

(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
2024年8月15日(15.08.2024)



(10) 国際公開番号

WO 2024/166829 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 1/21 (2006.01) C12N 15/31 (2006.01)
C12P 7/62 (2022.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2024/003568

(22) 国際出願日: 2024年2月2日(02.02.2024)

(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 2023-015848 2023年2月6日(06.02.2023) JP

(71) 出願人: 株式会社カネカ (KANEKA CORPORATION) [JP/JP]; 〒5308288 大阪府大阪市北区中之島二丁目3番18号 Osaka (JP).

(72) 発明者: 加藤 紗也 (KATO, Saya). 有川尚志 (ARIKAWA, Hisashi). 佐藤 俊輔 (SATO, Shunsuke).

(74) 代理人: 弁理士法人有古特許事務所 (ARCO PATENT & TRADEMARK ATTORNEYS); 〒6510088 兵庫県神戸市中央区小野柄通7丁目1番1号 日本生命三宮駅前ビル5階 Hyogo (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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, 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, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 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))

(54) Title: TRANSFORMED MICROORGANISM, AND METHOD FOR PRODUCING POLYHYDROXYALKANOIC ACID

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

(57) Abstract: Provided is a transformed microorganism which has polyhydroxyalkanoic acid productivity, which has a polyhydroxyalkanoic acid synthase gene, and to which a gene that encodes a chaperone belonging to the ClpB family is introduced or which reinforces the expression of said gene. The chaperone belonging to the ClpB family may be derived from the genus Cupriavidus, the genus Eschericia, or the genus Saccharomyces. Polyhydroxyalkanoic acid can be produced by culturing the transformed microorganism.

(57) 要約: ポリヒドロキシアルカン酸の産生能を有する形質転換微生物であって、ポリヒドロキシアルカン酸合成酵素遺伝子を有し、ClpBファミリーに属するシャペロンをコードする遺伝子が導入され、又はその発現が強化された、形質転換微生物。ClpBファミリーに属するシャペロンは、Cupriavidus属、Eschericia属、又は、Saccharomyces属由来のものであってよい。前記形質転換微生物を培養することにより、ポリヒドロキシアルカン酸を製造できる。

WO 2024/166829 A1

明 細 書

発明の名称：

形質転換微生物、及びポリヒドロキシアルカン酸の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、ポリヒドロキシアルカン酸の産生能を有する形質転換微生物、及び、当該形質転換微生物を用いたポリヒドロキシアルカン酸の製造方法に関する。

背景技術

[0002] 近年、環境問題に関する意識の高まりから環境低負荷な物質として生分解性プラスチックが注目されている。生分解性プラスチックの一例として微生物から生産されるポリヒドロキシアルカン酸（以下PHAともいう）が挙げられる。PHAは生分解性を有する他に、原材料が糖や油脂であることから非石油由来として産業利用が期待される。しかしながら、PHA生産コストは依然として高いため、生産量を向上し、コストを下げる必要がある。

[0003] 一方、タンパク質が正しい立体構造を形成する過程を助けるタンパク質として、シャペロンが知られている。熱や酸化ストレスなどのストレスによってタンパク質が誤った折りたたみをとると、シャペロンがタンパク質の誤った折りたたみを解きほぐし再折りたたみを補助する。IbpAやIbpBなどの低分子のシャペロンは変性タンパク質と共重合して安定化させることで凝集を防ぐ。また、Hsp60やHsp70に含まれるシャペロンGroESLやDnaKJなどは凝集を防ぐだけでなく、タンパク質の再折りたたみを補助している。さらに、シャペロンCipBは、凝集したタンパク質を解きほぐし、脱凝集する働きをもつ。

[0004] 非特許文献1では、*Cupriavidus necator*にシャペロンGroESLを過剰発現したところ、イソプロパノールの生産性が9～18%向上したことが報告されている。

先行技術文献

非特許文献

[0005] 非特許文献1: Metab. Eng., 42, 74-84 (2017)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 上述の通り微生物にシャペロンGroESLを過剰発現することでイソプロパノールの生産性が向上したことが報告されているが、シャペロンがポリヒドロキシアルカン酸の生産性に与える影響は報告されていない。

[0007] 本発明は、上記現状に鑑み、ポリヒドロキシアルカン酸の生産性が向上した形質転換微生物、及び当該微生物を培養することによるポリヒドロキシアルカン酸の製造方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者は前記課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、ポリヒドロキシアルカン酸の産生能を有する微生物において、CipBファミリーに属するシャペロンをコードする遺伝子を導入し又はその発現を強化することでポリヒドロキシアルカン酸の生産性が向上することを見出し、本発明を完成させた。

[0009] 即ち本発明は、ポリヒドロキシアルカン酸の産生能を有する形質転換微生物であって、

ポリヒドロキシアルカン酸合成酵素遺伝子を有し、

CipBファミリーに属するシャペロンをコードする遺伝子が導入され、又はその発現が強化された、形質転換微生物に関する。

また本発明は、前記形質転換微生物を培養する工程を含む、ポリヒドロキシアルカン酸の製造方法にも関する。

発明の効果

[0010] 本発明によれば、ポリヒドロキシアルカン酸の生産性が向上した形質転換微生物、及び当該微生物を培養することによるポリヒドロキシアルカン酸の製造方法を提供することができる。

発明を実施するための形態

[0011] 以下に、本発明の実施形態について説明するが、本発明は以下の実施形態に限定されるものではない。

本開示は、ポリヒドロキシアルカン酸（以下、PHAともいう）の産生能を有する形質転換微生物に関する。また、当該形質転換微生物を培養することによるPHAの製造方法に関する。

[0012] 本開示に係る形質転換微生物は、PHA合成酵素遺伝子を有するPHA産生微生物であって、CipBファミリーに属するシャペロン遺伝子が導入され、又はその発現が強化された形質転換微生物である。

[0013] 本開示に係る形質転換微生物の宿主は、PHA合成酵素遺伝子を本来的に有する野生株であってもよいし、そのような野生株を人工的に突然変異処理して得られる変異株や、あるいは、遺伝子工学的手法により外来のPHA合成酵素遺伝子が導入された形質転換株であってもよい。

[0014] 本開示に係る形質転換微生物の宿主としては、例えばラルストニア（*Ralstonia*）属、カプリアビダス（*Cupriavidus*）属、ワウテルシア（*Wautersia*）属、アエロモナス（*Aeromonas*）属、エシェリキア（*Escherichia*）属、アルカリゲネス（*Alcaligenes*）属、シュードモナス（*Pseudomonas*）属等に属する細菌類が挙げられる。安全性及びPHA生産性の観点から、好ましくはラルストニア属、カプリアビダス属、ワウテルシア属、エシェリキア属に属する細菌であり、さらに好ましくはカプリアビダス属に属する微生物であり、特に好ましくはカプリアビダス・ネカトル（*Cupriavidus necator*）である。

[0015] (PHA)

本開示に係る形質転換微生物が生産するPHAの種類としては、微生物が生産し得るPHAである限り特に限定されないが、炭素数4～16の3-ヒドロキシアルカン酸から選択される1種のモノマーの単独重合体、炭素数4～16の3-ヒドロキシアルカン酸から選択される2種以上のモノマーの共

重合体、炭素数4～16の3-ヒドロキシアルカン酸から選択される1種のモノマーとその他のヒドロキシアルカン酸（例えば、炭素数4～16の2-ヒドロキシアルカン酸、4-ヒドロキシアルカン酸、5-ヒドロキシアルカン酸、6-ヒドロキシアルカン酸など）との共重合体、及び、炭素数4～16の3-ヒドロキシアルカン酸から選択される2種以上のモノマーとその他のヒドロキシアルカン酸との共重合体が好ましい。

