

(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
2021年4月15日(15.04.2021)



(10) 国際公開番号

WO 2021/070942 A1

(51) 国際特許分類:

C12P 13/02 (2006.01) *C12N 15/54* (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01) *C12N 9/10* (2006.01)
C12N 15/29 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2020/038340

(22) 国際出願日: 2020年10月9日(09.10.2020)

(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:
2019131887 2019年10月10日(10.10.2019) RU

(71) 出願人: 味の素株式会社 (AJINOMOTO CO., INC.) [JP/JP]; 〒1048315 東京都中央区京橋一丁目15番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 永田 秀美 (NAGATA, Hidemi); 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). 田上 宇乃 (TAGAMI, Uno); 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). 野▲崎▼博之 (NOZAKI, Hiroyuki); 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴

木町1-1 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). 肥沼 景子 (KOENUMA, Keiko); 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). ストレツォーバ ダリア (STRELTSOVA, Daria); 117545 モスクワ, 1 ストドロズニィ プロエズド 1-1, クローズド ジョイント スtock カンパニー アジノモトージェネティカ リサーチ インスティテュート内 Moscow (RU). フルシチョワ アンナ (KHRUSCHEVA, Anna); 117545 モスクワ, 1 ストドロズニィ プロエズド 1-1, クローズド ジョイント スtock カンパニー アジノモトージェネティカ リサーチ インスティテュート内 Moscow (RU). カタシュキナ ジャンナ (KATASHKINA, Joanna); 117545 モスクワ, 1 ストドロズニィ プロエズド 1-1, クローズド ジョイント スtock カンパニー アジノモトージェネティカ リサーチ インスティテュート内 Moscow (RU).

(74) 代理人: 特許業務法人 酒井国際特許事務所 (SAKAI INTERNATIONAL PATENT OFFICE); 〒1000013 東京都千代田区霞が

(54) Title: MODIFIED ENZYME HAVING N-ACYLATION ACTIVITY

(54) 発明の名称: N-アシル化活性を有する改変酵素

(57) Abstract: The present invention provides an enzyme or the like useful for establishment of an excellent N-acyl-amino group-containing compound production system. More specifically, the present invention provides a modified enzyme or the like including: (A) a modified amino acid sequence that includes an amino acid sequence obtained by providing one or more predetermined amino acid residue mutations to an amino acid sequence of a wild-type enzyme having N-acylation activity; (B) an amino acid sequence obtained by providing, to the modified amino acid sequence, at least one additional amino acid residue substitution, deletion, insertion, or addition; or (C) an amino acid sequence that is obtained by providing, to the modified amino acid sequence, at least one additional amino acid residue mutation, and that has 90% or more identity to the modified amino acid sequence, wherein the modified enzyme has N-acylation activity, and has improved N-acylation activity to L-glutamic acid or L-aspartic acid, or improved substrate specificity to L-glutamic acid, compared to the wild-type enzyme.

(57) 要約: 本発明は、優れたN-アシル-α-アミノ基含有化合物生産系の確立に有用な酵素などを提供する。より具体的には、本発明は、下記: (A) N-アシル化活性を有する野生型酵素のα-アミノ酸配列において、1以上の所定のα-アミノ酸残基の変異を含むα-アミノ酸配列からなる、改変α-アミノ酸配列; (B) 前記改変α-アミノ酸配列において、1もしくは数個の追加のα-アミノ酸残基の置換、欠失、挿入、もしくは付加を含むα-アミノ酸配列; または (C) 前記改変α-アミノ酸配列において、1以上のα-アミノ酸残基の追加変異を含み、前記改変α-アミノ酸配列に対して90%以上の同一性を有するα-アミノ酸配列を含み、N-アシル化活性を有し、かつ、野生型酵素に対して、L-グルタミン酸もしくはL-アスパラギン酸に対するN-アシル化活性、またはL-グルタミン酸に対する基質特異性が向上した、改変酵素などを提供する。



関 3 丁 目 8 番 1 号 虎 の 門 三 井 ビ ル
ディング 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))

明 細 書

発明の名称： N－アシル化活性を有する改変酵素

技術分野

[0001] 本発明は、N－アシル化活性を有する改変酵素などに関する。

背景技術

[0002] N－アシルーアミノ基含有化合物（例、N α －アシルアミノ酸）は、香粧品素材（例、界面活性剤）等として用いられている。N－アシルーアミノ基含有化合物の化学的合成（例、ショッテン・バウマン反応）は、合成反応の副産物による環境負荷の課題を有する。そこで、N－アシルーアミノ基含有化合物の酵素的合成が求められている。N－アシルーアミノ基含有化合物の酵素的合成に関する先行技術がいくつか報告されている。

[0003] 特許文献1では、*Bacillus subtilis*のサーファクチン生合成酵素を利用した糖からのN α －アシルアミノ酸発酵が報告されている。しかし、N α －アシルグルタミン酸の生成量は116.8mg/Lと微量であるため、この発酵は工業的スケールでの製造には適していない。

[0004] 特許文献2では、ヒト由来アミノ酸N－アシルトランスフェラーゼ、*E. coli*由来アシルCoA合成酵素を利用して、アミノ酸と脂肪酸からN α －アシルグリシンを合成する方法について報告されている。しかし、この方法では脂肪酸に直接アミノ酸を結合させることができず、2段階の酵素反応が必要となるため、単一の酵素を利用する反応と比較すると制御が複雑になるという課題がある。

[0005] 非特許文献1では、ブタ腎臓由来アシラーゼを用いて、グリセロールを含む溶液中で、アミノ酸と脂肪酸からN α －アシルアミノ酸を合成する方法が報告されている。本方法は、グリセロールを含む溶液中では、アシラーゼによるN α －アシルアミノ酸の加水分解反応が進行しにくいことを利用している。しかし、グリセロールの大量使用が要求される点、およびグリセロールを含まない水系溶媒中でのN α －アシルアミノ酸合成は低収率となる点に鑑

みて、この方法は、工業的製造では低効率となる。

- [0006] 非特許文献2では、*Streptomyces mobaraensis* 由来アシラーゼを用いて、グリセロールを含む溶液中で、アミノ酸と脂肪酸からN α -アシルアミノ酸を合成する方法が報告されている。しかし、グリセロールを含まない水系溶媒中でのN α -アシルアミノ酸合成は報告されていないため、この方法の工業的製造への効率性は示されていない。

先行技術文献

特許文献

- [0007] 特許文献1：国際公開第2008/131002号
特許文献2：国際公開第2015/028423号

非特許文献

- [0008] 非特許文献1：Wada et al., Journal of the American Oil Chemists' Society, 2002, 79 (1), pp 41-46
非特許文献2：Koreishi et al., Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54 (1), pp 72-78

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0009] 本発明の目的は、優れたN-アシルアミノ基含有化合物生産系の確立に有用な酵素、およびN-アシルアミノ基含有化合物の製造方法などを提供することである。

課題を解決するための手段

- [0010] 本発明者らは、鋭意検討した結果、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 由来 indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3.6 (AtGH3-6) のアミノ酸残基を変異させることにより、N-アシルアミノ基含有化合物生産

能に優れた改変酵素を作製すること、およびN-アシル-アミノ基含有化合物生産に有用であるその他の発明を作出することに成功し、本願発明を完成するに至った。

[0011] すなわち、本発明は、以下のとおりである。

〔1〕 下記：

(A) 配列番号1のアミノ酸配列において、N101、R117、T122、I123、Y134、L137、V140、S161、V174、Q200、V231、V311、C335、T336、M337、A339、S340、Y344、R350、G379、K388、L390、S455、E483、Q533、およびC576からなる群から選ばれる1以上のアミノ酸残基の変異を含むアミノ酸配列からなる、改変アミノ酸配列；

(B) 前記改変アミノ酸配列において、1もしくは数個の追加のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、もしくは付加を含むアミノ酸配列；または

(C) 前記改変アミノ酸配列において、1以上のアミノ酸残基の追加変異を含み、前記改変アミノ酸配列に対して90%以上の同一性を有するアミノ酸配列

を含み、

配列番号1のアミノ酸配列からなる酵素に対して、下記(i)～(iii)のいずれか一つの特性が向上したN-アシル化活性を有する改変酵素：

(i) L-グルタミン酸および／またはL-アスパラギン酸に対するN-アシル化活性；

(ii) L-グルタミン酸に対する基質特異性；あるいは

(iii) L-グルタミン酸および／またはL-アスパラギン酸に対するN-アシル化活性、ならびにL-グルタミン酸に対する基質特異性。

〔2〕 前記変異が、N101S、R117P、T122S、I123T、Y134F、Y134V、L137I、V140I、S161P、V174A、Q200E、V231A、V311A、C335S、T336S、M337G、M337A、A339G、S340A、Y344A、Y344G、Y

344I、Y344V、R350T、G379D、K388N、L390P、S455T、E483D、Q533R、およびC576Aからなる群から選ばれる1以上のアミノ酸残基の変異を含む、〔1〕の改変酵素。

〔3〕前記N-アシル化活性が、アミノ酸に対するN-アシル化活性である、〔1〕または〔2〕の改変酵素。

〔4〕前記アミノ酸に対するN-アシル化活性が、L-グルタミン酸またはL-アスパラギン酸に対するN-アシル化活性を有する、〔3〕の改変酵素。

〔5〕〔1〕～〔4〕のいずれかの改変酵素をコードするポリヌクレオチド。

〔6〕〔5〕のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

〔7〕〔1〕～〔4〕のいずれかの改変酵素をコードするポリヌクレオチドの発現単位を含む宿主細胞。

〔8〕前期宿主細胞が、下記から選ばれる少なくとも1つ以上の遺伝子改変がされた微生物である、〔7〕の宿主細胞：

- (1) 脂肪酸供給能強化；
- (2) アミノ酸供給能強化；
- (3) ATP供給能強化；および
- (4) N-アシルアミノ酸分解酵素欠損または弱化。

〔9〕前記脂肪酸供給能強化の遺伝子改変が、下記(a)または(b)のいずれか、あるいは下記(a)および(b)の双方である、〔8〕の宿主細胞：

- (a) アシルCoA合成酵素欠損または弱化；および
- (b) アシル-ACPチオエステラーゼ増強。

〔10〕前記宿主細胞が、腸内細菌科に属する細菌である、〔7〕～〔9〕のいずれかの宿主細胞。

〔11〕腸内細菌科に属する細菌が、エシェリヒア属細菌またはパントエア属細菌である、〔10〕の宿主細胞。

〔12〕エシェリヒア属細菌がエシェリヒア・コリであり、パントエア属細菌がパントエア・アナナティスである、〔11〕の宿主細胞。

〔13〕下記：

(A) 配列番号1のアミノ酸配列において、N101、R117、T122、I123、Y134、L137、V140、S161、V174、Q200、V231、V311、C335、T336、M337、A339、S340、Y344、R350、G379、K388、L390、S455、E483、Q533、およびC576からなる群から選ばれる1以上のアミノ酸残基の変異を含むアミノ酸配列からなる、改変アミノ酸配列；

(B) 前記改変アミノ酸配列において、1もしくは数個の追加のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、もしくは付加を含むアミノ酸配列；または

(C) 前記改変アミノ酸配列において、1以上のアミノ酸残基の追加変異を含み、前記改変アミノ酸配列に対して90%以上の同一性を有するアミノ酸配列

を含み、

N-アシル化活性を有し、かつ、

配列番号1のアミノ酸配列からなる酵素に対して、下記(i)～(iii)のいずれか一つの特性が向上したN-アシル化活性を有する改変酵素の存在下において、アミノ基含有化合物およびカルボキシル基含有化合物を反応させて、N-アシルーアミノ基含有化合物またはその塩を生成することを含む、N-アシルーアミノ基含有化合物またはその塩の製造方法：

(i) L-グルタミン酸および／またはL-アスパラギン酸に対するN-アシル化活性；

(ii) L-グルタミン酸に対する基質特異性；あるいは

(iii) L-グルタミン酸および／またはL-アスパラギン酸に対するN-アシル化活性、ならびにL-グルタミン酸に対する基質特異性。

〔14〕前記改変酵素が精製酵素である、〔13〕の方法。

〔15〕前記改変酵素の存在下における反応が、前記改変酵素を産生する形

質転換微生物またはその処理物を用いて行われる、〔13〕の方法。

〔16〕前記形質転換微生物が、下記から選ばれる少なくとも1つ以上の遺伝子改変がされた微生物である、〔15〕の方法：

- (1) 脂肪酸供給能強化；
- (2) アミノ酸供給能強化；
- (3) ATP供給能強化；および
- (4) N-アシルアミノ酸分解酵素欠損または弱化。

〔17〕アミノ基含有化合物およびカルボキシル基含有化合物が、前記形質転換微生物を炭素源の存在下で培養することにより前記形質転換微生物内で生成される、〔15〕または〔16〕の方法。

〔18〕下記：

- (1) 脂肪酸供給能強化；
- (2) アミノ酸供給能強化；
- (3) ATP供給能強化；および
- (4) N-アシルアミノ酸分解酵素欠損または弱化；

から選ばれる少なくとも1つ以上の遺伝子改変がされ、さらに、カルボキシル基およびアミノ基をATP依存的様式において結合させてアミド結合を形成する能力を有する酵素をコードするポリヌクレオチドの発現単位を含む微生物を、炭素源の存在下で培養することを含む、アミノ基含有化合物とカルボキシル基含有化合物がアミド結合したN-アシルアミノ基含有化合物またはその塩の製造方法。

〔19〕前記酵素が、GH3タンパク質、またはPaakタンパク質である、〔18〕の方法。

〔20〕前記GH3タンパク質が、

(1) 下記：

(A) 配列番号1のアミノ酸配列において、N101、R117、T122、I123、Y134、L137、V140、S161、V174、Q200、V231、V311、C335、T336、M337、A339、

S 3 4 0、Y 3 4 4、R 3 5 0、G 3 7 9、K 3 8 8、L 3 9 0、S 4 5 5、E 4 8 3、Q 5 3 3、および C 5 7 6 からなる群から選ばれる 1 以上のアミノ酸残基の変異を含むアミノ酸配列からなる、改変アミノ酸配列；

(B) 前記改変アミノ酸配列において、1 もしくは数個の追加のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、もしくは付加を含むアミノ酸配列；または

(C) 前記改変アミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸残基の追加変異を含み、前記改変アミノ酸配列に対して 9 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列

を含み、

N-アシル化活性を有し、かつ、

配列番号 1 のアミノ酸配列からなる酵素に対して、下記 (i) ~ (i i) のいずれか一つの特性が向上した N-アシル化活性を有する改変酵素：

(i) L-グルタミン酸および／または L-アスパラギン酸に対する N-アシル化活性；

(i i) L-グルタミン酸に対する基質特異性；あるいは

(i i i) L-グルタミン酸および／または L-アスパラギン酸に対する N-アシル化活性、ならびに L-グルタミン酸に対する基質特異性；

あるいは

(I I) 下記：

(D) 配列番号 1 のアミノ酸配列を含むタンパク質；

(E) 配列番号 1 のアミノ酸配列において、1 もしくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、もしくは付加を含むアミノ酸配列を含み、かつ、N-アシル化活性を有するタンパク質；または

(F) 配列番号 1 のアミノ酸配列に対して 9 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ、N-アシル化活性を有するタンパク質；

からなる群から選ばれる酵素

である、〔19〕の方法。

〔21〕脂肪酸供給能強化の遺伝子改変が、下記 (a) または (b) のいづ

れか、あるいは下記（a）および（b）の双方である、〔18〕～〔20〕のいずれかの方法：

（a）アシルCoA合成酵素欠損または弱化；および

（b）アシル-ACPチオエステラーゼ増強。

〔22〕アシル-ACPチオエステラーゼが、ラウロイル-ACPに対するチオエステラーゼ活性を有する、〔21〕の方法。

〔23〕アシル-ACPチオエステラーゼが、下記から選ばれる、〔21〕の方法：

（i）（i-1）配列番号3のアミノ酸配列、または（i-2）配列番号3のアミノ酸配列における84番目から382番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含むタンパク質；

（ii）（ii-1）配列番号3のアミノ酸配列、または（ii-2）配列番号3のアミノ酸配列における84番目から382番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列において、1もしくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、もしくは付加を含むアミノ酸配列を含み、かつ、アシル-ACPチオエステラーゼ活性を有するタンパク質；および

（iii）（iii-1）配列番号3のアミノ酸配列、または（iii-2）配列番号3のアミノ酸配列における84番目から382番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列に対して90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ、アシル-ACPチオエステラーゼ活性を有するタンパク質。

〔24〕炭素源が、糖類である、〔18〕～〔23〕のいずれかの方法。

〔25〕糖類が、グルコースである、〔24〕の方法。

〔26〕前記微生物が、腸内細菌科に属する細菌である、〔18〕～〔25〕のいずれかの方法。

〔27〕腸内細菌科に属する細菌が、エシェリヒア属細菌またはパントエア属細菌である、〔26〕の方法。

〔28〕エシェリヒア属細菌がエシェリヒア・コリであり、パントエア属細菌がパントエア・アナナティスである、〔27〕の方法。

〔29〕カルボキシル基含有化合物が、脂肪酸である、〔13〕～〔28〕のいずれかの方法。

〔30〕脂肪酸が、炭素原子数8～18の脂肪酸である、〔29〕の方法。

〔31〕脂肪酸が、炭素原子数12の脂肪酸である、〔29〕の方法。

〔32〕脂肪酸が、飽和脂肪酸である、〔29〕～〔31〕のいずれかの方法。

〔33〕アミノ基含有化合物が、アミノ酸であり、前記酵素が、前記アミノ酸に対するN-アシル化活性を有する、〔13〕～〔32〕のいずれかの方法。

〔34〕アミノ酸が、L-グルタミン酸またはL-アスパラギン酸である、〔33〕の方法。

〔35〕カルボキシル基含有化合物が、ラウリン酸であり、N-アシルアミノ基含有化合物が、N α -ラウロイル-L-グルタミン酸またはN α -ラウロイル-L-アスパラギン酸である、〔13〕～〔34〕のいずれかの方法。

〔36〕下記：

- (1) 脂肪酸供給能強化；
- (2) アミノ酸供給能強化；
- (3) ATP供給能強化；および
- (4) N-アシルアミノ酸分解酵素欠損または弱化；

から選ばれる少なくとも1つ以上の遺伝子改変がされ、さらに、カルボキシル基およびアミノ基をATP依存的様式において結合させてアミド結合を形成する能力を有する酵素をコードするポリヌクレオチドの発現単位を含み、炭素源の存在下で培養することによりN-アシルアミノ基含有化合物またはその塩の生産能を有する微生物。

〔37〕〔13〕～〔35〕のいずれかの方法で製造されたN-アシルアミノ基含有化合物またはその塩を含む界面活性剤。

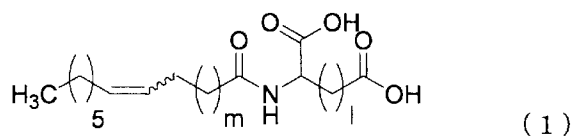
〔38〕N-アシルアミノ基含有化合物またはその塩が、炭素原子数10

～ 16 のモノ不飽和アシルを有する N-モノ不飽和アシルーアミノ基含有化合物またはその塩を含む、〔37〕の界面活性剤。

〔39〕炭素原子数 10～16 のモノ不飽和アシルを有する N-モノ不飽和アシルーアミノ基含有化合物またはその塩を含む界面活性剤。

〔40〕 N-モノ不飽和アシルーアミノ基含有化合物が、下記一般式（1）で表される化合物である、〔37〕～〔39〕のいずれかの界面活性剤。

〔化1〕



（前記一般式（1）中、 l は、1 又は 2 の整数であり、 m は、0～6 の整数である。）

〔41〕前記 N-モノ不飽和アシルーアミノ基含有化合物の立体化学が、 cis である、〔37〕～〔40〕のいずれかの界面活性剤。

〔42〕前記 N-アシルーアミノ基含有化合物またはその塩が、N-モノ不飽和アシルグルタミン酸またはその塩である、〔37〕～〔41〕のいずれかの界面活性剤。

〔43〕成分（A） N-モノ不飽和アシル酸性アミノ酸（ここで、不飽和アシルは、炭素原子数 10～16 個のアシルである）又はその塩、及び

成分（B） N-飽和アシル酸性アミノ酸又はその塩、を含む組成物。

発明の効果

〔0012〕 本発明の方法によれば、アミノ基含有化合物とカルボキシル基含有化合物とのアミド結合による N-アシルーアミノ基含有化合物生成反応を効率的に行うことができる。

図面の簡単な説明

〔0013〕〔図1〕図 1 は、プラスミド pMW118-ScE-Km の構造を示す図である。

〔図2〕図 2 は、プラスミド pMW118-PtAc-UcTEopt の構造示

す図である。

[図3]図3は、プラスミドpMW118-PlacUV5-lacI-UcTEoptの構造を示す図である。

[図4]図4は、(1) *Arabidopsis thaliana* 由来 indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3.6 (AtGH3-6) のアミノ酸配列 (配列番号1)、および (2) *California bay (Umbellularia californica)* 由来の medium-chain acyl-ACP thioesterase (UcTE) のアミノ酸配列 (配列番号3) を示す図である。

発明を実施するための形態

[0014] (改変酵素)

本発明は、N-アシル化活性を有する改変酵素を提供する。

[0015] 本発明の改変酵素は、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 由来 indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3.6 (Q9LSQ4、以下、「AtGH3-6」と呼ぶ) に基づいて改変された酵素である。AtGH3-6は、インドール-3-酢酸のカルボキシル基と特定のアミノ酸のアミノ基をATP依存の様式において結合させてアミド結合を形成する酵素として見出され (*Plant Cell* 17:616-627 (2005))、本発明者らにより脂肪酸とアミノ酸のアミド結合を形成する能力を含めたN-アシル化活性を有することも見出された。本発明の改変酵素は、AtGH3-6を改変して、N-アシル-アミノ基含有化合物生産能に関する特性を向上させた、N-アシル化活性を有する酵素である。

[0016] 本発明の改変酵素は、下記改変酵素である：

(A) 配列番号1 (野生型AtGH3-6) のアミノ酸配列において、所定のアミノ酸残基の変異の群から選ばれる1以上の変異を含むアミノ酸配列からなる、改変アミノ酸配列；

(B) 前記改変アミノ酸配列において、1もしくは数個の追加のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、もしくは付加を含むアミノ酸配列；または

(C) 前記改変アミノ酸配列において、1以上のアミノ酸残基の追加変異を含み、前記改変アミノ酸配列に対して90%以上の同一性を有するアミノ酸配列

を含み、

配列番号1のアミノ酸配列からなる酵素に対して、下記(i)～(iii)のいずれか一つの特性が向上したN-アシル化活性を有する改変酵素：

(i) L-グルタミン酸および／またはL-アスパラギン酸に対するN-アシル化活性；

(ii) L-グルタミン酸に対する基質特異性；あるいは

(iii) L-グルタミン酸および／またはL-アスパラギン酸に対するN-アシル化活性、ならびにL-グルタミン酸に対する基質特異性。

[0017] 別の表現としては、本発明の改変酵素は、下記改変酵素である：

下記：

(A') 配列番号1に示すアミノ酸配列；

(B') 配列番号1に示すアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、又は付加を含むアミノ酸配列、または

(C') 配列番号1に示すアミノ酸配列に対して90%以上の同一性を有するアミノ酸配列、のいずれかのアミノ酸配列において、所定のアミノ酸残基の変異の群から選ばれる1以上のアミノ酸残基の変異に相当するアミノ酸残基の変異を含み、

配列番号1のアミノ酸配列からなる酵素に対して、下記(i)～(iii)のいずれか一つの特性が向上したN-アシル化活性を有する改変酵素：

(i) L-グルタミン酸および／またはL-アスパラギン酸に対するN-アシル化活性；

(ii) L-グルタミン酸に対する基質特異性；あるいは

(iii) L-グルタミン酸および／またはL-アスパラギン酸に対するN

ーアシル化活性、ならびにL-グルタミン酸に対する基質特異性。

[0018] アミノ酸配列 (B) および (B') では、アミノ酸残基の欠失、置換、付加および挿入からなる群より選ばれる 1、2、3 または 4 種の変異により、1 個または数個のアミノ酸残基を改変することができる。アミノ酸残基の変異は、アミノ酸配列中の 1 つの領域に導入されてもよいが、複数の異なる領域に導入されてもよい。用語「1 または数個」は、改変酵素の活性 (例、N-アシル化活性) を大きく損なわない個数を示す。用語「1 または数個」が示す数は、例えば 1 ~ 60 個または 1 ~ 50 個、好ましくは 1 ~ 40 個、より好ましくは 1 ~ 30 個、さらにより好ましくは 1 ~ 20 個、特に好ましくは 1 ~ 10 個または 1 ~ 5 個 (例、1 個、2 個、3 個、4 個、または 5 個) である。

[0019] アミノ酸配列 (C) および (C') における同一性%は、90%以上である。好ましくは、同一性は、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上または99%以上であってもよい。ポリペプチド (タンパク質) の同一性%の算出は、アルゴリズム `blastp` により行うことができる。より具体的には、ポリペプチドの同一性の算定%は、National Center for Biotechnology Information (NCBI) において提供されているアルゴリズム `blastp` において、デフォルト設定の `Scoring Parameters (Matrix: BLOSUM62; Gap Costs: Existence=11 Extension=1; Compositional Adjustments: Conditional compositional score matrix adjustment)` を用いて行うことができる。ポリヌクレオチド (遺伝子) の同一性%の算出は、アルゴリズム `blastn` により行うことができる。より具体的には、ポリヌクレオチドの同一性%の算定は、NCBI において提供されているアルゴリズム `blastn` において、デフォルト設定の `Scoring Parameters (Match/Mismatch Scor`

$e s = 1, -2 ; G a p \ C o s t s = L i n e a r$) を用いて行うことができる。

[0020] 「N-アシル化活性」（「N-アシラーゼ活性」と呼ぶこともある）とは、基質としてのアミノ基含有化合物およびカルボキシル基含有化合物をアミド結合により結合させてN-アシルアミノ基含有化合物を生成する活性をいう。N-アシル化活性とは、例えば、アミノ酸（例、後述する α -L-アミノ酸）と脂肪酸（例、後述する飽和脂肪酸）からN-アシルアミノ酸を生成する活性であってもよく、好ましくは、L-グルタミン酸もしくはL-アスパラギン酸とラウリン酸からN α -ラウロイル-L-グルタミン酸もしくはN α -ラウロイル-L-アスパラギン酸を生成する活性を指標としてもよい。「N-アシル化活性を有する」とは、特定の測定条件で活性を測定した場合、配列番号1のアミノ酸配列からなる酵素の活性を基準として、例えば60%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらにより好ましくは85%以上、特に好ましくは90%以上、94%以上、96%以上、98%以上、または同等（すなわち、100%）以上の活性を有することであってもよい。このような特定の測定条件としては、次の条件を採用することができる。測定対象の酵素を精製酵素として調製し、50 mM Tris-HCl、5 mM アミノ酸（例、L-グルタミン酸またはL-アスパラギン酸）、5 mM 脂肪酸ナトリウム（例、ラウリン酸ナトリウム）、10 mM ATP、10 mM MgCl₂、1 mM DTT、50 μ g/mL 精製酵素、pH 8.0、0.2 mLの反応液を25℃で24時間インキュベートし、反応終了後、0.8 mLの反応停止液（1.4%（w/v）リン酸、75%（v/v）メタノール）を添加し、遠心後の上清をUPLC-MS分析に供し、N-アシルアミノ酸（例、N α -ラウロイル-L-グルタミン酸またはN α -ラウロイル-L-アスパラギン酸）と一致する分子量のシグナルを測定することによりN-アシル化活性を評価する。

[0021] アミノ酸配列（B）、（B'）、（C）、および（C'）は、改変酵素が目的特性を保持し得る限り、触媒ドメイン中の部位、および触媒ドメイン以

外の部位に、変異が導入されていてもよい。改変酵素が目的特性を保持し得る、変異が導入されてもよいアミノ酸残基の位置は、当業者に明らかである。具体的には、当業者は、1) 同種の特性を有する複数のタンパク質のアミノ酸配列を比較し、2) 相対的に保存されている領域、および相対的に保存されていない領域を明らかにし、次いで、3) 相対的に保存されている領域および相対的に保存されていない領域から、それぞれ、機能に重要な役割を果たし得る領域および機能に重要な役割を果たし得ない領域を予測できるので、構造・機能の相関性を認識できる。したがって、当業者は、本発明で用いられるタンパク質のアミノ酸配列において変異が導入されてもよいアミノ酸残基の位置を特定できる。

