(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
2020年11月19日(19.11.2020)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2020/230719 A1

(51) 国際特許分類:
C12P 7/42 (2006.01) *C12N 1/19* (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01) *C12N 1/21* (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01) *C12N 9/02* (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2020/018665

(22) 国際出願日： 2020年5月8日(08.05.2020)

(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：
特願 2019-089771 2019年5月10日(10.05.2019) JP

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

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

(74) 代理人: 特許業務法人谷川国際特許事務所 (**TANIGAWA AND PARTNERS, PATENT FIRM**); 〒1020072 東京都千代田区飯田橋一丁目７番１０号山京別館８０１ Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, 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).

(54) **Title:** GENETICALLY MODIFIED MICROORGANISM FOR PRODUCING 3-HYDROXYHEXANEDIOIC ACID, (E)-HEX-2-ENEDIOIC ACID AND/OR HEXANEDIOIC ACID, AND PRODUCTION METHOD FOR SAID CHEMICALS

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

(57) **Abstract:** Disclosed are a genetically modified microorganism capable of producing 3-hydroxyhexanedioic acid, (E)-hex-2-enedioic acid and/or hexanedioic acid at a high yield, and a production method for 3-hydroxyhexanedioic acid, (E)-hex-2-enedioic acid and/or hexanedioic acid using said genetically modified microorganism. The genetically modified microorganism has the ability to produce 3-hydroxyhexanedioic acid, (E)-hex-2-enedioic acid and/or hexanedioic acid, and has been modified so as to disrupt the function of pyruvate kinase and to enhance the activity of phosphoenolpyruvate carboxykinase and the activity of enzymes that catalyze a reaction for generating 3-hydroxyadipyl-CoA by reducing 3-oxoadipyl-CoA.

(57) 要約：要約 ３－ヒドロキシアジピン酸、α－ヒドロムコン酸および／またはアジピン酸を高い収率で生産することが可能な遺伝子改変微生物及び当該遺伝子改変微生物を用いた３－ヒドロキシアジピン酸、α－ヒドロムコン酸および／またはアジピン酸の製造方法が開示されている。遺伝子改変微生物は、３－ヒドロキシアジピン酸、α－ヒドロムコン酸および／またはアジピン酸を製造する能力を有し、かつピルビン酸キナーゼの機能が欠損し、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼの活性および３－オキソアジピル－ＣｏＡを還元して３－ヒドロキシアジピル－ＣｏＡを生成する反応を触媒する酵素の活性が強化されている。

WO 2020/230719 A1

［続葉有］

添付公開書類：

一　国際調査報告（条約第21条(3)）

一　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 ：

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

技術分野

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

背景技術

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

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

[0004] 特許文献１には、代謝経路を改変した微生物を用いた１，３－ブタジエンの製造方法が記載されており、当該文献中では、アセチル－ＣｏＡおよびスクシニル－ＣｏＡから１，３－ブタジエンが生合成される代謝経路における代謝中間体として３－ヒドロキシアジピン酸（３－ヒドロキシアジペート）が記載されている。

[0005] 特許文献２には、代謝経路を改変した微生物を用いたムコン酸の製造方法が記載されており、当該文献中では、アセチル－ＣｏＡおよびスクシニル－ＣｏＡからｔｒａｎｓ，ｔｒａｎｓ－ムコン酸が生合成される代謝経路にお

ける代謝中間体としてα－ヒドロムコン酸（２，３－デヒドロアジペート）が記載されている。

[0006] 特許文献３、４には、非天然の微生物を用いたアジピン酸やヘキサメチレンジアミン（ＨＭＤＡ）の製造方法が記載されており、当該文献中で、これらの物質は、アセチル－ＣｏＡおよびスクシニル－ＣｏＡから３－オキソアジピル－ＣｏＡが合成される反応が生合成経路に含まれる点で共通しているが、３－オキソアジピル－ＣｏＡ以降の生合成経路は別々であると記載されている。さらに、特許文献３では、ＨＭＤＡの製造において、増殖と共役したＨＭＤＡの形成を改善するための追加的な遺伝子欠失としてピルビン酸キナーゼが記載されているが、ピルビン酸キナーゼの欠損が、アジピン酸の生産性向上に関係するとの記載はない。

[0007] また、特許文献１から４に記載された生合成経路では、いずれも３－オキソアジピル－ＣｏＡを３－ヒドロキシアジピル－ＣｏＡへと還元する酵素反応を経由するとの記載がある。

[0008] 特許文献５および特許文献６には、セラチア属微生物を用いた３－ヒドロキシアジピン酸と、α－ヒドロムコン酸の製造方法がそれぞれ記載されている。当該文献中には、特に、アセチル－ＣｏＡおよびスクシニル－ＣｏＡより３－オキソアジピル－ＣｏＡを生じる反応を触媒するアシルトランスフェラーゼの活性を強化することにより、３－ヒドロキシアジピン酸とα－ヒドロムコン酸の生産効率を向上させることが可能であることが開示されているが、ピルビン酸キナーゼに関する記載はない。

[0009] また、特許文献７には、インシリコ分析に基づく微生物の改良方法が開示されており、大腸菌のピルビン酸キナーゼおよびホスホトランスフェラーゼ系酵素をコードする遺伝子であるｐｙｋＦ、ｐｙｋＡ、ｐｔｓＧを欠失させ、嫌気条件下で培養することにより、コハク酸の生産性が向上することが開示されている。

先行技術文献

特許文献

[0010] 特許文献1：特表２０１３－５３５２０３号公報

特許文献2：米国特許出願公開第２０１１／０１２４９１１Ａ１号明細書

特許文献3：特開２０１５－１４６８１０号公報

特許文献4：特表２０１１－５１５１１１号公報

特許文献5：国際公開第２０１７／２０９１０２号

特許文献6：国際公開第２０１７／２０９１０３号

特許文献7：特表２００８－５２７９９１号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0011] 特許文献１または２には、微生物内で３－ヒドロキシアジピン酸またはα－ヒドロムコン酸が生成しうる代謝経路の記載はあるが、代謝を３－ヒドロキシアジピン酸またはα－ヒドロムコン酸で止め、培養液中に分泌させるという記載はない。また、特許文献１から４に記載された３－オキソアジピル－ＣｏＡを３－ヒドロキシアジピル－ＣｏＡへと還元する反応を触媒する酵素をコードする核酸を導入して代謝経路を改変した微生物を用いた場合に、実際に３－ヒドロキシアジピン酸またはα－ヒドロムコン酸が製造できるかどうかの検証はなされていない。特許文献３から６には、３－ヒドロキシアジピン酸、α－ヒドロムコン酸あるいはアジピン酸の生産性の向上に関与する酵素遺伝子の発現強化について開示されているが、発現を強化する酵素遺伝子はいずれも生合成経路においてアセチル－ＣｏＡおよびスクシニル－ＣｏＡより下流の反応に限られ、それらより上流の代謝経路における酵素活性の強化についての記載はない。

[0012] そこで本発明では、３－オキソアジピル－ＣｏＡを基質とした還元反応において優れた活性を示す酵素をコードする核酸を導入、または当該酵素の発現を増強して当該酵素活性を強化した遺伝子改変微生物を基に、さらに上記の上流の代謝経路を改変して、３－ヒドロキシアジピン酸、α－ヒドロムコン酸および／またはアジピン酸を高い収率で製造するための遺伝子改変微生物及び当該改変微生物を用いた物質製造方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0013] 本発明者らは上記目的を達成するため鋭意検討した結果、３－ヒドロキシアジピン酸、α－ヒドロムコン酸および／またはアジピン酸を製造する能力を有し、かつピルビン酸キナーゼの機能が欠損し、かつホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ、および３－オキソアジピル－ＣｏＡを還元して３－ヒドロキシアジピル－ＣｏＡを生成する反応を触媒する酵素の活性が強化された遺伝子改変微生物が３－ヒドロキシアジピン酸、α－ヒドロムコン酸および／またはアジピン酸の優れた生産能を持つことを見出し、本発明を完成させるに至った。

[0014] すなわち、本発明は以下のものを提供する。

（１）３－ヒドロキシアジピン酸、α－ヒドロムコン酸および／またはアジピン酸を製造する能力を有し、かつピルビン酸キナーゼの機能が欠損し、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼの活性および３－オキソアジピル－ＣｏＡを還元して３－ヒドロキシアジピル－ＣｏＡを生成する反応を触媒する酵素の活性が強化された、遺伝子改変微生物。

（２）さらにホスホトランスフェラーゼ系酵素の機能が欠損した、（１）に記載の遺伝子改変微生物。

（３）前記３－オキソアジピル－ＣｏＡを還元して３－ヒドロキシアジピル－ＣｏＡを生成する反応を触媒する酵素が、以下（ａ）～（ｃ）のいずれかである（１）または（２）に記載の遺伝子改変微生物。

（ａ）配列番号１～７のいずれかのアミノ酸配列からなるポリペプチド

（ｂ）配列番号１～７のいずれかのアミノ酸配列において、１もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ３－オキソアジピル－ＣｏＡを還元して３－ヒドロキシアジピル－ＣｏＡを生成する反応を触媒する酵素活性を有するポリペプチド

（ｃ）配列番号１～７のいずれかのアミノ酸配列に対して７０％以上の配列同一性を有し、かつ３－オキソアジピル－ＣｏＡを還元して３－ヒドロキシアジピル－ＣｏＡを生成する反応を触媒する酵素活性を有するポリペプチ

ド

（４）（１）から（３）のいずれかに記載の遺伝子改変微生物を培養する工程を含む、３－ヒドロキシアジピン酸、α－ヒドロムコン酸および／またはアジピン酸の製造方法。

発明の効果

[0015] ３－ヒドロキシアジピン酸、α－ヒドロムコン酸および／またはアジピン酸を製造する能力を有し、かつピルビン酸キナーゼの機能が欠損し、かつホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼの活性および３－オキソアジピル－ＣｏＡを還元して３－ヒドロキシアジピル－ＣｏＡを生成する反応を触媒する酵素の活性が強化された遺伝子改変微生物は、当該遺伝子を改変していない親株の微生物と比較して、３－ヒドロキシアジピン酸、α－ヒドロムコン酸および／またはアジピン酸を高い収率で生産することができる。

発明を実施するための形態

[0016] 本発明では、３－ヒドロキシアジピン酸、α－ヒドロムコン酸および／またはアジピン酸を製造する能力を有する微生物において、当該微生物のピルビン酸キナーゼの機能を欠損させ、かつホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼの活性および３－オキソアジピル－ＣｏＡを還元して３－ヒドロキシアジピル－ＣｏＡを生成する反応を触媒する酵素の活性を強化させると、３－ヒドロキシアジピン酸、α－ヒドロムコン酸および／またはアジピン酸を高い収率で製造できることを見出した。

[0017] 以下、本明細書中では３－オキソアジピル－ＣｏＡを還元して３－ヒドロキシアジピル－ＣｏＡを生成する反応を触媒する酵素を「３－オキソアジピル－ＣｏＡレダクターゼ」と記載する場合がある。また、本明細書ではホスホエノールピルビン酸をＰＥＰ、３－ヒドロキシアジピン酸を３ＨＡ、α－ヒドロムコン酸をＨＭＡ、アジピン酸をＡＤＡと略すことがある。

[0018] 本発明でホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼの活性および３－オキソアジピル－ＣｏＡを還元して３－ヒドロキシアジピル－ＣｏＡを生成する反応を触媒する酵素の活性を強化するとは、これらのポリペプチドをコ

ードする核酸を宿主微生物の菌体外から菌体内へと導入したり、当該ポリペプチドをコードする核酸のコピー数を増加させたり、当該ポリペプチドのコーディング領域上流のプロモーター領域やリボソーム結合配列を改変させたりする方法などが挙げられる。これらの方法は単独で行ってもよいし、組み合わせてもよい。核酸を導入する方法は特に限定されず、微生物内で自律複製可能な発現ベクターに当該核酸を組み込み宿主微生物に導入する方法や、微生物のゲノムに当該核酸を組み込む方法などを用いることができる。

[0019] 導入する核酸は１種類でも複数種類でもよい。また核酸の導入と発現の増強を組み合わせてもよい。

[0020] 本発明で発現させるポリペプチドをコードする核酸を発現ベクターまたは宿主微生物ゲノムに組み込む場合、当該発現ベクターまたはゲノム組み込み用核酸はプロモーター、リボソーム結合配列、発現させるポリペプチドをコードする核酸、転写終結配列により構成されていることが好ましい。また、プロモーター活性を制御する遺伝子が含まれていてもよい。

[0021] 本発明で用いるプロモーターは、宿主微生物内で酵素を発現させられるものであれば特に限定されないが、例えばｇａｐプロモーター、ｔｒｐプロモーター、ｌａｃプロモーター、ｔａｃプロモーター、Ｔ７プロモーターなどが挙げられる。

[0022] 本発明で発現ベクターを用いて核酸の導入や、ポリペプチドの発現の増強を行う場合は、当該微生物中で自律複製可能であれば特に限定されないが、例えばｐＢＢＲ１ＭＣＳベクター、 ｐＢＲ３２２ベクター、ｐＭＷベクター、ｐＥＴベクター、ｐＲＳＦベクター、ｐＣＤＦベクター、ｐＡＣＹＣベクター、および上述のベクターの派生型などが挙げられる。

[0023] 本発明でゲノム組み込み用核酸を用いて核酸の導入や、ポリペプチドの発現の増強を行う場合は、部位特異的相同組換えを用いて導入する。部位相同組換えの方法は特に限定されないが、例えばλ Ｒｅｄ レコンビナーゼおよびＦＬＰレコンビナーゼを用いる方法（Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ．２０００ Ｊｕｎ ６； ９７（１２）：６６４０－６６

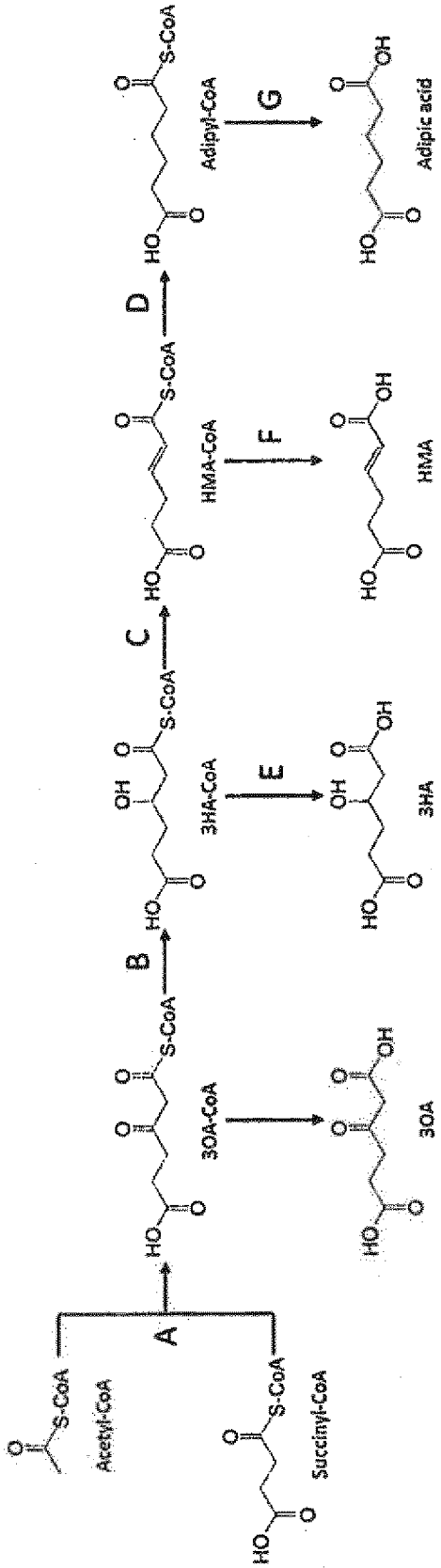
４５．）、λ　ＲｅｄレコンビナーゼおよびｓａｃＢ遺伝子を用いる方法（Ｂｉｏｓｃｉ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ　Ｂｉｏｃｈｅｍ．２００７　Ｄｅｃ；７１（１２）：２９０５－１１．）が挙げられる。

[0024] 発現ベクターまたはゲノム組み込み用核酸の導入方法は、微生物に核酸を導入する方法であれば特に限定されないが、例えばカルシウムイオン法（Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ，５３，１５９（１９７０））、エレクトロポレーション法（ＮＭ　Ｃａｌｖｉｎ，ＰＣ　Ｈａｎａｗａｌｔ．Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ，１７０　（１９８８），ｐｐ．２７９６－２８０１）などが挙げられる。

[0025] 下記スキーム１は、３－ヒドロキシアジピン酸、α－ヒドロムコン酸、および／またはアジピン酸を生産するために必要な反応経路の例を示している。ここで、反応Ａは、アセチル－ＣｏＡおよびスクシニル－ＣｏＡから３－オキソアジピル－ＣｏＡおよび補酵素Ａを生成する反応を示す。反応Ｂは、３－オキソアジピル－ＣｏＡを還元して３－ヒドロキシアジピル－ＣｏＡを生成する反応を示す。反応Ｃは、３－ヒドロキシアジピル－ＣｏＡから２，３－デヒドロアジピル－ＣｏＡを生成する反応を示す。反応Ｄは、２，３－デヒドロアジピル－ＣｏＡからアジピル－ＣｏＡを生成する反応を示す。反応Ｅは３－ヒドロキシアジピル－ＣｏＡから３－ヒドロキシアジピン酸を生成する反応を示す。反応Ｆは、２，３－デヒドロアジピル－ＣｏＡからα－ヒドロムコン酸を生成する反応を示す。反応Ｇは、アジピル－ＣｏＡからアジピン酸を生成する反応を示す。

[0026]

[化1]


Acetyl-CoA
Succinyl-CoA
A
3OA-CoA
3OA
B
3HA-CoA
3HA
E
C
HMA-CoA
HMA
F
D
Adipyl-CoA
Adipic acid
G
S-CoA
HO
OH

[0027] 微生物が、３－ヒドロキシアジピン酸、α－ヒドロムコン酸、および／またはアジピン酸を製造する能力を有している場合、上記スキーム１に示す生合成経路のうち、少なくとも反応Ａを触媒する酵素を有していることが知られている。３－オキソアジピルＣｏＡから３－ヒドロキシアジピン酸、α－ヒドロムコン酸またはアジピン酸を生成する反応については、スキーム１に示す生合成経路を有していることが好ましい。つまり、本発明の遺伝子改変微生物が、３－ヒドロキシアジピン酸を製造する能力を有している場合、遺伝子改変微生物の宿主微生物としては、アセチル－ＣｏＡおよびスクシニル－ＣｏＡから３－オキソアジピル－ＣｏＡおよび補酵素Ａを生成（反応Ａ）する能力、３－オキソアジピル－ＣｏＡを還元して３－ヒドロキシアジピル－ＣｏＡを生成（反応Ｂ）する能力、３－ヒドロキシアジピル－ＣｏＡから３－ヒドロキシアジピン酸を生成（反応Ｅ）する能力を有していることが好ましい。また、本発明の遺伝子改変微生物が、α－ヒドロムコン酸を製造する能力を有している場合、遺伝子改変微生物の宿主微生物としては、アセチル－ＣｏＡおよびスクシニル－ＣｏＡから３－オキソアジピル－ＣｏＡおよび補酵素Ａを生成（反応Ａ）する能力、３－オキソアジピル－ＣｏＡを還元して３－ヒドロキシアジピル－ＣｏＡを生成（反応Ｂ）する能力、３－ヒドロキシアジピル－ＣｏＡから２，３－デヒドロアジピル－ＣｏＡを生成（反応Ｃ）する能力、２，３－デヒドロアジピル－ＣｏＡからα－ヒドロムコン酸を生成（反応Ｆ）する能力を有していることが好ましい。さらに、本発明の遺伝子改変微生物が、アジピン酸を製造する能力を有している場合、遺伝子改変微生物の宿主微生物としては、アセチル－ＣｏＡおよびスクシニル－ＣｏＡから３－オキソアジピル－ＣｏＡおよび補酵素Ａを生成（反応Ａ）する能力、３－オキソアジピル－ＣｏＡを還元して３－ヒドロキシアジピル－ＣｏＡを生成（反応Ｂ）する能力、３－ヒドロキシアジピル－ＣｏＡから２，３－デヒドロアジピル－ＣｏＡを生成（反応Ｃ）する能力、２，３－デヒドロアジピル－ＣｏＡからアジピル－ＣｏＡを生成（反応Ｄ）する能力、アジピル－ＣｏＡからアジピン酸を生成（反応Ｇ）する能力を有していること

が好ましい。

[0028] これらの生合成経路を有する微生物を宿主微生物に対して、ピルビン酸キナーゼの機能を欠損させ、かつＰＥＰカルボキシキナーゼの活性および３－オキソアジピル－ＣｏＡを還元して３－ヒドロキシアジピル－ＣｏＡを生成する反応を触媒する酵素の活性を強化すれば、３－ヒドロキシアジピン酸、α－ヒドロムコン酸、および／またはアジピン酸を高生産することができる遺伝子改変微生物を取得することができる。

[0029] ３－ヒドロキシアジピン酸を製造する能力を元来有する微生物としては、以下の種属に属する微生物が挙げられる。

Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｆｅｒｇｕｓｏｎｉｉ、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉなどのＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ属。

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

Ｈａｆｎｉａ ａｌｖｅｉなどのＨａｆｎｉａ属。

Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍａｃｅｔｏａｃｉｄｏｐｈｉｌｕｍ、Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ ａｃｅｔｏｇｌｕｔａｍｉｃｕｍ、Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ ａｍｍｏｎｉａｇｅｎｅｓ、Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｇｌｕｔａｍｉｃｕｍなどのＣｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ属。

Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｂａｄｉｕｓ、Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｍａｇａｔｅｒｉｕｍ、Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｒｏｓｅｕｓなどのＢａｃｉｌｌｕｓ属。

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

Ｃｕｐｒｉａｖｉｄｕｓ ｍｅｔａｌｌｉｄｕｒａｎｓ、Ｃｕｐｒｉａｖｉｄｕｓ ｎｅｃａｔｏｒ、Ｃｕｐｒｉａｖｉｄｕｓ ｏｘａｌａｔｉｃｕ

ｓなどのＣｕｐｒｉａｖｉｄｕｓ属。

Ａｃｉｎｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｂａｙｌｙｉ、Ａｃｉｎｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｒａｄｉｏｒｅｓｉｓｔｅｎｓなどのＡｃｉｎｅｔｏｂａｃｔｅｒ属。

Ａｌｃａｌｉｇｅｎｅｓ ｆａｅｃａｌｉｓなどのＡｌｃａｌｉｇｅｎｅｓ属。

Ｎｏｃａｒｄｉｏｉｄｅｓ ａｌｂｕｓなどのＮｏｃａｒｄｉｏｉｄｅｓ属。

Ｂｒｅｖｉｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｉｏｄｉｎｕｍなどのＢｒｅｖｉｂａｃｔｅｒｉｕｍ属。

Ｄｅｌｆｔｉａ ａｃｉｄｏｖｏｒａｎｓなどのＤｅｌｆｔｉａ属。

Ｓｈｉｍｗｅｌｌｉａ ｂｌａｔｔａｅなどのＳｈｉｍｗｅｌｌｉａ属。

Ａｅｒｏｂａｃｔｅｒ ｃｌｏａｃａｅなどのＡｅｒｏｂａｃｔｅｒ属。

Ｒｈｉｚｏｂｉｕｍ ｒａｄｉｏｂａｃｔｅｒなどのＲｈｉｚｏｂｉｕｍ属。

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

[0030] 本発明の遺伝子改変微生物が、３－ヒドロキシアジピン酸を製造する能力を元来有していない場合には、反応Ａ、Ｂ、Ｅを触媒する酵素をコードする核酸を適当に組み合わせて微生物に導入することで、これらの製造能を付与することができる。

[0031] α－ヒドロムコン酸を製造する能力を元来有すると推定される微生物としては、以下の種属に属する微生物が挙げられる。

Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｆｅｒｇｕｓｏｎｉｉ、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉなどのＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ属。

Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｓ、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎ

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

Ｈａｆｎｉａ ａｌｖｅｉなどのＨａｆｎｉａ属。

Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｂａｄｉｕｓなどのＢａｃｉｌｌｕｓ属。

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

Ａｃｉｎｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｂａｙｌｙｉ、Ａｃｉｎｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｒａｄｉｏｒｅｓｉｓｔｅｎｓなどのＡｃｉｎｅｔｏｂａｃｔｅｒ属。

Ａｌｃａｌｉｇｅｎｅｓ ｆａｅｃａｌｉｓなどのＡｌｃａｌｉｇｅｎｅｓ属。

Ｄｅｌｆｔｉａ ａｃｉｄｏｖｏｒａｎｓなどのＤｅｌｆｔｉａ属。

Ｓｈｉｍｗｅｌｌｉａ ｂｌａｔｔａｅなどのＳｈｉｍｗｅｌｌｉａ属。

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

[0032] 本発明の遺伝子改変微生物が、α－ヒドロムコン酸を製造する能力を元来有していない場合には、反応Ａ、Ｂ、Ｃ、Ｆを触媒する酵素をコードする核酸を適当に組み合わせて微生物に導入することで、これらの生成能を付与することができる。

[0033] アジピン酸を製造する能力を元来有すると推定される微生物としてはＴｈｅｒｍｏｂｉｆｉｄａ ｆｕｓｃａなどのＴｈｅｒｍｏｂｉｆｉｄａ属に属する微生物が挙げられる。本発明の遺伝子改変微生物がアジピン酸を製造する能力を元来有していない場合には、反応Ａ、Ｂ、Ｃ、Ｄ、Ｇを触媒する酵素をコードする核酸を適当に組み合わせて微生物に導入することで、これら

の生成能を付与することができる。

[0034] 本発明で遺伝子改変微生物を得るための宿主として用いることができる微生物は、上記に挙げた微生物が好ましく、特に好ましくは、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ属、Ｓｅｒｒａｔｉａ属、Ｈａｆｎｉａ属、Ｐｓｕｅｄｏｍｏｎａｓ属、Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ属、Ｂａｃｉｌｌｕｓ属、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ属、Ｃｕｐｒｉａｖｉｄｕｓ属、Ａｃｉｎｅｔｏｂａｃｔｅｒ属、Ａｌｃａｌｉｇｅｎｅｓ属、Ｂｒｅｖｉｂａｃｔｅｒｉｕｍ属、Ｄｅｌｆｔｉａ属、Ｓｈｉｍｗｅｌｌｉａ属、Ａｅｒｏｂａｃｔｅｒ属、Ｒｈｉｚｏｂｉｕｍ属、Ｔｈｅｒｍｏｂｉｆｉｄａ属、Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ属、Ｓｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ属、Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ属、Ｐｉｃｈｉａ属およびＣａｎｄｉｄａ属に属する微生物である。これらの中でも、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ属、Ｓｅｒｒａｔｉａ属、Ｈａｆｎｉａ属、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ属に属する微生物が特に好ましい。

[0035] ３－オキソアジピル－ＣｏＡを還元して３－ヒドロキシアジピル－ＣｏＡを生成する反応を触媒する酵素の具体例としては、以下（ａ）～（ｃ）に記載のポリペプチドが挙げられる。

[0036] （ａ）配列番号１～７のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド

（ｂ）配列番号１～７のいずれかに記載のアミノ酸配列において、１もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ３－オキソアジピル－ＣｏＡを還元して３－ヒドロキシアジピル－ＣｏＡを生成する反応を触媒する酵素活性を有するポリペプチド

（ｃ）配列番号１～７のいずれかに記載のアミノ酸配列に対して７０％以上の配列同一性を有し、かつ３－オキソアジピル－ＣｏＡを還元して３－ヒドロキシアジピル－ＣｏＡを生成する活性を有するポリペプチド

[0037] さらに、３－ヒドロキシアシル－ＣｏＡデヒドロゲナーゼとしてＥＣ１．１．１．３５に分類される酵素、３－ヒドロキシブチリル－ＣｏＡデヒドロゲナーゼとしてＥＣ１．１．１．１５７に分類される酵素も、３－オキソア

ジピル－ＣｏＡレダクターゼ活性を有する酵素として用いることができる。具体的には、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ｐｕｔｉｄａ ＫＴ２４４０株由来のＰａａＨ（ＮＣＢＩ－ＰｒｏｔｅｉｎＩＤ：ＮＰ＿７４５４２５．１）、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ ｓｔｒ．Ｋ－１２ ｓｕｂｓｔｒ．ＭＧ１６５５株由来のＰａａＨ（ＮＣＢＩ－ＰｒｏｔｅｉｎＩＤ：ＮＰ＿４１５９１３．１）、Ａｃｉｎｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｂａｙｌｙｉ ＡＤＰ１株由来のＤｃａＨ（ＮＣＢＩ－ＰｒｏｔｅｉｎＩＤ：ＣＡＧ６８５３３．１）、Ｓｅｒｒａｔｉａ ｐｌｙｍｕｔｈｉｃａ ＮＢＲＣ１０２５９９株由来のＰａａＨ（ＮＣＢＩ－ＰｒｏｔｅｉｎＩＤ：ＷＰ＿０６３１９７１２０）、Ｓｅｒｒａｔｉａ ｎｅｍａｔｏｄｉｐｈｉｌａ ＤＳＭ２１４２０株由来のポリペプチド（ＮＣＢＩ－ＰｒｏｔｅｉｎＩＤ：ＷＰ＿０３３６３３３９９．１）も３－オキソアジピル－ＣｏＡを還元して３－ヒドロキシアジピル－ＣｏＡを生成する反応を触媒する酵素として挙げられる。これらの中でも、上記（ａ）～（ｃ）に記載のポリペプチドが好ましい。

[0038] 本発明で用いる、配列番号１～７のいずれかに記載のアミノ酸配列において、１もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ３－オキソアジピル－ＣｏＡレダクターゼの酵素活性を有するポリペプチドついて、「１もしくは数個」の範囲は、１０個以内が好ましく、さらに好ましくは５個以内、特に好ましくは４個以内、最も好ましくは１個又は２個以内である。ここで、アミノ酸が置換される場合、性質が類似したアミノ酸に置換された場合（いわゆる保存的置換）にポリペプチドの活性が維持される可能性が高くなる。すなわち、アミノ酸が置換する場合、類似した性質のアミノ酸に置換しても生理活性が維持される場合が多いので、置換の場合は、類似した性質のアミノ酸に置換したものが好ましい。すなわち、天然のタンパク質を構成する２０種類のアミノ酸は、低極性側鎖を有する中性アミノ酸（Ｇｌｙ，Ｉｌｅ，Ｖａｌ，Ｌｅｕ，Ａｌａ，Ｍｅｔ，Ｐｒｏ）、親水性側鎖を有する中性アミノ酸（Ａｓｎ，Ｇｌｎ，Ｔｈｒ，Ｓｅｒ，Ｔｙｒ，Ｃｙｓ）、酸性アミノ酸（Ａｓｐ，Ｇｌｕ）、塩

基性アミノ酸（Ａｒｇ，Ｌｙｓ，Ｈｉｓ）、芳香族アミノ酸（Ｐｈｅ，Ｔｙｒ，Ｔｒｐ）のように類似の性質を有するものにグループ分けでき、これらの間での置換であればポリペプチドの性質が変化しないことが多い。

