法にて培養した。培養上清中に蓄積した3-ヒドロキシアジピン酸および α -ヒドロムコン酸、他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。さらに、その結果を元に式(1)を用いて算出した3-ヒドロキシアジピン酸および α -ヒドロムコン酸の収率を表5に示す。

[0147] 表5より、PFLの発現量が増大し、かつ反応A、B、DおよびEを触媒する酵素を発現するプラスミドを導入した*Escherichia*属微生物変異体では、3-ヒドロキシアジピン酸および α -ヒドロムコン酸の収率が向上することがわかった。

[0148] [表5]

	株	3HA収率 (%)	HMA収率 (%)
比較例4	<i>Ec</i> Δ PP / 3HApMW	6.73	0.025
	<i>Ec</i> Δ G / 3HApMW	4.39	0.023
	<i>Ec</i> Δ GPP / 3HApMW	12.6	0.040
	<i>Ec</i> Δ PP / 3HAPFL	7.62	0.038
	<i>Ec</i> Δ G / 3HAPFL	5.39	0.039
	<i>Ec</i> Δ GPP / 3HAPFL	18.9	0.086

[0149] 参考例11

Pck、かつ反応A、B、DおよびEを触媒する酵素を発現するプラスミドの作製

Pckを構成的に発現させるプロモーターを組み込むために、*Escherichia coli* K-12 MG1655のゲノムDNAを鋳型としてgapA (NCBI Gene ID: NC_000913.3)の上流域200b (配列番号63)をPCR増幅するためのプライマーを設計し (配列番号64、65)、常法に従ってPCR反応を行った。得られた断片および参考例1で作製したpBBR1MCS-2::ATCTORをSa

c I で切断して得られる断片を、In-Fusion HD Cloning Kit を用いて連結し、大腸菌株 DH5 α に導入した。得られた組換え株から当該プラスミドを抽出し、常法により塩基配列を確認したプラスミドを pBBR1MCS-2::ATCTORPgap とした。続いて Pck をコードする遺伝子を増幅するために、*Serratia grimesii* NBRC13537 株のゲノム DNA を鋳型として pck 遺伝子（配列番号 66）の全長を含む連続した配列を PCR 増幅するためのプライマーを設計し（配列番号 67、68）、常法に従って PCR 反応を行った。得られた断片および pBBR1MCS-2::ATCTORPgap を SacI で切断して得られる断片を、In-Fusion HD Cloning Kit を用いて連結し、大腸菌株 DH5 α に導入した。得られた組換え株から当該プラスミドを抽出し、常法により塩基配列を確認したプラスミドを pBBR1MCS-2::ATCTORPCK とした。

[0150] 実施例 15

Pck の発現量が増大し、かつ反応 A、B、D および E を触媒する酵素を発現するプラスミドを導入した *Escherichia* 属微生物変異体の作製

実施例 13 と同様の方法にて、実施例 9 で作製した Ec Δ PPR/3HA、Ec Δ GR/3HA に pMW119::ATCTORPCK あるいはコントロールとして pMW119 を導入した。得られた株をそれぞれ Ec Δ PPR/3HAPCK、Ec Δ GR/3HAPCK、Ec Δ PPR/3HApMW、Ec Δ GR/3HApMW とした。

[0151] 実施例 16

Pck の発現量が増大し、かつ反応 A、B、D および E を触媒する酵素を発現するプラスミドを導入した *Escherichia* 属微生物変異体を用いた 3-ヒドロキシアジピン酸および α -ヒドロムコン酸の生産試験

実施例 15 で作製した Ec Δ PPR/3HAPCK、Ec Δ GR/3HAPCK、Ec Δ PPR/3HApMW、Ec Δ GR/3HApMW を、実施例 14 と同様の方法にて培養した。培養上清中に蓄積した 3-ヒドロキシア