[0022] アミノ酸残基が置換により変異される場合、アミノ酸残基の置換は、保存的置換であってもよい。本明細書中で用いられる場合、用語「保存的置換」とは、所定のアミノ酸残基を、類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置換することをいう。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当該分野で周知である。例えば、このようなファミリーとしては、塩基性側鎖を有するアミノ酸（例、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖を有するアミノ酸（例、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電性極性側鎖を有するアミノ酸（例、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖を有するアミノ酸（例、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、 β 位分岐側鎖を有するアミノ酸（例、スレオニン、バリン、イソロイシン）、芳香族側鎖を有するアミノ酸（例、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）、ヒドロキシル基（例、アルコール性、フェノール性）含有側鎖を有するアミノ酸（例、セリン、スレオニン、チロシン）、および硫黄含有側鎖を有するアミノ酸（例、システイン、メチオニン）が挙げられる。好ましくは、アミノ酸の保存的置換は、アスパラギン酸とグルタミン酸との間での置換、アルギニンとリジンとヒスチジンとの間での置換、トリプトファンとフェニルアラニンとの間での置換、フ

エニルアラニンとバリンとの間での置換、ロイシンとイソロイシンとアラニンとの間での置換、およびグリシンとアラニンとの間での置換であってもよい。

[0023] 本発明の改変酵素はまた、異種部分とペプチド結合を介して連結された融合タンパク質であってもよい。このような異種部分としては、例えば、目的タンパク質の精製を容易にするペプチド成分（例、ヒスチジントグ、S t r e p - t a g ⅠⅠ等のタグ部分；グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、マルトース結合タンパク質、およびこれらの変異型等の目的タンパク質の精製に利用されるタンパク質）、目的タンパク質の可溶性を向上させるペプチド成分（例、N u s - t a g）、シャペロンとして働くペプチド成分（例、トリガーファクター）、上記精製タグを切断するためのプロテアーゼにより認識されるペプチド成分（例、トロンビン認識配列、T E Vプロテアーゼ認識配列）、他の機能を有するペプチド成分（例、全長タンパク質またはその一部）、ならびにリンカーが挙げられる。

[0024] 配列番号1に示すアミノ酸配列、または（A'）、（B'）、もしくは（C'）のいずれかのアミノ酸配列における「所定のアミノ酸残基の変異」は、改変酵素においてN-アシルアミノ基含有化合物生産能に関する特性を向上させる変異である。「所定のアミノ酸残基の変異」としては、N101、R117、T122、I123、Y134、L137、V140、S161、V174、Q200、V231、V311、C335、T336、M337、A339、S340、Y344、R350、G379、K388、L390、S455、E483、Q533、およびC576のアミノ酸残基の変異が挙げられる。より具体的には、「所定のアミノ酸残基の変異」としては、N101S、R117P、T122S、I123T、Y134F、Y134V、L137I、V140I、S161P、V174A、Q200E、V231A、V311A、C335S、T336S、M337G、M337A、A339G、S340A、Y344A、Y344G、Y344I、Y344V、R350T、G379D、K388N、L390P、S455T、

E 4 8 3 D、Q 5 3 3 R、およびC 5 7 6 Aのアミノ酸残基の置換が挙げられる。本発明の改変酵素が含む「所定のアミノ酸残基の変異」の数は、1以上であり、例えば1～26個、好ましくは1～20個、より好ましくは1～15個、さらにより好ましくは1～10個（例、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個）であってもよい。

[0025] 「所定のアミノ酸残基の変異」により向上するN-アシル-アミノ基含有化合物生産能に関する特性としては、特定のアミノ酸基質に対するN-アシル化活性、および特定のアミノ酸基質に対する基質特異性が挙げられる。向上の程度は、配列番号1のアミノ酸配列からなる酵素との比較により示され、異種部分とペプチド結合を介して連結された融合タンパク質同士の比較として測定してもよい。

[0026] 特定のアミノ酸基質に対するN-アシル化活性としては、L-グルタミン酸に対するN-アシル化活性およびL-アスパラギン酸に対するN-アシル化活性が挙げられる。N-アシル化活性の測定に用いる基質であるカルボキシル基含有化合物は、例えば脂肪酸であってもよく、飽和脂肪酸が好ましく、ラウリン酸がより好ましい。N-アシル化活性の測定は、例えば、上述した測定条件で行なうことができる。特定のアミノ酸基質に対するN-アシル化活性の向上の程度は、配列番号1のアミノ酸配列からなる酵素のN-アシル化活性を超えている限り特に制限されないが、例えば1.1倍以上、好ましくは1.2倍以上、より好ましくは1.3倍以上、さらにより好ましくは1.5倍以上、最も好ましくは2倍以上である。

[0027] L-グルタミン酸またはL-アスパラギン酸に対するN-アシル化活性を向上させる変異としては、N 1 0 1、R 1 1 7、T 1 2 2、I 1 2 3、Y 1 3 4、L 1 3 7、V 1 4 0、S 1 6 1、V 1 7 4、Q 2 0 0、V 2 3 1、V 3 1 1、C 3 3 5、T 3 3 6、M 3 3 7、A 3 3 9、S 3 4 0、Y 3 4 4、R 3 5 0、G 3 7 9、K 3 8 8、L 3 9 0、S 4 5 5、E 4 8 3、Q 5 3 3、およびC 5 7 6のアミノ酸残基の変異が挙げられる。より具体的には、L-グルタミン酸またはL-アスパラギン酸に対するN-アシル化活性を向上

させる変異としては、N101S、R117P、T122S、I123T、Y134F、Y134V、L137I、V140I、S161P、V174A、Q200E、V231A、V311A、C335S、T336S、M337G、M337A、A339G、S340A、Y344A、Y344G、Y344I、Y344V、R350T、G379D、K388N、L390P、S455T、E483D、Q533R、およびC576Aのアミノ酸残基の置換が挙げられる。

[0028] 特定のアミノ酸基質に対する基質特異性としては、L-グルタミン酸に対する基質特異性が挙げられる。L-グルタミン酸に対する基質特異性は、同一のカルボキシル基含有化合物基質を用いた場合のL-グルタミン酸および別のアミノ酸（例、L-アスパラギン酸）に対するN-アシル化活性の活性比として示すことができる。同一のカルボキシル基含有化合物基質は、例えば脂肪酸であってもよく、飽和脂肪酸が好ましく、ラウリン酸がより好ましい。N-アシル化活性の測定は、例えば、上述した測定条件で行なうことができる。特定のアミノ酸基質に対する基質特異性の向上の程度は、配列番号1のアミノ酸配列からなる酵素の基質特異性を超えている限り特に制限されないが、例えば1.1倍以上、好ましくは1.2倍以上、より好ましくは1.3倍以上、さらにより好ましくは1.5倍以上、最も好ましくは2倍以上である。

[0029] L-グルタミン酸に対する基質特異性を向上させる変異としては、N101、R117、T122、I123、Y134、L137、V140、S161、V174、Q200、V231、V311、C335、T336、M337、A339、S340、Y344、R350、G379、K388、L390、S455、E483、Q533、およびC576のアミノ酸残基の変異が挙げられる。より具体的には、L-グルタミン酸に対する基質特異性を向上させる変異としては、N101S、R117P、T122S、I123T、Y134F、Y134V、L137I、V140I、S161P、V174A、Q200E、V231A、V311A、C335S、T336

S、M337G、M337A、A339G、S340A、Y344A、Y344G、Y344I、Y344V、R350T、G379D、K388N、L390P、S455T、E483D、Q533R、およびC576Aのアミノ酸残基の置換が挙げられる。

[0030] (ポリヌクレオチド)

本発明はまた、本発明の改変酵素をコードするポリヌクレオチドを提供する。本発明のポリヌクレオチドは、DNAであってもRNAであってもよいが、DNAであることが好ましい。

[0031] 好ましくは、本発明で用いられる上記酵素をコードするポリヌクレオチドは、以下をコードするポリヌクレオチドであってもよい：

(a) 配列番号2 (野生型A t G H 3 - 6) に示す塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b) 配列番号2 に示す塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェント条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド；

(c) 配列番号2 に示す塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含むポリヌクレオチド；ならびに

(d) (a) ~ (c) からなる群より選ばれるポリヌクレオチドの縮重変異体

からなる群より選ばれるポリヌクレオチドにおいて、

上述した所定のアミノ酸残基の変異の群から選ばれる1以上のアミノ酸残基の変異に相当するアミノ酸残基の変異に相当する塩基配列の変異を含み、

配列番号1のアミノ酸配列からなる酵素に対して、下記(i) ~ (iii) のいずれか一つの特性が向上したN-アシル化活性を有する改変酵素：

(i) L-グルタミン酸および／またはL-アスパラギン酸に対するN-アシル化活性；

(ii) L-グルタミン酸に対する基質特異性；あるいは

(iii) L-グルタミン酸および／またはL-アスパラギン酸に対するN-アシル化活性、ならびにL-グルタミン酸に対する基質特異性。配列番号

2の塩基配列は、配列番号1のアミノ酸配列をコードする。

- [0032] 上記ポリヌクレオチド(b)において、用語「ストリンジェント条件」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。例えば、ストリンジェント条件としては、 $6\times S S C$ (塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム) 中、約 $45^{\circ}C$ でのハイブリダイゼーション、続いて、 $0.2\times S S C$ 、 0.1% SDS 中、 $50\sim 65^{\circ}C$ での1または2回以上の洗浄が挙げられる。
- [0033] 上記ポリヌクレオチド(c)では、配列番号2の塩基配列に対する塩基配列の同一性は、 90% 以上、 91% 以上、 92% 以上、 93% 以上、 94% 以上、 95% 以上、 96% 以上、 97% 以上、 98% 以上または 99% 以上であってもよい。
- [0034] 上記ポリヌクレオチド(d)において、用語「縮重変異体」とは、変異前のポリヌクレオチド中の所定のアミノ酸残基をコードする少なくとも1つのコドンが、同一アミノ酸残基をコードする別のコドンに変更されたポリヌクレオチド変異体をいう。このような縮重変異体はサイレント変異に基づく変異体であることから、縮重変異体によりコードされるタンパク質(酵素)は、変異前のポリヌクレオチドによりコードされるタンパク質(酵素)と同一である。
- [0035] 好ましくは、縮重変異体は、それが導入されるべき宿主細胞のコドン使用頻度に適合するようにコドンが変更されたポリヌクレオチド変異体である。ある遺伝子を異種宿主細胞(例、微生物)で発現させる場合、コドン使用頻度の相違により、対応するtRNA分子種が十分に供給されず、翻訳効率の低下および／または不正確な翻訳(例、翻訳の停止)が生じることがある。例えば、エシェリヒア・コリでは、表1に示される低頻度コドンが知られている。
- [0036]

[表1]

表 1. エシェリヒア・コリにおける低頻度コドン

アミノ酸残基	コドン	低頻度コドン
Arg	AGG/AGA/CGG/CGA/CGU/CGC	AGG/AGA/CGG/CGA
Gly	GGG/GGA/GGU/GGC	GGA
Ile	AUA/AUU/AUC	AUA
Leu	UUG/UUA/CUG/CUA/CUU/CUC	CUA
Pro	CCG/CCA/CCU/CCC	CCC

[0037] したがって、本発明では、後述するような宿主細胞のコドン使用頻度に適合する縮重変異体を利用することができる。例えば、縮重変異体は、アルギニン残基、グリシン残基、イソロイシン残基、ロイシン残基、およびプロリン残基からなる群より選ばれる1種以上のアミノ酸残基をコードするコドンが変更されたものであってもよい。より具体的には、縮重変異体は、低頻度コドン（例、A G G、A G A、C G G、C G A、G G A、A U A、C U A、およびC C C）からなる群より選ばれる1種以上のコドンが変更されたものであってもよい。好ましくは、縮重変異体は、以下からなる群より選ばれる1種以上（例、1種、2種、3種、4種、または5種）のコドンの変更を含んでいてもよい：

- i) A r g をコードする4種のコドン（A G G、A G A、C G G、およびC G A）からなる群より選ばれる少なくとも1種のコドンの、A r g をコードする別のコドン（C G U、またはC G C）への変更；
- i i) G l y をコードする1種のコドン（G G A）の、別のコドン（G G G、G G U、またはG G C）への変更；
- i i i) I l e をコードする1種のコドン（A U A）の、別のコドン（A U U、またはA U C）への変更；
- i v) L e u をコードする1種のコドン（C U A）の、別のコドン（U U G、U U A、C U G、C U U、またはC U C）への変更；ならびに
- v) P r o をコードする1種のコドン（C C C）の、別のコドン（C C G、C C A、またはC C U）への変更。

縮重変異体がRNAの場合、上記のとおりヌクレオチド残基「U」が利用

されるべきであるが、縮重変異体がDNAの場合、ヌクレオチド残基「U」の代わりに「T」が利用されるべきである。宿主細胞のコドン使用頻度に適合させるためのヌクレオチド残基の変異数は、変異前後で同一のタンパク質をコードする限り特に限定されないが、例えば、1～400個、1～300個、1～200個、または1～100個である。

[0038] 低頻度コドンの同定は、当該分野で既知の技術を利用することにより、任意の宿主細胞の種類およびゲノム配列情報に基づいて容易に行うことができる。したがって、縮重変異体は、低頻度コドンの非低頻度コドン（例、高頻度コドン）への変更を含むものであってもよい。また、低頻度コドンのみならず、生産菌株のゲノムGC含量への適合性などの要素を考慮して変異体を設計する方法が知られているので（Alan Villalobos et al., Gene Designer: a synthetic biology tool for constructing artificial DNA segments, BMC Bioinformatics, 2006 Jun 6; 7:285.）、このような方法を利用してもよい。このように、上述の変異体は、それが導入され得る任意の宿主細胞（例、後述するような微生物）の種類に応じて適宜作製できる。

[0039] （発現ベクター）

本発明は、発現ベクターを提供する。本発明の発現ベクターは、本発明のポリヌクレオチド、または本発明の改変酵素をコードするポリヌクレオチドを含む。

[0040] 本発明において、用語「発現単位」とは、タンパク質として発現されるべき所定のポリヌクレオチドおよびそれに作動可能に連結されたプロモーターを含む、当該ポリヌクレオチドの転写、ひいては当該ポリヌクレオチドによりコードされるタンパク質の産生を可能にする最小単位をいう。発現単位は、ターミネーター、リボゾーム結合部位、および薬剤耐性遺伝子等のエレメントをさらに含んでもよい。発現単位は、DNAであってもRNAであってもよいが、DNAであることが好ましい。発現単位はまた、宿主細胞に

対して同種 (homologous) (すなわち、固有 (inherent)) であっても、異種 (heterologous) (すなわち、非固有) であってもよい。発現単位はまた、タンパク質として発現されるべき1つのポリヌクレオチド、およびそれに作動可能に連結されたプロモーターを含む発現単位 (すなわち、モノシストロニック mRNA の発現を可能にする発現単位)、またはタンパク質として発現されるべき複数のポリヌクレオチド (例えば2以上、好ましくは3以上、より好ましくは4以上、さらにより好ましくは5以上、特に好ましくは10以上のポリヌクレオチド)、およびそれに作動可能に連結されたプロモーターを含む発現単位 (すなわち、ポリシストロニック mRNA の発現を可能にする発現単位) であってもよい。発現単位は、微生物 (宿主細胞) においてゲノム領域 (例、上記タンパク質をコードするポリヌクレオチドが固有に存在する天然ローカスである天然ゲノム領域、もしくは当該天然ローカスではない非天然ゲノム領域)、または非ゲノム領域 (例、細胞質内) に含まれることができる。発現単位は、1または2以上 (例、1、2、3、4、または5) の異なる位置においてゲノム領域中に含まれていてもよい。非ゲノム領域に含まれる発現単位の具体的な形態としては、例えば、プラスミド、ウイルスベクター、ファージ、および人工染色体が挙げられる。

[0041] 発現単位を構成するプロモーターは、その下流に連結されたポリヌクレオチドによりコードされるタンパク質 (酵素) を宿主細胞で発現させることができるものであれば特に限定されない。例えば、プロモーターは、宿主細胞に対して同種であっても異種であってもよい。例えば、組換えタンパク質の産生に汎用される構成または誘導プロモーターを用いることができる。このようなプロモーターとしては、例えば、PhoAプロモーター、PhoCプロモーター、T7プロモーター、T5プロモーター、T3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、tacプロモーター、PRプロモーター、PLプロモーター、SP6プロモーター、アラビノース誘導プロモーター、コールドショックプロモーター、テトラサイ

クリン誘導性プロモーターが挙げられる。好ましくは、宿主細胞で強力な転写活性を有するプロモーターを用いることができる。宿主細胞で強力な転写活性を有するプロモーターとしては、例えば、宿主細胞で高発現している遺伝子のプロモーター、およびウイルス由来のプロモーターが挙げられる。

[0042] 発現ベクターは、発現単位として上述した最小単位に加えて、宿主細胞で機能するターミネーター、リボゾーム結合部位、および薬剤耐性遺伝子等のエレメントをさらに含んでいてもよい。薬剤耐性遺伝子としては、例えば、テトラサイクリン、アンピシリン、カナマイシン、ハイグロマイシン、ホスフィノスリシン、クロラムフェニコール等の薬剤に対する耐性遺伝子が挙げられる。

[0043] 発現ベクターはまた、宿主細胞のゲノムDNAとの相同組換えのために、宿主細胞のゲノムとの相同組換えを可能にする領域をさらに含んでいてもよい。例えば、発現ベクターは、それに含まれる発現単位が一对の相同領域（例、宿主細胞のゲノム中の特定配列に対して相同なホモロジーアーム、 $\text{I} \times \text{P}$ 、 FRT ）間に位置するように設計されてもよい。発現単位が導入されるべき宿主細胞のゲノム領域（相同領域の標的）としては、特に限定されないが、宿主細胞において発現量が多い遺伝子のローカスであってもよい。

[0044] 発現ベクターは、プラスミド、ウイルスベクター、ファージ、または人工染色体であってもよい。発現ベクターはまた、組込み型（*i n t e g r a t i v e*）ベクターであっても非組込み型ベクターであってもよい。組込み型ベクターは、その全体が宿主細胞のゲノムに組み込まれるタイプのベクターであってもよい。あるいは、組込み型ベクターは、その一部（例、発現単位）のみが宿主細胞のゲノムに組み込まれるタイプのベクターであってもよい。発現ベクターはさらに、DNAベクター、またはRNAベクター（例、レトロウイルス）であってもよい。発現ベクターはまた、汎用されている発現ベクターであってもよい。このような発現ベクターとしては、例えば、 pUC （例、 pUC19 、 pUC18 ）、 pSTV 、 pBR （例、 pBR322 ）、 pHSG （例、 pHSG299 、 pHSG298 、 pHSG399 、 p

HSG398)、RSF (例、RSF1010)、pACYC (例、pACYC177、pACYC184)、pMW (例、pMW119、pMW118、pMW219、pMW218)、pQE (例、pQE30)、pET (例、pET28a) およびその誘導体が挙げられる。

[0045] (宿主細胞)

本発明は、宿主細胞を提供する。本発明の宿主細胞は、本発明の改変酵素をコードするポリヌクレオチドの発現単位を含む。本発明の宿主細胞は、好ましくは、本発明の改変酵素をコードするポリヌクレオチドおよびそれに作動可能に連結されたプロモーターを含む発現単位を含む。本発明の宿主細胞は、好ましくは微生物である。

[0046] 本発明の宿主細胞は、形質転換微生物が好ましい。本発明の宿主細胞としては、例えば、腸内細菌科 (*Enterobacteriaceae*) に属する細菌等の細菌、および真菌が挙げられる。細菌はまた、グラム陽性菌であってもグラム陰性菌であってもよい。グラム陽性細菌としては、例えば、バシラス (*Bacillus*) 属細菌、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属細菌が挙げられる。バシラス (*Bacillus*) 属細菌としては、枯草菌 (*Bacillus subtilis*) が好ましい。コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属細菌としては、コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) が好ましい。グラム陰性細菌としては、例えば、エシェリヒア (*Escherichia*) 属細菌、パントエア (*Pantoea*) 属細菌が挙げられる。エシェリヒア (*Escherichia*) 属細菌としては、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) が好ましい。パントエア (*Pantoea*) 属細菌としては、パントエア・アナナティス (*Pantoea ananatis*) が好ましい。真菌としては、サッカロミセス (*Saccharomyces*) 属、シゾサッカロミセス (*Schizosaccharomyces*) 属の微生物が好ましい。サッカロミセス (*Saccharomyces*) 属の微生物としては、サッカ

ロミセス・セレビスエー (*Saccharomyces cerevisiae*) が好ましい。シゾサッカロミセス (*Schizosaccharomyces*) 属の微生物としては、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) が好ましい。本発明の宿主細胞は、腸内細菌科に属する細菌が好ましく、エシェリヒア属細菌およびパントエア属細菌がより好ましく、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) およびパントエア・アナナティス (*Pantoea ananatis*) がさらにより好ましい。

[0047] 一実施形態では、本発明の宿主細胞は、宿主細胞自体（例、宿主細胞培養物）またはその処理物（例、宿主細胞の破砕物、溶菌物、凍結乾燥物）を用いて、宿主細胞で生成された本発明の改変酵素によりN-アシルアミノ基含有化合物またはその塩を製造するために用いることができる。別の実施形態では、本発明の宿主細胞は、本発明の改変酵素を未精製、粗精製または精製酵素として得るために用いることができる。

[0048] 本発明の宿主細胞をN-アシルアミノ基含有化合物またはその塩の製造のために用いる場合、本発明の宿主細胞は、酵素反応の基質の供給効率を向上させて生成効率を向上させるために、例えば、アミノ酸および／または脂肪酸の取り込み能が強化された宿主であってもよい。上記取り込み能が強化された宿主としては、例えば、上記取り込み能に関連する酵素等のタンパク質を産生または強化する宿主が挙げられる。上記取り込み能に関連する酵素等のタンパク質を産生または強化する宿主としては、例えば、上記タンパク質の発現単位が形質転換により導入された宿主、宿主ゲノム中に上記タンパク質の発現量を強化させる変異を含む宿主、宿主ゲノム中に上記タンパク質の活性を強化させる変異を含む宿主が挙げられる。このような宿主細胞は、アミノ基含有化合物（例、アミノ酸）および／またはカルボキシル基含有化合物（例、脂肪酸）を含む培養液中で宿主細胞を培養させてN-アシルアミノ基含有化合物（例、N-アシルアミノ酸）またはその塩を製造するために用いることができる。さらに、このような宿主細胞は、炭素源（例、グル

コース等の糖類)を含む培養液中で宿主細胞を培養することによるN-アシルアミノ基含有化合物(例、N-アシルアミノ酸)またはその塩の製造(直接発酵法)に用いることができる。

[0049] 本発明の宿主細胞は、酵素反応の基質の損失を抑制するために、および／または酵素反応の基質の供給を促進するために、あるいは生成物の損失を抑制するために、例えば、下記から選ばれる少なくとも1つ以上の遺伝子改変がされた宿主細胞であってもよい。：

- (1) 脂肪酸供給能強化；
- (2) アミノ酸供給能強化；
- (3) ATP供給能強化；および
- (4) N-アシルアミノ酸分解酵素欠損または弱化。

[0050] 脂肪酸供給能強化に有効な遺伝子改変がされた宿主細胞は、脂肪酸の分解系が弱化または欠損、および／または脂肪酸の合成系が強化された宿主細胞であってもよい。

[0051] 上記脂肪酸の分解系が弱化または欠損した宿主細胞としては、例えば、上記分解系に関連する酵素等のタンパク質が弱化または欠損した宿主細胞、上記分解系に関連する酵素等のタンパク質の阻害因子を産生する宿主細胞が挙げられる。

上記脂肪酸の分解系に関連する酵素等のタンパク質が弱化または欠損した宿主細胞としては、例えば、宿主細胞ゲノム中に上記タンパク質の発現量を低下または欠失させる変異を含む宿主細胞、宿主細胞ゲノム中に上記タンパク質の活性を低下または欠失させる変異を含む宿主細胞が挙げられる。

上記脂肪酸の分解系に関連する酵素等のタンパク質の阻害因子を産生または強化する宿主細胞としては、例えば、上記阻害因子の発現単位が形質転換により導入された宿主細胞、宿主細胞ゲノム中に上記阻害因子の発現量を強化させる変異を含む宿主細胞、宿主細胞ゲノム中に上記阻害因子の活性を強化させる変異を含む宿主細胞が挙げられる。

より具体的には、上記脂肪酸の分解系に関連する酵素等のタンパク質とし

ては、例えば、アシルC o A合成酵素（f a d D）、アシルC o Aデヒドロゲナーゼ（f a d E）、エノイルC o Aヒドラターゼ（f a d B、f a d J）、3-ヒドロキシアシルC o Aデヒドロゲナーゼ（f a d B、f a d J）、3-ケトアシルC o Aチオラーゼ（f a d A、f a d I）が挙げられる。なお、酵素名の後のカッコ内は、その遺伝子名である（以下の記載においても同様）。これらの酵素の中では、例えば、アシルC o A合成酵素が好ましい。

[0052] 上記脂肪酸の合成系が強化された宿主細胞としては、例えば、上記合成系に関連する酵素等のタンパク質を産生または強化する宿主細胞が挙げられる。

上記合成系に関連する酵素等のタンパク質を産生または強化する宿主細胞としては、例えば、上記タンパク質の発現単位が形質転換により導入された宿主細胞、宿主細胞ゲノム中に上記タンパク質の発現量を強化させる変異を含む宿主細胞、宿主細胞ゲノム中に上記タンパク質の活性を強化させる変異を含む宿主細胞が挙げられる。

より具体的には、上記脂肪酸の合成系に関連する酵素等のタンパク質としては、例えば、アシル-ACPチオエステラーゼ、アセチルC o Aカルボキシラーゼ（a c c A B C D）、マロニルC o A-ACPトランスアシラーゼ（f a b D）、 β -ケトアシルACP合成酵素I I I（f a b H）、 β -ケトアシルACPレダクターゼ（f a b G）、 β -ヒドロキシアシルACPデヒドラターゼ（f a b Z）、エノイルACPレダクターゼ（f a b I）、 β -ケトアシルACP合成酵素I（f a b B）、 β -ケトアシルACP合成酵素I I（f a b F）が挙げられる。これらの酵素の中では、例えば、アシル-ACPチオエステラーゼが好ましい。

[0053] 好ましくは、上記脂肪酸供給能強化の遺伝子改変は、下記（a）または（b）のいずれか、あるいは下記（a）および（b）の双方であってもよい。

（a）アシルC o A合成酵素欠損または弱化；および

（b）アシル-ACPチオエステラーゼ増強。

[0054] アシルC o A合成酵素欠損または弱化としては、例えば、宿主細胞ゲノム上のf a d D遺伝子の欠失または変異導入が挙げられる。

[0055] アシルーA C Pチオエステラーゼ増強としては、例えば、アシルーA C Pチオエステラーゼ発現単位の宿主細胞への導入が挙げられる。

[0056] アシルーA C Pチオエステラーゼは、例えば、ラウロイルーA C Pに対するチオエステラーゼ活性を有するアシルーA C Pチオエステラーゼであってもよい。また、アシルーA C Pチオエステラーゼは、例えば、下記から選ばれるタンパク質であってもよい：

(i) (i - 1) 配列番号3のアミノ酸配列、または(i - 2) 配列番号3のアミノ酸配列における84番目から382番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含むタンパク質；

(i i) (i i - 1) 配列番号3のアミノ酸配列、または(i i - 2) 配列番号3のアミノ酸配列における84番目から382番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列において、1もしくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、もしくは付加を含むアミノ酸配列を含み、かつ、アシルーA C Pチオエステラーゼ活性を有するタンパク質；および

(i i i) (i i i - 1) 配列番号3のアミノ酸配列、または(i i i - 2) 配列番号3のアミノ酸配列における84番目から382番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列に対して90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ、アシルーA C Pチオエステラーゼ活性を有するタンパク質。

[0057] アミノ酸供給能強化に有効な遺伝子改変がされた宿主細胞は、アミノ酸の分解系が弱化または欠損した宿主細胞、および／またはアミノ酸の合成系が強化された宿主細胞であってもよい。

[0058] 上記アミノ酸の分解系が弱化または欠損した宿主細胞としては、例えば、上記アミノ酸の分解系に関連する酵素等のタンパク質が弱化または欠損した宿主細胞、上記アミノ酸の分解系に関連する酵素等のタンパク質の阻害因子を産生する宿主細胞が挙げられる。