[0016] 特に好ましいPHAは、炭素数4の3-ヒドロキシアルカン酸の単独重合体、又は、炭素数4の3-ヒドロキシアルカン酸を含む共重合体である。例えば、3-ヒドロキシ酪酸（略称：3HB）のホモポリマーであるP（3HB）、3HBと3-ヒドロキシ吉草酸（略称：3HV）の共重合体P（3HB-co-3HV）、3HBと3-ヒドロキシヘキサン酸（略称：3HH）の共重合体P（3HB-co-3HH）（略称：P3HB3HH）、3HBと4-ヒドロキシ酪酸（略称：4HB）の共重合体P（3HB-co-4HB）、乳酸（略称：LA）を構成成分として含むPHA、例えば3HBとLAの共重合体P（LA-co-3HB）などが挙げられるが、これらに限定されない。この中でも、ポリマーとしての応用範囲が広いという観点から、P3HB3HHが好ましい。

[0017] なお、生産されるPHAの種類は、目的に応じて、使用する微生物の保有するあるいは別途導入されたPHA合成酵素遺伝子の種類や、その合成に関与する代謝系の遺伝子の種類、培養条件などによって適宜選択しうる。

[0018] （PHA合成酵素遺伝子）

本開示に係る形質転換微生物が有するPHA合成酵素（PhaC）遺伝子は、宿主が本来的に有するものであっても良いし、外来のものであってもよい。PHA合成酵素遺伝子としては特に限定されず、アエロモナス・キャビエ、アエロモナス・ハイドロフィラ、シュードモナス SP 61-3、又は、カプリアビダス・ネカトル由来のPHA合成酵素遺伝子や、前記2つ以上のPHA合成酵素遺伝子を組み合わせたキメラPHA合成酵素遺伝子、又は、前述の各PHA合成酵素のアミノ酸配列に対して90%以上の配列同

一性を示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子が挙げられる。

前記配列同一性は、95%以上であることが好ましく、97%以上がより好ましく、99%以上がさらに好ましい。

本開示に係る形質転換微生物が有するPHA合成酵素遺伝子の数は、1つでも良いし、複数であっても良い。また、複数のPHA合成酵素遺伝子を有する場合、それらは同一の遺伝子であっても良いし、異なる遺伝子であっても良い。

[0019] (CipBファミリーに属するシャペロン遺伝子)

本開示に係る形質転換微生物は、CipBファミリーに属するシャペロンをコードする遺伝子が導入され、又はその発現が強化されたものである。当該遺伝子が導入されることによって、形質転換微生物によるPHAの生産性を高めることができる。該形質転換微生物は、高ストレス下、例えば比較的高い培養温度下においても、良好な生産性にてPHAを生産することができる。

[0020] 一般的なシャペロンであるGroESLやDnaKJは、タンパク質の再折りたたみを補助する機能を持つものに対して、本開示に関するCipBファミリーに属するシャペロンは、タンパク質の再折りたたみを補助する機能を持たず、ATPを使用して、凝集したタンパク質を解きほぐすという機能を持っている。

本開示では、「CipBファミリー」にはCipBのホモログも含まれる。そのようなホモログとしては、例えば、酵母が有するHSP104が挙げられる。

[0021] 前記CipBファミリーに属するシャペロンをコードする遺伝子としては、特に限定されないが、例えば、Cupriavidus属（特に、Cupriavidus necator）由来のCipBをコードする遺伝子や、Eschericia属（特に、Eschericia coli）由来のCipBをコードする遺伝子、Saccharomyse属（Sacchar

omyse cerevisiae) 由来のHSP104をコードする遺伝子などが挙げられる。

[0022] より具体的には、Cupriavidus necator由来のClpBとして、配列番号1で示されるアミノ酸配列を有するClpB、または、該アミノ酸配列に対して65%以上の配列同一性を示すアミノ酸配列を有し、かつClpB活性を有するタンパク質が好ましい。また、Escherichia coli由来のClpBとして、配列番号2で示されるアミノ酸配列を有するClpB、または、該アミノ酸配列に対して65%以上の配列同一性を示すアミノ酸配列を有し、かつClpB活性を有するタンパク質が好ましい。なお、配列番号1で示されるアミノ酸配列と、配列番号2で示されるアミノ酸配列間の配列同一性は、67%である。

さらに、Saccharomyse cerevisiae由来のHSP104として、配列番号3で示されるアミノ酸配列を有するHSP104、または、該アミノ酸配列に対して90%以上の配列同一性を示すアミノ酸配列を有し、かつHSP104活性を有するタンパク質が好ましい。

[0023] 前記配列同一性は、70%以上であることが好ましく、80%以上がより好ましく、90%以上がさらに好ましく、95%以上がより更に好ましく、97%以上が特に好ましく、99%以上が最も好ましい。

[0024] (遺伝子の導入)

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

[0025] 導入遺伝子の安定性を考慮すると、宿主の染色体上または宿主が保有するメガプラスミド上に対象遺伝子を直接挿入または置換する方法が好ましく、宿主の染色体上に対象遺伝子を直接挿入または置換する方法がより好ましい。

- [0026] 導入する遺伝子を確実に発現させるために、対象遺伝子が、宿主が元来有する「遺伝子発現調節配列」の下流に位置するように導入するか、または、対象遺伝子が、外来の「遺伝子発現調節配列」の下流に位置する形で導入することが好ましい。本開示における「遺伝子発現調節配列」とは、その遺伝子の転写量を制御する塩基配列（例えばプロモーター配列）、及び／または、その遺伝子から転写されたメッセンジャーRNAの翻訳量を調節する塩基配列（例えばシャイン・ダルガノ配列）を含むDNA配列である。「遺伝子発現調節配列」としては、自然界に存在する任意の塩基配列を利用することもできるし、人工的に構築または改変された塩基配列を利用しても良い。
- [0027] 「遺伝子発現調節配列」に含まれるプロモーター配列やシャイン・ダルガノ配列としては、例えば、配列番号10～15のいずれかに示される塩基配列、または、これら塩基配列の一部を含む塩基配列などが挙げられるが、特に限定されない。
- [0028] ゲノムDNAの少なくとも一部の置換、欠失、挿入及び／又は付加は、当業者に周知の方法により行うことができる。代表的な方法としてはトランスポゾンと相同組換えの機構を利用した方法（Ohman et al., J. Bacteriol., 162:1068-1074 (1985)) や、相同組換えの機構によって起こる部位特異的な組み込みと第二段階の相同組換えによる脱落を原理とした方法（Noti et al., Methods Enzymol., 154:197-217 (1987)) などがある。また、*Bacillus subtilis* 由来の *sacB* 遺伝子を共存させて、第二段階の相同組換えによって遺伝子が脱落した微生物株をスクロース耐性株として容易に単離する方法（Schweizer, Mol. Microbiol., 6:1195-1204 (1992)、Lenz et al., J. Bacteriol., 176:4385-4393 (1994)) も利用することができる。さらに別の方法として、標的DNAを改変するためのCRISPR/Cas9システムによるゲノム編集技術（Y. Wang et al., ACS Synth Biol. 2016, 5(7):721-732）も利用することができる。CRISPR/Cas9システムでは、ガイドRNA（gRNA）は改変すべきゲノムDNAの塩基配列の一部に結合しうる配列を有しており、Cas9を標的に運ぶ役割をもつ。

[0029] 細胞へのベクターの導入方法としても特に限定されないが、例えば、塩化カルシウム法、エレクトロポレーション法、ポリエチレングリコール法、スフェロプラスト法等が挙げられる。

[0030] (遺伝子の発現強化)

