

(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  
2013年3月14日(14.03.2013)



(10) 国際公開番号  
WO 2013/035372 A1

- (51) 国際特許分類:  
C12P 7/62 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2012/060179
- (22) 国際出願日: 2012年4月13日(13.04.2012)
- (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 2011-193230 2011年9月5日(05.09.2011) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人理化学研究所(RIKEN) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢2番1号 Saitama (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 沼田 圭司 (NUMATA Keiji) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢2番1号 独立行政法人理化学研究所内 Saitama (JP). 山田 美和 (YAMADA Miwa) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢2番1号 独立行

政法人理化学研究所内 Saitama (JP). 土肥 義治 (DOI Yoshiharu) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢2番1号 独立行政法人理化学研究所内 Saitama (JP).

(74) 代理人: 平木 祐輔, 外(HIRAKI Yusuke et al.); 〒1056232 東京都港区愛宕2丁目5番1号 愛宕グリーンヒルズMORIタワー32階 Tokyo (JP).

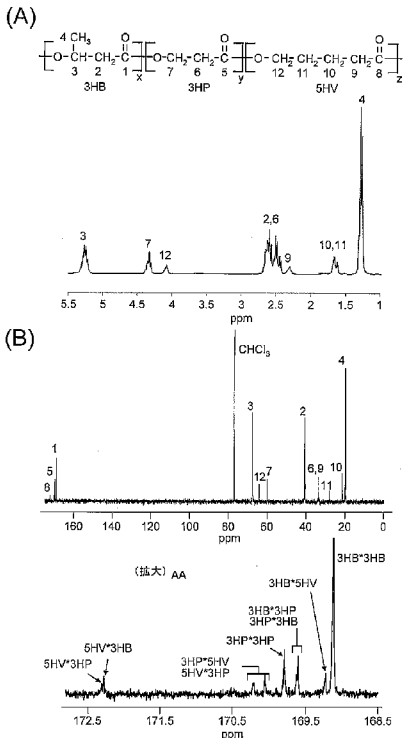
(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[続葉有]

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING POLYHYDROXYALKANOATE HAVING LONG MAIN CHAIN STRUCTURE

(54) 発明の名称: 長主鎖構造を有するポリヒドロキシアルカン酸の製造方法

[図2]



(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide a polyhydroxyalkanoate which forms a useful bioplastic or biomaterial. Specifically, the present invention relates to a method for producing a polyhydroxyalkanoate that contains at least a 5-hydroxy valerate unit. The method for producing a polyhydroxyalkanoate comprises a step of culturing a microorganism belonging to the genus *Ralstonia* in a culture medium that contains a lactone and/or a hydroxy acid or a hydroxy acid salt as a carbon source.

(57) 要約: 本発明は、有用なバイオプラスチック又は生体材料となるポリヒドロキシアルカン酸を提供することを目的とし、具体的には、少なくとも5-ヒドロキシバレレート単位を含むポリヒドロキシアルカン酸の製造方法であって、ラルストニア(*Ralstonia*)属に属する微生物を、炭素源としてラクトン及び/又はヒドロキシ酸若しくはヒドロキシ酸塩を含有する培地において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関する。

WO 2013/035372 A1



- (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, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 規則 4.17 に規定する申立て:
- 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て (規則 4.17(v))
- 添付公開書類:
- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
  - 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

## 明 細 書

発明の名称：

長主鎖構造を有する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、長主鎖構造を有するポリヒドロキシアルカン酸(ポリヒドロキシアルカノエート：PHA)の製造方法及び当該方法により得られるポリマーに関する。

### 背景技術

[0002] 多くのバクテリアは、バイオマスである糖や植物油を原料とし、細胞内にエネルギー貯蔵物質としてポリヒドロキシアルカン酸(PHA)を蓄積する(非特許文献1～3)。PHAは、生分解性と熱可塑性を有するため、石油プラスチックの代替品としての応用が期待されている(非特許文献4及び5)。

[0003] また、PHAは、生分解性と生体適合性も有することから生体材料としての応用も期待されている(非特許文献6及び7)。in vivo及びin vitro試験によって、PHAが骨及び軟骨組織(非特許文献8)、血液(非特許文献9)及び様々な細胞系へ高い親和性を示すことが報告されており、PHAが医療分野で活躍することが期待される。

[0004] ところで、微生物細胞におけるPHAの細胞内合成は、炭素源を原料に代謝経路からモノマーであるヒドロキシアシル-CoAが供給され、供給された当該モノマーがPHA合成酵素により重合されることにより起こる。このように、PHAの細胞内合成は、モノマーの供給からポリマー合成まで全ての反応を微生物細胞内で行うことを特徴とする。本システムにおいて、PHAを構成するモノマーの種類や組成は、供給する炭素源の種類、代謝経路及びPHA合成酵素の基質特異性によって決定される。これらのファクターを調製するために、培養条件や炭素源を調整し、また遺伝子工学や代謝工学的な手法を組み合わせ、新規の代謝経路を構築することによって、これまでに100種類以上ものPHAファミリーが報告されている(非特許文献10)。報告されているPHAファミリーの

大部分は、側鎖にバラエティを持つPHAである。主鎖にバラエティを持つPHAは、ラクテート(非特許文献11)、4-ヒドロキシブチレート(4HB)(非特許文献12)、4-ヒドロキシバレレート(4HV)(非特許文献13)、5-ヒドロキシバレレート(5HV)(非特許文献14)及び6-ヒドロキシヘキサノエート(6HH)とこれまでにわずかな報告しかない。

## 先行技術文献

### 非特許文献

- [0005] 非特許文献1: Doi, Y.; Kitamura, S.; Abe, H., *Macromolecules* 1995, 28, 4822-4828.
- 非特許文献2: Steinbuchel, A.; Fuchtenbusch, B., *Trends in Biotechnology* 1998, 16, 419-427.
- 非特許文献3: Rehm, B. H. A.; Steinbuchel, A., *Int. J. Biol. Macromol.* 1999, 25, 3-19.
- 非特許文献4: Chen, G. Q., *Chemical Society Reviews* 2009, 38, 2434-2446.
- 非特許文献5: Sudesh, K.; Abe, H.; Doi, Y., *Progress in Polymer Science* 2000, 25, 1503-1555.
- 非特許文献6: Chen, G. Q.; Wu, Q.; Wang, Y., *Artificial Cells Blood Substitutes and Biotechnology* 2009, 37, 1-12.
- 非特許文献7: Boccaccini, A. R.; Misra, S. K.; Valappil, S. P.; Roy, I., *Biomacromolecules* 2006, 7, 2249-2258.
- 非特許文献8: Gogolewski, S.; Jovanovic, M.; Perren, S. M.; Dillon, J. G.; Hughes, M. K., *Journal of Biomedical Materials Research* 1993, 27, 1135-1148.
- 非特許文献9: Deng, Y.; Lin, X. S.; Zheng, Z.; Deng, J. G.; Chen, J. C.; Ma, H.; Chen, G. Q., *Biomaterials* 2003, 24, 4273-4281.
- 非特許文献10: Steinbuchel, A.; Valentin, H. E., *Fems Microbiology Letters* 1995, 128, 219-228.

非特許文献11 : Taguchi, S.; Yamada, M.; Matsumoto, K.; Tajima, K.; Satoh, Y.; Munekata, M.; Ohno, K.; Kohda, K.; Shimamura, T.; Kambe, H.; Obata, S., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2008, 105, 17323-7.

非特許文献12 : Kunioka, M.; Nakamura, Y.; Doi, Y., Polymer Communications 1988, 29, 174-176.

非特許文献13 : Gorenflo, V.; Schmack, G.; Vogel, R.; Steinbuchel, A., Biomacromolecules 2001, 2, 45-57.

非特許文献14 : Doi, Y.; Tamaki, A.; Kunioka, M.; Soga, K., Makromol. Chem., Rapid Commun 1987, 8, 631-635.

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0006] 多様なPHAの中で、長主鎖モノマーを有するPHAは生分解性が向上することが期待される。例えば、基本的なPHAのモノマー構造である3-ヒドロキシブチレート(3HB)と比較して、側鎖が存在せず、主鎖の炭素数が一つ多い4HB単位(ユニット)を持つP(3HB-co-4HB)コポリマーは、PHA分解酵素だけではなくリパーゼによる酵素分解性を示すことが知られている(Chen, G. Q.; Wu, Q.; Wang, Y., Artificial Cells Blood Substitutes and Biotechnology 2009, 37, 1-12及びSaito, Y.; Doi, Y., International Journal of Biological Macromolecules 1994, 16, 99-104.)。側鎖を持つP(3HB)ホモポリマーや他のPHAはリパーゼ分解性を示さないため、P(3HB-co-4HB)コポリマーのリパーゼによる酵素分解性は特別な性質である。

[0007] また、リパーゼは生体の細胞内に存在するため、リパーゼ分解性を有するPHAによれば細胞内における生分解性の向上が期待できる。よって、細胞内における生分解性の向上は、PHAを組織医療材料やドラッグデリバリーとして利用する際に有用である。

[0008] 4HBがリパーゼ分解性を示す理由の一つとして、4HBは側鎖構造を持たない直鎖構造を持つモノマーであるため、酵素がアタックしやすいということが考えられる。

[0009] 以上の知見をもとに、より長主鎖のモノマー(5HV、6HH等)が導入されたPHAは、さらなるリパーゼ分解性の向上が期待される。しかしながら、これまでに5HV単位を含むPHAの効率的な合成及び酵素分解性の評価は行われていなかった。

[0010] そこで、本発明は、上述した実情に鑑み、有用なバイオプラスチック又は生体材料となるPHAを創製するために、5HV単位を含むPHAの効率的な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

[0011] 上記課題を解決するため鋭意研究を行った結果、ラルストニア(*Ralstonia*)属に属する微生物を、炭素源としてラクトン及び／又はヒドロキシ酸若しくはヒドロキシ酸塩を含有する培地において培養することで、5HV単位を含むPHAを製造できることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0012] 本発明は、以下を包含する。

[0013] (1) 少なくとも5-ヒドロキシバレレート(5HV)単位を含むポリヒドロキシアリカン酸(PHA)の製造方法であって、ラルストニア属に属する微生物を、炭素源として、環を構成する炭素数が12以上のラクトン及び／又はヒドロキシ酸若しくはヒドロキシ酸塩を含有する培地において培養する工程を含む、ポリヒドロキシアリカン酸の製造方法。

[0014] (2) ラルストニア属に属する微生物が、ポリヒドロキシアリカン酸合成酵素をコードする遺伝子が導入されたラルストニア・ユートロファ(*Ralstonia eutropha*)である、(1)記載の方法。