上記アミノ酸の分解系に関連する酵素等のタンパク質が弱化または欠損し

た宿主細胞としては、例えば、宿主細胞ゲノム中に上記タンパク質の発現量を低下または欠失させる変異を含む宿主細胞、宿主細胞ゲノム中に上記タンパク質の活性を低下または欠失させる変異を含む宿主細胞が挙げられる。

上記アミノ酸の分解系に関連する酵素等のタンパク質の阻害因子を産生または強化する宿主細胞としては、例えば、上記阻害因子の発現単位が形質転換により導入された宿主細胞、宿主細胞ゲノム中に上記阻害因子の発現量を強化させる変異を含む宿主細胞、宿主細胞ゲノム中に上記阻害因子の活性を強化させる変異を含む宿主細胞が挙げられる。

より具体的には、アミノ酸の分解系に関連する酵素等のタンパク質は、目的のアミノ酸（例、L-グルタミン酸）の生合成経路から分岐して目的のアミノ酸（例、L-グルタミン酸）以外の化合物を生成する反応を触媒する酵素であってもよい。そのような酵素としては、例えば、 α -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ（s u c A）、イソクエン酸リアーゼ（a c e A）、コハク酸デヒドロゲナーゼ（s d h A B C D）、ホスホトランスアセチラーゼ（p t a）、酢酸キナーゼ（a c k）、アセトヒドロキシ酸シンターゼ（i l v G）、アセト乳酸シンターゼ（i l v l）、ギ酸アセチルトランスフェラーゼ（p f l）、乳酸デヒドロゲナーゼ（l d h）、グルタミン酸デカルボキシラーゼ（g a d A B）、1-ピロリン-5-カルボキシレートデヒドロゲナーゼ（p u t A）などが挙げられる。これらの酵素の中では、例えば、 α -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼが好ましい。

[0059] 上記アミノ酸の合成系が強化された宿主細胞としては、例えば、上記アミノ酸の合成系に関連する酵素等のタンパク質を産生または強化する宿主細胞が挙げられる。

上記アミノ酸の合成系に関連する酵素等のタンパク質を産生または強化する宿主細胞としては、例えば、上記アミノ酸のタンパク質の発現単位が形質転換により導入された宿主細胞、宿主細胞ゲノム中に上記タンパク質の発現量を強化させる変異を含む宿主細胞、宿主細胞ゲノム中に上記タンパク質の活性を強化させる変異を含む宿主細胞が挙げられる。

より具体的には、アミノ酸（例、グルタミン酸）の合成系に関連する酵素等のタンパク質としては、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ（g d h A）、グルタミンシンテターゼ（g l n A）、グルタミン酸シンターゼ（g l t B D）、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ（i c d A）、アコニテートヒドラターゼ（a c n A, a c n B）、クエン酸シンターゼ（g l t A）、メチルクエン酸シンターゼ（p r p C）、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ（p p c）、ピルビン酸カルボキシラーゼ（p y c）、ピルビン酸キナーゼ（p y k A, p y k F）、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ（a c e E F, l p d A）、ホスホエノールピルビン酸シンターゼ（p p s A）、エノラーゼ（e n o）、ホスホグリセロムターゼ（p g m A, p g m l）、ホスホグリセリン酸キナーゼ（p g k）、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ（g a p A）、トリオースリン酸イソメラーゼ（t p i A）、フルクトースビスリン酸アルドラーゼ（f b p）、ホスホフルクトキナーゼ（p f k A, p f k B）、グルコースリン酸イソメラーゼ（p g i）、6-ホスホグルコン酸デヒドラターゼ（e d d）、2-ケト-3-デオキシ-6-ホスホグルコン酸アルドラーゼ（e d a）、トランスヒドロゲナーゼなどが挙げられる。

[0060] A T P 供給能強化に有効な遺伝子改変がされた宿主細胞は、A T P の分解系が弱化または欠損した宿主細胞、および／または A T P の合成系が強化された宿主細胞であってもよい。

[0061] 上記 A T P の分解系が弱化または欠損した宿主細胞としては、例えば、上記 A T P の分解系に関連する酵素等のタンパク質が弱化または欠損した宿主細胞が挙げられる。

上記 A T P の分解系に関連する酵素等のタンパク質が弱化または欠損した宿主細胞としては、例えば、宿主細胞ゲノム中に上記タンパク質の発現量を低下または欠失させる変異を含む宿主細胞、宿主細胞ゲノム中に上記タンパク質の活性を低下または欠失させる変異を含む宿主細胞が挙げられる。

[0062] 上記 A T P の合成系が強化された宿主細胞としては、例えば、上記合成系

に関連する酵素等のタンパク質を産生または強化する宿主細胞が挙げられる。

上記 A T P の合成系に関連する酵素等のタンパク質を産生または強化する宿主細胞としては、例えば、上記タンパク質の発現単位が形質転換により導入された宿主細胞、宿主細胞ゲノム中に上記タンパク質の発現量を強化させる変異を含む宿主細胞、宿主細胞ゲノム中に上記タンパク質の活性を強化させる変異を含む宿主細胞が挙げられる。

[0063] N－アシルアミノ酸分解酵素欠損または弱化に有効な遺伝子改変としては、例えば、アシラーゼ欠損または弱化が挙げられる。アシラーゼ欠損または弱化としては、例えば、宿主細胞ゲノム上のアシラーゼ遺伝子の欠失または変異導入が挙げられる。

[0064] このような宿主細胞は、本発明で用いられる酵素を産生する形質転換微生物（例、微生物培養物）またはその処理物（例、微生物の破砕物、溶菌物、凍結乾燥物）として、アミノ基含有化合物（例、アミノ酸）およびカルボキシル基含有化合物（例、脂肪酸）を含む反応液中で N－アシルアミノ基含有化合物（例、N－アシルアミノ酸）またはその塩を製造（酵素法）するために用いることができる。このような宿主細胞は、アミノ基含有化合物（例、アミノ酸）および／またはカルボキシル基含有化合物（例、脂肪酸）を含む培養液中で宿主細胞を培養して、N－アシルアミノ基含有化合物（例、N－アシルアミノ酸）またはその塩を製造するために用いることができる。さらに、このような宿主細胞は、炭素源（例、グルコース等の糖類）からアミノ基含有化合物（例、アミノ酸）および／またはカルボキシル基含有化合物（例、脂肪酸）を生成する代謝経路が強化されていることから、炭素源を含む培養液中で宿主細胞を培養することによる N－アシルアミノ基含有化合物（例、N－アシルアミノ酸）またはその塩の製造（直接発酵法）に用いることができる。

[0065] 本発明で用いられる形質転換微生物は、当該分野において公知の任意の方法により作製することができる。例えば、上述したような形質転換微生物は

、発現ベクターを用いる方法（例、コンピテント細胞法、エレクトロポレーション法）、またはゲノム改変技術により作製することができる。発現ベクターが宿主細胞のゲノムDNAと相同組換えを生じる組込み型（i n t e g r a t i v e）ベクターである場合、発現単位は、形質転換により、宿主細胞のゲノムDNAに組み込まれることができる。一方、発現ベクターが宿主細胞のゲノムDNAと相同組換えを生じない非組込み型ベクターである場合、発現単位は、形質転換により、宿主細胞のゲノムDNAに組み込まれず、宿主細胞内において、発現ベクターの状態のまま、ゲノムDNAから独立して存在できる。あるいは、ゲノム編集技術（例、CRISPR/Casシステム、Transcription Activator-Like Effector Nucleases（TALEN））によれば、発現単位を宿主細胞のゲノムDNAに組み込むこと、および宿主細胞が固有に備える発現単位を改変することが可能である。

[0066] （N-アシルーアミノ基含有化合物またはその塩の製造方法）

本発明は、N-アシルーアミノ基含有化合物またはその塩の製造方法を提供する。本発明の方法は、N-アシル化活性を有する改変酵素の存在下において、アミノ基含有化合物およびカルボキシル基含有化合物を反応させて、N-アシルーアミノ基含有化合物またはその塩を生成することを含む。

[0067] 本発明の方法で用いられる改変酵素は、上述した本発明の改変酵素であってもよい。

[0068] （アミノ基含有化合物）

本発明の方法に用いることができるアミノ基含有化合物は、窒素原子が1個または2個の水素原子と結合したアミノ基を含有する有機化合物、または窒素原子が水素原子と結合していないアミノ基を含有する有機化合物のいずれであってもよい。アミノ基含有化合物としては、酵素の基質特異性等の観点から、窒素原子が1個または2個の水素原子と結合したアミノ基を含有する化合物が好ましく、窒素原子が2個の水素原子と結合したアミノ基を含有する化合物がより好ましい。

[0069] 本発明の方法に用いることができるアミノ基含有化合物は、アニオン性基を有するアミノ基含有化合物が好ましい。アニオン性基としては、例えば、カルボキシル基、スルホン酸基、硫酸基、リン酸基が挙げられる。

[0070] アニオン性基としてカルボキシル基を有するアミノ基含有化合物としては、例えば、アミノ酸およびペプチドが挙げられる。

[0071] アミノ酸としては、例えば、 α -アミノ酸、 β -アミノ酸、および γ -アミノ酸が挙げられる。 α -アミノ酸としては、例えば、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、メチオニン、フェニルアラニン、トリプトファン、セリン、スレオニン、アスパラギン、グルタミン、チロシン、システイン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ヒスチジン、リジン、およびアルギニンが挙げられる。 β -アミノ酸としては、例えば、 β -アラニンが挙げられる。 γ -アミノ酸としては、例えば、 γ -アミノ酪酸が挙げられる。アミノ酸のアミノ基は、窒素原子が2個の水素原子と結合したアミノ基、窒素原子が1個の水素原子と結合したアミノ基、および窒素原子が水素原子と結合していないアミノ基のいずれであってもよい。窒素原子が1個の水素原子と結合したアミノ基を含有するアミノ酸としては、例えば、サルコシン、N-メチル- β -アラニン、N-メチルタウリン、プロリンが挙げられる。アミノ酸は、L-アミノ酸またはD-アミノ酸のいずれであってもよい。

[0072] ペプチドは、上述したアミノ酸がアミド結合により連結された構造を有する化合物である。ペプチドとしては、例えば、2~10個のアミノ酸がアミド結合により連絡された構造を有するオリゴペプチド（例、ジペプチド、トリペプチド、テトラペプチド、ペンタペプチド、ヘキサペプチド、ヘプタペプチド、オクタペプチド）、および11個以上のアミノ酸がアミド結合により連結された構造を有するポリペプチド（タンパク質）が挙げられる。ジペプチドとしては、例えば、アスパルチルフェニルアラニン、グリシルグリシン、および β -アラニルヒスチジン、アラニルグルタミンが挙げられる。

[0073] アニオン性基としてスルホン酸基を有するアミノ基含有化合物としては、

例えば、タウリン、N-メチルタウリン、システイン酸が挙げられる。

[0074] アニオン性基として硫酸基を有するアミノ基含有化合物としては、例えば、O-スルホセリン、O-スルホスレオニンが挙げられる。

[0075] アニオン性基としてリン酸基を有するアミノ基含有化合物としては、例えば、エタノールアミンリン酸、ホスホセリン、ホスホスレオニンが挙げられる。

[0076] 本発明の方法に用いることができるアミノ基含有化合物は、酸性アミノ酸が好ましい。「酸性アミノ酸」とは、酸性側鎖を有するアミノ酸を指す。酸性アミノ酸としては、例えば、グルタミン酸、アスパラギン酸が挙げられ、グルタミン酸が好ましい。

[0077] (カルボキシル基含有化合物)

本発明の方法に用いることができるカルボキシル基含有化合物は、置換されていないカルボキシル基(例、遊離型、イオン、塩)を含有する化合物である。カルボキシル基含有化合物としては、例えば、脂肪酸、芳香族カルボン酸、インドールカルボン酸、およびこれらの混合物が挙げられる。カルボキシル基含有化合物としては、脂肪酸が好ましい。

[0078] 脂肪酸は、例えば炭素原子数8~18の脂肪酸、好ましくは炭素原子数12の脂肪酸であってもよい。炭素原子数6~18の脂肪酸としては、例えばカプロン酸(C6)、エナント酸(C7)、カプリル酸(C8)、ペラルゴン酸(C9)、カプリン酸(C10)、デセン酸(C10:1)、ウンデシル酸(C11)、ラウリン酸(C12)、ドデセン酸(C12:1)、トリデシル酸(C13)、ミリスチン酸(C14)、テトラデセン酸(C14:1)(例えば、ミリストレイン酸)、ペンタデシル酸(C15)、パルミチン酸(C16)、ヘキサデセン酸(C16:1)(例えば、パルミトレイン酸、サピエン酸)、マルガリン酸(C17)、ステアリン酸(C18)、オクタデセン酸(C18:1)(例えば、オレイン酸、バクセン酸)、リノール酸(C18:2)、リノレン酸(C18:3)(例えば、 α -リノレン酸、 γ -リノレン酸)が挙げられ(括弧内は炭素原子数を示す。)、その他に

、ヤシ油脂肪酸、パーム脂肪酸、硬化牛脂脂肪酸等の混合脂肪酸も使用可能である。

[0079] 脂肪酸は、飽和脂肪酸であってもよい。上記脂肪酸のうち飽和脂肪酸としては、カプロン酸、エナント酸、カプリル酸、ペラルゴン酸、カプリン酸、ウンデシル酸、ラウリン酸、トリデシル酸、ミリスチン酸、ペンタデシル酸、パルミチン酸、マルガリン酸、ステアリン酸が挙げられる。飽和脂肪酸としては、ラウリン酸が好ましい。脂肪酸は、不飽和飽和脂肪酸であってもよい。上記脂肪酸のうち不飽和脂肪酸としては、デセン酸（C 10 : 1）、ドデセン酸（C 12 : 1）、テトラデセン酸（C 14 : 1）（例えば、ミリストレイン酸）、ヘキサデセン酸（C 16 : 1）（例えば、パルミトレイン酸、サピエン酸）、オクタデセン酸（C 18 : 1）（例えば、オレイン酸、バクセン酸）、リノール酸（C 18 : 2）、リノレン酸（C 18 : 3）（例えば、 α -リノレン酸、 γ -リノレン酸）が挙げられる（括弧内は炭素原子数を示す。）。不飽和脂肪酸としては、ドデセン酸（C 12 : 1）またはヘキサデセン酸（C 16 : 1）が好ましい。脂肪酸は、これらの混合物であってもよい。

[0080] 芳香族カルボン酸としては、安息香酸、フタル酸、イソフタル酸、テレフタル酸、サリチル酸、没食子酸、ケイ皮酸、およびこれらの混合物が挙げられる。

[0081] （N-アシルーアミノ基含有化合物またはその塩）

本発明の方法で製造されるN-アシルーアミノ基含有化合物またはその塩は、上記アミノ基含有化合物のアミノ基と上記カルボキシル基含有化合物のカルボキシル基とがアミド結合を形成した構造を有する化合物である。上記N-アシルーアミノ基含有化合物またはその塩は、上記酵素の存在下において、上記アミノ基含有化合物および上記カルボキシル基含有化合物の反応により生成される。カルボキシル基と反応するアミノ基は、上記アミノ基含有化合物のいずれの位置にあってもよく、例えば、 α 位、 β 位、 γ 位、 δ 位、 ε 位のいずれであってもよい。本発明の方法で製造されるN-アシルーアミ

ノ基含有化合物またはその塩は、 $N\alpha$ -アシル-L-グルタミン酸もしくは $N\alpha$ -アシル-L-アスパラギン酸またはその塩が好ましく、 $N\alpha$ -ラウロイル-L-グルタミン酸もしくは $N\alpha$ -ラウロイル-L-アスパラギン酸またはその塩がより好ましい。 N -アシル-アミノ基含有化合物の塩としては、例えば、無機塩および有機塩が挙げられる。無機塩としては、例えば、金属（例、リチウム、ナトリウム、カリウム、ルビジウム、およびセシウム等の一価の金属、並びにカルシウム、マグネシウム、および亜鉛等の二価の金属）の塩、並びに無機塩基（例、アンモニア）の塩が挙げられる。有機塩としては、例えば、有機塩基（例、エチレンジアミン、プロピレンジアミン、エタノールアミン、モノアルキルエタノールアミン、ジアルキルエタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、リジン、アルギニン、ヒスチジン、およびオルニチン）の塩が挙げられる。

[0082] 本明細書において、「炭素原子数 n 個のアシル」とは、 $C_{n-1}H_m-CO-$ で示されるアシル（水素原子は置換されていてもよい）を指す。ここで、 m は、炭素原子数及び不飽和結合の有無にしたがって適宜決定される。

[0083] 本明細書において、「 N -モノ不飽和アシル-アミノ基含有化合物（ここで、不飽和アシルは、炭素原子数 10～16 個のモノ不飽和アシルである）」は、遊離体としては、 $C_{n-1}H_m-CO-NH-CHR-COOH$ で示される化合物（ H_m で示される水素原子は置換されていてもよい。 m は上記で定義したとおりである。 R は酸性アミノ酸の側鎖を示す。）を指す。すなわち、「 N -モノ不飽和アシル-アミノ基含有化合物」とは、酸性アミノ酸のアミノ基上の 1 個の水素原子が不飽和アシル基で置換された化合物を指す。「 N -モノ不飽和アシル-アミノ基含有化合物」は、 N -モノ不飽和アシル-アミノ基含有化合物の遊離体であってもよく、 N -モノ不飽和アシル-アミノ基含有化合物の塩であってもよい。

[0084] 本明細書において、 N -モノ不飽和アシル-アミノ基含有化合物は、便宜上、 $C_{n-1}H_m-COOH$ で示される脂肪酸またはその誘導体に由来するものとして示すことがある。また、本明細書において、「炭素原子数 n 個の不飽

和アシル」およびその由来する脂肪酸等を、「C n : m」により表記することもある。例えば、「N-ドデセノイル酸性アミノ酸 (C 12 : 1)」とは、酸性アミノ酸のアミノ基上の1個の水素原子が、ドデセノン酸 (C 12 : 1) に由来するアシル基であるドデセノイル基で置換された化合物 (C₁₁H₂₁CO-NH-CHR-COOH、ここで、Rは酸性アミノ酸の側鎖を示す。) を指す。

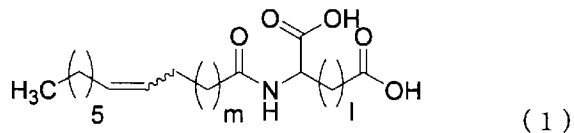
[0085] 本発明の方法で製造されるN-アシル-アミノ基含有化合物またはその塩が、N-モノ不飽和アシル-アミノ基含有化合物またはその塩を含む場合、N-モノ不飽和アシル-アミノ基含有化合物は、例えば、N-デセノイル酸性アミノ酸 (C 10 : 1)、N-ドデセノイル酸性アミノ酸 (C 12 : 1)、N-テトラデセノイル酸性アミノ酸 (C 14 : 1)、及びN-ヘキサデセノイル酸性アミノ酸 (C 16 : 1) が挙げられ、N-ドデセノイル酸性アミノ酸 (C 12 : 1) 又はN-ヘキサデセノイル酸性アミノ酸 (C 16 : 1) が好ましく、N-ドデセノイルグルタミン酸 (C 12 : 1) 又はN-ヘキサデセノイルグルタミン酸 (C 16 : 1) がより好ましく、N-ドデセノイルグルタミン酸 (C 12 : 1) がさらに好ましい。

[0086] N-モノ不飽和アシル-アミノ基含有化合物は、1種のN-モノ不飽和アシル-アミノ基含有化合物であってもよく、2種以上のN-モノ不飽和アシル-アミノ基含有化合物を含んでいてもよい。すなわち、N-モノ不飽和アシル-アミノ基含有化合物は、N-デセノイル酸性アミノ酸 (C 10 : 1)、N-ドデセノイル酸性アミノ酸 (C 12 : 1)、N-テトラデセノイル酸性アミノ酸 (C 14 : 1)、及びN-ヘキサデセノイル酸性アミノ酸 (C 16 : 1) からなる群から選ばれる1又は2以上を含んでいてもよい。2種以上のN-モノ不飽和アシル-アミノ基含有化合物である場合、N-ドデセノイル酸性アミノ酸 (C 12 : 1) と、N-デセノイル酸性アミノ酸 (C 10 : 1)、N-テトラデセノイル酸性アミノ酸 (C 14 : 1)、及びN-ヘキサデセノイル酸性アミノ酸 (C 16 : 1) からなる群から選ばれる1又は2以上と、の組合せが好ましく、泡質がより良好になる観点から、N-ドデセ

ノイル酸性アミノ酸（C 1 2 : 1）とN-ヘキサデセノイル酸性アミノ酸（C 1 6 : 1）と、の組合せがより好ましい。

[0087] N-モノ不飽和アシルーアミノ基含有化合物は、下記一般式（1）で表される化合物であることが好ましい。

[0088] [化2]



（一般式（1）中、 l は、1 又は 2 の整数であり、 m は、0～6 の整数である。）

[0089] N-モノ不飽和アシルーアミノ基含有化合物の立体化学（不飽和二重結合部位）は、*c i s* と *t r a n s* のいずれでもよい。但し、増粘性の増加を抑制し、ハンドリング性の高い低粘度とする観点からは、*c i s* が好ましい。

[0090] （酵素法によるN-アシルーアミノ基含有化合物の製造）

本発明の方法で用いられる酵素として、組換えタンパク質を利用することができる。組換えタンパク質は、例えば、無細胞系ベクターを用いて、または本発明で用いられる酵素を産生する微生物から得ることができる。本発明で用いられる酵素は、未精製、粗精製または精製酵素として利用することができる。これらの酵素としては、反応において、固相に固定された固相化タンパク質として利用されてもよい。本発明で用いられる酵素は、前記酵素を産生する形質転換微生物（例、微生物培養物）またはその処理物（例、微生物の破碎物、溶菌物、凍結乾燥物）の形態で利用することができる。

[0091] 本発明の方法で用いられる酵素を公知の方法で単離し、必要に応じて更に精製することにより、目的とする酵素が得られる。酵素を産生する微生物としては、酵素の大量入手等の観点より、形質転換微生物が好ましい。本発明では、用語「形質転換」は、宿主細胞に対するポリヌクレオチドの導入のみならず、宿主細胞におけるゲノムの改変もまた意図される。

[0092] 形質転換微生物の培養条件としては、特に限定されず、宿主に応じて標準

的な細胞培養条件を用いることができる。形質転換微生物を培養するための培地は公知であり、例えば、LB培地などの栄養培地や、M9培地などの最小培地に炭素源、窒素源、ビタミン源等を添加して用いることができる。

[0093] 培養温度としては、4～40℃が好ましく、10～37℃がより好ましい。培養時間としては、5～168時間が好ましく、8～72時間がより好ましい。ガス組成としては、CO₂濃度が約6%～約84%であることが好ましく、pHが、約5～9であることが好ましい。また、宿主細胞の性質に応じて好気性、無酸素性、又は嫌気性条件下で培養を行うことが好ましい。

[0094] 培養方法としては、任意の適切な方法を用いることができる。宿主細胞に依存して、振盪培養と静置培養のいずれも可能であるが、必要に応じて攪拌を行ってもよく、通気を行ってもよい。このような培養方法としては、例えば、バッチ培養法、流加培養法、連続培養法が挙げられる。形質転換体微生物により産生される特定のタンパク質の発現がlacプロモーター等の誘導的プロモーターの制御下にある場合、培養培地中に、例えばIPTG（イソプロピルーβ-チオガラクトピラノシド）等の誘導剤を添加して、タンパク質の発現を誘導してもよい。

[0095] 産生された目的酵素は、形質転換微生物の抽出物から公知の塩析、等電点沈殿法もしくは溶媒沈殿法等の沈殿法、透析、限外濾過もしくはゲル濾過等の分子量差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィー等の特異的親和性を利用する方法、疎水クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー等の疎水度の差を利用する方法やその他アフィニティークロマトグラフィー、SDSポリアクリルアミド電気泳動法、等電点電気泳動法等、またはこれらの組み合わせにより、精製および単離することが可能である。目的酵素を分泌発現させた場合には、形質転換微生物を培養して得られた培養液から、菌体を遠心分離等で除くことで目的酵素を含む培養上清が得られる。この培養上清からも目的酵素を精製および単離することが可能である。

[0096] 本発明の方法において用いられる基質であるアミノ基含有化合物およびカルボキシル基含有化合物は、上記酵素を含む反応系（例、上記酵素を含む水

溶液、上記酵素を産生する形質転換微生物を含む培養液、上記酵素を産生する形質転換微生物の処理物）に添加することができる。あるいは、本発明の方法では、別の反応系において生成したアミノ基含有化合物またはカルボキシル基含有化合物を基質として利用することもできる。

[0097] 本発明の方法が上記酵素自体（例、精製酵素）を用いて行われる場合、反応系としては、上記酵素を含む水溶液を用いることができる。水溶液としては、緩衝液が好ましい。緩衝液としては、例えば、リン酸緩衝液、T r i s 緩衝液、炭酸緩衝液、酢酸緩衝液、クエン酸緩衝液が挙げられる。p Hは、例えば、約5～10が好ましい。反応系における酵素、ならびにアミノ基含有化合物およびカルボキシル基含有化合物（基質）の量、ならびに反応時間は、生成されるべきN-アシル-アミノ基含有化合物の量に応じて、適宜調節することができる。反応温度は、反応が進行する限り特に限定されないが、20～40℃が好ましい。

[0098] 本発明の方法は、A T P再生系との組合せで行われてもよい。本発明の方法が上記酵素自体（例、精製酵素）を用いて行われる場合、A T P再生系との組合せとしては、例えば、A T P再生酵素との組合せ（例、混合）による反応が挙げられる。A T P再生酵素としては、例えば、ポリリン酸キナーゼ、ポリリン酸：A M P リン酸転移酵素とポリリン酸キナーゼとの組み合わせ、ポリリン酸：A M P リン酸転移酵素とアデニル酸キナーゼとの組み合わせが挙げられる。本発明の方法が前記酵素を産生する形質転換微生物またはその処理物を用いて行われる場合、A T P再生系との組合せとしては、例えば、A T P供給能を増強した微生物を宿主として用いることが挙げられる。A T P供給能を増強した微生物としては、例えば、上述したA T P再生酵素を産生または強化する微生物が挙げられる。A T P再生酵素を産生または強化する微生物としては、例えば、A T P再生酵素の発現単位が形質転換により導入された宿主、宿主ゲノム中にA T P再生酵素の発現量を強化させる変異を含む宿主、宿主ゲノム中にA T P再生酵素の活性を強化させる変異を含む宿主が挙げられる。

[0099] (微生物培養法によるN-アシルアミノ基含有化合物の製造)

本発明の方法において、上記酵素の存在下における反応は、前記酵素を産生する形質転換微生物(例、微生物培養物)を用いて行われてもよい。

[0100] 本発明の方法を上記形質転換微生物の培養物を用いて行なう場合、形質転換微生物は、酵素反応の基質の供給効率を向上させて生成効率を向上させるために、例えば、アミノ酸および／または脂肪酸の取り込み能が強化された宿主であってもよい。上記取り込み能が強化された宿主としては、上述のものが挙げられる。この場合、形質転換微生物をアミノ基含有化合物(例、アミノ酸)および／またはカルボキシル基含有化合物(例、脂肪酸)を含む培養液中で培養させることにより、両基質が形質転換微生物に取り込まれ、形質転換微生物中で生成された酵素によりアミド結合が形成されて、目的のN-アシルアミノ基含有化合物(例、N-アシルアミノ酸)を生成させることができる。

[0101] また、酵素反応の基質の損失を抑制するために、および／または酵素反応の基質の供給を促進するために、あるいは生成物の損失を抑制するために、形質転換微生物は、例えば、下記から選ばれる少なくとも1つ以上の遺伝子改変がされていてもよい：

- (1) 脂肪酸供給能強化；
- (2) アミノ酸供給能強化；
- (3) ATP供給能強化；および
- (4) N-アシルアミノ酸分解酵素欠損または弱化。

このような形質転換微生物は、好ましくは、脂肪酸供給能強化に有効な遺伝子改変がされていてもよく、このような形質転換微生物は、脂肪酸の分解系が弱化または欠損、および／または合成系が強化された形質転換微生物であってもよい。上記分解系が弱化または欠損、および／または合成系が強化された形質転換微生物(宿主)としては、上述のものが挙げられる。このような形質転換微生物としては、好ましくは下記から選ばれる少なくとも1つ以上の遺伝子改変がされた微生物が挙げられる：

(a) アシルC o A 合成酵素欠損または弱化；および

(b) アシルー A C P チオエステラーゼ増強。

(a) および (b) の遺伝子改変の詳細は上述のとおりである。

[0102] 形質転換微生物を培養することにより N-アシルーアミノ基含有化合物を製造する場合、形質転換微生物の培養条件としては、特に限定されず、例えば、上述の培養条件において、所定量のアミノ基含有化合物および／またはカルボキシル基含有化合物をさらに含む培地で培養する培養条件を用いることができる。

