

(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
2017年9月28日(28.09.2017)



(10) 国際公開番号

WO 2017/163518 A1

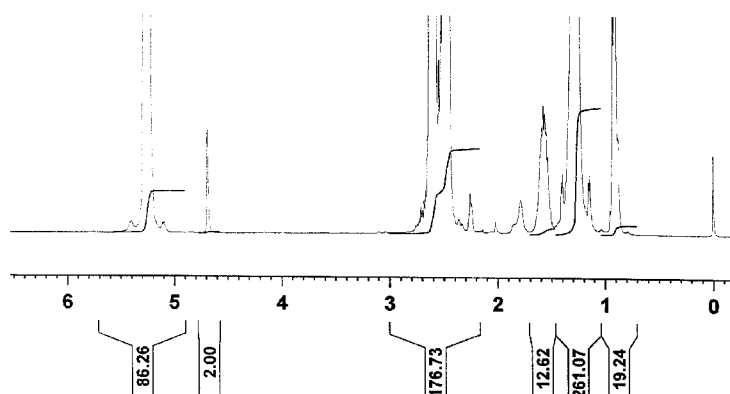
- (51) 国際特許分類:
C12P 7/42 (2006.01) C08G 63/78 (2006.01)
C08G 63/00 (2006.01) C08G 63/82 (2006.01)
C08G 63/685 (2006.01) C12P 7/62 (2006.01)
C08G 63/688 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/088424
- (22) 国際出願日: 2016年12月22日(22.12.2016)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2016-062278 2016年3月25日(25.03.2016) JP
- (71) 出願人: 株式会社カネカ(KANEKA CORPORATION) [JP/JP]; 〒5308288 大阪府大阪市北区中之島二丁目3番18号 Osaka (JP).
- (72) 発明者: 小林 新吾(KOBAYASHI, Shingo); 〒6768688 兵庫県高砂市高砂町宮前町1-8 株式会社カネカ内 Hyogo (JP). 藤木 哲也(FUJIKI, Tetsuya); 〒6768688 兵庫県高砂市高砂町宮前町1-8 株式会社カネカ内 Hyogo (JP).
- (74) 代理人: 植木 久一, 外(UEKI, Kyuichi et al.); 〒5300003 大阪府大阪市北区堂島2丁目1番16号 フジタ東洋紡ビル9階 Osaka (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, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, 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).

[続葉有]

(54) Title: POLYHYDROXYALKANOIC ACID HAVING FUNCTIONAL GROUP AT TERMINAL CARBOXYL GROUP AND METHOD FOR PRODUCING SAME

(54) 発明の名称: カルボキシ末端に官能基を有するポリヒドロキシルアルカン酸とその製造方法

[図1]



(57) Abstract: Provided are: a novel polyhydroxyalkanoic acid which has a functional group at a terminal carboxy group, and which is able to be chemically modified, while being easily controlled in terms of reaction; and a method for producing this polyhydroxyalkanoic acid. A polyhydroxyalkanoic acid according to the present invention is obtained by introducing a specific alkyne group, alkene group, thiol group, azide group or allyl group into a terminal carboxy group. A production method according to the present invention comprises a step wherein a microorganism that is capable of producing a polyhydroxyalkanoic acid is cultured with use of an alcohol that has an alkyne group, an alkene group, a thiol group, an azide group or an allyl group.

(57) 要約: 化学修飾可能でその反応制御が容易な、カルボキシ末端に官能基を有する新規のポリヒドロキシルアルカン酸とその製造方法を提供する。本発明のポリヒドロキシルアルカン酸は、カルボキシ末端に、特定のアルキン基、アルケン基、チオール基、アジド基またはアリル基が導入されたものである。また本発明の製造方法は、アルキン基、アルケン基、チオール基、アジド基またはアリル基を有するアルコールを用いて、ポリヒドロキシルアルカン酸を生産可能な微生物を培養する工程を含む。



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：

カルボキシ末端に官能基を有するポリヒドロキシアリカン酸とその製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、カルボキシ末端に官能基を有する新規なポリヒドロキシアリカン酸とその製造方法に関する。特に、3位にヒドロキシ基を有する微生物産生のR-3-ヒドロキシアリカン酸の単独ポリマーまたは共重合ポリマー〔ポリ(R-3-ヒドロキシアリカン酸)〕とその製造方法に関する。

背景技術

[0002] ポリヒドロキシアリカン酸（以下、「PHA」と略す）は、多くの微生物種の細胞内にエネルギー貯蔵物質として生産、蓄積される熱可塑性ポリエステルである。微生物によって様々な天然の炭素源から生産されるPHAは、土中や水中の微生物により完全に生分解されるため、自然界の炭素循環プロセスに取り込まれる。従って、PHAは生態系への悪影響がほとんどない環境調和型のプラスチックであると言える。近年、環境汚染、廃棄物処理、石油資源の観点から、合成プラスチックによる社会問題が深刻になるに伴って、PHAが環境にやさしいグリーンプラスチックとして注目され、その実用化が切望されている。

[0003] 微生物中に最初に発見されたPHAは、3-ヒドロキシ酪酸（以下、「3HB」と略す）のホモポリマーであるポリヒドロキシブチレート（以下、「PHB」と略す）である。PHBは高結晶性であり、結晶化度が高いため硬くて脆く、しかも融点付近の温度（180℃）で速やかに熱分解するため、溶融加工性が低く実用範囲は極めて限られるという問題を有している。

[0004] そこで、PHBの結晶化度を下げて脆性を改善するため、他の3-ヒドロキシアリカン酸をPHB骨格中に導入する試みがなされた。例えば、3-ヒドロキシプロピオン酸（以下、「3HP」と略す）、4-ヒドロキシ酪酸（

以下、「4HB」と略す）、5-ヒドロキシ吉草酸（以下、「5HV」と略す）などの側鎖を持たない直鎖状モノマーや、乳酸、3-ヒドロキシ吉草酸（以下、「3HV」と略す）、3-ヒドロキシヘキサン酸（以下、「3HHx」と略す）などの側鎖を有するモノマーについて、PHB骨格への導入がこれまでに報告されている。導入するモノマーの種類やその共重合比率によって得られるPHAの物性は大きく変化するが、基本的にどのモノマーを導入してもPHBの結晶化度が低下するため、PHBと比べて溶融加工性が改善する。

[0005] PHAの用途をさらに広げるためには、上記のようなPHAとは大きく異なる物性を有する新たなPHAを生産する技術開発が必要である。そのためには、単純にPHA主鎖の長さや直鎖の大きさを変化させるだけではなく、PHAの側鎖やカルボキシ末端に何らかの官能基を導入することが有効と考えられる。

[0006] これまでに、PHAの側鎖に官能基を導入した例として、特許文献1では炭素数6～14の中鎖PHAの側鎖にチオエステルを導入したことが報告されている。また、非特許文献1には、炭素数6～14の中鎖PHAの側鎖に、分岐鎖アルキル基、シクロヘキシル基、ハロゲン化アルキル、アセトキシ基、エステル、アルコキシ基、エポキシ基、チオール基、シアノ基、ニトロ基、フェニル基やベンゾイル基などの芳香環化合物を導入した例がまとめられている。

[0007] これら官能基の導入は、PHAの物性を大きく変化させるだけでなく、上記官能基を更に化学的に修飾するための反応起点を付与する点でも重要である。例えば非特許文献3では、チオール-エンクリック反応を用いて、PHA側鎖の二重結合に蛍光物質やペプチドを修飾したことが報告されている。また非特許文献4では、チオール-エンクリック反応を用いて、PHA側鎖の二重結合にヒドロキシ基やカルボキシ基を導入し、PHAの撥水性を変化させたことが報告されている。さらに非特許文献4では多分岐構造化合物と反応させることで、PHAを架橋できたことも報告されている。さらに非特

許文献5では、側鎖にアジド基を有するPHAを生産し、アルキン-アジドクリック反応を用いて上記側鎖を修飾した例が報告されている。

[0008] このようにPHAに官能基を導入し、それを標的に化学修飾する方法は、PHAの物性を変化させる上で有用である。しかしながら、上記のようにPHA側鎖の官能基を用いる場合、反応制御が非常に難しい。例えば上記多分岐構造化合物を用いて架橋する場合、架橋点が多いとPHAはゲル化してしまうが、架橋点が少ないと架橋による物性改変の効果が得られない。また、1分子のPHA鎖上に複数の反応基が存在することで、反応後の生成物は多様な化合物の混合物になってしまうという課題も有していた。

[0009] 一方、非特許文献6には、PHAのカルボキシ末端に官能基を導入した例が報告されている。詳細には非特許文献6には、I V型PHA合成酵素遺伝子を有する*Bacillus*属微生物を1, 3-プロパンジオール、2-プロピン-1-オール、3-メルカプト-1-プロパノール、ベンジルアルコールの存在下で培養すると、PHBのカルボキシ末端に1-プロパノール基、1-プロピニル基、1-プロパンチオール基、ベンジル基が導入されて、これらの非存在下で培養した場合に比べて分子量が低下することが報告されている。更に上記非特許文献6には、2-プロペン-1-オールや3-ブチン-1-オールの存在下で培養しても、分子量低下は観察されなかったことも報告されている。

先行技術文献

特許文献

[0010] 特許文献1: WO2012/038572

非特許文献

[0011] 非特許文献1: Marta Tortajada, Luiziana Ferreira da Silva, Maria Auxiliadora Prieto, *International Microbiology*, vol. 16, pp. 1-15, 2013

非特許文献2: Henry E. Valentin, Pierre A.

Berger, Kenneth J. Gruys, Maria Filomena de Andrade Rodrigues, Alexander Steinbuchel, Munhtien Tran, Jawed Asrar, *Macromolecules*, vol. 32, pp. 7389–7395, 1999

非特許文献3: Kenji Tajima, Kosuke Iwamoto, Yasuharu Sato, Ryosuke Sakai, Toshifumi Satoh, Tohru Daiiri, *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 100, pp. 4375–4383, 2016

非特許文献4: Alex C. Levine, Graham W. Heberlig, Christopher T. Nomura, *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 83, pp. 358–365, 2016

非特許文献5: Atahualpa Pinto, Jsessica H. Ciesla, Adriana Paulucci, Bradley P. Sutliff, Christopher T. Nomura, *ACS Macro Letters*, Vol. 5, pp. 215–219, 2016

非特許文献6: Manami Hyakutake, Satoshi Tomizawa, Imai Sugahara, Emi Murata, Kouhei Mizuno, Hideki Abe, Takeharu Tsuge, *Polymer Degradation and Stability*, vol. 117, pp. 90–96, 2015

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0012] 前述したとおり非特許文献6にはPHAのカルボキシ末端に官能基が導入

された化合物が記載されているが、実際に製造できたのは僅か4つであり、例えばアルキニル基についてプロピニル基は導入できたがブチニル基は導入できなかったことが記載されている。本発明の課題は、化学修飾可能でその反応制御が容易な、カルボキシ末端に官能基を有する各種新規のPHAを製造できる方法、およびこうした従来製造ではなかったPHAを提供することである。

課題を解決するための手段

[0013] 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、PHAの側鎖ではなくカルボキシ末端に特定の官能基を含有するPHAの製造に成功し、本発明を完成するに至った。

本発明の詳細は以下のとおりである。

1. 繰り返し単位が下記一般式(1)



(式中、 R^1 は C_nH_{2n+1} で表されるアルキル基であり、 n は1～15の整数であり、*は不斉であることを表す。)

で示されるR-3-ヒドロキシアリカン酸の単独又は共重合ポリマーであって、該ポリマーが単独ポリマーであるか共重合ポリマーであるかに応じて、カルボキシ末端に以下に示す基が結合しているポリヒドロキシアリカン酸。

(1) 単独ポリマーである時にカルボキシ末端に結合する基

炭素数4～8のアルキニル基、

炭素数3～8のアルケニル基、

炭素数2、4～8のメルカプトアルキル基、

炭素数3～8のアジド化アルキル基、または

アルキル基の炭素数が2～6のアリル(ポリ)オキシアリル基

(2) 共重合ポリマーである時にカルボキシ末端に結合する基

炭素数3～8のアルキニル基、

炭素数3～8のアルケニル基、

炭素数2～8のメルカプトアルキル基、

炭素数3～8のアジド化アルキル基、または

アルキル基の炭素数が2～6のアリル（ポリ）オキシアルキル基

2. カルボキシ末端に、アルキン基（アルキニル基と同義）、アルケン基（アルケニル基と同義）、チオール基（メルカプト基）またはアジド基が導入された微生物産生ポリヒドロキシアルカン酸であり、