C l p Bファミリーに属するシャペロンをコードする遺伝子の発現を強化する方法としては、特に限定されないが、染色体上の内生の前記シャペロンをコードする遺伝子上流に遺伝子発現調節配列を挿入したり、内生の前記シャペロンをコードする遺伝子のコピーを本来存在する位置とは異なる位置に導入したりすることによって、発現量を増大させても良いし、内生の前記シャペロンをコードする遺伝子に変異を導入することによって該遺伝子によるC l p B活性を上昇させても良い。また、それらを組み合わせても良いし、併用しても良い。

[0031] 染色体上の内生の前記シャペロンをコードする遺伝子上流に遺伝子発現調節配列を挿入する場合、公知の方法を用いることができ、例えば、相同組換え法等が利用できる。また、遺伝子発現調節配列としては、上述した遺伝子発現調節配列を利用することができる。

[0032] 内生の前記シャペロンをコードする遺伝子のコピーを本来存在する位置とは異なる位置に導入する場合、該導入の方法は特に限定されないが、宿主の染色体上に直接挿入または置換する方法、宿主が保有するメガプラスミド上に導入する形式、あるいはプラスミド、ファージ、ファージミドなどのベクター上に該コピーを配置して導入する形式のいずれを選択しても良いし、これらの方法のうち2以上を併用しても良い。ただし、プラスミドは培養中に脱落する可能性があることから、宿主の染色体上に内生の前記シャペロンをコードする遺伝子のコピーが挿入または置換されていることが好ましい。前記導入、挿入、置換、または配置の方法としては、公知の方法を用いることができる。例えば、宿主の染色体上に内生の前記シャペロンをコードする遺伝子を置換または挿入するには、相同組換え法等が利用できる。

[0033] また、導入する内生の前記シャペロンをコードする遺伝子のコピーは、そ

の上流に、その発現に関わる遺伝子発現調節配列を有していることが好ましい。内生の前記シャペロンをコードする遺伝子の上流に連結する遺伝子発現調節配列としては、宿主が元々有する遺伝子発現調節配列を利用することもできるし、自然界に存在する任意の遺伝子発現調節配列を利用することもできるし、人工的に構築または改変された遺伝子発現調節配列を利用しても良い。

[0034] 内生の前記シャペロンをコードする遺伝子に対して使用される遺伝子発現調節配列は特に限定されず、内生の前記シャペロンをコードする遺伝子の上流に位置する遺伝子発現調節配列をそのまま一緒に導入しても良いし、適切な遺伝子発現調節配列を選択して前記遺伝子に連結させて、宿主に導入しても良い。また、宿主の染色体上に内生の前記シャペロンをコードする遺伝子のコピーを挿入する際に、宿主の染色体上にもともと存在する遺伝子発現調節配列に前記遺伝子が連結されるように挿入しても良い。ここで選択する遺伝子発現調節配列としては、上述したような遺伝子発現調節配列を利用することができる。

[0035] 内生の前記シャペロンをコードする遺伝子に変異を導入する場合、公知の方法を用いることができる。例えば、前記シャペロンをコードする遺伝子を鋳型とし、エラープライムPCRや、変異を導入したプライマーを用いたPCRを行うことにより、変異が導入された遺伝子を得ることができる。

[0036] (好熱菌に由来するphaA遺伝子及びphaB遺伝子)

本開示に係る形質転換微生物は、phaA遺伝子及びphaB遺伝子を有することが好ましい。該phaA遺伝子及び／又はphaB遺伝子は、宿主が本来有するphaA遺伝子及び／又は宿主が本来有するphaB遺伝子であってよいが、好熱菌に由来するPhaAをコードする遺伝子及び／又は好熱菌に由来するPhaBをコードする遺伝子が導入されてもよい。

[0037] phaA遺伝子、及びphaB遺伝子は、それぞれβ-ケトチオラーゼ (PhaA)、アセトアセチルCoAレダクターゼ (PhaB) をコードする遺伝子である。これらの遺伝子は、PHAを元来蓄積し得る微生物の多くが

保有するものであり、最も一般的なPHAの生合成基質である3HB-CoAの生合成に関わる。具体的には、PhaAは2分子のアセチルCoAを縮合してアセトアセチルCoAを生成する反応の触媒に関わり、PhaBはアセトアセチルCoAを還元して3HB-CoAを生成する反応の触媒に関わる。

[0038] 好熱菌に由来する β -ケトチオラーゼ (PhaA) をコードする遺伝子としては、例えば、*Cupriavidus* sp. strain S-6 に由来する配列番号4に記載のアミノ酸配列を有するPhaAをコードする遺伝子、*Caldimonas manganoxydans* に由来する配列番号5に記載のアミノ酸配列を有するPhaAをコードする遺伝子、*Schlegelella thermodepolymerans* に由来する配列番号6に記載のアミノ酸配列を有するPhaAをコードする遺伝子、またはこれらのアミノ酸配列に対して90%以上の配列同一性を示すアミノ酸配列を有し、かつ β -ケトチオラーゼ活性を示すタンパク質をコードする塩基配列を有する遺伝子などが挙げられるが、これらに限定されない。

[0039] 配列番号4に記載のアミノ酸配列に対する配列同一性は、90%以上であることが好ましいが、95%以上がより好ましく、97%以上がさらに好ましく、99%以上が特に好ましい。また、配列番号5又は6に記載のアミノ酸配列に対する配列同一性も、90%以上であることが好ましいが、95%以上がより好ましく、97%以上がさらに好ましく、99%以上が特に好ましい。

[0040] 好熱菌に由来するアセトアセチルCoAレダクターゼ (PhaB) をコードする遺伝子としては、例えば、*Cupriavidus* sp. strain S-6 に由来する配列番号7に記載のアミノ酸配列を有するPhaBをコードする遺伝子、*Caldimonas manganoxydans* に由来する配列番号8に記載のアミノ酸配列を有するPhaBをコードする遺伝子、*Schlegelella thermodepolymerans* に由来する配列番号9に記載のアミノ酸配列を有するPhaBをコード

する遺伝子、またはこれらのアミノ酸配列に対して90%以上の配列同一性を示すアミノ酸配列を有し、かつアセトアセチルCoAレダクターゼ活性を示すタンパク質をコードする塩基配列を有する遺伝子などが挙げられるが、これらに限定されない。

[0041] 配列番号7に記載のアミノ酸配列に対する配列同一性は、90%以上であることが好ましいが、95%以上がより好ましく、97%以上がさらに好ましく、98%以上がより更に好ましく、99%以上が特に好ましい。また、配列番号8又は9に記載のアミノ酸配列に対する配列同一性も、90%以上であることが好ましいが、95%以上がより好ましく、97%以上がさらに好ましく、99%以上が特に好ましい。

[0042] P h a Aをコードする遺伝子及び／又はP h a Bをコードする遺伝子の導入は、上述した方法によって実現することができる。

[0043] (P H Aの生産)

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

[0044] 本開示に係る形質転換微生物は、比較的高温の培養温度下においても、良好な生産性にてP H Aを生産することができる。例えば35℃以上の温度で培養しても、良好な生産性を達成することができる。

[0045] 培養時の炭素源としては、本開示に係る形質転換微生物が資化可能であればどのような炭素源でも使用可能である。特に限定されないが、例えば、グルコース、フルクトース、シュークロースなどの糖類；パーム油やパーム核油（これらを分別した低融点分画であるパームオレイン、パームダブルオレイン、パーム核油オレインなども含む）、コーン油、やし油、オリーブ油、大豆油、菜種油、ヤトロファ油などの油脂やその分画油類、あるいはその精