[0103] (直接発酵法による N-アシルーアミノ基含有化合物の製造)

本発明は、直接発酵法による N-アシルーアミノ基含有化合物の製造方法を提供する。「直接発酵法」とは、形質転換微生物を原料である炭素源を含む培養液中で培養して、炭素源から目的の N-アシルーアミノ基含有化合物（例、N-アシルアミノ酸）を生成させることによる N-アシルーアミノ基含有化合物（例、N-アシルアミノ酸）の製造方法をいう。この方法では、炭素源が微生物に取り込まれ、微生物中で炭素源がカルボキシル基含有化合物（例、脂肪酸）およびアミノ基含有化合物（例、アミノ酸）に代謝され、代謝により生じたカルボキシル基含有化合物（例、脂肪酸）およびアミノ基含有化合物（例、アミノ酸）が、微生物中の N-アシル化活性を有する酵素の作用によりアミド結合により結合して、目的の N-アシルーアミノ基含有化合物（例、N-アシルアミノ酸）が生成されることを原理とする。

[0104] 例えば、直接発酵法は、下記：

(1) 脂肪酸供給能強化；

(2) アミノ酸供給能強化；

(3) A T P 供給能強化；および

(4) N-アシルアミノ酸分解酵素欠損または弱化

から選ばれる少なくとも 1 つ以上の遺伝子改変がされ、さらに、N-アシル化活性を有する酵素をコードするポリヌクレオチドの発現単位を含む微生物を、炭素源の存在下で培養することを含む、アミノ基含有化合物とカルボ

キシル基含有化合物がアミド結合したN-アシル-アミノ基含有化合物の製造方法として表わすことができる。上記（１）～（４）の詳細は、上述したものと同様である（他の箇所も同様）。

[0105] 好ましくは、直接発酵法は、下記：

（a）アシルCoA合成酵素欠損または弱化；および

（b）アシル-ACPチオエステラーゼ増強

から選ばれる少なくとも１つ以上の遺伝子改変がされ、さらに、N-アシル化活性を有する酵素をコードするポリヌクレオチドの発現単位を含む微生物を、炭素源の存在下で培養することを含む、アミノ基含有化合物とカルボキシル基含有化合物がアミド結合したN-アシル-アミノ基含有化合物の製造方法として表わすことができる。上記（a）および（b）の詳細は、上述したものと同様である（他の箇所も同様）。

[0106] 炭素源としては、例えば、糖類、脂質、タンパク質、アルコール（例、グリセリン）が挙げられ、糖類が好ましい。糖類としては、例えば、グルコース、ガラクトース、マンノース、フルクトース、スクロース、マルトース、ラクトース、澱粉加水分解物、糖蜜等が挙げられ、グルコースが好ましい。

[0107] （a）および（b）の遺伝子改変の詳細は上述のとおりである。（a）および（b）から選ばれる少なくとも１つ以上の遺伝子改変により、酵素反応の基質の損失が抑制、および／または供給が促進され、これにより、微生物中での炭素源からカルボキシル基含有化合物（例、脂肪酸）への代謝が強化される。

[0108] 代謝により生じるアミノ基含有化合物（例、アミノ酸）とカルボキシル基含有化合物（例、脂肪酸）が、N-アシル化活性を有する酵素の作用によりアミド結合して、N-アシル-アミノ基含有化合物（例、N-アシルアミノ酸）が、目的物として生成される。

[0109] 「N-アシル化活性を有する酵素」とは、カルボキシル基およびアミノ基をATP依存的様式において結合させてアミド結合を形成する能力を有する酵素をいう。N-アシル化活性を有する酵素としては、上述したN-アシル

化活性を有する改変酵素（本発明の改変酵素）を用いてもよく、カルボキシル基およびアミノ基をATP依存的様式において結合させてアミド結合を形成する能力を有することが見出されたタンパク質、当該タンパク質のアミノ酸配列において、1もしくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、もしくは付加を含むアミノ酸配列を含み、かつ、N-アシル化活性を有するタンパク質、ならびに、当該タンパク質のアミノ酸配列に対して90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ、N-アシル化活性を有するタンパク質を用いてもよい。カルボキシル基およびアミノ基をATP依存的様式において結合させてアミド結合を形成する能力を有することが見出されたタンパク質としては、例えば、PCT/JP2019/007681に記載のGH3タンパク質（AtGH3-6、OsGH3-8、AtJAR1（AtGH3-11）、AtGH3-5、AtGH3-10、AtGH3-12、AtGH3-17、SsGH3、およびCfHP（WP__002626336））およびPaaKタンパク質（PslAAL、およびPaHP（WP__031591948））が挙げられ、好ましくはAtGH3-6（配列番号1）であってもよい。GH3タンパク質およびPaaKタンパク質には、これらの変異体（当該タンパク質のアミノ酸配列において、1もしくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、もしくは付加を含むアミノ酸配列を含み、かつ、N-アシル化活性を有するタンパク質、ならびに、当該タンパク質のアミノ酸配列に対して90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ、N-アシル化活性を有するタンパク質）も含まれる。

[0110] 代謝により生じるアミノ基含有化合物の例としては、アミノ基含有化合物の例として上述したものが挙げられるが、アミノ酸が好ましく、L-グルタミン酸またはL-アスパラギン酸がより好ましい。代謝により生じるカルボキシル基含有化合物の例としては、カルボキシル基含有化合物の例として上述したものが挙げられるが、脂肪酸（例、飽和脂肪酸）が好ましく、炭素原子数8～18の脂肪酸（例、飽和脂肪酸）がより好ましく、炭素原子数12の脂肪酸がさらにより好ましく、ラウリン酸が最も好ましい。

[0111] 形質転換微生物を培養することによりN-アシルーアミノ基含有化合物の製造する場合、形質転換微生物の培養条件としては、特に限定されず、例えば、上述の培養条件において、所定量の炭素源（例、グルコース等の糖類）をさらに含む培地で培養する培養条件を用いることができる。

[0112] N-アシルーアミノ基含有化合物の製造の確認は、適宜行うことができる。例えば、このような確認は、反応系に反応停止液（例、1.4%（w/v）リン酸、75%（v/v）メタノール水溶液）を添加し、遠心後の上清をUPLC-MS分析することにより行うことができる。

[0113] （界面活性剤）

N-アシルーアミノ基含有化合物（例、本発明の方法で製造されるN-アシルーアミノ基含有化合物）またはその塩は、各種用途に用いてもよく、例えば、香粧品素材（例、界面活性剤）等の組成物に含まれる成分として用いてもよい。このような組成物に含まれるN-アシルーアミノ基含有化合物またはその塩は、例えば、N-モノ不飽和アシルーアミノ基含有化合物またはその塩を含んでもよい。N-モノ不飽和アシルーアミノ基含有化合物またはその塩としては、例えば上述したものが挙げられる。

[0114] N-アシルーアミノ基含有化合物またはその塩を界面活性剤の成分として用いる場合、界面活性剤は、炭素原子数10～16のモノ不飽和アシル基を有するN-モノ不飽和アシルーアミノ基含有化合物またはその塩を含んでもよい。このような場合、N-モノ不飽和アシルーアミノ基含有化合物のアシル部位が、モノ不飽和アシルであるため、増粘性の増加を抑制し、ハンドリング性の高い低粘度であるとともに、溶解性が良好であるという効果を奏する。また、アシル部位の炭素原子数が10～16個であるため、良好な泡立ち、泡質になる。

[0115] N-アシルーアミノ基含有化合物の塩としては、例えば、上述したものが挙げられる。

[0116] N-アシルーアミノ基含有化合物がモノ不飽和脂肪酸から得られる場合、N-アシルーアミノ基含有化合物は、例えば、 $C_{n-1}H_m-COX$ で示される

モノ不飽和脂肪酸誘導体（Xは、任意の一価の基、例えば、フッ素、塩素、臭素、及びヨウ素からなる群から選ばれるハロゲン原子）と酸性アミノ酸の塩（塩としては、例えば、上述したような無機塩及び有機塩が挙げられる。）とを反応させることにより得たものであってもよい。

[0117] N-モノ不飽和アシルーアミノ基含有化合物が由来するモノ不飽和脂肪酸としては、例えば、デセン酸（C 10 : 1）、ドデセン酸（C 12 : 1）、テトラデセン酸（C 14 : 1）（例えば、ミリストレイン酸）、及びヘキサデセン酸（C 16 : 1）（例えば、パルミトレイン酸）が挙げられ、ドデセン酸（C 12 : 1）又はヘキサデセン酸（C 16 : 1）が好ましい。

[0118] 「N-アシルーアミノ基含有化合物」における「酸性アミノ酸」とは、酸性側鎖を有するアミノ酸を指す。酸性アミノ酸としては、例えば、グルタミン酸、アスパラギン酸が挙げられ、グルタミン酸が好ましい。

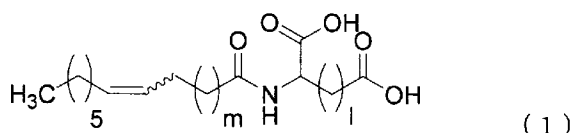
[0119] N-モノ不飽和アシルーアミノ基含有化合物は、例えば、N-デセノイル酸性アミノ酸（C 10 : 1）、N-ドデセノイル酸性アミノ酸（C 12 : 1）、N-テトラデセノイル酸性アミノ酸（C 14 : 1）、及びN-ヘキサデセノイル酸性アミノ酸（C 16 : 1）が挙げられ、N-ドデセノイル酸性アミノ酸（C 12 : 1）又はN-ヘキサデセノイル酸性アミノ酸（C 16 : 1）が好ましく、N-ドデセノイルグルタミン酸（C 12 : 1）又はN-ヘキサデセノイルグルタミン酸（C 16 : 1）がより好ましく、N-ドデセノイルグルタミン酸（C 12 : 1）がさらに好ましい。

[0120] N-モノ不飽和アシルーアミノ基含有化合物は、1種のN-モノ不飽和アシルーアミノ基含有化合物であってもよく、2種以上のN-モノ不飽和アシルーアミノ基含有化合物を含んでいてもよい。すなわち、N-モノ不飽和アシルーアミノ基含有化合物は、N-デセノイル酸性アミノ酸（C 10 : 1）、N-ドデセノイル酸性アミノ酸（C 12 : 1）、N-テトラデセノイル酸性アミノ酸（C 14 : 1）、及びN-ヘキサデセノイル酸性アミノ酸（C 16 : 1）からなる群から選ばれる1又は2以上を含んでいてもよい。2種以上のN-モノ不飽和アシルーアミノ基含有化合物である場合、N-ドデセノ

イル酸性アミノ酸（C 1 2 : 1）と、N－デセノイル酸性アミノ酸（C 1 0 : 1）、N－テトラデセノイル酸性アミノ酸（C 1 4 : 1）、及びN－ヘキサデセノイル酸性アミノ酸（C 1 6 : 1）からなる群から選ばれる1又は2以上と、の組合せが好ましく、泡質がより良好になる観点から、N－ドデセノイル酸性アミノ酸（C 1 2 : 1）とN－ヘキサデセノイル酸性アミノ酸（C 1 6 : 1）と、の組合せがより好ましい。

[0121] N－モノ不飽和アシル酸性アミノ酸の不飽和結合部位は特に限定されるものではなく、アシル部位の炭素鎖末端でもよく、アシル部位の炭素鎖末端から炭素原子数で数個離れた炭素原子間であってもよく、アシル部位のカルボニル基の α 位であってもよい。中でも、アシル部位の炭素鎖末端から炭素原子数で6～7個離れた炭素原子間で不飽和結合を有することが好ましい。すなわち、N－モノ不飽和アシル酸性アミノ酸は、下記一般式（1）で表される化合物であることが好ましい。

[0122] [化3]



（一般式（1）中、 l は、1又は2の整数であり、 m は、0～6の整数である。）

[0123] N－モノ不飽和アシル酸性アミノ酸の立体化学（不飽和二重結合部位）は、*c i s*と*t r a n s*のいずれでもよい。但し、増粘性の増加を抑制し、ハンドリング性の高い低粘度とする観点からは、*c i s*が好ましい。

[0124] （組成物）

本発明の組成物は、成分（A）N－モノ不飽和アシル酸性アミノ酸（ここで、不飽和アシルは、炭素原子数10～16個のアシルである）又はその塩、及び成分（B）N－飽和アシル酸性アミノ酸又はその塩、を含む。

本発明の組成物は、成分（A）を含むため、皮膚と同等のpHである弱酸性領域であっても良好な泡立ち、泡質と溶解性を有し、かつハンドリング性

の高い低粘度である。また、本発明の組成物は、成分（Ｂ）も含み、アシル基にバリエーションを持った組成物となるため、油の洗浄力も向上するという効果を奏する。

[0125] （成分（Ａ））

成分（Ａ）についての詳細は、上記界面活性剤のＮ－モノ不飽和アシル酸性アミノ酸に記載した通りである。

[0126] （成分（Ｂ））

本明細書において、「Ｎ－飽和アシル酸性アミノ酸」は、遊離体としては、 $C_{n-1}H_m-CO-NH-CHR-COOH$ で示される化合物（ H_m で示される水素原子は置換されていてもよい。 m は上記で定義したとおりである。 R は酸性アミノ酸の側鎖を示す。）を指す。すなわち、「Ｎ－飽和アシル酸性アミノ酸」とは、酸性アミノ酸のアミノ基上の１個の水素原子が、飽和アシル基で置換された化合物を指す。「Ｎ－飽和アシル酸性アミノ酸」は、Ｎ－飽和アシル酸性アミノ酸の遊離体であってもよく、Ｎ－飽和アシル酸性アミノ酸の塩であってもよい。

なお、Ｎ－飽和アシル酸性アミノ酸の塩としては、Ｎ－モノ不飽和アシル酸性アミノ酸の塩と同様のことが言える。

[0127] 本明細書において、Ｎ－飽和アシル酸性アミノ酸は、便宜上、 $C_{n-1}H_m-COOH$ で示される脂肪酸又はその誘導体に由来するものとして示すことがある。また、本明細書において、「炭素原子数 n 個の飽和アシル」およびその由来する脂肪酸等を、「 C_n 」により表記することもある。例えば、「Ｎ－ラウロイル酸性アミノ酸（ C_{12} ）」とは、酸性アミノ酸のアミノ基上の１個の水素原子が、ラウリン酸（ C_{12} ）に由来するアシル基であるラウロイル基で置換された化合物（ $C_{11}H_{23}CO-NH-CHR-COOH$ 、ここで、 R は酸性アミノ酸の側鎖を示す。）を指す。

[0128] Ｎ－飽和アシル酸性アミノ酸を飽和脂肪酸から得る場合、Ｎ－飽和アシル酸性アミノ酸は、例えば、 $C_{n-1}H_m-COX$ で示される飽和脂肪酸誘導体（ X は、任意の一価の基、例えば、フッ素、塩素、臭素、及びヨウ素からなる

群から選ばれるハロゲン原子)と酸性アミノ酸又はその塩(塩としては、例えば、上述したような無機塩及び有機塩が挙げられる。)とを反応させることにより得ることができる。

[0129] N-飽和アシル酸性アミノ酸としては、例えば、N-カプリロイル酸性アミノ酸(C 8)、N-カプロイル酸性アミノ酸(C 10)、N-ラウロイル酸性アミノ酸(C 12)、N-ミリストイル酸性アミノ酸(C 14)、N-パルミトイル酸性アミノ酸(C 16)、及びN-ステアロイル酸性アミノ酸(C 18)が挙げられる。

[0130] 「N-飽和アシル酸性アミノ酸」における「酸性アミノ酸」とは、酸性側鎖を有するアミノ酸を指す。酸性アミノ酸としては、例えば、グルタミン酸、アスパラギン酸が挙げられ、グルタミン酸が好ましい。

[0131] N-飽和アシル酸性アミノ酸は、N-カプリロイル酸性アミノ酸(C 8)、N-カプロイル酸性アミノ酸(C 10)、N-ラウロイル酸性アミノ酸(C 12)、N-ミリストイル酸性アミノ酸(C 14)、又はN-パルミトイル酸性アミノ酸(C 16)が好ましく、N-ラウロイル酸性アミノ酸(C 12)がより好ましく、N-ラウロイルグルタミン酸(C 12)がさらに好ましい。

[0132] 成分(B)は、1種のN-飽和アシル酸性アミノ酸又はその塩であってもよく、2種以上のN-飽和アシル酸性アミノ酸又はその塩を含んでいてもよい。すなわち、成分(B)は、N-カプリロイル酸性アミノ酸(C 8)、N-カプロイル酸性アミノ酸(C 10)、N-ラウロイル酸性アミノ酸(C 12)、N-ミリストイル酸性アミノ酸(C 14)、N-パルミトイル酸性アミノ酸(C 16)、及びN-ステアロイル酸性アミノ酸(C 18)からなる群から選ばれる1又は2以上を含んでいてもよい。2種以上のN-飽和アシル酸性アミノ酸である場合、N-ラウロイル酸性アミノ酸(C 12)を含むことが好ましく、N-ラウロイル酸性アミノ酸(C 12)と、N-カプリロイル酸性アミノ酸(C 8)、N-カプロイル酸性アミノ酸(C 10)、N-ミリストイル酸性アミノ酸(C 14)、及びN-パルミトイル酸性アミノ酸

(C 1 6) からなる群から選ばれる 1 又は 2 以上と、を組合せて含むことがより好ましい。

[0133] 成分 (B) が、N-ラウロイル酸性アミノ酸 (C 1 2) を含む場合、成分 (B) における N-ラウロイル酸性アミノ酸 (C 1 2) の含有量は、例えば 30 質量%以上であり、40 質量%以上が好ましく、50 質量%以上がより好ましく、60 質量%以上がさらに好ましい。より具体的には、成分 (B) における N-ラウロイル酸性アミノ酸の含有量は、例えば 30~100 質量%であり、40~100 質量%が好ましく、50~100 質量%がより好ましく、60~100 質量%がさらに好ましい。

[0134] 成分 (A) と成分 (B) の合計に対する成分 (A) の質量比 ($A / (A + B)$) は、成分 (A) による低 pH での溶解性の向上等の観点から、通常 0.001 以上であり、0.002 以上が好ましく、0.003 以上がより好ましく、0.004 以上がさらに好ましい。成分 (A) と成分 (B) の合計に対する成分 (A) の質量比 ($A / (A + B)$) はまた、成分 (B) の含有量が多いことによる油の洗浄力への寄与等の観点から、通常 1.00 以下であり、1.00 未満が好ましく、0.80 以下がより好ましく、0.60 以下がさらに好ましく、0.50 以下がさらにより好ましい。より具体的には、成分 (A) と成分 (B) の合計に対する成分 (A) の質量比 ($A / (A + B)$) は、通常 0.001~1.00 であり、0.001 以上 1.00 未満が好ましく、0.002~0.80 がより好ましく、0.003~0.60 がさらに好ましく、0.004~0.50 がさらにより好ましい。

[0135] 本発明の組成物は、成分 (C) N-不飽和脂肪酸又はその塩、をさらに含むものであってもよい。

本発明の組成物が成分 (C) を含む場合、泡質がより良好になるとともに、油の洗浄力がより向上する。

[0136] (成分 (C))

不飽和脂肪酸の炭素原子数は、6~22 が好ましく、8~18 がより好ましい。不飽和脂肪酸としては、例えば、ヘキセン酸 (C 6 : 1)、オクテン

酸（C 8 : 1）、デセン酸（C 1 0 : 1）、ドデセン酸（C 1 2 : 1）、テトラデセン酸（C 1 4 : 1）（例えば、ミリストレイン酸）、ヘキサデセン酸（C 1 6 : 1）（例えば、パルミトレイン酸）、オクタデセン酸（C 1 8 : 1）（例えば、オレイン酸）、イコセン酸（C 2 0 : 1）（例えば、エイコセン酸）、ドコセン酸（C 2 2 : 1）が挙げられ、ドデセン酸（C 1 2 : 1）が好ましい。

[0137] 不飽和脂肪酸の塩としては、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩、アルミニウム塩等の無機塩；アンモニウム塩、モノエタノールアミン塩、ジエタノールアミン塩、トリエタノールアミン塩等の有機アミン塩；アルギニン塩、リジン塩等の塩基性アミノ酸塩等の有機塩等が挙げられる。中でも、トリエタノールアミン塩、ナトリウム塩、カリウム塩が好ましい。

[0138] 成分（C）は、1種の不飽和脂肪酸又はその塩であってもよく、2種以上の不飽和脂肪酸又はその塩を含んでいてもよい。すなわち、成分（C）は、ヘキセン酸（C 6 : 1）、オクテン酸（C 8 : 1）、デセン酸（C 1 0 : 1）、ドデセン酸（C 1 2 : 1）、テトラデセン酸（C 1 4 : 1）（例えば、ミリストレイン酸）、ヘキサデセン酸（C 1 6 : 1）（例えば、パルミトレイン酸）、オクタデセン酸（C 1 8 : 1）（例えば、オレイン酸）、イコセン酸（C 2 0 : 1）（例えば、エイコセン酸）、及びドコセン酸（C 2 2 : 1）からなる群から選ばれる1又は2以上を含んでいてもよい。2種以上の不飽和脂肪酸又はその塩である場合、ドデセン酸（C 1 2 : 1）を含むことが好ましく、ドデセン酸（C 1 2 : 1）と、オクテン酸（C 8 : 1）、デセン酸（C 1 0 : 1）、テトラデセン酸（C 1 4 : 1）、及びヘキサデセン酸（C 1 6 : 1）からなる群から選ばれる1又は2以上と、を組合せて含むことがより好ましい。

[0139] 成分（C）が、ドデセン酸（C 1 2 : 1）を含む場合、成分（C）におけるドデセン酸（C 1 2 : 1）の含有量は、例えば30質量%以上であり、40質量%以上が好ましく、50質量%以上がより好ましく、60質量%以上

がさらに好ましく、70質量%以上がさらにより好ましく、80質量%以上が特に好ましい。より具体的には、成分(C)におけるドデセン酸(C12:1)の含有量は、例えば30~100質量%であり、40~100質量%が好ましく、50~100質量%がより好ましく、60~100質量%がさらに好ましく、70~100質量%がさらにより好ましく、80~100質量%が特に好ましい。

[0140] 成分(A)と成分(B)の合計に対する成分(C)の質量比($C/(A+B)$)は、0以上であってもよい。成分(A)と成分(B)の合計に対する成分(C)の質量比($C/(A+B)$)が0である場合、成分(C)は含まれない。成分(C)の泡質(密度)向上への寄与等の観点から、0.01以上とすることができ、0.1以上が好ましく、0.2以上がより好ましく、0.4以上がさらに好ましく、0.5以上がさらにより好ましい。成分(A)と成分(B)の合計に対する成分(C)の質量比($C/(A+B)$)はまた、成分(A)及び成分(B)の効果の寄与等の観点から、通常20以下であり、15以下が好ましく、13以下がより好ましく、11以下がさらに好ましく、10以下がさらにより好ましい。より具体的には、成分(A)と成分(B)の合計に対する成分(C)の質量比($C/(A+B)$)は、通常0.01~20であり、0.1~15が好ましく、0.2~13がより好ましく、0.4~11がさらに好ましく、0.5~10がさらにより好ましい。

[0141] 本発明の組成物は、成分(A)、成分(B)、及び任意成分(C)を、(D)水溶性媒体中に含んでいてもよい。水溶性媒体としては、任意の水溶性溶媒を用いることができる。水溶性媒体としては、例えば、水溶液が挙げられる。水溶液は、緩衝能を有していてもいなくてもよい。水溶液としては、例えば、水(例、蒸留水、滅菌蒸留水、精製水、生理食塩水、市水等の水道水)、リン酸緩衝液、Tris-塩酸緩衝液、TE(Tris-EDTA)緩衝液、炭酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、酒石酸緩衝液、グリシン緩衝液、クエン酸緩衝液、酢酸緩衝液が挙げられる。

[0142] 成分(A)の含有量は、本発明の組成物に含まれる他の成分の種類及び濃

度、並びに pH 等の種々の条件によっても変動するため特に限定されるものではない。本発明の組成物が水溶液の形態である場合、低 pH での溶解性の向上等の観点から、例えば 0.001 質量%以上であり、0.002 質量%以上が好ましく、0.003 質量%以上がより好ましい。成分 (A) の含有量はまた、例えば 60 質量%以下とすることができ、40 質量%以下が好ましい。より具体的には、成分 (A) の含有量は、例えば 0.001～60 質量%であり、0.001～40 質量%が好ましく、0.002～40 質量%がより好ましく、0.003～40 質量%がさらに好ましい。

[0143] 成分 (B) の含有量は、本発明の組成物に含まれる他の成分の種類及び濃度、並びに pH 等の種々の条件によっても変動するため特に限定されるものではない。本発明の組成物が水溶液の形態である場合、低 pH での溶解性の向上等の観点から、例えば 0.01 質量%以上であり、0.02 質量%以上が好ましく、0.03 質量%以上がより好ましい。成分 (B) の含有量はまた、例えば 60 質量%以下とすることができ、40 質量%以下が好ましく、10 質量%以下がより好ましい。より具体的には、成分 (B) の含有量は、例えば 0.01～60 質量%であり、0.02～40 質量%が好ましく、0.03～10 質量%がより好ましい。

[0144] 成分 (C) の含有量は、本発明の組成物に含まれる他の成分の種類及び濃度、並びに pH 等の種々の条件によっても変動するため特に限定されるものではないが、0 質量%以上であってもよい。成分 (C) の含有量が 0 質量%である場合、成分 (C) は含まれない。本発明の組成物が水溶液の形態である場合、泡質（密度）向上への寄与等の観点から、例えば 0.001 質量%以上であり、0.002 質量%以上が好ましく、0.003 質量%以上がより好ましい。成分 (C) の含有量はまた、多量に含有すると本発明の効果を阻害する等の観点から、例えば 5 質量%以下とすることができ、3 質量%以下が好ましく、1 質量%以下がより好ましい。より具体的には、成分 (C) の含有量は、例えば 0.001～5 質量%であり、0.002～3 質量%が好ましく、0.003～1 質量%がより好ましい。

[0145] 本発明の組成物は、雑菌繁殖の抑制（防腐作用）による保存安定性、及び皮膚（弱酸性）と同等のpHによる皮膚への低刺激性の観点から、弱酸性であることが好ましい。本発明の組成物のpHは、例えば3.0～9.0であり、3.0～8.0又は3.0～7.0とすることができる。pHの上限は、8.0以下が好ましく、7.0以下がより好ましい。また、下限は、4.0以上が好ましく、4.5以上がより好ましい。本発明の組成物のpHは、皮膚と同等のpHとなる観点から、4.0～8.0が好ましく、4.0～7.0がより好ましいか、4.5～8.0が好ましく、4.5～7.0がより好ましい。本発明の組成物は、低pHでも溶解性に優れるため、析出が抑制され、この点でも保存安定性に優れるといえる。さらに、一般に、アニオン性界面活性剤はpHが低くなると泡立ちが低下する傾向が見られるが、本発明の組成物は、低pHでも泡立ちが良好となる。pHは、pH調整剤を用いて調整できる。pH調整剤としては、例えば、上述したような水溶液（緩衝液）、酸性物質（例、塩酸、硫酸、硝酸、クエン酸）、アルカリ性物質（例、ナトリウム、カリウム等のアルカリ金属、カルシウム等のアルカリ土類金属の水酸化物）が挙げられる。

[0146] 本発明の組成物の粘度は、ハンドリング性の観点から、低粘度であることが好ましい。本発明の組成物の粘度は、例えば1.5 Pa・s以下であり、1.0 Pa・s以下が好ましく、0.80 Pa・s以下がより好ましく、0.70 Pa・s以下がさらに好ましく、0.50 Pa・s以下がさらに好ましい。本発明の組成物は、ハンドリング性に優れるため、パーソナルケアとしての化粧料として有用といえる。

本明細書において、粘度は、濃度が10質量%の組成物の水溶液をB型粘度計（DVB-10（株）東洋精機製作所製B型粘度計、ローターNo. 20～23、6～30 rpm、25℃、30秒後）により測定した値である。

本発明の組成物はまた、追加の洗浄成分、多価アルコール、増粘剤、安定化剤、保存剤、香料、色素等の他の成分を含んでもよい。これらの成分の具体的な種類及び量は、適宜設定することができる。