前記ヒドロキシアルカン酸が3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキプロピオン酸、4-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ吉草酸、5-ヒドロキシ吉草酸、3-ヒドロキシヘキサン酸、6-ヒドロキシヘキサン酸、3-ヒドロキシヘプタン酸、3-ヒドロキシオクタン酸、3-ヒドロキシノナン酸、3-ヒドロキシデカン酸、3-ヒドロキシウンデカン酸、3-ヒドロキシドデカン酸から選ばれる複数種で構成されているポリヒドロキシアルカン酸。

3. カルボキシ末端に、アルキン基、アルケン基、チオール基またはアジド基が導入された微生物産生ポリヒドロキシアルカン酸であり、

前記ヒドロキシアルカン酸が3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキプロピオン酸、4-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ吉草酸、5-ヒドロキシ吉草酸、3-ヒドロキシヘキサン酸、6-ヒドロキシヘキサン酸、3-ヒドロキシヘプタン酸、3-ヒドロキシオクタン酸、3-ヒドロキシノナン酸、3-ヒドロキシデカン酸、3-ヒドロキシウンデカン酸、3-ヒドロキシドデカン酸から選ばれる単一種で構成されており、

前記アルキン基が、ブチニル基、ペンチニル基、又はヘキシニル基であり、

前記アルケン基が、プロペニル基、ブテニル基、ペンテニル基、又はヘキセニル基であり、

前記チオール基が、メルカプトエチル基、メルカプトブチル基、メルカプトペンチル基、又はメルカプトヘキシル基であるポリヒドロキシアルカン酸。

4. モノマーユニットとして少なくとも3-ヒドロキシ酪酸を含む上記1～3のいずれかに記載のポリヒドロキシアルカン酸。

5. モノマーユニットとしてさらに3-ヒドロキシヘキサン酸を含む上記4に記載のポリヒドロキシルアルカン酸。

6. 上記1～5のいずれかに記載のポリヒドロキシルアルカン酸を製造する方法であって、

アルキン基、アルケン基、チオール基、アジド基、またはアリル基を有するアルコールを用いて、ポリヒドロキシルアルカン酸を生産可能な微生物を培養する工程を含む、カルボキシ末端に、アルキン基、アルケン基、チオール基、アジド基、又はアリル基が導入されたポリヒドロキシルアルカン酸の製造方法。

7. アルキン基、アルケン基、チオール基、アジド基、またはアリル基を有する炭素数2～8のアルコールを用いて、ポリヒドロキシルアルカン酸を生産可能な*Cupriavidus*属に属する微生物を培養する工程を含む、カルボキシ末端に、アルキン基、アルケン基、チオール基、アジド基、又はアリル基が導入されたポリヒドロキシルアルカン酸の製造方法。

8. 前記アルコールが第一級アルコールである上記6または7に記載の製造方法。

9. 前記微生物が、*Aeromonas*属、*Ralstonia*属または*Pseudomonas*属由来のポリヒドロキシルアルカン酸合成酵素をコードする遺伝子を有する微生物である上記6～8のいずれかに記載の製造方法。

10. 前記微生物が、*Cupriavidus*属に属する微生物である上記8または9に記載の製造方法。

11. 前記微生物が、*Cupriavidus necator*を宿主とする形質転換体である上記7または10に記載の製造方法。

12. 上記1～5のいずれかに記載のポリヒドロキシルアルカン酸の末端のアルキン基、アルケン基、チオール基、アジド基、またはアリル基がさらに化学修飾された化合物。

13. 上記1～5のいずれかに記載のポリヒドロキシルアルカン酸、または

上記 1 2 に記載の化合物を含有する成形体。

発明の効果

[0014] 本発明によれば、カルボキシ末端に特定の官能基を有する全く新規の P H A を製造することができる。本発明の P H A は、フィルムやシートなどの成形体を製造するための添加剤として使用することで従来の P H A の物性改善が期待できるだけでなく、上記官能基をさらに化学修飾することで多様な構造体への誘導が可能であると考えられる。

図面の簡単な説明

[0015] [図1]図 1 は、実施例 8 の¹H-NMR チャートである。

[図2]図 2 は、実施例 1 6 の¹H-NMR チャートである。

[図3]図 3 は、比較例 1 の¹H-NMR チャートである。

発明を実施するための形態

[0016] 以下、本発明について、さらに詳細に説明する。

[0017] 本発明の P H A は、繰り返し単位が下記一般式 (1)



(式中、R¹はC_nH_{2n+1}で表されるアルキル基であり、nは1～15の整数であり、*は不斉炭素であることを表す。)

で示される R-3-ヒドロキシアリカン酸 (以下、「3 H A」と略す) の単独又は共重合ポリマー (以下、これらのポリマーを「P 3 H A」と略す) であって、P 3 H A が単独ポリマーであるか共重合ポリマーであるかに応じて、カルボキシ末端に以下に示す基が結合しているものである。好ましくは該カルボキシ基を含むエステル結合に以下の基が結合しており、P H A の末端に、三重結合、二重結合、メルカプト基 (チオール基)、アリル基を有するものである。

(1) 単独ポリマーである時にカルボキシ末端に結合する基

炭素数 4～8 のアルキニル基、炭素数 3～8 のアルケニル基、炭素数 2、4～8 のメルカプトアルキル基、炭素数 3～8 のアジド化アルキル基、またはアルキル基の炭素数が 2～6 のアリル (ポリ) オキシアリル基

(2) 共重合ポリマーである時にカルボキシ末端に結合する基

炭素数3～8のアルキニル基、炭素数3～8のアルケニル基、炭素数2～8のメルカプトアルキル基、炭素数3～8のアジド化アルキル基、またはアルキル基の炭素数が2～6のアリル（ポリ）オキシアルキル基

[0018] なお、前述した非特許文献6には、上記一般式(1)において $n=1$ である3HBのホモポリマーであって、そのカルボキシ末端にプロピニル基（炭素数3のアルキニル基）およびメルカプトプロピル基（炭素数3のアルキル基を有するチオール基）が開示されているに過ぎず、本発明とは官能基の種類が相違する。また、両者は使用する微生物種が相違する。

[0019] すなわち本発明のPHAは、3HAを主要モノマーユニットとし、P3HAと称される、微生物から生産されるポリエステル樹脂である。本発明のPHAを構成するモノマーユニットとしては、例えば3HB（上記一般式(1)において、 C_nH_{2n+1} で表されるアルキル基 R^1 の $n=1$ ）、3HV（ $n=2$ ）、3HHx（ $n=3$ ）、3-ヒドロキシヘプタン酸（ $n=4$ ）、3-ヒドロキシオクタン酸（ $n=5$ ）、3-ヒドロキシノナン酸（ $n=6$ ）、3-ヒドロキシデカン酸（ $n=7$ ）、3-ヒドロキシウンデカン酸（ $n=8$ ）、3-ヒドロキシドデカン酸（ $n=9$ ）などが挙げられる。

[0020] 本発明のPHAにおけるモノマーユニットは、単一種で構成されていても良いし、複数種で構成されていても良い。複数種のモノマーユニットを含む場合、2種類以上の3HAを共重合させたものであってもよいし、1種または2種以上の3HAに対し、4HB等の4-ヒドロキシアルカン酸を共重合させたものであってもよい。本発明のPHAとしては、モノマーユニットとして、少なくとも3HBを含んでいることが好ましい。本発明のPHAは、モノマーユニットとして上記3HBのみからなるPHBであってもよく、3HBとその他のモノマーユニットからなる共重合体であっても良い。3HB以外のモノマーユニットとして、前述したモノマーユニットのほか、3HP、4HB、5HV、6-ヒドロキシヘキサン酸（6-hydroxyhexanoate；以下、「6HHx」と略す）などが挙げられる。このよう

な共重合体の例として、 $3HHx$ をさらに有する $Poly(3HB-co-3HHx)$ （以下、「PHBH」と略す）、 $3HV$ をさらに有する $Poly(3HB-co-3HV)$ 、 $4HV$ をさらに有する $Poly(3HB-co-4HV)$ などが挙げられる。これらのうちPHBHが好ましい。

[0021] 本発明のPHAが共重合体である場合の各モノマーユニットの共重合比率は特に限定されないが、 $3HB$ をモノマーユニットとして含有する場合、その共重合比率は、50モル%以上であることがより好ましく、60モル%以上であることがさらに好ましく、70モル%以上であることが一層好ましく、80モル%以上であることが特に好ましい。また本発明のPHAがPHBHである場合、 $3HHx$ 共重合比率の下限は、1モル%が好ましく、2モル%がより好ましく、3モル%がさらに好ましい。またその上限は、20モル%が好ましく、15モル%がより好ましく、12モル%がさらに好ましい。

[0022] 上述したように本発明のPHAは、ポリマー主鎖のカルボキシ末端に、特定の官能基としてアルキニル基、アルケニル基、チオール基（メルカプト基）、アジド基、またはアリル基が導入されていることを特徴とする。本発明のPHAのカルボキシ末端は、アルキル鎖を介してアルキニル基、アルケニル基、チオール基、アジド基を有しており、またオキシアルキル鎖を介してアリル基を有する。

[0023] 上記炭素数3～8のアルキニル基として、直鎖状または分岐状のプロピニル基、ブチニル基、ペンチニル基、ヘキシニル基、ヘプチニル基、オクチニル基が挙げられる。分岐はない方、すなわち直鎖が好ましい。炭素数は3～6であることが好ましく、なかでもプロピニル基、ブチニル基、ヘキシニル基が好ましい例として挙げられる。

[0024] 上記炭素数3～8のアルケニル基として、直鎖状または分岐状のプロペニル基、ブテニル基、ペンテニル基、ヘキセニル基、ヘプテニル基、オクテニル基が挙げられる。分岐はない方、すなわち直鎖が好ましい。炭素数は3～6であることが好ましく、なかでもプロペニル基、ブテニル基、ヘキセニル基が好ましい例として挙げられる。

- [0025] 上記炭素数2～8のメルカプトアルキル基として、直鎖状または分岐状のメルカプトエチル基、メルカプトプロピル基、メルカプトブチル基、メルカプトペンチル基、メルカプトヘキシル基、メルカプトヘプチル基、メルカプトオクチル基が挙げられる。分岐はない方、すなわち直鎖が好ましい。炭素数は2～6であることが好ましく、3～6であることがより好ましい。例えばメルカプトエチル基、メルカプトプロピル基が好ましい例として挙げられる。
- [0026] 上記炭素数3～8のアジド化アルキル基として、直鎖状または分岐状のアジド化プロピル基、アジド化ブチル基、アジド化ペンチル基、アジド化ヘキシル基、アジド化ヘプチル基が挙げられる。分岐はない方、すなわち直鎖が好ましい。炭素数は3～6であることが好ましく、なかでもアジド化プロピル基、アジド化ブチル基が好ましい例として挙げられる。
- [0027] アルキル基の炭素数が2～6のアリル（ポリ）オキシアルキル基として、オキシアルキルを1～3有するものが挙げられ、好ましくは1である。オキシアルキル基としては例えばオキシエチル基、オキシプロピル基、オキシブチル基、オキシペンチル基、オキシヘキシル基が挙げられ、なかでもオキシエチル基、オキシプロピル基、オキシブチル基が好ましい例として挙げられる。分岐はない方、すなわち直鎖が好ましい。アリル（ポリ）オキシアルキル基の総炭素数は2～6であることが好ましく、例えばアリルオキシエチル基、アリルオキシプロピル基、アリルオキシブチル基が挙げられる。
- [0028] 本発明のPHAは上記の通り特定の官能基をカルボキシル基末端に有していることを特徴とするが、ポリマー側鎖にもさらに官能基を有していてもかまわない。但し、本発明のPHAをさらに化学修飾して新たな誘導体を合成する場合には、反応制御の観点からカルボキシル基末端にのみ官能基を有しているのが好ましい。
- [0029] 本発明のPHAの分子量は限定されないが、下記本発明の製造方法を利用する場合、比較的低分子量のPHAが得られる傾向がある。例えば重量平均分子量 (M_w) として、5000～20000000程度、使用目的によって

は8000～300000程度やさらに10000～100000程度であっても差し支えない。また数平均分子量 (M_n) として3000～1500000程度、使用目的によっては5000～1000000程度やさらに7000～800000程度であっても差し支えない。

[0030] 上述した本発明のPHAを生産する方法としては、上記特定の官能基をカルボキシ末端に導入できるよう、上記アルキニル基、アルケニル基、チオール基、アジド基、またはアリル基を有するアルコールを用いてPHAを合成可能な微生物（以下、「本発明の微生物」と言う）を培養する方法（以下、「本発明の製造方法」と言う）が挙げられる。前記アルコールとしては、第一級アルコールが好ましい。

