【公報種別】特許法第１７条の２の規定による補正の掲載
【部門区分】第１部門第１区分
【発行日】平成21年8月13日(2009.8.13)

【公開番号】特開2008-29218(P2008-29218A)
【公開日】平成20年2月14日(2008.2.14)
【年通号数】公開・登録公報2008-006
【出願番号】特願2006-203401(P2006-203401)
【国際特許分類】
Ｃ１２Ｎ　1/21　(2006.01)
Ｃ１２Ｐ　7/62　(2006.01)
Ｃ１２Ｎ　15/09　(2006.01)
【ＦＩ】
Ｃ１２Ｎ　1/21　ＺＮＡ
Ｃ１２Ｐ　7/62
Ｃ１２Ｎ　15/00　Ａ

【手続補正書】
【提出日】平成21年6月29日(2009.6.29)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
以下に示す（ａ）（ｂ）のいずれか一方もしくは両方の特徴を有し、かつ、３－ヒドロキシ酪酸と３－ヒドロキシヘキサン酸のモノマーユニットで構成される共重合ポリエステルの生産能を有するワーテルシア属、カプリアビダス属、ラルストニア属、アルカリゲネス属及びシュードモナス属からなる群より選択される微生物。
（ａ）アセトアセチル－ＣｏＡ還元酵素遺伝子の全部もしくは一部が欠失されたことにより、またはアセトアセチル－ＣｏＡ還元酵素遺伝子の開始コドンより上流１０塩基以内に存在するリボソーム結合部位の塩基配列に少なくとも１塩基以上の置換、欠失もしくは挿入がなされたことにより、アセトアセチル－ＣｏＡ還元酵素活性が０．３Ｕ／ｍｇ蛋白質以下である。
（ｂ）β－ケトチオラーゼ遺伝子のＤＮＡ配列に少なくとも１塩基以上の置換、欠失もしくは挿入がなされたことにより、β－ケトチオラーゼ活性が欠損又は減少されている。
【請求項２】
ワーテルシア・ユートロファであることを特徴とする、請求項１に記載の微生物。
【請求項３】
ワーテルシア・ユートロファの染色体上にある、配列番号２４に示す遺伝子配列の８４２番目から２６１１番目までが、配列番号２５に示す遺伝子配列に置換され、配列番号２に示す遺伝子配列の８５番目の塩基アデニンがチミンに置換され、かつ８８番目の塩基チミンがシトシンに置換されている、請求項２に記載の微生物。
【請求項４】
さらに、配列番号２に示す遺伝子配列の１２８８番目の塩基グアニンがチミンに置換され、かつ１２９０番目の塩基グアニンがシトシンに置換されている、請求項３に記載の微生物。
【請求項５】
さらに、配列番号２に示す遺伝子配列の１２８７番目の塩基グアニンがシトシンに置換さ

