

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7554177号
(P7554177)

(45)発行日 令和6年9月19日(2024.9.19)

(24)登録日 令和6年9月10日(2024.9.10)

(51)国際特許分類

C 1 2 N	1/21 (2006.01)	F I	C 1 2 N	1/21	Z N A
C 1 2 N	15/09 (2006.01)		C 1 2 N	15/09	Z
C 1 2 P	7/62 (2022.01)		C 1 2 P	7/62	
C 1 2 P	7/625(2022.01)		C 1 2 P	7/625	
C 1 2 N	15/74 (2006.01)		C 1 2 N	15/74	Z

請求項の数 9 (全17頁)

(21)出願番号	特願2021-501778(P2021-501778)	(73)特許権者	000000941 株式会社カネカ 大阪府大阪市北区中之島二丁目3番18号
(86)(22)出願日	令和2年1月29日(2020.1.29)	(74)代理人	110000556 弁理士法人有古特許事務所
(86)国際出願番号	PCT/JP2020/003156	(72)発明者	有川 尚志 兵庫県高砂市高砂町宮前町1-8 株式会社カネカ内
(87)国際公開番号	WO2020/174988	(72)発明者	佐藤 俊輔 兵庫県高砂市高砂町宮前町1-8 株式会社カネカ内
(87)国際公開日	令和2年9月3日(2020.9.3)	(72)発明者	鈴木 崇之
審査請求日	令和4年11月18日(2022.11.18)	審査官	
(31)優先権主張番号	特願2019-36006(P2019-36006)		
(32)優先日	平成31年2月28日(2019.2.28)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)		
(31)優先権主張番号	特願2019-36008(P2019-36008)		
(32)優先日	平成31年2月28日(2019.2.28)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)		

前置審査

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 形質転換微生物、及びポリヒドロキシアルカン酸の製造方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

ポリヒドロキシアルカン酸合成酵素遺伝子を有し、m i n C 遺伝子及びm i n D 遺伝子の発現が強化され、

前記m i n C 遺伝子が、配列番号1に記載のアミノ酸配列で示されるポリペプチド、又は、該アミノ酸配列に対して90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列で示されるポリペプチドをコードする塩基配列を有する遺伝子であり、

前記m i n D 遺伝子が、配列番号2に記載のアミノ酸配列で示されるポリペプチド、又は、該アミノ酸配列に対して90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列で示されるポリペプチドをコードする塩基配列を有する遺伝子である、カブリアビダス・ネカトールの形質転換微生物。

【請求項2】

さらに、m i n E 遺伝子の発現が強化され、

前記m i n E 遺伝子が、配列番号3に記載のアミノ酸配列で示されるポリペプチド、又は、該アミノ酸配列に対して90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列で示されるポリペプチドをコードする塩基配列を有する遺伝子である、請求項1に記載の形質転換微生物。

【請求項3】

請求項1又は2に記載の形質転換微生物を、炭素源の存在下で培養する工程を含む、ポリヒドロキシアルカン酸の製造方法。

【請求項 4】

炭素源が、油脂あるいは脂肪酸を含有する、請求項3に記載のポリヒドロキシアルカン酸の製造方法。

【請求項 5】

炭素源が、糖を含有する、請求項3に記載のポリヒドロキシアルカン酸の製造方法。

【請求項 6】

炭素源が、二酸化炭素を含有する、請求項3に記載のポリヒドロキシアルカン酸の製造方法。

【請求項 7】

ポリヒドロキシアルカン酸が、2種以上のヒドロキシアルカン酸の共重合体である、請求項3～6のいずれか1項に記載のポリヒドロキシアルカン酸の製造方法。 10

【請求項 8】

前記ポリヒドロキシアルカン酸が、3-ヒドロキシヘキサン酸をモノマーユニットとして含有する共重合体である、請求項2に記載のポリヒドロキシアルカン酸の製造方法。

【請求項 9】

前記ポリヒドロキシアルカン酸が、3-ヒドロキシ酪酸と3-ヒドロキシヘキサン酸との共重合体である、請求項8に記載のポリヒドロキシアルカン酸の製造方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、ポリヒドロキシアルカン酸を生産可能な形質転換微生物、及び、当該形質転換微生物を用いたポリヒドロキシアルカン酸の製造方法に関する。 20

【背景技術】**【0002】**

環境問題、食糧問題、健康及び安全に対する意識の高まり、天然又は自然志向の高まりなどを背景に、微生物を利用した物質製造（発酵生産、バイオ変換など）の意義及び重要性が益々高まっており、タンパク質医薬品や遺伝子治療用の核酸などの製造にも、微生物による物質生産が応用されている。例えば、酵母やバクテリアなどの微生物を利用したエタノール、酢酸、医療用タンパク質の生産などが活発に産業応用されている。

【0003】

その一例として、生分解性プラスチックとしての産業利用が期待されているポリヒドロキシアルカン酸（以下、P H Aともいう）の微生物による生産が挙げられる（非特許文献1を参照）。P H Aは、多くの微生物種の細胞にエネルギー蓄積物質として产生、蓄積される熱可塑性ポリエステルであり、生分解性を有している。現在、環境への意識の高まりから非石油由来のプラスチックが注目されるなか、特に、微生物が菌体内に产生、蓄積するP H Aは、自然界の炭素循環プロセスに取り込まれることから生態系への悪影響が小さいと予想されており、その実用化が切望されている。微生物を利用したP H A生産では、例えば、カプリアビダス属細菌に炭素源として糖、植物油脂や脂肪酸を与え、細胞内にP H Aを蓄積させることでP H Aを生産することが知られている（非特許文献2及び3を参照）。 30

【0004】

しかしながら、微生物を利用した物質生産においては、微生物細胞や目的生産物の分離回収工程が煩雑となり、生産コストが高くなることが問題となるケースがある。従って、分離回収効率を向上させることは、生産コストの低減のための大きな課題である。

【先行技術文献】**【非特許文献】****【0005】**

【文献】Anderson A J . , et al . , Int . J . Biol . Macromol . , 12 , 102 - 105 (1990)

【文献】Sato S . , et al . , J . Biosci . Bioeng . , 120 (3)

10

20

30

40

50

) , 2 4 6 - 2 5 1 (2 0 1 5)

【文献】 I n s o m p h u n C . , e t a l . , M e t a b . E n g . , 2 7 , 3 8 - 4 5 (2 0 1 5)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0 0 0 6】