[0031] このようなアルコールとしては、例えば2-プロピン-1-オール、3-ブチン-1-オール、4-ペンチン-1-オール、5-ヘキシン-1-オール；2-プロペン-1-オール、3-ブテン-1-オール、4-ペンテン-1-オール、5-ヘキセン-1-オール；2-メルカプトエタノール、3-メルカプトプロパノール、4-メルカプトブタノール、5-メルカプトペンタノール、6-メルカプトヘキサノール；4-アジドブタン-1-オール、5-アジドペンタン-1-オール、6-アジドヘキサン-1-オール；エチレングリコールモノアリルエーテル、プロピレングリコールモノアリルエーテル、テトラメチレングリコールモノアリルエーテル、ペンタメチレングリコールモノアリルエーテルなどが挙げられる。なかでも、2-プロペン-1-オール、3-ブテン-1-オール、5-ヘキセン-1-オール、2-プロピン-1-オール、3-ブチン-1-オール、5-ヘキシン-1-オール、2-メルカプトエタノール、3-メルカプトプロパノール、エチレングリコールモノアリルエーテルなどが好ましい例として挙げられる。これ以外にも、アルキル鎖部分に分岐構造を有するアルコールや、ヒドロキシ基を複数有するアルコール、あるいはアルキニル基、アルケニル基、チオール基、アジド基、またはアリル基を複数有するアルコールを使用しても良い。また、これらのアルコールは、単独種で使用しても良いし、複数種を併用しても良い。

。

[0032] 本発明の製造方法では、微生物菌体内でのPHA合成における連鎖移動反応において、上記アルコールが停止剤として機能していると考えられる。その場合、どのようなアルコールが停止剤として機能するのかは、本発明の微生物が有するPHA合成酵素のアルコールに対する基質特異性に依存する。本発明の製造方法においては、上記本発明の微生物が、*Aeromonas* (アエロモナス) 属、*Ralstonia* (ラルストニア) 属または*Pseudomonas* (シュードモナス) 属由来のPHA合成酵素をコードする遺伝子（以下、「PHA合成酵素遺伝子」と略す）を有する微生物であるのが好ましく、さらに具体的には、PHA合成酵素遺伝子として、配列番号1に記載するアミノ酸配列からなる、*Aeromonas caviae* (アエロモナス キャビエ) 由来で、かつ149番目のアスパラギンがセリンに、171番目のアスパラギン酸がグリシンにそれぞれ人工的に置き換えられたPHA合成酵素遺伝子、配列番号2に記載するアミノ酸配列からなる、*Ralstonia eutropha* (ラルストニア ユートロファ) 由来のPHA合成酵素遺伝子、配列番号3に記載するアミノ酸配列からなる、*Pseudomonas* Sp. 61-3由来で、325番目のセリンがトレオニンに、477番目のセリンがアルギニンに、481番目のグルタミンがアルギニンにそれぞれ人工的に置き換えられたPHA合成酵素遺伝子等がより好ましい例としてあげられるが、これらに限定されない。*Aeromonas* 属由来PHA合成酵素は炭素数3～6のヒドロキシアルカン酸CoAを基質とすることが知られているため、*Aeromonas* 属由来のPHA合成酵素遺伝子を有する微生物を使用することで、3HB、3HP、4HB、3HV、5HV、および3HHxからなるホモポリマー、あるいはこれらのモノマーユニットからなる共重合PHAが生産できる。また、*Ralstonia* 属由来PHA合成酵素は炭素数3～5のヒドロキシアルカン酸CoAを基質とすることが知られているため、*Ralstonia* 属由来PHA合成酵素遺伝子を有する微生物を使用することで、3HB、3HP、4HB、

3HV、および5HVからなるホモポリマー、あるいはこれらのモノマーユニットからなる共重合PHAが生産できる。また、*Pseudomonas* 属由来PHA合成酵素は炭素数3～12のヒドロキシアリカン酸CoAを基質とすることが知られているため、*Pseudomonas* 属由来PHA合成酵素遺伝子を有する微生物を使用することで、3HB、3HP、4HB、3HV、5HV、3HHx、6HHx、3-ヒドロキシヘプタン酸、3-ヒドロキシアリカン酸、3-ヒドロキシノナン酸、3-ヒドロキシデカン酸、3-ヒドロキシウンデカン酸、3-ヒドロキシドデカン酸からなるホモポリマー、あるいはこれらのモノマーユニットからなる共重合PHAが生産できる。

[0033] 本発明の微生物種は特に限定されず、細菌、または真菌のいずれであってもよい。例えば、*Acinetobacter* (アシネトバクター) 属、*Aeromonas* (アエロモナス) 属、*Alcaligenes* (アルカリゲネス) 属、*Allochromatium* (アルクロマチウム) 属、*Azorhizobium* (アゾリゾビウム) 属、*Azotobacter* (アゾトバクター) 属、*Bacillus* (バチルス) 属、*Burkholderia* (バークホルデリア) 属、*Candida* (カンジダ) 属、*Caulobacter* (カウロバクター) 属、*Chromobacterium* (クロモバクテリウム) 属、*Comamonas* (コマモナス) 属、*Cupriavidus* (カプリアビダス) 属、*Ectothiorhodospira* (エクトチオドスピラ) 属、*Escherichia* 属、*Klebsiella* (クレブシエラ) 属、*Methylobacterium* (メチロバクテリウム) 属、*Nocardia* (ノカルディア) 属、*Paracoccus* (パラコッカス) 属、*Pseudomonas* (シュードモナス) 属、*Ralstonia* (ラルストニア) 属、*Rhizobium* (リゾビウム) 属、*Rhodobacter* (ロドバクター) 属、*Rhodococcus* (ロドコッカス) 属、*Rhodospirillum* (ロドスピリillum) 属、*Rickettsia* (リケッチア) 属、*Saccharomyc*

es (サッカロミセス) 属、*Sinorhizobium* (シノリゾビウム) 属、*Sphingomonas* (スフィンゴモナス) 属、*Synechocystis* (シネコシステイス) 属、*Thiococcus* (チオコッカス) 属、*Thiocystis* (チオキスチス) 属、*Vibrio* (ビブリオ) 属、*Wautersia* (ウォーテルシア) 属、または *Zoog/Loea* (ゾオグ/ロエア) 属に属する微生物が挙げられる。中でも *Aeromonas* 属、*Alcaligenes* 属、*Cupriavidus* 属、*Escherichia* 属、*Pseudomonas* 属、*Ralstonia* 属等に属する微生物が好ましく、*Cupriavidus* 属、*Escherichia* 属、*Ralstonia* 属に属する微生物がより好ましく、*Cupriavidus* 属に属する微生物がさらにより好ましい。本発明の微生物として特に好ましいのは、*Cupriavidus necator* (カプリアビダス ネカトール) である。

[0034] 本発明の微生物が元来 PHA 合成酵素遺伝子を持たない場合、あるいは微生物がもともと有する PHA 合成酵素遺伝子が所望する PHA 合成酵素遺伝子ではない場合、遺伝子組換え法によって例えば上記好ましい PHA 合成酵素遺伝子を宿主となる微生物に導入した形質転換体を使用することも出来る。PHA 合成酵素遺伝子を宿主に導入する方法としては、プラスミドで保持する形式であっても良いし、または染色体の任意の位置に導入する形式であっても良い。この際、宿主がもともと有する PHA 合成酵素遺伝子は、機能が失われている方が好ましい。該 PHA 合成酵素遺伝子の機能を欠失する方法としては、一例として、該 PHA 合成酵素遺伝子を全長にわたって、または部分的に欠損する方法、または該 PHA 合成酵素遺伝子への塩基の付加、欠失、または置換によって、生産される PHA 合成酵素の機能が欠損する方法などが挙げられる。DNA の挿入または置換の具体的な方法については、例えば、Green, M. R. and Sambrook, J., 2012, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual Fourth Ed.*, Cold Spring Harbor

Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New Yorkに記載の方法を参考にすればよい。

[0035] 本発明の製造方法においては、PHAを生産する場合の炭素源として上記アルコールを単独で使用しても良いが、上記アルコールを大量に培養に使用すると微生物の成育に影響がある可能性が高いことから、上記アルコールとそれ以外の炭素源を併用するのが好ましい。そのようなアルコール以外の炭素源としては、本発明の微生物が資化可能な炭素源であれば任意の原料を使用することができる。そのような炭素源としては、特に限定されないが、好ましくは、グルコース、フルクトース、スクロースなどの糖類、パーム油、パーム核油（Palm Kernel Oil；以下、「PKO」と略す）、コーン油、やし油、オリーブ油、大豆油、菜種油、ヤトロファ油などの油脂、その分画油類もしくはその精製副産物、またはラウリン酸、オレイン酸、ステアリン酸、パルミチン酸、ミリスチン酸などの脂肪酸、それらの誘導体等が好ましい。また、酵母エキスやポリペプトンなども使用することができる。より好ましくは、パーム油、パーム核油などの植物油脂、またはパーム油やパーム核油を分別した低融点分画であるパームオレイン、パームダブルオレイン、もしくはパーム核油オレイン、PFAD（パーム油脂肪酸蒸留物）、PKFAD（パーム核油脂肪酸蒸留物）、または菜種油の脂肪酸蒸留物といった油脂の精製副産物等であり、食糧との競合を避ける観点からは前記油脂の精製副産物が特に好ましい。

[0036] 本発明の製造方法においては、上記アルコール、アルコール以外の炭素源、炭素源以外の栄養源である窒素源、無機塩類、およびその他の有機栄養源を含む培地を用いて、前記微生物を培養することが好ましい。窒素源としては、例えばアンモニア、塩化アンモニウム、尿素、硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等のアンモニウム塩の他、ペプトン、肉エキス、酵母エキス等が挙げられる。無機塩類としては、例えばリン酸二水素カリウム、リン酸水素二ナトリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム等が挙げられる。そのほかの有機栄養源としては、例えばグリシン、アラ

ニン、セリン、トレオニン、プロリン等のアミノ酸、ビタミンB 1、ビタミンB 1 2、ビタミンC等のビタミン等が挙げられる。

[0037] 本発明の製造方法において、培地中における上記アルコールの濃度は特に限定されないが、効率よく本発明のP H Aを生産するためには、その下限は0. 0 1 g / Lであるのが好ましく、0. 0 5 g / Lがさらに好ましく、0. 1 g / Lがより好ましい。上限としては、上述したように微生物の成育に対する影響を押さえるという観点から、5 g / L程度が好ましく、3 g / Lがさらに好ましく、2 g / Lがより好ましい。さらにアルコールとしてメルカプトアルコールを使用する場合には0. 8 g / L以下の濃度で使用するの

が特に好ましい。

[0038] それ以外の培養温度、培養時間、培養時p H、培地等の条件は、本発明の微生物において通常使用される培養条件でよい。

[0039] 本発明の製造方法において、微生物菌体からP H Aを回収する方法は、特に限定されないが、例えば次のような方法により行うことができる。培養終了後、培養液から遠心分離機等で菌体を分離し、その菌体を蒸留水およびメタノール等により洗浄し、乾燥させる。この乾燥菌体から、クロロホルム等の有機溶剤を用いてP H Aを抽出する。このP H Aを含んだ有機溶剤溶液から、濾過等によって菌体成分を除去し、その濾液にメタノールやヘキサン等の貧溶媒を加えてP H Aを沈殿させる。さらに、濾過や遠心分離によって上澄み液を除去し、乾燥させてP H Aを回収する。

[0040] 本発明のP H Aは、カルボキシ末端に導入された特定のアルケニル基、アルキニル基、チオール基、アジド基、またはアリル基を介して、化学反応により、さらに任意の化合物に転位させる、即ち化学修飾することもできる。例えば、本発明のP H Aがカルボキシ末端にアルケニル基、またはアルキニル基を有する場合、チオール基を含有する化合物を、チオール-エンクリック反応、またはチオール-インクリック反応によって転位させることができる。逆に、本発明のP H Aがカルボキシ末端にチオール基を有する場合、アルケニル基、またはアルキニル基を含有する化合物を、チオール-エンクリ

ック反応、またはチオール-インクリック反応によって転位させることができる。あるいは、本発明のPHAがカルボキシ末端にアルキニル基を有する場合、アジド基を含有する化合物を、アルキン-アジドクリック反応によって転位させることができる。逆に、本発明のPHAがカルボキシ末端にアジド基を有する場合、アルキニル基を含有する化合物を、アルキン-アジドクリック反応によって転位させることができる。このような化学修飾によって得られる誘導体も、本発明の範疇である。さらには、本発明のPHAや、上記その誘導体である化合物を含有する樹脂成形体も本発明の範疇である。前記樹脂成形体においては、本発明のPHAやその誘導体である化合物を単独で使用してもよく、従来公知のPHAと混合して使用することも出来る。

