

(19) 日本国特許庁 (JP)

## (12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-512648

(P2015-512648A)

(43) 公表日 平成27年4月30日 (2015. 4. 30)

(51) Int.Cl.		F I				テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N</b>	<b>1/21</b>	<b>(2006. 01)</b>	<b>C 1 2 N</b>	<b>1/21</b>	<b>Z N A</b>	<b>4 B O 2 4</b>
<b>C 1 2 P</b>	<b>7/62</b>	<b>(2006. 01)</b>	<b>C 1 2 P</b>	<b>7/62</b>		<b>4 B O 6 4</b>
<b>C 1 2 N</b>	<b>15/09</b>	<b>(2006. 01)</b>	<b>C 1 2 N</b>	<b>15/00</b>	<b>A</b>	<b>4 B O 6 5</b>

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 37 頁)

(21) 出願番号	特願2015-504961 (P2015-504961)	(71) 出願人	591081310
(86) (22) 出願日	平成25年4月11日 (2013. 4. 11)		ヘルムホルツ-ツェントラム フュア イ
(85) 翻訳文提出日	平成26年12月5日 (2014. 12. 5)		ンフェクツィオンスフォルシュング ゲー
(86) 国際出願番号	PCT/EP2013/057630		エムペーハー
(87) 国際公開番号	W02013/153180		ドイツ連邦共和国 3 8 1 2 4 ブラウン
(87) 国際公開日	平成25年10月17日 (2013. 10. 17)		シュヴァイク、 インホフェンシュトラ
(31) 優先権主張番号	12163787.0		セ 7
(32) 優先日	平成24年4月11日 (2012. 4. 11)	(74) 代理人	100082647
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 永井 義久
		(72) 発明者	アリアス, サグラリオ
			スペイン国 2 4 5 0 0 レオン ヴィラ
			フランカ デル ビエルツォ アヴェニ
			ーダ カルヴォ ソテロ 2 9

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 PHAを生産する遺伝子組み換え微生物

## (57) 【要約】

【課題】微生物における中鎖長または長鎖長のPHAの過剰生産に関与する遺伝情報が複製に際して安定的である遺伝子組み換え微生物を提供すること。

【解決手段】本発明は、自然にPHAを生産する微生物の遺伝子組み換え品種であって、ポリヒドロキシアルカノエート (PHA) シンターゼをコードする少なくとも1つの遺伝子を野生型微生物と比較して増加したコピー数で有し、過剰生産を評価するために参照する状態が15 mMオクタン酸ナトリウムを含有する改変MM培地である場合に、前記増加したコピー数が前記PHAシンターゼのバランスのとれた過剰生産を提供し、最終的には微生物に24時間後に野生型と比較して少なくとも1.2倍の量で中鎖長または長鎖長のPHAを過剰生産させる、微生物の遺伝子組み換え品種に関する。微生物におけるPHAの生産は、加えて、PHAの分解に関わるタンパク質をコードする遺伝子の不活性化によって有利に影響を受けることができ、PHA含有量における低下なしに本化合物の微生物の生産の増加さえも経時的にもたらす。本発明の微生物はPHAの商業用生産において有用である。本発明はPHAの生産のための方法にも関する。

【選択図】図1

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

自然に P H A を生産する微生物の遺伝子組み換え品種であって、前記微生物はポリヒドロキシアルカノエート ( P H A ) シンターゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子の野生型微生物と比較したコピー数が増加しており、過剰生産を評価するために参照する状態が 1 5 m M オクタン酸ナトリウムを含有する改変 M M 培地にある場合に、前記増加したコピー数が前記 P H A シンターゼのバランスのとれた過剰生産を提供し、遺伝子組み換えが微生物に 2 4 時間後に野生型と比較して少なくとも 1 . 2 倍の量で中鎖長または長鎖長の P H A を過剰生産させ、遺伝子組み換え微生物のベースを形成する微生物が P H A シンターゼをコードする遺伝子を保持する場合に、前記微生物が前記微生物における P H A の分解に関わるタンパク質をコードする少なくとも 1 つの遺伝子中に少なくとも 1 つの修飾を有し、修飾が P H A の分解に関わるタンパク質をコードする遺伝子の完全または部分的な不活性化、より好ましくは前記遺伝子の完全な不活性化を引き起こす、微生物の遺伝子組み換え品種。