[0039] 本発明で用いる、配列番号１～７のいずれかのアミノ酸配列に対して７０％以上の配列同一性を有し、かつ３－オキソアジピル－ＣｏＡレダクターゼの酵素活性を有するポリペプチドについて、配列同一性の好ましい範囲は、８０％以上が好ましく、より好ましくは８５％以上、さらに好ましくは９０％以上、さらに好ましくは９５％以上、さらに好ましくは９７％以上、さらに好ましくは９９％以上である。

[0040] 本発明で「配列同一性」とは、２つのアミノ酸配列または塩基配列にギャップを導入して、またはギャップを導入しないで整列させた場合の、最適なアライメントにおいて、オーバーラップする全アミノ酸配列（翻訳開始点となるアミノ酸を含む）または塩基配列（開始コドンを含む）に対する同一アミノ酸または塩基の割合（パーセンテージ）を意味し、式（１）によって算出する。式（１）において、比較する短い方の配列長は４００アミノ酸以上であり、４００アミノ酸未満の場合には配列同一性は定義されない。配列同一性は、この分野で汎用されているアルゴリズムであるＢＬＡＳＴ（Ｂａｓｉｃ Ｌｏｃａｌ Ａｌｉｇｎｍｅｎｔ Ｓｅａｒｃｈ Ｔｏｏｌ）を用いて容易に調べることができる。例えばＢＬＡＳＴは、ＮＣＢＩ（Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｃｅｎｔｅｒ ｆｏｒ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ）やＫＥＧＧ（Ｋｙｏｔｏ Ｅｎｃｙｃｌｏｐｅｄｉａ ｏｆ Ｇｅｎｅｓ ａｎｄ Ｇｅｎｏｍｅｓ）などのウェブサイトから誰でも利用可能であり、デフォルトのパラメーターを用いて容易に配列同一性を調べることができる。また、配列同一性はＧｅｎｅｔｙｘなどのソフトウェアに搭載されている同様の機能を用いても調べることができる。

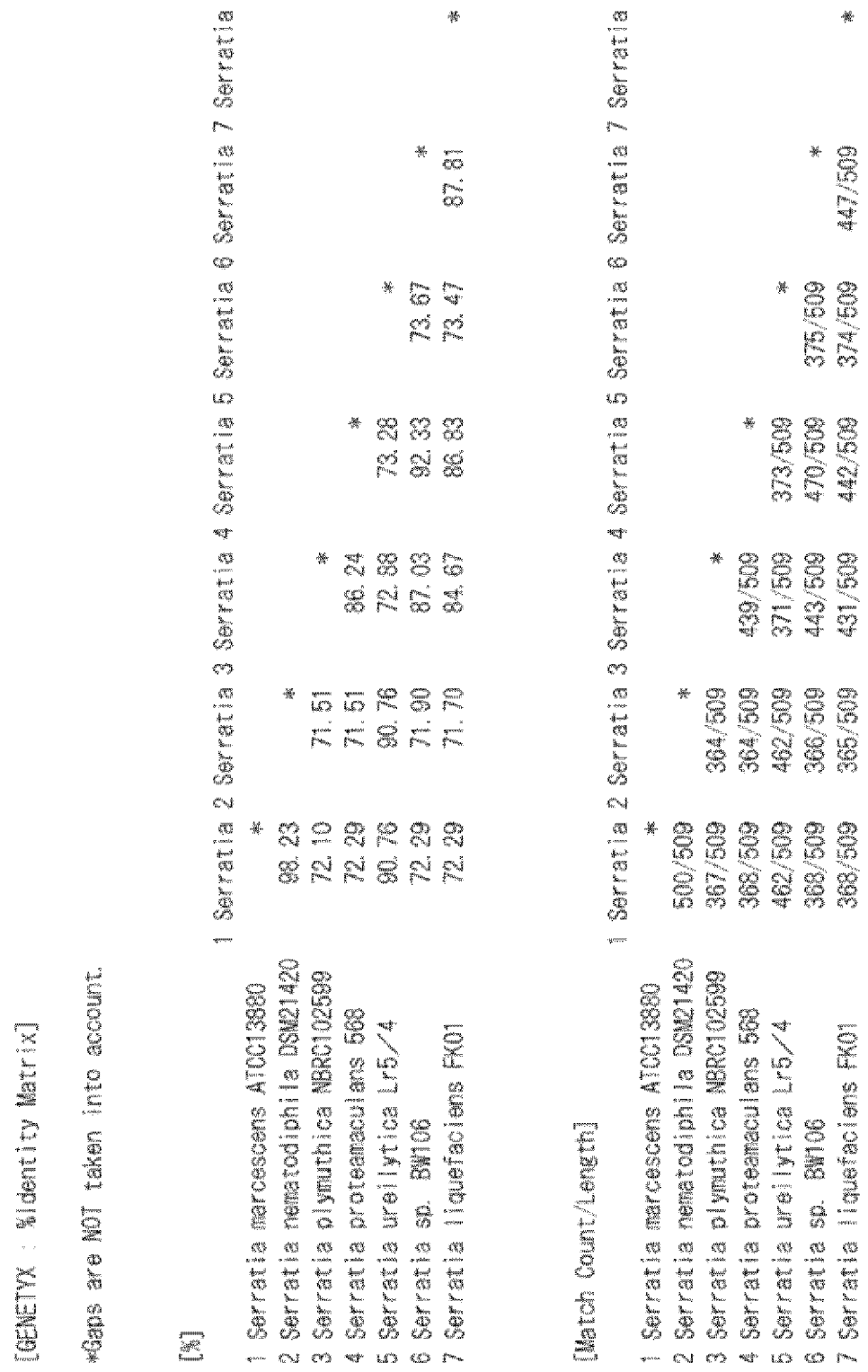
[0041] 配列同一性（％）＝一致数（ギャップ同士はカウントしない）／短い方の配列長（両端のギャップを含まない長さ）×１００・・・式（１）。

[0042] 式（１）に従い、Ｇｅｎｅｔｙｘの機能（％Ｉｄｅｎｔｉｔｙ Ｍａｔｒ

ｉｘ）を用いて配列番号１～７に記載のアミノ酸配列間の配列同一性を算出すると、最も配列同一性の値が低い配列番号２と４との値は７１．５１％となり、配列番号１～７に記載のアミノ酸配列は、お互いに少なくとも７０％以上の配列同一性を有している。Ｇｅｎｅｔｙｘを用いた配列同一性の算出結果を表１に示す。なお、下記表１において、一番左側の数字は配列番号を示す。

[0043]

[表1]



[GENETYX - %Identity Matrix]

*Gaps are NOT taken into account.

[%]

	1 Serratia	2 Serratia	3 Serratia	4 Serratia	5 Serratia	6 Serratia	7 Serratia
1 Serratia marcescens ATCC13880	*						
2 Serratia nematodiphila DSM21420	98.23	*					
3 Serratia plymuthica NBRC102599	72.10	71.51	*				
4 Serratia proteamaculans 568	72.29	71.51	86.24	*			
5 Serratia ureilytica Lr5/4	90.76	90.76	72.88	73.28	*		
6 Serratia sp. BW106	72.29	71.90	87.03	92.33	73.67	*	
7 Serratia liquefaciens FK01	72.29	71.70	84.67	86.83	73.47	87.81	*

[Match Count/Length]

	1 Serratia	2 Serratia	3 Serratia	4 Serratia	5 Serratia	6 Serratia	7 Serratia
1 Serratia marcescens ATCC13880	*						
2 Serratia nematodiphila DSM21420	500/509	*					
3 Serratia plymuthica NBRC102599	367/509	364/509	*				
4 Serratia proteamaculans 568	368/509	364/509	439/509	*			
5 Serratia ureilytica Lr5/4	462/509	462/509	371/509	373/509	*		
6 Serratia sp. BW106	368/509	366/509	443/509	470/509	375/509	*	
7 Serratia liquefaciens FK01	368/509	365/509	431/509	442/509	374/509	447/509	*

[0044] 配列番号１～７に記載の各アミノ酸配列をＱｕｅｒｙとして、ＮＣＢＩのアミノ酸データベース（Ｎｏｎ－ｒｅｄｕｎｄａｎｔ　ｐｒｏｔｅｉｎ　ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ）に登録されている全アミノ酸配列との配列同一性を、Ｂ

ＬＡＳＴＰを用いて調べた結果、配列同一性が７０％以上の配列は全てＳｅｒｒａｔｉａ属細菌由来であった。

[0045] 前記（ａ）の配列番号１～７に記載のポリペプチドは、いずれもＮ末端側からのアミノ酸残基１５～３８番目（以下、便宜的に、Ｎ末端側から何番目のアミノ酸残基かを、「ａ．ａ．」で表すことがある。したがって、例えば、Ｎ末端側からのアミノ酸残基１５～３８番目は、単に「１５～３８ａ．ａ．」と表すことがある）において配列番号１７３に示す２４アミノ酸残基からなる共通配列１を有している。共通配列１において、Ｘａａは任意のアミノ酸残基であるが、１３ａ．ａ．は好ましくはフェニルアラニンまたはロイシンであり、１５ａ．ａ．は好ましくはロイシンまたはグルタミンであり、１６ａ．ａ．は好ましくはリシンまたはアスパラギンであり、１７ａ．ａ．はグリシンまたはセリン、より好ましくはグリシンであり、１９ａ．ａ．は好ましくはプロリンまたはアルギニンであり、２１ａ．ａ．は好ましくはロイシン、メチオニンまたはバリンである。共通配列１は、ＮＡＤ＋結合残基およびその周辺のアミノ酸残基にあたる。ＮＡＤ＋結合残基は、Ｂｉｏｃｈｉｍｉｅ． ２０１２ Ｆｅｂ；９４（２）：４７１－８．で示されているように、共通配列１の２４番目のアミノ酸残基がアスパラギン酸であるが、共通配列１ではアスパラギンである点が特徴である。共通配列１を有することによって、配列番号１～７に記載のポリペプチドは、３－オキソアジピル－ＣｏＡレダクターゼとしての優れた酵素活性を示すと考える。

[0046] 前記（ｂ）および（ｃ）に記載のポリペプチドについても、１～２００ａ．ａ．以内に配列番号１７３に示す２４アミノ酸残基からなる共通配列１を有していることが好ましい。より好ましい共通配列の位置は、１～１５０ａ．ａ．以内であり、さらに好ましくは、１～１００ａ．ａ．以内である。その具体例としては、配列番号８～８６のアミノ酸配列が挙げられる。配列番号８～８６のアミノ酸配列は、１５～３８ａ．ａ．において配列番号１７３に示す２４アミノ酸残基からなる共通配列１を有している。なお、配列番号８～８６のアミノ酸配列は、配列番号１～７のいずれかのアミノ酸配列と配

列同一性が９０％以上である。Ｇｅｎｅｔｙｘを用いた配列同一性の算出結果を表２－１から表２－３および表３－１から表３－３に示す。

[0047] [表2-1]

[GENETYX : %Identity Matrix]

*Gaps are NOT taken into account.

[%]

	1 Serratia 2 Serratia 3 Serratia 4 Serratia 5 Serratia 6 Serratia 7 Serratia
1 Serratia marcescens ATCC13880	* * * * * * *
2 Serratia nematodiphila DSM21420	98.23 * * * * * *
3 Serratia plymuthica NBRC102599	72.10 71.51 * * * * *
4 Serratia proteamaculans 568	72.29 71.51 86.24 * * * *
5 Serratia ureilytica Lr5/4	90.76 90.76 72.88 73.28 * * *
6 Serratia sp. BW106	72.29 71.90 87.03 92.33 73.67 * *
7 Serratia liquefaciens FK01	72.29 71.70 84.67 86.83 73.47 87.81 *
8 Serratia sp. S119	94.89 94.30 72.88 72.49 91.55 73.08 72.88
9 Serratia sp. YD25	92.33 92.33 72.49 72.49 93.51 72.69 72.88
10 Serratia sp. FS14	98.62 99.60 71.70 71.70 91.15 72.10 72.10
11 Serratia sp. HMSC15F11	94.89 94.30 73.28 73.28 91.35 73.47 73.47
12 Serratia sp. JKS0000199	90.76 90.76 72.69 73.08 99.41 73.47 73.28
13 Serratia sp. TEL	90.56 90.56 72.88 73.28 99.80 73.67 73.47
14 Serratia sp. ISTD04	90.56 90.56 72.49 73.08 99.41 73.47 73.28
15 Serratia sp. SCBI	90.76 90.76 72.88 73.28 99.60 73.47 73.47
16 Serratia sp. S4	72.10 71.31 86.44 98.62 73.08 91.94 86.64
17 Serratia sp. C-1	72.49 71.90 98.03 86.05 73.28 86.64 84.08
18 Serratia marcescens 532	99.80 98.03 72.29 72.10 90.56 72.10 72.10
19 Serratia marcescens 2880STDY5993033	99.60 97.83 72.10 72.29 90.37 72.10 72.29
20 Serratia marcescens WW4	98.42 99.41 71.90 71.90 90.96 72.29 71.90
21 Serratia marcescens K27	98.23 99.21 71.31 71.31 90.96 71.70 71.70
22 Serratia marcescens 280	98.42 99.41 71.70 71.70 90.96 72.10 72.10
23 Serratia marcescens 19F	98.42 99.41 71.51 71.70 90.96 72.10 72.10
24 Serratia marcescens 1185	98.23 99.60 71.31 71.31 90.37 71.70 71.51

[0048] [表2-2]

25	Serratia marcescens S217	98.23	99.21	71.31	71.51	90.96	71.90	71.90	
26	Serratia marcescens KHOo-24B	98.03	99.80	71.31	71.31	90.56	71.70	71.90	
27	Serratia marcescens Z6	98.03	99.01	71.70	71.90	90.56	72.29	71.90	
28	Serratia marcescens 546	97.83	99.21	71.51	71.70	90.37	72.10	71.70	
29	Serratia nematodiphila MB307	98.03	99.80	71.31	71.51	90.56	71.90	71.70	
30	Serratia marcescens VGH107	98.03	99.01	71.31	71.51	90.56	71.90	71.90	
31	Serratia marcescens MCB	95.48	95.28	72.29	72.69	91.15	72.88	72.69	
32	Serratia marcescens AH0650	95.67	95.48	72.29	72.69	90.76	73.28	72.69	
33	Serratia marcescens UMH12	95.48	95.28	72.10	72.49	90.56	73.08	72.49	
34	Serratia sp. OMLW3	95.48	95.28	72.29	72.49	90.76	73.28	72.69	
35	Serratia marcescens UMH11	95.28	95.08	72.10	72.69	90.56	73.47	72.49	
36	Serratia marcescens UMH1	95.08	94.89	72.29	72.49	90.17	73.08	72.29	
37	Serratia marcescens 2880STDY5683020	95.48	94.89	73.08	72.69	92.14	73.28	73.08	
38	Serratia marcescens 99	95.48	94.69	73.28	72.88	91.55	73.67	73.28	
39	Serratia marcescens 374	94.89	94.69	72.29	72.29	90.17	73.08	72.29	
40	Serratia marcescens 2880STDY5683036	95.28	94.49	73.08	72.69	91.35	73.47	73.08	
41	Serratia marcescens 2880STDY5683034	95.28	94.69	73.08	72.69	91.94	73.28	73.08	
42	Serratia marcescens 2880STDY5682892	95.28	94.69	73.28	72.88	91.94	73.47	73.28	
43	Serratia marcescens SM39	95.08	94.49	73.28	72.69	92.14	73.28	73.28	
44	Serratia marcescens 189	95.08	94.49	73.28	72.88	92.14	73.47	73.28	
45	Serratia marcescens SMB2099	95.08	94.49	73.47	72.69	91.74	73.67	73.47	
46	Serratia marcescens 2880STDY5682862	94.89	94.30	73.47	72.88	91.55	73.47	73.47	
47	Serratia marcescens SE4145	94.89	94.30	73.08	72.49	91.94	73.08	73.06	
48	Serratia marcescens 2880STDY5682876	95.08	94.49	73.28	72.88	91.74	73.47	73.28	
49	Serratia marcescens 709	95.08	94.49	73.08	72.69	91.74	73.28	73.08	
50	Serratia marcescens MGH136	94.89	94.30	72.88	72.49	91.94	73.08	72.86	
51	Serratia marcescens 2880STDY5682884	94.69	94.10	72.88	72.49	91.74	73.08	73.08	
52	Serratia marcescens D-3	95.08	94.49	73.08	72.69	91.74	73.28	73.08	
53	Serratia marcescens 2880STDY5682957	94.89	94.30	72.88	72.69	91.55	73.28	72.88	
54	Serratia marcescens YDC563	94.69	94.10	72.88	72.69	91.35	73.28	72.88	
55	Serratia marcescens 2880STDY5683035	94.89	94.30	73.08	72.69	91.55	73.28	73.08	

[0049]

[表2-3]

56	Serratia marcescens 2880STDY5682930	94.69	94.10	72.88	72.49	91.35	73.08	72.88
57	Serratia marcescens 790	94.49	94.30	73.28	72.88	91.35	73.47	73.28
58	Serratia marcescens UMH5	93.51	92.92	72.69	72.39	90.37	72.69	72.49
59	Serratia marcescens 2880STDY5682988	93.32	92.73	72.69	72.88	90.17	72.69	72.49
60	Serratia marcescens 945154301	94.89	94.30	73.28	73.28	91.35	73.67	73.47
61	Serratia marcescens at10508	94.69	94.10	73.47	73.47	91.15	73.67	73.67
62	Serratia marcescens ML2637	94.49	93.90	73.28	73.47	90.96	73.67	73.67
63	Serratia marcescens SM1978	94.30	93.71	73.28	73.28	90.76	73.67	73.67
64	Serratia marcescens PWN146	94.10	93.51	72.88	72.88	90.96	72.88	73.28
65	Serratia marcescens H1q	92.53	92.53	72.49	72.49	93.51	72.69	73.08
66	Serratia marcescens UMH6	91.15	91.15	72.69	73.08	99.60	73.47	73.28
67	Serratia nematodiphila WCU338	91.15	91.15	72.69	73.08	99.41	73.47	73.28
68	Serratia sp. OLEL1	90.96	90.96	72.88	73.28	99.80	73.67	73.47
69	Serratia marcescens 7209	90.96	90.96	72.49	72.88	99.41	73.28	73.08
70	Serratia marcescens sicaria (Ss1)	90.96	90.96	72.69	73.08	98.41	73.28	73.28
71	Serratia sp. OLFL2	90.76	90.76	72.69	73.08	99.60	73.47	73.28
72	Serratia marcescens BIDMC 81	90.76	90.76	72.88	73.28	99.60	73.67	73.47
73	Serratia marcescens BIDMC 50	90.76	90.76	72.69	73.08	99.21	73.47	73.28
74	Serratia marcescens UMH7	90.56	90.56	72.88	73.28	99.80	73.67	73.47
75	Serratia marcescens RSC-14	90.56	90.56	72.88	73.47	99.21	73.87	73.67
76	Serratia marcescens SM03	92.33	92.33	72.29	72.29	93.51	72.49	72.88
77	Serratia marcescens 90-166	90.17	89.78	72.49	73.47	96.66	73.67	73.08
78	Serratia marcescens UMH2	90.76	90.76	72.88	73.28	99.21	73.67	73.47
79	Serratia plymuthica AS9	72.49	71.90	96.66	85.06	73.47	86.05	83.69
80	Serratia plymuthica tumat 205	72.69	72.10	98.03	86.24	73.47	86.64	84.28
81	Serratia plymuthica A30	72.29	71.70	98.82	85.65	72.88	86.44	84.08
82	Serratia plymuthica 4Rx13	72.29	71.70	97.83	85.85	73.08	86.44	84.28
83	Serratia plymuthica V4	72.29	71.70	98.42	85.85	73.08	86.44	84.28
84	Serratia plymuthica 3Rp8	72.29	71.70	98.62	86.05	73.08	86.64	84.08
85	Serratia proteamaculans MFPA44A14	72.29	71.90	87.03	92.53	73.28	98.82	87.22
86	Serratia plymuthica A153	72.10	71.51	99.21	86.05	72.88	86.64	84.47

[0050]

[表3-1]

[Match Count/Length]	1 Serratia	2 Serratia	3 Serratia	4 Serratia	5 Serratia	6 Serratia	7 Serratia
1 Serratia marcescens ATCC13880	*						
2 Serratia nematodiphila DSM21420	500/509	*					
3 Serratia plymuthica NBRC102589	367/509	364/509	*				
4 Serratia proteamaculans 568	368/509	364/509	439/509	*			
5 Serratia ureilytica Lr5/4	462/509	462/509	371/509	373/509	*		
6 Serratia sp. BW106	368/509	366/509	443/509	470/509	375/509	*	
7 Serratia liquefaciens FK01	368/509	365/509	431/509	442/509	374/509	447/509	*
8 Serratia sp. S119	483/509	480/509	371/509	369/509	466/509	372/509	371/509
9 Serratia sp. YD25	470/509	470/509	369/509	369/509	476/509	370/509	371/509
10 Serratia sp. FS14	502/509	507/509	365/509	365/509	464/509	367/509	367/509
11 Serratia sp. HMSC15F11	483/509	480/509	373/509	373/509	465/509	374/509	374/509
12 Serratia sp. JKS000199	462/509	462/509	370/509	372/509	506/509	374/509	373/509
13 Serratia sp. TEL	461/509	461/509	371/509	373/509	508/509	375/509	374/509
14 Serratia sp. IST004	461/509	461/509	369/509	372/509	506/509	374/509	373/509
15 Serratia sp. S08I	462/509	462/509	371/509	373/509	507/509	374/509	374/509
16 Serratia sp. S4	367/509	363/509	440/509	502/509	372/509	468/509	441/509
17 Serratia sp. C-1	369/509	366/509	499/509	438/509	373/509	441/509	428/509
18 Serratia marcescens 532	508/509	498/509	368/509	367/509	481/509	367/509	367/509
19 Serratia marcescens 2880STDY5903033	507/509	498/509	367/509	368/509	490/509	367/509	368/509
20 Serratia marcescens WW4	501/509	506/509	366/509	366/509	463/509	368/509	366/509
21 Serratia marcescens K27	500/509	505/509	363/509	363/509	463/509	365/509	365/509
22 Serratia marcescens 280	501/509	506/509	365/509	365/509	463/509	367/509	367/509
23 Serratia marcescens 19F	501/509	506/509	364/509	365/509	463/509	367/509	367/509
24 Serratia marcescens 1185	500/509	507/509	363/509	363/509	460/509	365/509	364/509

[0051] [表3-2]

25	Serratia marcescens	S217	500/509	505/509	363/509	364/509	463/509	369/509	366/509
26	Serratia marcescens	KWJa-24B	499/509	508/509	363/509	363/509	461/509	365/509	366/509
27	Serratia marcescens	Z6	499/509	504/509	365/509	366/509	461/509	368/509	366/509
28	Serratia marcescens	546	498/509	505/509	364/509	365/509	460/509	367/509	365/509
29	Serratia nematodiphila	MB307	499/509	508/509	363/509	364/509	461/509	366/509	365/509
30	Serratia marcescens	VGH107	499/509	504/509	363/509	364/509	461/509	369/509	366/509
31	Serratia marcescens	MC3	486/509	485/509	368/509	370/509	464/509	371/509	370/509
32	Serratia marcescens	AH0650	487/509	486/509	368/509	370/509	462/509	373/509	370/509
33	Serratia marcescens	UMH12	486/509	485/509	367/509	369/509	461/509	372/509	369/509
34	Serratia sp.	OMLW3	486/509	485/509	368/509	369/509	462/509	373/509	370/509
35	Serratia marcescens	UMH11	485/509	484/509	367/509	370/509	461/509	374/509	369/509
36	Serratia marcescens	UMH1	484/509	483/509	368/509	369/509	459/509	372/509	368/509
37	Serratia marcescens	2880STDY5683020	486/509	483/509	372/509	370/509	469/509	373/509	372/509
38	Serratia marcescens	99	486/509	482/509	373/509	371/509	466/509	375/509	373/509
39	Serratia marcescens	374	483/509	482/509	368/509	368/509	459/509	372/509	368/509
40	Serratia marcescens	2880STDY5683036	485/509	481/509	372/509	370/509	465/509	374/509	372/509
41	Serratia marcescens	2880STDY5683034	485/509	482/509	372/509	370/509	468/509	373/509	372/509
42	Serratia marcescens	2880STDY5682892	485/509	482/509	373/509	371/509	468/509	374/509	373/509
43	Serratia marcescens	SM39	484/509	481/509	373/509	370/509	469/509	373/509	373/509
44	Serratia marcescens	189	484/509	481/509	373/509	371/509	469/509	374/509	373/509
45	Serratia marcescens	SM2099	484/509	481/509	374/509	370/509	467/509	375/509	374/509
46	Serratia marcescens	2880STDY5682862	483/509	480/509	374/509	371/509	466/509	374/509	374/509
47	Serratia marcescens	SE4145	483/509	480/509	372/509	369/509	468/509	372/509	372/509
48	Serratia marcescens	2880STDY5682876	484/509	481/509	373/509	371/509	467/509	374/509	373/509
49	Serratia marcescens	709	484/509	481/509	372/509	370/509	467/509	373/509	372/509
50	Serratia marcescens	MGH136	483/509	480/509	371/509	369/509	468/509	372/509	371/509
51	Serratia marcescens	2880STDY5682884	482/509	479/509	371/509	369/509	467/509	372/509	372/509
52	Serratia marcescens	D-3	484/509	481/509	372/509	370/509	467/509	373/509	372/509
53	Serratia marcescens	2880STDY5682957	483/509	480/509	371/509	370/509	466/509	373/509	371/509
54	Serratia marcescens	YD0563	482/509	479/509	371/509	370/509	465/509	373/509	371/509
55	Serratia marcescens	2880STDY5683035	483/509	480/509	372/509	370/509	466/509	373/509	372/509

[0052]

[表3-3]

56 Serratia marcescens 2880STDY5682930	482/509	479/509	371/509	369/509	465/509	372/509	371/509	
57 Serratia marcescens 790	481/509	480/509	373/509	371/509	465/509	374/509	373/509	
58 Serratia marcescens UMH5	476/509	473/509	370/509	371/509	460/509	370/509	369/509	
59 Serratia marcescens 2880STDY5682968	475/509	472/509	370/509	371/509	459/509	370/509	369/509	
60 Serratia marcescens 945154301	483/509	480/509	373/509	373/509	465/509	375/509	374/509	
61 Serratia marcescens at10508	482/509	479/509	374/509	374/509	464/509	375/509	375/509	
62 Serratia marcescens ML2637	481/509	478/509	373/509	374/509	463/509	375/509	375/509	
63 Serratia marcescens SM1978	480/509	477/509	373/509	373/509	462/509	375/509	375/509	
64 Serratia marcescens PMN146	479/509	476/509	371/509	371/509	463/509	371/509	373/509	
65 Serratia marcescens H1q	471/509	471/509	369/509	369/509	476/509	370/509	372/509	
66 Serratia marcescens UMH6	464/509	464/509	370/509	372/509	507/509	374/509	373/509	
67 Serratia nematodiphila WCU338	464/509	464/509	370/509	372/509	506/509	374/509	373/509	
68 Serratia sp. OLEL1	463/509	463/509	371/509	373/509	508/509	375/509	374/509	
69 Serratia marcescens 7209	463/509	463/509	369/509	371/509	506/509	373/509	372/509	
70 Serratia marcescens sicaria (Ss1)	463/509	463/509	370/509	372/509	506/509	373/509	373/509	
71 Serratia sp. OLFL2	462/509	462/509	370/509	372/509	507/509	374/509	373/509	
72 Serratia marcescens BIDMC 81	462/509	462/509	371/509	373/509	507/509	375/509	374/509	
73 Serratia marcescens BIDMC 50	462/509	462/509	370/509	372/509	505/509	374/509	373/509	
74 Serratia marcescens UMH7	461/509	461/509	371/509	373/509	508/509	375/509	374/509	
75 Serratia marcescens RSC-14	461/509	461/509	371/509	374/509	505/509	376/509	375/509	
76 Serratia marcescens SM03	470/509	470/509	368/509	368/509	476/509	369/509	371/509	
77 Serratia marcescens 90-166	459/509	457/509	369/509	374/509	492/509	375/509	372/509	
78 Serratia marcescens UMH2	462/509	462/509	371/509	373/509	505/509	375/509	374/509	
79 Serratia plymuthica AS9	369/509	366/509	492/509	433/509	374/509	438/509	426/509	
80 Serratia plymuthica rumat 205	370/509	367/509	499/509	439/509	374/509	441/509	429/509	
81 Serratia plymuthica A30	368/509	365/509	503/509	436/509	371/509	440/509	428/509	
82 Serratia plymuthica 4Rx13	368/509	365/509	498/509	437/509	372/509	440/509	429/509	
83 Serratia plymuthica V4	368/509	365/509	501/509	437/509	372/509	440/509	429/509	
84 Serratia plymuthica 3Rx8	368/509	365/509	502/509	438/509	372/509	441/509	428/509	
85 Serratia proteamaculans MFPA44A14	368/509	366/509	443/509	471/509	373/509	503/509	444/509	
86 Serratia plymuthica A153	367/509	364/509	505/509	438/509	371/509	441/509	430/509	

[0053] 本発明の（ａ）～（ｃ）に記載のポリペプチドをコードする核酸は、当該ポリペプチドのＮ末端及び／又はＣ末端にさらなるペプチド又はタンパク質

が付加されるような配列を含んでいてもよい。このようなペプチド又はタンパク質としては、例えば、分泌シグナル配列、輸送タンパク質、結合タンパク質、精製用のタグペプチド、蛍光タンパク質等を含むものが例示できる。こうしたペプチド又はタンパク質に関しては、当業者が目的に応じて、付加する機能を有するペプチド又はタンパク質を選択して、本発明のポリペプチドに付加することができる。なお、アミノ酸配列の配列同一性には、このようなペプチド又はタンパク質は含まれない。

[0054] 配列番号１～８６に記載のポリペプチドをコードする核酸は、配列番号１～８６に記載のアミノ酸配列に翻訳されうるような塩基配列であれば特に限定されず、各アミノ酸に対応するコドン（標準遺伝暗号）を参考に決定することができる。その際、本発明に使用する宿主微生物にとってよく使用されているコドンで塩基配列を再設計してもよい。

[0055] 配列番号１～８６に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする核酸の塩基配列の具体例としては、それぞれ、配列番号８７～１７２に記載の塩基配列が挙げられる。

[0056] 本発明において、ある核酸がコードするポリペプチドが、３－オキソアジピル－ＣｏＡレダクターゼ活性を有しているかどうかは、以下の形質転換株Ａと形質転換株Ｂを作製し、培養試験の結果、培養液中に３－ヒドロキシアジピン酸またはα－ヒドロムコン酸を確認することができれば、当該核酸が３－オキソアジピル－ＣｏＡレダクターゼ活性を有するポリペプチドをコードしていると判断する。判断方法を上記スキーム１に示す生合成経路を用いて説明する。