[0041] 本発明のPHAがポリマー主鎖の末端にのみ官能基を有する場合、反応後の生成物を限定することができ、より好ましい。例えば、側鎖に二重結合を有するPHAと、カルボキシ末端にチオール基を有するPHAを反応させることで、グラフトポリマーへと誘導することができる。また、カルボキシ末端にアルケン基を有するPHAを、ペンタエリトリールテトラキス（3-メルカプトプロピオナート）のような多分岐構造を有するチオール化合物に転位させれば、多分岐型PHAへと誘導することもできる。あるいは、カルボキシ末端にアルケン基が導入されたPHAを含有する樹脂組成物を、フィルム、シート、不織布などに加工し、その後にチオール化合物を転位させることで、樹脂成形物の表面修飾をすることができる。

[0042] さらに、本発明のPHAを利用してデンドリマーを構成すれば、生体適合性の高い医療用材料や、適度な徐放性を有する農業用資材を提供することもできる。

[0043] 本願は、2016年3月25日に出願された日本国特許出願第2016-062278号に基づく優先権の利益を主張するものである。2016年3月25日に出願された日本国特許出願第2016-062278号の明細書の全内容が、本願に参考のため援用される。

実施例

[0044] 以下に実施例を示し、本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に何ら限定されるものではない。なお、菌株の育種、P H Aに含まれるモノマーユニット共重合比率の分析方法、P H Aの分子量の分析方法は以下の通りである。

[0045] (菌株の育種)

本明細書の実施例における遺伝子操作は、前述のGreen, M. R. and Sambrook, J. (2012)に記載されている方法で行うことができる。また、遺伝子操作に使用する酵素、クローニング宿主などは市場の供給者から購入し、その取扱説明書に従って使用することができる。なお、実施例等に用いられる酵素は、遺伝子操作に使用できるものであれば特に限定されない。

[0046] (P H Aに含まれるモノマーユニット共重合比率の分析方法)

P H Aに含まれるモノマーユニット共重合比率は、NMRを用いて分析した。具体的には、得られたP H A 2 m gを重クロロホルム 2 m Lに溶かし、試料管に移して測定に供した。検出された各ピークの面積から、モノマーユニットの共重合比率を算出した。

[0047] (P H Aの分子量の分析方法)

P H Aの分子量は、ゲルパーミッションクロマトグラフィー法により分析した。P H Aを1.5 g/Lの濃度でクロロホルムに溶解し、 $\Phi = 0.2 \mu\text{m}$ フィルターで濾過して得られた濾液を分析サンプルとした。測定システムは島津製作所のGPCシステムを使用した。カラムはShodex GPC K-806L (昭和電工)を2本直列に接続した状態で使用し、カラムオーブンは40℃に設定した。移動相はクロロホルムを使用し、流速は1.0 mL/分とした。分子量標品としては、約700万、約190万、約35万、約19万、約3万、約2千のポリスチレンを使用した。標品6点の分析結果から検量線を作成し、これを元にP H Aの分子量(重量平均分子量 M_w 、および数平均分子量 M_n)を算出した。

[0048] (P H Aのカルボキシ末端構造の確認)

^1H -NMRを用いてカルボキシ末端に所定の基が導入されているか確かめた。 ^1H -NMRの測定は、日本電子製NMR機器を用い、室温にて、500 MHz、SCAN回数256回程度の条件で行った。データ解析は、ALICE2 for windows ver. 4を用いて行なった。下記実施例8、16については、具体的な結果を図1、図2に示す。比較のため、比較例1の結果も図3に示す。

実施例 1

[0049] 2-プロペナー1-オールを0.2 g/L含有する培地における、KNK-005 trc-phaJ4b/ Δ phaZ1, 2, 6株によるPHAの生産

微生物としては、WO2015/115619号記載のKNK-005 trc-phaJ4b/ Δ phaZ1, 2, 6株を使用した。KNK-005 trcphaJ4b/ Δ phaZ1, 2, 6株は、染色体上のphaZ1遺伝子およびphaZ6遺伝子を全長欠失し、phaZ2遺伝子の16番目のコドンから終止コドンまでを欠失し、染色体上に配列番号4に記載のAeromonas caviae由来の変異型PHA合成酵素遺伝子を有し、phaJ4b遺伝子上流に配列番号5記載の発現調節配列が挿入された菌株である。

[0050] (培養)

上記微生物を以下の条件で培養した。

[0051] 種母培地の組成は、10 g/L 肉エキス、10 g/L バクトトリプトン、2 g/L 酵母エキス、9 g/L リン酸二水素ナトリウム12水和物、1.5 g/L リン酸水素ニカリウムとした。

[0052] PHA生産培地の組成は、11 g/L リン酸水素二ナトリウム12水和物、1.9 g/L リン酸水素ニカリウム、1.3 g/L 硫酸アンモニウム、5 mL/L マグネシウム溶液、1 mL/L 微量金属塩溶液とした。マグネシウム溶液は、水に200 g/L 硫酸マグネシウム七水和物を溶かして調製した。微量金属塩溶液は、0.1 N塩酸に、0.218 g/L 塩

化コバルト六水和物、16.2 g/L 塩化鉄(III)六水和物、10.3 g/L 塩化カルシウム二水和物、0.118 g/L 塩化ニッケル六水和物、0.156 g/L 硫酸銅五水和物を溶かして調製した。

[0053] 菌株のグリセロールストック溶液50 μ Lを種母培地10 mLに接種し、30℃で24時間振盪培養した。得られた培養液を前培養液とした。

[0054] PHA生産培養は、フラスコで行った。500 mL容量の振盪フラスコにPHA生産培地50 mLを入れた。植菌直前に、マグネシウム溶液を250 μ L、微量元素溶液を50 μ L、PKOを1 g添加し、さらに2-プロペナー1-オールを0.2 g/Lとなるように添加した。培地調製後、振盪フラスコに前培養液を500 μ L接種し、30℃で72時間振盪培養を行った。

[0055] (精製)

培養終了後、遠心分離によって菌体を回収し、水で懸濁した後、終濃度3% (w/v)となるようにラウリル硫酸ナトリウムを添加した。調製した菌体溶液を、氷冷しながら超音波で処理し、菌体を破碎した。破碎菌体溶液から遠心分離によってPHAを沈殿として回収し、水およびエタノールで1回ずつ洗浄した後、沈殿を60℃で2時間真空乾燥して、精製PHAとして取得した。

[0056] 得られたPHAについて、モノマーユニット共重合比率と分子量の分析を行った。その結果を表1に示す。

実施例 2

[0057] 2-プロペナー1-オールを1.0 g/L含有する培地における、KNK-005 *trc-phaJ4b*/ Δ *phaZ1, 2*, 6株によるPHAの生産

実施例1と同様に、KNK-005 *trc-phaJ4b*/ Δ *phaZ1, 2*, 6株を培養、精製し精製PHAを取得した。ただし、PHA生産培養において培地中に添加する2-プロペナー1-オールの終濃度は1.0 g/Lとした。得られたPHAについて、モノマーユニット共重合比率と分子量の分析を行った。その結果を表1に示す。

実施例 3

[0058] 3-ブテン-1-オールを0.2 g/L含有する培地における、KNK-005 t r c - p h a J 4 b / Δ p h a Z 1, 2, 6株によるPHAの生産

実施例1と同様に、KNK-005 t r c - p h a J 4 b / Δ p h a Z 1, 2, 6株を培養、精製し精製PHAを取得した。ただし、PHA生産培養において2-プロペン-1-オールの代わりに、3-ブテン-1-オールを終濃度0.2 g/Lとなるよう培地中に添加した。得られたPHAについて、モノマーユニット共重合比率と分子量の分析を行った。その結果を表1に示す。

実施例 4

[0059] 3-ブテン-1-オールを1.0 g/L含有する培地における、KNK-005 t r c - p h a J 4 b / Δ p h a Z 1, 2, 6株によるPHAの生産

実施例3と同様に、KNK-005 t r c - p h a J 4 b / Δ p h a Z 1, 2, 6株を培養、精製し精製PHAを取得した。ただし、PHA生産培養において培地中に添加する3-ブテン-1-オールの終濃度は1.0 g/Lとした。得られたPHAについて、モノマーユニット共重合比率と分子量の分析を行った。その結果を表1に示す。

実施例 5

[0060] 5-ヘキセン-1-オールを0.2 g/L含有する培地における、KNK-005 t r c - p h a J 4 b / Δ p h a Z 1, 2, 6株によるPHAの生産

実施例1と同様に、KNK-005 t r c - p h a J 4 b / Δ p h a Z 1, 2, 6株を培養、精製し精製PHAを取得した。ただし、PHA生産培養において2-プロペン-1-オールの代わりに、5-ヘキセン-1-オールを終濃度0.2 g/Lとなるよう培地中に添加した。得られたPHAについて、モノマーユニット共重合比率と分子量の分析を行った。その結果を表

1 に示す。

実施例 6

[0061] 5-ヘキセン-1-オールを1.0 g/L含有する培地における、KNK-005 t r c - p h a J 4 b / Δ p h a Z 1, 2, 6株によるPHAの生産

実施例5と同様に、KNK-005 t r c - p h a J 4 b / Δ p h a Z 1, 2, 6株を培養、精製し精製PHAを取得した。ただし、培地中に添加する5-ヘキセン-1-オールの終濃度は1.0 g/Lとした。得られたPHAについて、モノマーユニット共重合比率と分子量の分析を行った。その結果を表1に示す。

実施例 7

[0062] 2-プロピン-1-オールを0.2 g/L含有する培地における、KNK-005 t r c - p h a J 4 b / Δ p h a Z 1, 2, 6株によるPHAの生産

実施例1と同様に、KNK-005 t r c - p h a J 4 b / Δ p h a Z 1, 2, 6株を培養、精製し精製PHAを取得した。ただし、PHA生産培養において2-プロペン-1-オールの代わりに、2-プロピン-1-オールを終濃度0.2 g/Lとなるよう培地中に添加した。得られたPHAについて、モノマーユニット共重合比率と分子量の分析を行った。その結果を表1に示す。

実施例 8

[0063] 2-プロピン-1-オールを1.0 g/L含有する培地における、KNK-005 t r c - p h a J 4 b / Δ p h a Z 1, 2, 6株によるPHAの生産

実施例7と同様に、KNK-005 t r c - p h a J 4 b / Δ p h a Z 1, 2, 6株を培養、精製し精製PHAを取得した。ただし、培地中に添加する2-プロピン-1-オールの終濃度は1.0 g/Lとした。得られたPHAについて、モノマーユニット共重合比率と分子量の分析を行った。その

結果を表1に示す。

実施例 9

[0064] 3-ブチン-1-オールを0.2 g/L含有する培地における、KNK-005 t r c - p h a J 4 b / Δ p h a Z 1, 2, 6株によるPHAの生産

実施例1と同様に、KNK-005 t r c - p h a J 4 b / Δ p h a Z 1, 2, 6株を培養、精製し精製PHAを取得した。ただし、PHA生産培養において2-プロペン-1-オールの代わりに、3-ブチン-1-オールを終濃度0.2 g/Lとなるよう培地中に添加した。得られたPHAについて、モノマーユニット共重合比率と分子量の分析を行った。その結果を表1に示す。

実施例 10

[0065] 3-ブチン-1-オールを1.0 g/L含有する培地における、KNK-005 t r c - p h a J 4 b / Δ p h a Z 1, 2, 6株によるPHAの生産

実施例9と同様に、KNK-005 t r c - p h a J 4 b / Δ p h a Z 1, 2, 6株を培養、精製し精製PHAを取得した。ただし、培地中に添加する3-ブチン-1-オールの終濃度は1.0 g/Lとした。得られたPHAについて、モノマーユニット共重合比率と分子量の分析を行なった。その結果を表1に示す。

実施例 11

[0066] 5-ヘキシン-1-オールを0.2 g/L含有する培地における、KNK-005 t r c - p h a J 4 b / Δ p h a Z 1, 2, 6株によるPHAの生産

実施例1と同様に、KNK-005 t r c - p h a J 4 b / Δ p h a Z 1, 2, 6株を培養、精製し精製PHAを取得した。ただし、PHA生産培養において2-プロペン-1-オールの代わりに、5-ヘキシン-1-オールを終濃度0.2 g/Lとなるよう培地中に添加した。得られたPHAにつ

いて、モノマーユニット共重合比率と分子量の分析を行った。その結果を表 1 に示す。

実施例 12

[0067] 5-ヘキシノー1-オールを1.0 g/L含有する培地における、KNK-005 t r c - p h a J 4 b / Δ p h a Z 1, 2, 6株によるPHAの生産

実施例11と同様に、KNK-005 t r c - p h a J 4 b / Δ p h a Z 1, 2, 6株を培養、精製し精製PHAを取得した。ただし、培地中に添加する5-ヘキシノー1-オールの終濃度は1.0 g/Lとした。得られたPHAについて、モノマーユニット共重合比率と分子量の分析を行った。その結果を表1に示す。