れ、かつ１２８９番目の塩基アデニンがシトシンに置換されている、請求項３に記載の微生物。
【請求項６】
さらに、配列番号２に示す遺伝子配列の１２９６番目から２０３６番目までを欠失している、請求項３に記載の微生物。
【請求項７】
ワーテルシア・ユートロファの染色体上にある、配列番号２４に示す遺伝子配列の８４２番目から２６１１番目までが、配列番号２５に示す遺伝子配列に置換され、配列番号２に示す遺伝子配列の１２８８番目の塩基グアニンがチミンに置換され、かつ１２９０番目の塩基グアニンがシトシンに置換されている、請求項２に記載の微生物。
【請求項８】
ワーテルシア・ユートロファの染色体上にある、配列番号２４に示す遺伝子配列の８４２番目から２６１１番目までが、配列番号２５に示す遺伝子配列に置換され、配列番号２に示す遺伝子配列の１２８７番目の塩基グアニンがシトシンに置換され、かつ１２８９番目の塩基アデニンがシトシンに置換されている、請求項２に記載の微生物。
【請求項９】
ワーテルシア・ユートロファの染色体上にある、配列番号２４に示す遺伝子配列の８４２番目から２６１１番目までが、配列番号２５に示す遺伝子配列に置換され、かつ配列番号２に示す遺伝子配列の１２９６番目から２０３６番目までを欠失している、請求項２に記載の微生物。
【請求項１０】
３－ヒドロキシ酪酸と３－ヒドロキシヘキサン酸のモノマーユニットで構成される共重合ポリエステルの重合酵素遺伝子を染色体上に保持していることを特徴とする、請求項１～９のいずれか１項に記載の微生物。
【請求項１１】
重合酵素遺伝子がアエロモナス・キャビエ由来の酵素又は変異体をコードするものである、請求項１０に記載の微生物。
【請求項１２】
重合酵素遺伝子が、配列番号１のアミノ酸配列をコードするものである、請求項１１に記載の微生物。
【請求項１３】
配列番号２に示す遺伝子配列の１２８８番目の塩基グアニンがチミンに置換され、かつ１２９０番目の塩基グアニンがシトシンに置換されていることを特徴とする、請求項２～１２のいずれか１項に記載の微生物。
【請求項１４】
配列番号２に示す遺伝子配列の１２８７番目の塩基グアニンがシトシンに置換され、かつ１２８９番目の塩基アデニンがシトシンに置換されていることを特徴とする、請求項２～１３のいずれか１項に記載の微生物。
【請求項１５】
配列番号２に示す遺伝子配列の１２９６番目から２０３６番目までを欠失していることを特徴とする、請求項２～１４のいずれか１項に記載の微生物。
【請求項１６】
配列番号３に示すβ－ケトチオラーゼ遺伝子の１６番目のアミノ酸であるリジンが終止コドンに置換していることを特徴とする、請求項２～１５のいずれか１項に記載の微生物。
【請求項１７】
請求項１～１６のいずれか１項に記載の微生物を用いた、３－ヒドロキシ酪酸と３－ヒドロキシヘキサン酸のモノマーユニットで構成される共重合ポリエステルの製造方法。
【手続補正２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００１１