[0057] 形質転換株Ａは、反応Ａ，反応Ｅおよび反応Ｆを触媒する酵素を有する。形質転換株Ｂは、反応Ａ、反応Ｃ、反応Ｅおよび反応Ｆを触媒する酵素を有する。

[0058] まず、形質転換株Ａを作製する。反応Ａ、反応Ｅおよび反応Ｆをそれぞれ触媒する酵素を発現するプラスミドを作製する。なお、反応ＥとＦは同一の酵素で反応を触媒することが可能である。当該プラスミドを、３－ヒドロキ

シアジピン酸、α－ヒドロムコン酸、及びアジピン酸のいずれも生産する能力のない微生物株であるＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ＢＬ２１（ＤＥ３）株に導入する。得られた形質転換株に対し、酵素活性の有無を調べる対象となるポリペプチドをコードする核酸を適当なプロモーターの下流に組み込んだ発現プラスミドを導入し、形質転換株Ａを得る。形質転換株Ａを培養し、培養後の培養液に３－ヒドロキシアジピン酸が含まれているかどうかを確認する。３－ヒドロキシアジピン酸が培養液中に確認できた場合、次に形質転換株Ｂを作製する。形質転換株Ｂは、形質転換株Ａに対し、反応Ｃを触媒する酵素を発現するプラスミドを作製して導入することで得る。形質転換株Ｂを培養し、培養後の培養液にα－ヒドロムコン酸が含まれているかどうかを確認する。培養後の培養液にα－ヒドロムコン酸が含まれることを確認することができれば、形質転換株Ａが生産した３－ヒドロキシアジピン酸および形質転換株Ｂが生産したα－ヒドロムコン酸は、３－ヒドロキシアジピル－ＣｏＡを経由して生成されたことがわかるため、対象となるポリペプチドが３－オキソアジピル－ＣｏＡレダクターゼ活性を有していると判断する。

[0059] 反応Ａを触媒する酵素をコードする遺伝子として、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｐｕｔｉｄａ　ＫＴ２４４０株由来のｐｃａＦ（ＮＣＢＩ　Ｇｅｎｅ　ＩＤ：　１０４１７５５、配列番号１７４）を用いる。

[0060] 反応ＥおよびＦを触媒する酵素をコードする遺伝子として、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｐｕｔｉｄａ　ＫＴ２４４０株由来のｐｃａＩおよびｐｃａＪ（ＮＣＢＩ　Ｇｅｎｅ　ＩＤ：　１０４６６１３、１０４６６１２、配列番号１７５、１７６）の全長を含む連続した配列を用いる。ｐｃａＩおよびｐｃａＪがコードするポリペプチドは、複合体を形成することによって反応Ｅと反応Ｆを触媒する。

[0061] 反応Ｃを触媒する酵素をコードする核酸として、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｐｕｔｉｄａ　ＫＴ２４４０株遺伝子ｐａａＦ（ＮＣＢＩ　Ｇｅｎｅ　ＩＤ：　１０４６９３２、配列番号１７７）を用いる。

[0062] 形質転換株Ａ、形質転換株Ｂの培養方法は、以下のとおりである。なお培養の際には、プラスミドを安定に保持するための抗生物質や、組み込んだ核酸がコードするポリペプチドの発現を誘導する物質を適宜加えることができる。ｐＨ７に調整した培地Ｉ（Ｂａｃｔｏトリプトン（Ｄｉｆｃｏ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ社製）１０ｇ／Ｌ、Ｂａｃｔｏ酵母エキス（Ｄｉｆｃｏ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ社製）５ｇ／Ｌ、塩化ナトリウム５ｇ／Ｌ）５ｍＬに、形質転換株ＡまたはＢを一白金耳植菌し、３０℃、１２０ｍｉｎ－１で１８時間振とう培養し、前培養液とする。続いて当該前培養液０．２５ｍＬをｐＨ６．５に調整した培地ＩＩ（コハク酸１０ｇ／Ｌ、グルコース１０ｇ／Ｌ、硫酸アンモニウム１ｇ／Ｌ、リン酸カリウム５０ｍＭ、硫酸マグネシウム０．０２５ｇ／Ｌ、硫酸鉄０．０６２５ｍｇ／Ｌ、硫酸マンガン２．７ｍｇ／Ｌ、塩化カルシウム０．３３ｍｇ／Ｌ、塩化ナトリウム１．２５ｇ／Ｌ、Ｂａｃｔｏトリプトン２．５ｇ／Ｌ、Ｂａｃｔｏ酵母エキス１．２５ｇ／Ｌ）５ｍＬに添加し、３０℃、１２０ｍｉｎ－１で２４時間振とう培養する。得られた培養液中に３－ヒドロキシアジピン酸またはα－ヒドロムコン酸が含まれているかを確認する。

[0063] 培養液中に３－ヒドロキシアジピン酸またはα－ヒドロムコン酸が含まれることは、培養液を遠心し、上清をＬＣ－ＭＳ／ＭＳで分析することにより確認できる。分析の条件は以下のとおりである。

[0064] ・ＨＰＬＣ：１２９０Ｉｎｆｉｎｉｔｙ（Ａｇｉｌｅｎｔ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）

カラム：Ｓｙｎｅｒｇｉ ｈｙｄｒｏ－ＲＰ（Ｐｈｅｎｏｍｅｎｅｘ社製）、長さ１００ｍｍ、内径３ｍｍ、粒径２．５μｍ

移動相：０．１％ギ酸水溶液／メタノール＝７０／３０

流速：０．３ｍＬ／分

カラム温度：４０℃

ＬＣ検出器：ＤＡＤ（２１０ｎｍ）

・ＭＳ／ＭＳ：Ｔｒｉｐｌｅ－Ｑｕａｄ ＬＣ／ＭＳ（Ａｇｉｌｅｎｔ Ｔ

ｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）

イオン化法：ＥＳＩ　ネガティブモード。

[0065] ３－オキソアジピル－ＣｏＡレダクターゼの活性の値は、３－オキソアジピン酸から酵素反応で調製した３－オキソアジピル－ＣｏＡを基質として、精製３－オキソアジピル－ＣｏＡレダクターゼを用いて生成する３－ヒドロキシアジピル－ＣｏＡを測定することで算出できる。具体的な方法は、以下の通りである。

[0066] ３－オキソアジピン酸は公知の方法（例えば、ＷＯ２０１７／０９９２０９の参考例１に記載された方法）により調製することができる。

[0067] ３－オキソアジピル－ＣｏＡ溶液の調製：常法に従いＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｐｕｔｉｄａ　ＫＴ２４４０株のゲノムＤＮＡを鋳型としたＰＣＲを行い、ＣｏＡトランスフェラーゼをコードする核酸（ｐｃａｌおよびｐｃａＪ、ＮＣＢＩ－ＧｅｎｅＩＤ：１０４６６１３および１０４６６１２）の全長を増幅する。なお、このＰＣＲで用いるプライマーの塩基配列は、例えば配列番号１９４および１９５である。当該増幅断片を大腸菌用発現ベクターであるｐＲＳＦ－１ｂ（Ｎｏｖａｇｅｎ社製）のＫｐｎＩサイトに、ヒスチジンタグ配列と同じフレームとなるよう挿入する。当該プラスミドを大腸菌ＢＬ２１（ＤＥ３）に導入し、常法に従いイソプロピル－β－チオガラクトピラノシド（ＩＰＴＧ）による当該酵素の発現誘導、続いて培養液からのヒスチジンタグを利用した精製を行い、ＣｏＡトランスフェラーゼ溶液を得る。当該溶液を用いて以下組成の３－オキソアジピル－ＣｏＡ調製用酵素反応溶液を調製し、２５℃で３分分反応させた後、ＵＦ膜（Ａｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａ－０．５ｍＬ　１０Ｋ、Ｍｅｒｃｋ　Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ社製）で処理することで酵素を除去し、得られた透過液を３－オキソアジピル－ＣｏＡ溶液とする。

[0068] （酵素反応溶液）

１００ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．２）

１０ｍＭ　$MgCl_2$

０．５ｍＭ　ｓｕｃｃｉｎｙｌ－ＣｏＡ

５ｍＭ　３－ｏｘｏａｄｉｐｉｃ　ａｃｉｄ　ｓｏｄｉｕｍ　ｓａｌｔ

２μＭ　ＣｏＡ　ｔｒａｎｓｆｅｒａｓｅ。

[0069]　３－オキソアジピル－ＣｏＡレダクターゼ活性の確認：常法に従い対象とする微生物株のゲノムＤＮＡを鋳型としたＰＣＲを行い、３－オキソアジピル－ＣｏＡレダクターゼをコードする核酸全長を増幅する。なお、このＰＣＲで用いるプライマーの塩基配列は、例えば配列番号１９６および１９７である。当該増幅断片を大腸菌用発現ベクターｐＡＣＹＣＤｕｅｔ－１（Ｎｏｖａｇｅｎ社製）のＢａｍＨＩサイトに、ヒスチジンタグ配列と同じフレームとなるよう挿入する。当該プラスミドを大腸菌ＢＬ２１（ＤＥ３）に導入し、常法に従いイソプロピル－β－チオガラクトピラノシド（ＩＰＴＧ）による当該酵素の発現誘導、続いて培養液からのヒスチジンタグを利用した精製を行い、３－オキソアジピル－ＣｏＡレダクターゼ溶液を得る。３－オキソアジピル－ＣｏＡレダクターゼ活性は、本酵素溶液を用いて以下組成の酵素反応溶液を調製し、２５℃における３－ヒドロキシアジピル－ＣｏＡの生成量を測定することで確認できる。

[0070]　（酵素反応溶液）

１００ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．２）

１０ｍＭ　$MgCl_2$

１５０μＬ／ｍＬ　３－ｏｘｏａｄｉｐｙｌ－ＣｏＡ　ｓｏｌｕｔｉｏｎ

０．５ｍＭ　ＮＡＤＨ

１ｍＭ　ｄｉｔｈｉｏｔｈｒｅｉｔｏｌ

１０μＭ　３－ｏｘｏａｄｉｐｙｌ－ＣｏＡ　ｒｅｄｕｃｔａｓｅ。

[0071]　続いて、反応Ａ、Ｃ～Ｇを触媒する酵素の具体例を示す。３－オキソアジピル－ＣｏＡを生成する反応Ａを触媒する酵素は、例えば、アシルトランスフェラーゼ（β－ケトチオラーゼ）などを用いることができる。アシルトランスフェラーゼとしてはＥＣ番号による分類上の限定は特にないが、ＥＣ２．３．１．－に分類されるアシルトランスフェラーゼが好ましく、具体的に

は３－オキソアジピル－ＣｏＡチオラーゼとしてＥＣ２．３．１．１７４に分類される酵素、アセチル－ＣｏＡ　Ｃ－アセチルトランスフェラーゼとしてＥＣ２．３．１．９に分類される酵素、アセチル－ＣｏＡ　Ｃ－アシルトランスフェラーゼとしてＥＣ２．３．１．１６に分類される酵素が挙げられる。これらの中でもＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ＭＧ１６５５株由来のＰａａＪ（ＮＣＢＩ－ＰｒｏｔｅｉｎＩＤ：ＮＰ＿４１５９１５）、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｐｕｔｉｄａ　ＫＴ２４４０株由来のＰｃａＦ（ＮＣＢＩ－ＰｒｏｔｅｉｎＩＤ：ＮＰ＿７４３５３６）などを好ましく用いることができる。

[0072] 上記のアシルトランスフェラーゼが、スクシニル－ＣｏＡおよびアセチル－ＣｏＡを基質として、３－オキソアジピル－ＣｏＡを生成できるかどうかは、精製アシルトランスフェラーゼによる３－オキソアジピル－ＣｏＡ生成反応と、３－オキソアジピル－ＣｏＡを基質とした精製３－オキソアジピル－ＣｏＡレダクターゼによる還元反応を組み合わせ、３－オキソアジピル－ＣｏＡの還基に伴うＮＡＤＨの減少量を測定することで確認できる。具体的な測定方法は、例えば以下の通りである。

[0073] アシルトランスフェラーゼ活性の確認：常法に従い対象とする微生物株のゲノムＤＮＡを鋳型としたＰＣＲを行い、アシルトランスフェラーゼをコードする核酸全長を増幅する。当該増幅断片を大腸菌用発現ベクターｐＡＣＹＣＤｕｅｔ－１（Ｎｏｖａｇｅｎ社製）のＳａｃＩサイトに、ヒスチジンタグ配列と同じフレームとなるよう挿入する。当該プラスミドを大腸菌ＢＬ２１（ＤＥ３）に導入し、常法に従いイソプロピル－β－チオガラクトピラノシド（ＩＰＴＧ）による当該酵素の発現誘導、続いて培養液からのヒスチジンタグを利用した精製を行い、アシルトランスフェラーゼ溶液を得る。アシルトランスフェラーゼ活性は、当該酵素溶液を用いて以下組成の酵素反応溶液を調製し、３０℃におけるＮＡＤＨの酸化に伴う３４０ｎｍ吸収の減少を測定することで確認できる。

[0074] １００ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．０）

１０ｍＭ　$MgCl_2$

０．１ｍＭ　ｓｕｃｃｉｎｙｌ－ＣｏＡ

０．２ｍＭ　ａｃｅｔｙｌ－ＣｏＡ

０．２ｍＭ　ＮＡＤＨ

１ｍＭ　ｄｉｔｈｉｏｔｈｒｅｉｔｏｌ

１０μｇ／ｍＬ　３－ｏｘｏａｄｉｐｙｌ－ＣｏＡ　ｒｅｄｕｃｔａｓｅ

５μｇ／ｍＬ　ａｃｙｌｔｒａｎｓｆｅｒａｓｅ。

[0075] 微生物が有する酵素がアシルトランスフェラーゼ活性を有しているかどうかは、精製アシルトランスフェラーゼの代わりにＣＦＥを用いて上述の測定を行うことで確認できる。大腸菌を対象とした具体的な測定方法は、例えば以下の通りである。

[0076] ＣＦＥの調製：ｐＨ７に調整した培地（培地組成：トリプトン１０ｇ／Ｌ、酵母エキス５ｇ／Ｌ、塩化ナトリウム５ｇ／Ｌ）５ｍＬに活性測定の対象となる大腸菌ＭＧ１６５５株を一白金耳植菌し、３０℃で１８時間振とう培養する。得られた培養液をｐＨ７に調整した培地（培地組成：トリプトン１０ｇ／Ｌ、酵母エキス５ｇ／Ｌ、塩化ナトリウム５ｇ／Ｌ、フェルラ酸２．５ｍＭ、ｐ－クマル酸２．５ｍＭ、安息香酸２．５ｍＭ、ｃｉｓ，ｃｉｓ－ムコン酸２．５ｍＭ、プロトカテク酸２．５ｍＭ、カテコール２．５ｍＭ、３ＯＡ２．５ｍＭ、３－ヒドロキシアジピン酸２．５ｍＭ、α－ヒドロムコン酸２．５ｍＭ、アジピン酸２．５ｍＭ、フェニルエチルアミン２．５ｍＭ）５ｍＬに添加し、３０℃で３時間振とう培養する。

[0077] 得られた培養液に１０ｍＬの０．９％塩化ナトリウムを加え、菌体を遠心分離して上清を取り除く操作を３回行い、菌体を洗浄する。洗浄後の菌体をＴｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．０）１００ｍＭ、ｄｉｔｈｉｏｔｈｒｅｉｔｏｌ１ｍＭからなるＴｒｉｓ－ＨＣｌバッファー１ｍＬに懸濁し、得られた懸濁液にガラスビーズ（φ０．１ｍｍ）を加え、超音波破砕機を用い４℃で菌体を破砕する。菌体破砕液を遠心して得られる上清のうち０．５ｍＬをＵＦ膜（Ａｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａ－０．５ｍＬ　１０Ｋ、Ｍｅｒｃｋ　Ｍｉｌ

ｌｉｐｏｒｅ社製）に通し、透過液を除去したのちＴｒｉｓ－ＨＣｌバッファー０．４ｍＬを添加することを３回繰り返すことで低分子量の夾雑物を除去した後、Ｔｒｉｓ－ＨＣｌバッファーで再懸濁して液量を０．１ｍＬとしたものをＣＦＥとする。精製酵素の代わりに当該ＣＦＥを全量０．１ｍＬの酵素反応溶液に対して０．０５ｍＬ添加し、酵素活性の確認を行う。

[0078] ２，３－デヒドロアジピル－ＣｏＡを生成する反応Ｃを触媒する酵素は、例えば、エノイル－ＣｏＡヒドラターゼなどを用いることができる。エノイル－ＣｏＡヒドラターゼとしては、ＥＣ番号による分類上の限定は特にないが、ＥＣ番号４．２．１．－に分類されるエノイル－ＣｏＡヒドラターゼが好ましく、具体的にはエノイル－ＣｏＡヒドラターゼまたは２，３－デヒドロアジピル－ＣｏＡヒドラターゼとしてＥＣ４．２．１．１７に分類される酵素が挙げられる。これらの中でもＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ ＭＧ１６５５株由来のＰａａＦ（ＮＣＢＩ－ＰｒｏｔｅｉｎＩＤ：ＮＰ＿４１５９１１）、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ｐｕｔｉｄａ ＫＴ２４４０株由来のＰａａＦ（ＮＣＢＩ－ＰｒｏｔｅｉｎＩＤ：ＮＰ＿７４５４２７）などを好ましく用いることができる。

[0079] エノイル－ＣｏＡヒドラターゼが触媒する反応は一般的に可逆反応であることから、エノイル－ＣｏＡヒドラターゼが、３－ヒドロキシアジピル－ＣｏＡを基質として２，３－デヒドロアジピル－ＣｏＡが生成する反応を触媒する活性を有することは、α－ヒドロムコン酸から酵素反応で調製した２，３－デヒドロアジピル－ＣｏＡを基質として、精製エノイル－ＣｏＡヒドラターゼを用いて生成する３－ヒドロキシアジピル－ＣｏＡを検出することで確認することができる。具体的な測定方法は、例えば以下の通りである。

[0080] α－ヒドロムコン酸の調製：α－ヒドロムコン酸はＷＯ２０１６／１９９８５８Ａ１の参考例１に記載された方法により調製する。

[0081] ２，３－デヒドロアジピル－ＣｏＡ溶液の調製：常法に従いＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ｐｕｔｉｄａ ＫＴ２４４０株のゲノムＤＮＡを鋳型としたＰＣＲを行い、ＣｏＡトランスフェラーゼをコードする核酸（ｐｃａｌおよび

ｐｃａＪ、ＮＣＢＩ－ＧｅｎｅＩＤ：１０４６６１３および１０４６６１２）の全長を増幅する。当該増幅断片を大腸菌用発現ベクターであるｐＲＳＦ－１ｂ（Ｎｏｖａｇｅｎ社製）のＫｐｎＩサイトに、ヒスチジンタグ配列と同じフレームとなるよう挿入する。当該プラスミドを大腸菌ＢＬ２１（ＤＥ３）に導入し、常法に従いイソプロピル－β－チオガラクトピラノシド（ＩＰＴＧ）による当該酵素の発現誘導、続いて培養液からのヒスチジンタグを利用した精製を行い、ＣｏＡトランスフェラーゼ溶液を得る。当該溶液を用いて以下組成の２，３－デヒドロアジピル－ＣｏＡ調製用酵素反応溶液を調製し、３０℃で１０分反応させた後、ＵＦ膜（Ａｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａ－０．５ｍＬ　１０Ｋ、Ｍｅｒｃｋ　Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ社製）で処理することで酵素を除去し、得られた透過液を２，３－デヒドロアジピル－ＣｏＡ溶液とする。

[0082] ２，３－デヒドロアジピル－ＣｏＡ調製用酵素反応溶液

１００ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．０）

１０ｍＭ　$MgCl_2$

０．４ｍＭ　ｓｕｃｃｉｎｙｌ－ＣｏＡ

２ｍＭ　α－ｈｙｄｒｏｍｕｃｏｎｉｃ　ａｃｉｄ　ｓｏｄｉｕｍ　ｓａｌｔ

２０μｇ／ｍＬ　ＣｏＡ　ｔｒａｎｓｆｅｒａｓｅ。

[0083] エノイル－ＣｏＡヒドラターゼ活性の確認：常法に従い対象とする微生物株のゲノムＤＮＡを鋳型としたＰＣＲを行い、エノイル－ＣｏＡヒドラターゼをコードする核酸全長を増幅する。当該増幅断片を大腸菌用発現ベクターｐＥＴ－１６ｂ（Ｎｏｖａｇｅｎ社製）のＮｄｅＩサイトに、ヒスチジンタグ配列と同じフレームとなるよう挿入する。当該プラスミドを大腸菌ＢＬ２１（ＤＥ３）に導入し、常法に従いイソプロピル－β－チオガラクトピラノシド（ＩＰＴＧ）による当該酵素の発現誘導、続いて培養液からのヒスチジンタグを利用した精製を行い、エノイル－ＣｏＡヒドラターゼ溶液を得る。エノイル－ＣｏＡ　ヒドラターゼ活性は、当該溶液を用いて以下組成の酵素

反応溶液を調製し、３０℃で１０分反応させた後、ＵＦ膜（Ａｍｉｃｏｎ Ｕｌｔｒａ－０．５ｍＬ １０Ｋ、Ｍｅｒｃｋ Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ社製）で処理することで酵素を除去し、得られた透過液中の３－ヒドロキシアジピル－ＣｏＡを高速液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析計（ＬＣ－ＭＳ／ＭＳ）（Ａｇｉｌｅｎｔ社）で検出することで確認できる。

[0084] １００ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．０）
１０ｍＭ $MgCl_2$
３００μＬ／ｍＬ ２，３－ｄｅｈｙｄｒｏａｄｉｐｙｌ－ＣｏＡ ｓｏｌｕｔｉｏｎ
１ｍＭ ｄｉｔｈｉｏｔｈｒｅｉｔｏｌ
２０μｇ／ｍＬ ｅｎｏｙｌ－ＣｏＡ ｈｙｄｒａｔａｓｅ。

[0085] 本発明で用いる宿主微生物において元来発現する酵素がエノイル－ＣｏＡヒドラターゼ活性を有しているかどうかは、精製エノイル－ＣｏＡヒドラターゼの代わりにＣＦＥを全量０．１ｍＬの酵素反応溶液に対して０．０５ｍＬ添加して上述の測定を行うことで確認できる。大腸菌を対象としたＣＦＥの調製方法の具体例はアシルトランスフェラーゼ活性の確認方法に記載した通りである。

[0086] アジピル－ＣｏＡを生成する反応Ｄを触媒する酵素は、例えば、エノイル－ＣｏＡレダクターゼなどを用いることができる。エノイル－ＣｏＡレダクターゼとしては、ＥＣ番号による分類上の限定は特にないが、ＥＣ番号１．３．－．－に分類されるエノイル－ＣｏＡレダクターゼが好ましく、具体的にはｔｒａｎｓ－２－エノイル－ＣｏＡレダクターゼとしてＥＣ１．３．１．４４に分類される酵素、アシル－ＣｏＡデヒドロゲナーゼとしてＥＣ１．３．８．７に分類される酵素が挙げられる。これらの具体例は、例えば特表２０１１－５１５１１１、Ｊ Ａｐｐｌ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ． ２０１５ Ｏｃｔ；１１９（４）：１０５７－６３．などに開示されているが、中でもＥｕｇｌｅｎａ ｇｒａｃｉｌｉｓ Ｚ株由来のＴＥＲ（ＵｎｉＰｒｏｔＫＢ：Ｑ５ＥＵ９０）、Ｔｈｅｒｍｏｂｉｆｉｄａ ｆｕｓｃａ ＹＸ株由

来のＴｆｕ＿１６４７（ＮＣＢＩ－ＰｒｏｔｅｉｎＩＤ：ＡＡＺ５５６８２）、Ａｃｉｎｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｂａｙｌｙｉ ＡＤＰ１株由来のＤｃａＡ（ＮＣＢＩ－ＰｒｏｔｅｉｎＩＤ：ＡＡＬ０９０９４．１）などを好ましく用いることができる。

[0087] エノイル－ＣｏＡレダクターゼが、２，３－デヒドロアジピル－ＣｏＡを基質とした場合、アジピル－ＣｏＡが生成する活性を有することは、α－ヒドロムコン酸から酵素反応で調製した２，３－デヒドロアジピル－ＣｏＡを基質として、精製エノイル－ＣｏＡレダクターゼを用いて２，３－デヒドロアジピル－ＣｏＡの還元に伴うＮＡＤＨの減少量を測定することで確認できる。

[0088] α－ヒドロムコン酸の調製と、２，３－デヒドロアジピル－ＣｏＡ溶液の調製は、上記と同様に行うことができる。

[0089] エノイル－ＣｏＡレダクターゼ活性の確認：常法に従い対象とする微生物株のゲノムＤＮＡを鋳型としたＰＣＲを行い、エノイル－ＣｏＡレダクターゼをコードする核酸全長を増幅する。当該増幅断片を大腸菌用発現ベクターｐＥＴ－１６ｂ（Ｎｏｖａｇｅｎ社製）のＮｄｅＩサイトに、ヒスチジンタグ配列と同じフレームとなるよう挿入する。当該プラスミドを大腸菌ＢＬ２１（ＤＥ３）に導入し、常法に従いイソプロピル－β－チオガラクトピラノシド（ＩＰＴＧ）による当該酵素の発現誘導、続いて培養液からのヒスチジンタグを利用した精製を行い、エノイル－ＣｏＡレダクターゼ溶液を得る。エノイル－ＣｏＡレダクターゼ活性は、本酵素溶液を用いて以下組成の酵素反応溶液を調製し、３０℃におけるＮＡＤＨの酸化に伴う３４０ｎｍ吸収の減少を測定することで確認できる。

[0090] １００ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．０）
１０ｍＭ $MgCl_2$
３００μＬ／ｍＬ ２，３－ｄｅｈｙｄｒｏａｄｉｐｙｌ－ＣｏＡ ｓｏｌｕｔｉｏｎ０．２ｍＭ ＮＡＤＨ
１ｍＭ ｄｉｔｈｉｏｔｈｒｅｉｔｏｌ

２０μｇ／ｍＬ　ｅｎｏｙｌ－ＣｏＡ　ｒｅｄｕｃｔａｓｅ。

[0091] 本発明で用いる宿主微生物において元来発現する酵素がエノイル－ＣｏＡレダクターゼ活性を有しているかどうかは、精製エノイル－ＣｏＡレダクターゼの代わりにＣＦＥを全量０．１ｍＬの酵素反応溶液に対して０．０５ｍＬ添加して上述の測定を行うことで確認できる。大腸菌を対象としたＣＦＥの調製方法の具体例はアシルトランスフェラーゼ活性の確認方法に記載した通りである。

[0092] ３－ヒドロキシアジピン酸を生成する反応Ｅ、α－ヒドロムコン酸を生成する反応Ｆ、アジピン酸を生成する反応Ｇを触媒する酵素は、例えば、ＣｏＡトランスフェラーゼあるいはアシル－ＣｏＡヒドロラーゼなどを用いることができるが、ＣｏＡトランスフェラーゼが好ましい。

[0093] ＣｏＡトランスフェラーゼとしては、ＥＣ番号による分類上の限定は特にないが、ＥＣ番号２．８．３．－に分類されるＣｏＡトランスフェラーゼが好ましく、具体的にはＣｏＡトランスフェラーゼまたはアシル－ＣｏＡトランスフェラーゼとしてＥＣ２．８．３．６に分類される酵素などが挙げられる。

[0094] 本発明において、「ＣｏＡトランスフェラーゼ」とは、アシル－ＣｏＡおよびコハク酸を基質としてカルボン酸およびスクシニル－ＣｏＡを生成する反応の触媒活性（ＣｏＡトランスフェラーゼ活性）を有する酵素を意味する。

[0095] ３－ヒドロキシアジピン酸を生成する反応Ｅ、α－ヒドロムコン酸を生成する反応Ｆを触媒する酵素には、中でもＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｐｕｔｉｄａ　ＫＴ２４４０株由来のＰｃａｌおよびＰｃａＪ（ＮＣＢＩ－ＰｒｏｔｅｉｎＩＤ：ＮＰ＿７４６０８１およびＮＰ＿７４６０８２）等を好ましく用いることができる。

[0096] また、アジピン酸を生成する反応Ｇを触媒する酵素には、Ａｃｉｎｅｔｏｂａｃｔｅｒ　ｂａｙｌｙｉ　ＡＤＰ１株由来のＤｃａｌおよびＤｃａＪ（ＮＣＢＩ－ＰｒｏｔｅｉｎＩＤ：ＣＡＧ６８５３８およびＣＡＧ６８５３９

）などを好ましく用いることができる。

[0097] ３－ヒドロキシアジピル－ＣｏＡ、２，３－デヒドロアジピル－ＣｏＡまたはアジピル－ＣｏＡを基質とするＣｏＡトランスフェラーゼ活性は、本酵素反応が可逆反応であることから、３－ヒドロキシアジピン酸およびスクシニル－ＣｏＡ、α－ヒドロムコン酸およびスクシニル－ＣｏＡ、またはアジピン酸およびスクシニル－ＣｏＡを基質として、精製ＣｏＡトランスフェラーゼを用いて生成する３－ヒドロキシアジピル－ＣｏＡ、２，３－デヒドロアジピル－ＣｏＡまたはアジピル－ＣｏＡを検出することで確認することができる。具体的な測定方法は、例えば以下の通りである。

[0098] ３－ヒドロキシアジピン酸の調製：３－ヒドロキシアジピン酸はＷＯ２０１６／１９９８５６Ａ１の参考例１に記載された方法により調製する。

[0099] ３－ヒドロキシアジピン酸を基質としたＣｏＡトランスフェラーゼ活性の確認：常法に従い対象とする微生物株のゲノムＤＮＡを鋳型としたＰＣＲを行い、ＣｏＡトランスフェラーゼをコードする核酸全長を増幅する。当該増幅断片を大腸菌用発現ベクターであるｐＲＳＦ－１ｂ（Ｎｏｖａｇｅｎ社製）のＫｐｎＩサイトに、ヒスチジンタグ配列と同じフレームとなるよう挿入する。当該プラスミドを大腸菌ＢＬ２１（ＤＥ３）に導入し、常法に従いイソプロピル－β－チオガラクトピラノシド（ＩＰＴＧ）による当該酵素の発現誘導、続いて培養液からのヒスチジンタグを利用した精製を行い、ＣｏＡトランスフェラーゼ溶液を得る。当該溶液を用いて以下組成の酵素反応溶液を調製し、３０℃で１０分反応させた後、ＵＦ膜（Ａｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａ－０．５ｍＬ　１０Ｋ、Ｍｅｒｃｋ　Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ社製）で処理することで酵素を除去し、透過液中の３－ヒドロキシアジピル－ＣｏＡを高速液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析計（ＬＣ－ＭＳ／ＭＳ）（Ａｇｉｌｅｎｔ社）で検出することで確認できる。