実施例 13

[0068] 2-メルカプトエタノールを0.2 g/L含有する培地における、KNK-005 t r c - p h a J 4 b / Δ p h a Z 1, 2, 6株によるPHAの生産

実施例1と同様に、KNK-005 t r c - p h a J 4 b / Δ p h a Z 1, 2, 6株を培養、精製し精製PHAを取得した。ただし、PHA生産培養において2-プロペノー1-オールの代わりに、2-メルカプトエタノールを終濃度0.2 g/Lとなるよう培地中に添加した。得られたPHAについて、モノマーユニット共重合比率と分子量の分析を行った。その結果を表1に示す。

実施例 14

[0069] 3-メルカプトプロパノールを0.2 g/L含有する培地における、KNK-005 t r c - p h a J 4 b / Δ p h a Z 1, 2, 6株によるPHAの生産

実施例1と同様に、KNK-005 t r c - p h a J 4 b / Δ p h a Z 1, 2, 6株を培養、精製し精製PHAを取得した。ただし、PHA生産培養において2-プロペノー1-オールの代わりに、3-メルカプトプロパノ

ールを終濃度0.2 g/Lとなるよう培地中に添加した。得られたPHAについて、モノマーユニット共重合比率と分子量の分析を行った。その結果を表1に示す。

実施例 15

[0070] エチレングリコールモノア릴エーテルを0.2 g/L含有する培地における、KNK-005 t r c - p h a J 4 b / Δ p h a Z 1, 2, 6株によるPHAの生産

実施例1と同様に、KNK-005 t r c - p h a J 4 b / Δ p h a Z 1, 2, 6株を培養、精製し精製PHAを取得した。ただし、PHA生産培養において2-プロペン-1-オールの代わりに、エチレングリコールモノア릴エーテルを終濃度0.2 g/Lとなるよう培地中に添加した。得られたPHAについて、モノマーユニット共重合比率と分子量の分析を行った。その結果を表1に示す。

実施例 16

[0071] エチレングリコールモノア릴エーテルを1.0 g/L含有する培地における、KNK-005 t r c - p h a J 4 b / Δ p h a Z 1, 2, 6株によるPHAの生産

実施例15と同様に、KNK-005 t r c - p h a J 4 b / Δ p h a Z 1, 2, 6株を培養、精製し精製PHAを取得した。ただし、培地中に添加するエチレングリコールモノア릴エーテルの終濃度は1.0 g/Lとした。得られたPHAについて、モノマーユニット共重合比率と分子量の分析を行った。その結果を表1に示す。

[0072] (比較例1) 特定のアルコールなどを含有しない培地における、KNK-005 t r c - p h a J 4 b / Δ p h a Z 1, 2, 6株によるPHAの生産

PHA生産培養において培地中に2-プロペン-1-オールを添加しない以外は、実施例1と同様に、KNK-005 t r c - p h a J 4 b / Δ p h a Z 1, 2, 6株を培養、精製し精製PHAを取得した。得られたPHA

について、モノマーユニット共重合比率と分子量の分析を行った。その結果を表1に示す。

[0073] (比較例2) 2-アミノエタノール塩酸塩を0.2 g/L含有する培地における、KNK-005 t r c - p h a J 4 b / Δ p h a Z 1, 2, 6株によるPHAの生産

実施例1と同様に、KNK-005 t r c - p h a J 4 b / Δ p h a Z 1, 2, 6株を培養、精製し精製PHAを取得した。ただし、PHA生産培養において2-プロペン-1-オールの代わりに、2-アミノエタノール塩酸塩を終濃度0.2 g/Lとなるよう培地中に添加した。得られたPHAについて、モノマーユニット共重合比率と分子量の分析を行った。その結果を表1に示す。

[0074] (比較例3) 2-アミノエタノール塩酸塩を1.0 g/L含有する培地における、KNK-005 t r c - p h a J 4 b / Δ p h a Z 1, 2, 6株によるPHAの生産

比較例2と同様に、KNK-005 t r c - p h a J 4 b / Δ p h a Z 1, 2, 6株を培養、精製し精製PHAを取得した。ただし、培地中に添加する2-アミノエタノール塩酸塩の終濃度は1.0 g/Lとした。得られたPHAについて、モノマーユニット共重合比率と分子量の分析を行った。その結果を表1に示す。

[0075] (比較例4) 3-アミノプロパノール塩酸塩を0.2 g/L含有する培地における、KNK-005 t r c - p h a J 4 b / Δ p h a Z 1, 2, 6株によるPHAの生産

実施例1と同様に、KNK-005 t r c - p h a J 4 b / Δ p h a Z 1, 2, 6株を培養、精製し精製PHAを取得した。ただし、PHA生産培養において2-プロペン-1-オールの代わりに、3-アミノプロパノール塩酸塩を終濃度0.2 g/Lとなるよう培地中に添加した。得られたPHAについて、モノマーユニット共重合比率と分子量の分析を行った。その結果を表1に示す。

[0076] (比較例5) 2-アミノエタノール塩酸塩を1.0 g/L含有する培地における、KNK-005 t r c - p h a J 4 b / Δ p h a Z 1, 2, 6株によるPHAの生産

比較例4と同様に、KNK-005 t r c - p h a J 4 b / Δ p h a Z 1, 2, 6株を培養、精製し精製PHAを取得した。ただし、培地中に添加する3-アミノプロパノール塩酸塩の終濃度は1.0 g/Lとした。得られたPHAについて、モノマーユニット共重合比率と分子量の分析を行った。その結果を表1に示す。

[0077] (比較例6) 1, 2-エタンジチオールを0.2 g/L含有する培地における、KNK-005 t r c - p h a J 4 b / Δ p h a Z 1, 2, 6株によるPHAの生産

実施例1と同様に、KNK-005 t r c - p h a J 4 b / Δ p h a Z 1, 2, 6株を培養、精製し精製PHAを取得した。ただし、PHA生産培養において2-プロペナー1-オールの代わりに、1, 2-エタンジチオールを終濃度0.2 g/Lとなるよう培地中に添加した。得られたPHAについて、モノマーユニット共重合比率と分子量の分析を行った。その結果を表1に示す。

[0078] (比較例7) 1, 3-プロパンジチオールを0.2 g/L含有する培地における、KNK-005 t r c - p h a J 4 b / Δ p h a Z 1, 2, 6株によるPHAの生産

実施例1と同様に、KNK-005 t r c - p h a J 4 b / Δ p h a Z 1, 2, 6株を培養、精製し精製PHAを取得した。ただし、PHA生産培養において2-プロペナー1-オールの代わりに、培地中に1, 3-プロパンジチオールを終濃度0.2 g/Lとなるよう添加した。得られたPHAについて、モノマーユニット共重合比率と分子量の分析を行った。その結果を表1に示す。

[0079]

[表1]

	PHA合成酵素 の由来	培地添加成分		共重合比率 (mol%)		分子量 ($\times 10^4$)	
		種類	濃度 (g/L)	3HB	3HHx	M_w	M_n
実施例1	Aeromonas	2-Propen-1-ol	0.2	90.2	9.8	20	8.1
実施例2			1	92.3	7.7	7.3	2.8
実施例3		3-Buten-1-ol	0.2	89.4	10.6	135	46
実施例4			1	90.7	9.3	28	10
実施例5		5-Hexen-1-ol	0.2	90.5	9.5	252	78
実施例6			1	88.9	11.1	53	15
実施例7		2-Propyn-1-ol	0.2	91.4	8.6	6.4	2.7
実施例8			1	94.3	5.7	2.5	1.2
実施例9		3-Butyn-1-ol	0.2	89.7	10.3	51	20
実施例10			1	89.3	10.7	13	5.0
実施例11		5-Hexyn-1-ol	0.2	88.9	11.1	92	30
実施例12			1	87.1	12.9	16	7
実施例13		2-Mercaptoethanol	0.2	89.2	10.8	31	11
実施例14		3-Mercaptopropanol	0.2	89.4	10.6	60	26
実施例15		Ethylene Glycol Monoallyl Ether	0.2	89.7	10.3	124	32
実施例16		Ethylene Glycol Monoallyl Ether	1	90.2	9.8	39	13
比較例1		-	-	88.9	11.1	279	128
比較例2		2-Aminoethanol Hydrochloride	0.2	89.8	10.2	398	206
比較例3			1	90.6	9.4	364	88
比較例4		3-Aminoethanol Hydrochloride	0.2	89.5	10.5	423	248
比較例5			1	89.1	10.9	279	130
比較例6		1,2-Ethanedithiol	0.2	90.7	9.3	325	87
比較例7		1,3-Propanedithiol	0.2	90.4	9.6	239	91

[0080] (結果と考察)

表1の結果から、アルキニル基、アルケニル基、チオール基またはアリル基を有するアルコールを培地中に添加してPHA生産微生物を培養した実施例1～16では、これらアルコールを添加していない比較例1と比べ、得られたPHAの分子量が、重量平均分子量(M_w)、数平均分子量(M_n)ともに

低下したことから、添加したアルコールが停止剤として機能し、その結果、カルボキシ末端に、アルケニル基、アルキニル基、チオール基またはアリル基が導入されたPHAが生産されていると推察できる。ただし、5-ヘキセン-1-オールを添加した場合には、その培地中への添加濃度が1 g/Lの場合のみ、PHAの大幅な分子量低下が認められた。

[0081] 図1、図2はそれぞれ、実施例8、16の¹H-NMRチャートである。比較のため、図3に比較例1の¹H-NMRチャートを示す。図3に比べ、図1では4.7 ppm付近にプロピニル基中のメチレンプロトンに帰属されるピークが現れており、また図2では4.5 ppm、5.9 ppm付近にアリル基に帰属されるピークが現れており、これらの基が導入されていることが分かる。

[0082] 一方、比較例2～5では、2-アミノエタノールや3-アミノ-1-プロパノールを培地中に添加してもPHAの分子量低下は認められなかった。この結果は、これらのアミノアルコールが微生物により代謝されたことが原因と考えられる。また、比較例6、7でも、1,2-エタンジチオールや1,3-プロパンジチオールは培地中に添加してもPHAの分子量低下が認められず、ジチオールは停止剤としては機能しないと考えられる。

[0083] 以上の結果から、*Aeromonas*属由来PHA合成酵素遺伝子を有する微生物を、アルキニル基、アルケニル基、チオール基またはアリル基を有するアルコールを培地中に添加して培養することにより、カルボキシ末端に、アルケニル基、アルキニル基、チオール基またはアリル基を導入されたPHAが生産できることが示唆された。

[0084] (製造例1) H16 ΔphaZ1, 2, 6株の作製

H16 ΔphaZ1, 2, 6株を作製するにあたって、まず、WO2014/065253号記載のKNK-005 ΔphaZ1, 2, 6株をもとに、PHA合成酵素遺伝子が破壊されたH16 ΔphaC1 ΔphaZ1, 2, 6株を以下の手順で作製した。KNK-005 ΔphaZ1, 2, 6株は、染色体上のphaZ1遺伝子およびphaZ6遺伝子を全長欠失

し、*phaZ2* 遺伝子の 16 番目のコドンから終止コドンまでを欠失し、染色体上に配列番号 5 に記載の PHA 合成酵素遺伝子を有する菌株である。

[0085] まず *KNK-005 ΔphaZ1, 2, 6* 株の PHA 合成酵素遺伝子を全長欠損するためのプラスミドを作製した。*C. necator* H16 株のゲノム DNA を鋳型とし、配列番号 6 および配列番号 7 で示した DNA をプライマーペアとして、PCR を行った。ポリメラーゼは *KOD-plus* (東洋紡) を用いた。同様に、配列番号 8 および配列番号 9 で示した DNA をプライマーペアとして、PCR を行った。上記 PCR で得られた 2 種類の DNA 断片を鋳型とし、配列番号 6 および配列番号 9 で示した DNA をプライマーペアとして、同様の条件で PCR を行い、得られた DNA 断片を制限酵素 *SmiI* で消化した。この DNA 断片を、特開 2007-259708 号公報に記載のベクター *pNS2X-sacB* を *SmiI* で消化して得られた DNA 断片と、DNA リガーゼ (*Ligation High*、東洋紡) を用いて連結し、*phaC1* 遺伝子より上流の塩基配列、および *phaC1* 遺伝子より下流の塩基配列を有する PHA 合成酵素遺伝子破壊用プラスミド *pNS2X-sacB-ΔphaC1UL* を作製した。