[0015] (3) ポリヒドロキシアリカン酸合成酵素をコードする遺伝子が、以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードする遺伝子である、(2)記載の方法。

[0016] (a)配列番号2、4及び6のいずれか1つに示されるアミノ酸配列から成るタンパク質

(b)(a)のタンパク質のアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列から成り、且つポリヒドロキシアリカン酸合成活性を有するタンパク質

- (4) 前記ラクトンが $\omega$ -ペンタデカラクトンである、(1)～(3)のいずれか1記載の方法。
- [0017] (5) ヒドロキシ酸塩が5-ヒドロキシ吉草酸塩である、(1)～(4)のいずれか1記載の方法。
- [0018] (6) 前記ポリヒドロキシアルカン酸が3-ヒドロキシブチレート(3HB)単位をさらに含む、(1)～(5)のいずれか1記載の方法。
- [0019] (7) 前記ポリヒドロキシアルカン酸が10～35 mol%の5-ヒドロキシバレレート単位を有するポリヒドロキシアルカン酸コポリマーである、(1)～(6)のいずれか1記載の方法。
- [0020] 本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願2011-193230号の明細書及び/又は図面に記載される内容を包含する。

### 発明の効果

- [0021] 本発明によれば、バイオプラスチックのみならず生体適合性材料として有用な5HV単位を含むPHAを製造できる。

### 図面の簡単な説明

- [0022] [図1]ラルストニア・ユートロファにおけるP(3HB-co-3HP-co-5HV)の合成経路を示す。5HV：5-ヒドロキシバレレート、5HVNa：5-ヒドロキシ吉草酸ナトリウム、 $\omega$ -PDL： $\omega$ -ペンタデカラクトン、PhaA： $\beta$ -ケトチオラーゼ、PhaB：NADPH依存性アセトアセチル-CoAレダクターゼ、PhaC：PHAシクターゼ。
- [図2]発現ベクターpBBRMCS2C<sub>R6</sub>を有する組換えラルストニア・ユートロファPHB-4において生産されたP(3HB-co-3HP-co-5HV)(表3におけるサンプル番号10)のNMRスペクトルを示す。(A)<sup>1</sup>H NMR、(B)<sup>13</sup>C NMR。
- [図3]P(3HB)、P(3HP)、P(5HV)及びP(3HB-co-3HP-co-5HV)のDSC分析結果を示す。5% 3HP 1% 5HV：P(3HB-co-5 mol%3HP-co-1 mol% 5HV)、5% 3HP 10% 5HV：P(3HB-co-5 mol% 3HP-co-10 mol% 5HV)、18% 3HP 5% 5HV：P(3HB-co-18 mol% 3HP-co-5 mol% 5HV)、及び23% 3HP 6% 5HV：P(3HB-co-23 mol% 3HP-co-6 mol% 5HV)のP(3HB-co-3HP-co-5HV)は、それぞれ表2及び3に示すサンプル番号1、14、10及び11であった。P(3HB)は、フルクトースから

ラルストニア・ユートロファH16により生産されたものである。P(3HP)及びP(5HV)は、化学合成されたものである(Abe, H.; Doi, Y.; Aoki, H.; Akehata, T.; Hori, Y.; Yamaguchi, A., *Macromolecules* 1995, 28, 7630-7637.)。

矢印は、融解温度( $T_m$ )のピークを示す。

[図4]37°C及びpH7.4下でのブタ膵臓由来のリパーゼ水溶液中でのPHAフィルム(初期重量:約4 mg)の酵素分解プロフィールを示す。エラーバーは、サンプル(n=2)の標準偏差を表す。図4(A)及び(B)において、5%3HP 1% 5HV:P(3HB-co-5 mol% 3HP-co-1 mol% 5HV)、5% 3HP 10% 5HV:P(3HB-co-5 mol% 3HP-co-10 mol% 5HV)、18% 3HP 5% 5HV:P(3HB-co-18 mol% 3HP-co-5 mol% 5HV)、及び23% 3HP 6% 5HV:P(3HB-co-23 mol% 3HP-co-6 mol% 5HV)のP(3HB-co-3HP-co-5HV)は、それぞれ表2及び3に示すサンプル番号1、14、10及び11であった。P(3HB)は、フルクトースからラルストニア・ユートロファH16により生産されたものである。P(3HP)及びP(5HV)は、化学合成されたものである(Abe, H.; Doi, Y.; Aoki, H.; Akehata, T.; Hori, Y.; Yamaguchi, A., *Macromolecules* 1995, 28, 7630-7637.)。図4(B)において、P(98 mol% 4HB-co-3HB)は、コマモナス・アシドボランズ(*Comamonas acidovorans*)により1,4-ブタンジオールから生産されたものである。また、P(3HB-co-9 mol% 3HP-co-14 mol% 5HV)は、表6に示すサンプル番号30又は31であった。さらに、P(3HB-co-7 mol% 3HP-co-20 mol% 5HV)は、表5に示すサンプル番号22であった。

[図5]48時間のインキュベーション後の細胞培養物を用いて測定した490nmにおける吸光度から決定した、PHAフィルム上に播種したhMSCの細胞生存能を示す。細胞生存能100%を、陽性対照(細胞培養プレート上に播種した、48時間のインキュベーション後の細胞培養物)から算出した。エラーバーは、サンプル(n=3)の標準偏差を表す。5% 3HP 1% 5HV:P(3HB-co-5 mol% 3HP-co-1 mol% 5HV)、5% 3HP 10% 5HV:P(3HB-co-5 mol% 3HP-co-10 mol% 5HV)、18% 3HP 5% 5HV:P(3HB-co-18 mol% 3HP-co-5 mol% 5HV)、及び23% 3HP 6% 5HV:P(3HB-co-23 mol% 3HP-co-6 mol% 5HV)のP(3HB-co-3HP-co-5HV)



は、それぞれ表2及び3に示すサンプル番号1、14、10及び11であった。P(3HB)は、フルクトースからラルストニア・ユートロファH16により生産されたものである。P(3HP)及びP(5HV)は、化学合成されたものである(Abe, H.; Doi, Y.; Aoki, H.; Akehata, T.; Hori, Y.; Yamaguchi, A., *Macromolecules* 1995, 28, 7630-7637.)。

### 発明を実施するための形態

[0023] 以下、本発明を詳細に説明する。

[0024] 以前の研究で、土肥ら(Doi, Y.; Tamaki, A.; Kunioka, M.; Soga, K., *Makromol. Chem., Rapid Commun* 1987, 8, 631-635.)は、ラルストニア・ユートロファH16を用いて5-クロロペンタン酸とペンタン酸からP(3HB-co-3HV-co-5HV)コポリマー(ここで、3HVは3-ヒドロキシバレレートである)を合成した。この結果は、ラルストニア・ユートロファは、5HV-CoAモノマー供給経路を有しているということを示している。しかしながら、5-クロロペンタン酸の毒性により、ポリマー蓄積量が非常に低かったため、合成したポリマーの解析を行うには不向きな系であった。一方、ラクトン環やアルカン酸塩は、細胞に対しての毒性が低いことが知られている(Doi, Y.; Tamaki, A.; Kunioka, M.; Soga, K., *Makromol. Chem., Rapid Commun* 1987, 8, 631-635.)。

[0025] そこで、ラルストニア・ユートロファ等のラルストニア属に属する微生物を利用し、ラクトン(例えば、 $\omega$ -ペンタデカラクトン( $\omega$ -PDL))又はヒドロキシ酸塩(例えば、5-ヒドロキシ吉草酸ナトリウム(5HVNa))を炭素源として、5HVを含むPHA合成を行うことを試みたところ、ラルストニア属に属する微生物では $\beta$ 酸化経路から5HV-CoAを供給し、5HVを含むPHAを合成できることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0026] 本発明は、ラルストニア属に属する微生物を、炭素源としてラクトン及び/又はヒドロキシ酸若しくはヒドロキシ酸塩を含有する培地において培養し、少なくとも5-ヒドロキシバレレート(5HV)単位を含むポリヒドロキシアルカン酸(PHA)を製造する方法である(以下、「本方法」と称する)。本方法では、5HV単位を含むPHAとして、5HV単位と共に3-ヒドロキシブチレート(3HB)単位

及び／又は3-ヒドロキシプロピオネート(3HP)単位を含むPHAコポリマーを製造することができる。

[0027] 本発明によれば、5HV単位の割合が高く、リパーゼ分解性を有し、且つ細胞毒性が低いPHAを製造することができる。製造されたPHAは、リパーゼ分解性を有することから、生分解性を有し、生体材料として有用である。

[0028] 本方法で使用するラルストニア属に属する微生物としては、例えばラルストニア・ユートロファ(カプリアビダス・ネカトル(*Cupriavidus necator*)とも称される)、ラルストニア・マンニトリリティカ(*Ralstonia mannitolilytica*)、ラルストニア・メタリデュランス(*Ralstonia metallidurans*)、ラルストニア・オキサラティカ(*Ralstonia oxalatica*)、ラルストニア・パウクラ(*Ralstonia paucula*)、ラルストニア・ソラナセアラム(*Ralstonia solanacearum*)等の種が挙げられる。また、ラルストニア・ユートロファの菌株としては、例えばラルストニア・ユートロファH16株(ATCC No. 17699)(本明細書では、単に「ラルストニア・ユートロファH16」と称する場合がある；ATCC(American Type Culture Collection)から入手可能)が挙げられる。

[0029] また、本方法で使用するラルストニア属に属する微生物としては、ポリヒドロキシアルカン酸合成酵素(PHAシンターゼ；PhaC)をコードする遺伝子が導入されたラルストニア属に属する微生物(例えば、組換えラルストニア・ユートロファ)が挙げられる。ラルストニア属に属する微生物に、5HV-CoA取り込み能力が高いPHAシンターゼを導入することで、5HV単位組成の多様なPHAコポリマー(例えば5HV単位の割合が高いPHAコポリマー)を製造することができる。

[0030] PHAシンターゼをコードする遺伝子が導入されるラルストニア属に属する微生物としては、例えばラルストニア・ユートロファH16のPHA合成酵素遺伝子欠損変異株であるラルストニア・ユートロファPHB-4株(DSM No. 541)(本明細書では、単に「ラルストニア・ユートロファPHB-4」と称する場合がある；DSMZ(German Collection of Microorganisms and Cell Cultures)から入手可能)が挙げられる。