ジピン酸および α -ヒドロムコン酸、他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。さらに、その結果を元に式（１）を用いて算出した３-ヒドロキシアジピン酸および α -ヒドロムコン酸の収率を表６に示す。

[0152] 表６より、P c kの発現量が増大し、かつ反応A、B、DおよびEを触媒する酵素を発現するプラスミドを導入した*E s c h e r i c h i a*属微生物変異体では、３-ヒドロキシアジピン酸および α -ヒドロムコン酸の収率がさらに向上することがわかった。

[0153] [表6]

	株	3HA収率 (%)	HMA収率 (%)
実施例 1 6	E c Δ P P R / 3 H A p M W	4. 0 1	0. 0 0 6
	E c Δ G R / 3 H A p M W	5. 4 8	0. 0 1 6
	E c Δ P P R / 3 H A P C K	4. 4 1	0. 0 0 7
	E c Δ G R / 3 H A P C K	6. 3 4	0. 0 1 9

[0154] 参考例 1 2

*E s c h e r i c h i a c o l i*由来のL p dあるいは*K l e b s i e l l a p n e u m o n i a e*由来のL p d Aを発現するためのプラスミドの作製

大腸菌内で自律複製可能な発現ベクターp M W 1 1 9（株式会社ニッポンジーン製）をS a c IおよびK p n Iで切断し、p M W 1 1 9 / S a c I、K p n Iを得た。

[0155] *E s c h e r i c h i a c o l i*由来のL p dをコードする遺伝子を増幅するために、*E s c h e r i c h i a c o l i* str. K-12 sub str. M G 1 6 5 5のゲノムDNAを鋳型としてl p d（NCBI-GeneID: 944854）全長ならびにその5'側0.5kbおよび3'側0.1kbを含む領域をPCR増幅するためのプライマーを設計し（配列番号69、70）、常法に従ってPCR反応を行った。得られた断片およびp M W 1 1 9 / S a c I、K p n Iを、In-Fusion HD

Cloning Kit（タカラバイオ株式会社製）を用いて連結し、大腸菌株DH5 α に導入した。得られた組換え株から当該プラスミドを抽出し、常法により塩基配列を確認した。得られたプラスミドを「pMW119::EcLPD」とした。

[0156] *Klebsiella pneumoniae*由来のLpdAをコードする遺伝子を増幅するために、*Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* MGH78578株のlpdA (NCBI-GeneID:CP000647, REGION:142460...143884) 全長ならびに*Escherichia coli* str. K-12 substr. MG1655のlpdの5'側0.5kbおよび3'側0.5kbを含む領域を遺伝子合成し、当該領域をPCR増幅するためのプライマーを設計し（配列番号69、71）、常法に従ってPCR反応を行った。得られた断片およびpMW119/SacI、KpnIを、In-Fusion HD Cloning Kit（タカラバイオ株式会社製）を用いて連結し、大腸菌株DH5 α に導入した。得られた組換え株から当該プラスミドを抽出し、常法により塩基配列を確認した。得られたプラスミドを「pMW119::KpLPD」とした。

[0157] 実施例17

Lpdの発現量が増大し、かつ反応A、B、DおよびEを触媒する酵素を発現するプラスミドを導入した*Escherichia*属微生物変異体の作製
参考例3で作製した株に対して、参考例12で作製したプラスミドをそれぞれ導入し、*Escherichia*属微生物変異体を作製した。

[0158] 実施例13と同様の方法にて、参考例3で作製したEc Δ G/3HAにpMW119::EcLPDを、Ec Δ PP/3HAにpMW119::KpLPDをそれぞれ導入した。得られた株をそれぞれEc Δ G/3HA EcLPD、Ec Δ PP/3HA KpLPDとした。