10

## 【請求項 2】

前記遺伝子が P h a C 2 シンターゼまたはそのホモログをコードする、請求項 1 に記載の遺伝子組み換え微生物。

## 【請求項 3】

前記 P H A シンターゼの発現が、プロモーターシステム、好ましくはタンパク質ベース、より好ましくは T 7 ポリメラーゼ / T 7 ポリメラーゼプロモーターシステムによって調節される、請求項 1 または 2 に記載の遺伝子組み換え微生物。

20

## 【請求項 4】

前記 P H A の分解に関わるタンパク質が、P H A デポリメラーゼ、好ましくは p h a Z およびそのホモログである、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の遺伝子組み換え微生物。

## 【請求項 5】

前記遺伝子修飾が、好ましくは抗生物質の非存在または存在下の両者において、複製および / または培養に際して微生物中で保たれる、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の遺伝子組み換え微生物。

## 【請求項 6】

過剰生産を評価するために参照する状態が 1 5 m M オクタン酸ナトリウムを含有する改変 M M 培地である場合に、前記遺伝子操作が、2 4 時間後の野生型と比較して、好ましくは少なくとも 1 . 5 倍およびより好ましくは少なくとも 2 倍の量で中鎖ポリヒドロキシアルカノエート ( 類 ) P H A を微生物に過剰生産させる、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の遺伝子組み換え微生物。

30

## 【請求項 7】

前記微生物が、*Pseudomonas putida*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Pseudomonas syringae*、*Pseudomonas fluorescens*、*Pseudomonas acitophila*、*Pseudomonas olevarans*、*Idiomarina loihiensis*、*Alcanivorax borkumensis*、*Acinetobacter* 属の種、*Caulobacter crescentus*、*Alcaligenes eutrophus*、*Alcaligenes latus*、*Azotobacter vinlandii*、*Rhodococcus eutrophus*、*Chromobacterium violaceum* または *Chromatium vinosum*、好ましくは *Pseudomonas putida* 株、より好ましくは *Pseudomonas putida* U からなる群から選択される、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の遺伝子組み換え微生物。

40

## 【請求項 8】

前記微生物が、誘導剤分子の添加なしに P H A を生産することが可能である、請求項 1

50

～ 7 のいずれか一項に記載の遺伝子組み換え微生物。

【請求項 9】

前記微生物が、1 つだけの細胞間顆粒の形で P H A を生産することができる、請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の遺伝子組み換え微生物。

【請求項 10】

前記微生物が、オクタン酸ナトリウムを含有する改変 M M 培地への曝露に際して 2 4 時間後に P H A の最大の含有量を生産することが可能であり、好ましくは P H A 含有量を維持することも可能であり、それは少なくとも 4 8 時間の間で最大の P H A 含有量の重量で ± 2 0 % の範囲内である、請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の遺伝子組み換え微生物。

【請求項 11】

a . 請求項 1 ～ 10 のいずれか一項に記載の微生物を培養する工程と  
b . 培養培地から P H A を回収する工程と  
を含む、P H A を生産する方法。

【請求項 12】

前記方法が、微生物における P H A 過剰生産および / または P H A シンターゼの過剰生産を開始する誘導剤分子の添加ならびに / もしくは遺伝子修飾の損失を防止する抗生物質の添加を含まないかまたは要求しない、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記 P H A が、6 0 以下、好ましくは 2 0 ～ 4 0 の温度で、3 ～ 8 の炭素原子を有するケトン、好ましくはアセトンによる抽出によって回収される、請求項 11 または 12 に記載の方法。