P H A は微生物細胞内に蓄積される。微生物細胞内に蓄積された P H A を生分解性プラスチックとして利用するためには、まず、培養液から微生物細胞を分離回収することになる。微生物細胞の分離回収に際しては、遠心分離機や分離膜等を使用できるが、分離回収の容易さや効率は、微生物細胞の大きさに依存する。即ち、微生物細胞が大きいほど、遠心分離機や分離膜等を用いた分離回収を容易に効率よく実施でき、生産コストの低減につながる。

10

【0 0 0 7】

また、P H A を蓄積した微生物細胞を破碎して P H A 粒子を取り出し、他の細胞成分から分離し、回収する際、P H A 粒子の分離回収の手法は、大きくは有機溶媒系による方法と水系による方法に分けられる。このうち、有機溶媒の使用は高環境負荷、高コストとなるため、工業的には水系による方法が好ましい。水系による方法では、例えば、P H A 粒子を含む細胞破碎液から、遠心分離機や分離膜等によって P H A 粒子を分離することができる。このような場合、分離回収の効率は P H A 粒子の大きさに依存することになる。即ち、微生物細胞内に蓄積された P H A 粒子が大きいほど、遠心分離機や分離膜等を用いた分離回収を容易に実施でき、生産コストの低減につながる。

20

【0 0 0 8】

本発明は、上記現状に鑑み、P H A を蓄積し、かつ大型化が可能な形質転換微生物、及び、当該形質転換微生物を用いたP H A の製造方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0 0 0 9】

本発明者らは鋭意検討した結果、細胞分裂に関与する遺伝子と予想されている m i n C 遺伝子（例えば配列番号 1 に記載のアミノ酸配列をコードする遺伝子）、m i n D 遺伝子（例えば配列番号 2 に記載のアミノ酸配列をコードする遺伝子）、及び、m i n E 遺伝子（例えば配列番号 3 に記載のアミノ酸配列をコードする遺伝子）のうち、特定の遺伝子の発現を強化及び／又は低下させることで、工業的に望ましい P H A 蓄積量を維持しながら、微生物細胞を大型化できることを見出し、本発明に至った。

30

【0 0 1 0】

すなわち本発明は、ポリヒドロキシアルカン酸合成酵素遺伝子を有し、m i n D 遺伝子の発現が強化された、形質転換微生物に関する。また、本発明は、ポリヒドロキシアルカン酸合成酵素遺伝子を有し、m i n C 遺伝子及び m i n D 遺伝子の発現が強化された、形質転換微生物にも関し、該形質転換微生物は、さらに、m i n E 遺伝子の発現が強化されたものであってもよいし、また、m i n E 遺伝子の発現を低下させたものであってもよい。前記形質転換微生物は、カブリアビダス属に属することが好ましく、カブリアビダス・ネカトールの形質転換微生物であることがより好ましい。さらに本発明は、前記形質転換微生物を、炭素源の存在下で培養する工程を含む、ポリヒドロキシアルカン酸の製造方法にも関する。前記炭素源は、油脂あるいは脂肪酸を含有することが好ましく、また、糖を含有することが好ましく、あるいは、二酸化炭素を含有することが好ましい。前記ポリヒドロキシアルカン酸は、2種以上のヒドロキシアルカン酸の共重合体であることが好ましく、3 - ヒドロキシヘキサン酸をモノマーユニットとして含有する共重合体であることがより好ましく、3 - ヒドロキシ酪酸と3 - ヒドロキシヘキサン酸との共重合体であることがさらに好ましい。

40

【発明の効果】

【0 0 1 1】

本発明によれば、P H A を蓄積し、かつ大型化が可能な形質転換微生物、及び、当該形

50

質転換微生物を用いた P H A の製造方法を提供することができる。本発明によると、P H A を蓄積した微生物細胞が大型化するため、培養液からの微生物細胞の分離回収が容易となり、生産コストの低減を実現することができる。

【 0 0 1 2 】

本発明の好適な態様によると、形質転換微生物の大型化が可能であると共に、大粒子径の P H A を蓄積可能な形質転換微生物、及び、当該形質転換微生物を用いた P H A の製造方法を提供することができる。当該態様によると、培養液からの微生物細胞の分離回収が容易となることに加えて、微生物細胞内に大粒子径の P H A 粒子が蓄積されるため、細胞破碎後に細胞成分からの P H A の分離回収が容易となり、生産コストの低減を実現することができる。

10

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 1 3 】

【図 1】培養後の K N K - 0 0 5 株（比較例 1）を撮影した顕微鏡写真（写真中のスケールバーは 10 μm を示す。図 2 ~ 8 についても同様。）

【図 2】培養後の m i n E 遺伝子欠失株（比較例 2）を撮影した顕微鏡写真

【図 3】培養後の m i n C 遺伝子発現強化株（比較例 3）を撮影した顕微鏡写真

【図 4】培養後の m i n D 遺伝子発現強化・m i n E 遺伝子欠失株（比較例 4）を撮影した顕微鏡写真

【図 5】培養後の m i n D 遺伝子発現強化株（実施例 1）を撮影した顕微鏡写真

20

【図 6】培養後の m i n C D 遺伝子発現強化株（実施例 2）を撮影した顕微鏡写真

【図 7】培養後の m i n C D E 遺伝子発現強化株（実施例 3）を撮影した顕微鏡写真

【図 8】培養後の m i n C D 遺伝子発現強化・m i n E 遺伝子欠失株（実施例 4）を撮影した顕微鏡写真

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 1 4 】

以下、本発明の実施形態を詳細に説明する。

本発明に係る形質転換微生物は、P H A 合成酵素遺伝子を有し、m i n C 遺伝子、m i n D 遺伝子及びm i n E 遺伝子のうち、特定の遺伝子の発現を強化及び／又は低下させた、形質転換微生物である。

【 0 0 1 5 】

30

（微生物）

本発明に係る形質転換微生物は、P H A 合成酵素遺伝子を有し、かつ、m i n D 遺伝子の発現が強化されるように形質転換された微生物であってよい。また、P H A 合成酵素遺伝子を有し、かつ、m i n C 遺伝子及びm i n D 遺伝子の発現が強化されるように形質転換された微生物であってもよい。あるいは、P H A 合成酵素遺伝子を有し、かつ、m i n C 遺伝子、m i n D 遺伝子、及びm i n E 遺伝子の発現が強化されるように形質転換された微生物であってもよいし、P H A 合成酵素遺伝子を有し、かつ、m i n C 遺伝子及びm i n D 遺伝子の発現が強化され、かつm i n E 遺伝子の発現が低下するように形質転換された微生物であってもよい。ただし、m i n C 遺伝子の発現が強化されておらず、m i n D 遺伝子の発現が強化され、かつm i n E 遺伝子の発現が低下するように形質転換された微生物は、本発明の形質転換微生物に含まれない。