[0086] この PHA 合成酵素遺伝子破壊用プラスミド *pNS2X-sacB-ΔphaC1UL* を大腸菌 *S17-1* 株 (*ATCC47055*) に導入し、*KNK-005 ΔphaZ1, 2, 6* 株と *Nutrient Agar* 培地 (*DIFCO*) 上で混合培養して接合伝達を行った。

[0087] 上記接合伝達後の菌株から、250 mg/L のカナマイシン硫酸塩を含むシモンズ寒天培地 (クエン酸ナトリウム 2 g/L、塩化ナトリウム 5 g/L、硫酸マグネシウム 7 水和物 0.2 g/L、リン酸二水素アンモニウム 1 g/L、リン酸水素二カリウム 1 g/L、寒天 15 g/L、pH 6.8) 上で生育する菌株を選択し、前記プラスミドが *KNK-005 ΔphaZ1, 2, 6* 株の染色体上に組み込まれた株を取得した。この株を *Nutrient Broth* 培地 (*DIFCO*) で 2 世代培養した後、15% のショ糖を含む *Nutrient Agar* 培地で生育する菌株を選択した。得られた

菌株から染色体上にある配列番号5記載のPHA合成酵素遺伝子が全長欠失された菌株をPCRにより選別し、うち1株をH16 Δ phaC1 Δ phaZ1, 2, 6株と命名した。H16 Δ phaC1 Δ phaZ1, 2, 6株は、C. necator H16株を親株とし、染色体上のphaZ1遺伝子およびphaZ6遺伝子を全長欠失し、phaZ2遺伝子の16番目のコドンから終止コドンまでを欠失し、さらにphaC1遺伝子が全長欠失された菌株である。

[0088] 次に、得られたH16 Δ phaC1 Δ phaZ1, 2, 6株をもとに、配列番号10記載のC. necator H16株由来のphaC1遺伝子が挿入されたH16 Δ phaC1, 2, 6株を以下の手順で作製した。

[0089] まずC. necator H16株のphaC1遺伝子を染色体上に挿入するためのプラスミドを作製した。C. necator H16株のゲノムDNAを鋳型とし、配列番号6および配列番号9で示したDNAをプライマーペアとして、PCRを行った。ポリメラーゼはKOD-plusを用いた。得られたDNA断片を制限酵素SmiIで消化した。このDNA断片を、pNS2X-sacBをSmiIで消化して得られたDNA断片と、DNAリガーゼを用いて連結し、phaC1遺伝子より上流の塩基配列、phaC1遺伝子、およびphaC1遺伝子より下流の塩基配列を有するPHA合成酵素遺伝子破壊用プラスミドpNS2X-sacB-phaC_{Re}+ULを作製した。

[0090] 上記PHA合成酵素遺伝子破壊と同様の手順で、H16 Δ phaC1 Δ phaZ1, 2, 6株を親株とし、pNS2X-sacB-phaC_{Re}+ULが染色体上に組み込まれた株を取得した。この株をNutrient Broth培地で2世代培養した後、15%のショ糖を含むNutrient Agar培地で生育する菌株を選択した。得られた菌株から染色体上にあるphaC1遺伝子が挿入された菌株をPCRにより選別し、うち1株をH16 Δ phaZ1, 2, 6株と命名した。H16 Δ phaZ1, 2, 6

株は、*C. necator* H16株を親株とし、染色体上の*phaZ1*遺伝子および*phaZ6*遺伝子を全長欠失し、*phaZ2*遺伝子の16番目のコドンから終止コドンまでを欠失し、*Ralstonia eutropha*由来の野生型PHA合成酵素をコードする遺伝子を染色体上に有する菌株である。

[0091] (製造例2) *ReSK003*株の作製

製造例1記載のH16 $\Delta phaC1$ $\Delta phaZ1, 2, 6$ 株をもとに、染色体上に配列番号11に記載する塩基配列からなるPHA合成酵素遺伝子が挿入された*ReSK003*株を作製した。配列番号11に記載する塩基配列からなるPHA合成酵素遺伝子は、*Pseudomonas* Sp. 61-3由来で、325番目のセリンがトレオニンに、477番目のセリンがアルギニンに、481番目のグルタミンがアルギニンにそれぞれ人工的に置き換えられた、配列番号3記載のアミノ酸配列からなるPHA合成酵素をコードする遺伝子である。

[0092] まず、配列番号12記載の発現調節配列下で、配列番号13記載の*Pseudomonas* Sp. 61-3株由来のPHA合成酵素遺伝子を発現するプラスミドpCUP2-REP-*phaC1_{ps}*を作製した。配列番号11記載の発現調節配列は、*C. necator* H16株由来の*phaCAB*オペロンのプロモーターである。*C. necator* H16株のゲノムDNAを鋳型とし、配列番号14および配列番号15で示したDNAをプライマーペアとして、PCRを行った。ポリメラーゼはKOD-plusを用いた。同様に、*Pseudomonas* Sp. 61-3株のゲノムDNAを鋳型とし、配列番号16および配列番号17で示したDNAをプライマーペアとして、PCRを行った。上記PCRで得られた2種類のDNA断片を鋳型とし、配列番号14および配列番号17で示したDNAをプライマーペアとして、同様の条件でPCRを行い、得られたDNA断片を制限酵素MunIおよびSpeIで消化した。このDNA断片を、特開2007-259708号公報記載のベクターpCUP2をMunIおよびSpeIで消化して

得られたDNA断片と、DNAリガーゼを用いて連結し、上記プラスミド pCUP2-REP-phaC1_{ps} を作製した。

[0093] 次に、pCUP2-REP-phaC1_{ps} を鋳型とし、配列番号14および配列番号18で示したDNAをプライマーペアとしてPCRを行った。同様に、配列番号19および配列番号20で示したDNAをプライマーペアとしてPCRを行った。同様に、配列番号21および配列番号17で示したDNAをプライマーペアとしてPCRを行った。上記PCRで得られた3種類のDNA断片を鋳型とし、配列番号14および配列番号17で示したDNAをプライマーペアとして、同様の条件でPCRを行い、得られたDNA断片を制限酵素MunIおよびSpeIで消化した。このDNA断片を、特開2007-259708号公報記載のベクターpCUP2をMunIおよびSpeIで消化して得られたDNA断片と、DNAリガーゼを用いて連結し、上記プラスミド pCUP2-REP-phaC1_{ps}^{S325T, S477R, Q481R} を作製した。

[0094] 次に、配列番号11記載のPHA合成酵素遺伝子を染色体上に挿入するためのプラスミドを作製した。pCUP2-REP-phaC1_{ps}^{S325T, S477R, Q481R} を鋳型とし、配列番号6および配列番号22で示したDNAをプライマーペアとして、PCRを行った。ポリメラーゼはKOD-plusを用いた。同様に、配列番号23および配列番号9で示したDNAをプライマーペアとしてPCRを行った。上記PCRで得られた2種類のDNA断片を鋳型とし、配列番号6および配列番号9で示したDNAをプライマーペアとして、同様の条件でPCRを行い、得られたDNA断片を制限酵素SmiIで消化した。このDNA断片を、pNS2X-sacBをSmiIで消化して得られたDNA断片と、DNAリガーゼを用いて連結し、phaC1遺伝子より上流の塩基配列、配列番号11記載のPHA合成酵素遺伝子、およびphaC1遺伝子より下流の塩基配列を有するPHA合成酵素遺伝子破壊用プラスミド pNS2X-sacB-ΔphaC1UL::STSRQR を作製した。

[0095] 製造例1記載のPHA合成酵素遺伝子挿入と同様の手順で、H16 ΔphaC1 ΔphaZ1, 2, 6株を親株とし、pNS2X-sacB-Δ

p h a C 1 U L : : S T S R Q Rを用いて、配列番号 11 記載の P H A 合成酵素遺伝子を染色体上に挿入した。得られた菌株を R e S K 003 株と命名した。R e S K 003 株は、H 16 Δ p h a C 1 Δ p h a Z 1, 2, 6 株を親株とし、配列番号 11 記載の P s e u d o m o n a s 属由来の変異型 P H A 合成酵素遺伝子が染色体上に挿入された菌株である。

実施例 17

- [0096] 2-プロペナー1-オールを1.0 g/L含有する培地における、H 16 Δ p h a Z 1, 2, 6 株による P H A の生産

実施例 1 と同様の方法で、製造例 1 で作製した H 16 Δ p h a Z 1, 2, 6 株を培養、精製し精製 P H A を取得した。ただし、培地中に添加する 2-プロペナー1-オールの終濃度は1.0 g/Lとした。得られた P H A について、モノマーユニット共重合比率と分子量の分析を行った。その結果を表 2 に示す。

実施例 18

- [0097] 2-プロピナー1-オールを1.0 g/L含有する培地における、H 16 Δ p h a Z 1, 2, 6 株による P H A の生産

実施例 15 と同様の方法で、製造例 1 で作製した H 16 Δ p h a Z 1, 2, 6 株を培養、精製し精製 P H A を取得した。ただし、P H A 生産培養において培地中に 2-プロペナー1-オールの代わりに、2-プロピナー1-オールを終濃度1.0 g/Lとなるよう培地中に添加した。得られた P H A について、モノマーユニット共重合比率と分子量の分析を行った。その結果を表 2 に示す。

- [0098] (比較例 8) 特定のアルコールを含有しない培地における、H 16 Δ p h a Z 1, 2, 6 株による P H A の生産 P H A 生産培養において培地中に 2-プロペナー1-オールをは添加しない以外は、実施例 15 と同様の方法で、製造例 1 で作製した H 16 Δ p h a Z 1, 2, 6 株を培養、精製し精製 P H A を取得した。得られた P H A について、モノマーユニット共重合比率と分子量の分析を行った。その結果を表 2 に示す。

[0099] [表2]

	PHA合成酵素の 由来	培地添加成分		共重合比率 (mol%)		分子量 ($\times 10^4$)	
		種類	濃度 (g/L)	3HB	3HHx	M_w	M_n
実施例17	<i>Ralstonia eutropha</i> H16	2-Propen-1-ol	1.0	100	0.0	76	30
実施例18		2-Propyn-1-ol	1.0	100	0.0	59	23
比較例8		-		100	0.0	243	93

[0100] (結果と考察)

表2の結果から、2-プロペン-1-オールまたは2-プロピン-1-オールを培地中に添加した実施例17、18では、これらアルコールを添加していない比較例8と比べ、PHAの分子量が M_w 、 M_n ともに低下したことから、添加したアルコールが停止剤として機能し、その結果、カルボキシ末端に、プロペニル基またはプロピニル基が導入されたPHAが生産されていると推察できる。以上の結果から、*Ralstonia*属由来PHA合成酵素遺伝子を有する微生物を、アルキニル基またはアルケニル基を有するアルコールを培地中に添加して培養することによりカルボキシ末端に、アルケニル基またはアルキニル基が導入されたPHAが生産できることが示唆された。

実施例 19

[0101] 2-プロペン-1-オールを1.0g/L含有する培地における、ReSK003株によるPHAの生産

実施例1と同様の方法で、製造例2で作製したReSK003株を培養、精製し精製PHAを取得した。ただし、培地中に添加する2-プロペン-1-オールの終濃度は1.0g/Lとした。得られたPHAについて、モノマーユニット共重合比率と分子量の分析を行った。その結果を表3に示す。

実施例 20

[0102] 2-プロピン-1-オールを1.0g/L含有する培地における、ReSK003株によるPHAの生産

実施例 19 と同様の方法で、製造例 1 で作製した R e S K 0 0 3 株を培養、精製し精製 P H A を取得した。ただし、P H A 生産培養において 2-プロペン-1-オールに代わって、2-プロピン-1-オールを最終濃度 1.0 g/L となるよう培地中に添加した。得られた P H A について、モノマーユニット共重合比率と分子量の分析を行った。その結果を表 3 に示す。

[0103] (比較例 9) 特例のアルコールを含有しない培地における、R e S K 0 0 3 株による P H A の生産

P H A 生産培養において培地中に 2-プロペン-1-オールを添加しない以外は、実施例 17 と同様の方法で、製造例 1 で作製した R e S K 0 0 3 株を培養、精製し精製 P H A を取得した。得られた P H A について、モノマーユニット共重合比率と分子量の分析を行った。その結果を表 3 に示す。

[0104] [表3]

	PHA合成酵素の 由来	培地添加成分		共重合比率 (mol%)		分子量 ($\times 10^4$)	
		種類	濃度 (g/L)	3HB	3HHx	M_w	M_n
実施例19	<i>Pseudomonas</i> Sp.61-3	2-Propen-1-ol	1.0	96.4	3.6	20	9.1
実施例20		2-Propyn-1-ol	1.0	95.4	4.6	8.2	4.1
比較例9		-		96.0	4.0	39	16

[0105] (結果と考察)