[0100] １００ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．０）

１０ｍＭ　$MgCl_2$

０．４ｍＭ　ｓｕｃｃｉｎｙｌ－ＣｏＡ

２ｍＭ ３－ｈｙｄｒｏｘｙａｄｉｐｉｃ ａｃｉｄ ｓｏｄｉｕｍ ｓａｌｔ

２０μｇ／ｍＬ ＣｏＡ ｔｒａｎｓｆｅｒａｓｅ。

[0101] α－ヒドロムコン酸の調製：α－ヒドロムコン酸はＷＯ２０１６／１９９８５８Ａ１の参考例１に記載された方法により調製する。

[0102] α－ヒドロムコン酸を基質としたＣｏＡトランスフェラーゼ活性の確認：常法に従い対象とする微生物株のゲノムＤＮＡを鋳型としたＰＣＲを行い、ＣｏＡトランスフェラーゼをコードする核酸全長を増幅する。当該増幅断片を大腸菌用発現ベクターであるｐＲＳＦ－１ｂ（Ｎｏｖａｇｅｎ社製）のＫｐｎＩサイトに、ヒスチジンタグ配列と同じフレームとなるよう挿入する。当該プラスミドを大腸菌ＢＬ２１（ＤＥ３）に導入し、常法に従いイソプロピル－β－チオガラクトピラノシド（ＩＰＴＧ）による当該酵素の発現誘導、続いて培養液からのヒスチジンタグを利用した精製を行い、ＣｏＡトランスフェラーゼ溶液を得る。当該溶液を用いて以下組成の酵素反応溶液を調製し、３０℃で１０分反応させた後、ＵＦ膜（Ａｍｉｃｏｎ Ｕｌｔｒａ－０．５ｍＬ １０Ｋ、Ｍｅｒｃｋ Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ社製）で処理することで酵素を除去し、透過液中の２，３－デヒドロアジピル－ＣｏＡを高速液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析計（ＬＣ－ＭＳ／ＭＳ）（Ａｇｉｌｅｎｔ社）で検出することで確認できる。

[0103] １００ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．０）

１０ｍＭ $MgCl_2$

０．４ｍＭ ｓｕｃｃｉｎｙｌ－ＣｏＡ

２ｍＭ α－ｈｙｄｒｏｍｕｃｏｎｉｃ ａｃｉｄ ｓｏｄｉｕｍ ｓａｌｔ

２０μｇ／ｍＬ ＣｏＡ ｔｒａｎｓｆｅｒａｓｅ。

[0104] アジピン酸を基質としたＣｏＡトランスフェラーゼ活性の確認：常法に従い対象とする微生物株のゲノムＤＮＡを鋳型としたＰＣＲを行い、ＣｏＡトランスフェラーゼをコードする核酸全長を増幅する。当該増幅断片を大腸菌

用発現ベクターであるｐＲＳＦ－１ｂ（Ｎｏｖａｇｅｎ社製）のＫｐｎＩサイトに、ヒスチジンタグ配列と同じフレームとなるよう挿入する。当該プラスミドを大腸菌ＢＬ２１（ＤＥ３）に導入し、常法に従いイソプロピル－β－チオガラクトピラノシド（ＩＰＴＧ）による当該酵素の発現誘導、続いて培養液からのヒスチジンタグを利用した精製を行い、ＣｏＡトランスフェラーゼ溶液を得る。当該溶液を用いて以下組成の酵素反応溶液を調製し、３０℃で１０分反応させた後、ＵＦ膜（Ａｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａ－０．５ｍＬ　１０Ｋ、Ｍｅｒｃｋ　Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ社製）で処理することで酵素を除去し、透過液中のアジピル－ＣｏＡを高速液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析計（ＬＣ－ＭＳ／ＭＳ）（Ａｇｉｌｅｎｔ社）で検出することで確認できる。

[0105] １００ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．０）
１０ｍＭ　$MgCl_2$
０．４ｍＭ　ｓｕｃｃｉｎｙｌ－ＣｏＡ
２ｍＭ　ａｄｉｐｉｃ　ａｃｉｄ　ｓｏｄｉｕｍ　ｓａｌｔ
２０μｇ／ｍＬ　ＣｏＡ－ｔｒａｎｓｆｅｒａｓｅ。

[0106] 本発明で用いる宿主微生物において元来発現する酵素がＣｏＡトランスフェラーゼ活性を有しているかどうかは、精製ＣｏＡトランスフェラーゼの代わりにＣＦＥを全量０．１ｍＬの酵素反応溶液に対して０．０５ｍＬ添加して上述の測定を行うことで確認できる。大腸菌を対象としたＣＦＥの調製方法の具体例はアシルトランスフェラーゼ活性の確認方法に記載した通りである。

[0107] 本発明においてＰＥＰカルボキシキナーゼ、アシルトランスフェラーゼ、３－オキソアジピル－ＣｏＡレダクターゼ、エノイル－ＣｏＡヒドラターゼ、エノイル－ＣｏＡレダクターゼ、ＣｏＡトランスフェラーゼのいずれかをコードする核酸を宿主微生物に導入する場合、当該核酸はデータベース上に存在する当該酵素のアミノ酸配列を基に人工的に合成してもよいし、天然から分離してもよい。人工的に合成する場合、導入する宿主微生物に合わせて

各アミノ酸に対応するコドンの使用頻度を変更してもよい。

[0108] 当該酵素をコードする核酸を天然から分離する場合、遺伝子源となる生物は特に限定されないが、例えば、Ａｃｉｎｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｂａｙｌｙｉ、Ａｃｉｎｅｔｏｂａｃｔｅｒ ｒａｄｉｏｒｅｓｉｓｔｅｎｓなどのＡｃｉｎｅｔｏｂａｃｔｅｒ属、Ａｅｒｏｂａｃｔｅｒ ｃｌｏａｃａｅなどのＡｅｒｏｂａｃｔｅｒ属、Ａｌｃａｌｉｇｅｎｅｓ ｆａｅｃａｌｉｓなどのＡｌｃａｌｉｇｅｎｅｓ属、Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｂａｄｉｕｓ、Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｍａｇａｔｅｒｉｕｍ、Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｒｏｓｅｕｓなどのＢａｃｉｌｌｕｓ属、Ｂｒｅｖｉｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｉｏｄｉｎｕｍなどのＢｒｅｖｉｂａｃｔｅｒｉｕｍ属、Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ ａｃｅｔｏａｃｉｄｏｐｈｉｌｕｍ、Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ ａｃｅｔｏｇｌｕｔａｍｉｃｕｍ、Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ ａｍｍｏｎｉａｇｅｎｅｓ、Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｇｌｕｔａｍｉｃｕｍなどのＣｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ属、Ｃｕｐｒｉａｖｉｄｕｓ ｍｅｔａｌｌｉｄｕｒａｎｓ、Ｃｕｐｒｉａｖｉｄｕｓ ｎｅｃａｔｏｒ、Ｃｕｐｒｉａｖｉｄｕｓ ｎｕｍａｚｕｅｎｓｉｓ、Ｃｕｐｒｉａｖｉｄｕｓ ｏｘａｌａｔｉｃｕｓなどのＣｕｐｒｉａｖｉｄｕｓ属、Ｄｅｌｆｔｉａ ａｃｉｄｏｖｏｒａｎｓなどのＤｅｌｆｔｉａ属、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｆｅｒｇｕｓｏｎｉｉなどのＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ属、Ｈａｆｎｉａ ａｌｖｅｉなどのＨａｆｎｉａ属、Ｍｉｃｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ａｍｍｏｎｉａｐｈｉｌｕｍなどのＭｉｃｒｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ属、Ｎｏｃａｒｄｉｏｉｄｅｓ ａｌｂｕｓなどのＮｏｃａｒｄｉｏｉｄｅｓ属、Ｐｌａｎｏｍｉｃｒｏｂｉｕｍ ｏｋｅａｎｏｋｏｉｔｅｓなどのＰｌａｎｏｍｉｃｒｏｂｉｕｍ属、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ａｚｏｔｏｆｏｒｍａｎｓ、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ｃｈｌｏｒａｐｈｉｓ、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｓ、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ｆｒａｇｉ、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ｐｕｔｉｄａ、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ｒｅｐｔｉｌｉｖｏｒａなどのＰｓｅｕｄｏ

monas属、Rhizobium radiobacterなどのRhizobium属、Rhodosporidium toruloidesなどのRhodosporidium属、Saccharomyces cerevisiaeなどのSaccharomyces属、Serratia entomophila、Serratia ficaria、Serratia fonticola、Serratia grimesii、Serratia nematodiphila、Serratia odorifera、Serratia plymuthicaなどのSerratia属、Shimwellia blattaeなどのShimwellia属、Sterptomyces vinaceus、Streptomyces karnatakensis、Streptomyces olivaceus、Streptomyces vinaceusなどのSterptomyces属、Yarrowia lipolyticaなどのYarrowia属、Yersinia ruckeriなどのYersinia属、Euglena gracilis などのEuglena 属、Thermobifida fuscaなどのThermobifida属が挙げられ、好ましくはAcinetobacter属、Coryneb acterium属、Escherichia属、Pseudomonas属、Serratia属、Euglena属、Thermobifida属である。

[0109] 本発明でピルビン酸キナーゼやホスホトランスフェラーゼ系酵素の機能を欠損させるとは、これら酵素活性を欠損させることである。機能を欠損させる方法は特に限定されないが、例えば、当該酵素をコードする遺伝子を、遺伝子変異剤、紫外線照射などによる遺伝子変異処理、部位特異的変異法等による塩基配列の一部や全部の欠損処理、塩基配列へのフレームシフト変異の導入、塩基配列へのストップコドンの挿入等により、欠損させることにより行うことができる。また、遺伝子組換え技術を用いて、塩基配列の全部又は一部を除去したり、他の塩基配列と置換したりすることでも遺伝子の欠損を

行うことができる。これらの中で好ましくは塩基配列の一部もしくは全体を欠損させる方法が好ましい。

[0110] ピルビン酸キナーゼはＥＣ２．７．１．４０に分類され、ホスホエノールピルビン酸を脱リン酸化し、ピルビン酸およびＡＴＰに変換する反応を触媒する酵素である。具体的には、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ ｓｔｒ．Ｋ－１２ ｓｕｂｓｔｒ． ＭＧ１６５５株由来のｐｙｋＦ（ＮＣＢＩ－ＰｒｏｔｅｉｎＩＤ：ＮＰ＿４１６１９１、配列番号１７８）、ｐｙｋＡ（ＮＣＢＩ－ＰｒｏｔｅｉｎＩＤ：ＮＰ＿４１６３６８、配列番号１７９）、およびＳｅｒｒａｔｉａ ｇｒｉｍｅｓｉｉ ＮＢＲＣ１３５３７株由来のｐｙｋＦ（配列番号１８０）、ｐｙｋＡ（配列番号１８１）などが挙げられる。下記スキーム２の代謝経路に示されるように、本発明で用いる微生物がピルビン酸キナーゼをコードする遺伝子を２個以上有する場合は、全てのピルビン酸キナーゼの機能を欠損させることが好ましい。本発明で用いる微生物が有する遺伝子がコードするポリペプチドがピルビン酸キナーゼであるかどうかは、ＮＣＢＩ（Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｃｅｎｔｅｒ ｆｏｒ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ）やＫＥＧＧ（Ｋｙｏｔｏ Ｅｎｃｙｃｌｏｐｅｄｉａ ｏｆ Ｇｅｎｅｓ ａｎｄ Ｇｅｎｏｍｅｓ）などのウェブサイトでＢＬＡＳＴ（Ｂａｓｉｃ Ｌｏｃａｌ Ａｌｉｇｎｍｅｎｔ Ｓｅａｒｃｈ Ｔｏｏｌ）検索を行えばよい。

[0111] ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼはＥＣ４．１．１．４９に分類され、ホスホエノールピルビン酸、二酸化炭素およびＡＤＰからオキサロ酢酸およびＡＴＰを生成する反応を触媒する酵素である。具体的には、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ ｓｔｒ． Ｋ－１２ ｓｕｂｓｔｒ． ＭＧ１６５５株由来のｐｃｋ（ＮＣＢＩ－ＰｒｏｔｅｉｎＩＤ：ＮＰ＿４１７８６２、配列番号１８２）、およびＳｅｒｒａｔｉａ ｇｒｉｍｅｓｉｉ ＮＢＲＣ１３５３７株由来のｐｃｋＡ＿１（配列番号１８３）、ｐｃｋＡ＿２（配列番号１８４）などが挙げられる。

[0112] ＰＥＰカルボキシキナーゼは、生理的には糖新生において脂肪酸からグル

コースを生産する際の主要な反応を担っている。ＰＥＰカルボキシキナーゼが触媒する反応は可逆反応であるが、糖新生において、当該反応はオキサロ酢酸をＰＥＰおよび二酸化炭素に変換する方向に進行する。

[0113] 本発明で用いる酵素遺伝子がコードするポリペプチドがＰＥＰカルボキシキナーゼであるかどうかは、ＮＣＢＩ（Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｃｅｎｔｅｒ ｆｏｒ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ）やＫＥＧＧ（Ｋｙｏｔｏ Ｅｎｃｙｃｌｏｐｅｄｉａ ｏｆ Ｇｅｎｅｓ ａｎｄ Ｇｅｎｏｍｅｓ）などのウェブサイトでＢＬＡＳＴ（Ｂａｓｉｃ Ｌｏｃａｌ Ａｌｉｇｎｍｅｎｔ Ｓｅａｒｃｈ Ｔｏｏｌ）検索を行えばよい。

[0114] 特開２０１５－１４６８１０号公報には、代謝ネットワークモデルを用いてアセチル－ＣｏＡおよびスクシニル－ＣｏＡからアジピン酸を高収率で生産する微生物株をインシリコで作製するにあたり、ＰＥＰカルボキシキナーゼ遺伝子の欠損が有効であることが記載されている。また、特表２０１５－５０４６８８号公報には、ＰＥＰを経由して生合成されるムコン酸の製造において、ＰＥＰプールの増加を目的としてＰＥＰカルボキシキナーゼの活性を強化させることが記載されている。すなわち、ＰＥＰカルボキシキナーゼが触媒する反応はオキサロ酢酸からＰＥＰを生成する方向に進行すると記載された当該記載から、当業者であれば、ＰＥＰカルボキシキナーゼ遺伝子の発現増強による同酵素活性の強化は３－ヒドロキシアジピン酸、α－ヒドロムコン酸、および／またはアジピン酸の収率を低下させると予想すると考える。しかし、本発明では、上記の予想に反して、３－ヒドロキシアジピン酸、α－ヒドロムコン酸、および／またはアジピン酸を製造する能力を有し、かつピルビン酸キナーゼが欠損し、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ遺伝子および３－オキソアジピル－ＣｏＡを還元して３－ヒドロキシアジピル－ＣｏＡを生成する反応を触媒する酵素遺伝子の発現を増強した遺伝子改変微生物を培養すると、３－ヒドロキシアジピン酸、α－ヒドロムコン酸、および／またはアジピン酸の生産量が向上することを見出した。

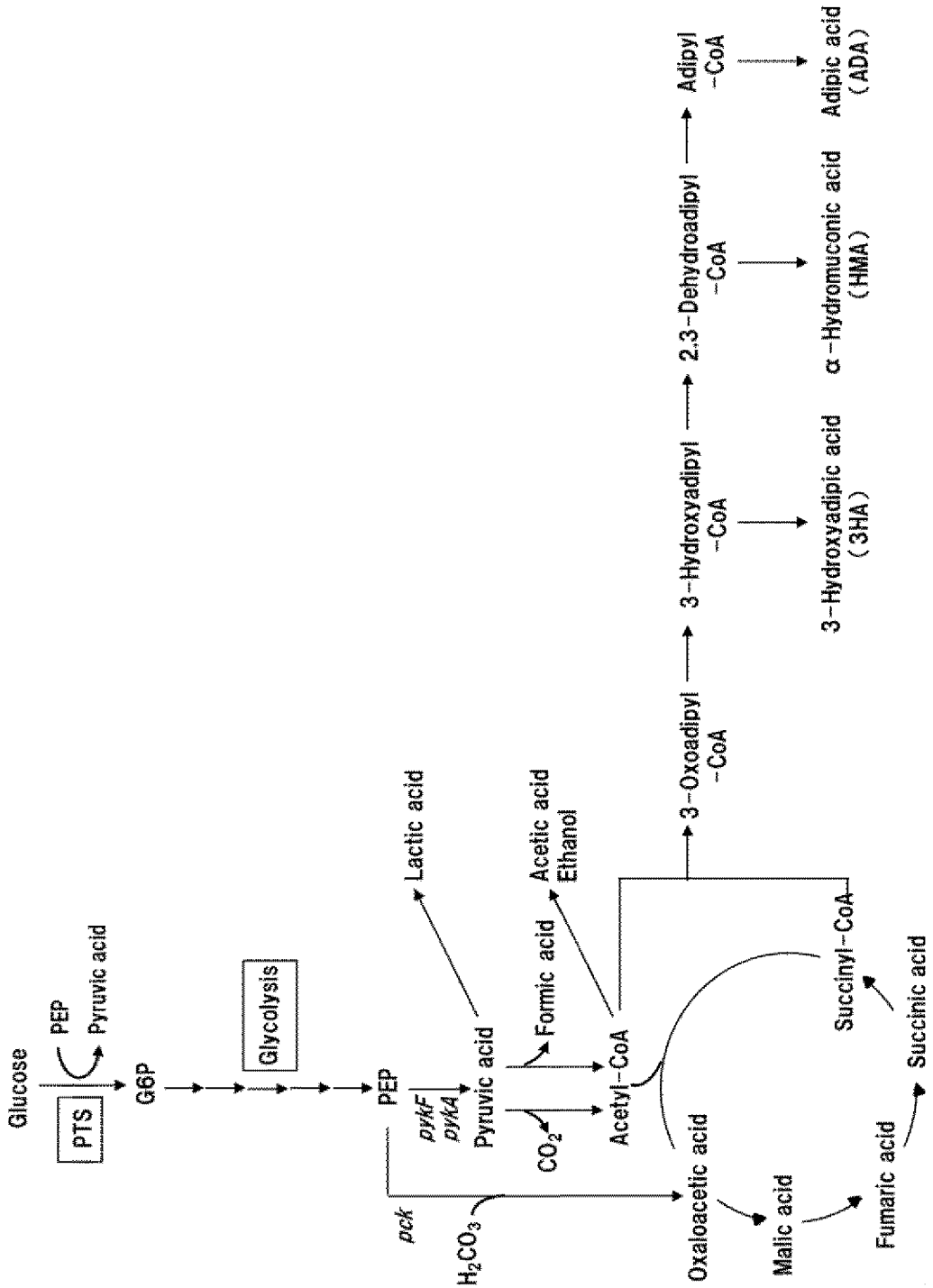
[0115] 本発明の遺伝子改変微生物は、さらにホスホトランスフェラーゼ系酵素の

機能が欠損していることが好ましい。ホスホトランスフェラーゼ系酵素とは、ｐｈｏｓｐｈｏｅｎｏｌｐｙｒｕｖａｔｅ－ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ　ｐｈｏｓｐｈｏｔｒａｎｓｆｅｒａｓｅ　ｓｙｓｔｅｍ（ＰＴＳ）を指す（本明細書中では、ＰＴＳ酵素と記載することがある）。ＰＴＳは、下記スキーム２の代謝経路に示されるように、ヘキソース、ヘキシトール、二糖などの炭水化物を細胞内に取り込むための主要な仕組みである。ＰＴＳにおいて、炭水化物は細胞内に取り込まれると同時にリン酸エステルへと変換され、一方リン酸供与体であるＰＥＰはピルビン酸へと変換される。

[0116] ３－ヒドロキシアジピン酸、α－ヒドロムコン酸、および／またはアジピン酸の生合成における中間体であるアセチル－ＣｏＡは、ＰＴＳ酵素の機能によりＰＥＰからピルビン酸を経由して合成することができる。

[0117]

[化2]



[0118] ＰＴＳ酵素は、炭水化物の種類によらず機能するｐｈｏｓｐｈｏｅｎｏｌｐｙｒｕｖａｔｅ ｓｕｇａｒ ｐｈｏｓｐｈｏｔｒａｎｓｆｅｒａｓｅ ｅｎｚｙｍｅｌおよびｐｈｏｓｐｈｏ ｃａｒｒｉｅｒ ｐｒｏｔｅｉｎ ＨＰｒの２種類の共通酵素と、特定の炭水化物に特異的なｍｅｍｂｒａｎｅ

－ｂｏｕｎｄ ｓｕｇａｒ ｓｐｅｃｉｆｉｃ ｐｅｒｍｅａｓｅｓ（ｅｎｚｙｍｅＩＩ）で構成される。ｅｎｚｙｍｅＩＩはさらにｓｕｇａｒ－ｓｐｅｃｉｆｉｃ ＩＩＡ、ＩＩＢ、およびＩＩＣ ｃｏｍｐｏｎｅｎｔで構成される。ｅｎｚｙｍｅＩＩの酵素は生物種によって個別あるいは複数ドメインタンパクとしてつながった状態で存在する。

[0119] 微生物では、ｐｈｏｓｐｈｏｅｎｏｌｐｙｒｕｖａｔｅ ｓｕｇａｒ ｐｈｏｓｐｈｏｔｒａｎｓｆｅｒａｓｅ ｅｎｚｙｍｅＩはｐｔｓＩ遺伝子、ｐｈｏｓｐｈｏ ｃａｒｒｉｅｒ ｐｒｏｔｅｉｎ ＨＰｒはｐｔｓＨ遺伝子、グルコース特異的ＩＩＡはｃｒｒ遺伝子、同じくグルコース特異的ＩＩＢおよびＩＩＣはｐｔｓＧ遺伝子にそれぞれコードされている。

[0120] ｐｔｓＧ遺伝子がコードする酵素は、ＥＣ２．７．１．１９９に分類され、ｐｒｏｔｅｉｎ－Ｎｐｉ－ｐｈｏｓｐｈｏｈｉｓｔｉｄｉｎｅ－Ｄ－ｇｌｕｃｏｓｅ ｐｈｏｓｐｈｏｔｒａｎｓｆｅｒａｓｅと呼ばれ、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ ｓｔｒ．Ｋ－１２ ｓｕｂｓｔｒ．ＭＧ１６５５株由来のＰｔｓＧ（ＮＣＢＩ－ＰｒｏｔｅｉｎＩＤ：ＮＰ＿４１５６１９）、Ｓｅｒｒａｔｉａ ｇｒｉｍｅｓｉｉ ＮＢＲＣ１３５３７株由来のＰｔｓＧ（配列番号１８５）などが挙げられる。 本発明で用いる微生物が有する遺伝子がコードするポリペプチドがＰＴＳ酵素であるかどうかは、ＮＣＢＩやＫＥＧＧなどのウェブサイトでＢＬＡＳＴ検索を行えばよい。

[0121] 本発明では、上記のＰＴＳ酵素遺伝子のうち、１種類を欠損させてもよいし、複数を欠損させてもよい。上記のＰＴＳ酵素遺伝子のいずれを欠損させてもよいが、好ましくはグルコースの取り込みに関与する酵素遺伝子を欠損させることが好ましく、特にｐｔｓＧ遺伝子を欠損させることが好ましい。ｐｔｓＧ遺伝子の具体例には、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ ｓｔｒ．Ｋ－１２ ｓｕｂｓｔｒ．ＭＧ１６５５株由来のｐｔｓＧ（ＮＣＢＩ－ＧｅｎｅＩＤ：９４５６５１）およびＳｅｒｒａｔｉａ ｇｒｉｍｅｓｉｉ ＮＢＲＣ１３５３７株由来のｐｔｓＧ（配列番号２４３）などが挙げられる。

[0122] 前述のとおり、大腸菌は３－ヒドロキシアジピン酸およびα－ヒドロムコン酸を製造する能力を有する微生物であるが、特表２００８－５２７９９１号公報では、大腸菌のピルビン酸キナーゼをコードするｐｙｋＦおよびｐｙｋＡ並びにホスホトランスフェラーゼ系酵素をコードするｐｔｓＧ遺伝子を欠損させた変異株を作製したこと、また当該変異株を嫌気的条件で培養すると、コハク酸の収率が増加し、酢酸およびエタノールの収率が減少することが記載されている。ここで、酢酸およびエタノールは、上記スキーム２の代謝経路に示すように、アセチル－ＣｏＡから代謝される化合物である。つまり、特表２００８－５２７９９１号公報では、大腸菌のｐｔｓＧ、ｐｋＦ、ｐｙｋＡ遺伝子を欠損させることにより、アセチル－ＣｏＡの供給量が低下し、酢酸およびエタノールの収率が低下したと推定される。

[0123] 一方、本発明の方法で製造する３－ヒドロキシアジピン酸、α－ヒドロムコン酸および／またはアジピン酸は、前述のとおり、アセチル－ＣｏＡおよびスクシニル－ＣｏＡから反応Ａによって生産される３－オキソアジピル－ＣｏＡから複数の反応を介して代謝される化合物である。よって、特表２００８－５２７９９１号公報の記載から、ピルビン酸キナーゼとホスホトランスフェラーゼ系酵素の遺伝子を欠損させると、アセチル－ＣｏＡの供給量の低下により３－ヒドロキシアジピン酸、α－ヒドロムコン酸および／またはアジピン酸の収率も低下することが予想される。しかし、本発明では、上記の予想に反して、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼの活性および３－オキソアジピル－ＣｏＡを還元して３－ヒドロキシアジピル－ＣｏＡを生成する反応を触媒する酵素の活性が強化された遺伝子改変微生物において、ピルビン酸キナーゼおよびホスホトランスフェラーゼ系酵素の遺伝子を欠損させることで、３－ヒドロキシアジピン酸、α－ヒドロムコン酸および／またはアジピン酸の収率が向上し、かつ酢酸およびの収率も向上する。

[0124] 本発明の遺伝子改変微生物は、通常の微生物が利用し得る炭素源を発酵原料として含有する培地、好ましくは液体培地中において培養する。当該遺伝子改変微生物が利用し得る炭素源の他には、窒素源、無機塩および必要に応

じてアミノ酸やビタミンなどの有機微量栄養素を程よく含有した培地を用いる。上記栄養源を含有していれば天然培地、合成培地のいずれでも利用できる。

[0125] 発酵原料とは、当該遺伝子改変微生物が代謝し得る原料である。「代謝」とは、微生物が細胞外から取り入れた、あるいは細胞内で別の化学化合物より生じたある化学化合物が、酵素反応により別の化学化合物へと変換されることを指す。炭素源としては、糖類を好ましく用いることができる。糖類の具体例としては、グルコース、シュクロース、フルクトース、ガラクトース、マンノース、キシロース、アラビノース等の単糖類、これら単糖類が結合した二糖類、多糖類、およびこれらを含有する澱粉糖化液、糖蜜、セルロース含有バイオマス糖化液などが挙げられる。

[0126] 上記に挙げた炭素源は、一種類のみ用いてもよいし、組み合わせて用いてもよいが、特にグルコースを含む培地で培養することが好ましい。炭素源の添加において、培地中の炭素源の濃度は、特に限定されず、炭素源の種類などに応じて適宜設定することができる。グルコースの好ましい濃度は、５ｇ／Ｌ～３００ｇ／Ｌである。

[0127] 当該遺伝子改変微生物の培養に用いる窒素源としては、例えば、アンモニアガス、アンモニア水、アンモニウム塩類、尿素、硝酸塩類、その他補助的に使用される有機窒素源、例えば、油粕類、大豆加水分解液、カゼイン分解物、その他のアミノ酸、ビタミン類、コーンスティープリカー、酵母または酵母エキス、肉エキス、ペプトン等のペプチド類、各種発酵菌体およびその加水分解物などが使用できる。培地中の窒素源の濃度は、特に限定されないが、好ましくは、０．１ｇ／Ｌ～５０ｇ／Ｌである。

[0128] 当該遺伝子改変微生物の培養に用いる無機塩類としては、例えば、リン酸塩、マグネシウム塩、カルシウム塩、鉄塩およびマンガン塩等を適宜添加使用することができる。

[0129] ３－ヒドロキシアジピン酸、α－ヒドロムコン酸および／またはアジピン酸を生産するための遺伝子改変微生物の培養条件は、前記成分組成の培地、

培養温度、撹拌速度、ｐＨ、通気量、植菌量などを、当該遺伝子改変微生物の種類および外部条件などに応じて、適宜調節あるいは選択して設定する。

[0130] 培養におけるｐＨの範囲は当該遺伝子改変微生物が生育することができれば特に制限はないが、好ましくはｐＨ５～８、より好ましくはｐＨ５．５～６．８である。

[0131] 培養における通気条件の範囲は３－ヒドロキシアジピン酸、α－ヒドロムコン酸および／またはアジピン酸を生産することができれば特に制限はないが、当該微生物変異体を良好に生育させるために、少なくとも培養開始時において培養容器内の気相および／または液相に酸素が残存していることが好ましい。

[0132] 液体培養において発泡がある場合には、鉱油、シリコーン油および界面活性剤などの消泡剤を適宜培地に配合することができる。

[0133] 前記微生物の培養物中に、３－ヒドロキシアジピン酸、α－ヒドロムコン酸および／またはアジピン酸が回収可能な量まで生産された後、生産された当該生産物を回収することができる。生産された当該生産物の回収、例えば単離は、蓄積量が適度に高まった時点で培養を停止し、その培養物から、発酵生産物を採取する一般的な方法に準じて行うことができる。具体的には、遠心分離、ろ過などにより菌体を分離したのち、カラムクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、活性炭処理、結晶化、膜分離、蒸留などにより、当該生産物を培養物から単離することができる。より具体的には、当該生産物の塩に酸成分を添加して析出物を回収する方法、培養物を逆浸透膜やエバポレーターなどを用いた濃縮操作により水を除去して当該生産物の濃度を高めた後、冷却結晶化や断熱結晶化により当該生産物および／または当該生産物の塩の結晶を析出させ、遠心分離やろ過などにより当該生産物および／または当該生産物の塩の結晶を得る方法、培養物にアルコールを添加して当該生産物をエステルとした後、蒸留操作により当該生産物のエステルを回収後、加水分解により当該生産物を得る方法等を挙げることができるがこれらに限定されるものではない。また、これらの回収方法は生成物の物性

などにより適当に選択して最適化することができる。

実施例

[0134] 以下、実施例を挙げて本発明を具体的に説明する。

[0135] 参考例１

３－オキソアジピル－ＣｏＡおよび補酵素Ａを生成する反応（反応Ａ）を触媒する酵素、および３－ヒドロキシアジピル－ＣｏＡから３－ヒドロキシアジピン酸を生成する反応（反応Ｅ）かつ２，３－デヒドロアジピル－ＣｏＡからα－ヒドロムコン酸を生成する反応（反応Ｆ）を触媒する酵素、および配列番号１、２、３、４、５、６、７に記載のポリペプチドを発現するプラスミドの作製