製副産物；ラウリン酸、オレイン酸、ステアリン酸、パルミチン酸、ミリスチン酸などの脂肪酸やそれらの誘導体、あるいはグリセロール等が挙げられる。前記油脂は、その一部、又は、全部が、劣化油であってよい。劣化油とは、熱変性し、または、加熱下で酸素および／または水と反応して変質した油脂を指す。その呼称は限定されず、廃油、廃棄油、廃食油、廃食用油、廃植物油、使用済み油等と呼称されているものも含まれる。また、本開示に係る形質転換微生物が二酸化炭素、一酸化炭素、メタン、メタノール、エタノールなどのガスやアルコール類を利用可能である場合、これらを炭素源として使用することもできる。

[0046] 本開示におけるPHAの製造では、上記炭素源、炭素源以外の栄養源である窒素源、無機塩類、その他の有機栄養源を含む培地を用いて、前記微生物を培養することが好ましい。下記に限定されないが、窒素源としては、例えば、アンモニア；塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等のアンモニウム塩；ペプトン、肉エキス、酵母エキス等が挙げられる。無機塩類としては、例えば、リン酸2水素カリウム、リン酸水素2ナトリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム等が挙げられる。その他の有機栄養源としては、例えば、グリシン、アラニン、セリン、スレオニン、プロリン等のアミノ酸、ビタミンB1、ビタミンB12、ビタミンC等のビタミン等が挙げられる。

[0047] 培養を適切な時間行なって菌体内にPHAを蓄積させた後、周知の方法を用いて菌体からPHAを回収することができる。回収方法については特に限定されないが、例えば、培養終了後、培養液から遠心分離機や分離膜等で菌体を分離し、乾燥させた後、乾燥菌体から、クロロホルム等の有機溶剤を用いてPHAを抽出し、このPHAを含んだ有機溶剤溶液から濾過等によって細胞成分を除去し、その濾液にメタノールやヘキサン等の貧溶媒を加えてPHAを沈殿させ、濾過や遠心分離によって上澄み液を除去し、乾燥させてPHAを回収することができる。また、界面活性剤やアルカリ、酵素などを用いてPHA以外の細胞成分を水に溶解させた後、濾過や遠心分離によってP

H A 粒子を水相から分離し乾燥させて回収することもできる。

[0048] 以下の各項目では、本開示における好ましい態様を列挙するが、本発明は以下の項目に限定されるものではない。

[項目 1]

ポリヒドロキシアルカン酸の産生能を有する形質転換微生物であって、
ポリヒドロキシアルカン酸合成酵素遺伝子を有し、
C l p B ファミリーに属するシャペロンをコードする遺伝子が導入され、
又はその発現が強化された、形質転換微生物。

[項目 2]

前記 C l p B ファミリーに属するシャペロンが、配列番号 1 又は 2 で示されるアミノ酸配列に対して 65 ～ 100 % の配列同一性を示すアミノ酸配列を有する、項目 1 に記載の形質転換微生物。

[項目 3]

前記 C l p B ファミリーに属するシャペロンが、C u p r i a v i d u s 属、又は、E s c h e r i c i a 属由来である、項目 1 又は 2 に記載の形質転換微生物。

[項目 4]

前記 C l p B ファミリーに属するシャペロンが、C u p r i a v i d u s n e c a t o r、又は、E s c h e r i c i a c o l i 由来である、項目 3 に記載の形質転換微生物。

[項目 5]

前記形質転換微生物が C u p r i a v i d u s 属に属する、項目 1 又は 2 に記載の形質転換微生物。

[項目 6]

好熱菌由来の P h a A をコードする遺伝子及び／又は好熱菌由来の P h a B をコードする遺伝子が導入された、項目 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の記載の形質転換微生物。

[項目 7]

前記好熱菌が *Cupriavidus* sp. strain S-6 である、項目 6 に記載の形質転換微生物。

[項目 8]

項目 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の形質転換微生物を培養する工程を含む、ポリヒドロキシアルカン酸の製造方法。

[項目 9]

ポリヒドロキシアルカン酸が、2 種以上のヒドロキシアルカン酸の共重合体である、項目 8 に記載のポリヒドロキシアルカン酸の製造方法。

[項目 10] 前記ポリヒドロキシアルカン酸が、3-ヒドロキシヘキサン酸をモノマーユニットとして含有する共重合体である、項目 9 に記載のポリヒドロキシアルカン酸の製造方法。

実施例

[0049] 以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。ただし、本発明は、これら実施例に限定されるものではない。

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

[0050] 以下で使用する *KNK005/dZ/trc-J4b* 株は、カプリアビダス・ネカトル H16 株の染色体上の *phaC1* 遺伝子 (PHA 合成酵素遺伝子)、*phaZ1* 遺伝子、*phaZ2* 遺伝子、及び *phaZ6* 遺伝子を欠失し、染色体上の R 体特異的エノイル-CoA ヒドラターゼ遺伝子 (*phaJ4b* 遺伝子) の発現を強化し、配列番号 19 に記載のアミノ酸配列を有するアエロモナス属由来の PHA 合成酵素変異体 (N149S/D171G 変異体 (NSDG) 遺伝子) をコードする遺伝子を導入した株であり、国際公開第 2015/115619 号に記載の方法に準じて作製することができる。

。

[0051] (微生物作製例1)

まず、シャペロン (C l p B) 遺伝子発現用プラスミドの作製を行った。作製は以下のように行った。

合成オリゴDNAを用いたPCRにより、大腸菌の l a c プロモーター改変体である l a c N 1 7 プロモーターを有するDNA断片 (配列番号17) を得た。このDNA断片を制限酵素E c o R IおよびM u n Iで消化し、得られたDNA断片を、国際公開2007/049716号に記載のプラスミドベクターpCUP2をM u n Iで切断したものと連結して、l a c N 1 7 プロモーターの下流にpCUP2の制限酵素S p e I認識配列が位置する向きに連結されたものを選抜し、pCUP2-l a c N 1 7を得た。

次に、合成オリゴDNAを用いたPCRにより、配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するC l p Bをコードする遺伝子の塩基配列を有するDNA断片 (配列番号18) を得た。このDNA断片を制限酵素M u n IおよびS p e Iで消化し、得られたDNA断片を、pCUP2-l a c N 1 7をM u n IおよびS p e Iで切断したものと連結して、C l p B遺伝子発現用プラスミドpCUP2-l a c N 1 7-C l p B r eを得た。

次に、C l p B遺伝子発現用プラスミドpCUP2-l a c N 1 7-C l p B r eを用いて、以下のようにしてC l p B発現強化株の作製を行った。C l p B遺伝子発現用プラスミドpCUP2-l a c N 1 7-C l p B r eを、K N K 0 0 5 / d Z / t r c - J 4 b株に導入し、得られた菌株を、K N K 0 0 5 / d Z / t r c - J 4 b / p C U P 2 - l a c N 1 7 - C l p B r e株と命名した (以下、「PHA生産微生物株 (1)」と記載することもある)。

[0052] プラスミドベクターの細胞への導入は以下のようにエレクトロポレーション法によって行った。遺伝子導入装置はB i o r a d社製のジーンパルサーを用い、キュベットは同じくB i o r a d社製のg a p 0. 2 c mを用いた。キュベットに、コンピテント細胞400 μ lと発現ベクター20 μ lを注

入してパルス装置にセットし、静電容量 $25\ \mu\text{F}$ 、電圧 $1.5\ \text{kV}$ 、抵抗値 $800\ \Omega$ の条件で電気パルスをかけた。パルス後、キュベット内の菌液を *Nutrient Broth* 培地（DIFCO社製）で 30°C 、3時間振とう培養し、選択プレート（*Nutrient Agar* 培地（DIFCO社製）、カナマイシン $100\ \text{mg/L}$ ）で、 30°C にて2日間培養して、生育してきたPHA生産微生物株（1）を取得した。