40

【 0 0 1 6 】

本発明に係る形質転換微生物の宿主は、P H A 合成酵素遺伝子を有する微生物であれば特に限定されないが、好ましくは、m i n C D 遺伝子またはm i n C D E 遺伝子を有する細菌である。当該細菌としては、例えば、ラルストニア（ R a l s t o n i a ）属、カブリアビダス（ C u p r i a v i d u s ）属、ワウテルシア（ W a u t e r s i a ）属、アエロモナス（ A e r o m o n a s ）属、エシェリキア（ E s c h e r i c h i a ）属、アルカリゲネス（ A l c a l i g e n e s ）属、シュードモナス（ P s e u d o m o n a s ）属等に属する細菌類が好ましい例として挙げられる。安全性及び P H A 生産性の観点から、より好ましくはラルストニア属、カブリアビダス属、アエロモナス属、ワウテルシア

50

属に属する細菌であり、さらに好ましくはカブリアビダス属又はアエロモナス属に属する細菌であり、さらにより好ましくはカブリアビダス属に属する微生物であり、特に好ましくはカブリアビダス・ネカトール (*Cupriavidus necator*) である。

【0017】

本発明に係る形質転換微生物の宿主は、PHA合成酵素遺伝子を本来的に有する野生株であってもよいし、そのような野生株を人工的に突然変異処理して得られる変異株や、あるいは、遺伝子工学的手法により外来のPHA合成酵素遺伝子が導入された菌株であってもよい。外来のPHA合成酵素遺伝子を導入する方法は特に限定されず、宿主の染色体上に遺伝子を直接挿入または置換する方法、宿主が保有するメガプラスミド上に遺伝子を直接挿入または置換する方法、あるいはプラスミド、ファージ、ファージミドなどのベクター上に遺伝子を配置して導入する方法などが選択でき、これらの方法のうち2つ以上を併用しても良い。導入遺伝子の安定性を考慮すると、好ましくは、宿主の染色体上または宿主が保有するメガプラスミド上に遺伝子を直接挿入または置換する方法であり、より好ましくは、宿主の染色体上に遺伝子を直接挿入または置換する方法である。

10

【0018】

(PHA合成酵素遺伝子)

PHA合成酵素遺伝子としては特に限定されないが、ラルストニア属、カブリアビダス属、ワウテルシア属、アルカリゲネス属、アエロモナス属、シュードモナス属、ノルカディア属、クロモバクテリウム属に類する生物に由来するPHA合成酵素遺伝子や、それらの改变体などが挙げられる。前記改变体としては、1以上のアミノ酸残基が欠失、付加、挿入、又は置換されたPHA合成酵素をコードする塩基配列などを用いることができる。例えば、配列番号4～8のいずれかに記載のアミノ酸配列で示されるポリペプチドをコードする塩基配列を有する遺伝子、及び、該アミノ酸配列に対して85%以上の配列相同性を有するアミノ酸配列で示され、かつPHA合成酵素活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を有する遺伝子などが挙げられる。上記配列相同性としては好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、さらに好ましくは97%以上、特に好ましくは99%以上である。

20

【0019】

(PHA)

本発明の形質転換微生物が生産するPHAの種類としては、微生物が生産し得るPHAである限り特に限定されないが、炭素数4～16の3-ヒドロキシアルカン酸から選択される1種のモノマーの単独重合体、炭素数4～16の3-ヒドロキシアルカン酸から選択される1種のモノマーとその他のヒドロキシアルカン酸（例えば、炭素数4～16の2-ヒドロキシアルカン酸、4-ヒドロキシアルカン酸、5-ヒドロキシアルカン酸、6-ヒドロキシアルカン酸など）の共重合体、及び、炭素数4～16の3-ヒドロキシアルカン酸から選択される2種以上のモノマーの共重合体が好ましい。例えば、3-ヒドロキシ酪酸（略称：3HB）のホモポリマーであるP(3HB)、3HBと3-ヒドロキシ吉草酸（略称：3HV）の共重合体P(3HB-co-3HV)、3HBと3-ヒドロキシヘキサン酸（略称：3HH）の共重合体P(3HB-co-3HH)（略称：PHBH）、3HBと4-ヒドロキシ酪酸（略称：4HB）の共重合体P(3HB-co-4HB)、乳酸（略称：LA）を構成成分として含むPHA、例えば3HBとLAの共重合体P(LA-co-3HB)などが挙げられるが、これらに限定されない。この中でも、ポリマーとしての応用範囲が広いという観点から、PHBHが好ましい。なお、生産されるPHAの種類は、目的に応じて、使用する微生物の保有するあるいは別途導入されたPHA合成酵素遺伝子の種類や、その合成に関与する代謝系の遺伝子の種類、培養条件などによって適宜選択しうる。

30

【0020】

(minC遺伝子、minD遺伝子、minE遺伝子)

minC遺伝子、minD遺伝子、及び、minE遺伝子がコードするタンパク質MinC、MinD、及び、MinEは、細菌において協調して細胞分裂を制御する機能を持

40

50

タンパク質である（M i n C D E システム）。例えば大腸菌細胞内においては、M i n D は A T P 依存的に重合体を形成し、さらに M i n C と複合体を形成して、細胞の極から極へと素早く振動することが知られている。M i n C は細胞分裂の際の隔壁形成を阻害する働きを持つ。また、M i n E は M i n C と競合的に M i n D に結合することが知られており、細胞の中央でのみ隔壁形成が生じるように調節する働きを持つ。

【 0 0 2 1 】

前記 m i n C 遺伝子は、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列で示されるポリペプチド（U n i P r o t K B I D Q 0 K F I 3 ）、及び、該アミノ酸配列に対して 85% 以上の配列相同性を有するアミノ酸配列で示されるポリペプチドをコードする塩基配列を有する遺伝子である。上記配列相同性としては好ましくは 90% 以上、より好ましくは 95% 以上、さらに好ましくは 97% 以上、特に好ましくは 99% 以上である。