大腸菌内で自律複製可能なベクターｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２（ＭＥ Ｋｏｖａｃｈ，（１９９５），Ｇｅｎｅ １６６：１７５－１７６）をＸｈｏＩで切断し、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２／ＸｈｏＩを得た。当該ベクターに構成的な発現プロモーターを組み込むために、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ Ｋ－１２ ＭＧ１６５５のゲノムＤＮＡを鋳型としてｇａｐＡ（ＮＣＢＩ Ｇｅｎｅ ＩＤ： ＮＣ＿０００９１３．３）の上流域２００ｂ（配列番号１８６）をＰＣＲ増幅するためのプライマーを設計し（配列番号１８７、１８８）、常法に従ってＰＣＲ反応を行った。得られた断片およびｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２／ＸｈｏＩ を、Ｉｎ－Ｆｕｓｉｏｎ ＨＤ Ｃｌｏｎｉｎｇ Ｋｉｔ（タカラバイオ株式会社製）を用いて連結し、大腸菌株ＤＨ５αに導入した。得られた組換え大腸菌株から当該プラスミドを抽出し、常法により塩基配列を確認したプラスミドをｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：Ｐｇａｐとした。続いてｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＰｇａｐをＳｃａＩで切断し、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：Ｐｇａｐ／ＳｃａＩ を得た。反応Ａを触媒する酵素をコードする遺伝子を増幅するために、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ｐｕｔｉｄａ ＫＴ２４４０株のゲノムＤＮＡを鋳型としてアシルトランスフェラーゼ遺伝子ｐｃａＦ（ＮＣＢＩ Ｇｅｎｅ ＩＤ： １０４１７５５、配列番号１８９）の全長をＰＣＲ増幅するためのプライマーを設計し（配列番号

１９０、１９１）、常法に従ってＰＣＲ反応を行った。得られた断片およびｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：Ｐｇａｐ／Ｓｃａｌを、Ｉｎ－Ｆｕｓｉｏｎ ＨＤ Ｃｌｏｎｉｎｇ Ｋｉｔを用いて連結し、大腸菌株ＤＨ５αに導入した。得られた組換え株から当該プラスミドを抽出し、常法により塩基配列を確認したプラスミドをｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴとした。続いてｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴをＨｐａＩで切断し、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴ／ＨｐａＩを得た。反応Ｄおよび反応Ｅを触媒する酵素をコードする遺伝子を増幅するために、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ｐｕｔｉｄａ ＫＴ２４４０株のゲノムＤＮＡを鋳型としてＣｏＡトランスフェラーゼ遺伝子ｐｃａＩおよびｐｃａＪ（ＮＣＢＩ Ｇｅｎｅ ＩＤ： １０４６６１３、１０４６６１２、配列番号１９２、１９３）の全長を含む連続した配列をＰＣＲ増幅するためのプライマーを設計し（配列番号１９４、１９５）、常法に従ってＰＣＲ反応を行った。得られた断片およびｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴ／ＨｐａＩを、Ｉｎ－Ｆｕｓｉｏｎ ＨＤ Ｃｌｏｎｉｎｇ Ｋｉｔを用いて連結し、大腸菌株ＤＨ５αに導入した。得られた組換え株から当該プラスミドを抽出し、常法により塩基配列を確認したプラスミドをｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴとした。

[0136] ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴをＳｃａＩで切断し、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴ／ＳｃａＩを得た。配列番号１のポリペプチドをコードする核酸を増幅するために、Ｓｅｒｒａｔｉａ ｍａｒｃｅｓｃｅｎｓ ＡＴＣＣ１３８８０株のゲノムＤＮＡを鋳型として、配列番号８７に記載の核酸を増幅するためのプライマーを設計し（配列番号１９６、１９７）、常法に従ってＰＣＲ反応を行った。配列番号２のポリペプチドをコードする核酸を増幅させるために、Ｓｅｒｒａｔｉａ ｎｅｍａｔｏｄｉｐｈｉｌａ ＤＳＭ２１４２０株のゲノムＤＮＡを鋳型として、配列番号８８に記載の核酸を増幅するためのプライマーを設計し（配列番号１９８、１９９）、常法に従ってＰＣＲ反応を行った。配列番号３のポリペプチドをコードする核酸を増幅させるために、Ｓｅｒｒａｔｉａ ｐｌｙｍｕｔｈｉｃａ ＮＢＲＣ１

０２５９９株のゲノムＤＮＡを鋳型として、配列番号８９に記載の核酸を増幅するためのプライマーを設計し（配列番号２００、２０１）、常法に従ってＰＣＲ反応を行った。配列番号４のポリペプチドをコードする核酸を増幅させるために、Ｓｅｒｒａｔｉａ ｐｒｏｔｅａｍａｃｕｌａｎｓ ５６８株のゲノムＤＮＡを鋳型として、配列番号９０に記載の核酸を増幅するためのプライマーを設計し（配列番号２０２、２０３）、常法に従ってＰＣＲ反応を行った。配列番号５のポリペプチドをコードする核酸を増幅させるために、Ｓｅｒｒａｔｉａ ｕｒｅｉｌｙｔｉｃａ Ｌｒ５／４株のゲノムＤＮＡを鋳型として、配列番号９１に記載の核酸を増幅するためのプライマーを設計し（配列番号２０４、２０５）、常法に従ってＰＣＲ反応を行った。配列番号６のポリペプチドをコードする核酸を増幅させるために、Ｓｅｒｒａｔｉａ ｓｐ．ＢＷ１０６株のゲノムＤＮＡを鋳型として、配列番号９２に記載の核酸を増幅するためのプライマーを設計し（配列番号２０６、２０７）、常法に従ってＰＣＲ反応を行った。配列番号７のポリペプチドをコードする核酸を増幅させるために、Ｓｅｒｒａｔｉａ ｌｉｑｕｅｆａｃｉｅｎｓ ＦＫ０１株のゲノムＤＮＡを鋳型として、配列番号９３に記載の核酸を増幅するためのプライマーを設計し（配列番号２０８、２０９）、常法に従ってＰＣＲ反応を行った。得られたそれぞれの断片およびｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴ／Ｓｃａｌを、Ｉｎ－Ｆｕｓｉｏｎ ＨＤ Ｃｌｏｎｉｎｇ Ｋｉｔ（タカラバイオ株式会社製）を用いて連結し、大腸菌株ＤＨ５αに導入した。得られた組換え株から当該プラスミドを抽出し、常法により塩基配列を確認した。

[0137] 配列番号１に記載のポリペプチドを発現するためのプラスミドを「ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ１」、配列番号２に記載のポリペプチドを発現するためのプラスミドを「ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ２」、配列番号３に記載のポリペプチドを発現するためのプラスミドを「ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ３」、配列番号４に記載のポリペプチドを発現するためのプラスミドを「ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ４」

、配列番号５に記載のポリペプチドを発現するためのプラスミドを「ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ５」、配列番号６に記載のポリペプチドを発現するためのプラスミドを「ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ６」、配列番号７に記載のポリペプチドを発現するためのプラスミドを「ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ７」とし、これらのプラスミドについて表４に示す。

[0138] [表4]

プラスミド	由来生物	Gene ID	配列番号
pBBR1MCS-2::ATCTOR1	Serratia marcescens ATCC 13880	JMPQ01000047.1	87
pBBR1MCS-2::ATCTOR2	Serratia nematodiphila DSM21420	JPUX00000000.1	88
pBBR1MCS-2::ATCTOR3	Serratia plymuthica NBRC102599	BCTU01000013.1	89
pBBR1MCS-2::ATCTOR4	Serratia proteamaculans 568	CP000826.1	90
pBBR1MCS-2::ATCTOR5	Serratia ureilytica Lr5/4	JSFB01000001	91
pBBR1MCS-2::ATCTOR6	Serratia sp. BW106	MCGS01000002.1	92
pBBR1MCS-2::ATCTOR7	Serratia liquefaciens FK01	CP006252.1	93

[0139] 参考例２

３－ヒドロキシアジピル－ＣｏＡから２，３－デヒドロアジピル－ＣｏＡを生成する反応（反応Ｃ）を触媒する酵素を発現するためのプラスミドの作製

大腸菌内で自律複製可能な発現ベクターｐＭＷ１１９（ニッポンジーン社製）をＳａｃＩで切断し、ｐＭＷ１１９／ＳａｃＩを得た。当該ベクターに構成的な発現プロモーターを組み込むために、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ Ｋ－１２ ＭＧ１６５５のゲノムＤＮＡを鋳型としてｇａｐＡ（ＮＣＢＩ Ｇｅｎｅ ＩＤ： ＮＣ＿０００９１３．３）の上流域２００ｂ（配列番号１８６）をＰＣＲ増幅するためのプライマーを設計し（配列番号２１０、２１１）、常法に従ってＰＣＲ反応を行った。得られた断片およびｐＭＷ１１９／ＳａｃＩを、Ｉｎ－Ｆｕｓｉｏｎ ＨＤ Ｃｌｏｎｉｎｇ Ｋ

ｉｔ（タカラバイオ株式会社製）を用いて連結し、大腸菌株ＤＨ５αに導入した。得られた組換え大腸菌株から当該プラスミドを抽出し、常法により塩基配列を確認したプラスミドをｐＭＷ１１９：：Ｐｇａｐとした。続いてｐＭＷ１１９：：ＰｇａｐをＳｐｈＩで切断し、ｐＭＷ１１９：：Ｐｇａｐ／ＳｐｈＩを得た。反応Ｃを触媒する酵素をコードする遺伝子を増幅するために、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｐｕｔｉｄａ　ＫＴ２４４０株のゲノムＤＮＡを鋳型としてエノイル－ＣｏＡヒドラターゼ遺伝子ｐａａＦ（ＮＣＢＩ　Ｇｅｎｅ　ＩＤ：　１０４６９３２、配列番号１７６）の全長をＰＣＲ増幅するためのプライマーを設計し（配列番号２１２、２１３）、常法に従ってＰＣＲ反応を行った。得られた断片およびｐＭＷ１１９：：Ｐｇａｐ／ＳｐｈＩを、Ｉｎ－Ｆｕｓｉｏｎ　ＨＤ　Ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｋｉｔ（タカラバイオ株式会社製）を用いて連結し、大腸菌株ＤＨ５αに導入した。得られた組換え株から当該プラスミドを抽出し、常法により塩基配列を確認した。得られたプラスミドを「ｐＭＷ１１９：：ＥＨ」とした。

[0140] 参考例３

アセチル－ＣｏＡおよびスクシニル－ＣｏＡから３－オキソアジピル－ＣｏＡおよび補酵素Ａを生成する反応（反応Ａ）を触媒する酵素、およびアジピル－ＣｏＡからアジピン酸を生成する反応（反応Ｇ）を触媒する酵素、および配列番号１、２、３、４、５、６、７、に記載のポリペプチドを発現するプラスミドの作製

反応Ｇを触媒する酵素をコードする遺伝子を増幅するために、Ａｃｉｎｅｔｏｂａｃｔｅｒ　ｂａｙｌｙｉ　ＡＤＰ１株のゲノムＤＮＡを鋳型としてＣｏＡトランスフェラーゼ遺伝子ｄｃａＩおよびｄｃａＪ（ＮＣＢＩ　Ｇｅｎｅ　ＩＤ：ＣＲ５４３８６１．１、配列番号２３９、２４０）の全長を含む連続した配列をＰＣＲ増幅するためのプライマーを設計し（配列番号２４１、２４２）、常法に従ってＰＣＲ反応を行った。得られた断片および参考例１で作製したｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ１、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ２、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ３、ｐ

ＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ４、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ５、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ６、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ７をそれぞれＨｐａＩで切断して得られる断片を、Ｉｎ－Ｆｕｓｉｏｎ　ＨＤ　Ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｋｉｔを用いて連結し、大腸菌株ＤＨ５αに導入した。得られた組換え株から当該プラスミドを抽出し、常法により塩基配列を確認したプラスミドをそれぞれｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴ２ＯＲ１、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴ２ＯＲ２、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴ２ＯＲ３、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴ２ＯＲ４、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴ２ＯＲ５、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴ２ＯＲ６、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴ２ＯＲ７とした。

[0141] 参考例４

３－ヒドロキシアジピル－ＣｏＡから２，３－デヒドロアジピル－ＣｏＡを生成する反応（反応Ｃ）および２，３－デヒドロアジピル－ＣｏＡからアジピル－ＣｏＡを生成する反応（反応Ｄ）を触媒する酵素を発現するためのプラスミドの作製

ｐＭＷ１１９：：ＥＨをＨｉｎｄＩＩＩで切断し、ｐＭＷ１１９：：ＥＨ／ＨｉｎｄＩＩＩを得た。反応Ｄを触媒する酵素をコードする遺伝子を増幅するために、Ａｃｉｎｅｔｏｂａｃｔｅｒ　ｂａｙｌｙｉ　ＡＤＰ１株由来のｄｃａＡ（ＮＣＢＩ－ＰｒｏｔｅｉｎＩＤ：ＡＡＬ０９０９４．１、配列番号２１４）の全長をＰＣＲ増幅するためのプライマーを設計し（配列番号２１５、２１６）、常法に従ってＰＣＲ反応を行った。得られた断片およびｐＭＷ１１９：：ＥＨ／ＨｉｎｄＩＩＩを、Ｉｎ－Ｆｕｓｉｏｎ　ＨＤ　Ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｋｉｔ（タカラバイオ株式会社製）を用いて連結し、大腸菌株ＤＨ５αに導入した。得られた組換え株から当該プラスミドを抽出し、常法により塩基配列を確認したプラスミドをｐＭＷ１１９：：ＥＨＥＲとした。

[0142] 参考例５

ＰＥＰカルボキシキナーゼ、３－オキソアジピル－ＣｏＡおよび補酵素Ａを生成する反応（反応Ａ）を触媒する酵素、および３－ヒドロキシアジピル－ＣｏＡから３－ヒドロキシアジピン酸を生成する反応（反応Ｅ）かつ２，３－デヒドロアジピル－ＣｏＡからα－ヒドロムコン酸を生成する反応（反応Ｆ）を触媒する酵素、および配列番号１、２、３、４、５、６、７に記載のポリペプチドを発現するプラスミドの作製

ＰＥＰカルボキシキナーゼを構成的に発現させるプロモーターを組み込むために、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ Ｋ－１２ ＭＧ１６５５のゲノムＤＮＡを鋳型としてｇａｐＡ（ＮＣＢＩ Ｇｅｎｅ ＩＤ： ＮＣ＿０００９１３．３）の上流域２００ｂ（配列番号１８６）をＰＣＲ増幅するためのプライマーを設計し（配列番号２１７、２１８）、常法に従ってＰＣＲ反応を行った。得られた断片および参考例１で作製したｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ１、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ２、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ３、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ４、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ５、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ６、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ７をそれぞれＳａｃＩで切断して得られる断片を、Ｉｎ－Ｆｕｓｉｏｎ ＨＤ Ｃｌｏｎｉｎｇ Ｋｉｔを用いて連結し、大腸菌株ＤＨ５αに導入した。得られた組換え株から当該プラスミドを抽出し、常法により塩基配列を確認したプラスミドをそれぞれｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ１Ｐｇａｐ、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ２Ｐｇａｐ、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ３Ｐｇａｐ、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ４Ｐｇａｐ、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ５Ｐｇａｐ、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ６Ｐｇａｐ、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ７Ｐｇａｐとした。続いてＰＥＰカルボキシキナーゼをコードする遺伝子を増幅するために、Ｓｅｒｒａｔｉａ ｇｒｉｍｅｓｉｉ ＮＢＲＣ１３５３７株のゲノムＤＮＡを鋳型としてＰＥＰカルボキシキナーゼ遺伝子（配列番号２１９）の全長を含む連続した配列をＰＣＲ増幅するためのプライマーを設計

し（配列番号２２０、２２１）、常法に従ってＰＣＲ反応を行った。得られた断片およびｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ１Ｐｇａｐ、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ２Ｐｇａｐ、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ３Ｐｇａｐ、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ４Ｐｇａｐ、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ５Ｐｇａｐ、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ６Ｐｇａｐ、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ７Ｐｇａｐをそれぞれ Ｓａｃ Ｉで切断して得られる断片を、Ｉｎ－Ｆｕｓｉｏｎ ＨＤ Ｃｌｏｎｉｎｇ Ｋｉｔを用いて連結し、大腸菌株ＤＨ５αに導入した。得られた組換え株から当該プラスミドを抽出し、常法により塩基配列を確認したプラスミドをそれぞれｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ１ＰＣＫ、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ２ＰＣＫ、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ３ＰＣＫ、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ４ＰＣＫ、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ５ＰＣＫ、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ６ＰＣＫ、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ７ＰＣＫとした。

[0143] 参考例６

ＰＥＰカルボキシキナーゼ、アセチル－ＣｏＡおよびスクシニル－ＣｏＡから３－オキソアジピル－ＣｏＡおよび補酵素Ａを生成する反応（反応Ａ）を触媒する酵素、およびアジピル－ＣｏＡからアジピン酸を生成する反応（反応Ｇ）を触媒する酵素、および配列番号１、２、３、４、５、６、７、に記載のポリペプチドを発現するプラスミドの作製

参考例５と同様の方法およびプライマーを用いて、参考例３で作製したｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴ２ＯＲ１、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴ２ＯＲ２、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴ２ＯＲ３、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴ２ＯＲ４、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴ２ＯＲ５、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴ２ＯＲ６、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴ２ＯＲ７にＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ Ｋ－１２ ＭＧ１６５５のゲノムＤＮＡを鋳型としてｇａｐＡ（ＮＣＢＩ Ｇｅｎｅ ＩＤ

：　ＮＣ＿０００９１３．３）の上流域２００ｂおよびＳｅｒｒａｔｉａ　ｇｒｉｍｅｓｉｉ　ＮＢＲＣ１３５３７株由来のＰＥＰカルボキシキナーゼ遺伝子を挿入した。得られたプラスミドをそれぞれｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴ２ＯＲ１ＰＣＫ、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴ２ＯＲ２ＰＣＫ、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴ２ＯＲ３ＰＣＫ、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴ２ＯＲ４ＰＣＫ、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴ２ＯＲ５ＰＣＫ、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴ２ＯＲ６ＰＣＫ、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴ２ＯＲ７ＰＣＫとした。

[0144] 実施例１

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損したセラチア属微生物変異体の作製

セラチア属微生物のピルビン酸キナーゼをコードする遺伝子であるｐｙｋＦおよびｐｙｋＡを欠損させ、ピルビン酸キナーゼの機能が欠損したセラチア属微生物変異体を作製した。

[0145] ｐｙｋＦおよびｐｙｋＡの欠損方法は、Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　ＵＳＡ．２０００　Ｊｕｎ　６；　９７（１２）：　６６４０－６６４５．に記載の方法に従った。

[0146] ｐｙｋＦを欠損したセラチア属微生物変異体の作製

ｐＫＤ４を鋳型として、プライマーとして配列番号２２２および２２３のオリゴＤＮＡを用いてＰＣＲを行い、ｐｙｋＦ欠損のための配列長１．６ｋｂのＰＣＲ断片を得た。ＦＲＴ　ｒｅｃｏｍｂｉｎａｓｅ発現プラスミドであるｐＫＤ４６を、Ｓｅｒｒａｔｉａ　ｇｒｉｍｅｓｉｉ　ＮＢＲＣ１３５３７株に導入し、アンピシリン耐性株を取得した。得られた株をアンピシリン５００μｇ／ｍＬを含む５ｍＬのＬＢ培地に植菌し、３０℃で１日振とう培養した。培養液０．５ｍＬをアンピシリン５００μｇ／ｍＬおよびアラビノース５０ｍＭを含む５０ｍＬのＬＢ培地に植菌し、３０℃で２時間、回旋培養した。培養液を２０分間氷冷したのち、菌体を１０％（ｗ／ｗ）グリセロールで３回洗浄した。洗浄後のペレットを１００μＬの１０％（ｗ／ｗ）グリセロールで懸濁し、５μＬのＰＣＲ断片と混合したのちエレクトロポレ

ーションキュベット内で１０分間氷冷した。Ｇｅｎｅ　ｐｕｌｓｅｒ（Ｂｉｏ－ｒａｄ社製）を用いてエレクトロポレーションを実施した（３ｋＶ、２００Ω、２５μＦ）後、即座に１ｍＬのＳＯＣ培地を添加し、３０℃で２時間振とう培養した。全量をカナマイシン２５μｇ／ｍＬを含むＬＢ寒天培地に塗布し、３０℃で１日インキュベートした。得られたカナマイシン耐性株を用いてコロニーダイレクトＰＣＲを行い、バンド長より目的遺伝子の欠損およびカナマイシン耐性遺伝子の挿入を確認した。プライマーは配列番号２２４および２２６のオリゴＤＮＡを使用した。

[0147] 続いて当該カナマイシン耐性株を５ｍＬのＬＢ培地に植菌し、３７℃にて２回継代培養することでｐＫＤ４６を脱落させ、アンピシリン感受性株を得た。アンピシリン感受性株にｐＣＰ２０を導入し、再びアンピシリン耐性株を取得した。得られた株を４０℃で培養した後にコロニーダイレクトＰＣＲを行い、バンド長よりカナマイシン耐性遺伝子の脱落を確認した。プライマーは配列番号２２５および２２６のオリゴＤＮＡを使用した。カナマイシン感受性株を５ｍＬのＬＢ培地に植菌し、３７℃にて２回継代培養することでｐＣＰ２０を脱落させた。得られた株をＳｅｒｒａｔｉａ　ｇｒｉｍｅｓｉｉ　ＮＢＲＣ１３５３７ΔｐｙｋＦとした。

[0148] ｐｙｋＡを欠損したセラチア属微生物変異体の作製

ｐＫＤ４を鋳型として、プライマーとして配列番号２２７および２２８のオリゴＤＮＡを用いてＰＣＲを行い、配列長１．６ｋｂのｐｙｋＡ欠損用ＰＣＲ断片を得た。

[0149] ｐｙｋＦ欠損株の作製と同様の方法にて、Ｓｅｒｒａｔｉａ　ｇｒｉｍｅｓｉｉ　ＮＢＲＣ１３５３７ΔｐｙｋＦ株のｐｙｋＡを欠損させた。当該株にｐＫＤ４６を導入したのち、ｐｙｋＡ欠損用ＰＣＲ断片を導入した。得られたカナマイシン耐性株を用いてコロニーダイレクトＰＣＲを行い、バンド長より目的遺伝子の欠損およびカナマイシン耐性遺伝子の挿入を確認した。プライマーは配列番号２２４および２３０のオリゴＤＮＡを使用した。

[0150] 続いてｐＫＤ４６を脱落させ、アンピシリン感受性株を得た。アンピシリ

ン感受性株にｐＣＰ２０を導入し、再びアンピシリン耐性株を取得した。得られた株を用いてコロニーダイレクトＰＣＲを行い、バンド長よりカナマイシン耐性遺伝子の脱落を確認した。プライマーは配列番号２２９および２３０のオリゴＤＮＡを使用した。カナマイシン感受性株よりｐＣＰ２０を脱落させた。得られた株をＳｇΔＰＰとした。

[0151] 実施例２

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損し、かつＰＥＰカルボキシキナーゼ、反応Ａ、Ｂ、ＥおよびＦを触媒する酵素を発現するプラスミドを導入したセラチア属微生物変異体の作製

実施例１で作製したＳｇΔＰＰに対して、参考例１で作製したプラスミドをそれぞれ導入し、セラチア属微生物変異体を作製した。

[0152] ＳｇΔＰＰを５ｍＬのＬＢ培地に植菌し、３０℃で１日振とう培養した。培養液０．５ｍＬを５ｍＬのＬＢ培地に植菌し、３０℃で２時間、振とう培養した。培養液を２０分間氷冷したのち、菌体を１０％（ｗ／ｗ）グリセロールで３回洗浄した。洗浄後のペレットを１００μＬの１０％（ｗ／ｗ）グリセロールで懸濁し、１μＬのｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ１ＰＣＫ、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ２ＰＣＫ、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ３ＰＣＫ、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ４ＰＣＫ、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ５ＰＣＫ、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ６ＰＣＫ、またはｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ７ＰＣＫと混合したのちエレクトロポレーションキュベット内で１０分間氷冷した。Ｇｅｎｅ　ｐｕｌｓｅｒ（Ｂｉｏ－ｒａｄ社製）を用いてエレクトロポレーションを実施した（３ｋＶ、２００Ω、２５μＦ）後、即座に１ｍＬのＳＯＣ培地を添加し、３０℃で１時間振とう培養した。５０μＬをカナマイシン２５μｇ／ｍＬを含むＬＢ寒天培地に塗布し、３０℃で１日インキュベートした。得られた株をそれぞれＳｇΔＰＰ／３ＨＡ１ＰＣＫ、ＳｇΔＰＰ／３ＨＡ２ＰＣＫ、ＳｇΔＰＰ／３ＨＡ３ＰＣＫ、ＳｇΔＰＰ／３ＨＡ４ＰＣＫ、ＳｇΔＰＰ／３ＨＡ５ＰＣＫ、ＳｇΔＰＰ／３ＨＡ６ＰＣ

Ｋ、ＳｇΔＰＰ／３ＨＡ７ＰＣＫとした。

[0153] 参考例７

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損しておらず、かつＰＥＰカルボキシキナーゼ、反応Ａ、Ｂ、ＥおよびＦを触媒する酵素を発現するプラスミドを導入したセラチア属微生物変異体の作製

実施例２と同様の方法にて、Ｓｅｒｒａｔｉａ ｇｒｉｍｅｓｉｉ ＮＢＲＣ１３５３７にｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ１ＰＣＫ、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ２ＰＣＫ、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ３ＰＣＫ、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ４ＰＣＫ、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ５ＰＣＫ、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ６ＰＣＫ、またはｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ７ＰＣＫを導入した。またコントロールとして、Ｓｅｒｒａｔｉａ ｇｒｉｍｅｓｉｉ ＮＢＲＣ１３５３７に空ベクターであるｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２を導入した株を作製した。得られた株をそれぞれＳｇ／３ＨＡ１ＰＣＫ、Ｓｇ／３ＨＡ２ＰＣＫ、Ｓｇ／３ＨＡ３ＰＣＫ、Ｓｇ／３ＨＡ４ＰＣＫ、Ｓｇ／３ＨＡ５ＰＣＫ、Ｓｇ／３ＨＡ６ＰＣＫ、Ｓｇ／３ＨＡ７ＰＣＫ、Ｓｇ／ｐＢＢＲ（ネガティブコントロール）とした。

[0154] 参考例８

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損し、かつ反応Ａ、Ｂ、ＥおよびＦを触媒する酵素を発現するプラスミドを導入したセラチア属微生物変異体の作製

実施例２と同様の方法にて、ＳｇΔＰＰにｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ１、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ２、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ３、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ４、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ５、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ６、またはｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ７を導入した。またコントロールとして、ＳｇΔＰＰに空ベクターであるｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２を導入した株を作製した。得られた株をそれぞれＳｇΔＰＰ／３ＨＡ１、ＳｇΔＰＰ／３ＨＡ２、ＳｇΔＰＰ／３ＨＡ３、ＳｇΔＰＰ／３ＨＡ４、Ｓｇ

ΔＰＰ／３ＨＡ５、ＳｇΔＰＰ／３ＨＡ６、ＳｇΔＰＰ／３ＨＡ７、ＳｇΔＰＰ／ｐＢＢＲ（ネガティブコントロール）とした。

[0155] 実施例３

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損し、かつＰＥＰカルボキシキナーゼの活性が強化されたセラチア属微生物変異体を用いた３－ヒドロキシアジピン酸およびα－ヒドロムコン酸の生産試験

実施例２で作製したセラチア属微生物変異体を用いて、３－ヒドロキシアジピン酸およびα－ヒドロムコン酸の生産試験を行った。

[0156] ｐＨ７に調整した培地Ｉ（Ｂａｃｔｏトリプトン（Ｄｉｆｃｏ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ社製）１０ｇ／Ｌ、Ｂａｃｔｏ酵母エキス（Ｄｉｆｃｏ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ社製）５ｇ／Ｌ、塩化ナトリウム５ｇ／Ｌ、カナマイシン２５μｇ／ｍＬ）５ｍＬ（φ１８ｍｍガラス試験管、アルミ栓）に、実施例２で作製した変異体を一白金耳植菌し、３０℃、１２０ｍｉｎ－１で２４時間振とう培養した。当該培養液０．２５ｍＬをｐＨ６．５に調整した培地ＩＩ（グルコース５０ｇ／Ｌ、硫酸アンモニウム１ｇ／Ｌ、リン酸カリウム５０ｍＭ、硫酸マグネシウム０．０２５ｇ／Ｌ、硫酸鉄０．０６２５ｍｇ／Ｌ、硫酸マンガン２．７ｍｇ／Ｌ、塩化カルシウム０．３３ｍｇ／Ｌ、塩化ナトリウム１．２５ｇ／Ｌ、Ｂａｃｔｏトリプトン２．５ｇ／Ｌ、Ｂａｃｔｏ酵母エキス１．２５ｇ／Ｌ、カナマイシン２５μｇ／ｍＬ）５ｍＬ（φ１８ｍｍガラス試験管、アルミ栓）に添加し、３０℃、１２０ｍｉｎ－１で２４時間振とう培養した。

[0157] 基質および生成物の定量分析

当該培養液より菌体を遠心分離した上清をＭｉｌｌｅｘ－ＧＶ（０．２２μｍ、ＰＶＤＦ、Ｍｅｒｃｋ社製）を用いて膜処理し、透過液を以下の方法で分析することで培養上清中に蓄積した３－ヒドロキシアジピン酸、α－ヒドロムコン酸および他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。さらに、その結果を元に以下の式（２）を用いて算出した３－ヒドロキシアジピン酸およびα－ヒドロムコン酸の収率を表５に示す。

[0158] ただし、ＬＣ－ＭＳ／ＭＳによる定量分析において０．１ｍｇ／Ｌ以下であった場合は検出限界以下とし、表中には以下Ｎ．Ｄ．と表す。

[0159] 収率（％）＝生成物の生成量（ｍｏｌ）／糖の消費量（ｍｏｌ）×１００・・・式（２）。

[0160] ＬＣ－ＭＳ／ＭＳによる３－ヒドロキシアジピン酸およびα－ヒドロムコン酸の定量分析

・ＨＰＬＣ：１２９０Ｉｎｆｉｎｉｔｙ（Ａｇｉｌｅｎｔ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）

カラム：Ｓｙｎｅｒｇｉ ｈｙｄｒｏ－ＲＰ（Ｐｈｅｎｏｍｅｎｅｘ社製）、長さ１００ｍｍ、内径３ｍｍ、粒径２．５μｍ

移動相：０．１％ギ酸水溶液／メタノール＝７０／３０

流速：０．３ｍＬ／分

カラム温度：４０℃

ＬＣ検出器：１２６０ＤＡＤ ＶＬ＋（２１０ｎｍ）

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

イオン化法：ＥＳＩ ネガティブモード。

[0161] ＨＰＬＣによる有機酸の定量分析

・ＨＰＬＣ：ＬＣ－１０Ａ（島津製作所製）

カラム： Ｓｈｉｍ－ｐａｃｋ ＳＰＲ－Ｈ（島津ジーエルシー社製）、長さ２５０ｍｍ、内径７．８ｍｍ、粒径８μｍ

Ｓｈｉｍ－ｐａｃｋ ＳＣＲ－１０１Ｈ（島津ジーエルシー社製）長さ２５０ｍｍ、内径７．８ｍｍ、粒径１０μｍ

移動相： ５ｍＭ ｐ－トルエンスルホン酸

反応液：５ｍＭ ｐ－トルエンスルホン酸、０．１ｍＭ ＥＤＴＡ、２０ｍＭ Ｂｉｓ－Ｔｒｉｓ

流速：０．８ｍＬ／ｍｉｎ

カラム温度：４５℃

検出器：ＣＤＤ－１０Ａｖｐ（島津製作所製）

[0162] ＨＰＬＣによる糖およびアルコールの定量分析

・ＨＰＬＣ：Ｓｈｉｍａｚｕ　Ｐｒｏｍｉｎｅｎｃｅ（島津製作所製）

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

移動相：０．０５Ｍ　硫酸水溶液

流速：０．６ｍＬ／ｍｉｎ

カラム温度：６５℃

検出器：ＲＩＤ－１０Ａ（島津製作所製）。

[0163] 比較例１

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損しておらず、かつＰＥＰカルボキシキナーゼの活性が強化されたセラチア属微生物変異体を用いた３－ヒドロキシアジピン酸およびα－ヒドロムコン酸の生産試験