[0159] 実施例18

Lpdの発現量が増大し、かつ反応A、B、DおよびEを触媒する酵素を発

現するプラスミドを導入した *Escherichia* 属微生物変異体を用いた 3-ヒドロキシアジピン酸および α -ヒドロムコン酸の生産試験

実施例 17 で作製した *Escherichia* 属微生物変異体を、培地にアンピシリン $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ を追加で含む以外は実施例 5 と同様の方法にて培養した。培養上清中に蓄積した 3-ヒドロキシアジピン酸および α -ヒドロムコン酸、他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。さらに、その結果を元に式 (1) を用いて算出した 3-ヒドロキシアジピン酸および α -ヒドロムコン酸の収率を表 7 に示す。

[0160] 表 7 より、Lpd の発現量が増大し、かつ反応 A、B、D および E を触媒する酵素を発現するプラスミドを導入した *Escherichia* 属微生物変異体では、3-ヒドロキシアジピン酸および α -ヒドロムコン酸の収率が向上することがわかった。

[0161] [表 7]

	株	3HA 収率 (%)	HMA 収率 (%)
実施例 18	<i>Ec</i> Δ G / 3HAE <i>c</i> LPD	5.17	0.041
	<i>Ec</i> Δ PP / 3HAK <i>p</i> LPD	8.31	0.059

[0162] 参考例 13

NADH に対する感受性が低減された Lpd を発現するためのプラスミドの作製

参考例 12 で得られた pMW119 :: *Ec*LPD のアミノ酸変異体を作製した。Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit (New England Biolabs 社製) を用いて、pMW119 :: *Ec*LPD を鋳型、配列番号 72、73 のオリゴヌクレオチドをプライマーとして 354 番目のグルタミン酸 (E) をリジン (K) に置換させた。得られたプラスミドを pMW119 :: *Ec*LPDE354K とした。

[0163] 同様に、pMW119 :: *Ec*LPD を鋳型、配列番号 74、75 のオリゴヌクレオチドをプライマーとして 322 番目のヒスチジン (H) をチロシン (Y) に置換させた。得られたプラスミドを pMW119 :: *Ec*LPD

H322Yとした。

[0164] 実施例 19

NADHに対する感受性が低減されたLpd、かつ反応A、B、DおよびEを触媒する酵素を発現するプラスミドを導入した*Escherichia*属微生物変異体の作製

参考例3で作製した株に対して、参考例13で作製したプラスミドをそれぞれ導入し、*Escherichia*属微生物変異体を作製した。

[0165] 実施例13と同様の方法にて、参考例3で作製したEcΔG/3HAにpMW119::EcLPDE354KあるいはpMW119::EcLPDH322Yをそれぞれ導入した。得られた株をそれぞれEcΔG/3HA EcLPDE354K、EcΔG/3HA EcLPDH322Yとした。

[0166] 実施例 20

NADHに対する感受性が低減されたLpd、かつ反応A、B、DおよびEを触媒する酵素を発現するプラスミドを導入した*Escherichia*属微生物変異体を用いた3-ヒドロキシアジピン酸および α -ヒドロムコン酸の生産試験

実施例19で作製した*Escherichia*属微生物変異体を、培地にアンピシリン100 μ g/mLを追加で含む以外は実施例5と同様の方法にて培養した。培養上清中に蓄積した3-ヒドロキシアジピン酸および α -ヒドロムコン酸、他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。さらに、その結果を元に式(1)を用いて算出した3-ヒドロキシアジピン酸および α -ヒドロムコン酸の収率を表8に示す。

[0167] 表8より、NADHに対する感受性が低減されたLpd、かつ反応A、B、DおよびEを触媒する酵素を発現するプラスミドを導入した*Escherichia*属微生物変異体では、3-ヒドロキシアジピン酸および α -ヒドロムコン酸の収率がさらに向上することがわかった。

[0168]

[表8]

	株	3HA収率 (%)	HMA収率(%)
実施例20	E c Δ G / 3 H A E c L P D E 3 5 4 K	5. 8 3	0. 0 4 6
	E c Δ G / 3 H A E c L P D H 3 2 2 Y	5. 6 3	0. 0 4 5