【請求項 14】

中鎖長および / または長鎖長の P H A の過剰生産のための請求項 1 ～ 10 のいずれか一項に記載の微生物の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明はポリヒドロキシアルカノエート ( P H A ) の生合成の分野に関する。特に、本発明は、複製に際して安定的であり、P H A シンターゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子を野生型微生物と比較して増加したコピー数で有し、遺伝子操作が微生物に中鎖長または長鎖長の P H A を過剰生産させる、遺伝子組み換え微生物に関する。

【背景技術】

【0002】

P H A は、ポリマーのタイプに属し、工業および生物医学上の適用のために広範囲の再生可能資源から生産される生体分解性かつ生体適合性の可塑性材料 ( 3 - ヒドロキシ脂肪酸のポリエステル ) である ( W i l l i a m s & P e o p l e s , 1 9 9 6 , C h e m t e c h 2 6 : 3 8 - 4 4 ) 。 P H A は広範囲の細菌によって合成され、従来の石油化学ベースの可塑性物質を置き換えて、可塑性物質の廃棄物の有害作用から環境を保護するというそれらの潜在的な使用に起因して大規模に研究されてきた。

【0003】

P H A は側鎖の長さおよび生合成経路によって 2 つの群に分類することができる。短い側鎖 ( P H B 、 ( R ) - 3 - ヒドロキシ酪酸のホモポリマー等 ) を備えたものは結晶性熱可塑性物質であるが、より長い側鎖を備えた P H A はより弾性がある。前者は約 7 0 年間公知であり ( L e m o i g n e & R o u k h e l m a n , 1 9 2 5 , A n n D e s F e r m e n t a t i o n , 5 2 7 - 5 3 6 ) 、一方後者の材料は比較的最近見出された ( d e S m e t e t a l . , 1 9 8 3 , J . B a c t e r i o l . 1 5 4 : 8 7 0 - 7 8 ) 。しかしながらこの表記の前に、( R ) - 3 - ヒドロキシ酪酸単位および 5 ～ 1 6 の炭素原子を持つより長い側鎖の ( R ) - 3 - ヒドロキシ酸単位の両方を含有する微生物起源の P H A が同定されていた ( W a l l e n & R o w e d e r 1 9 7 5 , E n v i r o n . S c i . T e c h n o l . 8 : 5 7 6 - 7 9 ) 。 ( R ) - 3 - ヒドロキシ酪酸および

10

20

30

40

50

5 ~ 16 の炭素原子を含有する 1 つまたは複数の長い側鎖のヒドロキシ酸単位のコポリマーを生産する、多数の細菌が同定されていた (Steinbuechel & Wiese, 1992, Appl. Microbiol. Biotechnol. 37: 691 - 97; Valentin et al., 1992, Appl. Microbiol. Biotechnol. 36: 507 - 14; Valentin et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 1994, 40: 710 - 16; Abe et al., 1994, Int. J. Biol. Macromol. 16: 115 - 19; Lee et al., 1995, Appl. Microbiol. Biotechnol. 42: 901 - 09; Kato et al., 1996, Appl. Microbiol. Biotechnol. 45: 363 - 70; Valentin et al., 1996, Appl. Microbiol. Biotechnol. 46: 261 - 67; および米国特許第 4, 876, 331 号)。これらのコポリマーは、PHB-co-HX (式中、X は 6 以上の炭素原子の 3 - ヒドロキシアルカノエートまたは 3 - ヒドロキシアルケノエートである) と称することができる。特異的な 2 コンポーネントのコポリマーの有用な実例は、PHB-co-3-ヒドロキシヘキサノエート (PHB-co-3HH) である (Brandl et al., 1989, Int. J. Biol. Macromol. 11: 49 - 45; Amos & McInerney, 1991, Arch. Microbiol. 155: 103 - 06; 米国特許第 5, 292, 860 号)。