10

【 0 0 2 2 】

前記 m i n D 遺伝子は、配列番号 2 に記載のアミノ酸配列で示されるポリペプチド（U n i P r o t K B I D Q 0 K F I 4 ）、及び、該アミノ酸配列に対して 85% 以上の配列相同性を有するアミノ酸配列で示されるポリペプチドをコードする塩基配列を有する遺伝子である。上記配列相同性としては好ましくは 90% 以上、より好ましくは 95% 以上、さらに好ましくは 97% 以上、特に好ましくは 99% 以上である。

20

【 0 0 2 3 】

前記 m i n E 遺伝子は、配列番号 3 に記載のアミノ酸配列で示されるポリペプチド（U n i P r o t K B I D Q 0 K F I 5 ）、及び、該アミノ酸配列に対して 85% 以上の配列相同性を有するアミノ酸配列で示されるポリペプチドをコードする塩基配列を有する遺伝子である。上記配列相同性としては好ましくは 90% 以上、より好ましくは 95% 以上、さらに好ましくは 97% 以上、特に好ましくは 99% 以上である。

20

【 0 0 2 4 】

（遺伝子発現強化）

本発明における遺伝子発現の強化とは、対象遺伝子の発現が強化されていない菌株と比較して、対象遺伝子の転写量または対象遺伝子のコードするポリペプチドの発現量が増加している状態を指す。その増加量は特に限定されないが、対象遺伝子の発現が強化されていない菌株と比較して 1 倍超であればよく、好ましくは 1.1 倍以上、より好ましくは 1.2 倍以上、さらに好ましくは 1.5 倍以上、さらにより好ましくは 2 倍以上の増加である。

30

【 0 0 2 5 】

本発明において、各 m i n 遺伝子の発現を強化する方法は特に限定されないが、対象遺伝子を宿主に導入する方法、宿主がゲノム D N A 上に元来有する対象遺伝子の発現量を増強する方法、またはその両方を選択することができる。

【 0 0 2 6 】

対象遺伝子を宿主に導入する方法としては特に限定されないが、宿主の染色体上に対象遺伝子を直接挿入または置換する方法、宿主が保有するメガプラスミド上に対象遺伝子を直接挿入または置換する方法、あるいはプラスミド、ファージ、ファージミドなどのベクター上に対象遺伝子を配置して導入する方法などが選択でき、これらの方法のうち 2 つ以上を併用しても良い。

40

【 0 0 2 7 】

導入遺伝子の安定性を考慮すると、好ましくは、宿主の染色体上または宿主が保有するメガプラスミド上に対象遺伝子を直接挿入または置換する方法であり、より好ましくは、宿主の染色体上に対象遺伝子を直接挿入または置換する方法である。導入する遺伝子を確実に発現させるために、対象遺伝子が、宿主が元来有する「遺伝子発現調節配列」の下流に位置するように導入するか、または、対象遺伝子が、外来の「遺伝子発現調節配列」の下流に位置する形で導入することが好ましい。本発明における「遺伝子発現調節配列」とは、その遺伝子の転写量を制御する塩基配列（例えばプロモーター配列）、及び / または、その遺伝子から転写されたメッセンジャー R N A の翻訳量を調節する塩基配列（例えば

50

シャイン・ダルガノ配列)を含むDNA配列である。「遺伝子発現調節配列」としては、自然界に存在する任意の塩基配列を利用することができるし、人工的に構築または改変された塩基配列を利用しても良い。

【0028】

また、宿主がゲノムDNA上に元来有する対象遺伝子の発現量を増強する方法としては特に限定されないが、対象遺伝子の上流に位置する「遺伝子発現調節配列」を改変する方法、対象遺伝子の上流に外来の「遺伝子発現調節配列」を導入する方法、あるいは、対象遺伝子及び/またはその周辺の塩基配列を改変することにより、転写されたメッセンジャーRNAの安定性を向上させる方法などが挙げられる。

【0029】

「遺伝子発現調節配列」に含まれるプロモーター配列やシャイン・ダルガノ配列としては、例えば、配列番号9~15のいずれかに示される塩基配列、または、これら塩基配列の一部を含む塩基配列などが挙げられるが、特に限定されない。

【0030】

ゲノムDNAの少なくとも一部の置換、欠失、挿入及び/又は付加は、当業者に周知の方法により行うことができる。代表的な方法としてはトランスポゾンと相同組換えの機構を利用した方法(Ohman et al., J. Bacteriol., 162:1068-1074 (1985))や、相同組換えの機構によって起こる部位特異的な組み込みと第二段階の相同組換えによる脱落を原理とした方法(Noti et al., Methods Enzymol., 154:197-217(1987))などがある。また、Bacillus subtilis由来のsacB遺伝子を共存させて、第二段階の相同組換えによつて遺伝子が脱落した微生物株をスクロース耐性株として容易に単離する方法(Schweizer, Mol. Microbiol., 6:1195-1204 (1992)、Lenz et al., J. Bacteriol., 176:4385-4393 (1994))も利用することができる。さらに別の方法として、標的DNAを改変するためのCRISPR/Cas9システムによるゲノム編集技術(Y. Wang et al., ACS Synth Biol. 2016, 5(7):721-732)も利用することができる。CRISPR/Cas9システムでは、ガイドRNA(gRNA)は改変すべきゲノムDNAの塩基配列の一部に結合しうる配列を有しており、Cas9を標的に運ぶ役割をもつ。

【0031】

細胞へのベクターの導入方法としても特に限定されないが、例えば、塩化カルシウム法、エレクトロポレーション法、ポリエチレングリコール法、スフェロプラスト法等が挙げられる。

【0032】

(遺伝子発現の低下)

本発明における「遺伝子発現の低下」とは、対象遺伝子の発現を低下させていない菌株と比較して、対象遺伝子の転写量または対象遺伝子のコードするポリペプチドの発現量が減少している状態を指す。その減少量は特に限定されないが、対象遺伝子の発現を低下させていない菌株による発現量に対して、1倍未満であればよく、好ましくは0.8倍以下、より好ましくは0.5倍以下、さらに好ましくは0.3倍以下、さらにより好ましくは0.2倍以下である。対象遺伝子の転写量または対象遺伝子のコードするポリペプチドの発現量はゼロであってもよい。また、対象遺伝子の塩基配列を改変することなどにより、該遺伝子がコードするポリペプチドが元来の機能を示さない場合も、該遺伝子発現が低下しているとみなすことができる。また、minC遺伝子及びminD遺伝子の発現が強化された本発明の形質転換微生物に対して、当該ポリペプチドの機能を阻害する薬剤やタンパク質などを用いることで対象遺伝子の発現を低下させることもできる。