実施例３と同様の方法にて、参考例７で作製した変異体を培養した。培養上清中に蓄積した３－ヒドロキシアジピン酸、α－ヒドロムコン酸および他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。さらに、その結果を元に式（２）を用いて算出した３－ヒドロキシアジピン酸およびα－ヒドロムコン酸の収率を表５に示す。

[0164] 比較例２

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損し、かつＰＥＰカルボキシキナーゼの活性が強化されていないセラチア属微生物変異体を用いた３－ヒドロキシアジピン酸およびα－ヒドロムコン酸の生産試験

実施例３と同様の方法にて、参考例８で作製した変異体を培養した。培養上清中に蓄積した３－ヒドロキシアジピン酸、α－ヒドロムコン酸および他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。さらに、その結果を元に式（２）を用いて算出した３－ヒドロキシアジピン酸およびα－ヒドロムコン酸の収率を表５に示す。

[0165] 比較例１および２の結果と実施例３の結果を比較すると、セラチア属微生

物のピルビン酸キナーゼの機能を欠損させ、かつＰＥＰカルボキシキナーゼの活性を強化することにより、３－ヒドロキシアジピン酸およびα－ヒドロムコン酸の収率が向上することがわかった。

[0166] [表5]

	株	3HA収率(%)	HMA収率(%)
実施例3	SgΔPP/3HA1PCK	6.84	0.103
	SgΔPP/3HA2 PCK	7.91	0.132
	SgΔPP/3HA3 PCK	7.43	0.148
	SgΔPP/3HA4 PCK	7.12	0.103
	SgΔPP/3HA5 PCK	7.03	0.127
	SgΔPP/3HA6 PCK	8.13	0.149
	SgΔPP/3HA7 PCK	6.70	0.127
比較例1	Sg/pBBR	N.D.	N.D.
	Sg/3HA1 PCK	0.568	0.0206
	Sg/3HA2 PCK	0.857	0.0336
	Sg/3HA3 PCK	0.684	0.0330
	Sg/3HA4 PCK	0.635	0.0298
	Sg/3HA5 PCK	0.733	0.0290
	Sg/3HA6 PCK	0.750	0.0260
	Sg/3HA7 PCK	0.685	0.0165
比較例2	SgΔPP/pBBR	0.0362	0.0113
	SgΔPP/3HA1	3.47	0.0782
	SgΔPP/3HA2	5.78	0.0960
	SgΔPP/3HA3	5.24	0.0846
	SgΔPP/3HA4	5.10	0.0909
	SgΔPP/3HA5	6.21	0.107
	SgΔPP/3HA6	6.28	0.103
	SgΔPP/3HA7	4.96	0.0638

[0167] 実施例４

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損した大腸菌変異体の作製

大腸菌のピルビン酸キナーゼをコードする遺伝子であるｐｙｋＦおよびｐｙｋＡを欠損させ、ピルビン酸キナーゼの機能が欠損した大腸菌変異体を作製した、ｐｙｋＦおよびｐｙｋＡの欠損方法は、Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ. ２０００ Ｊｕｎ ６; ９７（１２）：６６４０-６６４５．に記載の方法に従った。

[0168] ｐｙｋＦを欠損した大腸菌変異体の作製

ｐＫＤ４を鋳型として、プライマーとして配列番号２３１および２３２のオリゴＤＮＡを用いてＰＣＲを行い、ｐｙｋＦ欠損のための配列長１．６ｋｂのＰＣＲ断片を得た。

[0169] ＦＲＴ ｒｅｃｏｍｂｉｎａｓｅ 発現プラスミドであるｐＫＤ４６を、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ ＭＧ１６５５株に導入し、アンピシリン耐性株を取得した。得られた株をアンピシリン１００μｇ／ｍＬを含む５ｍＬのＬＢ培地に植菌し、３０℃で１日振とう培養した。培養液０．５ｍＬをアンピシリン１００μｇ／ｍＬおよびアラビノース５０ｍＭを含む５０ｍＬのＬＢ培地に植菌し、３０℃で２時間、回旋培養した。培養液を２０分間氷冷したのち、菌体を１０％（ｗ／ｗ）グリセロールで３回洗浄した。洗浄後のペレットを１００μＬの１０％（ｗ／ｗ）グリセロールで懸濁し、５μＬのＰＣＲ断片と混合したのちエレクトロポレーションキュベット内で１０分間氷冷した。Ｇｅｎｅ ｐｕｌｓｅｒ（Ｂｉｏ－ｒａｄ社製）を用いてエレクトロポレーションを実施した（３ｋＶ、２００Ω、２５μＦ）後、即座に１ｍＬのＳＯＣ培地を添加し、３０℃で２時間振とう培養した。全量をカナマイシン２５μｇ／ｍＬを含むＬＢ寒天培地に塗布し、３０℃で１日インキュベートした。得られたカナマイシン耐性株を用いてコロニーダイレクトＰＣＲを行い、バンド長より目的遺伝子の欠損およびカナマイシン耐性遺伝子の挿入を確認した。プライマーは配列番号２２４および２３４のオリゴＤＮＡを使用した。

[0170] 続いて当該カナマイシン耐性株を５ｍＬのＬＢ培地に植菌し、３７℃にて２回継代培養することでｐＫＤ４６を脱落させ、アンピシリン感受性株を得た。アンピシリン感受性株にｐＣＰ２０を導入し、再びアンピシリン耐性株を取得した。得られた株を４０℃で培養した後にコロニーダイレクトＰＣＲを行い、バンド長よりカナマイシン耐性遺伝子の脱落を確認した。プライマーは配列番号２３３および２３４のオリゴＤＮＡを使用した。カナマイシン感受性株を５ｍＬのＬＢ培地に植菌し、３７℃にて２回継代培養することでｐＣＰ２０を脱落させた。得られた株をＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ

ＭＧ１６５５ΔｐｙｋＦとした。

[0171] ｐｙｋＡを欠損した大腸菌変異体の作製

ｐＫＤ４を鋳型として、プライマーとして配列番号２３５および２３６のオリゴＤＮＡを用いてＰＣＲを行い、配列長１．６ｋｂのｐｙｋＡ欠損用ＰＣＲ断片を得た。

[0172] ｐｙｋＦ欠損株の作製と同様の方法にて、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ ＭＧ１６５５ΔｐｙｋＦ株のｐｙｋＡを欠損させた。当該株にｐＫＤ４６を導入したのち、ｐｙｋＡ欠損用ＰＣＲ断片を導入した。得られたカナマイシン耐性株を用いてコロニーダイレクトＰＣＲを行い、バンド長より目的遺伝子の欠損およびカナマイシン耐性遺伝子の挿入を確認した。プライマーは配列番号２２４および２３８のオリゴＤＮＡを使用した。

[0173] 続いてｐＫＤ４６を脱落させ、アンピシリン感受性株を得た。アンピシリン感受性株にｐＣＰ２０を導入し、再びアンピシリン耐性株を取得した。得られた株を用いてコロニーダイレクトＰＣＲを行い、バンド長よりカナマイシン耐性遺伝子の脱落を確認した。プライマーは配列番号２３７および２３８のオリゴＤＮＡを使用した。カナマイシン感受性株よりｐＣＰ２０を脱落させた。得られた株をＥｃΔＰＰとした。

[0174] 実施例５

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損し、かつＰＥＰカルボキシキナーゼ、反応Ａ、Ｂ、ＥおよびＦを触媒する酵素を発現するプラスミドを導入した大腸菌変異体の作製

実施例４で作製したＥｃΔＰＰに対して、参考例１で作製したプラスミドをそれぞれ導入し、大腸菌変異体を作製した。

[0175] ＥｃΔＰＰを５ｍＬのＬＢ培地に植菌し、３０℃で１日振とう培養した。培養液０．５ｍＬを５ｍＬのＬＢ培地に植菌し、３０℃で２時間、振とう培養した。培養液を２０分間氷冷したのち、菌体を１０％（ｗ／ｗ）グリセロールで３回洗浄した。洗浄後のペレットを１００μＬの１０％（ｗ／ｗ）グリセロールで懸濁し、１μＬのｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ１Ｐ

ＣＫ、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ２ＰＣＫ、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ３ＰＣＫ、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ４ＰＣＫ、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ５ＰＣＫ、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ６ＰＣＫ、またはｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ７ＰＣＫと混合したのちエレクトロポレーションキュベット内で１０分間氷冷した。Ｇｅｎｅ　ｐｕｌｓｅｒ（Ｂｉｏ－ｒａｄ社製）を用いてエレクトロポレーションを実施した（３ｋＶ、２００Ω、２５μＦ）後、即座に１ｍＬのＳＯＣ培地を添加し、３０℃で１時間振とう培養した。５０μＬをカナマイシン２５μｇ／ｍＬを含むＬＢ寒天培地に塗布し、３０℃で１日インキュベートした。得られた株をそれぞれＥｃΔＰＰ／３ＨＡ１ＰＣＫ、ＥｃΔＰＰ／３ＨＡ２ＰＣＫ、ＥｃΔＰＰ／３ＨＡ３ＰＣＫ、ＥｃΔＰＰ／３ＨＡ４ＰＣＫ、ＥｃΔＰＰ／３ＨＡ５ＰＣＫ、ＥｃΔＰＰ／３ＨＡ６ＰＣＫ、ＥｃΔＰＰ／３ＨＡ７ＰＣＫとした。

[0176] 参考例９

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損しておらず、かつＰＥＰカルボキシキナーゼ、反応Ａ、Ｂ、ＥおよびＦを触媒する酵素を発現するプラスミドを導入した大腸菌変異体の作製

実施例５と同様の方法にて、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ＭＧ１６５５にｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ１ＰＣＫ、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ２ＰＣＫ、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ３ＰＣＫ、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ４ＰＣＫ、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ５ＰＣＫ、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ６ＰＣＫ、またはｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ７ＰＣＫを導入した。またコントロールとして、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ＭＧ１６５５に空ベクターであるｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２を導入した株を作製した。得られた株をそれぞれＥｃ／３ＨＡ１ＰＣＫ、Ｅｃ／３ＨＡ２ＰＣＫ、Ｅｃ／３ＨＡ３ＰＣＫ、Ｅｃ／３ＨＡ４ＰＣＫ、Ｅｃ／３ＨＡ５ＰＣＫ、Ｅｃ／３ＨＡ６ＰＣＫ、Ｅｃ／３ＨＡ７ＰＣＫ、Ｅｃ／ｐＢＢＲ（ネガティブコ

ントロール）とした。

[0177] 参考例１０

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損し、かつ反応Ａ、Ｂ、ＥおよびＦを触媒する酵素を発現するプラスミドを導入した大腸菌変異体の作製

実施例５と同様の方法にて、ＥｃΔＰＰにｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ１、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ２、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ３、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ４、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ５、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ６、またはｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ７を導入した。またコントロールとして、ＥｃΔＰＰに空ベクターであるｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２を導入した株を作製した。得られた株をそれぞれＥｃΔＰＰ／３ＨＡ１、ＥｃΔＰＰ／３ＨＡ２、ＥｃΔＰＰ／３ＨＡ３、ＥｃΔＰＰ／３ＨＡ４、ＥｃΔＰＰ／３ＨＡ５、ＥｃΔＰＰ／３ＨＡ６、ＥｃΔＰＰ／３ＨＡ７、ＥｃΔＰＰ／ｐＢＢＲ（ネガティブコントロール）とした。

[0178] 実施例６

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損し、かつＰＥＰカルボキシキナーゼの活性が強化された大腸菌変異体を用いた３－ヒドロキシアジピン酸およびα－ヒドロムコン酸の生産試験

実施例３と同様の方法にて、実施例５で作製した変異体を培養した。培養上清中に蓄積した３－ヒドロキシアジピン酸、α－ヒドロムコン酸および他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。その値を元に式（２）を用いて算出した３－ヒドロキシアジピン酸およびα－ヒドロムコン酸の収率を表６に示す。

[0179] 比較例３

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損しておらず、かつＰＥＰカルボキシキナーゼの活性が強化された大腸菌変異体を用いた３－ヒドロキシアジピン酸およびα－ヒドロムコン酸の生産試験

実施例３と同様の方法にて、参考例９で作製した変異体を培養した。培養

上清中に蓄積した３－ヒドロキシアジピン酸、α－ヒドロムコン酸および他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。その値を元に式（２）を用いて算出した３－ヒドロキシアジピン酸およびα－ヒドロムコン酸の収率を表６に示す。

[0180] 比較例４

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損しており、かつＰＥＰカルボキシキナーゼの活性が強化されていない大腸菌変異体を用いた３－ヒドロキシアジピン酸およびα－ヒドロムコン酸の生産試験

実施例３と同様の方法にて、参考例１０で作製した変異体を培養した。培養上清中に蓄積した３－ヒドロキシアジピン酸、α－ヒドロムコン酸および他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。さらに、その結果を元に式（２）を用いて算出した３－ヒドロキシアジピン酸およびα－ヒドロムコン酸の収率を表６に示す。

[0181] 比較例３および４の結果と実施例６の結果を比較すると、大腸菌のピルビン酸キナーゼの機能を欠損させ、かつＰＥＰカルボキシキナーゼの活性を強化することにより、３－ヒドロキシアジピン酸およびα－ヒドロムコン酸の収率が向上することがわかった。

[0182]

[表6]

	株	3HA収率(%)	HMA収率(%)
実施例5	EcΔPP/3HA1PCK	4.76	0.0370
	EcΔPP/3HA2 PCK	5.31	0.0380
	EcΔPP/3HA3 PCK	4.35	0.0323
	EcΔPP/3HA4 PCK	4.60	0.0375
	EcΔPP/3HA5 PCK	5.14	0.0389
	EcΔPP/3HA6 PCK	5.54	0.0389
	EcΔPP/3HA7 PCK	4.65	0.0362
比較例3	Ec/pBBR	N.D.	N.D.
	Ec/3HA1 PCK	1.08	0.0124
	Ec/3HA2 PCK	1.91	0.0116
	Ec/3HA3 PCK	2.15	0.0124
	Ec/3HA4 PCK	1.44	0.0147
	Ec/3HA5 PCK	1.72	0.0109
	Ec/3HA6 PCK	1.86	0.0148
	Ec/3HA7 PCK	1.34	0.0117
比較例4	EcΔPP/pBBR	0.0427	0.0132
	EcΔPP/3HA1	2.54	0.0292
	EcΔPP/3HA2	3.97	0.0333
	EcΔPP/3HA3	3.64	0.0273
	EcΔPP/3HA4	2.86	0.0257
	EcΔPP/3HA5	3.67	0.0269
	EcΔPP/3HA6	3.57	0.0348
	EcΔPP/3HA7	3.13	0.0274

[0183] 実施例７

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損し、かつＰＥＰカルボキシキナーゼ、反応Ａ、Ｂ、Ｃ、ＥおよびＦを触媒する酵素を発現するプラスミドを導入したセラチア属微生物変異体の作製

実施例２で作製したセラチア属微生物変異体それぞれに対して、参考例２で作製したプラスミドｐＭＷ１１９：：ＥＨを導入し、セラチア属微生物変異体を作製した。

[0184] ＳｇΔＰＰ／３ＨＡ１ＰＣＫ、ＳｇΔＰＰ／３ＨＡ２ＰＣＫ、ＳｇΔＰＰ／３ＨＡ３ＰＣＫ、ＳｇΔＰＰ／３ＨＡ４ＰＣＫ、ＳｇΔＰＰ／３ＨＡ５ＰＣＫ、ＳｇΔＰＰ／３ＨＡ６ＰＣＫ、ＳｇΔＰＰ／３ＨＡ７ＰＣＫを、カナマイシン２５μｇ／ｍＬを含む５ｍＬのＬＢ培地に植菌し、３０℃で１日振

とう培養した。培養液０．５ｍＬをカナマイシン２５μｇ／ｍＬを含む５ｍＬのＬＢ培地に植菌し、３０℃で２時間、振とう培養した。培養液を２０分間氷冷したのち、菌体を１０％（ｗ／ｗ）グリセロールで３回洗浄した。洗浄後のペレットを１００μＬの１０％（ｗ／ｗ）グリセロールで懸濁し、１μＬのｐＭＷ１１９：：ＥＨと混合したのちエレクトロポレーションキュベット内で１０分間氷冷した。Ｇｅｎｅ　ｐｕｌｓｅｒ（Ｂｉｏ－ｒａｄ社製）を用いてエレクトロポレーションを実施した（３ｋＶ、２００Ω、２５μＦ）後、即座に１ｍＬのＳＯＣ培地を添加し、３０℃で１時間振とう培養した。５０μＬをアンピシリン５００μｇ／ｍＬおよびカナマイシン２５μｇ／ｍＬを含むＬＢ寒天培地に塗布し、３０℃で１日インキュベートした。得られた株をそれぞれＳｇΔＰＰ／ＨＭＡ１ＰＣＫ、ＳｇΔＰＰ／ＨＭＡ２ＰＣＫ、ＳｇΔＰＰ／ＨＭＡ３ＰＣＫ、ＳｇΔＰＰ／ＨＭＡ４ＰＣＫ、ＳｇΔＰＰ／ＨＭＡ５ＰＣＫ、ＳｇΔＰＰ／ＨＭＡ６ＰＣＫ、ＳｇΔＰＰ／ＨＭＡ７ＰＣＫとした。

[0185] 参考例１１

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損しておらず、かつＰＥＰカルボキシキナーゼ、反応Ａ、Ｂ、Ｃ、ＥおよびＦを触媒する酵素を発現するプラスミドを導入したセラチア属微生物変異体の作製

実施例７と同様の方法にて、Ｓｇ／３ＨＡ１ＰＣＫ、Ｓｇ／３ＨＡ２ＰＣＫ、Ｓｇ／３ＨＡ３ＰＣＫ、Ｓｇ／３ＨＡ４ＰＣＫ、Ｓｇ／３ＨＡ５ＰＣＫ、Ｓｇ／３ＨＡ６ＰＣＫ、Ｓｇ／３ＨＡ７ＰＣＫにｐＭＷ１１９：：ＥＨを導入した。またコントロールとして、Ｓｇ／ｐＢＢＲに空ベクターであるｐＭＷ１１９を導入した株を作製した。得られた株をそれぞれＳｇ／ＨＭＡ１ＰＣＫ、Ｓｇ／ＨＭＡ２ＰＣＫ、Ｓｇ／ＨＭＡ３ＰＣＫ、Ｓｇ／ＨＭＡ４ＰＣＫ、Ｓｇ／ＨＭＡ５ＰＣＫ、Ｓｇ／ＨＭＡ６ＰＣＫ、Ｓｇ／ＨＭＡ７ＰＣＫ、Ｓｇ／ｐＢＢＲｐＭＷ（ネガティブコントロール）とした。

[0186] 参考例１２

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損し、かつ反応Ａ、Ｂ、Ｃ、ＥおよびＦを触

媒する酵素を発現するプラスミドを導入したセラチア属微生物変異体の作製

実施例７と同様の方法にて、ＳｇΔＰＰ／３ＨＡ１、ＳｇΔＰＰ／３ＨＡ２、ＳｇΔＰＰ／３ＨＡ３、ＳｇΔＰＰ／３ＨＡ４、ＳｇΔＰＰ／３ＨＡ５、ＳｇΔＰＰ／３ＨＡ６、ＳｇΔＰＰ／３ＨＡ７にｐＭＷ１１９：：ＥＨを導入した。またコントロールとして、ＳｇΔＰＰ／ｐＢＢＲに空ベクターであるｐＭＷ１１９を導入した株を作製した。得られた株をそれぞれＳｇΔＰＰ／ＨＭＡ１、ＳｇΔＰＰ／ＨＭＡ２、ＳｇΔＰＰ／ＨＭＡ３、ＳｇΔＰＰ／ＨＭＡ４、ＳｇΔＰＰ／ＨＭＡ５、ＳｇΔＰＰ／ＨＭＡ６、ＳｇΔＰＰ／ＨＭＡ７、ＳｇΔＰＰ／ｐＢＢＲｐＭＷ（ネガティブコントロール）とした。

[0187] 実施例８

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損し、かつＰＥＰカルボキシキナーゼの活性が強化されたセラチア属微生物変異体を用いたα－ヒドロムコン酸の生産試験

培地にアンピシリンを５００μｇ／ｍＬとなるように添加した以外は実施例３と同様の方法にて、実施例７で作製した変異体を培養した。培養上清中に蓄積したα－ヒドロムコン酸および他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。その値を元に式（２）を用いて算出したα－ヒドロムコン酸の収率を表７に示す。

[0188] 比較例５

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損しておらず、かつＰＥＰカルボキシキナーゼの活性が強化されたセラチア属微生物変異体を用いたα－ヒドロムコン酸の生産試験

実施例８と同様の方法にて、参考例１１で作製した変異体を培養した。培養上清中に蓄積したα－ヒドロムコン酸および他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。その値を元に式（２）を用いて算出したα－ヒドロムコン酸の収率を表７に示す。

[0189] 比較例６

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損し、かつＰＥＰカルボキシキナーゼの活性が強化されていないセラチア属微生物変異体を用いたα－ヒドロムコン酸の生産試験

実施例８と同様の方法にて、参考例１２で作製した変異体を培養した。培養上清中に蓄積したα－ヒドロムコン酸および他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。さらに、その結果を元に式（２）を用いて算出したα－ヒドロムコン酸の収率を表７に示す。

[0190] 比較例５および６の結果と実施例８の結果を比較すると、セラチア属微生物のピルビン酸キナーゼ遺伝子を欠損させ、かつＰＥＰカルボキシキナーゼの活性を強化することにより、α－ヒドロムコン酸の収率が向上することがわかった。

[0191] [表7]

	株	HMA収率(%)
実施例8	SgΔPP/HMA1PCK	0.182
	SgΔPP/HMA2 PCK	0.205
	SgΔPP/HMA3 PCK	0.218
	SgΔPP/HMA4 PCK	0.221
	SgΔPP/HMA5 PCK	0.246
	SgΔPP/HMA6 PCK	0.294
	SgΔPP/HMA7 PCK	0.216
比較例5	Sg/pBBRpMW	N.D.
	Sg/HMA1 PCK	0.0355
	Sg/HMA2 PCK	0.0420
	Sg/HMA3 PCK	0.0310
	Sg/HMA4 PCK	0.0376
	Sg/HMA5 PCK	0.0423
	Sg/HMA6 PCK	0.0445
	Sg/HMA7 PCK	0.0372
比較例6	SgΔPP/pBBRpMW	0.0119
	SgΔPP/HMA1	0.156
	SgΔPP/HMA2	0.179
	SgΔPP/HMA3	0.153
	SgΔPP/HMA4	0.118
	SgΔPP/HMA5	0.217
	SgΔPP/HMA6	0.241
	SgΔPP/HMA7	0.140

[0192] 実施例９

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損し、かつＰＥＰカルボキシキナーゼ、反応Ａ、Ｂ、Ｃ、ＥおよびＦを触媒する酵素を発現するプラスミドを導入した大腸菌変異体の作製

実施例５で作製した大腸菌変異体それぞれに対して、参考例２で作製したプラスミドｐＭＷ１１９：：ＥＨを導入し、大腸菌変異体を作製した。

[0193] ＥｃΔＰＰ／３ＨＡ１ＰＣＫ、ＥｃΔＰＰ／３ＨＡ２ＰＣＫ、ＥｃΔＰＰ／３ＨＡ３ＰＣＫ、ＥｃΔＰＰ／３ＨＡ４ＰＣＫ、ＥｃΔＰＰ／３ＨＡ５ＰＣＫ、ＥｃΔＰＰ／３ＨＡ６ＰＣＫ、ＥｃΔＰＰ／３ＨＡ７ＰＣＫを、カナマイシン２５μｇ／ｍＬを含む５ｍＬのＬＢ培地に植菌し、３０℃で１日振とう培養した。培養液０．５ｍＬをカナマイシン２５μｇ／ｍＬを含む５ｍＬのＬＢ培地に植菌し、３０℃で２時間、振とう培養した。培養液を２０分間氷冷したのち、菌体を１０％（ｗ／ｗ）グリセロールで３回洗浄した。洗浄後のペレットを１００μＬの１０％（ｗ／ｗ）グリセロールで懸濁し、１μＬのｐＭＷ１１９：：ＥＨと混合したのちエレクトロポレーションキュベット内で１０分間氷冷した。Ｇｅｎｅ　ｐｕｌｓｅｒ（Ｂｉｏ－ｒａｄ社製）を用いてエレクトロポレーションを実施した（３ｋＶ、２００Ω、２５μＦ）後、即座に１ｍＬのＳＯＣ培地を添加し、３０℃で１時間振とう培養した。５０μＬをアンピシリン１００μｇ／ｍＬおよびカナマイシン２５μｇ／ｍＬを含むＬＢ寒天培地に塗布し、３０℃で１日インキュベートした。得られた株をそれぞれＥｃΔＰＰ／ＨＭＡ１ＰＣＫ、ＥｃΔＰＰ／ＨＭＡ２ＰＣＫ、ＥｃΔＰＰ／ＨＭＡ３ＰＣＫ、ＥｃΔＰＰ／ＨＭＡ４ＰＣＫ、ＥｃΔＰＰ／ＨＭＡ５ＰＣＫ、ＥｃΔＰＰ／ＨＭＡ６ＰＣＫ、ＥｃΔＰＰ／ＨＭＡ７ＰＣＫとした。

[0194] 参考例１３

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損しておらず、かつＰＥＰカルボキシキナーゼ、反応Ａ、Ｂ、Ｃ、ＥおよびＦを触媒する酵素を発現するプラスミドを導入した大腸菌変異体の作製

実施例９と同様の方法にて、Ｅｃ／３ＨＡ１ＰＣＫ、Ｅｃ／３ＨＡ２ＰＣＫ、Ｅｃ／３ＨＡ３ＰＣＫ、Ｅｃ／３ＨＡ４ＰＣＫ、Ｅｃ／３ＨＡ５ＰＣＫ、Ｅｃ／３ＨＡ６ＰＣＫ、Ｅｃ／３ＨＡ７ＰＣＫにｐＭＷ１１９：：ＥＨを導入した。またコントロールとして、Ｅｃ／ｐＢＢＲに空ベクターであるｐＭＷ１１９を導入した株を作製した。得られた株をそれぞれＥｃ／ＨＭＡ１ＰＣＫ、Ｅｃ／ＨＭＡ２ＰＣＫ、Ｅｃ／ＨＭＡ３ＰＣＫ、Ｅｃ／ＨＭＡ４ＰＣＫ、Ｅｃ／ＨＭＡ５ＰＣＫ、Ｅｃ／ＨＭＡ６ＰＣＫ、Ｅｃ／ＨＭＡ７ＰＣＫ、Ｅｃ／ｐＢＢＲｐＭＷ（ネガティブコントロール）とした。

[0195] 参考例１４

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損し、かつ反応Ａ、Ｂ、Ｃ、ＥおよびＦを触媒する酵素を発現するプラスミドを導入した大腸菌変異体の作製

実施例９と同様の方法にて、ＥｃΔＰＰ／３ＨＡ１、ＥｃΔＰＰ／３ＨＡ２、ＥｃΔＰＰ／３ＨＡ３、ＥｃΔＰＰ／３ＨＡ４、ＥｃΔＰＰ／３ＨＡ５、ＥｃΔＰＰ／３ＨＡ６、ＥｃΔＰＰ／３ＨＡ７にｐＭＷ１１９：：ＥＨを導入した。またコントロールとして、ＥｃΔＰＰ／ｐＢＢＲに空ベクターであるｐＭＷ１１９を導入した株を作製した。得られた株をそれぞれＥｃΔＰＰ／ＨＭＡ１、ＥｃΔＰＰ／ＨＭＡ２、ＥｃΔＰＰ／ＨＭＡ３、ＥｃΔＰＰ／ＨＭＡ４、ＥｃΔＰＰ／ＨＭＡ５、ＥｃΔＰＰ／ＨＭＡ６、ＥｃΔＰＰ／ＨＭＡ７、ＥｃΔＰＰ／ｐＢＢＲｐＭＷ（ネガティブコントロール）とした。

[0196] 実施例１０

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損し、かつＰＥＰカルボキシキナーゼの活性が強化された大腸菌変異体を用いたα－ヒドロムコン酸の生産試験

培地にアンピシリンを１００μｇ／ｍＬとなるように添加した以外は実施例６と同様の方法にて、実施例９で作製した変異体を培養した。培養上清中に蓄積したα－ヒドロムコン酸および他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。その値を元に式（２）を用いて算出したα－ヒドロムコン酸の収率を表８に示す。

[0197] 比較例７

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損しておらず、かつＰＥＰカルボキシキナーゼの活性が強化された大腸菌変異体を用いたα－ヒドロムコン酸の生産試験

実施例１０と同様の方法にて、参考例１３で作製した変異体を培養した。培養上清中に蓄積したα－ヒドロムコン酸および他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。その値を元に式（２）を用いて算出したα－ヒドロムコン酸の収率を表８に示す。

[0198] 比較例８

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損し、かつＰＥＰカルボキシキナーゼの活性が強化されていない大腸菌変異体を用いたα－ヒドロムコン酸の生産試験

実施例１０と同様の方法にて、参考例１４で作製した変異体を培養した。培養上清中に蓄積したα－ヒドロムコン酸および他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。さらに、その結果を元に式（２）を用いて算出したα－ヒドロムコン酸の収率を表８に示す。

[0199] 比較例７および８の結果と実施例１０の結果を比較すると、大腸菌のピルビン酸キナーゼの機能を欠損させ、かつＰＥＰカルボキシキナーゼの活性を強化することにより、α－ヒドロムコン酸の収率が向上することがわかった。

[0200]

[表8]

	株	HMA収率(%)
実施例10	EcΔPP/HMA1PCK	0.154
	EcΔPP/HMA2 PCK	0.176
	EcΔPP/HMA3 PCK	0.174
	EcΔPP/HMA4 PCK	0.125
	EcΔPP/HMA5 PCK	0.213
	EcΔPP/HMA6 PCK	0.214
	EcΔPP/HMA7 PCK	0.191
比較例7	Ec/pBBRpMW	N.D.
	Ec/HMA1 PCK	0.0257
	Ec/HMA2 PCK	0.0459
	Ec/HMA3 PCK	0.0409
	Ec/HMA4 PCK	0.0459
	Ec/HMA5 PCK	0.0448
	Ec/HMA6 PCK	0.0462
	Ec/HMA7 PCK	0.0352
比較例8	EcΔPP/pBBRpMW	0.0167
	EcΔPP/HMA1	0.0511
	EcΔPP/HMA2	0.0818
	EcΔPP/HMA3	0.0717
	EcΔPP/HMA4	0.0688
	EcΔPP/HMA5	0.0765
	EcΔPP/HMA6	0.0761
	EcΔPP/HMA7	0.0599