【補正方法】変更
【補正の内容】
【００１１】
本発明者は、前記課題を解決するために鋭意研究した結果、Ｐ（３ＨＢ－ｃｏ－３ＨＨ）生産能を有する微生物において、そのＰ（３ＨＢ－ｃｏ－３ＨＨ）の基質モノマーの一つである３ヒドロキシ酪酸ＣｏＡの生合成系酵素の活性、特にアセトアセチル－ＣｏＡ還元酵素及びβ－ケトチオラーゼ活性が欠損若しくは減少した変異株を作製し、これを培養して生産されたＰ（３ＨＢ－ｃｏ－３ＨＨ）の３ＨＨ組成を比較したところ、親株よりも高い３ＨＨ組成を示すことを見いだし、これらの知見に基づいて本発明を完成するに至った。
即ち本発明は以下の通りである。
［１］以下に示す（ａ）（ｂ）のいずれか一方もしくは両方の特徴を有し、かつ、３－ヒドロキシ酪酸と３－ヒドロキシヘキサン酸のモノマーユニットで構成される共重合ポリエステルの生産能を有するワーテルシア属、カプリアビダス属、ラルストニア属、アルカリゲネス属及びシュードモナス属からなる群より選択される微生物。
（ａ）アセトアセチル－ＣｏＡ還元酵素遺伝子の全部もしくは一部が欠失されたことにより、またはアセトアセチル－ＣｏＡ還元酵素遺伝子の開始コドンより上流１０塩基以内に存在するリボソーム結合部位の塩基配列に少なくとも１塩基以上の置換、欠失もしくは挿入がなされたことにより、アセトアセチル－ＣｏＡ還元酵素活性が０．３Ｕ／ｍｇ蛋白質以下である。
（ｂ）β－ケトチオラーゼ遺伝子のＤＮＡ配列に少なくとも１塩基以上の置換、欠失もしくは挿入がなされたことにより、β－ケトチオラーゼ活性が欠損又は減少されている。
［２］ワーテルシア・ユートロファであることを特徴とする、［１］に記載の微生物。
［３］ワーテルシア・ユートロファの染色体上にある、配列番号２４に示す遺伝子配列の８４２番目から２６１１番目までが、配列番号２５に示す遺伝子配列に置換され、配列番号２に示す遺伝子配列の８５番目の塩基アデニンがチミンに置換され、かつ８８番目の塩基チミンがシトシンに置換されている、［２］に記載の微生物。
［４］さらに、配列番号２に示す遺伝子配列の１２８８番目の塩基グアニンがチミンに置換され、かつ１２９０番目の塩基グアニンがシトシンに置換されている、［３］に記載の微生物。
［５］さらに、配列番号２に示す遺伝子配列の１２８７番目の塩基グアニンがシトシンに置換され、かつ１２８９番目の塩基アデニンがシトシンに置換されている、［３］に記載の微生物。
［６］さらに、配列番号２に示す遺伝子配列の１２９６番目から２０３６番目までを欠失している、［３］に記載の微生物。
［７］ワーテルシア・ユートロファの染色体上にある、配列番号２４に示す遺伝子配列の８４２番目から２６１１番目までが、配列番号２５に示す遺伝子配列に置換され、配列番号２に示す遺伝子配列の１２８８番目の塩基グアニンがチミンに置換され、かつ１２９０番目の塩基グアニンがシトシンに置換されている、［２］に記載の微生物。
［８］ワーテルシア・ユートロファの染色体上にある、配列番号２４に示す遺伝子配列の８４２番目から２６１１番目までが、配列番号２５に示す遺伝子配列に置換され、配列番号２に示す遺伝子配列の１２８７番目の塩基グアニンがシトシンに置換され、かつ１２８９番目の塩基アデニンがシトシンに置換されている、［２］に記載の微生物。
［９］ワーテルシア・ユートロファの染色体上にある、配列番号２４に示す遺伝子配列の８４２番目から２６１１番目までが、配列番号２５に示す遺伝子配列に置換され、かつ配列番号２に示す遺伝子配列の１２９６番目から２０３６番目までを欠失している、［２］に記載の微生物。
［１０］３－ヒドロキシ酪酸と３－ヒドロキシヘキサン酸のモノマーユニットで構成される共重合ポリエステルの重合酵素遺伝子を染色体上に保持していることを特徴とする、［１］～［９］のいずれか１項に記載の微生物。

［１１］重合酵素遺伝子がアエロモナス・キャビエ由来の酵素又は変異体をコードするものである、［１０］に記載の微生物。
［１２］重合酵素遺伝子が、配列番号１のアミノ酸配列をコードするものである、［１１］に記載の微生物。
［１３］配列番号２に示す遺伝子配列の１２８８番目の塩基グアニンがチミンに置換され、かつ１２９０番目の塩基グアニンがシトシンに置換されていることを特徴とする、［２］～［１２］のいずれか１項に記載の微生物。
［１４］配列番号２に示す遺伝子配列の１２８７番目の塩基グアニンがシトシンに置換され、かつ１２８９番目の塩基アデニンがシトシンに置換されていることを特徴とする、［２］～［１３］のいずれか１項に記載の微生物。
［１５］配列番号２に示す遺伝子配列の１２９６番目から２０３６番目までを欠失していることを特徴とする、［２］～［１４］のいずれか１項に記載の微生物。
［１６］配列番号３に示すβ－ケトチオラーゼ遺伝子の１６番目のアミノ酸であるリジンが終止コドンに置換していることを特徴とする、［２］～［１５］のいずれか１項に記載の微生物。
［１７］［１］～［１６］のいずれか１項に記載の微生物を用いた、３－ヒドロキシ酪酸と３－ヒドロキシヘキサン酸のモノマーユニットで構成される共重合ポリエステルの製造方法。