【0033】

本発明において、遺伝子の発現を低下させる方法は特に限定されないが、対象遺伝子の一部分または全長を欠失させる方法、対象遺伝子の発現に関わる「遺伝子発現調節配列」を改変する方法や、対象遺伝子及び/またはその周辺の塩基配列を改変することにより、転写されたメッセンジャーRNAの安定性を低下させる方法などが挙げられる。塩基配列を改変する方法は特に限定されず、対象遺伝子及び/またはその周辺の塩基配列の少なく

10

20

30

40

50

とも一部の置換、欠失、挿入及び／又は付加などによって実施することができ、当業者に周知の方法により行うことができる。さらには、*m i n C* 遺伝子及び*m i n D* 遺伝子の発現が強化された本発明の形質転換微生物に対してアンチセンス RNA や RNA 干渉法 (RNAi) 、 C R I S P R 干渉法 (C R I S P R i) などを使用することで、対象遺伝子及び／またはその周辺の塩基配列を改変することなく、対象遺伝子の発現を低下させてもよい。

【 0 0 3 4 】

本発明の形質転換微生物を培養することで、菌体内に P H A を蓄積させることができる。本発明の形質転換微生物を培養する方法としては、常法の微生物培養法に従うことができ、適切な炭素源が存在する培地内で培養を行なえばよい。培地組成、炭素源の添加方法、培養スケール、通気攪拌条件や、培養温度、培養時間などは特に限定されない。炭素源は、連続的に、または間欠的に培地に添加することが好ましい。

10

【 0 0 3 5 】

培養時の炭素源としては、本発明の形質転換微生物が資化可能であればどのような炭素源でも使用可能である。特に限定されないが、例えば、グルコース、フルクトース、シュークロースなどの糖類；パーム油やパーム核油（これら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、パーム核油オレインなども含む）、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やその分画油類、あるいはその精製副産物；ラウリン酸、オレイン酸、ステアリン酸、パルミチン酸、ミリニスチン酸などの脂肪酸やそれらの誘導体、あるいはグリセロール等が挙げられる。また、本発明の形質転換微生物が二酸化炭素、一酸化炭素、メタン、メタノール、エタノールなどのガスやアルコール類を利用可能である場合、これらを炭素源として使用することもできる。

20

【 0 0 3 6 】

本発明における P H A の製造では、上記炭素源、炭素源以外の栄養源である窒素源、無機塩類、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。下記に限定されないが、窒素源としては、例えば、アンモニア；塩化アンモニウム、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；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 2 水素カリウム、リン酸水素 2 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。その他の有機栄養源としては、例えば、グリシン、アラニン、セリン、スレオニン、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。

30

【 0 0 3 7 】

培養を適切な時間行なって菌体内に P H A を蓄積させた後、周知の方法を用いて菌体から P H A を回収する。回収方法については特に限定されないが、例えば、培養終了後、培養液から遠心分離機や分離膜等で菌体を分離し、乾燥させた後、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 を抽出し、この P H A を含んだ有機溶剤溶液から濾過等によって細胞成分を除去し、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、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 を回収することができる。また、界面活性剤やアルカリ、酵素などを用いて P H A 以外の細胞成分を水に溶解させた後、濾過や遠心分離によって P H A 粒子を水相から分離し乾燥させて回収することもできる。

40

【 0 0 3 8 】

本発明によると、 P H A を蓄積した大粒径の微生物細胞を得るので、培養液からの微生物細胞の分離を容易に効率よく実施することができる。本発明の好適な態様により製造され得る大粒径の P H A は、前記水系による分離回収が容易に実施できるため好ましい。

【 実施例 】

【 0 0 3 9 】

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。ただし、本発明は、これら実施

50

例に限定されるものではない。なお全体的な遺伝子操作は、例えば Molecular Cloning (Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)) に記載されているように行うことができる。また、遺伝子操作に使用する酵素、クローニング宿主等は、市場の供給者から購入し、その説明に従い使用することができる。なお、酵素としては、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。

【0040】

(製造例1) minE 遺伝子欠失株の作製

まず、遺伝子欠失用プラスミドの作製を行った。作製は以下のように行った。合成オリゴDNAを用いたPCRにより、minE構造遺伝子より上流および下流の塩基配列を有するDNA断片（配列番号16）を得た。このDNA断片を制限酵素SwaIで消化し、得られたDNA断片を、同じくSwaI消化した特開2007-259708号公報に記載のベクターpNS2X-sacBとDNAリガーゼ（Ligation High（東洋紡社製））にて連結し、minE構造遺伝子より上流および下流の塩基配列を有する遺伝子欠失用プラスミドベクターpNS2X-sacB+minEUDを作製した。

【0041】

次に、遺伝子欠失用プラスミドベクターpNS2X-sacB+minEUDを用いて、以下のようにしてminE遺伝子欠失株の作製を行った。

遺伝子欠失用プラスミドベクターpNS2X-sacB+minEUDで大腸菌S17-1株（ATCC47055）を形質転換し、それによって得た形質転換微生物を、KNK-005株とNutrient Agar培地（Difco社製）上で混合培養して接合伝達を行った。KNK-005株は、カブリアビダス・ネカトールH16株の染色体上にアエロモナス・キャビエ由来のPHA合成酵素遺伝子（配列番号6に記載のアミノ酸配列を有するPHA合成酵素をコードする遺伝子）が導入された形質転換体であり、米国特許第7384766号明細書に記載の方法に準じて作成することができる。

【0042】

得られた培養液を、250mg/Lのカナマイシンを含むシモンズ寒天培地（クエン酸ナトリウム2g/L、塩化ナトリウム5g/L、硫酸マグネシウム・7水塩0.2g/L、りん酸二水素アンモニウム1g/L、りん酸水素二カリウム1g/L、寒天15g/L、pH6.8）に播種し、寒天培地上で生育してきた菌株を選択して、プラスミドがKNK-005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社製）で2世代培養した後、15%のシュークロースを含むNutrient Agar培地上に希釀して塗布し、生育してきた菌株をプラスミドが脱落した株として取得した。さらにPCRおよびDNAシーケンサーによる解析により染色体上のminE構造遺伝子の開始コドンから終止コドンまでを欠失した菌株1株を単離した。これによりminE遺伝子欠失株を得た。