[0053] PHA生産微生物株（1）は、カプリアビダス・ネカトルH16株の染色体上の *phaC1* 遺伝子（PHA合成酵素遺伝子）、*phaZ1* 遺伝子、*phaZ2* 遺伝子、及び *phaZ6* 遺伝子を欠失し、染色体上のR体特異的エノイル-CoAヒドラーゼ遺伝子の発現を強化し、配列番号19に記載のアミノ酸配列を有するアエロモナス属由来のPHA合成酵素変異体をコードする遺伝子を導入し、配列番号1に記載のアミノ酸配列を有する *Cupriavidus* 属由来の *CipB* をコードする遺伝子を発現強化した株である。

[0054] （微生物作製例2）

まず、シャペロン（*CipB*）遺伝子発現用プラスミドの作製を行った。作製は以下のように行った。合成オリゴDNAを用いたPCRにより、配列番号2に記載のアミノ酸配列を有する *CipB* をコードする遺伝子の塩基配列を有するDNA断片（配列番号20）を得た。このDNA断片を制限酵素 *MunI* および *SpeI* で消化し、得られたDNA断片を、*pCUP2-lacN17* を *MunI* および *SpeI* で切断したものと連結して、*CipB* 遺伝子発現用プラスミド *pCUP2-lacN17-CipBec* を得た。

[0055] 次に、*CipB* 遺伝子発現用プラスミド *pCUP2-lacN17-CipBec* を用いて、以下のようにして *CipBec* 導入株の作製を行った。*CipB* 遺伝子発現用プラスミド *pCUP2-lacN17-CipBec* を、上記と同様のエレクトロポレーション法によって、KNK005/dZ/trc-J4b株に導入し、得られた菌株を、KNK005/dZ/trc-J4b/*pCUP2-lacN17-CipBec* 株と命名した（以下

、「PHA生産微生物株（２）」と記載することもある）。

[0056] PHA生産微生物株（２）は、カプリアビダス・ネカトールH16株の染色体上のphaC1遺伝子（PHA合成酵素遺伝子）、phaZ1遺伝子、phaZ2遺伝子、及びphaZ6遺伝子を欠失し、染色体上のR体特異的エノイル-CoAヒドラターゼ遺伝子の発現を強化し、配列番号19に記載のアミノ酸配列を有するアエロモナス属由来のPHA合成酵素変異体をコードする遺伝子と、配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するEscherichia属由来のCipBをコードする遺伝子を導入した株である。

[0057] （微生物作製例3）

まず、シャペロン（GroESL）遺伝子発現用プラスミドの作製を行った。作製は以下のように行った。合成オリゴDNAを用いたPCRにより、配列番号21に記載のアミノ酸配列を有するGroESおよび配列番号22に記載のアミノ酸配列を有するGroELをコードする遺伝子の塩基配列を有するDNA断片（配列番号23）を得た。このDNA断片を制限酵素MunIおよびSpeIで消化し、得られたDNA断片を、pCUP2-lacN17をMunIおよびSpeIで切断したものと連結して、GroESL遺伝子発現用プラスミドpCUP2-lacN17-GroESLを得た。

[0058] 次に、GroESL遺伝子発現用プラスミドpCUP2-lacN17-GroESLを用いて、以下のようにしてGroESL発現強化株の作製を行った。GroESL遺伝子発現用プラスミドpCUP2-lacN17-GroESLを、上記と同様のエレクトロポレーション法によって、KNK005/dZ/trc-J4b株に導入し、得られた菌株を、KNK005/dZ/trc-J4b/pCUP2-lacN17-GroESL株と命名した（以下、「PHA生産微生物株（３）」と記載することもある）。

[0059] PHA生産微生物株（３）は、カプリアビダス・ネカトールH16株の染色体上のphaC1遺伝子（PHA合成酵素遺伝子）、phaZ1遺伝子、phaZ2遺伝子、及びphaZ6遺伝子を欠失し、染色体上のR体特異的エノイル-CoAヒドラターゼ遺伝子の発現を強化し、配列番号19に記載

のアミノ酸配列を有するアエロモナス属由来のPHA合成酵素変異体をコードする遺伝子と、配列番号21および22に記載のアミノ酸配列を有するCupriavidus属由来のGroESLをコードする遺伝子を導入した株である。

[0060] (微生物作製例4)

まず、シャペロン(DnaKJ)遺伝子発現用プラスミドの作製を行った。作製は以下のように行った。合成オリゴDNAを用いたPCRにより、配列番号24に記載のアミノ酸配列を有するDnaKおよび配列番号25に記載のアミノ酸配列を有するDnaJをコードする遺伝子の塩基配列を有するDNA断片(配列番号26)を得た。このDNA断片を制限酵素MunIおよびSpeIで消化し、得られたDNA断片を、pCUP2-lacN17をMunIおよびSpeIで切断したものと連結して、DnaKJ遺伝子発現用プラスミドpCUP2-lacN17-DnaKJを得た。

[0061] 次に、DnaKJ遺伝子発現用プラスミドpCUP2-lacN17-DnaKJを用いて、以下のようにしてDnaKJ導入株の作製を行った。DnaKJ遺伝子発現用プラスミドpCUP2-lacN17-DnaKJを、上記と同様のエレクトロポレーション法によって、KNK005/dZ/trc-J4b株に導入し、得られた菌株を、KNK005/dZ/trc-J4b/pCUP2-lacN17-DnaKJ株と命名した(以下、「PHA生産微生物株(4)」と記載することもある)。

[0062] PHA生産微生物株(4)は、カプリアビダス・ネカトールH16株の染色体上のphaC1遺伝子(PHA合成酵素遺伝子)、phaZ1遺伝子、phaZ2遺伝子、及びphaZ6遺伝子を欠失し、染色体上のR体特異的エノイル-CoAヒドラーゼ遺伝子の発現を強化し、配列番号19に記載のアミノ酸配列を有するアエロモナス属由来のPHA合成酵素変異体をコードする遺伝子と、配列番号24および25に記載のアミノ酸配列を有するEscherichia属由来のDnaKJをコードする遺伝子を導入した株である。

[0063] (微生物作製例5)

まず、p h a Aおよびp h a B遺伝子破壊用プラスミドの作製を行った。
作製は以下のように行った。

合成オリゴDNAを用いたPCRにより、カプリアビダス・ネカトルH16株のp h a A、p h a B構造遺伝子より上流及び下流の塩基配列を有するDNA断片（配列番号27）を得た。このDNA断片を制限酵素S w a Iで消化し、得られたDNA断片を、同じくS w a I消化した特開2007-259708号公報に記載のベクターp N S 2 X-s a c BとDNAリガーゼ（L i g a t i o n H i g h（東洋紡社製））にて連結し、p h a A B遺伝子破壊用プラスミドベクターp N S 2 X-s a c B+p h a A B U Dを作製した。

[0064] 次に、p h a A B遺伝子破壊用プラスミドベクターp N S 2 X-s a c B+p h a A B U Dを用いて、以下のようにしてp h a A B遺伝子破壊株の作製を行った。

p h a A B遺伝子破壊用プラスミドベクターp N S 2 X-s a c B+p h a A B U Dで大腸菌S17-1株（A T C C 47055）を形質転換し、それによって得た形質転換微生物を、K N K 005/d Z/t r c-J4b株とN u t r i e n t A g a r培地（D i f c o社製）上で混合培養して接合伝達を行った。

得られた培養液を、250mg/Lのカナマイシンを含むシモンズ寒天培地（クエン酸ナトリウム2g/L、塩化ナトリウム5g/L、硫酸マグネシウム・7水塩0.2g/L、りん酸二水素アンモニウム1g/L、りん酸水素二カリウム1g/L、寒天15g/L、pH6.8）に播種し、寒天培地上で生育してきた菌株を選択して、プラスミドがK N K 005/d Z/t r c-J4b株の染色体上に組み込まれた株を取得した。この株をN u t r i e n t B r o t h培地（D i f c o社製）で2世代培養した後、15%のシュークロースを含むN u t r i e n t A g a r培地上に希釈して塗布し、生育してきた菌株をプラスミドが脱落した株として取得した。さらにP C