[0031] また、導入されるPHAシンターゼをコードする遺伝子としては、例えば配列番号2、4及び6のいずれか1つに示されるアミノ酸配列から成るタンパク質をコードする遺伝子が挙げられる。配列番号2 (Accession No. AAW65074) に示されるアミノ酸配列から成るタンパク質(塩基配列：配列番号1 (Accession No. AY836680))は、ラルストニア・ユートロファ由来のPHAシンターゼ(PhaC<sub>R</sub>)である。配列番号4 (Accession No. BAA36200) に示されるアミノ酸配列から成るタンパク質(塩基配列：配列番号3 (Accession No. AB014758, Region: 543..2222))は、シュードモナス・エスピー(*Pseudomonas* sp.)61-3株由来のPHAシンターゼ1(PhaC1<sub>Ps</sub>)である。配列番号6 (Accession No. BAA21815) に示されるアミノ酸配列から成るタンパク質(塩基配列：配列番号5 (Accession No. D88825, Region: 2694..4478))は、エロモナス・キャビエ(*Aeromonas caviae*)由来のPHAシンターゼ(PhaC<sub>Ac</sub>)である。また、これらタンパク質のアミノ酸配列において、1又は数個(例えば1~10個、好ましくは1~5個、特に好ましくは1~3個)のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列から成り、且つPHA合成活性を有するタンパク質をコードする遺伝子、又は上述のタンパク質のアミノ酸配列に対して、例えば60%以上、70%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上の同一性を有するアミノ酸配列から成り、且つPHA合成活性を有するタンパク質をコードする遺伝子も導入されるPHAシンターゼをコードする遺伝子として使用することができる。アミノ酸配列の同一性(%)は、例えば周知の相同性検索プログラム(例えば、BLAST)を用いたアラインメントにより適宜決定することができる。

[0032] ここで、PHA合成活性とは、基質であるヒドロキシアシル-CoAと反応し、PHAポリマーを合成する活性をいう。PHA合成活性は、例えばPHAシンターゼを基質ヒドロキシアシル-CoA(例えば3HB-CoA、3HP-CoA、5HV-CoA)と接触させ、反応させることで、PHAポリマーが産生されるか否かにより評価することができる。

[0033] さらに、上述のタンパク質をコードするDNAと相補的な塩基配列から成るDN

Aとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、且つPHA合成活性を有するタンパク質をコードするDNAも導入されるPHAシターゼをコードする遺伝子として使用することができる。ここで、ストリンジェントな条件とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成される条件をいう。より具体的にストリンジェントな条件は、例えば、ナトリウム濃度が300~2000mM、好ましくは600~900mMであり、温度が40~75°C、好ましくは55~65°Cでの条件をいう。また、ストリンジェントな条件は、例えばSambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第3版, Cold Spring Harbor Laboratory Press(2001年)等の一般的なテキストを参照することにより適宜決定することができる。

[0034] PHAシターゼをコードする遺伝子は、例えば各PHAシターゼが由来する微生物のゲノムDNAを鋳型とし、特異的なプライマーセットを用いたPCRにより増幅し、単離することができる。

[0035] あるいは、一旦PHAシターゼをコードする遺伝子の塩基配列が確定されると、その後は化学合成によって、又はクローニングされたプローブを鋳型としたPCRによって、あるいは該塩基配列を有するDNA断片をプローブとしてハイブリダイズさせることによって、PHAシターゼをコードする遺伝子を得ることができる。さらに、部位特異的突然変異誘発法等によってPHAシターゼをコードする遺伝子の変異型であって変異前の遺伝子によってコードされるPHAシターゼと同等の機能を有するものをコードする遺伝子を合成することもできる。なお、PHAシターゼをコードする遺伝子に変異を導入するには、Kunkel法、Gapped duplex法等の公知の手法又はこれに準ずる方法を採用することができる。例えば部位特異的突然変異誘発法を利用した変異導入用キット(例えばMutant-K(TAKARA社製)やMutant-G(TAKARA社製))などを用いて、あるいは、TAKARA社のLA PCR in vitro Mutagenesis シリーズキットを用いて変異の導入が行われる。

[0036] さらに、PHAシターゼをコードする遺伝子をラルストニア属に属する微生物に導入すべく、PHAシターゼをコードする遺伝子を含む発現ベクターを準備する。当該発現ベクターは、適当なベクターにPHAシターゼをコードする

遺伝子を挿入することにより得ることができる。使用するベクターとしては、例えばグラム陰性菌での複製可能なpBBRシリーズ等のベクターが挙げられる。また発現ベクターは、ラルストニア属に属する微生物で駆動する制御配列(例えばプロモーター、ターミネーター等)を適宜含むことができる。

[0037] ラルストニア属に属する微生物への発現ベクターの導入方法は、ラルストニア属に属する微生物にDNAを導入する方法であれば特に限定されるものではない。例えばカルシウムイオンを用いる方法、エレクトロポレーション法等が挙げられる。

[0038] 一方、本方法において、培地中の炭素源は、ラクトン及び／又はヒドロキシ酸若しくはヒドロキシ酸塩である。ラクトンとしては、例えば環を構成する炭素数が12以上(例えば12~20、好ましくは14~16)のラクトン、特に $\omega$ -ペンタデカラクトン( $\omega$ -PDL; 15-ペンタデカノラクトンとも称される; 環を構成する炭素数: 15)等が挙げられる。また、ヒドロキシ酸又はヒドロキシ酸塩としては、例えば5-ヒドロキシ吉草酸、5-ヒドロキシ吉草酸塩(例えば5-ヒドロキシ吉草酸ナトリウム(5HVNa))等が挙げられる。培地中のラクトン及び／又はヒドロキシ酸若しくはヒドロキシ酸塩の濃度としては、製造されるPHA中の所望の5HV単位含量等に応じて適宜決定することができるが、例えば培地1Lに対して10~100g、好ましくは10~50gが挙げられる。

[0039] また、培養に使用される培地としては、例えば無機培地が挙げられる。無機培地の組成の例としては、蒸留水1L当たり $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.8g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  3.32g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.25g及び微量元素溶液1mL(当該微量元素溶液は、(0.5N HCl 1L当たり) $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  20g、 $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  10g、 $\text{CuSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.03g、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.05g及び $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1gを含有する)が挙げられる。また、培地のpHとしては、例えば6~8、好ましくは7.0~7.4が挙げられる。

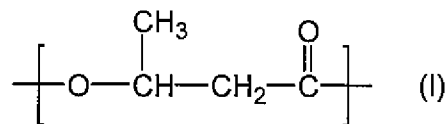
[0040] 本方法では、ラルストニア属に属する微生物を、炭素源としてラクトン及び／又はヒドロキシ酸若しくはヒドロキシ酸塩を含有する培地において培養する。培養温度は、例えば約20°C~約40°C、好ましくは約25°C~約35°Cが挙げられる。さらに、培養時間としては、特に限定されるものではないが、例

例えば約5時間～48時間又はそれ以上が挙げられる。

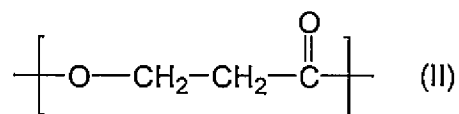
[0041] 培養後、例えば菌体を凍結乾燥に供し、凍結乾燥した菌体をクロロホルム等の有機溶媒を用いた抽出に供し、次いで抽出液にヘキサン又はメタノール等のPHAが不溶性の有機溶媒を加えてポリマー沈殿させることで、PHAを回収することができる。

[0042] 以上に説明した本方法によれば、5HV単位を含むPHA(例えば、3HB単位、3HP単位及び5HV単位を含むPHAコポリマー(本明細書では、「P(3HB-co-3HP-co-5HV)」と称する場合がある))をラルストニア属に属する微生物において製造することができる。本方法で製造されるP(3HB-co-3HP-co-5HV)は、3HB単位、3HP単位及び5HV単位から成るものとすることができる。具体的に製造されるP(3HB-co-3HP-co-5HV)は、以下の式(I)(3HB単位)、式(II)(3HP単位)及び式(III)(5HV)で示される構成単位を含む。

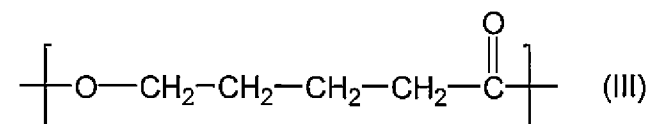
[化1]



[化2]



[化3]



[0043] 本方法で製造されるP(3HB-co-3HP-co-5HV)における上記式(I)の3HB単位は3位に不斉炭素を有し、その立体配置は全てR体である。また、P(3HB-co-3HP-co-5HV)における3HB単位、3HP単位及び5HV単位の順序(シーケンス)は、様々であり、3HB-3HB、3HP-3HP、5HV-5HV、3HB-3HP、3HB-5HV、3HP-5HV、3HP-3HB、5HV-3HB、5HV-3HPのいずれの順序も含む。さらに、本方法で製造されるP(3

HB-co-3HP-co-5HV)における5HV単位の割合は、例えば10~35mol%、好ましくは10~20mol%である。

[0044] また、本方法で製造されるP(3HB-co-3HP-co-5HV)の重量平均分子量( $M_w$ )としては、例えば $40 \times 10^3 \sim 170 \times 10^3$ が挙げられる。本方法で製造されるP(3HB-co-3HP-co-5HV)の数平均分子量( $M_n$ )としては、例えば $10 \times 10^3 \sim 75 \times 10^3$ が挙げられる。本方法で製造されるP(3HB-co-3HP-co-5HV)の多分散性( $M_w/M_n$ )としては、例えば1.5~3.5が挙げられる。

[0045] さらに、本方法で製造されるP(3HB-co-3HP-co-5HV)等の5HV単位を含むPHAの機械的特性によれば、本方法で製造されるPHAは、従来のPHAよりも柔軟であり、透明性の高いフィルムを形成する。

[0046] また、本方法で製造されるP(3HB-co-3HP-co-5HV)等の5HV単位を含むPHAは、リパーゼ分解性を有する。本方法で製造される5HV単位を含むPHAのリパーゼ分解性の評価は、例えば5HV単位を含むPHAから成るフィルムをリパーゼと共にインキュベートし、フィルムの侵食を評価することにより行うことができる。リパーゼ分解性を有しないポリ(3HB)ホモポリマー(P(3HB))やポリ(3HP)ホモポリマー(P(3HP))から成るフィルムと比較して、有意に侵食された(すなわち、フィルムの重量が損失した)場合には、5HV単位を含むPHAのリパーゼ分解性は良好であると判断することができる。

[0047] さらに、本方法で製造されるP(3HB-co-3HP-co-5HV)等の5HV単位を含むPHAは細胞毒性が低い。本方法で製造される5HV単位を含むPHAの細胞毒性の評価は、例えば5HV単位を含むPHAをコーティングしたプレートにおいて細胞を培養し、細胞の生存能を評価することで行うことができる。一般的な細胞培養プレート上での細胞の生存能と比較して、有意に差がない場合には、5HV単位を含むPHAの細胞毒性は低いか、又はほとんどないと判断することができる。