表 3 の結果から、2-プロペン-1-オールまたは 2-プロピン-1-オールを添加した実施例 19、20 では、これらアルコールを添加していない比較例 9 と比べ、P H A の分子量が M_w 、 M_n とともに低下したことから、添加したアルコールが停止剤として機能し、その結果、カルボキシ末端に、プロペニル基またはプロピニル基が導入された P H A が生産されていると推察できる。以上の結果から、*Pseudomonas* 属由来 P H A 合成酵素遺伝子を有する微生物を、アルキニル基またはアルケニル基を有するアルコールを培地中に添加して培養することによりカルボキシ末端に、アルケニル基また

はアルキニル基が導入しされたP H Aが生産できることが示唆された。

請求の範囲

[請求項1] 繰り返し単位が下記一般式（1）



（式中、 R^1 は C_nH_{2n+1} で表されるアルキル基であり、 n は1～15の整数であり、 $*$ は不斉炭素であることを表す。）

で示されるR-3-ヒドロキシアリカン酸の単独又は共重合ポリマーであって、該ポリマーが単独ポリマーであるか共重合ポリマーであるかに応じて、カルボキシ末端に以下に示す基が結合しているポリヒドロキシアリカン酸。

（1）単独ポリマーである時にカルボキシ末端に結合する基

炭素数4～8のアルキニル基、

炭素数3～8のアルケニル基、

炭素数2、4～8のメルカプトアルキル基、

炭素数3～8のアジド化アルキル基、または

アルキル基の炭素数が2～6のアリル（ポリ）オキシアルキル基、

（2）共重合ポリマーである時にカルボキシ末端に結合する基

炭素数3～8のアルキニル基、

炭素数3～8のアルケニル基、

炭素数2～8のメルカプトアルキル基、

炭素数3～8のアジド化アルキル基、または

アルキル基の炭素数が2～6のアリル（ポリ）オキシアルキル基

[請求項2] カルボキシ末端に、アルキン基、アルケン基、チオール基またはアジド基が導入された微生物産生ポリヒドロキシアリカン酸であり、

前記ヒドロキシアリカン酸が3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシピロピオン酸、4-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ吉草酸、5-ヒドロキシ吉草酸、3-ヒドロキシヘキサン酸、6-ヒドロキシヘキサン酸、3-ヒドロキシヘプタン酸、3-ヒドロキシアクタン酸、3-ヒドロキシノナン酸、3-ヒドロキシデカン酸、3-ヒドロキシウンデ

カン酸、3-ヒドロキシドデカン酸から選ばれる複数種で構成されているポリヒドロキシアルカン酸。

[請求項3] カルボキシ末端に、アルキン基、アルケン基、チオール基またはアジド基が導入された微生物産生ポリヒドロキシアルカン酸であり、

前記ヒドロキシアルカン酸が3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキプロピオン酸、4-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ吉草酸、5-ヒドロキシ吉草酸、3-ヒドロキシヘキサン酸、6-ヒドロキシヘキサン酸、3-ヒドロキシヘプタン酸、3-ヒドロキシオクタン酸、3-ヒドロキシノナン酸、3-ヒドロキシデカン酸、3-ヒドロキシウンデカン酸、3-ヒドロキシドデカン酸から選ばれる単一種で構成されており、

前記アルキン基が、ブチニル基、ペンチニル基、又はヘキシニル基であり、

前記アルケン基が、プロペニル基、ブテニル基、ペンテニル基、又はヘキセニル基であり、

前記チオール基が、メルカプトエチル基、メルカプトブチル基、メルカプトペンチル基、又はメルカプトヘキシル基であるポリヒドロキシアルカン酸。

[請求項4] モノマーユニットとして少なくとも3-ヒドロキシ酪酸を含む請求項1～3のいずれかに記載のポリヒドロキシアルカン酸。

[請求項5] モノマーユニットとしてさらに3-ヒドロキシヘキサン酸を含む請求項4に記載のポリヒドロキシアルカン酸。

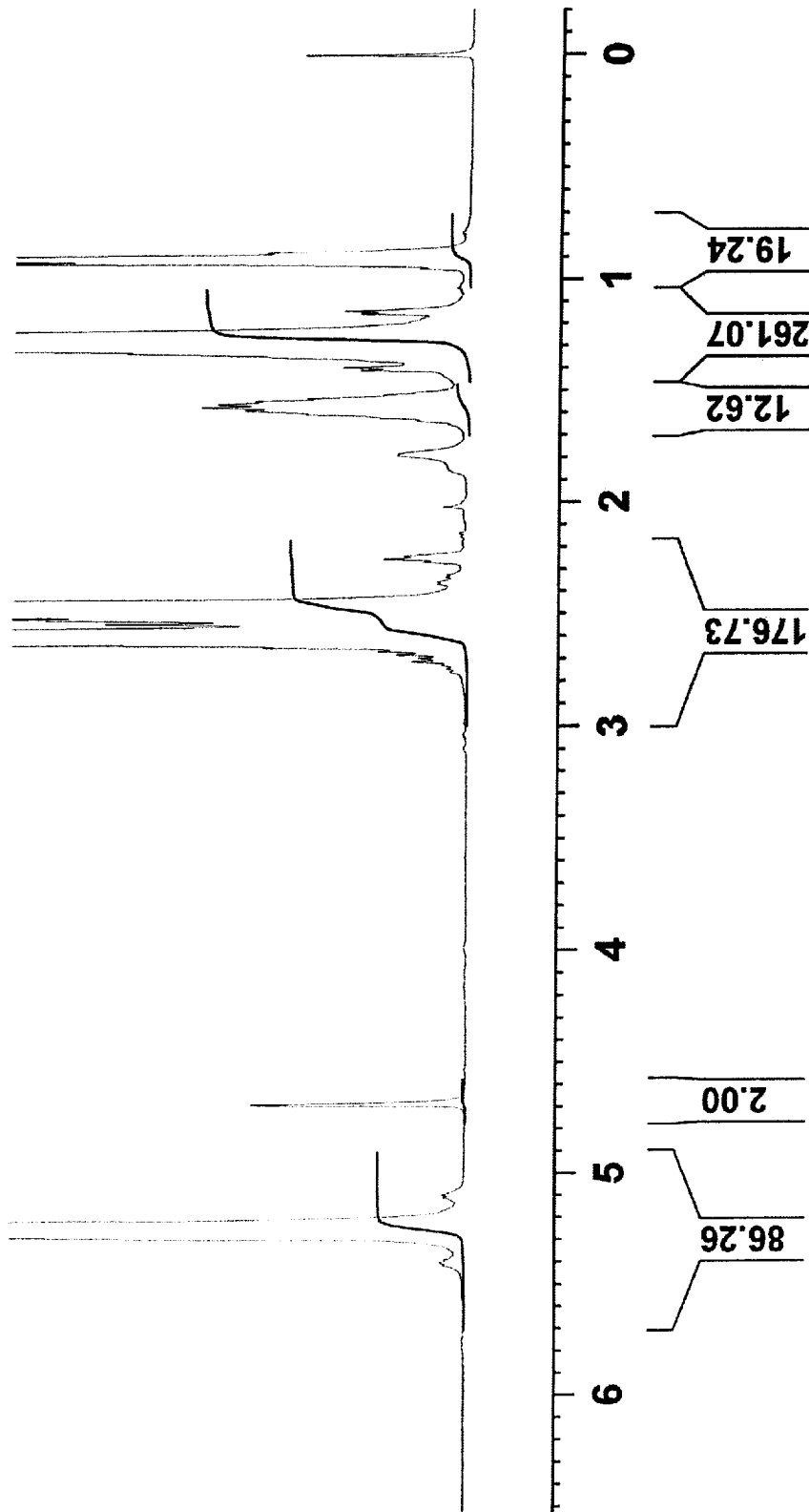
[請求項6] 請求項1～5のいずれかに記載のポリヒドロキシアルカン酸を製造する方法であって、

アルキン基、アルケン基、チオール基、アジド基、またはアリル基を有するアルコールを用いて、ポリヒドロキシアルカン酸を生産可能な微生物を培養する工程を含む、カルボキシ末端に、アルキン基、アルケン基、チオール基、アジド基、又はアリル基が導入されたポリヒ

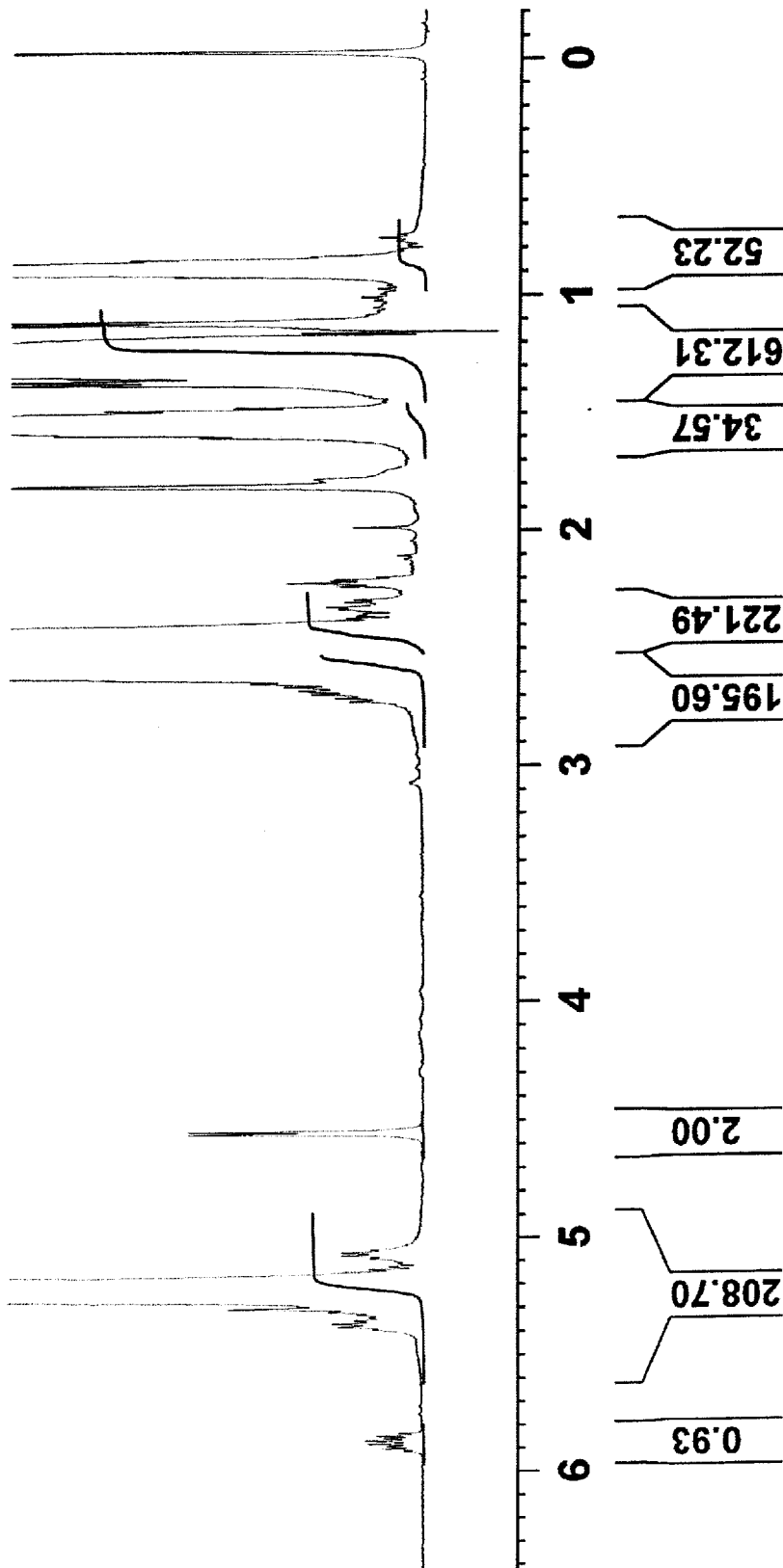
ドロキシアルカン酸の製造方法。

- [請求項7] アルキン基、アルケン基、チオール基、アジド基、またはアリル基を有する炭素数2～8のアルコールを用いて、ポリヒドロキシアルカン酸を生産可能な*Cupriavidus*属に属する微生物を培養する工程を含む、カルボキシ末端に、アルキン基、アルケン基、チオール基、アジド基、又はアリル基が導入されたポリヒドロキシアルカン酸の製造方法。
- [請求項8] 前記アルコールが第一級アルコールである請求項6または7に記載の製造方法。
- [請求項9] 前記微生物が、*Aeromonas*属、*Ralstonia*属または*Pseudomonas*属由来のポリヒドロキシアルカン酸合成酵素をコードする遺伝子を有する微生物である請求項6～8のいずれかに記載の製造方法。
- [請求項10] 前記微生物が、*Cupriavidus*属に属する微生物である請求項8または9に記載の製造方法。
- [請求項11] 前記微生物が、*Cupriavidus necator*を宿主とする形質転換体である請求項7または10に記載の製造方法。
- [請求項12] 請求項1～5のいずれか1項に記載のポリヒドロキシアルカン酸の末端のアルキン基、アルケン基、チオール基、アジド基、またはアリル基がさらに化学修飾された化合物。
- [請求項13] 請求項1～5のいずれか1項に記載のポリヒドロキシアルカン酸、または請求項12に記載の化合物を含有する成形体。