[0169] 実施例21

1種類のピルビン酸キナーゼが欠損し、かつL p dの発現量が増大し、かつ反応A、B、DおよびEを触媒する酵素を発現するプラスミドを導入した*S e r r a t i a*属微生物変異体の作製

実施例1で作製したS g Δ P fに、実施例4と同様の方法にてp B B R 1 M C S - 2 : : A T C T O Rを、また実施例11と同様の方法にてp M W 1 1 9 : : E c L P Dを導入した。得られた株をS g Δ P f / 3 H A E c L P Dとした。

[0170] 実施例22

1種類のピルビン酸キナーゼが欠損し、かつL p dの発現量が増大し、かつ反応A、B、DおよびEを触媒する酵素を発現するプラスミドを導入した*E s c h e r i c h i a*属微生物変異体の作製

実施例6で作製したE c Δ P fに、実施例9と同様の方法にてp B B R 1 M C S - 2 : : A T C T O Rを、また実施例17と同様の方法にてp M W 1 1 9 : : E c L P Dを導入した。得られた株をE c Δ P f / 3 H A E c L P Dとした。

[0171] 実施例23

1種類のピルビン酸キナーゼが欠損し、かつL p dの発現量が増大し、かつ反応A、B、DおよびEを触媒する酵素を発現するプラスミドを導入した*S e r r a t i a*属あるいは*E s c h e r i c h i a*属微生物変異体を用いた3-ヒドロキシアジピン酸およびα-ヒドロムコン酸の生産試験

実施例21、22で作製した*S e r r a t i a*属あるいは*E s c h e r i c h i a*属微生物変異体を、培地にアンピシリン500 μ g / m Lあるいは

100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を追加で含む以外は実施例5と同様の方法にて培養した。培養上清中に蓄積した3-ヒドロキシアジピン酸および α -ヒドロムコン酸、他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。さらに、その結果を元に式(1)を用いて算出した3-ヒドロキシアジピン酸および α -ヒドロムコン酸の収率を表9に示す。

[0172] 表9より、1種類のピルビン酸キナーゼが欠損し、かつLpdの発現量が増大し、かつ反応A、B、DおよびEを触媒する酵素を発現するプラスミドを導入した*Serratia*属および*Escherichia*属微生物変異体でも、3-ヒドロキシアジピン酸および α -ヒドロムコン酸の収率が向上することがわかった。

[0173] [表9]

	株	3HA収率(%)	HMA収率(%)
実施例23	Sg Δ Pf/3HApMW	2.10	0.009
	Ec Δ Pf/3HApMW	3.97	0.023
	Sg Δ Pf/3HAEcLPD	2.75	0.022
	Ec Δ Pf/3HAEcLPD	4.73	0.031

[0174] 参考例14

PFLの発現量のみが増大し、かつ反応A、B、DおよびEを触媒する酵素を発現するプラスミドを導入した*Escherichia*属微生物変異体の作製

参考例5で作製したEcWT/3HAに、参考例8で作製したpMW119::PFLあるいはコントロールとしてpMW119を実施例13と同様の方法にて導入した。得られた株をEcWT/3HAPFL、EcWT/3HApMWとした。

[0175] 参考例15

PFLの発現量のみが増大し、かつ反応A、B、DおよびEを触媒する酵素を発現するプラスミドを導入した*Escherichia*属微生物変異体を用いた3-ヒドロキシアジピン酸および α -ヒドロムコン酸の生産試験

参考例 14 で作製した *E c* WT / 3 H A P F L、*E c* WT / 3 H A p M W を、培地にアンピシリン 100 μ g / m L を追加で含む以外は実施例 5 と同様の方法にて培養した。培養上清中に蓄積した 3-ヒドロキシアジピン酸および α -ヒドロムコン酸、他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。さらに、その結果を元に式 (1) を用いて算出した 3-ヒドロキシアジピン酸および α -ヒドロムコン酸の収率を表 10 に示す。