## 実施例

[0048] 以下、実施例を用いて本発明をより詳細に説明するが、本発明の技術的範囲はこれら実施例に限定されるものではない。

[0049] 1. 材料及び方法

<細菌株及びプラスミド>

ラルストニア・ユートロファ(*Ralstonia eutropha*又は*R. eutropha*)H16(AT CC 17699, 野生型)又はラルストニア・ユートロファPHB-4(DSM541)を、PHAの生産のために使用した。

[0050] 発現ベクターpBBRMCS2C<sub>Re</sub>、pBBR1KmEX22(Taguchi, S.; Matsusaki, H.; Matsumoto, K.; Takase, K.; Taguchi, K.; Doi, Y., *Polymer International* 2002, 51, 899-906.)及びpBBREE32d13(Tsuge, T.; Saito, Y.; Kikkawa, Y.; Hiraishi, T.; Doi, Y., *Macromolecular Bioscience* 2004, 4, 238-242.)は、それぞれラルストニア・ユートロファ由来のPHAシターゼ遺伝子(PhaC<sub>Re</sub>; 塩基配列: 配列番号1、アミノ酸配列: 配列番号2)、シユードモナス・エスピー(*Pseudomonas* sp.)61-3由来のPHAシターゼ1遺伝子(PhaC1<sub>Ps</sub>; 塩基配列: 配列番号3、アミノ酸配列: 配列番号4)及びエロモナス・キャビエ(*Aeromonas caviae*)由来のPHAシターゼ遺伝子(PhaC<sub>Ac</sub>; 塩基配列: 配列番号5、アミノ酸配列: 配列番号6)を有した。各PHAシターゼ遺伝子は、それぞれの天然のプロモーターとラルストニア・ユートロファ由来のターミネーターとの間に位置した。これらプラスミド(発現ベクター)は、ラルストニア・ユートロファPHB-4におけるPHAシターゼの発現に使用した。

[0051] なお、発現ベクターpBBRMCS2C<sub>Re</sub>は、pBBRMCS2CAB<sub>Re</sub>(Taguchi, S.; Maehara, A.; Takase, K.; Nakahara, M.; Nakamura, H.; Doi, Y., *Fems Microbiology Letters* 2001, 198, 65-71.)を、Sse 8387I及びNde Iを用いた消化に供することで得られた平滑末端DNA断片の自己連結により構築した。

[0052] <培養条件>

先ず、ラルストニア・ユートロファH16又はPHAシターゼ遺伝子を導入したラルストニア・ユートロファPHB-4を、肉エキス1.0g、ポリペプトン1.0g及び酵母エキス0.2gを含有する富栄養培地100mLを有する500mLフラスコで、30℃で14時間培養した。培養後、細胞を5000rpmで15分間遠心分離に供した。これらの培養条件下では、当該細胞中にポリマーの蓄積は観察されなかった。

[0053] 次いで、ポリマー合成を促進するために、回収した細胞を、唯一の炭素源



として様々な炭素基質を含有する栄養非含有無機培地(100mL)に再懸濁した。当該無機培地は、蒸留水1L当たり $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.8g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  3.32g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.25g及び微量元素溶液1mLを含有した。また、当該微量元素溶液は、(0.5N HCl 1L当たり) $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  20g、 $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  10g、 $\text{CuSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.03g、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.05g及び $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1gを含有した。

[0054] 再懸濁した細胞を、窒素非含有培地(pH7.0)において30°Cで所定の時間インキュベートし、インキュベーション後、遠心分離により回収し、凍結乾燥に供した。

[0055] <細胞からのポリマー抽出>

上記のように、回収した細胞を凍結乾燥に供した後、スクリーキャップを有するガラスチューブにおいて60°Cで2日間、クロロホルムを用いて、ポリマーを抽出した。抽出液を、濾紙を通過させることによって細胞破片を除去した。

[0056] 次に、10倍容量のメタノールを抽出液に添加し、ポリマーを沈殿させた。当該沈殿物を、濾紙上で回収し、乾燥させることでポリマー重量を測定した。ポリマー含量は、乾燥細胞重量(DCW)に基づいて算出した。また、得られたポリマーを下記の更なる分析に供した。

[0057] <ポリマー分析>

上記で得られたコポリマーの組成及びシーケンス分布を、 $^1\text{H}$ -NMRスペクトル及び $^{13}\text{C}$ -NMRスペクトル(Bruker-500 spectrometer)により決定した。400 MHz  $^1\text{H}$ -NMRスペクトルを、5msパルス幅、32000データポイント及び16集積でPHAの $\text{CDCl}_3$ 溶液(10mg/mL)について27°Cで記録した。また、100 MHz  $^{13}\text{C}$ -NMRスペクトルを、5msパルス幅(パルス角度45°)、0.7sパルス反復、23000Hzスペクトル幅、32000データポイント及び8000~20000集積で、PHAの $\text{CDCl}_3$ 溶液(20mg/mL)について27°Cで記録した。テトラメチルシラン( $\text{Me}_4\text{Si}$ )を、内部化学シフト標準として使用した。

[0058] また、ポリマーの分子量を、40°CにおいてShodex 80Mカラムを備えたShimadzu 6Aゲル浸透クロマトグラフィー(GPC)システムを用いて得た。クロロホルム

ムを、溶離液として0.8mL/分の流速で使用した。サンプル濃度は、5.0mg/mLであった。分子量は、ポリスチレン標準物を使用して評価した。

[0059] さらに、示差走査熱量測定(DSC)データを、クーリングアクセサリーを備えたPerkin-Elmer DSC 8500機器で、-90~210°Cの温度範囲において20mL/分の窒素流速下で記録した。溶融結晶化フィルム(10mg)を、アルミパンに封入し、-50°Cから210°Cまで20°C/分で加熱した。融解温度( $T_m$ )を、吸熱ピークの位置から決定した。

[0060] また、ポリマーの機械的特性について、各ポリマーから作製された溶液キャストフィルム(10 × 2 × 0.15 mm<sup>3</sup>)の応力-歪み試験を、小型卓上試験機EZ test(島津製作所製)を用いて室温において10mm/分の歪み速度で行った。

[0061] <酵素分解>

PHAフィルムの酵素分解を、0.1 Mリン酸バッファー(pH7.4)において37°Cで行った。PHAフィルム(初期重量、約4mg; 初期寸法、10×10mm; 初期の厚さ、0.05mm)を、バッファー1.0mLを含有するスクリューキャップを備えた試験管に配置した。反応を、リパーゼ(500 μg; ブタ膵臓由来; Wako Chemical Co製)の添加により開始した。反応液を、振盪フラスコにおいて37°Cでインキュベートした。

[0062] フィルムを定期的に取り出し、水で洗浄し、真空乾燥に供することで、分析前の一定重量に達した。なお、侵食したPHAフィルムの分子量は、侵食されていないPHAフィルムのもものと異ならなかった。このことはPHAがフィルム表面からリパーゼにより侵食されることを示唆する。

[0063] <細胞培養及びin vitro細胞生存能>

ヒト間葉系幹細胞(hMSC)を、Lonza Walkersville Inc.(Walkersville, MD)から購入し、100U/mLペニシリン、100 μg/mLストレプトマイシン及び0.25 μg/mLファンギゾンの存在下で10%ウシ胎児血清(FBS)、0.1 mM非必須アミノ酸及び1ng/mL塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)を補足したダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)を含む増殖培地で、5%CO<sub>2</sub>インキュベーターにおいて37°Cで培養した。

[0064] 一方、PHAを、最終濃度10wt%でクロロホルムに溶解した。当該溶液20 $\mu$ Lを、96ウェルプレートに配置した。フィルム形成プロセス後、サンプルを、室温で2週間真空乾燥に供し、微量のクロロホルムを除去し、次いで更なる使用前に100%エタノール及びUVで滅菌した。

[0065] 細胞生存能アッセイに関しては、hMSC(8000細胞/ウェル)を、PHAフィルムでコーティングした96ウェルプレートに播種し、培地(100 $\mu$ L)で48時間培養した。培養後、PHAフィルム上でのhMSCの細胞生存能を、標準3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-5-(3-カルボキシメトキシフェニル)-2-(4-スルホフェニル)-2H-テトラゾリウム(MTS)アッセイ(Promega, Madison, WI)により製造業者の説明書に従って評価した(n=3)。

[0066] 細胞生存能は、以下の式：

[細胞生存能%] = [PHAフィルム上でインキュベートした細胞培養物の490nmでの吸光度]/[96ウェル細胞培養プレート上でインキュベートした細胞培養物の490nmでの吸光度(陽性対照)] $\times$ 100  
により算出した。

[0067] 2. 結果及び考察

<5HV単位を有するポリマーの微生物生産>

5HVモノマー(5HV-CoA)の前駆体であると期待される長鎖長の様々な $\alpha$ -ヒドロキシアルカン酸ナトリウム及びラク톤を、ポリマー生産のための培地中の唯一の炭素源として検討した(表1)。

[表1]

ラルストニア・ユートロファ H16<sup>a</sup> による長鎖長の様々なラクトンからの PHA 生合成

炭素源 (20 g/L)	DCW (mg)	ポリマー含量 (wt%)
γ-バレロラクトン	164	n.d. <sup>b</sup>
ε-カプロラクトン	168	n.d.
オキサシクロデカン-2-オン	55	n.d.