- [0147] 追加の洗浄成分としては、例えば、アニオン性界面活性剤、両性界面活性剤、ノニオン性界面活性剤等の界面活性剤、微小固形物（例、微小球、スクラブ）が挙げられる。
- [0148] アニオン性界面活性剤は、1種又は2種以上のアニオン性基を含む。アニオン性基としては、例えば、カルボキシル基、スルホン酸基、硫酸基、リン酸基が挙げられる。アニオン性界面活性剤としては、例えば、高級脂肪酸、N-アシルアミノ酸、N-アシルタウリン、アルキルエーテルカルボン酸、アルキルリン酸、ポリオキシエチレンアルキルエーテルリン酸、アルキル硫酸、ポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸、アルキル鎖を有するスルホン酸化合物、およびこれらの塩が挙げられる。
- [0149] 両性界面活性剤は、上述したような1種又は2種以上のアニオン性基、及び1種又は2種以上のカチオン性基を含む。カチオン性基としては、例えば、アンモニウム基、1級アミノ基、2級アミノ基、3級アミノ基、4級アミノ基が挙げられる。両性界面活性剤としては、例えば、アミドベタイン型両性界面活性剤、酢酸ベタイン型両性界面活性剤、スルホベタイン型両性界面活性剤、及びイミダゾリン型両性界面活性剤（例、ラウロアンホ酢酸又はその塩）が挙げられる。
- [0150] ノニオン性界面活性剤としては、例えば、グリセリン脂肪酸エステル、ソルビタン脂肪酸エステル、ショ糖脂肪酸エステルなどのエステル型、アルキルポリエチレングリコール、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテルなどのエーテル型、糖と高級アルコールがグリコシド結合したアルキルグリコシド、アルキルポリグリコシドなどの非イオン性界面活性剤が挙げられる。
- [0151] 多価アルコールとしては、例えば、2価アルコール（例、エチレングリコール、プロピレングリコール、1,3-プロパンジオール、1,2-ブチレングリコール、1,3-ブチレングリコール、2,3-ブチレングリコール、1,4-ブタンジオール、2-ブテン-1,4-ジオール、1,5-ペンタンジオール、1,2-ペンタンジオール、イソプレングリコール、ヘキシ

レングリコール、ジエチレングリコール、ジプロピレングリコール、モノグリセリド（モノアシルグリセロール））、3価アルコール（例、グリセリン、トリメチロールプロパン、1, 2, 6-ヘキサントリオール）、4価アルコール（例、ジグリセリン、ペンタエリスリトール）、より高い価数のアルコール、並びにそれらの塩（例、上述したような無機塩及び有機塩）が挙げられる。より高い価数のアルコールとしては、例えば、置換されていてもよい糖アルコール（例、ソルビトール、マンニトール、スクロース、グルコース、マンノース等の単糖アルコール、トレハロース等の二糖アルコール、及びヒアルロン酸、キサンタンガム等の多糖アルコール）、並びに上述したような2～4価アルコールの重合物（例、ポリグリコール、ポリグリセリン）、並びにそれらの塩（例、上述したような無機塩及び有機塩）が挙げられる。多価アルコールは、2価～4価アルコールが好ましく、2価又は3価アルコールがより好ましい。

[0152] 増粘剤としては、例えば、カラギーナン、デキストリン、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸、カルボキシビニルポリマー（カルボマー）、（アクリル酸／アクリル酸アルキル（C10-30））コポリマー、キサンタンガムが挙げられる。

[0153] 安定化剤としては、例えば、アスコルビン酸、ピロ亜硫酸ナトリウム、EDTAが挙げられる。

[0154] 保存剤としては、例えば、パラオキシ安息香酸エチル、安息香酸ナトリウム、サリチル酸、ソルビン酸、パラベン（メチルパラベン、プロピルパラベン等）、亜硫酸水素ナトリウムが挙げられる。

[0155] 香料としては、例えば、天然香料、及び合成香料が挙げられる。天然香料としては、例えば、バラ油、ジャスミン油、ネロリ油、ラベンダー油、イランイラン油、チュベローズ油、クラリセージ油、クローブ油、ペパーミント油、ゼラニウム油、パチュリー油、サンダルウッド油、シンナモン油、コリ

アンダー油、ナツメグ油、ペッパー油、レモン油、オレンジ油、ベルガモット油、オポポナックス油、ベチバー油、オリス油、オークモス油が挙げられる。合成香料としては、例えば、リモネン（オレンジ）、 β -カリオフィレン（ウッディ）、シス-3-ヘキセノール（新緑の若葉）、リナロール（スズラン）、ファルネソール（新鮮なグリーンノートでフローラル）、 β -フェニルエチルアルコール（ローズ）、2, 6-ノナジエナール（スミレ、キュウリ）、シトラール（レモン）、 α -ヘキシルシンナミックアルデヒド（ジャスミン）、 β -イオノン（薄めるとスミレ）、 ϵ -カルボン（スペアミント）、シクロペンタデカノン（ムスク）、リナリルアセテート（ベルガモット、ラベンダー）、ベンジルベンゾエート（バルサム）、 γ -ウンデカラクトン（ピーチ）、オイゲノール（丁子）、ローズオキサイド（グリーン・フローラル）、インドール（薄めるとジャスミン）、フェニルアセトアルデヒドジメチルアセタール（ヒヤシンス）、オーランチオール（オレンジフラワー）、メントール（ペパーミント）が挙げられる（括弧内は、香気を示す。）。

[0156] 色素としては、例えば、有機顔料（例、赤色201号等の赤色顔料、青色404号等の青色顔料、橙色203号等の橙色顔料、黄色205号等の黄色顔料、緑色3号等の緑色顔料、ジルコニウムレーキ等の有機レーキ顔料、クロロフィル等の天然色素）、及び無機顔料（例、酸化チタン等の白色顔料、酸化鉄等の有色顔料、タルク等の体質顔料、マイカ等のパール顔料）が挙げられる。

[0157] 本発明の組成物は、例えば、粉状、液状、ゲル状、ペースト状、クリーム状、泡状等の種々の形態において提供することができる。なお、本発明に係る組成物は、常法に従って製造することができる。

[0158] 本発明の組成物は、常法に従って、例えば皮膚、毛髪、頭皮等に適用可能な任意の形態の化粧料とすることができる。化粧料は、例えば、ヒト等の動物用の洗浄剤として、ボディシャンプー、ハンドソープ、洗顔剤、クレンジングローション、クレンジングクリーム、マッサージクリーム、頭髮用シャ

ンプー等の用途に好適である。化粧料の好ましい特性（例、pH）は、上述した本発明の組成物の好ましい特性と同様である。

また、本発明の組成物は、賦形剤等の添加剤としても利用し得る。

実施例

[0159] 次に実施例を示して本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

[0160] 実施例 1：部位特異的変異導入による変異型 AtGH3-6 発現プラスミドの構築

(1) N末端側に His-tag および トロンビン認識配列が融合した、*Arabidopsis thaliana* 由来 indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3.6 (AtGH3-6、Q9LSQ4、アミノ酸配列については配列番号 1、*E. coli* i での発現用にコドン最適化した当該アミノ酸配列をコードする塩基配列については配列番号 2) を発現する pET-28a-AtGH3-6 (PCT/JP2019/007681) を鋳型として、AtGH3-6 へ変異を導入した。また、いくつかの変異型 AtGH3-6 については、下記で得られた変異型 AtGH3-6 発現プラスミドを鋳型として、さらに変異を導入した。変異型 AtGH3-6 (変異体番号 31) の発現プラスミドの構築方法は、実施例 1 (2) に記載した。変異導入は PrimeSTAR Max DNA Polymerase (タカラバイオ) を用いて以下の条件で行った。

1	cycle	98℃、30 sec
30	cycles	98℃、10 sec
		55℃、15 sec
		72℃、40 sec
1	cycle	72℃、5 min
		4℃、hold

[0161] 用いたプライマーは以下の通りである。表中の WT は野生型 AtGH3-

6を示す。

[0162] [表2-1]

表2-1. 変異型A t G H 3 - 6 の作製に用いた部位特異的変異導入用プライマー (1)

変異体番号	鋳型	導入する 変異点	塩基配列 (5' → 3')	配列番号
R18	WT	Y134F	CGTCGGAGTCTGCTGTTTTCACTCCTTATGCCC	7
			GGGCATAAGGAGTGAAAACAGCAGACTCCGACG	8
R20	WT	Y134V	CGTCGGAGTCTGCTGGTGTCACTCCTTATGCCC	9
			GGGCATAAGGAGTGACACCAGCAGACTCCGACG	10
R30	WT	S161P	TTCTCTTCATCAAGCCGGAATCGAAAACCCCT	11
			AGGGGTTTTTCGATTCCGGCTTGATGAAGAGGAA	12
R32	WT	V174A	CTGCCTGCACGTCCCGCGCTGACCTCGTATTAC	13
			GTAATACGAGGTACGCGGGGACGTGCAGGCAG	14
R39	WT	V231A	CTGCGTGTGGCGCGGCGTTGCCAGCGGGTTT	15
			AAACCCGCTGGCAAACGCCGCGCCAACACGCAG	16
R55	WT	T336S	TTACCGTTAGTCTGCAGCATGTATGCGAGCAGT	17
			ACTGCTCGCATACATGCTGCAGACTAACGGTAA	18
R56	WT	M337G	CCGTTAGTCTGCACGGGCTATGCGAGCAGTGAA	19
			TTCCTGCTCGCATAGCCCCGTGCAGACTAACGG	20
R59	WT	A339G	GTCTGCACGATGTATGGCAGCAGTGAATGCTAC	21
			GTAGCATTCACTGCTGCCATACATCGTGCAGAC	22
R61	WT	S340A	TGCACGATGTATGCGGCGAGTGAATGCTACTTT	23
			AAAGTAGCATTCACTCGCCGCATACATCGTGCA	24
R68	WT	Y344G	GCGAGCAGTGAATGCGGCTTTGGAGTGAATCTC	25
			GAGATTCACTCCAAAGCCGATTCACTGCTCGC	26
R69	WT	Y344A	GCGAGCAGTGAATGCGGCTTTGGAGTGAATCTC	27
			GAGATTCACTCCAAACGCGATTCACTGCTCGC	28
R70	WT	Y344V	GCGAGCAGTGAATGCGGCTTTGGAGTGAATCTC	29
			GAGATTCACTCCAAACGCGATTCACTGCTCGC	30
R78	WT	S455T	GTTCTCTCCATTGACACCGACAAGACGGATGAA	31
			TTCATCCGTCTTGTGGTGTCAATGGAGAGAAC	32
R1002	WT	T122S/ I123T	CGCAAACCTTATGCCGAGCACCGAGGAAGAACTGGAT	33
			ATCCAGTTCTTCTCGGTGCTCGGCATAAGTTTGC	34
R1005	WT	R117P	ACCTCAGGCGGAGAACCGAACTTATGCCGACG	35
			CGTCGGCATAAGTTTCGGTTCTCCGCCTGAGGT	36
	R117P	Q533R	AATAGCGTGTATCGCCGTGGCCGTGTGTCCGAC	37
			GTCGGACACACGGCCACGGCGATACACGCTATT	38

[0163]

[表2-2]

表 2 - 2 . 変異型 A t G H 3 - 6 の作製に用いた部位特異的変異導入用プライマー (2)

変異体番号	鋳型	導入する 変異点	塩基配列 (5' → 3')	配列番号
4	WT	C576A	TACAAAACACCAAGAGCGGTCAAATTCGCGCCG	39
			CGGCGCGAATTTGACCGCTCTGGTGTGTTGTA	40
7	R32	S161P	TTCTCTTCATCAAGCCGGAATCGAAAACCCCT	41
			AGGGGTTTTTCGATTCCGGCTTGATGAAGAGGAA	42
8	R39	S161P	TTCTCTTCATCAAGCCGGAATCGAAAACCCCT	43
			AGGGGTTTTTCGATTCCGGCTTGATGAAGAGGAA	44
9	R56	S161P	TTCTCTTCATCAAGCCGGAATCGAAAACCCCT	45
			AGGGGTTTTTCGATTCCGGCTTGATGAAGAGGAA	46
10	R70	S161P	TTCTCTTCATCAAGCCGGAATCGAAAACCCCT	47
			AGGGGTTTTTCGATTCCGGCTTGATGAAGAGGAA	48
11	R39	V174A	CTGCCTGCACGTCCCGCGCTGACCTCGTATTAC	49
			GTAATACGAGGTCAGCGCGGACGTGCAGGCAG	50
12	R32	M337G	CCGTTAGTCTGCACGGGCTATGCGAGCAGTGAA	51
			TTCCTGCTCGCATAGCCCCGTGCAGACTAACGG	52
13	R32	Y344V	GCGAGCAGTGAATGCGTGTTTGGAGTGAATCTC	53
			GAGATTCACTCCAAACACGCATTCACTGCTCGC	54
14	R39	M337G	CCGTTAGTCTGCACGGGCTATGCGAGCAGTGAA	55
			TTCCTGCTCGCATAGCCCCGTGCAGACTAACGG	56
15	R39	Y344V	GCGAGCAGTGAATGCGTGTTTGGAGTGAATCTC	57
			GAGATTCACTCCAAACACGCATTCACTGCTCGC	58
16	R56	Y344V	GCGAGCAGTGAATGCGTGTTTGGAGTGAATCTC	59
			GAGATTCACTCCAAACACGCATTCACTGCTCGC	60
17	R1005	S161P	TTCTCTTCATCAAGCCGGAATCGAAAACCCCT	61
			AGGGGTTTTTCGATTCCGGCTTGATGAAGAGGAA	62
18	R1005	V174A	CTGCCTGCACGTCCCGCGCTGACCTCGTATTAC	63
			GTAATACGAGGTCAGCGCGGACGTGCAGGCAG	64
19	R1005	V231A	CTGCGTGTTGGCGCGGCGTTTGCCAGCGGGTTT	65
			AAACCCGCTGGCAAACGCCGCGCCAACACGCAG	66
20	R1005	M337G	CCGTTAGTCTGCACGGGCTATGCGAGCAGTGAA	67
			TTCCTGCTCGCATAGCCCCGTGCAGACTAACGG	68
21	R1005	Y344V	GCGAGCAGTGAATGCGTGTTTGGAGTGAATCTC	69
			GAGATTCACTCCAAACACGCATTCACTGCTCGC	70
24	WT	Y344I	GAATGCATTTTGGAGTGAATCTCAGG	71
			TCCAAAAATGCATTCACTGCTCGCATA	72

[0164]

[表2-3]

表2-3. 変異型A t G H 3 - 6 の作製に用いた部位特異的変異導入用プライマー (3)

変異体番号	鋳型	導入する 変異点	塩基配列 (5' → 3')	配列番号
30	18	V231A	CTGCGTGTGGCGCGGCGTTTGCCAGCGGGTTT	73
			AAACCCGCTGGCAAACGCCGCGCCAACACGCAG	74
32	18	Y344V	GCGAGCAGTGAATGCGTGTTTGGAGTGAATCTC	75
			GAGATTCACTCCAAACACGCATTCACTGCTCGC	76
34	19	Y344V	GCGAGCAGTGAATGCGTGTTTGGAGTGAATCTC	77
			GAGATTCACTCCAAACACGCATTCACTGCTCGC	78
37	31	G379D	GTCCATCGTAACCTAGACGTAAGTAGCAGCATT	79
			AATGCTGCTAGTTACGTCTGAGTTACGATGGAC	80
	31 + G3 79D	R350T	TTTGGAGTGAATCTCAGCCACTATGCAAACCA	81
			TGGTTTGCATAGTGGCGTGAGATTCCTCCAAA	82
38	31	V311A	ACCAAATATGTTGACGCGATTGTCTACTGGCACC	83
			GGTGCCAGTGACAATCGCGTCAACATATTTGGT	84
39	31	L137I	CTGCTGTACTCACTCATTATGCCCGTCATGGAT	85
			ATCCATGACGGGCATAATGAGTGAGTACAGCAG	86
40	31	Q200E	TATACCACTCCGAATGAGACGATCTTGTGTTCC	87
			GGAACACAAGATCGTCTCATTCCGACTGGTATA	88
42	31	I123T	AAACTTATGCCGACGACCGAGGAAGAACTGGAT	89
			ATCCAGTTCTTCCTCGGTCGTCGGCATAAGTTT	90
43	31	N101S	CAGGTTCTGTGTTTCGAGCCCGATAAGCGAGTTT	91
			AAACTCGCTTATCGGGCTCGAACACAGAACCTG	92
44	40	I123T	AAACTTATGCCGACGACCGAGGAAGAACTGGAT	93
			ATCCAGTTCTTCCTCGGTCGTCGGCATAAGTTT	94
45	40	N101S	CAGGTTCTGTGTTTCGAGCCCGATAAGCGAGTTT	95
			AAACTCGCTTATCGGGCTCGAACACAGAACCTG	96
46	42	N101S	CAGGTTCTGTGTTTCGAGCCCGATAAGCGAGTTT	97
			AAACTCGCTTATCGGGCTCGAACACAGAACCTG	98
48	37	Q200E	TATACCACTCCGAATGAGACGATCTTGTGTTCC	99
			GGAACACAAGATCGTCTCATTCCGACTGGTATA	100
49	37	I123T	AAACTTATGCCGACGACCGAGGAAGAACTGGAT	101
			ATCCAGTTCTTCCTCGGTCGTCGGCATAAGTTT	102
50	37	N101S	CAGGTTCTGTGTTTCGAGCCCGATAAGCGAGTTT	103
			AAACTCGCTTATCGGGCTCGAACACAGAACCTG	104
54	49	N101S	CAGGTTCTGTGTTTCGAGCCCGATAAGCGAGTTT	105
			AAACTCGCTTATCGGGCTCGAACACAGAACCTG	106
55	49	Q200E	TATACCACTCCGAATGAGACGATCTTGTGTTCC	107
			GGAACACAAGATCGTCTCATTCCGACTGGTATA	108
56	49	C576A	TACAAAACACCAAGAGCGGTCAAATTCGCGCCG	109
			CGGCGCAATTTGACCGCTCTTGGTGTTTTGTA	110

[0165] 得られたPCR産物をDpnIで消化した後、該反応液でE. coli JM109を形質転換し、カナマイシン耐性株の中から目的のプラスミドを抽出した。このプラスミドを変異型A t G H 3 - 6 発現プラスミドとした。

[0166] (2) pET-28a-A t G H 3 - 6 (PCT/JP2019/007681) を鋳型として、A t G H 3 - 6 へ変異を導入した。また、いくつかの

変異型 A t G H 3 - 6 については、上記または下記で得られた変異型 A t G H 3 - 6 発現プラスミドを鋳型として、さらに変異を導入した。変異導入は P r i m e S T A R G X L D N A P o l y m e r a s e (タカラバイオ) を用いて以下の条件で行った。

1 c y c l e 98℃、30 s e c
 30 c y c l e s 98℃、10 s e c
 60℃、15 s e c
 68℃、7.5 m i n
 1 c y c l e 72℃、5 m i n
 4℃、h o l d

[0167] 用いたプライマーは以下の通りである。

[0168] [表3]

表3. 変異型 A t G H 3 - 6 の作製に用いた部位特異的変異導入用プライマー

変異体番号	鋳型	導入する変異点	塩基配列 (5' → 3')	配列番号
26	18	S161P	TTCCTCTTCATCAAGCCGGAATCGAAAACCCCT	111
			AGGGGTTTTCGATTCCGGCTTGATGAAGAGGAA	112
27	19	S161P	TTCCTCTTCATCAAGCCGGAATCGAAAACCCCT	113
			AGGGGTTTTCGATTCCGGCTTGATGAAGAGGAA	114
29	21	S161P	TTCCTCTTCATCAAGCCGGAATCGAAAACCCCT	115
			AGGGGTTTTCGATTCCGGCTTGATGAAGAGGAA	116
31	18	M337G	CCGTTAGTCTGCACGGGCTATGCGAGCAGTGAA	117
			TTCCTGCTCGCATAGCCCGTGCAGACTAACGG	118
33	19	M337G	CCGTTAGTCTGCACGGGCTATGCGAGCAGTGAA	119
			TTCCTGCTCGCATAGCCCGTGCAGACTAACGG	120
41	31	K388N	TAGCTTGCCTAATGCACTGACCG	121
			CGGTCAGTGCATTAGGCAAGCTA	122
47	31	C576A	TACAAAACACCAAGAGCGGTCAAATTCGCGCCG	123
			CGGCGCGAATTTGACCGCTCTTGGTGTGTTTGTGTA	124
57	49	K388N	TAGCTTGCCTAATGCACTGACCG	125
			CGGTCAGTGCATTAGGCAAGCTA	126
58	56	N101S	CAGGTTCTGTGTTTCGAGCCCGATAAGCGAGTTT	127
			AAACTCGCTTATCGGGCTCGAACACAGAACCTG	128
59	56	Q200E	TATACCAGTCCGAATGAGACGATCTTGTGTTCC	129
			GGAACACAAGATCGTCTCATTCGGACTGGTATA	130

[0169] 得られたPCR産物をD p n I で消化した後、該反応液でE. c o l i

J M 1 0 9 を形質転換し、カナマイシン耐性株の中から目的のプラスミドを抽出した。このプラスミドを変異型 A t G H 3 - 6 発現プラスミドとした。配列を確認したところ、変異体番号 2 6 には、導入した変異点以外に、M 3 3 7 A の変異も導入されていた。

[0170] (3) p E T - 2 8 a - 変異型 A t G H 3 - 6 (変異体番号 5 6) を鋳型として、A t G H 3 - 6 へさらに変異を導入した。P C R は P r i m e S T A R R M a x D N A P o l y m e r a s e (タカラバイオ) を用いて以下の条件で行った。

1	c y c l e	9 8 ° C 、 3 0 s e c
3 0	c y c l e s	9 8 ° C 、 1 0 s e c
		6 0 ° C 、 1 5 s e c
		7 2 ° C 、 5 s e c / k b
1	c y c l e	7 2 ° C 、 5 m i n
		4 ° C 、 h o l d

[0171] 用いたプライマーは以下の通りである。

[0172]

[表4]

表4. 変異型A t G H 3 - 6 の作製に用いた部位特異的変異導入用プライマー

変異体番号	導入する変異点	PCR	塩基配列 (5' → 3')	配列番号
60	K388N	1	CGACGACCGAGGAAGAACTGGATCGTCG	131
			TCAGTGCATTAGGCAAGCTAATGCTGCT	132
		2	TGCCTAATGCACTGACCGAAAAAGAACA	133
			CTTCCTCGGTCGTCGGCATAAGTTGCG	134
61	N101S/Q200E	1	GTTTCGAGCCCGATAAGCGAGTTTCTCAC	135
			AGATCGTCTCATTTCGACTGGTATAGTT	136
		2	CGAATGAGACGATCTTGTGTTCCGACTC	137
			TTATCGGGCTCGAACACAGAACCTGCGA	138
62	N101S/K388N	1	GTTTCGAGCCCGATAAGCGAGTTTCTCAC	139
			TCAGTGCATTAGGCAAGCTAATGCTGCT	140
		2	TGCCTAATGCACTGACCGAAAAAGAACA	141
			TTATCGGGCTCGAACACAGAACCTGCGA	142
63	Q200E/K388N	1	CGAATGAGACGATCTTGTGTTCCGACTC	143
			TCAGTGCATTAGGCAAGCTAATGCTGCT	144
		2	TGCCTAATGCACTGACCGAAAAAGAACA	145
			AGATCGTCTCATTTCGACTGGTATAGTT	146
64	N101S/Q200E/K388N	1	GTTTCGAGCCCGATAAGCGAGTTTCTCAC	147
			AGATCGTCTCATTTCGACTGGTATAGTT	148
		2	CGAATGAGACGATCTTGTGTTCCGACTC	149
			TCAGTGCATTAGGCAAGCTAATGCTGCT	150
		3	TGCCTAATGCACTGACCGAAAAAGAACA	151
			TTATCGGGCTCGAACACAGAACCTGCGA	152

[0173] 得られたPCR産物をアガロースゲル電気泳動により分離後、アガロースゲルより目的のサイズのDNAを抽出し、In-Fusion（登録商標）HD Cloning Kit（タカラバイオ）を用いてIn-Fusion反応を行った。該反応液でE. coli JM109を形質転換し、カナマイシン耐性株の中から目的のプラスミドを抽出した。このプラスミドを変異型A t G H 3 - 6 発現プラスミドとした。

[0174] (4) 変異型A t G H 3 - 6（配列番号185および186）の遺伝子がpET-28a（+）のマルチクローニングサイト内のNdeI、およびXhoIサイトに挿入されたプラスミド、pET-28a-変異型A t G H 3 - 6（変異体番号36）をユーロフィンジェノミクス社から購入した。

[0175] 実施例2：ランダム変異導入による変異型A t G H 3 - 6 発現プラスミドの

構築

pET-28a-AtGH3-6 (PCT/JP2019/007681) を鋳型として、AtGH3-6へ変異を導入した。変異導入はGene Morph II Random Mutagenesis Kit (アジレント・テクノロジー) を用いて以下の条件で行った。

1 cycle 95℃、2 min
 30 cycles 95℃、30 sec
 60℃、30 sec
 72℃、1.2 min
 1 cycle 72℃、10 min
 4℃、hold

[0176] 用いたプライマーは以下の通りである。

[0177] [表5]

表5. 変異型AtGH3-6の作製に用いたランダム変異導入用プライマー

塩基配列(5' → 3')	配列番号
TAATACGACTCACTATAGGG	153
ATGCTAGTTATTGCTCAGCGG	154

[0178] 得られた約2.1 kbのDNA断片をNdeI、XhoIで制限酵素処理し、同様にNdeI、XhoIで処理したpET-28a-AtGH3-6のベクター側DNA断片とライゲーションした。このライゲーション溶液でE. coli JM109を形質転換し、カナマイシン耐性株からプラスミドを抽出し、変異型AtGH3-6発現プラスミドライブラリーとした。得られたプラスミドライブラリーをE. coli BL21 (DE3) に導入し、カナマイシン耐性株の中から変異型AtGH3-6発現プラスミドを有する形質転換体を得た。得られた形質転換体からプラスミドを抽出し、AtGH3-6の配列を確認したところ、以下のアミノ酸置換が導入されていた。

[0179]

[表6]

表6. ランダム変異導入により得られた変異型A t G H 3 - 6の変異点

変異体番号	変異点
R1_3-F11	R 3 5 0 T / G 3 7 9 D
R1_5-H9	V 3 1 1 A
R3_5-C8	L 1 3 7 I
R4_1-A6	Q 2 0 0 E
R5_5-D3	K 3 8 8 N
R5_5-E7	I 1 2 3 T
R6_2-H7	C 3 3 5 S / L 3 9 0 P
R6_5-B7	V 1 4 0 I
R7_2-C2	N 1 0 1 S
R9_3-D4	E 4 8 3 D

[0180] 実施例3：変異型A t G H 3 - 6の精製

変異型A t G H 3 - 6発現プラスミドをそれぞれE. c o l i B L 2 1 (D E 3) に導入し、カナマイシン耐性株の中から当該プラスミドを有する形質転換体を得た。この株を5 0 m g / L のカナマイシンを含むL B 培地5 0 m L に植菌し、坂口フラスコを用いて3 7 °C で振とう培養を行った。O D 6 1 0 が0. 6 に到達したら1 m M I P T G を添加し、1 5 °C で2 4 時間振とう培養を行った。培養終了後、2 0 m L の培養液より菌体を遠心分離により集め、4 m L のx T r a c t o r (商標) B u f f e r (タカラバイオ) に懸濁した。x T r a c t o r (商標) B u f f e r K i t (タカラバイオ) に付属の5 u n i t s / μ L D N a s e I s o l u t i o n を8 μ L 、1 0 0 × l y s o z y m e s o l u t i o n を4 0 μ L 添加し、転倒攪拌後、室温で2 0 分間静置した。遠心分離により得られた上清をT A L O N (登録商標) S p i n C o l u m n (タカラバイオ) に供し、メーカープロトコルに従い精製を行った。平衡化バッファーは2 0 m M T r i s - H C l (p H 8. 0) 、3 0 0 m M N a C l 、1 0 m M i m i d a z o l e を、溶出バッファーは2 0 m M T r i s - H C l (p H 8. 0) 、3 0 0 m M N a C l 、1 5 0 m M i m i d a z o l e を用いた。得られた溶出液を回収し、A m i c o n U l t r a - 0. 5 1 0 k D a (M e r c k) を用いて濃縮、2 0 m M T r i s - H C l (p H 8. 0) 、1 m M D T T にバッファー交換を行い、精製酵素溶液とした。得られ

た精製酵素溶液のタンパク質濃度を、プロテインアッセイCBB溶液（5倍濃縮）（ナカライテスク）を用いて、Quick Start BSA Standard Set（Bio-rad）を標品として測定した。