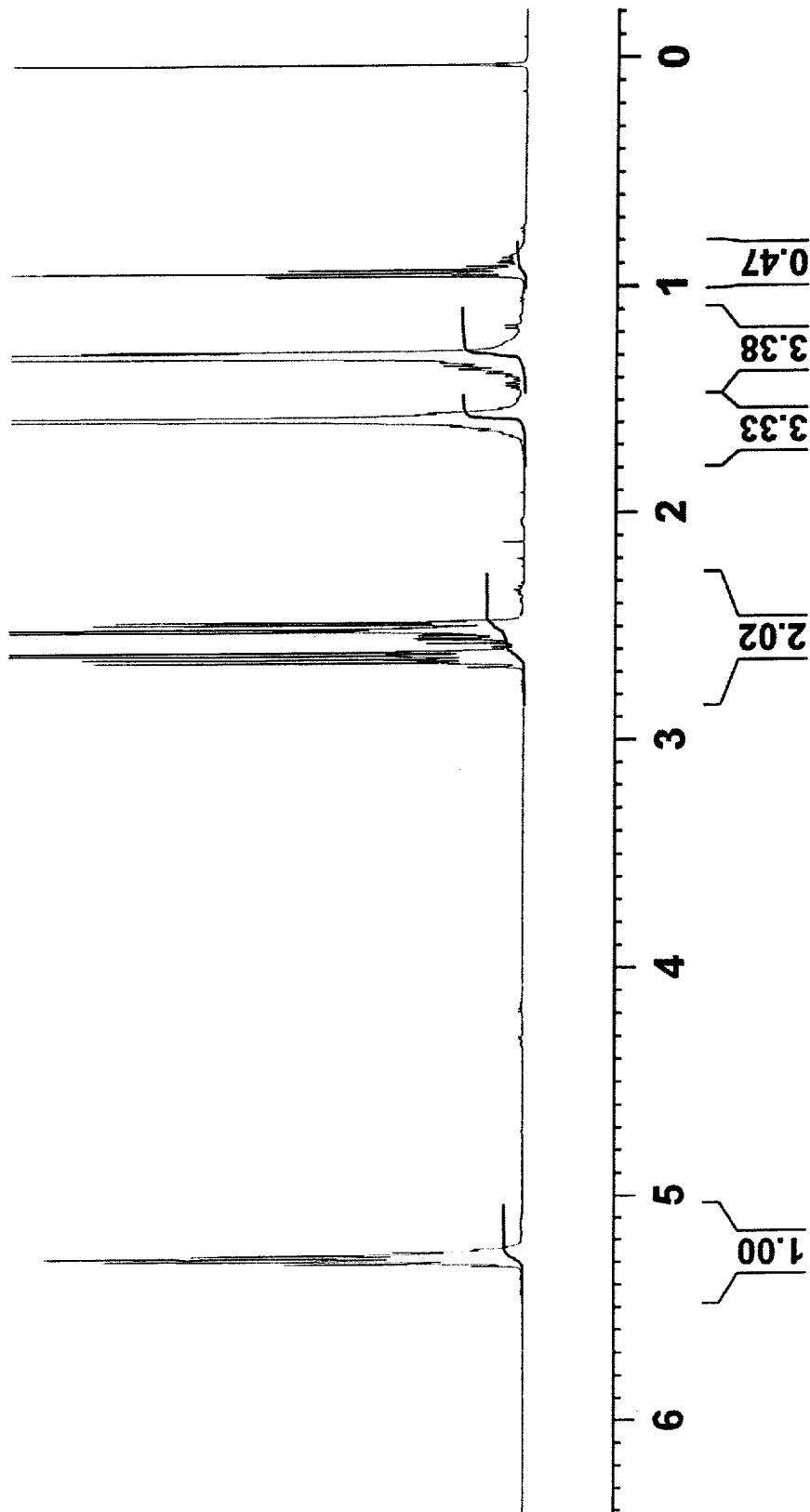
[図1]



[2]



[図3]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/088424

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P7/42(2006.01)i, C08G63/00(2006.01)i, C08G63/685(2006.01)i, C08G63/688(2006.01)i, C08G63/78(2006.01)i, C08G63/82(2006.01)i, C12P7/62(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12P7/42, C08G63/00, C08G63/685, C08G63/688, C08G63/78, C08G63/82, C12P7/62

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2017
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2017	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2017

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII),
CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS/WPIX (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HYAKUTAKE Manami, et al., "Carboxy-terminal modification of polyhydroxyalkanoate (PHA) via alcoholysis reaction catalyzed by Class IV PHA synthase", Polymer Degradation and Stability, 2015, Vol.117, pp.90-96, particularly, pp.91, 95-96	1-13
A	BABINOT Julien, et al., "Controlled Synthesis of Well Defined Poly(3-hydroxyalkanoate)s-based Amphiphilic Diblock Copolymers Using Click Chemistry", Macromol. Chem. Phys., 2011, Vol.212, pp.278-285, particularly, Abstract	1-13

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
02 March 2017 (02.03.17)

Date of mailing of the international search report
28 March 2017 (28.03.17)

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/JP2016/088424

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0052946 A1 (IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES PLC), 02 June 1982 (02.06.1982), claims 1 to 13 & JP 57-119949 A	1-13
A	HORI Yoji, et al., "A Novel Biodegradable Poly(urethane ester) Synthesized from Poly (3-hydroxybutyrate) Segments", Macromolecules, 1992, Vol.25, pp.5117-5118, entire document	1-13
A	HUYNH Vien T., et al., "Thiol-yne and Thiol-ene 'Click' Chemistry as a Tool for a Variety of Platinum Drug Delivery Carriers, from Statistical Copolymers to Crosslinked Micelles", Biomacromolecules, 2011, Vol.12, pp.1738-1751, particularly, abstract, Scheme 1	1-13
A	WO 2015/115619 A1 (Kaneka Corp.), 06 August 2015 (06.08.2015), paragraph [0041]; claims 1 to 22 & US 2017/0009221 A & EP 3101129 A1	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/088424

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
See extra sheet.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/088424

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

The invention of claims 1-13 relates to polyhydroxyalkanoic acids wherein an alkyne group, an alkene group, a mercaptoalkyl group (a thiol group), an azide group or an allyl group is bonded to a terminal carboxy group.

These polyhydroxyalkanoic acids have a common technical feature that is introduction of a functional group into a terminal carboxy group.

However, the above-said technical feature cannot be considered to be a special technical feature, since the technical feature does not make a contribution over the prior art in the light of the contents disclosed in the document 1.

In addition, there is no other same or corresponding special technical feature among these polyhydroxyalkanoic acids.

Accordingly, the above-said respective claims are classified into five inventions each of which has a special technical feature indicated below.

(Invention group 1) A part of the invention of claims 1-13, which is related to a polyhydroxyalkanoic acid wherein an alkyne group is bonded to a terminal carboxy group

[STF1] A polyhydroxyalkanoic acid wherein an alkyne group is bonded to a terminal carboxy group

(Invention group 2) A part of the invention of claims 1-13, which is related to a polyhydroxyalkanoic acid wherein an alkene group is bonded to a terminal carboxy group

[STF2] A polyhydroxyalkanoic acid wherein an alkene group is bonded to a terminal carboxy group

(Invention group 3) A part of the invention of claims 1-13, which is related to a polyhydroxyalkanoic acid wherein a mercaptoalkyl group (a thiol group) is bonded to a terminal carboxy group

[STF3] A polyhydroxyalkanoic acid wherein a mercaptoalkyl group (a thiol group) is bonded to a terminal carboxy group

(Invention group 4) A part of the invention of claims 1-13, which is related to a polyhydroxyalkanoic acid wherein an azide group is bonded to a terminal carboxy group

[STF4] A polyhydroxyalkanoic acid wherein an azide group is bonded to a terminal carboxy group

(Invention group 5) A part of the invention of claims 1 and 4-13, which is related to a polyhydroxyalkanoic acid wherein an allyl group is bonded to a terminal carboxy group

[STF5] A polyhydroxyalkanoic acid wherein an allyl group is bonded to a terminal carboxy group

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12P7/42(2006.01)i, C08G63/00(2006.01)i, C08G63/685(2006.01)i, C08G63/688(2006.01)i,
C08G63/78(2006.01)i, C08G63/82(2006.01)i, C12P7/62(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12P7/42, C08G63/00, C08G63/685, C08G63/688, C08G63/78, C08G63/82, C12P7/62

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	1971-2017年
日本国実用新案登録公報	1996-2017年
日本国登録実用新案公報	1994-2017年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Cplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS/WPIX (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	HYAKUTAKE Manami, et al., "Carboxy-teminal modification of polyhydroxyalkanoate (PHA) via alcoholysis reaction catalyzed by Class IV PHA synthase", Polymer Degradation and Stability, 2015, Vol.117, pp.90-96, 特に pp.91,95-96	1-13

☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

02.03.2017

国際調査報告の発送日

28.03.2017

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鳥居 敬司

4 B

4 0 4 5

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	BABINOT Julien, et al., "Controlled Synthesis of Well Defined Poly(3-hydroxyalkanoate)s-based Amphiphilic Diblock Copolymers Using Click Chemistry", Macromol. Chem. Phys., 2011, Vol.212, pp.278-285, 特に Abstract	1-13
A	EP 0052946 A1 (IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES PLC) 1982.06.02, claims 1-13 & JP 57-119949 A	1-13
A	HORI Yoji, et al., "A Novel Biodegradable Poly(urethane ester) Synthesized from Poly(3-hydroxybutyrate) Segments", Macromolecules, 1992, Vol.25, pp.5117-5118, entire document	1-13
A	HUYNH Vien T., et al., "Thiol-yne and Thiol-ene 'Click' Chemistry as a Tool for a Variety of Platinum Drug Delivery Carries, from Statistical Copolymers to Crosslinked Micelles", Biomacromolecules, 2011, Vol.12, pp.1738-1751, 特に abstract, Scheme 1	1-13
A	WO 2015/115619 A1 (株式会社カネカ) 2015.08.06, [0041]、請求項1～22 & US 2017/0009221 A & EP 3101129 A1	1-13

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（P C T 17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求項 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☐ 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってP C T 規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。
特別ページ参照。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

請求項1～13は、カルボキシ末端に、アルキン基、アルケン基、メルカプトアルキル基（チオール基）、アジド基又はアリル基が結合しているポリヒドロキシアルカン酸に係る発明である。

各ポリヒドロキシアルカン酸は、カルボキシ末端に官能基が導入されているという共通の技術的特徴を有している。

しかしながら、当該技術的特徴は、文献1の開示内容に照らして、先行技術に対する貢献をもたらすものではないから、当該技術的特徴は、特別な技術的特徴とはいえない。また、これらのポリヒドロキシアルカン酸の間に、他に同一の又は対応する特別な技術的特徴は存在しない。

したがって、上記請求項は、各々下記の特別な技術的特徴を有する5の発明に区分される。

（発明1）請求項1～13のうち、カルボキシ末端にアルキン基が結合しているポリヒドロキシアルカン酸に係る発明

〔S T F 1〕カルボキシ末端にアルキン基が結合しているポリヒドロキシアルカン酸

（発明2）請求項1～13のうち、カルボキシ末端にアルケン基が結合しているポリヒドロキシアルカン酸に係る発明

〔S T F 2〕カルボキシ末端にアルケン基が結合しているポリヒドロキシアルカン酸

（発明3）請求項1～13のうち、カルボキシ末端にメルカプトアルキル基（チオール基）が結合しているポリヒドロキシアルカン酸に係る発明

〔S T F 3〕カルボキシ末端にメルカプトアルキル基（チオール基）が結合しているポリヒドロキシアルカン酸

（発明4）請求項1～13のうち、カルボキシ末端にアジド基が結合しているポリヒドロキシアルカン酸に係る発明

〔S T F 4〕カルボキシ末端にアジド基が結合しているポリヒドロキシアルカン酸

（発明5）請求項1、4～13のうち、カルボキシ末端にアリル基が結合しているポリヒドロキシアルカン酸に係る発明

〔S T F 5〕カルボキシ末端にアリル基が結合しているポリヒドロキシアルカン酸