【0043】

(製造例2) minC 遺伝子発現強化株の作製

まず、minC遺伝子発現用プラスミドpCUP2-PA-minCの作製を行った。作製は以下のように行った。

【0044】

合成オリゴDNAを用いたPCRにより、プロモーター配列とminC遺伝子配列を有するDNA断片（配列番号17）を得た。このDNA断片を制限酵素MunIおよびSpeIで消化し、得られたDNA断片を、国際公開2007/049716号に記載のプラスミドベクターpCUP2をMunIおよびSpeIで切断したものと連結して、minC遺伝子発現用プラスミドpCUP2-PA-minCを得た。

【0045】

次に、minC遺伝子発現用プラスミドpCUP2-PA-minCをKNK-005株に導入して、minC遺伝子発現強化株を得た。

プラスミドベクターの細胞への導入は以下のように電気導入によって行った。遺伝子導

10

20

30

40

50

入装置は Bi o r a d 社製のジーンパルサーを用い、キュベットは同じく Bi o r a d 社製の gap 0.2 cm を用いた。キュベットに、コンピテント細胞 400 μ l と発現ベクター 20 μ l を注入してパルス装置にセットし、静電容量 25 μ F、電圧 1.5 kV、抵抗値 800 の条件で電気パルスをかけた。パルス後、キュベット内の菌液を Nutrient Broth 培地 (DIFCO 社製) で 30 、3 時間振とう培養し、選択プレート (Nutrient Agar 培地 (DIFCO 社製) 、カナマイシン 100 mg/L) で、30 にて 2 日間培養して、生育してきた min C 遺伝子発現強化株を取得した。

【0046】

(製造例 3) min D 遺伝子発現強化株の作製

まず、min D 遺伝子発現用プラスミド pCUP2 - PA - min D の作製を行った。作製は以下のように行った。

【0047】

合成オリゴ DNA を用いた PCR により、プロモーター配列と min D 遺伝子配列を有する DNA 断片 (配列番号 18) を得た。この DNA 断片を制限酵素 Mung I および Spe I で消化し、得られた DNA 断片を、国際公開 2007/049716 号に記載のプラスミドベクター pCUP2 を Mung I および Spe I で切断したものと連結して、min D 遺伝子発現用プラスミド pCUP2 - PA - min D を得た。

【0048】

次に、min D 遺伝子発現用プラスミド pCUP2 - PA - min D を、製造例 2 と同様の方法で KNK - 005 株に導入し、min D 遺伝子発現強化株を得た。

【0049】

(製造例 4) min C D 遺伝子発現強化株の作製

まず、min C D 遺伝子発現用プラスミド pCUP2 - PA - min C D の作製を行った。作製は以下のように行った。

【0050】

合成オリゴ DNA を用いた PCR により、プロモーター配列と min C D 遺伝子配列を有する DNA 断片 (配列番号 19) を得た。この DNA 断片を制限酵素 Mung I および Spe I で消化し、得られた DNA 断片を、国際公開 2007/049716 号に記載のプラスミドベクター pCUP2 を Mung I および Spe I で切断したものと連結して、min C D 遺伝子発現用プラスミド pCUP2 - PA - min C D を得た。

【0051】

次に、min C D 遺伝子発現用プラスミド pCUP2 - PA - min C D を、製造例 2 と同様の方法で KNK - 005 株に導入し、min C D 遺伝子発現強化株を得た。

【0052】

(製造例 5) min D 遺伝子発現強化及び min E 遺伝子欠失株の作製

製造例 3 で作製した min D 遺伝子発現用プラスミド pCUP2 - PA - min D を、製造例 2 と同様の方法で、製造例 1 で作製した min E 遺伝子欠失株に導入し、min D 遺伝子発現強化及び min E 遺伝子欠失株を得た。

【0053】

(製造例 6) min C D E 遺伝子発現強化株の作製

まず、min C D E 遺伝子発現用プラスミド pCUP2 - PA - min C D E の作製を行った。作製は以下のように行った。

【0054】

合成オリゴ DNA を用いた PCR により、プロモーター配列と min C D E 遺伝子配列を有する DNA 断片 (配列番号 20) を得た。この DNA 断片を制限酵素 Mung I および Spe I で消化し、得られた DNA 断片を、国際公開 2007/049716 号に記載のプラスミドベクター pCUP2 を Mung I および Spe I で切断したものと連結して、min C D E 遺伝子発現用プラスミド pCUP2 - PA - min C D E を得た。

【0055】

次に、min C D E 遺伝子発現用プラスミド pCUP2 - PA - min C D E を、製造

10

20

30

40

50

例2と同様の方法でKNK-005株に導入し、minCDE遺伝子発現強化株を得た。

【0056】

(製造例7) minCD遺伝子発現強化及びminE遺伝子欠失株の作製

製造例4で作製したminCD遺伝子発現用プラスミドpCUP2-PA-minCDを、製造例2と同様の方法で、製造例1で作製したminE遺伝子欠失株に導入し、minCD遺伝子発現強化及びminE遺伝子欠失株を得た。

【0057】

(比較例1) KNK-005株によるPHA生産

下記の条件でKNK-005株を用いた培養検討を行なった。

【0058】

10

(培地)

種母培地の組成は1w/v% Meat-extract、1w/v% Bacto-Tryptone、0.2w/v% Yeast-extract、0.9w/v% Na₂HPO₄・12H₂O、0.15w/v% KH₂PO₄、(pH 6.8)とした。

前培養培地の組成は1.1w/v% Na₂HPO₄・12H₂O、0.19w/v% KH₂PO₄、1.29w/v% (NH₄)₂SO₄、0.1w/v% MgSO₄・7H₂O、2.5w/v% パームオレインオイル、0.5v/v% 微量金属塩溶液(0.1N塩酸に1.6w/v% FeCl₃・6H₂O、1w/v% CaCl₂・2H₂O、0.02w/v% CoCl₂・6H₂O、0.016w/v% CuSO₄・5H₂O、0.012w/v% NiCl₂・6H₂Oを溶かしたもの)とした。炭素源としてパームオレインオイルを10g/Lの濃度で一括添加した。

20

PHA生産培地の組成は0.385w/v% Na₂HPO₄・12H₂O、0.067w/v% KH₂PO₄、0.291w/v% (NH₄)₂SO₄、0.1w/v% MgSO₄・7H₂O、0.5v/v% 微量金属塩溶液(0.1N塩酸に1.6w/v% FeCl₃・6H₂O、1w/v% CaCl₂・2H₂O、0.02w/v% CoCl₂・6H₂O、0.016w/v% CuSO₄・5H₂O、0.012w/v% NiCl₂・6H₂Oを溶かしたもの)とした。