[0181] 実施例4：変異型AtGH3-6の各アミノ酸基質に対する活性測定

50 mM Tris-HCl、5 mM L-グルタミン酸またはL-アスパラギン酸、5 mM ラウリン酸ナトリウム、10 mM ATP、10 mM $MgCl_2$ 、1 mM DTT、50 $\mu g/mL$ 精製酵素、pH 8.0、0.2 mLの反応液を25℃で24時間インキュベートした。反応終了後、0.8 mLの反応停止液（1.4%（w/v）リン酸、75%（v/v）メタノール）を添加し、遠心後の上清をUPLC-MS分析に供した。N α -ラウロイル-L-グルタミン酸（C12-L-Glu）、またはN α -ラウロイル-L-アスパラギン酸（C12-L-Asp）の分子量のシグナルを選択イオンレコーディング（SIR）法で抽出してピーク面積値を確認し、標品の検量線を用いて生成量を定量した。

[0182] UPLC-MS分析条件は以下の通りである。

（分析条件1）

装置：ACQUITY UPLC（Waters）

カラム：ACQUITY UPLC BEH C18 1.7 μm 2.1 $\times$ 50 mm Column（Waters）

移動相A：0.1%ギ酸

移動相B：アセトニトリル

グラジエント：

A : B 60 : 40 ~ 20 : 80 Gradient 1.2 min

A : B 20 : 80 ~ 60 : 40 Gradient 0.01 min

A : B 60 : 40 Isocratic 0.29 min

流速：0.6 mL/min

インジェクション量：2 μL

カラム温度：40℃

イオン化法：ESIーネガティブ

SIR：C12ーLーGlu m/z 328 [M-H]ー

C12ーLーAsp m/z 314 [M-H]ー

[0183] (分析条件2)

装置：ACQUITY UPLC (Waters)

カラム：ACQUITY UPLC BEH C18 1.7 μ m 2.1
×100mm Column (Waters)

移動相A：0.1%ギ酸

移動相B：アセトニトリル

グラジエント：

A：B 60：40～20：80 Gradient 2.4min

A：B 20：80～60：40 Gradient 0.1min

A：B 60：40 Isocratic 0.5min

流速：0.6mL/min

インジェクション量：2 μ L

カラム温度：40℃

イオン化法：ESIーネガティブ

SIR：C12ーLーGlu m/z 328 [M-H]ー

C12ーLーAsp m/z 314 [M-H]ー

[0184] UPLCーMS分析の結果、野生型AtGH3ー6と比較して、変異型AtGH3ー6において、N α ーラウロイルーLーグルタミン酸 (C12ーLーGlu) の生成量、および／またはLーグルタミン酸に対する基質特異性 (C12ーLーGluの生成量／C12ーLーAspの生成量) の向上が確認された。表中のWTは野生型AtGH3ー6を示す。

[0185]

[表7-1]

表 7-1. 基質としての L-グルタミン酸および L-アスパラギン酸に対する、各変異型 A t G H 3-6 の N-アシルアミノ酸合成活性 (1)

番号	変異	生成物 (mM)		基質特異性 C12-L-Glu/C12-L-Asp
		C12-L-Asp	C12-L-Glu	
WT	-	0.76	0.06	0.08
R18	Y134F	0.85	0.10	0.11
R20	Y134V	0.96	0.08	0.08
R30	S161P	0.75	0.14	0.18
R32	V174A	0.66	0.11	0.16
WT	-	0.93	0.07	0.08
R55	T336S	1.05	0.09	0.08
R56	M337G	1.13	0.15	0.14
R59	A339G	0.98	0.13	0.14
R61	S340A	0.78	0.10	0.13
WT	-	1.41	0.09	0.06
R39	V231A	0.98	0.18	0.19
R68	Y344G	1.54	0.11	0.07
R69	Y344A	1.74	0.12	0.07
R70	Y344V	1.35	0.19	0.14
R78	S455T	1.25	0.14	0.11
R1002	T122S/I123T	1.81	0.10	0.05
R1005	R117P/Q533R	0.08	0.14	1.74
WT	-	1.65	0.09	0.05
R1_3-F11	R350T/G379D	2.16	0.16	0.08
R1_5-H9	V311A	1.82	0.25	0.14
R3_5-C8	L137I	2.84	0.19	0.07
WT	-	0.55	0.03	0.05
R4_1-A6	Q200E	0.84	0.07	0.09
R5_5-D3	K388N	0.71	0.08	0.11
R5_5-E7	I123T	1.16	0.12	0.10
R7_2-C2	N101S	0.72	0.05	0.07
WT	-	0.83	0.07	0.09
R6_2-H7	C335S/L390P	0.88	0.11	0.13
R6_5-B7	V140I	1.00	0.10	0.10
R9_3-D4	E483D	1.00	0.09	0.09
WT	-	1.92	0.18	0.09
4	C576A	1.99	0.38	0.19
WT	-	2.29	0.15	0.07
7	S161P/V174A	1.67	0.64	0.38
8	S161P/V231A	1.69	0.69	0.41
10	S161P/Y344V	2.52	1.05	0.42
11	V174A/V231A	1.49	0.70	0.47
15	V231A/Y344V	1.63	0.35	0.21
18	R117P/V174A/Q533R	0.23	0.66	2.85
19	R117P/V231A/Q533R	0.38	1.43	3.74
20	R117P/M337G/Q533R	0.13	0.53	4.24
21	R117P/Y344V/Q533R	0.32	0.84	2.65
24	Y344I	2.14	0.17	0.08

[0186]

[表7-2]

表7-2. 基質としてのL-グルタミン酸およびL-アスパラギン酸に対する、各変異型A t G H 3-6のN-アシルアミノ酸合成活性(2)

番号	変異	生成物 (mM)		基質特異性 C12-L-Glu/C12-L-Asp
		C12-L-Asp	C12-L-Glu	
WT	-	2.37	0.34	0.14
9	S161P/M337G	2.95	2.11	0.72
12	V174A/M337G	2.58	1.62	0.63
13	V174A/Y344V	2.40	0.68	0.28
14	V231A/M337G	1.92	1.12	0.58
17	R117P/S161P/Q533R	0.32	1.07	3.32
WT	-	2.11	0.23	0.11
16	M337G/Y344V	1.94	0.80	0.41
WT	-	1.85	0.08	0.04
30	R117P/V174A/V231A/Q533R	0.30	1.26	4.19
32	R117P/V174A/Y344V/Q533R	0.12	0.46	3.76
WT	-	1.78	0.10	0.06
34	R117P/V231A/Y344V/Q533R	0.08	0.37	4.63
WT	-	2.28	0.24	0.10
26	R117P/S161P/V174A/M337A/Q533R	0.84	1.79	2.12
29	R117P/S161P/Y344V/Q533R	0.59	1.27	2.16
31	R117P/V174A/M337G/Q533R	1.22	2.20	1.81
33	R117P/V231A/M337G/Q533R	0.40	1.61	3.98
WT	-	2.20	0.26	0.12
27	R117P/S161P/V231A/Q533R	0.26	0.88	3.41
36	R117P/S161P/V174A/V231A/M337G/ Y344V/Q533R	0.51	1.04	2.03
WT	-	2.02	0.15	0.08
31	R117P/V174A/M337G/Q533R	0.64	2.14	3.34
38	R117P/V174A/V311A/M337G/Q533R	0.70	2.47	3.55
39	R117P/L137I/V174A/M337G/Q533R	0.66	2.43	3.66
40	R117P/V174A/Q200E/M337G/Q533R	0.90	2.88	3.19
WT	-	1.47	0.15	0.10
31	R117P/V174A/M337G/Q533R	0.55	1.72	3.11
41	R117P/V174A/M337G/K388N/Q533R	0.91	2.26	2.47
46	N101S/R117P/I123T/V174A/M337G/ Q533R	0.93	2.30	2.46
47	R117P/V174A/M337G/Q533R/C576A	0.99	2.49	2.51

[0187]

[表7-3]

表7-3. 基質としてのL-グルタミン酸およびL-アスパラギン酸に対する、各変異型A t G H 3-6のN-アシルアミノ酸合成活性(3)

番号	変異	生成物 (mM)		基質特異性
		C12-L-Asp	C12-L-Glu	C12-L-Glu/C12-L-Asp
WT	—	2.02	0.07	0.03
31	R117P/V174A/M337G/Q533R	0.68	1.26	1.86
37	R117P/V174A/M337G/R350T/G379D/Q533R	1.21	1.84	1.51
42	R117P/I123T/V174A/M337G/Q533R	1.43	2.14	1.50
43	N101S/R117P/V174A/M337G/Q533R	0.95	1.72	1.82
44	R117P/I123T/V174A/Q200E/M337G/Q533R	1.53	2.07	1.35
45	N101S/R117P/V174A/Q200E/M337G/Q533R	1.07	1.72	1.60
48	R117P/V174A/Q200E/M337G/R350T/G379D/Q533R	1.21	2.00	1.65
49	R117P/I123T/V174A/M337G/R350T/G379D/Q533R	1.80	2.38	1.32
50	N101S/R117P/V174A/M337G/R350T/G379D/Q533R	1.36	2.25	1.66
WT	—	2.00	0.24	0.12
31	R117P/V174A/M337G/Q533R	0.83	2.01	2.43
49	R117P/I123T/V174A/M337G/R350T/G379D/Q533R	1.73	3.07	1.77
54	N101S/R117P/I123T/V174A/M337G/R350T/G379D/Q533R	1.41	3.01	2.13
55	R117P/I123T/V174A/Q200E/M337G/R350T/G379D/Q533R	1.38	2.83	2.05
56	R117P/I123T/V174A/M337G/R350T/G379D/Q533R/C576A	2.23	3.28	1.47
57	R117P/I123T/V174A/M337G/R350T/G379D/K388N/Q533R	1.81	3.00	1.65

[0188]

[表7-4]

表7-4. 基質としてのL-グルタミン酸およびL-アスパラギン酸に対する、各変異型A t G H 3-6のN-アシルアミノ酸合成活性(4)

番号	変異	生成物 (mM)		基質特異性
		C12-L-Asp	C12-L-Glu	C12-L-Glu/C12-L-Asp
WT	-	1.66	0.10	0.06
31	R117P/V174A/M337G/Q533R	0.81	1.60	1.98
49	R117P/I123T/V174A/M337G/R350T/ G379D/Q533R	1.89	2.61	1.38
56	R117P/I123T/V174A/M337G/R350T/ G379D/Q533R/C576A	2.53	3.24	1.28
58	N101S/R117P/I123T/V174A/M337G/ R350T/G379D/Q533R/C576A	2.12	2.92	1.38
59	R117P/I123T/V174A/Q200E/M337G/ R350T/G379D/Q533R/C576A	2.31	3.05	1.32
60	R117P/I123T/V174A/M337G/R350T/ G379D/K388N/Q533R/C576A	2.38	3.26	1.37
61	N101S/R117P/I123T/V174A/Q200E/ M337G/R350T/G379D/Q533R/C576A	2.26	3.12	1.38
62	N101S/R117P/I123T/V174A/M337G/ R350T/G379D/K388N/Q533R/C576A	2.48	3.11	1.25
63	R117P/I123T/V174A/Q200E/M337G/ R350T/G379D/K388N/Q533R/C576A	2.44	3.23	1.33
64	N101S/R117P/I123T/V174A/Q200E/ M337G/R350T/G379D/K388N/Q533R/ C576A	2.77	3.25	1.17

[0189] 実施例5：変異型A t G H 3-6の各脂肪酸基質に対する活性測定

50 mM Tris-HCl、5 mM L-グルタミン酸、5 mM 脂肪酸ナトリウム（または脂肪酸）、10 mM ATP、10 mM MgCl₂、1 mM DTT、50 μg/mL 精製酵素、pH 8.0、0.2 mLの反応液を25℃で24時間インキュベートした。酵素反応に添加する脂肪酸ナトリウム（または脂肪酸）は、20% (v/v) Triton X-100に溶解させた25 mMの溶液を調製し、終濃度5 mMになるように反応液に添加した。反応終了後、0.8 mLの反応停止液（1.4% (w/v) リン酸、75% (v/v) メタノール）を添加し、遠心後の上清をUPLC-MS分析に供した。想定されるN α -アシル-L-グルタミン酸の分子量のシグナルをSIR法で抽出してピーク面積値を確認し、標品の検量線を用いて生成量を定量した。C6-L-GluおよびC8-L-Gluの定量にはC8-L-Gluを、C10-L-Gluの定量にはC10-L-Gluを、

C 1 2 以上の炭素鎖長のアシル基を有する N α - アシル - L - G l u の定量には C 1 2 - L - G l u を標品として使用した。脂肪酸ナトリウム（または脂肪酸）は、カプロン酸ナトリウム、カプリル酸ナトリウム、カプリン酸ナトリウム、ラウリン酸ナトリウム、ミリスチン酸ナトリウム、パルミチン酸ナトリウム、c i s - 5 - ドデセン酸、c i s - 9 - テトラデセン酸、または c i s - 9 - ヘキサデセン酸を用いた。炭素数が x 個の飽和脂肪酸を C x 、炭素数が x 個で炭素 - 炭素間の二重結合が y 個ある不飽和脂肪酸を C x : y と表記した。

[0190] U P L C - M S 分析条件は以下の通りである。

装置 : A C Q U I T Y U P L C (W a t e r s)

カラム : A C Q U I T Y U P L C B E H C 1 8 1 . 7 μ m 2 . 1 $\times$ 5 0 m m C o l u m n (W a t e r s)

移動相 A : 0 . 1 % ギ酸

移動相 B : アセトニトリル

グラジエント :

A : B 9 0 : 1 0 ~ 0 : 1 0 0 G r a d i e n t 1 . 8 m i n

A : B 0 : 1 0 0 I s o c r a t i c 0 . 6 m i n

A : B 0 : 1 0 0 ~ 9 0 : 1 0 G r a d i e n t 0 . 1 m i n

A : B 9 0 : 1 0 I s o c r a t i c 0 . 5 m i n

流速 : 0 . 6 m L / m i n

インジェクション量 : 2 μ L

カラム温度 : 4 0 $^{\circ}$ C

イオン化法 : E S I - ネガティブ

[0191]

[表8]

表 8. S I R法で検出したMSイオン

<i>N</i> α-acyl-L-Glu	<i>m/z</i> [M-H] ⁻
C6-L-Glu	244
C8-L-Glu	272
C10-L-Glu	300
C12-L-Glu	328
C12:1-L-Glu	326
C14-L-Glu	356
C14:1-L-Glu	354
C16-L-Glu	384
C16:1-L-Glu	382

[0192] UPLC-MS分析の結果、野生型A t G H 3 - 6と比較して、変異型A t G H 3 - 6において、炭素鎖数8以上のアシル基を有する各種*N*α-アシル-L-グルタミン酸の生成量の向上が確認された。表中のWTは野生型A t G H 3 - 6を示す。

[0193] [表9]

表 9. 各変異型A t G H 3 - 6の各脂肪酸基質に対する*N*-アシルアミノ酸合成活性

変異体 番号	変異点	<i>N</i> α-acetyl-L-Glu (mM)									
		C6	C8	C10	C12	C12:1	C14	C14:1	C16	C16:1	
WT	-	1.14	0.30	0.35	0.50	1.03	0.64	0.17	0.07	2.21	
31	R117P/V174A/M337G/Q533R	0.14	1.37	2.72	3.11	3.12	1.67	1.70	0.24	4.38	
49	R117P/I123T/V174A/M337G /R350T/G379D/Q533R	0.22	1.47	3.12	3.12	3.61	1.52	1.95	0.12	4.01	
56	R117P/I123T/V174A/M337G /R350T/G379D/Q533R/C576 A	0.35	1.50	2.89	3.17	3.25	2.62	2.14	0.28	4.97	
61	N101S/R117P/I123T/V174A /Q200E/M337G/R350T/G379 D/Q533R/C576A	0.41	1.62	2.44	3.80	3.25	2.50	1.92	0.33	3.97	

[0194] 実施例 6 : 脂肪酸生産株 (E. coli) の構築

グルコース等の炭素源から脂肪酸を生産する株として、acyl-CoA synthetase (fadD) 欠失/acyl-ACP thioesterase 増強 E. coli 株 (E. coli ΔfadD/pMW1

18-Ptac-UcTEopt)を、以下の手順にしたがって構築した。

[0195] (1) UcTE (Umbellularia californica由来acyl-ACP thioesterase) 遺伝子の合成

中鎖脂肪酸合成に関与する植物由来の酵素として、acyl-ACP thioesteraseが知られている。この酵素は、細菌の脂肪酸合成における鎖長の改変に利用することが可能である。以前より、油糧種子にラウリン酸を優位に生成するCalifornia bay (Umbellularia californica) 由来のmedium-chain acyl-ACP thioesterase (UcTE、GenBank: M94159) に関する研究がなされており、E. coliにおけるラウリン酸生産に利用されてきた (Voelker and Davies, J. of Bacteriol. 1994; 176 (23): 7320-7327)。UcTEのN末端領域には輸送ペプチドが存在していることが明らかにされているが (配列番号187)、輸送ペプチドはUcTEの酵素活性には必須ではないことが示されている (Feng et al. ACS Chem Biol. 2017; 12 (11): 2830-2836)。そのため、UcTE遺伝子の発現プラスミドの構築には、輸送ペプチドを含まない切断型遺伝子 (すなわち、配列番号3のアミノ酸配列における84番目から382番目のアミノ酸残基に開始メチオニンを付与したアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子) を用いることとした。E. coli発現用にコドンが最適化された切断型UcTE遺伝子の配列を配列番号4に示す。E. coli発現用にコドンが最適化されたUcTEの遺伝子について、遺伝子合成をユーロフィンジェノミクスに依頼し、当該遺伝子を含むDNA断片がpEX-K4J1ベクターに挿入されたプラスミド (pEX-K4J1-UcTEopt) を購入した。

[0196] (2) pMW118-Sce-Kmプラスミドの構築

E. coliとP. ananatisの両方で利用可能なプラスミドを得るために、発現ベクターpMW118-Sce-Kmを構築した。このプラ

スミドはkan遺伝子（カナマイシン耐性マーカー）とbla遺伝子（アンピシリン耐性マーカー）を含む。pMW118-placUV5-lacIプラスミド（Skorokhodova et al., Biotechnologiya (Russian), 2004; 5: 3-21）を基にして、pMW118-Sce-Kmプラスミド（図1）を構築した。pUC-4K（GenBank/EMBL accession number X06404, Pharmacia）を鋳型として、aminoglycoside phosphotransferaseをコードするkan遺伝子（カナマイシン耐性マーカー）とそのRBSを含むDNA断片をPCR増幅した（Mashko et al., Biotekhnologiya, 2001; 5: 3-20）。用いたプライマーは以下の通りである。

[0197] [表10]

表10. kan遺伝子とそのRBSを含むDNA断片の増幅用プライマー

プライマー番号	塩基配列(5' → 3')	配列番号
P1	TCTGATCTAGATAGGGATAACAGGGTAATCAACCAATTAACCAATTCTGATTAGAA	155
P2	GGAAAGGATCCGCGCCGCCACGTTGTGTCTCAAAATCTC	156

[0198] 得られたDNA断片を、T4 DNA ligase（Thermo Fisher Scientific）によるライゲーション反応により、pMW118-placUV5-lacIプラスミドのBamHI、およびXbaIサイトに挿入した。このライゲーション反応液でE. coli TG1を形質転換し、50mg/Lのカナマイシンを含むLB寒天培地上で生育させた後、カナマイシン耐性株の中からpMW118-Sce-Kmを抽出した。プラスミドの構造はシーケンス解析により確認した（図1）。

[0199] (3) pMW118-Ptac-UcTEoptプラスミドの構築

pEX-K4J1-UcTEoptプラスミドを鋳型として、T7ファージ由来のRBS（RBS T7）に融合させて制限酵素サイトを付加させた切断型UcTEopt遺伝子を含むDNA断片をPCR増幅した。用いたプラ

イマーは以下の通りである。

[0200] [表11]

表 11. R B S T 7 と切断型 U c T E o p t 遺伝子を含む DNA 断片の増幅用プライマー

プライマー番号	塩基配列 (5' → 3')	配列番号
P3	TTTTTCTAGAAATAATTTTGTCTTAAGGAGATATACCATGC TAGAGTGGAAACCGAAACCG	157
P4	TTTTTGGATCCTCGAGTTAAACGCGAGGTTCCGCAG	158

[0201] P t a c プロモーターが導入された染色体 DNA (K a t a s h k i n a et al. Molecular Biology. 2005; 39 (5) : 719-726) を鋳型として、制限酵素サイトを付加させた P t a c プロモーターを含む DNA 断片を P C R 増幅した。用いたプライマーは以下の通りである。

[0202] [表12]

表 12. P t a c プロモーターを含む DNA 断片の増幅用プライマー

プライマー番号	塩基配列 (5' → 3')	配列番号
P5	TTTTTAGATCTCCCTGTTGACAATTAATCATCGG	159
P6	CTGTTTCTAGATCCTGTGTGAAATTGTTATCCGC	160

[0203] 得られた、R B S T 7 と切断型 U c T E o p t 遺伝子を含む DNA 断片と、P t a c プロモーターを含む DNA 断片を X b a l で処理し、T 4 D N A l i g a s e (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c) を用いて両方の DNA 断片をライゲーションさせた。このライゲーション反応液を鋳型として、B g l I I I、および E c o R I サイトが付加した P t a c - R B S T 7 - U c T E o p t (配列番号 6) を含む DNA 断片を P C R 増幅した。用いたプライマーは以下の通りである。

[0204] [表13]

表 13. P t a c - R B S T 7 - U c T E o p t を含む DNA 断片の増幅用プライマー

プライマー番号	塩基配列 (5' → 3')	配列番号
P5	TTTTTAGATCTCCCTGTTGACAATTAATCATCGG	161
P7	TTTTTGAATTCGAGCTCGGTACCAATAATTTTGTCTTAAGGAGATATACC	162

[0205] 得られた DNA 断片を、T 4 D N A l i g a s e (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c) によるライゲーション反応により p

MW118-Sce-KmのBglII、およびEcoRIサイトに挿入した。このライゲーション反応液で*E. coli* TG1を形質転換し、50 mg/Lのカナマイシンを含むLB寒天培地上で生育させた後、カナマイシン耐性株の中からpMW118-Ptac-UcTEoptプラスミドを抽出した。プラスミドの構造はシーケンス解析により確認した（図2）。

[0206] (4) *E. coli* Δ*fadD*/pMW118-Ptac-UcTEopt（脂肪酸生産株）の構築

*E. coli*の脂肪酸生産株の構築には、*E. coli* K-12 MG1655（F-lambda-*ilvG*-*rfb*-50 *rph*-ATCC 47076）を基本株として用いた。脂肪酸分解経路を遮断するため、*fadD*遺伝子のインフレーム欠失を行った。*fadD*遺伝子に相同な40bpの領域が付加されたλ*attL*-*kan*-λ*attR*を含むPCR増幅DNA断片を用いて、既報の方法（Katashkina et al., BMC Mol Biol. 2009; 10:34）と同様に、λ-Red法による欠失を行った。エレクトロポレーションの後、菌株を50 mg/Lのカナマイシンを含むLB寒天培地上で生育させた。*fadD*遺伝子をλ*attL*-*kan*-λ*attR*で置換するために用いたDNA断片は、λ*attL*-*kan*-λ*attR*カセットが導入されたゲノムDNA（Katashkina et al., BMC Mol Biol. 2009; 10:34）を鋳型として、PCR増幅した。用いたプライマーは以下の通りである。

[0207] [表14]

表14. λ*attL*-*kan*-λ*attR*を含むDNA断片（*fadD*遺伝子欠失用DNA断片）の増幅用プライマー

プライマー番号	塩基配列 (5' → 3')	配列番号
P9	TGAGCTGACGGCGGCAAAAGTCACCACTGACTCTTCGGTTGAAGCCTGC TTTTTATACTAAGTTGG	163
P10	CAACCTGCGTTTGTGAATATGGGGAGGTAATGACCTTCCCGCTCAAGTT AGTATAAAAAAGCTGAAC	164

[0208] 得られた*E. coli* MG1655 Δ*fadD*::λ*attL*-*kan*-λ*attR*をPCRにより確認した。用いたプライマーは以下の通りで

ある。

[0209] [表15]

表 15. *fadD* 遺伝子欠失確認用プライマー

プライマー番号	塩基配列 (5' → 3')	配列番号
P11	TGCGATGACGACGAACACGC	165
P12	GATTAACCGCGTCTGACGAC	166

[0210] 得られた菌株から、既報のファージ λ Int / Xis 依存的手法 (Katashkina et al., BMC Mol Biol. 2009; 10: 34) によりカナマイシン耐性マーカー (*kan* 遺伝子) を除去した。染色体からのマーカーの除去は PCR により確認した。用いたプライマーは以下の通りである。

[0211] [表16]

表 16. カナマイシン耐性マーカー (*kan* 遺伝子) 除去確認用プライマー

プライマー番号	塩基配列 (5' → 3')	配列番号
P11	TGCGATGACGACGAACACGC	167
P12	GATTAACCGCGTCTGACGAC	168

[0212] 得られた菌株 (*E. coli* MG1655 $\Delta fadD::\lambda attB$) を、エレクトロポレーション法により pMW118-Ptac-UcTEopt プラスミドで形質転換し、*E. coli* $\Delta fadD$ / pMW118-Ptac-UcTEopt を脂肪酸生産株として取得した。

[0213] 実施例 7: 脂肪酸生産株 (*P. ananatis*) の構築

グルコース等の炭素源から脂肪酸を生産する株として、*fadD* 欠失 / *gcd* 欠失 / *acyl-ACP thioesterase* 増強 *P. ananatis* 株 (*P. ananatis* SC17 (0) $\Delta fadD \Delta gcd$ / pMW118-PlacUV5-lacI-UcTEopt) を、以下の手順にしたがって構築した。

[0214] (1) pMW118-PlacUV5-lacI-UcTEopt プラスミドの構築

実施例 6 に記載の pMW118-Ptac-UcTEopt プラスミドを

鋳型として、R B S T 7 と切断型 U c T E o p t 遺伝子を含む DNA 断片を PCR 増幅した。用いたプライマーは以下の通りである。

[0215] [表17]

表 1 7 . R B S T 7 と切断型 U c T E o p t 遺伝子を含む DNA 断片の増幅用プライマー

プライマー番号	塩基配列 (5' → 3')	配列番号
P4	TTTTGGATCCTCGAGTTAAACGCGAGGTTCCGCAG	169
P8	TTTTGAGCTCGAATTCTTAAACGCGAGGTTCCGCAG	170

[0216] 得られた DNA 断片を、T4 DNA ligase (Thermo Fisher Scientific) によるライゲーション反応により pMW118-Sce-Km プラスミドの EcoRI、および BamHI サイトに挿入した。このライゲーション反応液で E. coli TG1 を形質転換し、50 mg/L のカナマイシンを含む LB 寒天培地上で生育させた後、カナマイシン耐性株の中から pMW118-PlacUV5-lacI-UcTEopt プラスミドを抽出した。プラスミドの構造はシーケンス解析により確認した (図 3)。

[0217] (2) P. ananatis SC17 (0) ΔfadD Δgcd/pMW118-PlacUV5-lacI-UcTEopt の構築

P. ananatis の脂肪酸生産株の構築には、P. ananatis SC17 (0) (Katashkina JI et al., BMC Mol Biol. 2009; 10: 34) を基本株として用いた。脂肪酸分解経路を遮断するため、fadD 遺伝子 (PAJ_1453) のインフレーム欠失を行った。fadD 遺伝子に相同な 40 bp の領域が付加された λ attL-kan-λ attR を含む PCR 増幅 DNA 断片を用いて、既報の方法 (Katashkina et al., BMC Mol Biol. 2009; 10: 34) と同様に、λ-Red 法による欠失を行った。エレクトロポレーションの後、菌株を 50 mg/L のカナマイシンを含む LB 寒天培地上で生育させた。fadD 遺伝子を λ attL-kan-λ attR で置換するために用いた DNA 断片は、λ attL-kan-λ attR カセットが導入されたゲノム DNA (Katashkina et al.