RおよびDNAシーケンサーによる解析により染色体上のphaAB遺伝子を欠失した菌株1株を単離した。この遺伝子破壊株をKNK005/dZ/trc-J4b/dphaAB株と命名した。

[0065] さらに、phaAおよびphaB遺伝子導入用プラスミドの作製を行った。作製は以下のように行った。

合成オリゴDNAを用いたPCRにより、カプリアビダス・ネカトルH16株のphaA、phaB構造遺伝子より上流及び下流の塩基配列と、配列番号4に記載のアミノ酸配列を有するPhaAをコードする遺伝子及び配列番号7に記載のアミノ酸配列を有するPhaBをコードする遺伝子の塩基配列を有するDNA断片（配列番号28）を得た。このDNA断片を制限酵素SwaIで消化し、得られたDNA断片を、同じくSwaI消化した特開2007-259708号公報に記載のベクターpNS2X-sacBとDNAリガーゼ（Ligation High（東洋紡社製））にて連結し、phaAおよびphaB遺伝子導入用プラスミドベクターpNS2X-sacB+phaAU-phaABsp-phaBDを作製した。

[0066] 次に、phaAおよびphaB遺伝子導入用プラスミドベクターpNS2X-sacB+phaAU-phaABsp-phaBDを上記と同様の接合伝達を用いた方法によって、KNK005/dZ/trc-J4b/dphaAB株に導入した。さらに上記と同様の培養及び15%のシュクロースを含むNutrient Agar培地による選抜で配列番号4に記載のアミノ酸配列を有するPhaAをコードする遺伝子及び配列番号7に記載のアミノ酸配列を有するPhaBをコードする遺伝子が導入された菌株1株を単離した。得られた菌株をKNK005/dZ/trc-J4b/dphaAB::phaABsp株と命名した。

[0067] さらに、CipB遺伝子発現用プラスミドpCUP2-lacN17-CipBreを用いて、以下のようにしてCipBre発現強化株の作製を行った。

CipB遺伝子発現用プラスミドpCUP2-lacN17-CipBr

eを、上記と同様のエレクトロポレーション法によって、KNK005/dZ/trc-J4b/dphaAB::phaABsp株に導入し、得られた菌株を、KNK005/dZ/trc-J4b/dphaAB::phaABsp/pCUP2-lacN17-ClpBre株と命名した（以下、「PHA生産微生物株（5）」と記載することもある）。

[0068] PHA生産微生物株（5）は、カプリアビダス・ネカトールH16株の染色体上のphaC1遺伝子（PHA合成酵素遺伝子）、phaZ1遺伝子、phaZ2遺伝子、phaZ6遺伝子、及びphaAB遺伝子を欠失し、染色体上のR体特異的エノイル-CoAヒドラターゼ遺伝子の発現を強化し、配列番号19に記載のアミノ酸配列を有するアエロモナス属由来のPHA合成酵素変異体をコードする遺伝子と、Cupriavidus sp. strain S-6由来の配列番号4に記載のアミノ酸配列を有するphaAおよび配列番号7に記載のアミノ酸配列を有するphaB遺伝子が導入され、配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するCupriavidus属由来のClpBをコードする遺伝子を発現強化した株である。

[0069] （微生物作製例6）

さらに、ClpB遺伝子発現用プラスミドpCUP2-lacN17-ClpBecを用いて、以下のようにしてClpBec導入株の作製を行った。

ClpB遺伝子発現用プラスミドpCUP2-lacN17-ClpBreを、上記と同様のエレクトロポレーション法によって、KNK005/dZ/trc-J4b/dphaAB::phaABsp株に導入し、得られた菌株を、KNK005/dZ/trc-J4b/dphaAB::phaABsp/pCUP2-lacN17-ClpBec株と命名した（以下、「PHA生産微生物株（6）」と記載することもある）。

[0070] PHA生産微生物株（6）は、カプリアビダス・ネカトールH16株の染色体上のphaC1遺伝子（PHA合成酵素遺伝子）、phaZ1遺伝子、phaZ2遺伝子、phaZ6遺伝子、及びphaAB遺伝子を欠失し、染

色体上のR体特異的エノイルーC o Aヒドラターゼ遺伝子の発現を強化し、配列番号19に記載のアミノ酸配列を有するアエロモナス属由来のP H A合成酵素変異体をコードする遺伝子と、C u p r i a v i d u s sp. strain S-6由来の配列番号4に記載のアミノ酸配列を有するp h a Aおよび配列番号7に記載のアミノ酸配列を有するp h a B遺伝子と、配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するE s c h e r i c h i a属由来のC l p Bをコードする遺伝子を導入した株である。

[0071] (微生物作製例7)

さらに、G r o E S L遺伝子発現用プラスミドp C U P 2-l a c N 17-G r o E S Lを用いて、以下のようにしてG r o E S L導入株の作製を行った。

G r o E S L遺伝子発現用プラスミドp C U P 2-l a c N 17-G r o E S Lを、上記と同様のエレクトロポレーション法によって、K N K 0 0 5 / d Z / t r c - J 4 b / d p h a A B :: p h a A B s p株に導入し、得られた菌株を、K N K 0 0 5 / d Z / t r c - J 4 b / d p h a A B :: p h a A B s p / p C U P 2-l a c N 17-G r o E S L株と命名した(以下、「P H A生産微生物株(7)」と記載することもある)。

[0072] P H A生産微生物株(7)は、カプリアビダス・ネカトールH16株の染色体上のp h a C 1遺伝子(P H A合成酵素遺伝子)、p h a Z 1遺伝子、p h a Z 2遺伝子、p h a Z 6遺伝子、及びp h a A B遺伝子を欠失し、染色体上のR体特異的エノイルーC o Aヒドラターゼ遺伝子の発現を強化し、配列番号19に記載のアミノ酸配列を有するアエロモナス属由来のP H A合成酵素変異体をコードする遺伝子と、C u p r i a v i d u s sp. strain S-6由来の配列番号4に記載のアミノ酸配列を有するp h a Aおよび配列番号7に記載のアミノ酸配列を有するp h a B遺伝子と、配列番号21および22に記載のアミノ酸配列を有するC u p r i a v i d u s属由来のG r o E S Lをコードする遺伝子を導入した株である。

[0073] (微生物作製例8)

さらに、DnaKJ遺伝子発現用プラスミドpCUP2-lacN17-DnaKJを用いて、以下のようにしてDnaKJ導入株の作製を行った。

DnaKJ遺伝子発現用プラスミドpCUP2-lacN17-DnaKJを、上記と同様のエレクトロポレーション法によって、KNK005/dZ/trc-J4b/dphaAB::phaABsp株に導入し、得られた菌株を、KNK005/dZ/trc-J4b/dphaAB::phaABsp/pCUP2-lacN17-DnaKJ株と命名した（以下、「PHA生産微生物株（8）」と記載することもある）。

[0074] PHA生産微生物株（8）は、カプリアビダス・ネカトルH16株の染色体上のphaC1遺伝子（PHA合成酵素遺伝子）、phaZ1遺伝子、phaZ2遺伝子、phaZ6遺伝子、及びphaAB遺伝子を欠失し、染色体上のR体特異的エノイル-CoAヒドラーゼ遺伝子の発現を強化し、配列番号19に記載のアミノ酸配列を有するアエロモナス属由来のPHA合成酵素変異体をコードする遺伝子とCupriavidus sp. strain S-6由来の配列番号4に記載のアミノ酸配列を有するphaAおよび配列番号7に記載のアミノ酸配列を有するphaB遺伝子と、配列番号24および25に記載のアミノ酸配列を有するEscherichia属由来のDnaKJをコードする遺伝子を導入した株である。