[0176] 表 10 より、P F L の発現量のみが増大し、かつ反応 A、B、D および E を触媒する酵素を発現するプラスミドを導入した *E s c h e r i c h i a* 属微生物変異体では、コントロール株と比べて 3-ヒドロキシアジピン酸および α -ヒドロムコン酸の収率が低下することが分かった。

[0177] [表10]

	株	3 H A 収率 (%)	H M A 収率 (%)
参考例 15	<i>E c</i> WT / 3 H A p M W	2. 1 1	0. 0 1 7
	<i>E c</i> WT / 3 H A P F L	1. 9 5	0. 0 1 1

請求の範囲

- [請求項1] 3-ヒドロキシアジピン酸および／または α -ヒドロムコン酸を製造する能力を有する微生物において、ピルビン酸からアセチルC o Aを生成する反応を強化し、ならびにピルビン酸キナーゼおよび／またはホスホトランスフェラーゼ酵素の機能を低下させた、遺伝子改変微生物。
- [請求項2] 前記ピルビン酸からアセチルC o Aを生成する反応の強化が、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体が触媒する反応の強化および／またはピルビン酸ギ酸リアーゼが触媒する反応の強化である、請求項1に記載の遺伝子改変微生物。
- [請求項3] 前記ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体が触媒する反応の強化が、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体の発現量の増大および／またはピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体の活性増強による強化である、請求項2に記載の遺伝子改変微生物。
- [請求項4] 前記ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体の発現量の増大が、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体転写抑制因子の機能を低下させることにより行われる、請求項3に記載の遺伝子改変微生物。
- [請求項5] 前記ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体の活性増強が、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体のN A D Hへの感受性を低減させることにより行われる、請求項3に記載の遺伝子改変微生物。
- [請求項6] 前記ピルビン酸ギ酸リアーゼが触媒する反応の強化が、ピルビン酸ギ酸リアーゼの発現量の増大による強化により行われる、請求項2に記載の遺伝子改変微生物。
- [請求項7] さらに3-オキソアジピル-C o Aを還元して3-ヒドロキシアジピル-C o Aを生成する反応を強化した、請求項1から6のいずれか1項に記載の遺伝子改変微生物。
- [請求項8] さらにホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼの反応を強化した、請求項1から7のいずれか1項に記載の遺伝子改変微生物。

- [請求項9] ホスホケトラーゼ経路による糖代謝をしない微生物である、請求項1から8のいずれか1項に記載の遺伝子改変微生物。
- [請求項10] 請求項1から9のいずれか1項に記載の遺伝子改変微生物を培養する工程を含む、3-ヒドロキシアジピン酸および／または α -ヒドロムコン酸の製造方法。
- [請求項11] 遺伝子改変により微生物に内在する機能を強化または低下させる工程を含む3-ヒドロキシアジピン酸および／または α -ヒドロムコン酸を製造する能力を有する遺伝子改変微生物の製造方法であって、前記工程として、ピルビン酸からアセチルCoAを生成する反応を強化する工程（a）、ならびにピルビン酸キナーゼおよび／またはホスホトランスフェラーゼ酵素の機能を低下させる工程（b）を含む、方法。
- [請求項12] さらに3-オキソアジピル-CoAを還元して3-ヒドロキシアジピル-CoAを生成する反応を強化する工程（c）を含む、請求項11に記載の方法。
- [請求項13] さらにホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼの反応を強化する工程（d）を含む、請求項11または12に記載の方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/041257

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*C12N 1/21*(2006.01)i; *C12N 15/52*(2006.01)i; *C12P 7/44*(2006.01)i

FI: C12N1/21 ZNA; C12P7/44; C12N15/52 Z

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)