, BMC Mol Biol. 2009; 10: 34) を鋳型として、PCR増幅した。用いたプライマーは以下の通りである。

[0218] [表18]

表18. λ attL-kan- λ attRを含むDNA断片 (fadD遺伝子欠失用DNA断片) の増幅用プライマー

プライマー番号	塩基配列 (5' → 3')	配列番号
P13	CTGACGACGACAGTGATCGAGCAGCTCTTCTTGGTCAGCTGAAGCCTGC TTTTTATACTAAGTTGG	171
P14	CTCTGGTTGATCTGTTTGAGCAGGCCGTTCCCGTTACGCCGCTCAAGTT AGTATAAAAAAGCTGAAC	172

[0219] 得られたP. ananatis SC17 (0) Δ fadD:: λ attL-kan- λ attRをPCRにより確認した。用いたプライマーは以下の通りである。

[0220] [表19]

表19. fadD遺伝子欠失確認用プライマー

プライマー番号	塩基配列 (5' → 3')	配列番号
P15	CAAATGCGATTGTCGAGGCG	173
P16	CCGGCGTTCAACCTGAATCC	174

[0221] 得られた菌株から、既報のファージ λ Int/Xis依存的手法 (Kataashkina et al., BMC Mol Biol. 2009; 10: 34) により、カナマイシン耐性マーカー (kan遺伝子) を除去した。染色体からのマーカーの除去はPCRにより確認した。用いたプライマーは以下の通りである。

[0222] [表20]

表20. カナマイシン耐性マーカー (kan遺伝子) 除去確認用プライマー

プライマー番号	塩基配列 (5' → 3')	配列番号
P15	CAAATGCGATTGTCGAGGCG	175
P16	CCGGCGTTCAACCTGAATCC	176

[0223] 得られた菌株をP. ananatis SC17 (0) Δ fadD:: λ attBと命名した。

[0224] 次に、gcd遺伝子 (PAJ_3473) の欠失を行った。Wizard Genomic DNA Purification Kit (Prom

ega) を用いて *P. ananatis* SC17 (0) $\Delta gcd::\lambda attR-attL\phi 80-kan-attR\phi 80$ より単離したゲノム DNA (Katashkina et al., Biotekhnologiya. 2019; 35 (2) : 3-15) を、既報の方法 (Katashkina et al., BMC Mol Biol. 2009; 10: 34) に従って *P. ananatis* SC17 (0) $\Delta fadD::\lambda attB$ 株にエレクトロポレーションした。 $\Delta gcd::\lambda attR-attL\phi 80-kan-attR\phi 80$ カセットの導入は以下のプライマーを用いて確認した。

[0225] [表21]

表 21. *gcd* 遺伝子欠失確認用プライマー

プライマー番号	塩基配列 (5' → 3')	配列番号
P17	AGGGCAGATAGCAGGCATAA	177
P18	TCTGATTGTTTTCTGAGTTTTC	178

[0226] 得られた菌株を *P. ananatis* SC17 (0) $\Delta fadD::\lambda attB \Delta gcd::\lambda attR-attL\phi 80-kan-attR\phi 80$ と命名した。この菌株から、pAH129-cat ヘルパープラスミドを用いた既報の方法 (Andreeva et al., FEMS Microbiol Lett. 2011; 318 (1) : 55-60) により、カナマイシン耐性マーカー (*kan* 遺伝子) を除去した。マーカーの除去は PCR により確認した。用いたプライマーは以下の通りである。

[0227] [表22]

表 22. カナマイシン耐性マーカー (*kan* 遺伝子) 除去確認用プライマー

プライマー番号	塩基配列 (5' → 3')	配列番号
P17	AGGGCAGATAGCAGGCATAA	179
P18	TCTGATTGTTTTCTGAGTTTTC	180

[0228] 得られた菌株 (*P. ananatis* SC17 (0) $\Delta fadD::\lambda attB \Delta gcd::\lambda attR-attB\phi 80$) を、エレクトロポレーション法により pMW118-PlacUV5-lacI-UcTEo

p t プラスミドで形質転換し、50～200 mg/L のカナマイシンを含む LB 寒天培地上で生育させ、*P. ananatis* SC17 (0) $\Delta fadD \Delta gcd$ / pMW118-P_{lac}UV5-lacI-UcTEopt を脂肪酸生産株として取得した。

[0229] 実施例 8：脂肪酸生産株を用いたグルコースからのラウリン酸合成

実施例 6 および 7 で構築した脂肪酸生産株を 50 mg/L のカナマイシンを含む K-medium 寒天培地 (K-medium: 0.5×M9 塩、5 g/L D-グルコースを加えた LB 培地) に植菌し、30℃、16 時間インキュベートした。評価した菌株は以下の通りである。

[0230] [表23]

表 23. ラウリン酸合成の評価に用いた脂肪酸生産株 (実施例 6 および 7 で構築した脂肪酸生産株)

菌株番号	宿主	プラスミド
1	<i>E. coli</i> $\Delta fadD$	pMW118-P _{tac} -UcTEopt
2	<i>P. ananatis</i> $\Delta fadD \Delta gcd$	pMW118-P _{lac} UV5-lacI-UcTEopt

[0231] 得られた菌体を 50 mL の評価用培地に植菌し、Ultra Yield (商標) Flask 500 mL (THOMSON) を用いて 30℃、220 rpm の条件で振とう培養した。菌株番号 2 を培養する場合には、1 mM IPTG を培地に添加した。評価用培地の組成は以下の通りである。

[0232]

[表24]

表 2 4 . 脂肪酸生産株の評価用培地の組成

原料名	濃度
D-glucose	40 g/L
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	16 g/L
KH ₂ PO ₄	0.3 g/L
KCl	1 g/L
MES	10 g/L
D-pantothenic acid calcium salt	10 mg/L
betaine	1 g/L
Bacto™ Tryptone	1 g/L
Bacto™ Yeast Extract	1 g/L
FeSO ₄ · 7H ₂ O	10 mg/L
MnSO ₄ · 5H ₂ O	10 mg/L
L-Lys · HCl	125 mg/L
L-Met	100 mg/L
2,6-diaminopimelic acid (DAP)	100 mg/L
CaCO ₃	30 g/L
kanamycin monosulfate	50 mg/L

[0233] 培養終了後、よく混合した培養液 1 mL を遠心分離して得られた菌体に、1 mL の 1.4 % (w/v) リン酸、75 % (v/v) メタノール（内部標準として 1000 ppm のトリデシル酸を含む）を添加し、ボルテックスミキサーで 3 分間混合した。遠心分離により得られた上清を GC、および GC-MS 分析に供した。

[0234] GC 分析条件は以下の通りである。

装置 : GC-2010 (SHIMADZU)

カラム : DB-FFAP 30m, ID 0.25mm, film 0.25 μm (Agilent Technologies)

注入量 : 1 μL

注入法 : スプリット 50 : 1

注入口温度 : 280℃

カラムオーブン : 190℃ (5 min) - 8℃/min - 250℃ (7.5 min)

キャリアガス：He、線速度、35 cm/sec

検出器：FID、300℃

[0235] GC-MS分析条件は以下の通りである。

装置：Network GC System (6890N, Agilent Technologies)

Mass Selective Detector (5973, Agilent Technologies)

カラム：DB-FFAP 30m, ID 0.25mm, film 0.25 μm (Agilent Technologies)

注入量：1 μL

注入法：スプリット 50 : 1

注入口温度：280℃

カラムオーブン：190℃ (5 min) - 8℃/min - 250℃ (7.5 min)

キャリアガス：He、線速度、39 cm/sec

MS温度：230℃ (イオン源)、150℃ (四重極)

スキャンレンジ：m/z 30 - 350

[0236] GC分析により得られたピークの面積値より、各種脂肪酸量を定量した。

標品は、各種脂肪酸を1.4% (w/v) リン酸、75% (v/v) メタノール (内部標準として1000 ppmのトリデシル酸を含む) に溶解して調製した。内部標準のトリデシル酸のピーク面積値との比較により試料間の補正を行い、培養液当たりの各種脂肪酸量を算出した。分析の結果、菌株番号1および2において、ラウリン酸を主成分とした各種脂肪酸の生成が確認された。生成した各種脂肪酸は、GC分析における保持時間、およびGC-MS分析により同定した。

[0237]

[表25]

表 25. 脂肪酸生産株により生成される各種脂肪酸の生成量

菌株 番号	菌種	脂肪酸 (g/L)						
		C12	C12:1	C14	C14:1	C16	C16:1	C18:1
1	<i>E. coli</i>	1.5±0.1	0.2±0.0	0.2±0.0	0.2±0.0	ND	ND	ND
2	<i>P. ananatis</i>	1.2±0.2	0.2±0.0	0.2±0.0	0.3±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.2±0.0

ND：不検出

[0238] 実施例 9：N-アシルアミノ酸生産株の構築

グルコース等の炭素源からN-アシルアミノ酸を生産する株として、実施例 6 および 7 で構築した脂肪酸生産株に、野生型 A t G H 3-6 または変異型 A t G H 3-6 発現単位を導入した菌株を、以下の手順にしたがって構築した。

[0239] プロモーター P p h o C _ _ S D a t c 配列（配列番号 5）について、DNA 合成をサーモフィッシャーサイエンティフィック社に依頼し、当該配列を含む DNA 断片が E c o R I、および N d e I サイトに挿入されたプラスミドを購入した。このプラスミドを鋳型として、P p h o C _ _ S D a t c を含む DNA 断片を PCR 増幅した。PCR は P r i m e S T A R M a x D N A P o l y m e r a s e（タカラバイオ）を用いて以下の条件で行った。

1 cycle 98℃、30 sec
 30 cycles 98℃、10 sec
 60℃、15 sec
 72℃、5 sec
 1 cycle 72℃、5 min
 4℃、hold

[0240] 用いたプライマーは以下の通りである。

[0241] [表26]

表 26. P p h o C _ _ S D a t c を含む DNA 断片の増幅用プライマー

塩基配列 (5' → 3')	配列番号
CCATGATTACGAATTCATTTTTCATGTG	181
ATGGATTCTCCTTACGGTGTTATATGTCC	182

[0242] pET-28a-AtGH3-6、または実施例1で構築したpET-28a-AtGH3-6 ID31、pET-28a-AtGH3-6 ID49、pET-28a-AtGH3-6 ID56、pET-28a-AtGH3-6 ID61 (IDは変異体番号を示す) を鋳型として、野生型または変異型AtGH3-6遺伝子を含むDNA断片をPCR増幅した。PCRはPrimeSTAR Max DNA Polymerase (タカラバイオ) を用いて以下の条件で行った。

1 cycle 98°C、30 sec
 30 cycles 98°C、10 sec
 60°C、15 sec
 72°C、10 sec
 1 cycle 72°C、5 min
 4°C、hold

[0243] 用いたプライマーは以下の通りである。

[0244] [表27]

表27. 野生型または変異型AtGH3-6遺伝子を含むDNA断片の増幅用プライマー

塩基配列 (5' → 3')	配列番号
TAAGGAGGAATCCATATGCCGGAAGCACCA	183
GATCCCCGGGTACCGAGCTCCTCGAGTTAATTACT	184

[0245] PphoC__SDatcを含むPCR産物、野生型または変異型AtGH3-6遺伝子を含むPCR産物、およびEcoRI、SacIで処理したpHSG398 (タカラバイオ) を、それぞれアガロースゲル電気泳動により分離後、アガロースゲルより目的のサイズのDNAを抽出し、In-Fusion (登録商標) HD Cloning Kit (タカラバイオ) を用いてIn-Fusion反応を行った。該反応液でE. coli JM109を形質転換し、クロラムフェニコール耐性株の中から目的のプラスミド (PphoC__SDatcおよびAtGH3-6発現単位を含むプラスミド) を抽出した。このプラスミドをpHSG398-PphoC-AtGH3-6 (SDatc)、pHSG398-PphoC-AtGH3-6 ID

31 (SDatc)、pHSG398-PphoC-AtGH3-6 ID49 (SDatc)、pHSG398-PphoC-AtGH3-6 ID56 (SDatc)、pHSG398-PphoC-AtGH3-6 ID61 (SDatc)とした。得られた目的のプラスミド、およびpHSG398(陰性対照)により、実施例6および7で構築した脂肪酸生産株(*E. coli* $\Delta fadD$ /pMW118-Ptac-UcTEopt、*P. ananatis* $\Delta fadD \Delta gcd$ /pMW118-PlacUV5-lacI-UcTEopt)を形質転換し、カナマイシンおよびクロラムフェニコール耐性株の中から当該プラスミドを有する形質転換体を得た。得られた形質転換体をN-アシルアミノ酸生産株とした。構築した株は以下の通りである。

[0246] [表28]

表28. N-アシルアミノ酸生産株

菌株番号	宿主	プラスミド(1)	プラスミド(2)
3	<i>E. coli</i> $\Delta fadD$	pMW118-Ptac-UcTEopt	pHSG398
4			pHSG398-PphoC-AtGH3-6 (SDatc)
5			pHSG398-PphoC-AtGH3-6 ID31 (SDatc)
6			pHSG398-PphoC-AtGH3-6 ID49 (SDatc)
7			pHSG398-PphoC-AtGH3-6 ID56 (SDatc)
8			pHSG398-PphoC-AtGH3-6 ID61 (SDatc)
9	<i>P. ananatis</i> $\Delta fadD \Delta gcd$	pMW118-PlacUV5-lacI-UcTEopt	pHSG398
10			pHSG398-PphoC-AtGH3-6 (SDatc)
11			pHSG398-PphoC-AtGH3-6 ID31 (SDatc)
12			pHSG398-PphoC-AtGH3-6 ID49 (SDatc)
13			pHSG398-PphoC-AtGH3-6 ID56 (SDatc)
14			pHSG398-PphoC-AtGH3-6 ID61 (SDatc)

[0247] 実施例10: N-アシルアミノ酸生産株を用いたグルコースからのN α -ラウロイル-L-グルタミン酸合成

実施例9で構築したN-アシルアミノ酸生産株を50mg/Lのカナマイシンおよび25mg/Lのクロラムフェニコールを含むLB寒天培地に植菌し、30℃、16時間インキュベートした。得られた菌体を3mLの評価用培地に植菌し、試験管を用いて30℃、120rpmの条件で48時間振と

う培養した。菌株番号 9 から 14 を培養する場合には、1 mM IPTG を培地に添加した。評価用培地の組成は以下の通りである。

[0248] [表29]

表 29. N-アシルアミノ酸生産株の評価用培地の組成

原料名	濃度
D-glucose	40 g/L
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	16 g/L
KH ₂ PO ₄	0.3 g/L
KCl	1 g/L
MES	10 g/L
D-pantothenic acid calcium salt	10 mg/L
betaine	1 g/L
Bacto™ Tryptone	1 g/L
Bacto™ Yeast Extract	1 g/L
FeSO ₄ · 7H ₂ O	10 mg/L
MnSO ₄ · 5H ₂ O	10 mg/L
L-Lys · HCl	125 mg/L
L-Met	100 mg/L
2,6-diaminopimelic acid (DAP)	100 mg/L
CaCO ₃	30 g/L
kanamycin monosulfate	50 mg/L
chloroamphenicol	25 mg/L

[0249] 培養終了後、よく混合した培養液 100 μL に、900 μL の 1.4 % (w/v) リン酸、75 % (v/v) メタノールを添加し、ボルテックスミキサーで 3 分間混合した。遠心分離により得られた上清を適宜 1.4 % (w/v) リン酸、75 % (v/v) メタノールで希釈し、UPLC-MS 分析に供した。UPLC-MS 分析条件は実施例 5 に記載の通りである。

[0250] UPLC-MS 分析の結果、陰性対照 (pHSG398)、および野生型 AtGH3-6 を発現させた場合には、各種 N α -アシル-L-グルタミン酸はほとんど生成しなかったが、変異型 AtGH3-6 (ID31、49、56、および 61) を発現させた場合には、各種 N α -アシル-L-グルタミン酸の生成が確認された。表中の Control は陰性対照を、WT は野生型 AtGH3-6 を示す。

[0251]

[表30]

表 30. 各 N-アシルアミノ酸生産株により生成される各種 N α -アシル-L-グルタミン酸の生成量

菌株番号	菌株		N α -acyl-L-Glu (g/L)						
			C10	C12	C12:1	C14	C14:1	C16	C16:1
3	<i>E. coli</i>	Control	0.0000	0.0001	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
4		WT	0.0000	0.0001	0.0001	0.0000	0.0000	0.0000	0.0001
5		ID31	0.0012	0.1296	0.0682	0.0003	0.0053	0.0001	0.0003
6		ID49	0.0019	0.1474	0.0863	0.0009	0.0086	0.0003	0.0012
7		ID56	0.0036	0.1942	0.1188	0.0017	0.0211	0.0006	0.0018
8		ID61	0.0028	0.1745	0.1059	0.0012	0.0149	0.0003	0.0014
9	<i>P. ananatis</i>	Control	0.0000	0.0022	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
10		WT	0.0011	0.0345	0.0183	0.0007	0.0008	0.0000	0.0003
11		ID31	0.0073	0.7553	0.1953	0.0104	0.1003	0.0001	0.0016
12		ID49	0.0075	0.7029	0.2248	0.0341	0.1200	0.0008	0.0132
13		ID56	0.0069	0.7486	0.1905	0.0125	0.0892	0.0004	0.0054
14		ID61	0.0042	0.7613	0.1522	0.0143	0.0806	0.0004	0.0069

[0252] 実施例 11: N-アシルアミノ酸生産株を用いたグルコースからの N α -ラウロイル-L-アスパラギン酸合成

実施例 9 で構築した N-アシルアミノ酸生産株を 50 mg/L のカナマイシンおよび 25 mg/L のクロラムフェニコールを含む LB 寒天培地に植菌し、30℃、16 時間インキュベートした。得られた菌体を 3 mL の評価用培地に植菌し、試験管を用いて 30℃、120 rpm の条件で 48 時間振とう培養した。菌株番号 9 から 14 を培養する場合には、1 mM IPTG を培地に添加した。評価用培地の組成は、実施例 10 に記載の組成に、10 g/L L-アスパラギン酸を添加した。

[0253] 培養終了後、よく混合した培養液 100 μ L に、900 μ L の 1.4% (w/v) リン酸、75% (v/v) メタノールを添加し、ボルテックスミキサーで 3 分間混合した。遠心分離により得られた上清を適宜 1.4% (w/v) リン酸、75% (v/v) メタノールで希釈し、UPLC-MS 分析に供した。UPLC-MS 分析は実施例 5 に記載の通りに行い、SIR 検出は以下の通りに行った。C10-L-Asp の定量には C10-L-Asp を、C12 以上の炭素鎖長のアシル基を有する N α -アシル-L-Asp の定量には C12-L-Asp を標品として使用した。

[0254] [表31]

表 3 1. S I R 法で検出したMSイオン

<i>Nα</i> -acyl-L-Asp	<i>m/z</i> [M-H] ⁻
C10-L-Asp	286
C12-L-Asp	314
C12:1-L-Asp	312
C14-L-Asp	342
C14:1-L-Asp	340
C16-L-Asp	370
C16:1-L-Asp	368

[0255] UPLC-MS分析の結果、陰性対照（p H S G 3 9 8）では、各種*Nα*-アシル-L-アスパラギン酸はほとんど生成しなかったが、野生型A t G H 3-6、または変異型A t G H 3-6（I D 3 1、4 9、5 6、および6 1）を発現させた場合には、各種*Nα*-アシル-L-アスパラギン酸の生成が確認された。表中のC o n t r o lは陰性対照を、W Tは野生型A t G H 3-6を示す。

[0256] [表32]

表 3 2. 各*N*-アシルアミノ酸生産株により生成される各種*Nα*-アシル-L-アスパラギン酸の生成量

菌株番号	菌株		<i>Nα</i> -acyl-L-Asp (g/L)						
			C10	C12	C12:1	C14	C14:1	C16	C16:1
3	<i>E. coli</i>	Control	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
4		WT	0.0000	0.0003	0.0001	0.0001	0.0002	0.0001	0.0008
5		ID31	0.0000	0.0012	0.0005	0.0000	0.0001	0.0000	0.0001
6		ID49	0.0001	0.0025	0.0012	0.0001	0.0003	0.0000	0.0001
7		ID56	0.0001	0.0007	0.0017	0.0002	0.0006	0.0000	0.0002
8		ID61	0.0000	0.0022	0.0008	0.0001	0.0003	0.0000	0.0001
9	<i>P. ananatis</i>	Control	0.0000	0.0001	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
10		WT	0.0087	0.1560	0.0912	0.0036	0.0566	0.0003	0.0054
11		ID31	0.0002	0.0816	0.0255	0.0008	0.0065	0.0001	0.0010
12		ID49	0.0006	0.1178	0.0341	0.0028	0.0140	0.0002	0.0042
13		ID56	0.0002	0.0939	0.0277	0.0015	0.0094	0.0001	0.0019
14		ID61	0.0006	0.1359	0.0375	0.0032	0.0171	0.0002	0.0046

[0257] 実施例 1 2 : *N*-アシルアミノ酸生産株の培養液の泡立ち評価

実施例 9 で構築した*N*-アシルアミノ酸生産株を 5 0 m g / L のカナマイ

シンおよび25 mg/Lのクロラムフェニコールを含むLB寒天培地に植菌し、30℃、16時間インキュベートした。評価した菌株は以下の通りである。

[0258] [表33]

表33. 培養液の泡立ち評価に用いたN-アシルアミノ酸生産株（実施例9で構築したN-アシルアミノ酸生産株）

菌株番号	宿主	プラスミド（1）	プラスミド（2）
3	<i>E. coli</i> $\Delta fadD$	pMW118-Ptac-UcTEopt	pHSG398
4			pHSG398-PphoC-AtGH3-6 (SDatc)
8			pHSG398-PphoC-AtGH3-6 ID61 (SDatc)
9	<i>P. ananatis</i> $\Delta fadD \Delta gcd$	pMW118-PlacUV5-lacI-UcTEopt	pHSG398
10			pHSG398-PphoC-AtGH3-6 (SDatc)
14			pHSG398-PphoC-AtGH3-6 ID61 (SDatc)

[0259] 得られた菌体を50 mLの評価用培地に植菌し、Ultra Yield（商標）Flask 500 mL（THOMSON）を用いて30℃、220 rpmの条件で振とう培養した。菌株番号9、10、14を培養する場合には、1 mM IPTGを培地に添加した。評価用培地の組成は実施例10に記載の通りである。

[0260] 培養終了後、よく混合した培養液を遠心分離し、得られた培養上清100 μ Lに、900 μ Lの1.4%（w/v）リン酸、75%（v/v）メタノールを添加し、ボルテックスミキサーで3分間混合した。遠心分離により得られた上清を適宜1.4%（w/v）リン酸、75%（v/v）メタノールで希釈し、UPLC-MS分析に供した。UPLC-MS分析条件は実施例5に記載の通りである。

[0261] UPLC-MS分析の結果、陰性対照（pHSG398）、および野生型AtGH3-6を発現させた場合には、各種N α -アシル- γ -グルタミン酸はほとんど生成しなかったが、変異型AtGH3-6（ID61）を発現させた場合には、各種N α -アシル- γ -グルタミン酸の生成が確認された。表中のControlは陰性対照を、WTは野生型AtGH3-6を、totalはC10、C12、C12:1、C14、C14:1、C16、C

16 : 1 のアシル基を有する $N\alpha$ -アシル-L-グルタミン酸の総濃度示す。

[0262] [表34]

表34. 各N-アシルアミノ酸生産株により培養上清中に生成される各種 $N\alpha$ -アシル-L-グルタミン酸の生成量

菌株 番号	菌株		Nα -acyl-L-Glu (g/L)							
			C10	C12	C12:1	C14	C14:1	C16	C16:1	total
3	E. coli	Control	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001
4		WT	0.000	0.001	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002
8		ID61	0.003	0.094	0.094	0.001	0.014	0.000	0.001	0.205
9	P. ananatis	Control	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001
10		WT	0.001	0.009	0.011	0.000	0.002	0.000	0.000	0.024
14		ID61	0.003	0.672	0.177	0.032	0.092	0.001	0.013	0.990

[0263] 得られた培養上清の泡立ちを評価するため、各種培養上清4 mLのpHをHClにより5.0に合わせた後、超純水を添加して5 mLとした。対照として、 $N\alpha$ -ラウロイル-L-グルタミン酸（アミソフト（登録商標）L A-D）を超純水に溶解してNaOHによりpHを5.0に合わせた溶液を準備した。さらに、 $N\alpha$ -ラウロイル-L-グルタミン酸（アミソフト（登録商標）L A-D）溶液を陰性対照（pHSG398）の培養上清4 mLに添加し、HClによりpHを5.0に合わせた後、超純水を添加して5 mLとした溶液を準備した。

[0264] 各サンプル2 mLをねじ口試験管（全長105 mm、口内径 ϕ 10.0 mm、胴径 ϕ 16.5 mm）に入れ、35℃、10分間、水浴でインキュベートした。その後、ねじ口試験管を手を持ち、10秒間、上下に振り、直後の泡の高さを測定した。

[0265] その結果、陰性対照（pHSG398）、および野生型AtGH3-6を発現させた場合と比較して、変異型AtGH3-6（ID61）を発現させた場合には、強い泡立ちが確認された。したがって、N-アシルアミノ酸生産株が生成した $N\alpha$ -アシル-L-グルタミン酸は、界面活性剤用途として利用可能であることが示された。表中のControlは陰性対照を、WTは野生型AtGH3-6を、総 $N\alpha$ -acyl-L-GluはC10、C12、C12:1、C14、C14:1、C16、C16:1のアシル基を有

する $N\alpha$ -アシル-L-グルタミン酸の総濃度を示す。

[0266] [表35]

表 35. 各N-アシルアミノ酸生産株の培養上清を振とう後の泡の高さ

サンプル 番号	菌株 番号	菌株	サンプル中の 総 $N\alpha$ -acyl-L-Glu (g/L)	泡の高さ (mm)
1	3	Control	0.00	1.0 $\pm$ 0.0
2	4	<i>E. coli</i> WT	0.00	4.0 $\pm$ 0.0
3	8	ID61	0.16	16.5 $\pm$ 0.5
4	C12-L-Glu溶液 (対照)		0.16	10.5 $\pm$ 2.5
5	サンプル番号1 + C12-L-Glu溶液 (対照)		0.16	5.5 $\pm$ 1.5
6	9	Control	0.00	4.5 $\pm$ 2.5
7	10	<i>P. ananatis</i> WT	0.02	4.0 $\pm$ 2.0
8	14	ID61	0.79	33.0 $\pm$ 0.0
9	C12-L-Glu溶液 (対照)		0.79	11.0 $\pm$ 1.0
10	サンプル番号6 + C12-L-Glu溶液 (対照)		0.79	16.0 $\pm$ 1.0

産業上の利用可能性

[0267] 本発明は、香粧品素材（特に、界面活性剤）等に利用可能なN-アシルアミノ基含有化合物の製造のために有用である。

配列表フリーテキスト

[0268] 配列番号1および2はそれぞれ、AtGH3-6のアミノ酸配列およびエシェリヒア・コリ発現用にコドン最適化した当該アミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

配列番号3および4はそれぞれ、California bay (*Umbellularia californica*) 由来のmedium-chain acyl-ACP thioesterase (UcTE、GenBank: M94159) のアミノ酸配列（アミノ酸1～83は、輸送ペプチドを示す。）および当該アミノ酸配列における84番目から382番目のアミノ酸残基に開始メチオニンを付与したアミノ酸配列をコードする塩基配列（コドンはエシェリヒア・コリ発現用に最適化されている。）を示す。

配列番号5は、PphoC__SDatcの塩基配列を示す。

配列番号6は、Ptac-RBST7-UcTEoptの塩基配列（ヌク

レオチド7～71はP t a cプロモーターを、ヌクレオチド82～110はR B S T 7を、117～1019はU c T E o p t 遺伝子をそれぞれ示す)を示す。

配列番号7～184は、プライマーの塩基配列を示す。

配列番号185および186はそれぞれ、変異型A t G H 3-6のアミノ酸配列およびエシェリヒア・コリ発現用にコドン最適化した当該アミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

配列番号187は、U c T E の輸送ペプチド (T r a n s i t p e p t i d e) のアミノ酸配列を示す。

請求の範囲

[請求項1]

下記：

(A) 配列番号1のアミノ酸配列において、N101、R117、T122、I123、Y134、L137、V140、S161、V174、Q200、V231、V311、C335、T336、M337、A339、S340、Y344、R350、G379、K388、L390、S455、E483、Q533、およびC576からなる群から選ばれる1以上のアミノ酸残基の変異を含むアミノ酸配列からなる、改変アミノ酸配列；

(B) 前記改変アミノ酸配列において、1もしくは数個の追加のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、もしくは付加を含むアミノ酸配列；または