[0075] （実施例1）PHA生産微生物株（1）によるPHA生産 下記の条件でPHA生産微生物株（1）を用いた培養検討を行なった。

[0076] （PHA蓄積量の測定方法）

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

Aの重量を測定し、PHA生産量を算出した。

[0077] (フラスコでのPHA生産培養)

種母培地の組成は、10 g/L 肉エキス、10 g/L バクトトリプトン、2 g/L 酵母エキス、9 g/L リン酸二水素ナトリウム12水和物、1.5 g/L リン酸水素ニカリウム、100 μg/L カナマイシン硫酸塩とした。

[0078] PHA生産培地の組成は、11 g/L リン酸水素二ナトリウム12水和物、1.9 g/L リン酸水素ニカリウム、1.3 g/L 硫酸アンモニウム、5 mL/L マグネシウム溶液、1 mL/L 微量金属塩溶液とした。マグネシウム溶液は、水に200 g/L 硫酸マグネシウム七水和物を溶かして調製した。微量金属塩溶液は、0.1 N塩酸に、0.218 g/L 塩化コバルト六水和物、16.2 g/L 塩化鉄(III)六水和物、10.3 g/L 塩化カルシウム二水和物、0.118 g/L 塩化ニッケル六水和物、0.156 g/L 硫酸銅五水和物を溶かして調製した。

[0079] 微生物作製例1で作製したKNK005/dZ/trc-J4b/pCUP2-lacN17-CipBre株のグリセロールストック溶液50 μLを種母培地10 mLに接種し、30℃で24時間振盪培養した。得られた培養液を前培養液とした。

[0080] PHA生産培養は、フラスコで行った。500 mL容量の振盪フラスコにPHA生産培地50 mLを入れた。植菌直前に、マグネシウム溶液を250 μL、微量金属溶液を50 μL、パーム核油を1 g添加した。培地調製後、振盪フラスコに前培養液を500 μL接種し、36℃で72時間振盪培養を行った。培養終了後、PHA生産量は前述のように測定した。KNK005/dZ/trc-J4b株を同条件で培養した比較例1のPHA生産量を基準値とし、該基準値に対する相対値としてPHA生産量を表1に示す。

[0081] (実施例2) PHA生産微生物株(2)によるPHA生産

実施例1と同様の条件で、PHA生産微生物株(2)を用いた培養検討を行ない、PHA生産量を前述のように測定した。実施例1と同様に、基準値

に対する相対値としてPHA生産量を表1に示す。

[0082] (比較例1～3)

実施例1と同様の条件で、KNK005/dZ/trc-J4b株、PHA生産微生物株(3)、又は、PHA生産微生物株(4)を用いた培養検討を行ない、PHA生産量を前述のように測定した。実施例1と同様に、基準値に対する相対値としてPHA生産量を表1に示す。

[0083] [表1]

	菌株名	導入又は発現強化した フェイスイン遺伝子	PHA生産量の 比較値(%)
実施例1	PHA生産微生物株(1)	ClpBre	152
実施例2	PHA生産微生物株(2)	ClpBec	156
比較例1	KNK005/dZ/trc-J4b	-	100
比較例2	PHA生産微生物株(3)	GroESL	106.0
比較例3	PHA生産微生物株(4)	DnaKJ	91.3

[0084] 表1より次のことが分かる。実施例1及び実施例2と比較例1を比較すると、実施例1及び2は、比較例1よりもPHA生産量が向上したことが分かる。このことより、ClpBファミリーに属するシャペロンをコードする遺伝子が導入又は発現強化されたことでPHA生産性が向上したと言える。

[0085] また、実施例1及び2と、比較例2及び3を比較すると、実施例1及び2は、比較例2及び3よりPHA生産量が高いことが分かる。このことより、ClpBファミリーに属するシャペロンをコードする遺伝子の導入又は発現強化は、他のシャペロンGroESL又はDnaKJをコードする遺伝子の導入又は発現強化よりもPHA生産性向上効果が良好であると言える。

[0086] (実施例3) PHA生産微生物株(5)によるPHA生産 下記の条件でPHA生産微生物株(5)を用いた培養検討を行なった。

[0087] (高密度培養でのPHA生産培養)

種母培地の組成は、1w/v% Meat-extract、1w/v% Bacto-Tryptone、0.2w/v% Yeast-extract、0.9w/v% $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、0.15w/v% K

H_2PO_4 、(pH 6.8)とした。

[0088] 前培養培地の組成は、1.1 w/v% $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、0.19 w/v% KH_2PO_4 、1.29 w/v% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.1 w/v% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、2.5 w/v% パームオレインオイル、0.5 v/v% 微量金属塩溶液 (0.1 N塩酸に1.6 w/v% $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、1 w/v% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.02 w/v% $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0.016 w/v% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、0.012 w/v% $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ を溶かしたもの)とした。

[0089] PHA生産培地の組成は、0.385 w/v% $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、0.067 w/v% KH_2PO_4 、0.291 w/v% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.1 w/v% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.5 v/v% 微量金属塩溶液 (0.1 N塩酸に1.6 w/v% $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、1 w/v% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.02 w/v% $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0.016 w/v% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、0.012 w/v% $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ を溶かしたもの)とした。

[0090] PHA生産培養は次のように行った。まず、PHA生産微生物株(5)のグリセロールストック(50 μl)を種母培地(10 ml)に接種して24時間培養し種母培養を行なった。次に種母培養液を、1.8 Lの前培養培地を入れた3 Lジャーファーマンター(丸菱バイオエンジニアリング製MDL-300型)に1.0 v/v%接種した。運転条件は、培養温度30℃、攪拌速度500 rpm、通気量1.8 L/minとし、pHは6.7~6.8の間でコントロールしながら28時間培養し、前培養を行なった。pHコントロールには14%水酸化アンモニウム水溶液を使用した。

[0091] 次に、前培養液を、2.5 LのPHA生産培地を入れた5 Lジャーファーマンター(丸菱バイオエンジニアリング製MDS-U50型)に5.0 v/v%接種した。運転条件は、培養温度36℃、攪拌速度420 rpm、通気量2.1 L/minとし、pHは6.7~6.8の間でコントロールした。pHコントロールには25%水酸化アンモニウム水溶液を使用した。炭素源は断続的に

添加した。炭素源としてはパームオレインオイルを使用した。培養は48時間行った。PHA生産量は前述のように測定した。KNK005/dZ/trc-J4b株を同条件で培養した比較例4のPHA生産量を基準値とし、該基準値に対する相対値としてPHA生産量を表2に示す。

[0092] (実施例4) PHA生産微生物株(6)によるPHA生産

実施例3と同様の条件でPHA生産微生物株(6)を用いた培養検討を行ない、PHA生産量を前述のように測定した。実施例3と同様に、基準値に対する相対値としてPHA生産量を表2に示す。

[0093] (比較例4～7)

実施例1と同様の条件で、KNK005/dZ/trc-J4b株、KNK005/dZ/trc-J4b/dphaAB::phaABsp株、PHA生産微生物株(7)、又は、PHA生産微生物株(8)を用いた培養検討を行ない、PHA生産量を前述のように測定した。実施例3と同様に、基準値に対する相対値としてPHA生産量を表2に示す。

[0094] [表2]

	菌株名	phaAB遺伝子	導入又は発現強化した フェイスイン遺伝子	PHA生産量の 比較値(%)
実施例3	PHA生産微生物株(5)	phaABsp	ClpBre	121
実施例4	PHA生産微生物株(6)	phaABsp	ClpBec	122
比較例4	KNK005/dZ/trc-J4b	phaABre	-	100
比較例5	KNK005/dZ/trc-J4b/dphaAB::phaABsp	phaABsp	-	116
比較例6	PHA生産微生物株(7)	phaABsp	GroESL	105
比較例7	PHA生産微生物株(8)	phaABsp	DnaKJ	77