C12N1/21; C12N15/52; C12P7/44

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2022
 Registered utility model specifications of Japan 1996-2022
 Published registered utility model applications of Japan 1994-2022

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2011-515111 A (GENOMATICA INC.) 19 May 2011 (2011-05-19) claims, abstract, paragraph [0057], example 1	1-13
Y	WO 2019/107516 A1 (TORAY INDUSTRIES, INC.) 06 June 2019 (2019-06-06) in particular, claims, abstract	1-13
Y	WO 2013/163292 A2 (BIOAMBER INC.) 31 October 2013 (2013-10-31) claims, paragraph [0091]	1-5, 7-13
Y	WO 2014/099725 A1 (GENOMATICA, INC.) 26 June 2014 (2014-06-26) in particular, claims	1-10
A	WO 2017/033965 A1 (RIKEN) 02 March 2017 (2017-03-02) claims, paragraphs [0038]-[0045], [0103]	1-13
A	WO 2019/022083 A1 (RIKEN) 31 January 2019 (2019-01-31) paragraph [0110]	1-13
A	JP 2017-184746 A (MYRIANT CORP.) 12 October 2017 (2017-10-12) claims, paragraphs [0003], [0011], [0045]	1-13

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 January 2022

Date of mailing of the international search report

01 February 2022

Name and mailing address of the ISA/JP

Japan Patent Office (ISA/JP)
 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915
 Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/041257**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, Y	WO 2020/230718 A1 (TORAY INDUSTRIES, INC.) 19 November 2020 (2020-11-19) in particular, claims, abstract	1-13
P, Y	WO 2020/230719 A1 (TORAY INDUSTRIES, INC.) 19 November 2020 (2020-11-19) in particular, claims, abstract	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/041257

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2021/041257

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP	2011-515111	A	19 May 2011	JP	2014-147399 A
				JP	2016-195612 A
				JP	2018-102317 A
				JP	2020-174684 A
				US	2010/0330626 A1
				WO	2009/151728 A2
				claims, abstract, p. 21, lines 3-15, example 1	
				US	2009/0305364 A1
				US	2011/0195466 A1
				US	2012/0115194 A1
				US	2012/0264179 A1
				US	2012/0309062 A1
				US	2013/0095540 A1
				US	2015/0167028 A1
				US	2017/0130234 A1
				US	2020/0248189 A1
				EP	3351619 A1
WO	2019/107516	A1	06 June 2019	US	2020/0291435 A1
				in particular, claims, abstract	
EP				EP	3719121 A1
WO	2013/163292	A2	31 October 2013	US	2013/0288320 A1
WO	2014/099725	A1	26 June 2014	US	2015/0329885 A1
				US	2014/0329916 A1
				US	2019/0300919 A1
WO	2017/033965	A1	02 March 2017	US	2018/0237813 A1
				claims, paragraphs [0064]-[0071], [0116]	
EP				EP	3342874 A1
WO	2019/022083	A1	31 January 2019	US	2021/0130854 A1
				paragraph [0108]	
EP				EP	3660156 A1
JP	2017-184746	A	12 October 2017	JP	2015-504688 A
				US	2015/0044755 A1
				claims, paragraph [0003], [0011], [0062]	
				JP	2019-195330 A
				US	2019/0345437 A1
				WO	2013/116244 A1
				EP	3312267 A1
WO	2020/230718	A1	19 November 2020	(Family: none)	
WO	2020/230719	A1	19 November 2020	(Family: none)	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12N 1/21(2006.01)i; C12N 15/52(2006.01)i; C12P 7/44(2006.01)i FI: C12N1/21 ZNA; C12P7/44; C12N15/52 Z		
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）） C12N1/21; C12N15/52; C12P7/44		
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 1971-2022年 日本国実用新案登録公報 1996-2022年 日本国登録実用新案公報 1994-2022年		
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); REGISTRY (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2011-515111 A (ジェノマティカ, インコーポレイテッド) 19.05.2011 (2011 - 05 - 19) 特許請求の範囲, 要約, 段落 0057, 実施例 1	1-13
Y	WO 2019/107516 A1 (東レ株式会社) 06.06.2019 (2019 - 06 - 06) 特に特許請求の範囲, 要約	1-13
Y	WO 2013/163292 A2 (BIOAMBER INC.) 31.10.2013 (2013 - 10 - 31) 特許請求の範囲, 段落 0091	1-5, 7-13
Y	WO 2014/099725 A1 (GENOMATICA, INC.) 26.06.2014 (2014 - 06 - 26) 特に特許請求の範囲	1-10
A	WO 2017/033965 A1 (国立研究開発法人理化学研究所) 02.03.2017 (2017 - 03 - 02) 特許請求の範囲, 段落 0038-0045, 0103	1-13
A	WO 2019/022083 A1 (国立研究開発法人理化学研究所) 31.01.2019 (2019 - 01 - 31) 段落 0110	1-13
A	JP 2017-184746 A (ミリアント・コーポレーション) 12.10.2017 (2017 - 10 - 12) 特許請求の範囲, 段落 0003, 0011, 0045	1-13
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 25.01.2022		国際調査報告の発送日 01.02.2022
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		権限のある職員（特許庁審査官） 白井 美香保 4B 4502 電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	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
P, Y	WO 2020/230718 A1 (東レ株式会社) 19.11.2020 (2020 - 11 - 19) 特に特許請求の範囲, 要約	1-13
P, Y	WO 2020/230719 A1 (東レ株式会社) 19.11.2020 (2020 - 11 - 19) 特に特許請求の範囲, 要約	1-13