【0059】

(PHA蓄積量割合の測定方法)

PHA蓄積量の割合は次のように測定した。遠心分離によって培養液から菌体を回収、エタノールで洗浄、凍結乾燥し、乾燥菌体を取得し、重量を測定した。得られた乾燥菌体1gに100mLのクロロホルムを加え、室温で一昼夜攪拌して、菌体内のPHAを抽出した。菌体残渣をろ別後、エバポレーターで総容量が30mLになるまで濃縮後、90mLのヘキサンを徐々に加え、ゆっくり攪拌しながら、1時間放置した。析出したPHAをろ別後、50℃で3時間真空乾燥した。乾燥PHAの重量を測定し、乾燥菌体量に対してPHA蓄積量が占める割合を算出した。

30

【0060】

(細胞径の測定方法)

細胞径は次のように測定した。培養後の培養液を65℃で60分間処理し、菌体細胞不活化を行った後、レーザー回折・散乱式粒子径分布測定装置(Microtrac M T 3300 EXII)により解析し、細胞の体積平均径(MV)を測定した。測定は標準的な設定(粒子透過性:透過、粒子屈折率:1.81、粒子形状:非球形、溶媒屈折率:1.333)を行った。

40

【0061】

(PHA粒子径の測定方法)

PHA粒子径は次のように測定した。培養後の培養液を65℃で60分間処理し、菌体細胞不活化を行った後、3.3w/v% ドデシル硫酸ナトリウム水溶液により150倍に希釈し、超音波破碎によりPHA抽出液を得た。超音波破碎にはSMT社製超音波分散機UH-600を用い、最大出力で40秒、4回の処理を行った。得られたPHA抽出液をレーザー回折・散乱式粒子径分布測定装置(Microtrac M T 3300 EXII)

50

)により解析し、P H A 粒子の体積平均径 (M V) を測定した。測定は標準的な設定 (粒子透過性: 透過、粒子屈折率: 1.81、粒子形状: 非球形、溶媒屈折率: 1.333) で行った。

【0062】

(細胞の顕微鏡観察)

細胞の顕微鏡観察は次のように行った。培養後の培養液を適宜希釈し、スライドガラスにのせて乾燥させた後、フクシンによって染色した。染色された細胞を光学顕微鏡によって観察した。

【0063】

(P H A 生産培養)

P H A 生産培養は次のように行った。まず、K N K - 0 0 5 株のグリセロールストック (50 μl) を種母培地 (10 ml) に接種して 24 時間培養し種母培養を行なった。次に種母培養液を、1.8 L の前培養培地を入れた 3 L ジャーファーメンター (丸菱バイオエンジ製 M D L - 3 0 0 型) に 1.0 v / v % 接種した。運転条件は、培養温度 33 、攪拌速度 500 r p m 、通気量 1.8 L / m i n とし、p H は 6.7 ~ 6.8 の間でコントロールしながら 28 時間培養し、前培養を行なった。p H コントロールには 14 % 水酸化アンモニウム水溶液を使用した。

【0064】

次に、前培養液を、2.5 L の P H A 生産培地を入れた 5 L ジャーファーメンター (丸菱バイオエンジ製 M D S - U 5 0 型) に 5.0 v / v % 接種した。運転条件は、培養温度 33 、攪拌速度 420 r p m 、通気量 2.1 L / m i n とし、p H は 6.7 ~ 6.8 の間でコントロールした。p H コントロールには 25 % 水酸化アンモニウム水溶液を使用した。炭素源は断続的に添加した。炭素源としてはパームオレインオイルを使用した。培養は、乾燥菌体量に対する P H A 蓄積量の割合が 90 % 程度に達するまで行った。P H A 蓄積量の割合、細胞径、および P H A 粒子径は前述のように測定した。結果を表 1 に示す。また、前述のように行った細胞の顕微鏡観察時に撮影した写真を図 1 に示す。

【0065】

(比較例 2) m i n E 遺伝子欠失株による P H A 生産

比較例 1 と同様の条件で m i n E 遺伝子欠失株を用いた培養検討を行なった。P H A 蓄積量の割合、細胞径、および P H A 粒子径の測定結果を表 1 に示す。また、前述のように行った細胞の顕微鏡観察写真を図 2 に示す。

【0066】

培養検討の結果、m i n E 遺伝子欠失株の細胞径は、親株である K N K - 0 0 5 株と比較して、ほとんど変化がなかった。

【0067】

(比較例 3) m i n C 遺伝子発現強化株による P H A 生産

比較例 1 と同様の条件で m i n C 遺伝子発現強化株を用いた培養検討を行なった。P H A 蓄積量の割合、細胞径、および P H A 粒子径の測定結果を表 1 に示す。また、前述のように行った細胞の顕微鏡観察写真を図 3 に示す。

【0068】

培養検討の結果、m i n C 遺伝子発現強化株の細胞径は、親株である K N K - 0 0 5 株と比較して減少した。加えて、m i n C 遺伝子発現強化株は P H A 生産性が著しく低下しており、比較例 1 よりも長時間の培養を行ったにも関わらず、P H A 蓄積量の割合は 83 % に留まった。

【0069】

(比較例 4) m i n D 遺伝子発現強化・m i n E 遺伝子欠失株による P H A 生産

比較例 1 と同様の条件で m i n D 遺伝子発現強化・m i n E 遺伝子欠失株を用いた培養検討を行なった。P H A 蓄積量の割合、細胞径、および P H A 粒子径の測定結果を表 1 に示す。また、前述のように行った細胞の顕微鏡観察写真を図 4 に示す。

【0070】

10

20

30

40

50

培養検討の結果、*minD* 遺伝子発現強化・*minE* 遺伝子欠失株の細胞径は、親株である K NK - 005 株と比較して、ほとんど変化がなかった。

【0071】

(実施例1) *minD* 遺伝子発現強化株による PHA 生産

比較例1と同様の条件で*minD* 遺伝子発現強化株を用いた培養検討を行なった。PHA 蓄積量の割合、細胞径、およびPHA 粒子径の測定結果を表1に示す。また、前述のように行った細胞の顕微鏡観察写真を図5に示す。

【0072】

培養検討の結果、*minD* 遺伝子発現強化株の細胞径は、親株である K NK - 005 株と比較して、10%以上増大した。PHA の生産性についても K NK - 005 株と同等であった。