[0095] 表2より次のことが分かる。実施例3及び実施例4と比較例5とを比較すると、実施例3及び4は、比較例5よりもPHA生産量が高いことが分かる。このことより、ClpBファミリーに属するシャペロンをコードする遺伝子が導入又は発現強化されたことでPHA生産性が向上したと言える。

[0096] また、実施例3及び実施例4と、比較例6及び7とを比較すると、実施例3及び4は、比較例6及び7よりPHA生産性が高いことが分かる。このことより、ClpBファミリーに属するシャペロンをコードする遺伝子の導入

又は発現強化は、他のシャペロンGroESL又はDnaKJをコードする遺伝子の導入又は発現強化よりもPHA生産性向上効果が良好であると言える。

請求の範囲

- [請求項1] ポリヒドロキシアルカン酸の産生能を有する形質転換微生物であって、
- ポリヒドロキシアルカン酸合成酵素遺伝子を有し、
- C l p Bファミリーに属するシャペロンをコードする遺伝子が導入され、又はその発現が強化された、形質転換微生物。
- [請求項2] 前記C l p Bファミリーに属するシャペロンが、配列番号1又は2で示されるアミノ酸配列に対して65～100%の配列同一性を示すアミノ酸配列を有する、請求項1に記載の形質転換微生物。
- [請求項3] 前記C l p Bファミリーに属するシャペロンが、C u p r i a v i d u s属、又は、E s c h e r i c i a属由来である、請求項1又は2に記載の形質転換微生物。
- [請求項4] 前記C l p Bファミリーに属するシャペロンが、C u p r i a v i d u s n e c a t o r、又は、E s c h e r i c i a c o l i由来である、請求項3に記載の形質転換微生物。
- [請求項5] 前記形質転換微生物がC u p r i a v i d u s属に属する、請求項1又は2に記載の形質転換微生物。
- [請求項6] 好熱菌由来のP h a Aをコードする遺伝子及び／又は好熱菌由来のP h a Bをコードする遺伝子が導入された、請求項1又は2に記載の記載の形質転換微生物。
- [請求項7] 前記好熱菌がC u p r i a v i d u s s p. s t r a i n S-6である、請求項6に記載の形質転換微生物。
- [請求項8] 請求項1又は2に記載の形質転換微生物を培養する工程を含む、ポリヒドロキシアルカン酸の製造方法。
- [請求項9] ポリヒドロキシアルカン酸が、2種以上のヒドロキシアルカン酸の共重合体である、請求項8に記載のポリヒドロキシアルカン酸の製造方法。
- [請求項10] 前記ポリヒドロキシアルカン酸が、3-ヒドロキシヘキサン酸をモノ

マーユニットとして含有する共重合体である、請求項 9 に記載のポリ
ヒドロキシアルカン酸の製造方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/003568

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>C12N 1/21</i> (2006.01)i; <i>C12P 7/62</i> (2022.01)i; <i>C12N 15/31</i> (2006.01)n FI: C12N1/21; C12P7/62; C12N15/31 ZNA 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) C12N1/21; C12P7/62; C12N15/31 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 1971-2024 Registered utility model specifications of Japan 1996-2024 Published registered utility model applications of Japan 1994-2024 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JAYAKODY, LN et al., Thermochemical wastewater valorization via enhanced microbial toxicity tolerance, Energy & Environmental Science, 2018, vol. 11, pages 1625-1638 abstract, pages 5, 7, fig. 6C	1-4, 8
Y		5-7, 9-10
Y	JP 2021-108581 A (KANEKA CORP.) 02 August 2021 (2021-08-02) claims, paragraph [0016], examples	5-7, 9-10
Y	WO 2023/004135 A1 (THE RESEARCH FOUNDATION FOR THE STATE UNIVERSITY OF NEW YORK) 26 January 2023 (2023-01-26) abstract, claims	6-7
A	WO 2009/147918 A1 (TOKYO INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 10 December 2009 (2009-12-10) examples, claims	1-10
A	JP 2005-73563 A (CANON INC.) 24 March 2005 (2005-03-24) claims, examples	1-10
☒ 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 “D” document cited by the applicant in the international application “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed “T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention “X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone “Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art “&” document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 03 April 2024		Date of mailing of the international search report 16 April 2024
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/003568

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	THOMSON, NM et al., Efficient Production of Active Polyhydroxyalkanoate Synthase in Escherichia coli by Coexpression of Molecular Chaperones, Applied and Environmental Microbiology, 2013, vol. 79, no. 6, pages 1948-1955 abstract	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/003568

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2024/003568

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP	2021-108581	A	02 August 2021	(Family: none)	
WO	2023/004135	A1	26 January 2023	(Family: none)	
WO	2009/147918	A1	10 December 2009	US 2011/0081692 A1	
				examples, claims	
				EP 2289967 A1	
				CN 102056962 A	
JP	2005-73563	A	24 March 2005	(Family: none)	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））
C12N 1/21(2006.01)i; C12P 7/62(2022.01)i; C12N 15/31(2006.01)n
FI: C12N1/21; C12P7/62; C12N15/31 ZNA

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））
C12N1/21; C12P7/62; C12N15/31

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 1971-2024年
日本国実用新案登録公報 1996-2024年
日本国登録実用新案公報 1994-2024年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	JAYAKODY, LN et al., Thermochemical wastewater valorization via enhanced microbial toxicity tolerance, Energy & Environmental Science, 2018, Vol. 11, pp. 1625-1638	1-4, 8
Y	Abstract, p. 5, p. 7, Figure 6C	5-7, 9-10
Y	JP 2021-108581 A (株式会社カネカ) 02.08.2021 (2021-08-02) 特許請求の範囲、[0016]、実施例	5-7, 9-10
Y	WO 2023/004135 A1 (THE RESEARCH FOUNDATION FOR THE STATE UNIVERSITY OF NEW YORK) 26.01.2023 (2023-01-26) Abstract, Claims	6-7
A	WO 2009/147918 A1 (国立大学法人東京工業大学) 10.12.2009 (2009-12-10) 実施例、請求の範囲	1-10
A	JP 2005-73563 A (キヤノン株式会社) 24.03.2005 (2005-03-24) 特許請求の範囲、実施例	1-10

☒ 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、一般的技术水準を示すもの
“D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献
“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
03.04.2024

国際調査報告の発送日
16.04.2024

名称及びあて先
日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

権限のある職員（特許庁審査官）
西澤 龍彦 4B 5376
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
A	THOMSON, NM et al., Efficient Production of Active Polyhydroxyalkanoate Synthase in Escherichia coli by Coexpression of Molecular Chaperones, Applied and Environmental Microbiology, 2013, Vol. 79, No. 6, pp. 1948-1955 Abstract	1-10

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
- b. ☐ 国際出願日後に、国際調査のために提出された配列表（PCT規則13の3.1(a)）
- ☐ 配列表が出願時の国際出願の開示の範囲を超えるものではない旨の陳述書が添付されていた。
2. ☐ 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、この国際調査報告は、WIPO標準ST.26に準拠する配列表なしで有意義な国際調査をすることができる限度において作成された。
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/JP2024/003568

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP	2021-108581	A	02.08.2021	(ファミリーなし)	
WO	2023/004135	A1	26.01.2023	(ファミリーなし)	
WO	2009/147918	A1	10.12.2009	US 2011/0081692 A1	
				EXAMPLES, CLAIMS	
				EP 2289967 A1	
				CN 102056962 A	
JP	2005-73563	A	24.03.2005	(ファミリーなし)	