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

- a. ☒ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
 ☒ 附属書C/ST.25テキストファイル形式
 ☐ 紙形式又はイメージファイル形式
- b. ☐ 国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c. ☐ 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
 ☐ 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))
 ☐ 紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)

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

3. 補足意見:

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2021/041257

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
JP	2011-515111	A	19.05.2011	JP	2014-147399	A	
				JP	2016-195612	A	
				JP	2018-102317	A	
				JP	2020-174684	A	
				US	2010/0330626	A1	
				WO	2009/151728	A2	
				特許請求の範囲, 要約, 第 2 1 頁第 3 行- 第 1 5 行, 実施例 1			
				US	2009/0305364	A1	
				US	2011/0195466	A1	
				US	2012/0115194	A1	
				US	2012/0264179	A1	
				US	2012/0309062	A1	
				US	2013/0095540	A1	
				US	2015/0167028	A1	
				US	2017/0130234	A1	
				US	2020/0248189	A1	
				EP	3351619	A1	
WO	2019/107516	A1	06.06.2019	US	2020/0291435	A1	
				特に特許請求の範囲, 要約			
				EP	3719121	A1	
WO	2013/163292	A2	31.10.2013	US	2013/0288320	A1	
WO	2014/099725	A1	26.06.2014	US	2015/0329885	A1	
				US	2014/0329916	A1	
				US	2019/0300919	A1	
WO	2017/033965	A1	02.03.2017	US	2018/0237813	A1	
				特許請求の範囲, 段落 0 0 6 4 - 0 0 7 1, 0 1 1 6			
				EP	3342874	A1	
WO	2019/022083	A1	31.01.2019	US	2021/0130854	A1	
				段落 0 1 0 8			
				EP	3660156	A1	
JP	2017-184746	A	12.10.2017	JP	2015-504688	A	
				US	2015/0044755	A1	
				特許請求の範囲, 段落 0 0 0 3, 0 0 1 1, 0 0 6 2			
				JP	2019-195330	A	
				US	2019/0345437	A1	
				WO	2013/116244	A1	
				EP	3312267	A1	
WO	2020/230718	A1	19.11.2020	(ファミリーなし)			
WO	2020/230719	A1	19.11.2020	(ファミリーなし)			