10

【0073】

(実施例2) *minCD* 遺伝子発現強化株による PHA 生産

比較例1と同様の条件で*minCD* 遺伝子発現強化株を用いた培養検討を行なった。PHA 蓄積量の割合、細胞径、およびPHA 粒子径の測定結果を表1に示す。また、前述のように行った細胞の顕微鏡観察写真を図6に示す。

【0074】

培養検討の結果、*minCD* 遺伝子発現強化株の細胞径は、親株である K NK - 005 株と比較して、15%以上増大した。PHA の生産性についても K NK - 005 株と同等であった。また、*minCD* 遺伝子発現強化株によって生産された PHA の粒子径は、K NK - 005 株によって生産された PHA の粒子径と比較して増大した。

20

【0075】

(実施例3) *minCDE* 遺伝子発現強化株による PHA 生産

比較例1と同様の条件で*minCDE* 遺伝子発現強化株を用いた培養検討を行なった。PHA 蓄積量の割合、細胞径、およびPHA 粒子径の測定結果を表1に示す。また、前述のように行った細胞の顕微鏡観察写真を図7に示す。

【0076】

培養検討の結果、*minCDE* 遺伝子発現強化株の細胞径は、親株である K NK - 005 株と比較して、20%以上増大した。また、*minCDE* 遺伝子発現強化株によって生産された PHA の粒子径は、K NK - 005 株によって生産された PHA の粒子径と比較して増大した。

30

【0077】

(実施例4) *minCD* 遺伝子発現強化及び*minE* 遺伝子欠失株による PHA 生産

比較例1と同様の条件で*minCD* 遺伝子発現強化及び*minE* 遺伝子欠失株を用いた培養検討を行なった。PHA 蓄積量の割合、細胞径、およびPHA 粒子径の測定結果を表1に示す。また、前述のように行った細胞の顕微鏡観察写真を図8に示す。

【0078】

培養検討の結果、*minCD* 遺伝子発現強化及び*minE* 遺伝子欠失株の細胞径は、親株である K NK - 005 株と比較して、55%以上増大した。PHA の生産性についても K NK - 005 株とほぼ同等であった。

40

【0079】

なお、比較例および実施例の培養検討によって生産された PHA は PHBH であることを HPLC 分析にて確認した。

【0080】

50

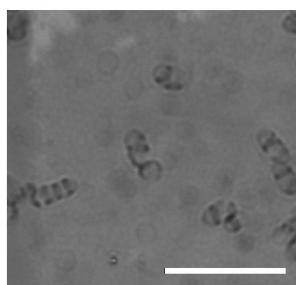
【表 1】

	菌株	乾燥菌体に対する PHA蓄積量の 割合(%)	細胞径 (μm)	PHA粒子径 (μm)
比較例1	KNK-005	90	1.89	1.74
比較例2	minE遺伝子欠失株	90	1.93	1.72
比較例3	minC遺伝子発現強化株	83	1.58	1.34
比較例4	minD遺伝子発現強化・minE遺伝子欠失株	88	1.94	1.71
実施例1	minD遺伝子発現強化株	90	2.09	1.78
実施例2	minCD遺伝子発現強化株	90	2.24	1.94
実施例3	minCDE遺伝子発現強化株	90	2.34	1.87
実施例4	minCD遺伝子発現強化・minE遺伝子欠失株	87	3.00	1.73

【図面】

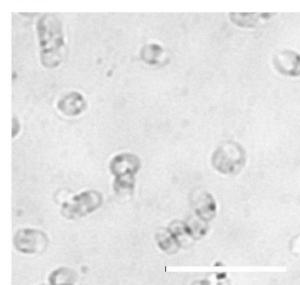
【図 1】

比較例 1



【図 2】

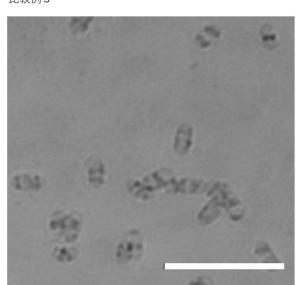
比較例 2



10

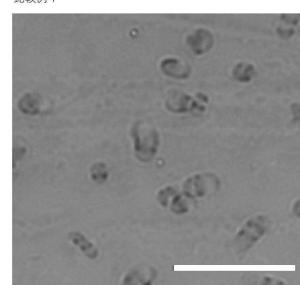
【図 3】

比較例 3



【図 4】

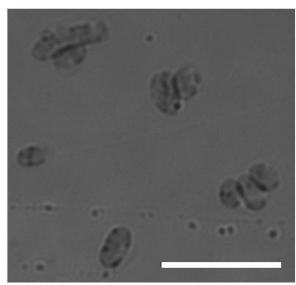
比較例 4



20

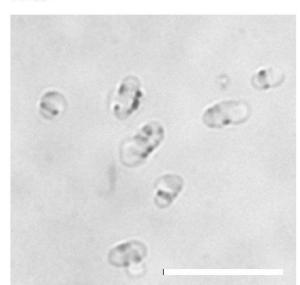
【図 5】

実施例 1



【図 6】

実施例 2



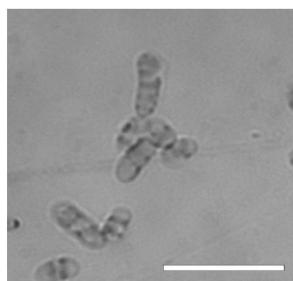
30

40

50

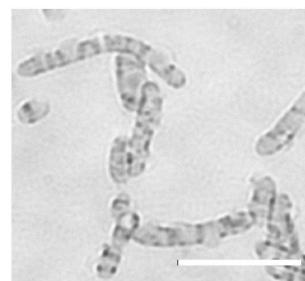
【図 7】

実施例3



【図 8】

実施例4



10

【配列表】

0007554177000001.app

20

30

40

50

フロントページの続き

(56)参考文献 中国特許出願公開第105779488(CN, A)

国際公開第2018/216726(WO, A1)

国際公開第2018/021046(WO, A1)

中国特許出願公開第104762311(CN, A)

生物工学会誌, 2019年02月25日, Vol. 97, No. 2, pp. 66-74

Molecular Microbiology, 1995年, Vol. 18, No. 2, pp. 321-329

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 12 P 7 / 62

C 12 N 1 / 21

C 12 N 15 / 00 - 15 / 90

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / M E D L I N E / B I O S I S (S T N)

G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q

P u b M e d