<sup>a</sup>:細胞を、炭素源(20g/L)含有 MS 培地において 30°Cで 48 時間培養した。

<sup>b</sup>n. d.: <sup>1</sup>H NMR 分析により検出されなかった。

[0068] 20g/Lの5-ヒドロキシ吉草酸ナトリウム(5HVNa)及びω-ペンタデカラクトン(ω-PDL)を炭素源として用いた場合には、ラルストニア・ユートロファH16は、それぞれ5mol%の3HP及び1mol%の5HVを含むポリマー、並びに2mol%の3HP及び1mol%の5HVを含むポリマーを生産した(表2)。

[表2]

ラルストニア・ユートロファ H16 又は様々な PHA シンターゼ遺伝子を有するラルストニア・ユートロファ PHB-4 による 5-ヒドロキシ吉草酸ナトリウム及び  $\omega$ -ペンタデカラクトンからの PHA 生合成<sup>a</sup>

サンプル 番号	菌株	PHA シンターゼ	炭素源 (g/L)	DCW (mg)	ポリマー含量 (wt%)	モノマー組成 <sup>b</sup> (mol%)		
						3HB	3HP	5HV
			5HVNa					
1	H16		20	603±50	34±7	94	5	1
			$\omega$ -PDL					
2	H16		20	571±160	17±9	97	2	1
			5HVNa					
3	PHB-4	PhaC <sub>Re</sub>	20	414±18	42±14	76	18	6
4	PHB-4	PhaC1 <sub>Ps</sub>	20	246±7	8±3	100		
5	PHB-4	PhaC <sub>Ac</sub>	20	274±11	15±4	90	7	3
			$\omega$ -PDL					
6	PHB-4	PhaC <sub>Re</sub>	20	287±54	10±3	87	5	8
7	PHB-4	PhaC1 <sub>Ps</sub>	20	325±9	25±5	96	2	5
8	PHB-4	PhaC <sub>Ac</sub>	20	228±7	13±1	88	5	7

<sup>a</sup>: pBBRMCS2C<sub>Re</sub>、pBBR1KmEX22 又は pBBREE32d13 を有する細胞を、唯一の炭素源として 5HVNa 又は  $\omega$ -PDL(20g/L)を含有する MS 培地において、30°Cで 48 時間培養した。

H16:ラルストニア・ユートロファ H16; PHB-4:ラルストニア・ユートロファ PHB-4; PhaC<sub>Re</sub>:ラルストニア・ユートロファ由来の PHA シンターゼ; PhaC1<sub>Ps</sub>:シュードモナス・エスピー-61-3 由来の PHA シンターゼ 1; PhaC<sub>Ac</sub>:エロモナス・キャビエ由来の PHA シンターゼ。

<sup>b</sup>:モノマー組成は、<sup>1</sup>H-NMR 分析により決定した。

3HP:3-ヒドロキシプロピオネート; 3HB:3-ヒドロキシブチレート; 5HV: 5-ヒドロキシバレレート。

[0069] この結果は、5HV-CoAを、ラルストニア・ユートロファにおいて5HVNa及び  $\omega$ -PDLから代謝を介して供給できることを示した。しかしながら、ポリマー中の5HV画分は、非常に低かった。そこで、培地中の5HVNa及び  $\omega$ -PDLの濃度を増加させた(20、30及び50g/L)が、ポリマー中の5HV画分は変化しなかった。この結果は、5HV-CoA量が細胞中で増加しないのか、及び/又は5HV-CoAに対するPHAシンターゼの基質特異性が低いことを示していた。

[0070] そこで、まず、PHAシンターゼの基質特異性に焦点を当てた。異なる基質特異性を有する3種類のPHAシンターゼ(ラルストニア・ユートロファ由来のPHAシンターゼ(PhaC<sub>Re</sub>)、シュードモナス・エスピー-61-3由来のPHAシンターゼ(PhaC1<sub>Ps</sub>)及びエロモナス・キャビエ由来のPHAシンターゼ(PhaC<sub>Ac</sub>))をそれぞれ導

入したラルストニア・ユートロファPHB-4(PHA陰性突然変異体)を用いたPHA生産を検討した。

- [0071] phaC<sub>Re</sub>遺伝子を有する組換えラルストニア・ユートロファPHB-4は、20g/Lの5HVNa及び $\omega$ -PDLから最も多い量の3HP単位(18mol%及び5mol%)並びに5HV単位(6mol%及び8mol%)を有するコポリマーを生産した(表2)。PhaC<sub>Re</sub>は、様々なモノマー組成を有するP(3HB-co-4HB)を産生できることが知られている。本結果は、PhaC<sub>Re</sub>が4HBだけでなく5HVも認識できることを示し、PhaC<sub>Re</sub>が様々な主鎖長のモノマーに対して幅広い基質特異性を有することを示している(Saito, Y.; Doi, Y., International Journal of Biological Macromolecules 1994, 16, 99-104.)。このように、PhaC<sub>Re</sub>は、5HV-CoAの高い取り込み能を有する突然変異体の作製において良好なリード酵素である。
- [0072] さらに、phaC<sub>Re</sub>遺伝子を有する組換えラルストニア・ユートロファPHB-4の培養において、MS培地中の炭素源濃度を、表3に示すように10~100g/Lの範囲で変化させた。

[表3]

ラルストニア・ユートロファ由来の PHA シンターゼ遺伝子を有するラルストニア・ユートロファ PHB-4 による 5-ヒドロキシ吉草酸ナトリウム及び  $\omega$ -ペンタデカラクトンからの PHA 生合成<sup>a</sup>

サンプル 番号	炭素源 (g/L)	DCW (mg)	ポリマー含量 (wt%)	モノマー組成 (mol%) <sup>b</sup>			分子量 <sup>c</sup>		
				3HB	3HP	5HV	M <sub>w</sub> ( $\times 10^3$ )	M <sub>n</sub> ( $\times 10^3$ )	M <sub>w</sub> /M <sub>n</sub>
5HVNa									
9	10	470 $\pm$ 15	26 $\pm$ 4	76	18	6	89	40	2.2
10	20	414 $\pm$ 18	42 $\pm$ 14	77	18	5	76	36	2.1
11	30	260 $\pm$ 8	15 $\pm$ 2	71	23	6	63	27	2.3
12	50	247 $\pm$ 5	微量	51	17	32	41	12	3.4
	80	微量	n.d.						
$\omega$ -PDL									
13	10	257 $\pm$ 26	10 $\pm$ 3	86	4	9	168	72	2.3
14	20	287 $\pm$ 54	10 $\pm$ 3	85	5	10	139	53	2.6
15	30	244 $\pm$ 58	12 $\pm$ 0	85	5	10	140	53	2.6
16	50	316 $\pm$ 8	13 $\pm$ 5	84	5	11	142	55	2.6
17	80	220 $\pm$ 33	6 $\pm$ 3	84	5	11	116	41	2.9
	100	微量	n.d.						

<sup>a</sup>: pBBRMCS2C<sub>Re</sub> を有する細胞を、唯一の炭素源として様々な濃度の 5HVNa 又は  $\omega$ -PDL を含有する MS 培地において 30°C で 48 時間培養した。

<sup>b</sup>: モノマー組成は、<sup>1</sup>H-NMR 分析により決定した。

3HP: 3-ヒドロキシプロピオネート; 3HB: 3-ヒドロキシブチレート; 5HV: 5-ヒドロキシバレレート。

<sup>c</sup>: M<sub>w</sub>: 重量平均分子量; M<sub>n</sub>: 数平均分子量; M<sub>w</sub>/M<sub>n</sub>: 多分散性。

[0073] 5HVNa を 10~50g/L の濃度で炭素源として使用した場合には、ポリマー中の 5HV が培地中の 5HVNa と共に増加した (5~32mol%)。しかしながら、 $\omega$ -PDL の濃度と共にモノマー組成は有意に変化しなかった。 $\omega$ -PDL は、培地に溶解させるのが困難であった。このように、様々な濃度の  $\omega$ -PDL により PHA 組成が変化しなかったことは、 $\omega$ -PDL の低溶解性に起因すると考えられる。

[0074] 生産されたポリマーは、3HP (C3) 及び 5HV (C5) 単位等の奇数炭素原子のモノマー単位を有していた。これらの結果は、アシル-CoA 単位が毎回の  $\beta$  酸化サイクルにおいて 2 炭素原子短縮するので、3HP 及び 5HV-CoA が主としてラルストニア・ユートロファにおいて 5HVNa (C5) 及び  $\omega$ -PDL (C15) から  $\beta$  酸化サイクルを介して供給されることを示していた (図 1)。さらに、アセチル-CoA (C2) は、毎回の  $\beta$  酸化サイクルにおいて付随して形成され、次いで 3HB-CoA がアセチ

ル-CoAから $\beta$ -ケトチオラーゼ及びNADPH依存性アセトアセチル-CoAレダクターゼにより合成される。3HB単位は本実施例で生産されるポリマーの主成分であり、 $\beta$ 酸化経路はラルストニア・ユートロファにおいて活性であることを示唆する。従って、 $\beta$ 酸化経路の阻害により、次のステップで5HV単位の含量が増加するであろう。

[0075] <生産されたポリマーのNMR分析>

図2 Aは、 $\text{CDCl}_3$ 中でのポリマー(表3中のサンプル番号10)の典型的な $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを示す。この結果から、当該ポリマーが3HB及び3HP単位の典型的なピークを有していることが明らかになった。他のピークは、P(3HB-co-3HV-co-5HV)コポリマーにおける5HV単位からのピークに割り当てられた(Doi, Y.; Tamaki, A.; Kunioka, M.; Soga, K., *Makromol. Chem., Rapid Commun* 1987, 8, 631-635.)。

[0076] 表3中のサンプル番号10の $^{13}\text{C-NMR}$ 分析は、3HB、3HP及び5HV単位の典型的なピークを示した(図2 B)。168.5~172.5 ppmのカルボニル共鳴は、3HB、3HP及び5HV単位から成る様々なダイアドシーケンスから生じる複雑なピークを示した。169.1 ppm、169.8 ppm及び169.6 ppmのピークは3HB\*3HB、3HP\*3HP及び3HB\*3HP/3HP\*3HBシーケンスからのカルボニル共鳴に一致し、これらはP(3HB-co-3HP)コポリマーにおいて既に観察されているピークである(Nakamura, S.; Kunioka, M.; Doi, Y., *Journal of Macromolecular Science-Chemistry* 1991, A28, 15-24.)。他のピークは、169.2 ppm、170.0 ppm、170.2 ppm及び172.3 ppmに出現し、3HB及び3HP単位が5HV単位に結合していることを示す。169.2 ppmのピークは、5mol%の3HP及び10mol%の5HVを有するポリマー(表3中のサンプル番号14)を測定した場合に増加するので、3HB\*5HV/5HV\*3HBシーケンスとして同定した。次に、170.0 ppm及び170.2 ppmのピークは、3HP\*5HV/5HV\*3HPシーケンスに由来するものであると推定された。最後に、5HV単位の $\alpha$ 炭素からのピークが分割された(172.3 ppm)。低モル画分の5HV単位から成るコポリマーにおいては、多量のダイアドシーケンス5HV\*3HBが存在するであろう。従って、5HV単位からの主なピークは、5HV\*3HBシーケンスに割り



当てられた。また、3HPは当該コポリマーの二次的な成分であるので、小さい方のピークは5HV\*3HPシーケンスであると推定された。

[0077]  $^{13}\text{C}$ -NMR分析は、コポリマーにおける5HV\*3HB/3HB\*5HV及び5HV\*3HP/3HP\*5HVダイアドシーケンスのピークを明確に示した。従って、本願において、PhaC<sub>Re</sub>が5HV-CoAの逐次的な重合能を本質的に備えていることが初めて示された。