(C) 前記改変アミノ酸配列において、1以上のアミノ酸残基の追加変異を含み、前記改変アミノ酸配列に対して90%以上の同一性を有するアミノ酸配列

を含み、

配列番号1のアミノ酸配列からなる酵素に対して、下記(i)～(iii)のいずれか一つの特徴が向上したN-アシル化活性を有する改変酵素：

(i) L-グルタミン酸および／またはL-アスパラギン酸に対するN-アシル化活性；

(ii) L-グルタミン酸に対する基質特異性；あるいは

(iii) L-グルタミン酸および／またはL-アスパラギン酸に対するN-アシル化活性、ならびにL-グルタミン酸に対する基質特異性。

[請求項2]

前記変異が、N101S、R117P、T122S、I123T、Y134F、Y134V、L137I、V140I、S161P、V174A、Q200E、V231A、V311A、C335S、T3

36S、M337G、M337A、A339G、S340A、Y344A、Y344G、Y344I、Y344V、R350T、G379D、K388N、L390P、S455T、E483D、Q533R、およびC576Aからなる群から選ばれる1以上のアミノ酸残基の変異を含む、請求項1記載の改変酵素。

[請求項3] 前記N-アシル化活性が、アミノ酸に対するN-アシル化活性である、請求項1または2記載の改変酵素。

[請求項4] 前記アミノ酸に対するN-アシル化活性が、L-グルタミン酸またはL-アスパラギン酸に対するN-アシル化活性である、請求項3記載の改変酵素。

[請求項5] 請求項1～4のいずれか一項記載の改変酵素をコードするポリヌクレオチド。

[請求項6] 請求項5記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

[請求項7] 請求項1～4のいずれか一項記載の改変酵素をコードするポリヌクレオチドの発現単位を含む宿主細胞。

[請求項8] 前期宿主細胞が、下記から選ばれる少なくとも1つ以上の遺伝子改変がされた微生物である、請求項7記載の宿主細胞：

- (1) 脂肪酸供給能強化；
- (2) アミノ酸供給能強化；
- (3) ATP供給能強化；および
- (4) N-アシルアミノ酸分解酵素欠損または弱化。

[請求項9] 前記脂肪酸供給能強化の遺伝子改変が、下記(a)または(b)のいずれか、あるいは下記(a)および(b)の双方である、請求項8記載の宿主細胞：

- (a) アシルCoA合成酵素欠損または弱化；および
- (b) アシル-ACPチオエステラーゼ増強。

[請求項10] 前記宿主細胞が、腸内細菌科に属する細菌である、請求項7～9のいずれか一項記載の宿主細胞。

[請求項11] 腸内細菌科に属する細菌が、エシェリヒア属細菌またはパントエア属細菌である、請求項10記載の宿主細胞。

[請求項12] エシェリヒア属細菌がエシェリヒア・コリであり、パントエア属細菌がパントエア・アナナティスである、請求項11記載の宿主細胞。

[請求項13] 下記：

(A) 配列番号1のアミノ酸配列において、N101、R117、T122、I123、Y134、L137、V140、S161、V174、Q200、V231、V311、C335、T336、M337、A339、S340、Y344、R350、G379、K388、L390、S455、E483、Q533、およびC576からなる群から選ばれる1以上のアミノ酸残基の変異を含むアミノ酸配列からなる、改変アミノ酸配列；

(B) 前記改変アミノ酸配列において、1もしくは数個の追加のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、もしくは付加を含むアミノ酸配列；または

(C) 前記改変アミノ酸配列において、1以上のアミノ酸残基の追加変異を含み、前記改変アミノ酸配列に対して90%以上の同一性を有するアミノ酸配列

を含み、

N-アシル化活性を有し、かつ、

配列番号1のアミノ酸配列からなる酵素に対して、下記(i)～(iii)のいずれか一つの特性が向上したN-アシル化活性を有する改変酵素の存在下において、アミノ基含有化合物およびカルボキシル基含有化合物を反応させて、N-アシルーアミノ基含有化合物またはその塩を生成することを含む、N-アシルーアミノ基含有化合物またはその塩の製造方法：

(i) L-グルタミン酸および／またはL-アスパラギン酸に対するN-アシル化活性；

(i i) L - グルタミン酸に対する基質特異性 ; あるいは
(i i i) L - グルタミン酸および / または L - アスパラギン酸に対する N - アシル化活性、ならびに L - グルタミン酸に対する基質特異性。

[請求項14] 前記改変酵素が精製酵素である、請求項 1 3 記載の方法。

[請求項15] 前記改変酵素の存在下における反応が、前記改変酵素を産生する形質転換微生物またはその処理物を用いて行われる、請求項 1 3 記載の方法。

[請求項16] 前記形質転換微生物が、下記から選ばれる少なくとも 1 つ以上の遺伝子改変がされた微生物である、請求項 1 5 記載の方法 :

- (1) 脂肪酸供給能強化 ;
- (2) アミノ酸供給能強化 ;
- (3) A T P 供給能強化 ; および
- (4) N - アシルアミノ酸分解酵素欠損または弱化。

[請求項17] アミノ基含有化合物およびカルボキシル基含有化合物が、前記形質転換微生物を炭素源の存在下で培養することにより前記形質転換微生物内で生成される、請求項 1 5 または 1 6 記載の方法。

[請求項18] 下記 :

- (1) 脂肪酸供給能強化 ;
- (2) アミノ酸供給能強化 ;
- (3) A T P 供給能強化 ; および
- (4) N - アシルアミノ酸分解酵素欠損または弱化 ;

から選ばれる少なくとも 1 つ以上の遺伝子改変がされ、さらに、カルボキシル基およびアミノ基を A T P 依存的様式において結合させてアミド結合を形成する能力を有する酵素をコードするポリヌクレオチドの発現単位を含む微生物を、炭素源の存在下で培養することを含む、アミノ基含有化合物とカルボキシル基含有化合物がアミド結合した N - アシルアミノ基含有化合物またはその塩の製造方法。

[請求項19] 前記酵素が、G H 3 タンパク質、またはP a a K タンパク質である、請求項18記載の方法。

[請求項20] 前記G H 3 タンパク質が、

(I) 下記：

(A) 配列番号1のアミノ酸配列において、N101、R117、T122、I123、Y134、L137、V140、S161、V174、Q200、V231、V311、C335、T336、M337、A339、S340、Y344、R350、G379、K388、L390、S455、E483、Q533、およびC576からなる群から選ばれる1以上のアミノ酸残基の変異を含むアミノ酸配列からなる、改変アミノ酸配列；

(B) 前記改変アミノ酸配列において、1もしくは数個の追加のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、もしくは付加を含むアミノ酸配列；または

(C) 前記改変アミノ酸配列において、1以上のアミノ酸残基の追加変異を含み、前記改変アミノ酸配列に対して90%以上の同一性を有するアミノ酸配列

を含み、

N-アシル化活性を有し、かつ、

配列番号1のアミノ酸配列からなる酵素に対して、下記(i)～(iii)のいずれか一つの特性が向上したN-アシル化活性を有する改変酵素：

(i) L-グルタミン酸および／またはL-アスパラギン酸に対するN-アシル化活性；

(ii) L-グルタミン酸に対する基質特異性；あるいは

(iii) L-グルタミン酸および／またはL-アスパラギン酸に対するN-アシル化活性、ならびにL-グルタミン酸に対する基質特異性；

あるいは

(i i) 下記 :

(D) 配列番号 1 のアミノ酸配列を含むタンパク質 ;

(E) 配列番号 1 のアミノ酸配列において、 1 もしくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、もしくは付加を含むアミノ酸配列を含み、かつ、 N - アシル化活性を有するタンパク質 ; または

(F) 配列番号 1 のアミノ酸配列に対して 90 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ、 N - アシル化活性を有するタンパク質 ;

からなる群から選ばれる酵素

である、請求項 19 記載の方法。

[請求項21] 脂肪酸供給能強化の遺伝子改変が、下記 (a) または (b) のいずれか、あるいは下記 (a) および (b) の双方である、請求項 18 ~ 20 のいずれか一項記載の方法 :

(a) アシル CoA 合成酵素欠損または弱化 ; および

(b) アシル - ACP チオエステラーゼ増強。

[請求項22] アシル - ACP チオエステラーゼが、ラウロイル - ACP に対するチオエステラーゼ活性を有する、請求項 21 記載の方法。

[請求項23] アシル - ACP チオエステラーゼが、下記から選ばれる、請求項 21 記載の方法 :

(i) (i - 1) 配列番号 3 のアミノ酸配列、または (i - 2) 配列番号 3 のアミノ酸配列における 84 番目から 382 番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含むタンパク質 ;

(i i) (i i - 1) 配列番号 3 のアミノ酸配列、または (i i - 2) 配列番号 3 のアミノ酸配列における 84 番目から 382 番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列において、 1 もしくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、もしくは付加を含むアミノ酸配列を含み、かつ、アシル - ACP チオエステラーゼ活性を有するタンパク質 ; および

(i i i) (i i i - 1) 配列番号 3 のアミノ酸配列、または (i i i - 2) 配列番号 3 のアミノ酸配列における 8 4 番目から 3 8 2 番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列に対して 9 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ、アシルー A C P チオエステラーゼ活性を有するタンパク質。

[請求項24] 炭素源が、糖類である、請求項 1 8 ～ 2 3 のいずれか一項記載の方法。

[請求項25] 糖類が、グルコースである、請求項 2 4 記載の方法。

[請求項26] 前記微生物が、腸内細菌科に属する細菌である、請求項 1 8 ～ 2 5 のいずれか一項記載の方法。

[請求項27] 腸内細菌科に属する細菌が、エシェリヒア属細菌またはパントエア属細菌である、請求項 2 6 記載の方法。

[請求項28] エシェリヒア属細菌がエシェリヒア・コリであり、パントエア属細菌がパントエア・アナナティスである、請求項 2 7 記載の方法。

[請求項29] カルボキシル基含有化合物が、脂肪酸である、請求項 1 3 ～ 2 8 のいずれか一項記載の方法。

[請求項30] 脂肪酸が、炭素原子数 8 ～ 1 8 の脂肪酸である、請求項 2 9 記載の方法。

[請求項31] 脂肪酸が、炭素原子数 1 2 の脂肪酸である、請求項 2 9 記載の方法。

[請求項32] 脂肪酸が、飽和脂肪酸である、請求項 2 9 ～ 3 1 のいずれか一項記載の方法。

[請求項33] アミノ基含有化合物が、アミノ酸であり、前記酵素が、前記アミノ酸に対する N - アシル化活性を有する、請求項 1 3 ～ 3 2 のいずれか一項記載の方法。

[請求項34] アミノ酸が、L - グルタミン酸または L - アスパラギン酸である、請求項 3 3 記載の方法。

[請求項35] カルボキシル基含有化合物が、ラウリン酸であり、N - アシルーア

ミノ基含有化合物が、 $N\alpha$ -ラウロイル-L-グルタミン酸または $N\alpha$ -ラウロイル-L-アスパラギン酸である、請求項13～34のいずれか一項記載の方法。

[請求項36] 下記：

- (1) 脂肪酸供給能強化；
- (2) アミノ酸供給能強化；
- (3) ATP供給能強化；および
- (4) N-アシルアミノ酸分解酵素欠損または弱化；

から選ばれる少なくとも1つ以上の遺伝子改変がされ、さらに、カルボキシル基およびアミノ基をATP依存的様式において結合させてアミド結合を形成する能力を有する酵素をコードするポリヌクレオチドの発現単位を含み、炭素源の存在下で培養することによりN-アシルアミノ基含有化合物またはその塩の生産能を有する微生物。

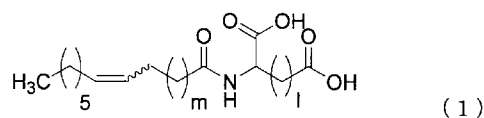
[請求項37] 請求項13～35のいずれか一項記載の方法で製造されたN-アシルアミノ基含有化合物またはその塩を含む界面活性剤。

[請求項38] N-アシルアミノ基含有化合物またはその塩が、炭素原子数10～16のモノ不飽和アシルを有するN-モノ不飽和アシルアミノ基含有化合物またはその塩を含む、請求項37記載の界面活性剤。

[請求項39] 炭素原子数10～16のモノ不飽和アシルを有するN-モノ不飽和アシルアミノ基含有化合物またはその塩を含む界面活性剤。

[請求項40] N-モノ不飽和アシルアミノ基含有化合物が、下記一般式(1)で表される化合物である、請求項37～39のいずれか一項記載の界面活性剤。

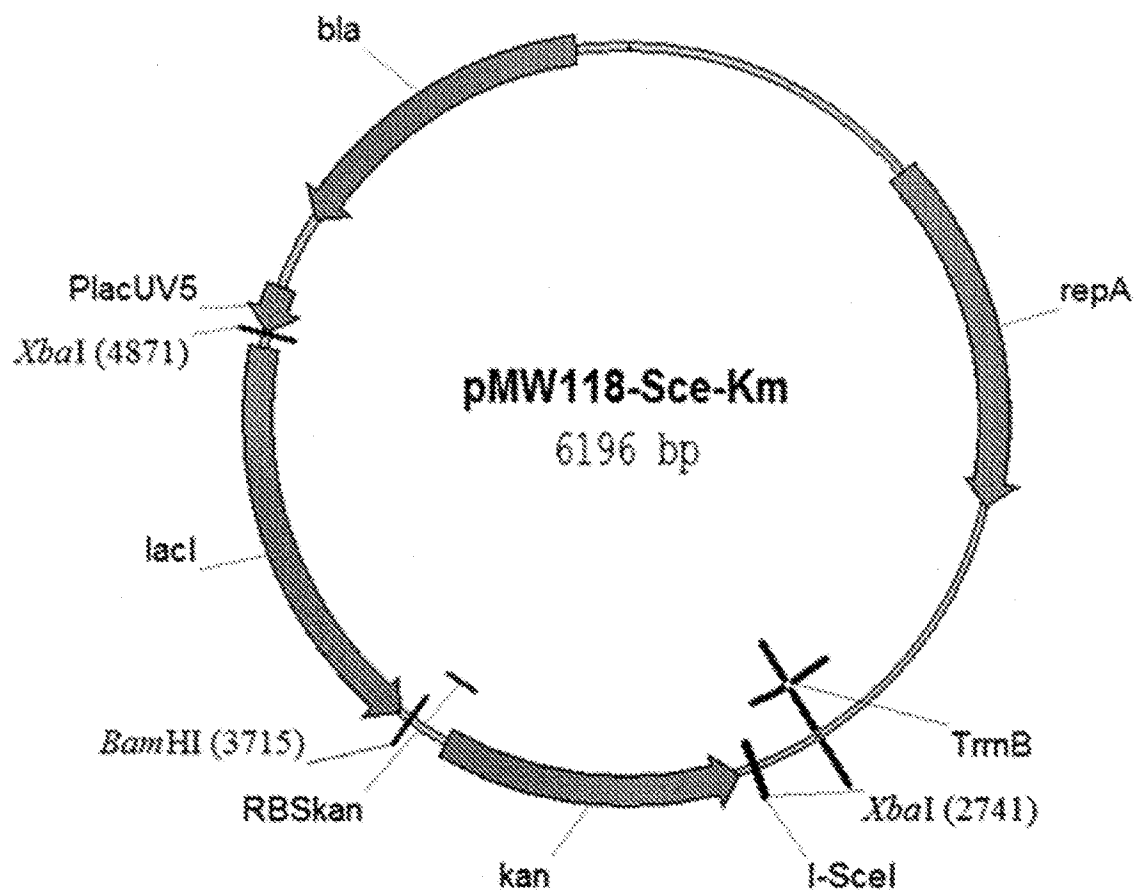
[化1]



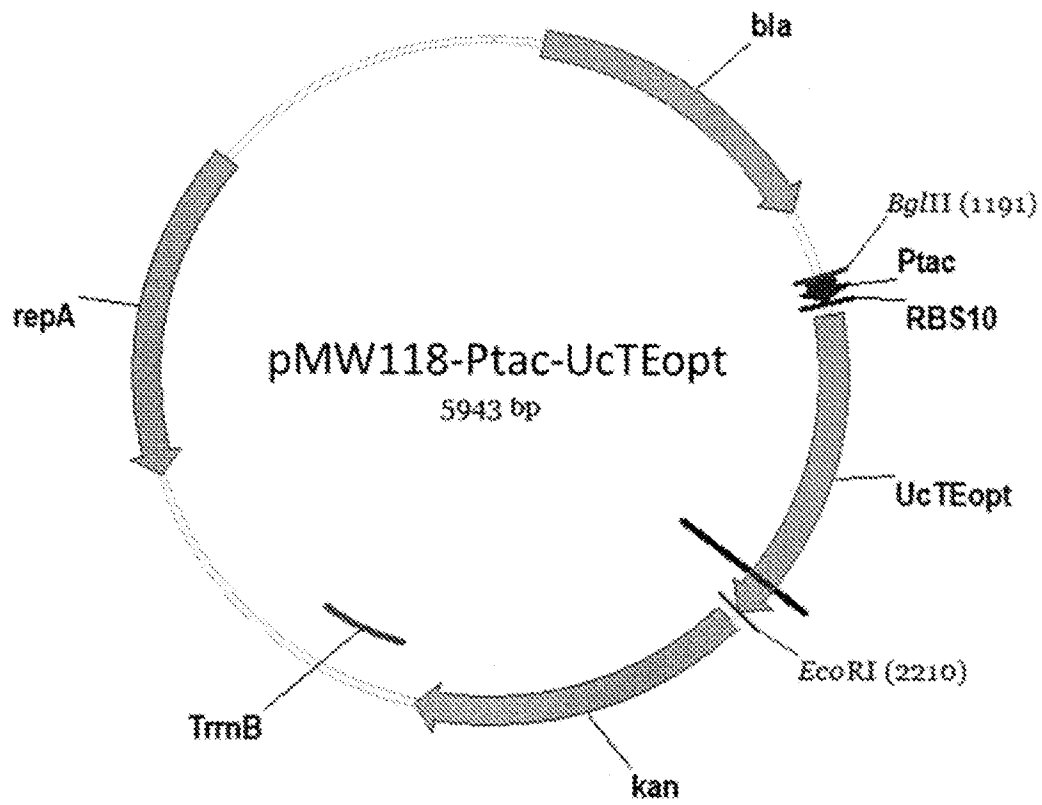
(前記一般式(1)中、 l は、1又は2の整数であり、 m は、0～6の整数である。)

- [請求項41] 前記N－モノ不飽和アシル－アミノ基含有化合物の立体化学が、*cis*である、請求項37～40のいずれか一項記載の界面活性剤。
- [請求項42] 前記N－アシル－アミノ基含有化合物またはその塩が、N－モノ不飽和アシルグルタミン酸またはその塩である、請求項37～41のいずれか一項記載の界面活性剤。
- [請求項43] 成分（A）N－モノ不飽和アシル酸性アミノ酸（ここで、不飽和アシルは、炭素原子数10～16個のアシルである）又はその塩、及び成分（B）N－飽和アシル酸性アミノ酸又はその塩、を含む組成物。

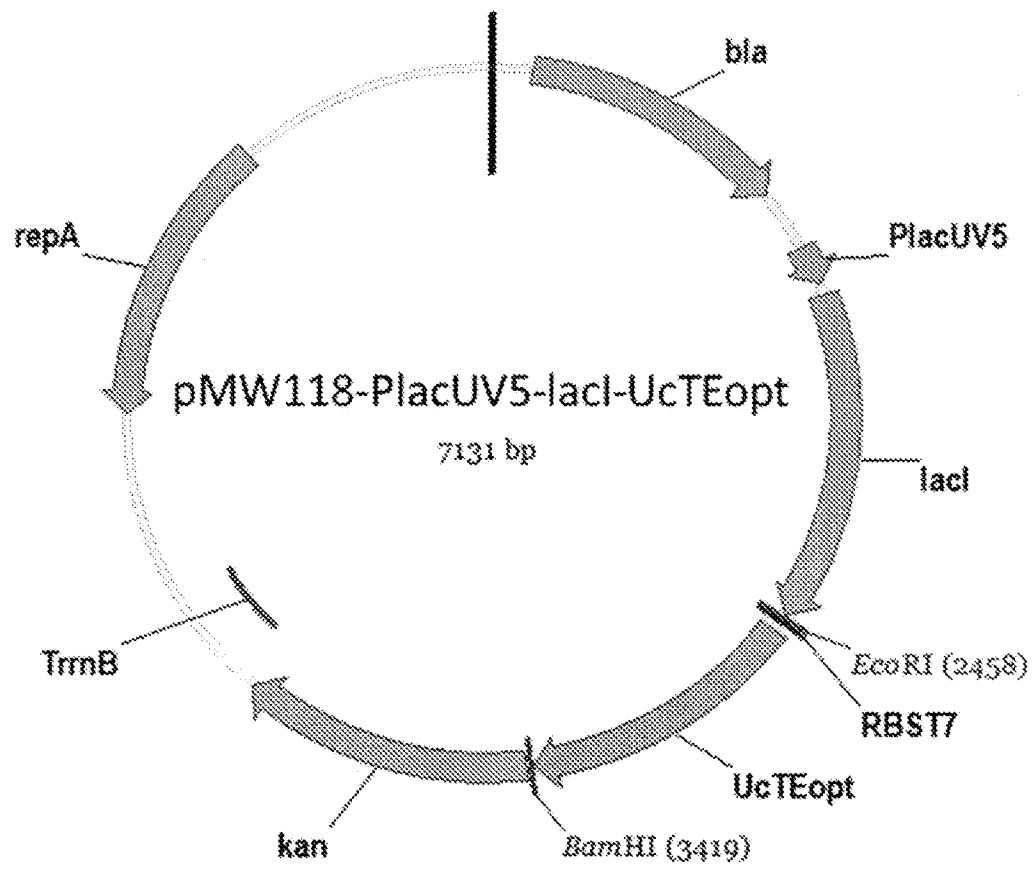
[図1]



[図2]



[図3]



[図4]

(1) AtGH3-6のアミノ酸配列

MPEAPKIAAL EVSDESLAEK NKNKLQFIED VTTNADDVQR RVLEEILSRN ADVEYLKRHG
LEGRTDRETF KHIMPVVITYE DIQPEINRIA NGDKSQVLCS NPISEFLTSS GTSGGERKLM
PTIEEELDRR SLLYSLLMPV MDQFVPGLDK GKGMYFLFIK SESKTPGGLP ARPVLTSYYK
SSHFKNRPYD PYTNYTSPNQ TILCSDSYQS MYSQMLCGLC QHKEVLRVGA VFASGFIRAI
KFLEKHWPEL ARDIRTGTLS SEITDSSVRE AVGEILKPDP KLADFVESEC RKTSWQGIIT
RLWPNTKYVD VIVTGTMSQY IPTLDYYSNG LPLVCTMYAS SECYFGVNLRL PLCKPSEVSY
TLIPNMAYFE FLPVHRNSGV TSSISLPKAL TEKEQQELVD LVDVKLGQY ELVVITYAGL
YRVRVGDVLS VAGFKNNAPQ FSFICRKNV LSIDS DKTDE VELQNAVKNA VTHLVFPDAS
LSEYTSYADT SSIPGHYVLF WELCLNGNTP IPPSVFEDCC LTIEESLNSV YRQGRVSDKS
IGPLEIKMVE SGTFDKLMY AISLGASINQ YKTPRCVKFA PIIELLNSRV VDSYFSPKCP
KWSPGHKQWG SN (配列番号1)

(2) UcTEのアミノ酸配列

MATTSLASAF CSMKAVMLAR DGRGMKPRSS DLQLRAGNAP TSLKMINGTK FSYTESLKRL
PDWSMLFAVI TTIFSAAEKQ WTNLEWKPKP KLPQLDDHF GLHGLVFRRT FAIRSYEVGP
DRSTSILAVM NHMQEATLNH AKSVGILGDG FGTTLEMSKR DLMWVVRTH VAVERYPTWG
DTVEVECWIG ASGNNGMRRD FLVRDCKTGE ILTRCTSLSV LMNTRTRRLS TIPDEVGEI
GPAFIDNVAV KDDEIKKLQK LNDSTADYIQ GGLTPRWNDL DVNQHVNNLK YVAWVFETVP
DSIFESHHS SFTLEYRREC TRDSVLRSLT TVSGGSSEAG LVCDHLLQLE GGSEVLRART
EWRPKLTDSF RGISVIPAEF RV (配列番号3)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2020/038340

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P 13/02(2006.01)i; C12N 15/09(2006.01)i; C12N 15/29(2006.01)i; C12N 15/54(2006.01)i; C12N 9/10(2006.01)i

FI: C12N15/09 Z ZNA; C12P13/02; C12N15/29; C12N15/54; C12N9/10

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)

C12P13/02; C12N15/09; C12N15/29; C12N15/54; C12N9/10

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	1971-2020
Registered utility model specifications of Japan	1996-2020
Published registered utility model applications of Japan	1994-2020

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN); UniProt/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2018/0127791 A1 (SCHAFFER, Steffen, et al.) 10 May 2018 (2018-05-10) paragraphs [0004]-[0005], [0008]-[0010], [0061], [0079]-[0080], examples	18, 21, 24-43
Y	paragraphs [0004]-[0005], [0008]-[0010], [0061], [0079]-[0080], examples	8-17, 19-43
X	WESTFALL, Corey S. et al., "Modulating plant hormones by enzyme action: the GH3 family of acyl acid amido synthetases", Plant Signal. Behav., 2010, 5:12, pp. 1607-1612 table 1	1-7, 10-12
Y	table 1	8-17, 19-43
A	STASWICK, Paul E. et al., "Characterization of an Arabidopsis enzyme family that conjugates amino acids to indole-3-acetic acid", Plant Cell, 2005, vol. 17, pp. 616-627 abstract	1-43
A	JP 2018-085969 A (TOYAMA PREFECTURAL UNIVERSITY) 07 June 2018 (2018-06-07)	1-43



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
03 December 2020 (03.12.2020)

Date of mailing of the international search report
15 December 2020 (15.12.2020)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2020/038340

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 6-022776 A (CCI CORP.) 01 February 1994 (1994-02-01)	1-43
P, X	WO 2019/198367 A1 (AJINOMOTO CO., INC.) 17 October 2019 (2019-10-17) examples	1-43

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2020/038340

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
US 2018/0127791 A1	10 May 2018	WO 2016/165968 A1 EP 3081639 A1 EP 3283621 A1	
JP 2018-085969 A	07 Jun. 2018	(Family: none)	
JP 6-02776 A	01 Feb. 1994	(Family: none)	
WO 2019/198367 A1	17 Oct. 2019	(Family: none)	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12P 13/02(2006.01)i; C12N 15/09(2006.01)i; C12N 15/29(2006.01)i; C12N 15/54(2006.01)i; C12N 9/10(2006.01)i FI: C12N15/09 Z ZNA; C12P13/02; C12N15/29; C12N15/54; C12N9/10		
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）） C12P13/02; C12N15/09; C12N15/29; C12N15/54; C12N9/10		
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 1971-2020年 日本国実用新案登録公報 1996-2020年 日本国登録実用新案公報 1994-2020年		
国際調査で利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); CAlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN); UniProt/GeneSeq		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	US 2018/0127791 A1 (SCHAFER Steffen, et al.) 10.05.2018 (2018-05-10) 0004-0005, 0008-0010, 0061, 0079-0080, EXAMPLES	18, 21, 24-43
Y	0004-0005, 0008-0010, 0061, 0079-0080, EXAMPLES	8-17, 19-43
X	WESTFALL, Corey S. et al., Modulating plant hormones by enzyme action: the GH3 family of acyl acid amido synthetases, Plant Signal. Behav., 2010, 5:12, pp.1607-1612 Table 1	1-7, 10-12
Y	Table 1	8-17, 19-43
A	STASWICK, Paul E. et al., Characterization of an Arabidopsis enzyme family that conjugates amino acids to indole-3-acetic acid, Plant Cell, 2005, Vol. 17, pp.616-627 要約	1-43
A	JP 2018-085969 A (公立大学法人 富山県立大学) 07.06.2018 (2018-06-07)	1-43
A	JP 6-022776 A (シーシーアイ株式会社) 01.02.1994 (1994-02-01)	1-43
☒ 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	“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	
“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		
国際調査を完了した日 03.12.2020	国際調査報告の発送日 15.12.2020	
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） 高山 敏充 4B 4153 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, X	W0 2019/198367 A1 (味の素株式会社) 17.10.2019 (2019 - 10 - 17) 実施例	1-43

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/JP2020/038340

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
US	2018/0127791	A1	10.05.2018	WO	2016/165968	A1	
				EP	3081639	A1	
				EP	3283621	A1	
JP	2018-085969	A	07.06.2018	(ファミリーなし)			
JP	6-022776	A	01.02.1994	(ファミリーなし)			
WO	2019/198367	A1	17.10.2019	(ファミリーなし)			