[0201] 実施例１１

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損し、かつＰＥＰカルボキシキナーゼ、反応Ａ、Ｂ、Ｃ、Ｄ、およびＧを触媒する酵素を発現するプラスミドを導入したセラチア属微生物変異体の作製

実施例２と同様の方法にて、ＳｇΔＰＰに対して参考例６で作成したｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴ２ＯＲ１ＰＣＫ、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴ２ＯＲ２ＰＣＫ、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴ２ＯＲ３ＰＣＫ、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴ２ＯＲ４ＰＣＫ、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴ２ＯＲ５ＰＣＫ、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴ２ＯＲ６ＰＣＫ、またはｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴ２ＯＲ７ＰＣＫを導入した。得られた変異体それぞれに対して、実施例７と同様の方法にて、参

考例４で作製したプラスミドｐＭＷ１１９：：ＥＨＥＲを導入し、セラチア属微生物変異体を作製した。得られた株をそれぞれＳｇΔＰＰ／ＡＤＡ１ＰＣＫ、ＳｇΔＰＰ／ＡＤＡ２ＰＣＫ、ＳｇΔＰＰ／ＡＤＡ３ＰＣＫ、ＳｇΔＰＰ／ＡＤＡ４ＰＣＫ、ＳｇΔＰＰ／ＡＤＡ５ＰＣＫ、ＳｇΔＰＰ／ＡＤＡ６ＰＣＫ、ＳｇΔＰＰ／ＡＤＡ７ＰＣＫとした。

[0202] 参考例１５

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損しておらず、かつＰＥＰカルボキシキナーゼ、反応Ａ、Ｂ、Ｃ、Ｄ、およびＧを触媒する酵素を発現するプラスミドを導入したセラチア属微生物変異体の作製

実施例２と同様の方法にて、Ｓｅｒｒａｔｉａ ｇｒｉｍｅｓｉｉ ＮＢＲＣ１３５３７に対して参考例６で作成したｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴ２ＯＲ１ＰＣＫ、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴ２ＯＲ２ＰＣＫ、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴ２ＯＲ３ＰＣＫ、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴ２ＯＲ４ＰＣＫ、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴ２ＯＲ５ＰＣＫ、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴ２ＯＲ６ＰＣＫ、またはｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴ２ＯＲ７ＰＣＫを導入した。得られた変異体それぞれに対して、実施例７と同様の方法にて、参考例４で作製したプラスミドｐＭＷ１１９：：ＥＨＥＲを導入し、セラチア属微生物変異体を作製した。得られた株をそれぞれＳｇ／ＡＤＡ１ＰＣＫ、Ｓｇ／ＡＤＡ２ＰＣＫ、Ｓｇ／ＡＤＡ３ＰＣＫ、Ｓｇ／ＡＤＡ４ＰＣＫ、Ｓｇ／ＡＤＡ５ＰＣＫ、Ｓｇ／ＡＤＡ６ＰＣＫ、Ｓｇ／ＡＤＡ７ＰＣＫとした。

[0203] 参考例１６

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損し、かつ反応Ａ、Ｂ、Ｃ、Ｄ、およびＧを触媒する酵素を発現するプラスミドを導入したセラチア属微生物変異体の作製

実施例２と同様の方法にて、ＳｇΔＰＰに対して参考例３で作成したｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴ２ＯＲ１、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴ２ＯＲ２、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴ２ＯＲ３、ｐＢＢＲ１ＭＣ

Ｓ－２：：ＡＴＣＴ２ＯＲ４、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴ２ＯＲ５、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴ２ＯＲ６、またはｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴ２ＯＲ７を導入した。得られた変異体それぞれに対して、実施例７と同様の方法にて、参考例４で作製したプラスミドｐＭＷ１１９：：ＥＨＥＲを導入し、セラチア属微生物変異体を作製した。得られた株をそれぞれＳｇΔＰＰ／ＡＤＡ１、ＳｇΔＰＰ／ＡＤＡ２、ＳｇΔＰＰ／ＡＤＡ３、ＳｇΔＰＰ／ＡＤＡ４、ＳｇΔＰＰ／ＡＤＡ５、ＳｇΔＰＰ／ＡＤＡ６、ＳｇΔＰＰ／ＡＤＡ７とした。

[0204] 実施例１２

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損し、かつＰＥＰカルボキシキナーゼの活性が強化されたセラチア属微生物変異体を用いたアジピン酸の生産試験

培地にアンピシリンを５００μｇ／ｍＬとなるように添加した以外は実施例３と同様の方法にて、実施例１１で作製した変異体を培養した。培養上清中に蓄積したアジピン酸および他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。なおアジピン酸の定量はＬＣ－ＭＳ／ＭＳを用いて３－ヒドロキシアジピン酸およびα－ヒドロムコン酸と同様の条件にて行った。その値を元に式（２）を用いて算出したアジピン収率を表９に示す。

[0205] 比較例９

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損しておらず、かつＰＥＰカルボキシキナーゼの活性が強化されたセラチア属微生物変異体を用いたアジピン酸の生産試験

実施例１２と同様の方法にて、参考例１５で作製した変異体およびＳｇ／ｐＢＢＲｐＭＷを培養した。培養上清中に蓄積したアジピン酸および他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。その値を元に式（２）を用いて算出したアジピン酸の収率を表９に示す。

[0206] 比較例１０

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損し、かつＰＥＰカルボキシキナーゼの活性が強化されていないセラチア属微生物変異体を用いたアジピン酸の生産試験

実施例１２と同様の方法にて、参考例１６で作製した変異体およびＳｇΔＰＰ／ｐＢＢＲｐＭＷを培養した。培養上清中に蓄積したアジピン酸および他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。さらに、その結果を元に式（２）を用いて算出したアジピンの収率を表９に示す。

[0207] 比較例９および１０の結果と実施例１２の結果を比較すると、セラチア属微生物のピルビン酸キナーゼの機能を欠損させ、かつＰＥＰカルボキシキナーゼの活性を強化することにより、アジピン酸の収率が向上することがわかった。

[0208] [表9]

	株	ADA収率(%)
実施例12	SgΔPP/ADA1PCK	0.170
	SgΔPP/ ADA 2 PCK	0.187
	SgΔPP/ ADA 3 PCK	0.176
	SgΔPP/ ADA 4 PCK	0.168
	SgΔPP/ ADA 5 PCK	0.172
	SgΔPP/ ADA 6 PCK	0.205
	SgΔPP/ ADA 7 PCK	0.159
比較例9	Sg/pBBRpMW	N.D.
	Sg/ ADA 1 PCK	0.0170
	Sg/ ADA 2 PCK	0.0229
	Sg/ ADA 3 PCK	0.0177
	Sg/ ADA 4 PCK	0.0171
	Sg/ ADA 5 PCK	0.0221
	Sg/ ADA 6 PCK	0.0185
	Sg/ ADA 7 PCK	0.0203
比較例10	SgΔPP/pBBRpMW	N.D.
	SgΔPP/ ADA 1	0.0783
	SgΔPP/ ADA 2	0.110
	SgΔPP/ ADA 3	0.0861
	SgΔPP/ ADA 4	0.116
	SgΔPP/ ADA 5	0.108
	SgΔPP/ ADA 6	0.136
	SgΔPP/ ADA 7	0.0958

[0209] 実施例１３

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損し、かつＰＥＰカルボキシキナーゼ、反応

Ａ、Ｂ、Ｃ、Ｄ、およびＧを触媒する酵素を発現するプラスミドを導入した大腸菌変異体の作製

実施例５と同様の方法にて、ＥｃΔＰＰに対して参考例６で作成したｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴ２ＯＲ１ＰＣＫ、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴ２ＯＲ２ＰＣＫ、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴ２ＯＲ３ＰＣＫ、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴ２ＯＲ４ＰＣＫ、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴ２ＯＲ５ＰＣＫ、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴ２ＯＲ６ＰＣＫ、またはｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴ２ＯＲ７ＰＣＫを導入した。得られた変異体それぞれに対して、実施例９と同様の方法にて、参考例４で作製したプラスミドｐＭＷ１１９：：ＥＨＥＲを導入し、変異体を作製した。得られた株をそれぞれＥｃΔＰＰ／ＡＤＡ１ＰＣＫ、ＥｃΔＰＰ／ＡＤＡ２ＰＣＫ、ＥｃΔＰＰ／ＡＤＡ３ＰＣＫ、ＥｃΔＰＰ／ＡＤＡ４ＰＣＫ、ＥｃΔＰＰ／ＡＤＡ５ＰＣＫ、ＥｃΔＰＰ／ＡＤＡ６ＰＣＫ、ＥｃΔＰＰ／ＡＤＡ７ＰＣＫとした。

[0210] 参考例１７

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損しておらず、かつＰＥＰカルボキシキナーゼ、反応Ａ、Ｂ、Ｃ、Ｄ、およびＧを触媒する酵素を発現するプラスミドを導入した大腸菌変異体の作製

実施例５と同様の方法にて、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ ＭＧ１６５５に対して参考例６で作成したｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴ２ＯＲ１ＰＣＫ、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴ２ＯＲ２ＰＣＫ、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴ２ＯＲ３ＰＣＫ、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴ２ＯＲ４ＰＣＫ、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴ２ＯＲ５ＰＣＫ、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴ２ＯＲ６ＰＣＫ、またはｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴ２ＯＲ７ＰＣＫを導入した。得られた変異体それぞれに対して、実施例９と同様の方法にて、参考例４で作製したプラスミドｐＭＷ１１９：：ＥＨＥＲを導入し、変異体を作製した。得られた株をそれぞれＥｃ／ＡＤＡ１ＰＣＫ、Ｅｃ／ＡＤＡ２ＰＣＫ、Ｅｃ／ＡＤＡ３ＰＣＫ、Ｅｃ

／ＡＤＡ４ＰＣＫ、Ｅｃ／ＡＤＡ５ＰＣＫ、Ｅｃ／ＡＤＡ６ＰＣＫ、Ｅｃ／ＡＤＡ７ＰＣＫとした。

[0211] 参考例１８

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損し、かつ反応Ａ、Ｂ、Ｃ、Ｄ、およびＧを触媒する酵素を発現するプラスミドを導入した大腸菌変異体の作製

実施例５と同様の方法にて、ＥｃΔＰＰに対して参考例３で作成したｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴ２ＯＲ１、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴ２ＯＲ２、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴ２ＯＲ３、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴ２ＯＲ４、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴ２ＯＲ５、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴ２ＯＲ６、またはｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴ２ＯＲ７を導入した。得られた変異体それぞれに対して、実施例９と同様の方法にて、参考例４で作製したプラスミドｐＭＷ１１９：：ＥＨＥＲを導入し、変異体を作製した。得られた株をそれぞれＥｃΔＰＰ／ＡＤＡ１、ＥｃΔＰＰ／ＡＤＡ２、ＥｃΔＰＰ／ＡＤＡ３、ＥｃΔＰＰ／ＡＤＡ４、ＥｃΔＰＰ／ＡＤＡ５、ＥｃΔＰＰ／ＡＤＡ６、ＥｃΔＰＰ／ＡＤＡ７とした。

[0212] 実施例１４

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損し、かつＰＥＰカルボキシキナーゼの活性が強化された大腸菌の変異体を用いたアジピン酸の生産試験

培地にアンピシリンを５００μｇ／ｍＬとなるように添加した以外は実施例６と同様の方法にて、実施例１３で作製した変異体を培養した。培養上清中に蓄積したアジピン酸および他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。なおアジピン酸の定量はＬＣ－ＭＳ／ＭＳを用いて３－ヒドロキシアジピン酸およびα－ヒドロムコン酸と同様の条件にて行った。その値を元に式（２）を用いて算出したアジピン収率を表１０に示す。

[0213] 比較例１１

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損しておらず、かつＰＥＰカルボキシキナー

ゼの活性が強化された大腸菌変異体を用いたアジピン酸の生産試験

実施例１４と同様の方法にて、参考例１７で作製した変異体を培養した。培養上清中に蓄積したアジピン酸および他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。その値を元に式（２）を用いて算出したアジピン酸の収率を表１０に示す。

[0214] 比較例１２

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損し、かつＰＥＰカルボキシキナーゼの活性が強化されていない大腸菌変異体を用いたアジピン酸の生産試験

実施例１４と同様の方法にて、参考例１８で作製した変異体を培養した。培養上清中に蓄積したアジピン酸および他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。さらに、その結果を元に式（２）を用いて算出したアジピンの収率を表１０に示す。

[0215] 比較例１１および１２の結果と実施例１４の結果を比較すると、大腸菌のピルビン酸キナーゼの機能を欠損させ、かつＰＥＰカルボキシキナーゼの活性を強化することにより、アジピン酸の収率が向上することがわかった。

[0216]

[表10]

	株	ADA収率(%)
実施例14	EcΔPP/ADA1PCK	0.0374
	EcΔPP/ ADA 2 PCK	0.0479
	EcΔPP/ ADA 3 PCK	0.0391
	EcΔPP/ ADA 4 PCK	0.0372
	EcΔPP/ ADA 5 PCK	0.0436
	EcΔPP/ ADA 6 PCK	0.0500
	EcΔPP/ ADA 7 PCK	0.0345
比較例11	Ec/pBBRpMW	N.D.
	Ec/ ADA 1 PCK	0.0109
	Ec/ ADA 2 PCK	0.0115
	Ec/ ADA 3 PCK	0.00993
	Ec/ ADA 4 PCK	0.0131
	Ec/ ADA 5 PCK	0.00920
	Ec/ ADA 6 PCK	0.0104
	Ec/ ADA 7 PCK	0.0113
比較例12	EcΔPP/pBBRpMW	N.D.
	EcΔPP/ ADA 1	0.0213
	EcΔPP/ ADA 2	0.0338
	EcΔPP/ ADA 3	0.0293
	EcΔPP/ ADA 4	0.0315
	EcΔPP/ ADA 5	0.0382
	EcΔPP/ ADA 6	0.0407
	EcΔPP/ ADA 7	0.0235

[0217] 実施例１５

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損し、かつかつＰＥＰカルボキシキナーゼの活性が強化されたセラチア属微生物変異体を用いた３－ヒドロキシアジピン酸およびα－ヒドロムコン酸の生産試験２

実施例２で作製したセラチア属微生物変異体を用いて、嫌気条件下での３－ヒドロキシアジピン酸およびα－ヒドロムコン酸の生産試験を行った。

[0218] 培地ＩＩを用いた培養を静置にて行った以外は実施例３と同様の方法にて、実施例２で作製したセラチア属微生物変異体を培養した。培養上清中に蓄積した３－ヒドロキシアジピン酸およびα－ヒドロムコン酸および他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。その値を元に式（２）を用いて算出した３－ヒドロキシアジピン酸およびα－ヒドロムコ

ン酸の収率を表１１に示す。

[0219] 比較例１３

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損しておらず、かつＰＥＰカルボキシキナーゼの活性が強化されたセラチア属微生物変異体を用いた３－ヒドロキシアジピン酸およびα－ヒドロムコン酸の生産試験２

実施例１５と同様の方法にて、参考例７で作製した変異体を培養した。培養上清中に蓄積した３－ヒドロキシアジピン酸およびα－ヒドロムコン酸および他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。その値を元に式（２）を用いて算出した３－ヒドロキシアジピン酸およびα－ヒドロムコン酸の収率を表１１に示す。

[0220] 比較例１４

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損しており、かつＰＥＰカルボキシキナーゼの活性が強化されていないセラチア属微生物変異体を用いた３－ヒドロキシアジピン酸およびα－ヒドロムコン酸の生産試験２

実施例１５と同様の方法にて、参考例８で作製した変異体を培養した。培養上清中に蓄積した３－ヒドロキシアジピン酸およびα－ヒドロムコン酸および他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。その値を元に式（２）を用いて算出した３－ヒドロキシアジピン酸およびα－ヒドロムコン酸の収率を表１１に示す。

[0221] 比較例１３および１４の結果と実施例１５の結果を比較すると、セラチア属微生物のピルビン酸キナーゼの機能を欠損させ、かつＰＥＰカルボキシキナーゼの活性を強化することにより、嫌気条件下でも３－ヒドロキシアジピン酸およびα－ヒドロムコン酸の収率が向上することがわかった。

[0222]

[表11]

	株	3HA収率(%)	HMA収率(%)
実施例15	SgΔPP/3HA1PCK	6.22	0.233
	SgΔPP/3HA2 PCK	7.34	0.239
	SgΔPP/3HA3 PCK	7.30	0.245
	SgΔPP/3HA4 PCK	7.50	0.267
	SgΔPP/3HA5 PCK	6.45	0.233
	SgΔPP/3HA6 PCK	6.70	0.256
	SgΔPP/3HA7 PCK	6.85	0.224
比較例13	Sg/pBBR	N.D.	N.D.
	Sg/3HA1 PCK	1.14	0.0345
	Sg/3HA2 PCK	1.71	0.0415
	Sg/3HA3 PCK	1.33	0.0337
	Sg/3HA4 PCK	1.37	0.0378
	Sg/3HA5 PCK	1.59	0.3750
	Sg/3HA6 PCK	2.07	0.0452
	Sg/3HA7 PCK	1.12	0.0428
比較例14	SgΔPP/pBBR	0.0485	0.0224
	SgΔPP/3HA1	4.84	0.159
	SgΔPP/3HA2	6.07	0.171
	SgΔPP/3HA3	5.99	0.143
	SgΔPP/3HA4	5.30	0.195
	SgΔPP/3HA5	5.84	0.180
	SgΔPP/3HA6	6.02	0.202
	SgΔPP/3HA7	5.98	0.160

[0223] 実施例１６

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損した大腸菌変異体を用いた３－ヒドロキシアジピン酸およびα－ヒドロムコン酸の生産試験２

実施例５で作製した大腸菌変異体を用いて、嫌気条件下での３－ヒドロキシアジピン酸およびα－ヒドロムコン酸の生産試験を行った。

[0224] 培地ＩＩを用いた培養を静置にて行った以外は実施例６と同様の方法にて、実施例５で作製した大腸菌変異体を培養した。培養上清中に蓄積した３－ヒドロキシアジピン酸およびα－ヒドロムコン酸および他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。その値を元に式（２）を用いて算出した３－ヒドロキシアジピン酸およびα－ヒドロムコン酸の収率を表１２に示す。

[0225] 比較例１５

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損しておらず、かつＰＥＰカルボキシキナーゼの活性が強化された大腸菌変異体を用いた３－ヒドロキシアジピン酸およびα－ヒドロムコン酸の生産試験２

実施例１６と同様の方法にて、参考例９で作製した変異体を培養した。培養上清中に蓄積した３－ヒドロキシアジピン酸およびα－ヒドロムコン酸および他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。その値を元に式（２）を用いて算出した３－ヒドロキシアジピン酸およびα－ヒドロムコン酸の収率を表１２に示す。

[0226] 比較例１６

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損し、かつＰＥＰカルボキシキナーゼの活性が強化されていない大腸菌変異体を用いた３－ヒドロキシアジピン酸およびα－ヒドロムコン酸の生産試験２

実施例１６と同様の方法にて、参考例１０で作製した変異体を培養した。培養上清中に蓄積した３－ヒドロキシアジピン酸およびα－ヒドロムコン酸および他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。その値を元に式（２）を用いて算出した３－ヒドロキシアジピン酸およびα－ヒドロムコン酸の収率を表１２に示す。

[0227] 比較例１５および１６の結果と実施例１６の結果を比較すると、大腸菌のピルビン酸キナーゼの機能を欠損させ、かつＰＥＰカルボキシキナーゼの活性を強化することにより、嫌気条件下でも３－ヒドロキシアジピン酸およびα－－ヒドロムコン酸の収率が向上することがわかった。

[0228]

[表12]

	株	3HA収率(%)	HMA収率(%)
実施例16	EcΔPP/3HA1PCK	15.6	0.0289
	EcΔPP/3HA2 PCK	16.8	0.0334
	EcΔPP/3HA3 PCK	15.5	0.0355
	EcΔPP/3HA4 PCK	15.8	0.0295
	EcΔPP/3HA5 PCK	16.2	0.0326
	EcΔPP/3HA6 PCK	17.2	0.0279
	EcΔPP/3HA7 PCK	16.4	0.0270
比較例15	Ec/pBBR	N.D.	N.D.
	Ec/3HA1 PCK	0.963	0.0116
	Ec/3HA2 PCK	1.46	0.0103
	Ec/3HA3 PCK	1.34	0.0106
	Ec/3HA4 PCK	1.09	0.0102
	Ec/3HA5 PCK	1.49	0.0120
	Ec/3HA6 PCK	1.20	0.1120
	Ec/3HA7 PCK	0.940	0.1220
比較例16	EcΔPP/pBBR	0.0669	0.0113
	EcΔPP/3HA1	13.2	0.0213
	EcΔPP/3HA2	14.9	0.0277
	EcΔPP/3HA3	13.9	0.0268
	EcΔPP/3HA4	14.1	0.0224
	EcΔPP/3HA5	14.3	0.0259
	EcΔPP/3HA6	14.7	0.0226
	EcΔPP/3HA7	13.2	0.0213

[0229] 実施例１７

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損し、かつかつＰＥＰカルボキシキナーゼの活性が強化されたセラチア属微生物変異体を用いたアジピン酸の生産試験２

実施例１１で作製したセラチア属微生物変異体を用いて、嫌気条件下でのアジピン酸の生産試験を行った。

[0230] 培地ＩＩを用いた培養を静置にて行った以外は実施例１２と同様の方法にて、実施例１１で作製したセラチア属微生物変異体を培養した。培養上清中に蓄積したアジピン酸および他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。その値を元に式（２）を用いて算出したアジピン酸の収率を表１３に示す。

[0231] 比較例１７

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損しておらず、かつＰＥＰカルボキシキナーゼの活性が強化されたセラチア属微生物変異体を用いたアジピン酸の生産試験２

実施例１７と同様の方法にて、参考例１５で作製した変異体を培養した。培養上清中に蓄積したアジピン酸および他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。その値を元に式（２）を用いて算出したアジピン酸の収率を表１３に示す。

[0232] 比較例１８

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損しており、かつＰＥＰカルボキシキナーゼの活性が強化されていないセラチア属微生物変異体を用いたアジピン酸の生産試験２

実施例１７と同様の方法にて、参考例１６で作製した変異体を培養した。培養上清中に蓄積したアジピン酸および他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。その値を元に式（２）を用いて算出したアジピン酸の収率を表１３に示す。

[0233] 比較例１７および１８の結果と実施例１７の結果を比較すると、セラチア属微生物のピルビン酸キナーゼの機能を欠損させ、かつＰＥＰカルボキシキナーゼの活性を強化することにより、嫌気条件下でもアジピン酸の収率が向上することがわかった。

[0234]

[表13]

	株	ADA収率(%)
実施例17	SgΔPP/ADA1PCK	0.0699
	SgΔPP/ ADA 2 PCK	0.0720
	SgΔPP/ ADA 3 PCK	0.0591
	SgΔPP/ ADA 4 PCK	0.0613
	SgΔPP/ ADA 5 PCK	0.0628
	SgΔPP/ ADA 6 PCK	0.0637
	SgΔPP/ ADA 7 PCK	0.0518
比較例17	Sg/pBBRpMW	N.D.
	Sg/ ADA 1 PCK	0.0102
	Sg/ ADA 2 PCK	0.0123
	Sg/ ADA 3 PCK	0.0129
	Sg/ ADA 4 PCK	0.0122
	Sg/ ADA 5 PCK	0.0107
	Sg/ ADA 6 PCK	0.0103
	Sg/ ADA 7 PCK	0.0790
比較例18	SgΔPP/pBBRpMW	N.D.
	SgΔPP/ ADA 1	0.0359
	SgΔPP/ ADA 2	0.0480
	SgΔPP/ ADA 3	0.0379
	SgΔPP/ ADA 4	0.0395
	SgΔPP/ ADA 5	0.0431
	SgΔPP/ ADA 6	0.0490
	SgΔPP/ ADA 7	0.0375

[0235] 実施例１８

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損した大腸菌変異体を用いたアジピン酸の生産試験２

実施例１３で作製した大腸菌変異体を用いて、嫌気条件下でのアジピン酸の生産試験を行った。培地ＩＩを用いた培養を静置にて行った以外は実施例１４と同様の方法にて、実施例１３で作製した大腸菌変異体を培養した。培養上清中に蓄積したアジピン酸および他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。その値を元に式（２）を用いて算出したアジピン酸の収率を表１４に示す。

[0236] 比較例１９

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損しておらず、かつＰＥＰカルボキシキナー

ゼの活性が強化された大腸菌変異体を用いたアジピン酸の生産試験２

実施例１８と同様の方法にて、参考例１７で作製した変異体を培養した。培養上清中に蓄積したアジピン酸および他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。その値を元に式（２）を用いて算出したアジピン酸の収率を表１４に示す。

[0237] 比較例２０

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損し、かつＰＥＰカルボキシキナーゼの活性が強化されていない大腸菌変異体を用いたアジピン酸の生産試験２

実施例１８と同様の方法にて、参考例１８で作製した変異体を培養した。培養上清中に蓄積したアジピン酸および他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。その値を元に式（２）を用いて算出したアジピン酸の収率を表１４に示す。

[0238] 比較例１９および２０の結果と実施例１８の結果を比較すると、大腸菌のピルビン酸キナーゼの機能を欠損させ、かつＰＥＰカルボキシキナーゼの活性を強化することにより、嫌気条件下でもアジピン酸の収率が向上することがわかった。

[0239]

[表14]

	株	ADA収率(%)
実施例18	EcΔPP/ADA1PCK	0.0311
	EcΔPP/ ADA 2 PCK	0.0384
	EcΔPP/ ADA 3 PCK	0.0304
	EcΔPP/ ADA 4 PCK	0.0274
	EcΔPP/ ADA 5 PCK	0.0254
	EcΔPP/ ADA 6 PCK	0.0345
	EcΔPP/ ADA 7 PCK	0.0324
比較例19	Ec/pBBRpMW	N.D.
	Ec/ ADA 1 PCK	0.0112
	Ec/ ADA 2 PCK	0.0123
	Ec/ ADA 3 PCK	0.0103
	Ec/ ADA 4 PCK	0.00990
	Ec/ ADA 5 PCK	0.0109
	Ec/ ADA 6 PCK	0.0151
	Ec/ ADA 7 PCK	0.00910
比較例20	EcΔPP/pBBRpMW	N.D.
	EcΔPP/ ADA 1	0.0255
	EcΔPP/ ADA 2	0.0254
	EcΔPP/ ADA 3	0.0269
	EcΔPP/ ADA 4	0.0248
	EcΔPP/ ADA 5	0.0212
	EcΔPP/ ADA 6	0.0278
	EcΔPP/ ADA 7	0.0212

[0240] 参考例１９

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損しておらず、かつ反応Ａ、Ｂ、ＥおよびＦを触媒する酵素を発現するプラスミドを導入したセラチア属微生物変異体の作製

実施例２と同様の方法にて、Ｓｅｒｒａｔｉａ ｇｒｉｍｅｓｉｉ ＮＢＲＣ１３５３７にｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２（コントロール）、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ１、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ２、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ３、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ４、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ５、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ６、またはｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ７を導入した。得られた株をそれぞれＳｇ／ｐＢＢＲ（ネガティブコントロール

）、Ｓｇ／３ＨＡ１、Ｓｇ／３ＨＡ２、Ｓｇ／３ＨＡ３、Ｓｇ／３ＨＡ４、Ｓｇ／３ＨＡ５、Ｓｇ／３ＨＡ６、Ｓｇ／３ＨＡ７とした。

[0241] 比較例２１

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損していないセラチア属微生物変異体を用いた３－ヒドロキシアジピン酸およびα－ヒドロムコン酸の生産試験

実施例３と同様の方法にて、参考例１９で作製したセラチア属微生物変異体を培養した。培養上清中に蓄積した３－ヒドロキシアジピン酸、α－ヒドロムコン酸および他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。さらに、その結果を元に上記式（２）を用いて算出した３－ヒドロキシアジピン酸およびα－ヒドロムコン酸の収率を表１５に示す。

[0242] 本比較例２１の結果と比較例１の結果を比較すると、ピルビン酸キナーゼの機能を欠損させていないセラチア属微生物のＰＥＰカルボキシキナーゼの活性を強化した場合は、強化していない場合と比べて３－ヒドロキシアジピン酸およびα－ヒドロムコン酸の収率が低下することがわかった。

[0243] [表15]

	株	3HA収率(%)	HMA収率(%)
比較例21	Sg/pBBR	N.D.	N.D.
	Sg/3HA1	0.784	0.0293
	Sg/3HA2	1.15	0.0470
	Sg/3HA3	0.942	0.0461
	Sg/3HA4	0.875	0.0418
	Sg/3HA5	1.01	0.0529
	Sg/3HA6	1.03	0.0366
	Sg/3HA7	0.943	0.0237

[0244] 参考例２０

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損しておらず、かつ反応Ａ、Ｂ、ＥおよびＦを触媒する酵素を発現するプラスミドを導入した大腸菌変異体の作製

実施例５と同様の方法にて、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ ＭＧ１６５５にｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２（コントロール）、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ１、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ２、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ３、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ４

、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ５、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ６、またはｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ７を導入した。得られた株をそれぞれＥｃ／ｐＢＢＲ（ネガティブコントロール）、Ｅｃ／３ＨＡ１、Ｅｃ／３ＨＡ２、Ｅｃ／３ＨＡ３、Ｅｃ／３ＨＡ４、Ｅｃ／３ＨＡ５、Ｅｃ／３ＨＡ６、Ｅｃ／３ＨＡ７とした。

[0245] 比較例２２

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損していない大腸菌の変異体を用いた３－ヒドロキシアジピン酸およびα－ヒドロムコン酸の生産試験

実施例６と同様の方法にて、参考例２０で作製した変異体を培養した。培養上清中に蓄積した３－ヒドロキシアジピン酸、α－ヒドロムコン酸および他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。その値を元に上記式（２）を用いて算出した３－ヒドロキシアジピン酸およびα－ヒドロムコン酸の収率を表１６に示す。

[0246] 本比較例２２の結果と比較例３の結果を比較すると、ピルビン酸キナーゼの機能を欠損させていない大腸菌のＰＥＰカルボキシキナーゼの活性を強化した場合は、強化していない場合と比べて３－ヒドロキシアジピン酸およびα－ヒドロムコン酸の収率が低下することがわかった。

[0247] [表16]

	株	3HA収率(%)	HMA収率(%)
比較例22	Ec/pBBR	N.D.	N.D.
	Ec/3HA1	1.48	0.0172
	Ec/3HA2	2.59	0.0160
	Ec/3HA3	2.64	0.0167
	Ec/3HA4	1.82	0.0186
	Ec/3HA5	2.47	0.0166
	Ec/3HA6	2.66	0.0228
	Ec/3HA7	1.78	0.0172

[0248] 参考例２１

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損しておらず、かつ反応Ａ、Ｂ、Ｃ、ＥおよびＦを触媒する酵素を発現するプラスミドを導入したセラチア属微生物変異体の作製