[0078] <P(3HB-co-3HP-co-5HV)コポリマーの分子量及び熱特性>

生産されたP(3HB-co-3HP-co-5HV)の分子量を、上記表3に要約する。3HP及び5HV画分が多くなるほど、ポリマーの分子量は小さくなる傾向にあった(41000~168000)。この結果は、ポリマー鎖への3HP及び5HV単位の取り込みにより分子量が低減することを示唆した。

[0079] 図3は、P(3HB)、P(3HP)、P(5HV)及びP(3HB-co-3HP-co-5HV)のDSCトレースを示す。P(3HB)、P(3HP)及びP(5HV)ホモポリマーの融解温度( $T_m$ )は、それぞれ173°C、67°C及び55°Cであった。P(3HB-co-3HP-co-5HV)コポリマーの $T_m$ 値は、P(3HB)ホモポリマーと比較すると、3HP及び5HV単位の含量と共に低下した。さらに、生産されたP(3HB-co-5 mol% 3HP-co-10 mol% 5HV)を測定した場合には、3つの小さなピークが検出された。これらの結果は、当該コポリマーが様々な組成と共に幾つかのクリスタリットから構成されることを示す。

[0080] P(3HB-co-3HP-co-5HV)の融解( $\Delta H_m$ )値のエンタルピーがホモポリマーのものと比較して低く、例えばP(94 mol% 3HB-co-5 mol% 3HP-co-1 mol% 5HV)及びP(85 mol% 3HB-co-5 mol% 3HP-co-10 mol% 5HV)の融解( $\Delta H_m$ )値がそれぞれ43J/g及び2J/gであり、一方、P(3HB)及びP(3HP)の融解( $\Delta H_m$ )値がそれぞれ70J/g及び60J/gであった。このことは、当該コポリマーの結晶度が3HP及び5HV画分と共に低下することを示唆する。これらの結果は、P(3HB-co-3HP-co-5HV)コポリマーの結晶化が3HB、3HP及び5HV単位の共重合により阻害されることを示していた。

[0081] <P(3HB-co-3HP-co-5HV)コポリマーの機械的特性>

各P(3HB-co-3HP-co-5HV)コポリマーについての機械的特性の試験結果を表4に示す。表4における各機械的特性データの値は、3回の測定値の平均値と

標準偏差である。

[表4]

様々なモノマー組成を有する P(3HB-co-3HP-co-5HV)の機械的特性

ポリマー	ヤング率 (MPa)	引張強さ (MPa)	破断点伸度 (%)
P(3HB-co-18 mol% 3HP-co-5 mol% 5HV)	1600 ± 170	29 ± 13	37 ± 17
P(3HB-co-5 mol% 3HP-co-10 mol% 5HV)	970 ± 290	12 ± 7	37 ± 4
P(3HB-co-9 mol% 3HP-co-14 mol% 5HV)	1400 ± 170	14 ± 7	15 ± 3

[0082] 表4において、P(3HB-co-18 mol% 3HP-co-5 mol% 5HV)及びP(3HB-co-5 mol% 3HP-co-10 mol% 5HV)は、それぞれ表3に示すサンプル番号10及び14であった。また、P(3HB-co-9 mol% 3HP-co-14 mol% 5HV)は表6に示すサンプル番号30又は31であった。

[0083] 表4に示すように、5HV及び3HP組成の増加に伴い、柔軟な性質を示した。フィルムとしての機械的特性としては、P(3HB-co-18 mol% 3HP-co-5 mol% 5HV)が比較的強さと柔軟さを兼ね備えた材料であった。

[0084] <P(3HB-co-3HP-co-5HV)フィルムのin vitro酵素分解>

図4は、ブタ膵臓由来のリパーゼを用いた、P(3HB)、P(3HP)、P(5HV)及びP(3HB-co-3HP-co-5HV)フィルムの重量損失プロフィールを示す。

[0085] 図4(A)に示すように、P(3HB)、P(3HP)及びP(3HB-co-5 mol% 3HP-co-1 mol% 5HV)がリパーゼによって侵食されなかったが、P(5HV)、P(3HB-co-5 mol% 3HP-co-10 mol% 5HV)、P(3HB-co-18 mol% 3HP-co-5 mol% 5HV)及びP(3HB-co-23 mol% 3HP-co-6 mol% 5HV)が侵食されたことが興味深かった。また、P(3HB-co-3HP-co-5HV)フィルムの侵食率は、P(5HV)フィルムとほぼ同じであった。

[0086] 図4(B)に示すように、リパーゼ分解性が知られているP(98mol%4HB-co-3HB)及びP(5HV)は優れた分解性を示した。本研究で合成したP(3HB-co-5 mol% 3HP-co-10 mol% 5HV)も同様に優れた分解性を示した。5HVを含む他の共重合体についても、リパーゼ分解性を示し、P(3HB)及びP(3HP)とは異なる性質を示した。

[0087] これらの結果は、5HV単位がリパーゼにより消化され、5HV単位がP(3HB-co-

3HP)コポリマーのリパーゼ分解性改善のための有望なモノマーであることを示している。

[0088] 様々な側鎖長単位を有するPHAは、PHAデポリメラーゼにより効率的に消化されるが、4HB単位を含むPHAを除いて、それらの多くはリパーゼにより消化することができない。従って、P(3HB-co-3HP-co-5HV)は、細胞内リパーゼによる分解に感受性の新規なPHA型である。P(3HB-co-3HP-co-5HV)の*in vivo*生分解性は、P(3HB)、P(3HP)及びP(5HV)と比較して増強されることが期待される。

[0089] <P(3HB-co-3HP-co-5HV)フィルム上での細胞増殖>

PHAフィルム上でのhMSCの細胞生存能を、MTSアッセイを用いて評価した(図5)。細胞生存能100%を、陽性対照として細胞培養プレート上に播種した細胞培養物(48時間インキュベーション後)から算出した。hMSCの細胞生存能は、P(3HB)、P(3HP)、P(5HV)及びP(3HB-co-3HP-co-5HV)フィルムを用いた場合に、ほぼ同じであった(約110%)。P(3HB-co-5 mol% 3HP-co-1 mol% 5HV)フィルムを用いた場合には、他のフィルムと比較してhMSCの細胞生存能がわずかに増加した(127%)。これらの結果は、生産されたP(3HB-co-3HP-co-5HV)が、医学的用途に十分な高い生体適合性を示すP(3HB)と同じか又はより高いレベルの生体適合性を有することを示している。

[0090] <ラルストニア・ユートロファ由来のPHAシターゼ(PhaC<sub>Re</sub>)の突然変異体を有するラルストニア・ユートロファPHB-4による $\omega$ -PDLからのPHA生合成>

ラルストニア・ユートロファ由来のPHAシターゼ(PhaC<sub>Re</sub>)の突然変異体を有するラルストニア・ユートロファPHB-4による $\omega$ -PDLからのPHA生合成の結果を表5及び6に示す。表5及び6は、同様の実験を行った結果である。

[0091] 表5及び6において、各PhaC<sub>Re</sub>突然変異体は、以下の通りであった：

M-22(V470M)：野生型(アミノ酸配列：配列番号2)の470番目のアミノ酸においてバリンからメチオニンへの置換を有する突然変異体；

E-11/S12-1(F420S)：野生型(アミノ酸配列：配列番号2)の420番目のアミノ酸においてフェニルアラニンからセリンへの置換を有する突然変異体；

2-12(L358P) : 野生型(アミノ酸配列 : 配列番号 2)の358番目のアミノ酸においてロイシンからプロリンへの置換を有する突然変異体 ;

1-14(S174P) : 野生型(アミノ酸配列 : 配列番号 2)の174番目のアミノ酸においてセリンからプロリンへの置換を有する突然変異体 ;

E-11/S12(S80P/F420S) : 野生型(アミノ酸配列 : 配列番号 2)の80番目のアミノ酸においてセリンからプロリン及び420番目のアミノ酸においてフェニルアラニンからセリンへの置換を有する突然変異体 ;

B-1(N519S) : 野生型(アミノ酸配列 : 配列番号 2)の519番目のアミノ酸においてアスパラギンからセリンへの置換を有する突然変異体 ;

E-11(S80P) : 野生型(アミノ酸配列 : 配列番号 2)の80番目のアミノ酸においてセリンからプロリンへの置換を有する突然変異体 ;

B-7(S35P) : 野生型(アミノ酸配列 : 配列番号 2)の35番目のアミノ酸においてセリンからプロリンへの置換を有する突然変異体 ; 並びに、

1-11(N426S) : 野生型(アミノ酸配列 : 配列番号 2)の426番目のアミノ酸においてアスパラギンからセリンへの置換を有する突然変異体。

[表5]

ラルストニア・ユートロファ由来の PHA シンターゼの突然変異体を有するラルストニア・ユートロファ PHB-4 による  $\omega$ -PDL からの PHA 生合成

サンプル 番号	炭素源 (g/100 mL)	PhaC <sub>Re</sub> 突然変異体	乾燥細胞 重量 (mg)	ポリマー 含量 (wt%)	モノマー組成 (mol%)		
					3HB	3HP	5HV
18	$\omega$ -PDL 2g	野生型	287±54	10±3	85	5	10
19		M-22 (V470M) <sup>2)</sup>	297	11	71	9	21
20		E-11/S12-1 (F420S) <sup>1)</sup>	274	7	76	7	16
21		2-12 (L358P) <sup>2)</sup>	477	26	76	8	16
22		1-14 (S174P) <sup>2)</sup>	224	5	73	7	20
23		E-11/S12 (S80P/F420S) <sup>1)</sup>	245	7	76	8	16
24		B-1 (N519S) <sup>2)</sup>	242	3	71	8	21
25		E-11 (S80P) <sup>2)</sup>	237	7		NT	
26		B-7 (S35P) <sup>2)</sup>	315	11±5	78	9	13
27		1-11 (N426S) <sup>2)</sup>	235	4±1	71	7	22

NT: 試験せず

参考論文:

<sup>1)</sup>In vitro evolution of a polyhydroxybutyrate synthase by intragenic suppression-type mutagenesis. Taguchi S, Nakamura H, Hiraishi T, Yamato I, Doi Y., J Biochem. (2002) 131, 801-806.

<sup>2)</sup>Analysis of mutational effects of a polyhydroxybutyrate (PHB) polymerase on bacterial PHB accumulation using an in vivo assay system. Taguchi S, Maehara A, Takase K, Nakahara M, Nakamura H, Doi Y., FEMS Microbiol Lett. (2001) 198, 65-71.