実施例７と同様の方法にて、Ｓｇ／ｐＢＢＲ、Ｓｇ／３ＨＡ１、Ｓｇ／３ＨＡ２、Ｓｇ／３ＨＡ３、Ｓｇ／３ＨＡ４、Ｓｇ／３ＨＡ５、Ｓｇ／３ＨＡ６、Ｓｇ／３ＨＡ７にｐＭＷ１１９（コントロール）、またはｐＭＷ１１９：：ＥＨを導入した。得られた株をそれぞれＳｇ／ｐＢＢＲｐＭＷ（ネガティブコントロール）、Ｓｇ／ＨＭＡ１、Ｓｇ／ＨＭＡ２、Ｓｇ／ＨＭＡ３、Ｓｇ／ＨＭＡ４、Ｓｇ／ＨＭＡ５、Ｓｇ／ＨＭＡ６、Ｓｇ／ＨＭＡ７とした。

[0249] 比較例２３

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損していないセラチア属微生物の変異体を用いたα－ヒドロムコン酸の生産試験

実施例８と同様の方法にて、参考例２１で作製した変異体を培養した。培養上清中に蓄積したα－ヒドロムコン酸および他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。その値を元に上記式（２）を用いて算出したα－ヒドロムコン酸の収率を表１７に示す。

[0250] 本比較例２３の結果と比較例５の結果を比較すると、ピルビン酸キナーゼの機能を欠損させていないセラチア属微生物のＰＥＰカルボキシキナーゼの活性を強化した場合は、強化していない場合と比べてα－ヒドロムコン酸の収率が低下することがわかった。

[0251] [表17]

	株	HMA収率(%)
比較例23	Sg/pBBRpMW	N.D.
	Sg/HMA1	0.0495
	Sg/HMA2	0.0584
	Sg/HMA3	0.0434
	Sg/HMA4	0.0524
	Sg/HMA5	0.0587
	Sg/HMA6	0.0618
	Sg/HMA7	0.0519

[0252] 参考例２２

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損しておらず、かつ反応Ａ、Ｂ、Ｃ、ＥおよびＦを触媒する酵素を発現するプラスミドを導入した大腸菌変異体の作製

実施例９と同様の方法にて、Ｅｃ／ｐＢＢＲ、Ｅｃ／３ＨＡ１、Ｅｃ／３ＨＡ２、Ｅｃ／３ＨＡ３、Ｅｃ／３ＨＡ４、Ｅｃ／３ＨＡ５、Ｅｃ／３ＨＡ６、Ｅｃ／３ＨＡ７にｐＭＷ１１９（コントロール）、またはｐＭＷ１１９：：ＥＨを導入した。得られた株をそれぞれＥｃ／ｐＢＢＲｐＭＷ（ネガティブコントロール）、Ｅｃ／ＨＭＡ１、Ｅｃ／ＨＭＡ２、Ｅｃ／ＨＭＡ３、Ｅｃ／ＨＭＡ４、Ｅｃ／ＨＭＡ５、Ｅｃ／ＨＭＡ６、Ｅｃ／ＨＭＡ７とした。

[0253] 比較例２４

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損していない大腸菌の変異体を用いたα－ヒドロムコン酸の生産試験

実施例１０と同様の方法にて、参考例２２で作製した変異体を培養した。培養上清中に蓄積したα－ヒドロムコン酸および他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。その値を元に上記式（２）を用いて算出したα－ヒドロムコン酸の収率を表１８に示す。

[0254] 本比較例２４の結果と比較例７の結果を比較すると、ピルビン酸キナーゼの機能を欠損させていない大腸菌のＰＥＰカルボキシキナーゼの活性を強化した場合は、強化していない場合と比べてα－ヒドロムコン酸の収率が低下することがわかった。

[0255] [表18]

	株	HMA収率(%)
比較例24	Ec/pBBRpMW	N.D.
	Ec/HMA1	0.0362
	Ec/HMA2	0.0636
	Ec/HMA3	0.0569
	Ec/HMA4	0.0624
	Ec/HMA5	0.0621
	Ec/HMA6	0.0640
	Ec/HMA7	0.0491

[0256] 参考例２３

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損しておらず、かつ反応Ａ、Ｂ、Ｃ、Ｄ、およびＧを触媒する酵素を発現するプラスミドを導入したセラチア属微生物変

異体の作製

実施例１１と同様の方法にて、Ｓｅｒｒａｔｉａ　ｇｒｉｍｅｓｉｉ　ＮＢＲＣ１３５３７に対して参考例３で作成したｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴ２ＯＲ１、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴ２ＯＲ２、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴ２ＯＲ３、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴ２ＯＲ４、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴ２ＯＲ５、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴ２ＯＲ６、またはｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴ２ＯＲ７を導入した。得られた変異体それぞれに対して、実施例７と同様の方法にて、参考例４で作製したプラスミドｐＭＷ１１９：：ＥＨＥＲを導入し、セラチア属微生物変異体を作製した。得られた株をそれぞれＳｇ／ＡＤＡ１、Ｓｇ／ＡＤＡ２、Ｓｇ／ＡＤＡ３、Ｓｇ／ＡＤＡ４、Ｓｇ／ＡＤＡ５、Ｓｇ／ＡＤＡ６、Ｓｇ／ＡＤＡ７とした。

[0257] 比較例２５

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損していないセラチア属微生物の変異体を用いたアジピン酸の生産試験

実施例８と同様の方法にて、参考例２３で作製した変異体およびＳｇ／ｐＢＢＲｐＭＷを培養した。培養上清中に蓄積したアジピン酸および他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。その値を元に上記式（２）を用いて算出したアジピン酸の収率を表１９に示す。

[0258] 本比較例２５の結果と比較例９の結果を比較すると、ピルビン酸キナーゼの機能を欠損させていないセラチア属微生物のＰＥＰカルボキシキナーゼの活性を強化した場合は、強化していない場合と比べてアジピン酸の収率が低下することがわかった。

[0259]

[表19]

	株	ADA収率(%)
比較例25	Sg/pBBRpMW	N.D.
	Sg/ADA1	0.0244
	Sg/ADA2	0.0325
	Sg/ADA3	0.0254
	Sg/ADA4	0.0246
	Sg/ADA5	0.0314
	Sg/ADA6	0.0264
	Sg/ADA7	0.0289

[0260] 参考例２４

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損しておらず、かつ反応Ａ、Ｂ、Ｃ、Ｄ、およびＧを触媒する酵素を発現するプラスミドを導入した大腸菌変異体の作製

実施例１３と同様の方法にて、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ ＭＧ１６５５に対して参考例３で作成したｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴ２ＯＲ１、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴ２ＯＲ２、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴ２ＯＲ３、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴ２ＯＲ４、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴ２ＯＲ５、ｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴ２ＯＲ６、またはｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴ２ＯＲ７を導入した。得られた変異体それぞれに対して、実施例９と同様の方法にて、参考例４で作製したプラスミドｐＭＷ１１９：：ＥＨＥＲを導入し、大腸菌変異体を作製した。得られた株をそれぞれＥｃ／ＡＤＡ１、Ｅｃ／ＡＤＡ２、Ｅｃ／ＡＤＡ３、Ｅｃ／ＡＤＡ４、Ｅｃ／ＡＤＡ５、Ｅｃ／ＡＤＡ６、Ｅｃ／ＡＤＡ７とした。

[0261] 比較例２６

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損していない大腸菌の変異体を用いたアジピン酸の生産試験

実施例１０と同様の方法にて、参考例２４で作製した変異体およびＥｃ／ｐＢＢＲｐＭＷを培養した。培養上清中に蓄積したアジピン酸および他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。その値を元に上記式（２）を用いて算出したアジピン酸の収率を表２０に示す。

[0262] 本比較例２６の結果と比較例１１の結果を比較すると、ピルビン酸キナーゼの機能を欠損させていない大腸菌のＰＥＰカルボキシキナーゼの活性を強化した場合は、強化していない場合と比べてアジピン酸の収率が低下することがわかった。

[0263] [表20]

	株	ADA収率(%)
比較例26	Ec/pBBRpMW	N.D.
	Ec/ADA1	0.0148
	Ec/ADA2	0.0153
	Ec/ADA3	0.0107
	Ec/ADA4	0.0192
	Ec/ADA5	0.0139
	Ec/ADA6	0.0147
	Ec/ADA7	0.0167

[0264] 比較例２７

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損していないセラチア属微生物の変異体を用いた３－ヒドロキシアジピン酸およびα－ヒドロムコン酸の生産試験２

実施例１５と同様の方法にて、参考例１９で作製した変異体を培養した。培養上清中に蓄積した３－ヒドロキシアジピン酸およびα－ヒドロムコン酸および他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。その値を元に上記式（２）を用いて算出した３－ヒドロキシアジピン酸およびα－ヒドロムコン酸の収率を表２１に示す。

[0265] 本比較例２７の結果と比較例１３の結果を比較すると、ピルビン酸キナーゼの機能を欠損させていないセラチア属微生物のＰＥＰカルボキシキナーゼの活性を強化した場合は、嫌気条件下においても、強化していない場合と比べて３－ヒドロキシアジピン酸およびα－ヒドロムコン酸の収率が低下することがわかった。

[0266]

[表21]

	株	3HA収率(%)	HMA収率(%)
比較例27	Sg/pBBR	N.D.	N.D.
	Sg/3HA1	1.68	0.0482
	Sg/3HA2	2.46	0.0577
	Sg/3HA3	1.94	0.0471
	Sg/3HA4	1.99	0.0527
	Sg/3HA5	2.29	0.0523
	Sg/3HA6	2.95	0.0627
	Sg/3HA7	1.66	0.0595

[0267] 比較例２８

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損していない大腸菌の変異体を用いた３－ヒドロキシアジピン酸およびα－ヒドロムコン酸の生産試験２

実施例１６と同様の方法にて、参考例２０で作製した変異体を培養した。培養上清中に蓄積した３－ヒドロキシアジピン酸およびα－ヒドロムコン酸および他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。その値を元に上記式（２）を用いて算出した３－ヒドロキシアジピン酸およびα－ヒドロムコン酸の収率を表２２に示す。

[0268] 本比較例２８の結果と比較例１５の結果を比較すると、ピルビン酸キナーゼの機能を欠損させていない大腸菌のＰＥＰカルボキシキナーゼの活性を強化した場合は、嫌気条件下においても、強化していない場合と比べて３－ヒドロキシアジピン酸およびα－ヒドロムコン酸の収率が低下することがわかった。

[0269] [表22]

	株	3HA収率(%)	HMA収率(%)
比較例28	Ec/pBBR	N.D.	N.D.
	Ec/3HA1	1.32	0.0171
	Ec/3HA2	2.00	0.0154
	Ec/3HA3	1.82	0.0130
	Ec/3HA4	1.47	0.0136
	Ec/3HA5	2.17	0.0138
	Ec/3HA6	1.77	0.0166
	Ec/3HA7	1.14	0.0179

[0270] 比較例２９

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損していないセラチア属微生物の変異体を用いたアジピン酸の生産試験２

実施例１７と同様の方法にて、参考例２３で作製した変異体を培養した。培養上清中に蓄積したアジピン酸および他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。その値を元に上記式（２）を用いて算出したアジピン酸の収率を表２３に示す。

[0271] 本比較例２９の結果と比較例１７の結果を比較すると、ピルビン酸キナーゼの機能を欠損させていないセラチア属微生物のＰＥＰカルボキシキナーゼの活性を強化した場合は、嫌気条件下においても、強化していない場合と比べてアジピン酸の収率が低下することがわかった。

[0272] [表23]

	株	ADA収率(%)
比較例29	Sg/pBBRpMW	N.D.
	Sg/ADA1	0.0152
	Sg/ADA2	0.0181
	Sg/ADA3	0.0188
	Sg/ADA4	0.0179
	Sg/ADA5	0.0135
	Sg/ADA6	0.0130
	Sg/ADA7	0.00930

[0273] 比較例３０

ピルビン酸キナーゼの機能が欠損していない大腸菌の変異体を用いたアジピン酸の生産試験２

実施例１８と同様の方法にて、参考例２４で作製した変異体を培養した。培養上清中に蓄積したアジピン酸および他の生成物、培地中に利用されずに残存している糖の濃度を定量した。その値を元に上記式（２）を用いて算出したアジピン酸の収率を表２４に示す。

[0274] 本比較例３０の結果と比較例１９の結果を比較すると、ピルビン酸キナーゼの機能を欠損させていない大腸菌のＰＥＰカルボキシキナーゼの活性を強化した場合は、嫌気条件下においても、強化していない場合と比べてアジピ

ン酸の収率が低下することがわかった。

[0275] [表24]

	株	ADA収率(%)
比較例30	Ec/pBBRpMW	N.D.
	Ec/ADA1	0.0166
	Ec/ADA2	0.0180
	Ec/ADA3	0.0140
	Ec/ADA4	0.0161
	Ec/ADA5	0.0148
	Ec/ADA6	0.0219
	Ec/ADA7	0.0123

[0276] 実施例１９

ピルビン酸キナーゼ遺伝子およびホスホトランスフェラーゼ系酵素遺伝子が欠損したセラチア属微生物の遺伝子変異体の作製

実施例１で作製したＳｇΔＰＰ株の有するホスホトランスフェラーゼをコードする遺伝子であるｐｔｓＧを欠損させ、ピルビン酸キナーゼおよびホスホトランスフェラーゼ系酵素の機能が欠損したセラチア属微生物変異体を作製した。

[0277] ｐＫＤ４を鋳型として、プライマーとして配列番号２４４および２４５のオリゴＤＮＡを用いてＰＣＲを行い、ｐｔｓＧ欠損のための配列長１．６ｋｂのＰＣＲ断片を得た。当該株にｐＫＤ４６を導入したのち、ｐｔｓＧ欠損用ＰＣＲ断片を導入した。得られたカナマイシン耐性株を用いてコロニーダイレクトＰＣＲを行い、バンド長より目的遺伝子の欠損およびカナマイシン耐性遺伝子の挿入を確認した。プライマーは配列番号２２４および２４７のオリゴＤＮＡを使用した。

[0278] 続いてｐＫＤ４６を脱落させ、アンピシリン感受性株を得た。アンピシリン感受性株にｐＣＰ２０を導入し、再びアンピシリン耐性株を取得した。得られた株を用いてコロニーダイレクトＰＣＲを行い、バンド長よりカナマイシン耐性遺伝子の脱落を確認した。プライマーは配列番号２４６および２４７のオリゴＤＮＡを使用した。カナマイシン感受性株よりｐＣＰ２０を脱落させた。得られた株を以降ＳｇΔＰＰＧと記載する。

[0279] 実施例２０

ピルビン酸キナーゼ遺伝子およびホスホトランスフェラーゼ系酵素遺伝子が欠損し、かつＰＥＰカルボキシキナーゼ、反応Ａ、Ｂ、ＥおよびＦを触媒する酵素を発現するプラスミドを導入したセラチア属微生物の遺伝子変異体の作製

実施例１９で作製したＳｇΔＰＰＧ株に対して、実施例２と同様の方法にて参考例５で作製したプラスミドｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ１ＰＣＫを導入し、得られたセラチア属微生物変異体をＳｇΔＰＰＧ／３ＨＡ１ＰＣＫとした。

[0280] 実施例２１

ピルビン酸キナーゼおよびホスホトランスフェラーゼ系酵素の機能が欠損し、かつＰＥＰカルボキシキナーゼ、反応Ａ、Ｂ、ＥおよびＦを触媒する酵素を発現するプラスミドを導入したセラチア属微生物変異体を用いた３－ヒドロキシアジピン酸およびα－ヒドロムコン酸の生産試験

実施例２０で作製したセラチア属微生物変異体を用いて、実施例１５と同様の方法にて３－ヒドロキシアジピン酸およびα－ヒドロムコン酸の生産試験を行った。

[0281] 比較例３１

ピルビン酸キナーゼおよびホスホトランスフェラーゼ系酵素の機能が欠損せず、かつＰＥＰカルボキシキナーゼ、反応Ａ、Ｂ、ＥおよびＦを触媒する酵素を発現するプラスミドを導入したセラチア属微生物変異体を用いた３－ヒドロキシアジピン酸およびα－ヒドロムコン酸の生産試験

参考例７で作製したＳｇ／３ＨＡ１ＰＣＫ株を用いて、比較例１３と同様の方法にて３－ヒドロキシアジピン酸およびα－ヒドロムコン酸の生産試験を行った。

[0282] 実施例２１の結果と実施例１５の結果を比較すると、ピルビン酸キナーゼおよびホスホトランスフェラーゼ系酵素の遺伝子が欠損し、かつＰＥＰカルボキシキナーゼ、および３－オキソアジピル－ＣｏＡを還元して３－ヒドロ

キシアジピル－ＣｏＡを生成する反応を触媒する酵素活性を強化したセラチア属微生物変異体では、３－ヒドロキシアジピン酸およびα－ヒドロムコン酸の収率がさらに向上することがわかった。また、実施例２１と比較例３１の結果を比較すると、ピルビン酸キナーゼおよびホスホトランスフェラーゼ系酵素の遺伝子が欠損した変異体では、アセチル－ＣｏＡが変換されて生成する酢酸およびエタノールの収率も向上することもわかった。

[0283] [表25]

	株	3HA収率(%)	HMA収率(%)	コハク酸収率(%)	酢酸収率(%)	エタノール収率(%)
実施例21	SgΔPPG/3HA1 PCK	8.21	0.467	45.6	43.2	50.2
比較例31	Sg/3HA1 PCK	1.14	0.0345	12.65	28.5	34.9

[0284] 実施例２２

ピルビン酸キナーゼ遺伝子およびホスホトランスフェラーゼ系酵素遺伝子が欠損した大腸菌の変異体の作製

実施例４で作製したＥｃΔＰＰ株の有するホスホトランスフェラーゼをコードする遺伝子であるｐｔｓＧを欠損させ、ピルビン酸キナーゼおよびホスホトランスフェラーゼ系酵素の機能が欠損した大腸菌の変異体を作製した。

[0285] ｐＫＤ４を鋳型として、プライマーとして配列番号２４８および２４９のオリゴＤＮＡを用いてＰＣＲを行い、ｐｔｓＧ欠損のための配列長１．６ｋｂのＰＣＲ断片を得た。当該株にｐＫＤ４６を導入したのち、ｐｔｓＧ欠損用ＰＣＲ断片を導入した。得られたカナマイシン耐性株を用いてコロニーダイレクトＰＣＲを行い、バンド長より目的遺伝子の欠損およびカナマイシン耐性遺伝子の挿入を確認した。プライマーは配列番号２２４および２５１のオリゴＤＮＡを使用した。

[0286] 続いてｐＫＤ４６を脱落させ、アンピシリン感受性株を得た。アンピシリン感受性株にｐＣＰ２０を導入し、再びアンピシリン耐性株を取得した。得られた株を用いてコロニーダイレクトＰＣＲを行い、バンド長よりカナマイ

シン耐性遺伝子の脱落を確認した。プライマーは配列番号２５０および２５１のオリゴＤＮＡを使用した。カナマイシン感受性株よりｐＣＰ２０を脱落させた。得られた株を得られた株を以降ＥｃΔＰＰＧと記載する。

[0287] 実施例２３

ピルビン酸キナーゼ遺伝子およびホスホトランスフェラーゼ系酵素遺伝子が欠損し、かつＰＥＰカルボキシキナーゼ、反応Ａ、Ｂ、ＥおよびＦを触媒する酵素を発現するプラスミドを導入した大腸菌の変異体の作製

実施例２２で作製したＥｃΔＰＰＧ株に対して、実施例５と同様の方法にて参考例５で作製したｐＢＢＲ１ＭＣＳ－２：：ＡＴＣＴＯＲ１ＰＣＫを導入し、得られた大腸菌変異体をＥｃΔＰＰＧ／３ＨＡ１ＰＣＫとした。

[0288] 実施例２４

ピルビン酸キナーゼおよびホスホトランスフェラーゼ系酵素の機能が欠損し、かつＰＥＰカルボキシキナーゼ、反応Ａ、Ｂ、ＥおよびＦを触媒する酵素を発現するプラスミドを導入した大腸菌変異体を用いた３－ヒドロキシアジピン酸およびα－ヒドロムコン酸の生産試験

実施例２３で作製した大腸菌変異体を用いて、実施例１６と同様の方法にて３－ヒドロキシアジピン酸およびα－ヒドロムコン酸の生産試験を行った。

[0289] 比較例３２

ピルビン酸キナーゼおよびホスホトランスフェラーゼ系酵素の機能が欠損せず、かつＰＥＰカルボキシキナーゼ、反応Ａ、Ｂ、ＥおよびＦを触媒する酵素を発現するプラスミドを導入した大腸菌変異体を用いた３－ヒドロキシアジピン酸およびα－ヒドロムコン酸の生産試験

参考例９で作製したＥｃ／３ＨＡ１を用いて、比較例１５と同様の方法にて３－ヒドロキシアジピン酸およびα－ヒドロムコン酸の生産試験を行った。

[0290] 実施例２４の結果と実施例１６の結果を比較すると、ピルビン酸キナーゼおよびホスホトランスフェラーゼ系酵素の遺伝子が欠損し、かつ３－オキソ

アジピル－ＣｏＡを還元して３－ヒドロキシアジピル－ＣｏＡを生成する反応を触媒する酵素活性を強化した大腸菌変異体では、３－ヒドロキシアジピン酸およびα－ヒドロムコン酸の収率がさらに向上することがわかった。また、実施例２４と比較例３２の結果を比較すると、ピルビン酸キナーゼおよびホスホトランスフェラーゼ系酵素の遺伝子が欠損した変異体では、アセチル－ＣｏＡが変換されて生成する酢酸およびエタノールの収率も向上することもわかった。

[0291] [表26]

	株	3HA収率(%)	HMA収率(%)	コハク酸収率(%)	酢酸収率(%)	エタノール収率(%)
実施例24	EcΔPPG/3HA1PCK	18.0	0.0596	57.4	53.9	42.4
比較例32	Ec/3HA1PCK	0.963	0.0116	20.0	33.4	38.5

請求の範囲

[請求項1] ３－ヒドロキシアジピン酸、α－ヒドロムコン酸および／またはアジピン酸を製造する能力を有し、かつピルビン酸キナーゼの機能が欠損し、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼの活性および３－オキソアジピル－ＣｏＡを還元して３－ヒドロキシアジピル－ＣｏＡを生成する反応を触媒する酵素の活性が強化された、遺伝子改変微生物。

[請求項2] さらにホスホトランスフェラーゼ系酵素の機能が欠損した、請求項１に記載の遺伝子改変微生物。

[請求項3] 前記３－オキソアジピル－ＣｏＡを還元して３－ヒドロキシアジピル－ＣｏＡを生成する反応を触媒する酵素が、以下（ａ）～（ｃ）のいずれかである請求項１または２に記載の遺伝子改変微生物。

（ａ）配列番号１～７のいずれかのアミノ酸配列からなるポリペプチド

（ｂ）配列番号１～７のいずれかのアミノ酸配列において、１もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ３－オキソアジピル－ＣｏＡを還元して３－ヒドロキシアジピル－ＣｏＡを生成する反応を触媒する酵素活性を有するポリペプチド

（ｃ）配列番号１～７のいずれかのアミノ酸配列に対して７０％以上の配列同一性を有し、かつ３－オキソアジピル－ＣｏＡを還元して３－ヒドロキシアジピル－ＣｏＡを生成する反応を触媒する酵素活性を有するポリペプチド

[請求項4] 請求項１から３のいずれか１項に記載の遺伝子改変微生物を培養する工程を含む、３－ヒドロキシアジピン酸、α－ヒドロムコン酸および／またはアジピン酸の製造方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2020/018665

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12P 7/42(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; C12N 1/15(2006.01)i; C12N 1/19(2006.01)i; C12N 1/21(2006.01)i; C12N 9/02(2006.01)i
FI: C12N1/21 ZNA; C12N1/19; C12P7/42; C12N9/02; C12N1/15; C12N5/10

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)
C12P7/42; C12N5/10; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N9/02

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); MEDLINE (JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2009/151728 A2 (GENOMATICA, INC.) 17.12.2009 (2009-12-17) claims 1-112, page 34, lines 4-24, page 35, line 29 to page 36, line 12, examples 1-2, 4	1-2,4 1-4
Y	WO 2017/209103 A1 (TORAY INDUSTRIES, INC.) 07.12.2017 (2017-12-07) claims 1-7	1-4
Y	WO 2017/209102 A1 (TORAY INDUSTRIES, INC.) 07.12.2017 (2017-12-07) claims 1-7	1-4
Y	WO 2016/199858 A1 (TORAY INDUSTRIES, INC.) 15.12.2016 (2016-12-15) claims 1-13	1-4
Y	WO 2016/199856 A1 (TORAY INDUSTRIES, INC.) 15.12.2016 (2016-12-15) claims 1-19	1-4

☒ 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	Date of mailing of the international search report
27 July 2020 (27.07.2020)	04 August 2020 (04.08.2020)

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2020/018665

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	"3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase [Serratia liquwfaciens].", Database GenBank [online], 11 February 2016, Accession No. AMG98270.1, [retrieval date: 06 February 2019], column "ORIGIN"	3-4
Y	"3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase [Serratia marcescens].", Database GenBank [online], 20 February 2017, Accession No. ALL37524.1, [retrieval date: 06 February 2019], column "ORIGIN"	3-4
Y	"3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase [Serratia nematodiphila DZ0503SBS1].", Database GenBank [online], 07 August 2014, Accession No. KFF90258.1, [retrieval date: 06 February 2019], column "ORIGIN"	3-4
Y	"3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase [Serratia plymuthica S13].", Database GenBank [online], 30 January 2014, Accession No. AGP43956.1, [retrieval date: 06 February 2019], column "ORIGIN"	3-4
Y	"3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase [Serratia proteamaculans 568].", Database GenBank [online], 28 January 2014, Accession No. ABV40935.1, [retrieval date: 06 February 2019], column "ORIGIN"	3-4
Y	"3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase [Serratia marcescens].", Database GenBank [online], 18 July 2017, Accession No. ASM11476.1, [retrieval date: 06 February 2019], column "ORIGIN"	3-4
Y	"3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase [Serratia proteamaculans].", Database GenBank [online], 14 April 2017, Accession No. SMB31239.1, [retrieval date: 06 February 2019], column "ORIGIN"	3-4
A	WO 2016/106367 A1 (GENOMATICA, INC.) 30.06.2016 (2016-06-30) claims 1-217	1-4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2020/018665

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 2009/151728 A2	17 Dec. 2009	JP 2011-515111 A claims 1-112, examples 1-2, 4 US 2009/0305364 A1 EP 2265709 A2 CN 102066551 A	
WO 2017/209103 A1	07 Dec. 2017	EP 3467113 A1 claims 1-7 CA 3025886 A CN 109196107 A	
WO 2017/209102 A1	07 Dec. 2017	US 2019/0276860 A1 claims 1-7 EP 3498852 A1 CA 3025885 A CN 109154008 A	
WO 2016/199858 A1	15 Dec. 2016	US 2018/0223318 A1 claims 1-13 EP 3309259 A1 CA 2988566 A CN 107614692 A	
WO 2016/199856 A1	15 Dec. 2016	US 2018/0142271 A1 claims 1-19 EP 3309258 A1 CA 2988696 A CN 107636157 A	
WO 2016/106367 A1	30 Jun. 2016	JP 2018-500911 A claims 1-217 US 2017/0369913 A1 EP 3237629 A1 CN 107709568 A	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2020/018665

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

C12P 7/42(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; C12N 1/15(2006.01)i; C12N 1/19(2006.01)i; C12N 1/21(2006.01)i; C12N 9/02(2006.01)i
FI: C12N1/21 ZNA; C12N1/19; C12P7/42; C12N9/02; C12N1/15; C12N5/10

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））

C12P7/42; C12N5/10; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N9/02

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); MEDLINE (JDreamIII)

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	WO 2009/151728 A2 (GENOMATICA, INC.) 17.12.2009 (2009-12-17) 請求項1-112、第34頁第4-24行、第35頁第29行-第36頁第12行、実施例1-2,4	1-2,4
Y		1-4
Y	WO 2017/209103 A1 (東レ株式会社) 07.12.2017 (2017-12-07) 請求項1-7	1-4
Y	WO 2017/209102 A1 (東レ株式会社) 07.12.2017 (2017-12-07) 請求項1-7	1-4
Y	WO 2016/199858 A1 (東レ株式会社) 15.12.2016 (2016-12-15) 請求項1-13	1-4
Y	WO 2016/199856 A1 (東レ株式会社) 15.12.2016 (2016-12-15) 請求項1-19	1-4
Y	"3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase [Serratia liquwfaciens].", Database GenBank [online], 2016.02.11, Accession No. AMG98270.1, [検索日：2019年02月06日] ORIGIN欄	3-4

☑ 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抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
"X" 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
"Y" 特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
"&" 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
27.07.2020	04.08.2020

名称及びあて先	権限のある職員（特許庁審査官）
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	野村　英雄 4N 4155 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
Y	"3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase [Serratia marcescens].", Database GenBank [online], 2017.02.20, Accession No. ALL37524.1, [検索日：2019年02月06日] ORIGIN欄	3-4
Y	"3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase [Serratia nematodiphila DZ0503SBS1].", Database GenBank [online], 2014.08.07, Accession No. KFF90258.1, [検索日：2019年02月06日] ORIGIN欄	3-4
Y	"3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase [Serratia plymuthica S13].", Database GenBank [online], 2014.01.30, Accession No. AGP43956.1, [検索日：2019年02月06日] ORIGIN欄	3-4
Y	"3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase [Serratia proteamaculans 568].", Database GenBank [online], 2014.01.28, Accession No. ABV40935.1, [検索日：2019年02月06日] ORIGIN欄	3-4
Y	"3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase [Serratia marcescens].", Database GenBank [online], 2017.07.18, Accession No. ASM11476.1, [検索日：2019年02月06日] ORIGIN欄	3-4
Y	"3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase [Serratia proteamaculans].", Database GenBank [online], 2017.04.14, Accession No. SMB31239.1, [検索日：2019年02月06日] ORIGIN欄	3-4
A	WO 2016/106367 A1 (GENOMATICA, INC.) 30.06.2016 (2016-06-30) 請求項1-217	1-4

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2020/018665

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/JP2020/018665

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO 2009/151728 A2	17.12.2009	JP 2011-515111 A 請求項1-112、実施例1-2,4 US 2009/0305364 A1 EP 2265709 A2 CN 102066551 A	
WO 2017/209103 A1	07.12.2017	EP 3467113 A1 請求項1-7 CA 3025886 A CN 109196107 A	
WO 2017/209102 A1	07.12.2017	US 2019/0276860 A1 請求項1-7 EP 3498852 A1 CA 3025885 A CN 109154008 A	
WO 2016/199858 A1	15.12.2016	US 2018/0223318 A1 請求項1-13 EP 3309259 A1 CA 2988566 A CN 107614692 A	
WO 2016/199856 A1	15.12.2016	US 2018/0142271 A1 請求項1-19 EP 3309258 A1 CA 2988696 A CN 107636157 A	
WO 2016/106367 A1	30.06.2016	JP 2018-500911 A 請求項1-217 US 2017/0369913 A1 EP 3237629 A1 CN 107709568 A	