[表6]

サンプル 番号	PHA シンターゼ	DCW (mg)	ポリマー含量 (wt%)	モノマー組成 (mol%) <sup>a</sup>			分子量 <sup>b</sup>		
				3HB	3HP	5HV	M <sub>w</sub> (×10 <sup>3</sup> )	M <sub>n</sub> (×10 <sup>3</sup> )	M <sub>w</sub> /M <sub>n</sub>
28	野生型	287 ± 74	12 ± 2	85	5	10	139	53	2.6
29	1-14 (S174P)	216 ± 6	9 ± 5	73	7	20	117	80	1.5
30	M-22 (V470M)	357 ± 135	8 ± 2	77	9	14	82	50	1.7
31	B-1 (N519S)	259 ± 28	13 ± 10	77	9	14	114	73	1.6
32	E-11 (S80P)	264 ± 58	13 ± 12	78	8	14	143	82	1.7
33	1-11 (N426S)	321 ± 107	22 ± 12	80	7	13	115	78	1.5
34	2-12 (L358P)	317 ± 107	17 ± 9	82	8	10	128	80	1.6
35	E-11/S12 (S80P/F420S)	248 ± 6	22 ± 10	80	8	12	138	101	1.4
36	E-11/S12-1 (F420S)	336 ± 103	22 ± 10	82	8	10	115	72	1.6

3HP: 3-ヒドロキシプロピオネート; 3HB: 3-ヒドロキシブチレート; 5HV: 5-ヒドロキシバレレート。

pBBRMCS2C<sub>Re</sub>を有する細胞を、唯一の炭素源として 20g/L の ω-PDL を含有する MS 培地において 30°C で 48 時間培養した。

<sup>a</sup>: モノマー組成は、<sup>1</sup>H-NMR 分析により決定した。

<sup>b</sup>: M<sub>w</sub>: 重量平均分子量; M<sub>n</sub>: 数平均分子量; M<sub>w</sub>/M<sub>n</sub>: 多分散性。

[0092] 表5及び6に示すように、ラルストニア・ユートロファ由来のPHAシンターゼ(PhaC<sub>Re</sub>)の突然変異体を有するラルストニア・ユートロファPHB-4によるω-PDLからのPHA生合成により、20%以上の5HVユニットを有するPHAの合成に成功した。さらに、モノマーユニットとして5HVを有するにも関わらず、これまでに比べ高い生産性(ポリマー含量)を示した。

### [0093] 3. 結論

本実施例は、野生型又は組換えラルストニア・ユートロファによる5HVNa又はω-PDLからの3HP及び5HV単位を含む新規のPHA型の生産に成功したことを示す。P(3HB-co-3HP-co-5HV)の組成は、培地中の炭素源濃度を調節することにより制御できた。

[0094] また、生産されたコポリマーは低い細胞毒性と高いリパーゼ分解性を示した。P(3HB-co-3HP-co-5HV)の酵素分解性の増加は、当該コポリマー中への5HV単位の導入並びにそれらの結晶度の低下に起因している可能性がある。

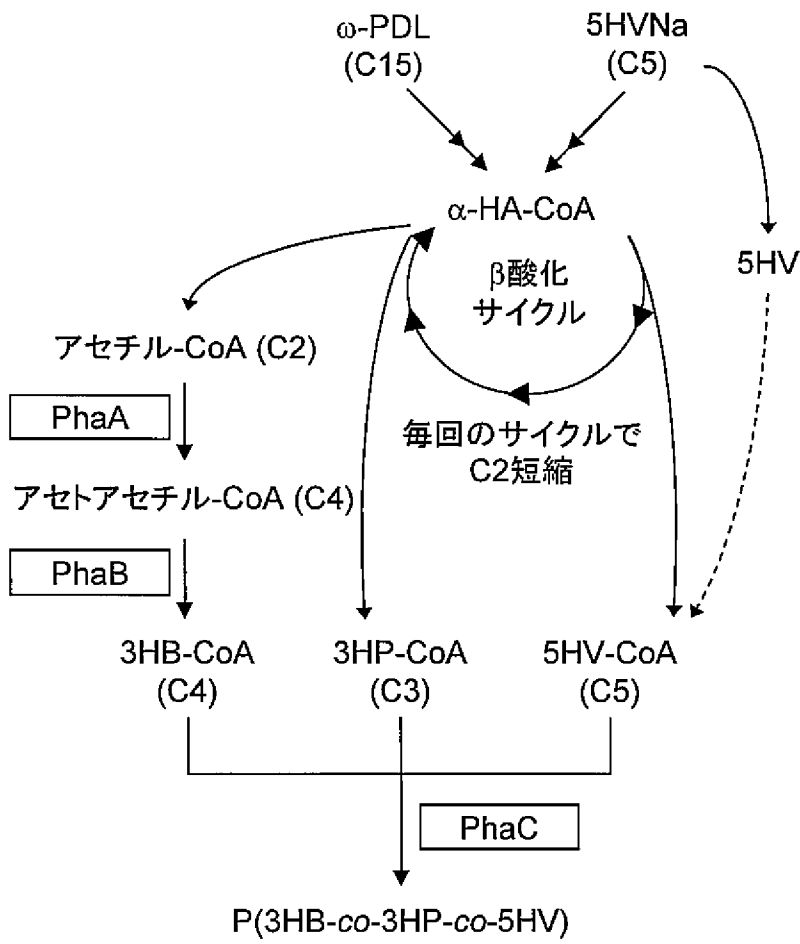
- [0095] さらに、本実施例は、5HV単位を有するPHAの酵素分解性と細胞毒性を初めて検討したものである。また、本実施例によれば、長主鎖単位を有するPHAが生体材料に有用である可能性が示された。
- [0096] 本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

## 請求の範囲

- [請求項1] 少なくとも5-ヒドロキシバレレート単位を含むポリヒドロキシアルカン酸の製造方法であって、ラルストニア(*Ralstonia*)属に属する微生物を、炭素源として、環を構成する炭素数が12以上のラクトン及び／又はヒドロキシ酸若しくはヒドロキシ酸塩を含有する培地において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2] ラルストニア属に属する微生物が、ポリヒドロキシアルカン酸合成酵素をコードする遺伝子が導入されたラルストニア・ユートロファ(*Ralstonia eutropha*)である、請求項1記載の方法。
- [請求項3] ポリヒドロキシアルカン酸合成酵素をコードする遺伝子が、以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードする遺伝子である、請求項2記載の方法。
- (a)配列番号2、4及び6のいずれか1つに示されるアミノ酸配列から成るタンパク質
- (b)(a)のタンパク質のアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列から成り、且つポリヒドロキシアルカン酸合成活性を有するタンパク質
- [請求項4] 前記ラクトンが $\omega$ -ペンタデカラクトンである、請求項1～3のいずれか1項記載の方法。
- [請求項5] ヒドロキシ酸塩が5-ヒドロキシ吉草酸塩である、請求項1～4のいずれか1項記載の方法。
- [請求項6] 前記ポリヒドロキシアルカン酸が3-ヒドロキシブチレート単位をさらに含む、請求項1～5のいずれか1項記載の方法。
- [請求項7] 前記ポリヒドロキシアルカン酸が10～35 mol%の5-ヒドロキシバレレート単位を有するポリヒドロキシアルカン酸コポリマーである、請求項1～6のいずれか1項記載の方法。

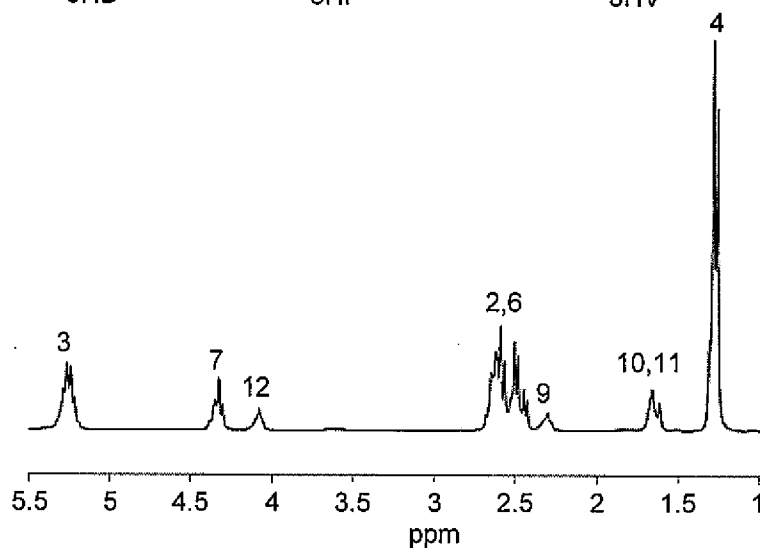
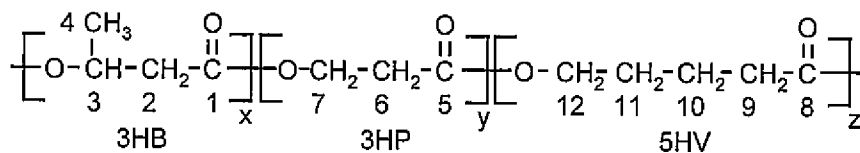


[図1]

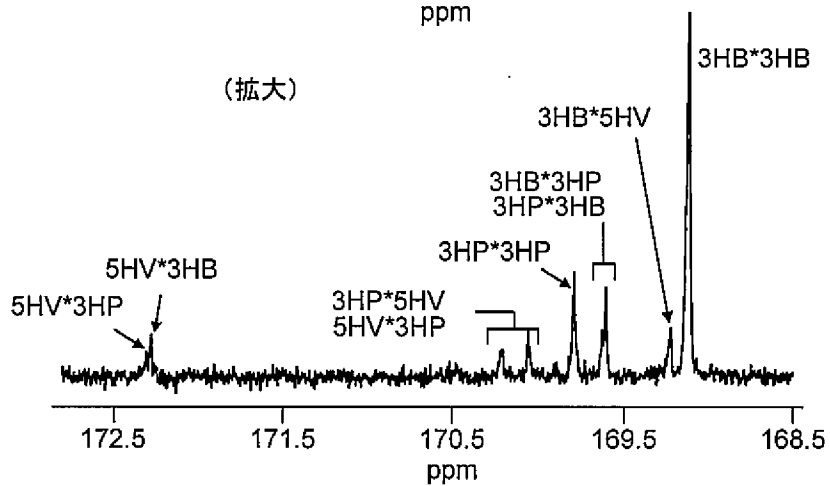
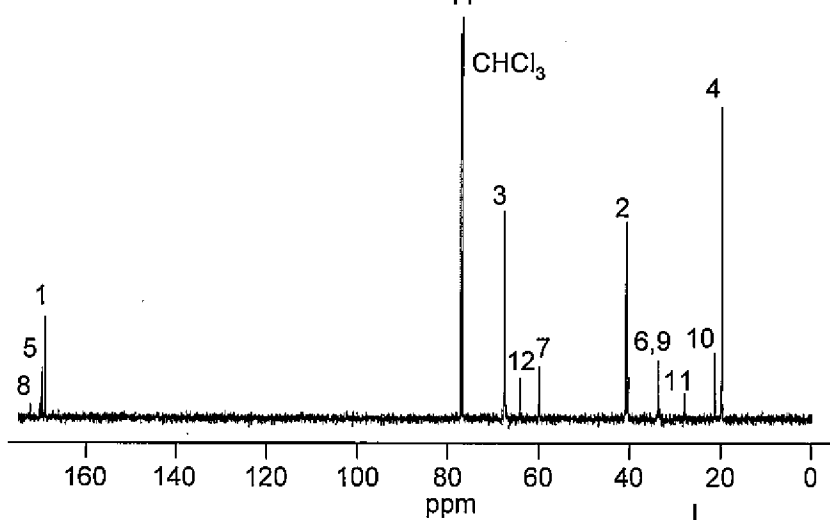


[図2]

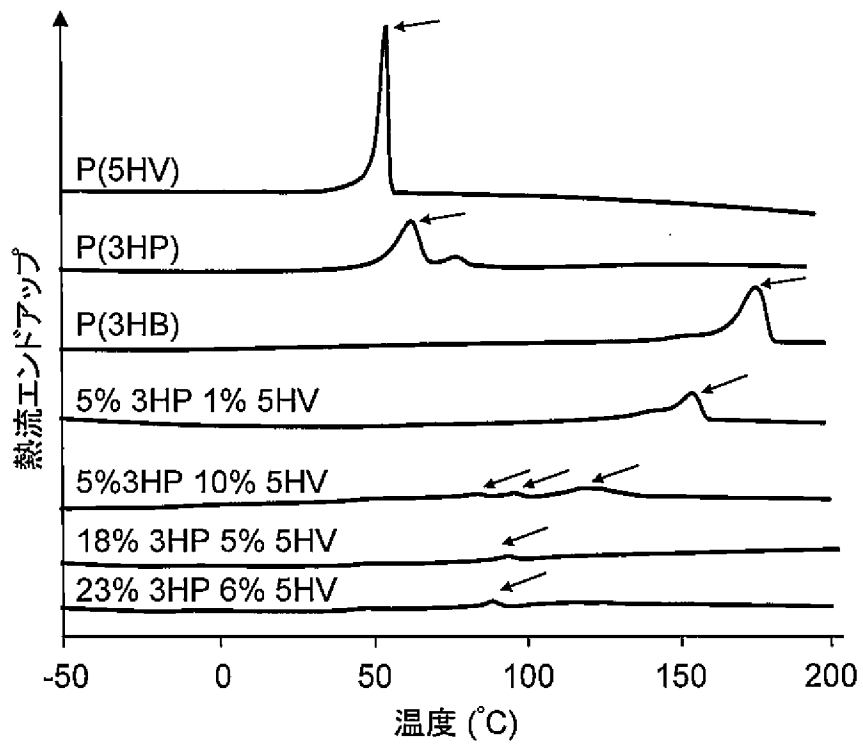
(A)



(B)

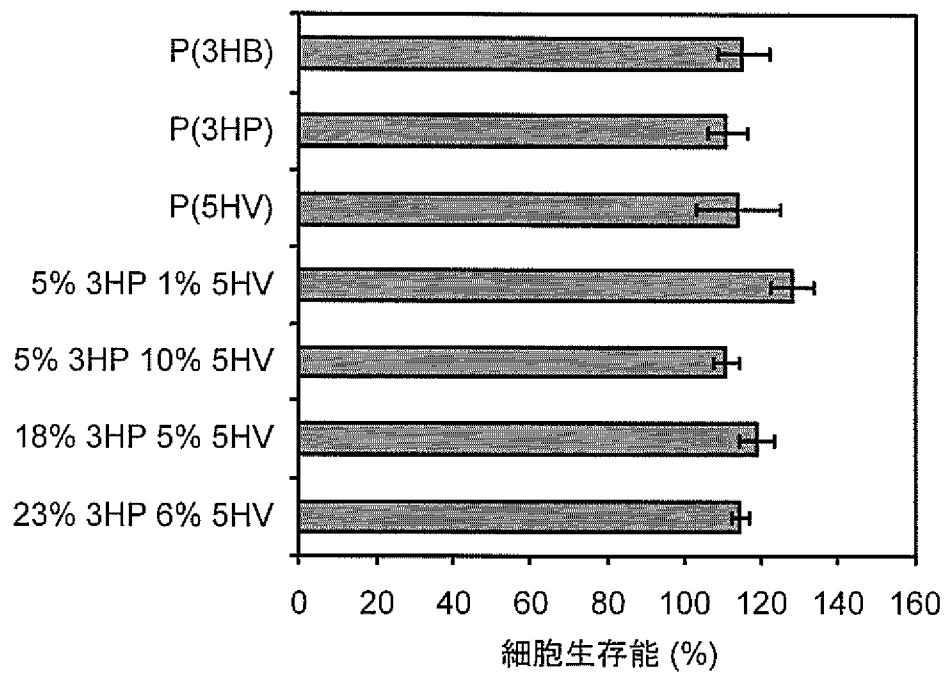


[図3]





[図5]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/060179

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P7/62(2006.01) i, C12N15/09(2006.01) i

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

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12P7/62, C12N15/09

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2012
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2012	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2012

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

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

## 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 2010/068953 A2 (METABOLIX INC.), 17 June 2010 (17.06.2010), & US 2010/0168481 A1 & EP 2376622 A2	1-3, 5-7/3, 4
Y	JP 2001-516574 A (Metabolix, Inc.), 02 October 2001 (02.10.2001), & US 6316262 B1 & EP 1015565 A2 & WO 1999/014313 A2	3, 4
Y	JP 2002-541759 A (LG Chemical Ltd.), 10 December 2002 (10.12.2002), & US 6649382 B1 & EP 1049784 A1 & WO 1999/036547 A1	3, 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

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
09 July, 2012 (09.07.12)Date of mailing of the international search report  
17 July, 2012 (17.07.12)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/060179

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CHOI, MH., et al., Biosynthesis and local sequence specific degradation of poly(3-hydroxyvalerate-co-4-hydroxybutyrate) in <i>Hydrogenophaga pseudoflava</i> . <i>Biomacromolecules</i> , 2003, Vol.4, p.38-45	3,4
Y	NOMURA, CT., et al., PHA synthase engineering toward superbicatalysts for custom-made biopolymers. <i>Appl. Microbiol. Biotechnol.</i> , 2007, Vol.73, p.969-979	3,4
Y	TAGUCHI, S., et al., Evolution of polyhydroxyalkanoate (PHA) production system by "enzyme evolution": successful case studies of directed evolution. <i>Macromol. Biosci.</i> , 2004, Vol.4, p.146-156	3,4
Y	TAGUCHI, S., et al., Biosynthesis of biodegradable polyesters from renewable carbon sources by recombinant bacteria. <i>Polymer International</i> , 2002, Vol.51, p.899-906	3,4
X	DOI, Y., et al., Biosynthesis of terpolyesters of 3-hydroxybutyrate, 3-hydroxyvalerate, and 5-hydroxyvalerate in <i>alcaligenes eutrophus</i> from 5-chloropentanoic and pentanoic acids. <i>Makromol. Chem., Rapid Commun.</i> , 1987, Vol.8, p.631-635	1,5-7
X	Miwa YAMADA et al., "Choshusa Monomer Unit o Yusuru Bio Plastic Polyhydroxyalkanoate no Biseibutsu Gosei", <i>Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry 2011 Nendo Taikai Koen Yoshishu</i> , 2011, page 3(2C01p07)	1,5-7
P,X	Miwa YAMADA et al., "Choshusa Monomer Unit o Yusuru Polyhydroxyalkanoate no Biseibutsu Gosei", <i>Polymer Preprints, Japan</i> , 13 September 2011 (13.09.2011), vol.60, no.2, pages 5245 to 5246	1-7

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
 Int.Cl. C12P7/62(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i

B. 調査を行った分野  
 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))  
 Int.Cl. C12P7/62, C12N15/09

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 1971-2012年  
 日本国実用新案登録公報 1996-2012年  
 日本国登録実用新案公報 1994-2012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)  
 CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

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 / Y	WO 2010/068953 A2 (METABOLIX INC.) 2010.06.17, & US 2010/0168481 A1 & EP 2376622 A2	1-3, 5-7 / 3, 4
Y	JP 2001-516574 A (メタボリックス, インコーポレイテッド) 2001.10.02, & US 6316262 B1 & EP 1015565 A2 & WO 1999/014313 A2	3, 4
Y	JP 2002-541759 A (エルジ ケミカル リミテッド) 2002.12.10, & US 6649382 B1 & EP 1049784 A1 & WO 1999/036547 A1	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日の後に公表された文献  
 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 09.07.2012	国際調査報告の発送日 17.07.2012
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 小川 明日香 電話番号 03-3581-1101 内線 3448



C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	CHOI, MH., et al., Biosynthesis and local sequence specific degradation of poly(3-hydroxyvalerate-co-4-hydroxybutyrate) in Hydrogenophaga pseudoflava. Biomacromolecules, 2003, Vol.4, p.38-45	3, 4
Y	NOMURA, CT., et al., PHA synthase engineering toward superbio-catalysts for custom-made biopolymers. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2007, Vol.73, p.969-979	3, 4
Y	TAGUCHI, S., et al., Evolution of polyhydroxyalkanoate (PHA) production system by "enzyme evolution": successful case studies of directed evolution. Macromol. Biosci., 2004, Vol.4, p.146-156	3, 4
Y	TAGUCHI, S., et al., Biosynthesis of biodegradable polyesters from renewable carbon sources by recombinant bacteria. Polymer International, 2002, Vol.51, p.899-906	3, 4
X	DOI, Y., et al., Biosynthesis of terpolyesters of 3-hydroxybutyrate, 3-hydroxyvalerate, and 5-hydroxyvalerate in alcaligenes eutrophus from 5-chloropentanoic and pentanoic acids. Makromol. Chem., Rapid Commun., 1987, Vol.8, p.631-635	1, 5-7
X	山田 美和, 他, 長主鎖モノマーユニットを有するバイオプラスチックポリヒドロキシアルカン酸の微生物 合成, 日本農芸化学会 2011 年度大開講演要旨集, 2011, p.3(2C01p07)	1, 5-7
P, X	山田 美和, 他, 長主鎖モノマーユニットを有するポリヒドロキシアルカン酸の微生物合成, 高分子学会予稿集, 2011.09.13, Vol.60, No.2, p.5245-5246	1-7