#### 【0004】

PHA は生物分解性の熱可塑性物質およびバイオポリマーのための再生可能資源としての潜在的な使用があるので大規模に研究されており (上記のように)、商業上開発され、市場で取引されるが (Hrabak, 1992, FEMS Microbiol. Rev. 103: 251 - 256)、それらの生産コストは、従来の石油化学製品ベースの可塑性物質のものよりもはるかに高い。このことは幅広い使用に対する主な障害である (Choi & Lee, 1997, Bioprocess Eng. 17: 335 - 342)。上述のように、多くの細菌が PHA を生産し、例えば、*Alcaligenes eutrophus*、*Alcaligenes latus*、*Azotobacter vinlandii*、*Pseudomonas acitophila*、*Pseudomonas oleovarians*、*Escherichia coli*、*Rhodococcus eutropha*、*Chromobacterium violaceum*、*Chromatium vinosum*、*Alcanivorax borcumensis* などである。すべてのこれらの PHA 生産細菌は細胞内 PHA を生産し PHA 顆粒中にそれを蓄積することが当技術分野において公知である (Steinbuechel, 1991, Biomaterials, pp. 123 - 213)。

#### 【0005】

主要な態様は、PHA 生産を高価にし、したがって石油化学ベースの可塑性物質と比較して不利にするものであり、高収率で材料を生産することおよび PHA が蓄積される細菌細胞内部から生産された PHA を回収することが困難である。PHA の全生産コストを低下させるために、効果的な回収プロセスの開発は、一般的には、i) 適切な溶媒、ii) PHA の次亜塩素酸塩抽出、および / または iii) 非 PHA 細胞物質の消化による細胞破壊 (Lee, 1996, Biotech, Bioeng. 49: 1 - 14) を、目標とすることが必須であると考えられた。

#### 【0006】

工業規模では、入手可能な微生物は今もなお比較的少量の PHA を提供し、それは経済的に非実現可能なこれらの微生物による PHA の生産をもたらす。例えば、*Pseudomonas putida* U の野生型細胞が、炭素源としてオクタン酸ナトリウム (15 mM) を含有する改変 MM 培地中で培養される場合、24.4% の PHA のみが最初の 24 時間の間に微生物中に蓄積した。当技術分野において公知の微生物ベースの PHA 生産のためのすべての方法は、生産の間の水ならびに加えて回収のための化学試薬および / または酵素を多量に要求し、それは生産コストの低下に対する障害である。したがって、

P H A 生産のための代替の戦略は緊急に必要とされる。

【 0 0 0 7 】

微生物による全体的な低い P H A 生産に加えて、培養の特定のステージで蓄積される P H A の量は下降し始める。この下降の理由は、微生物は食物貯蔵材料として P H A を生産し、それは環境の変化において速やかなエネルギー源および還元力として細菌に役立つという事実に由来し得る。すべての自由生活性微生物はいくつかの種類の炭素資源管理を可能な程度で実行する。多くの動植物は一般的には代謝要求に釣り合うように炭素取り込みを調節するが、大きく上下する炭素利用可能性へさらされる他の生物（特に日和見性の環境微生物）は、過剰な炭素を捕捉し、一方で消費および増殖ならびに他方で貯蔵ポリマーへの転換による保存を介して、その利用を管理することができる。細胞内貯蔵産物（およびある程度の細胞外貯蔵産物）の容易に代謝できるものとより不活性なものととの間の相互転換は、このメカニズムの中心である。炭素取り込みを調節する生物でさえ、炭素管理の微調整のためにかかる相互転換を活用してそれらの細胞代謝ネットワークおよび生物環境生理プロセスを最適化する。

10

【 0 0 0 8 】

上記のように、P H A は微生物界において広く活用される貯蔵産物である。微生物中に P H A として保存された炭素の利用を可能にするために、微生物が余剰の炭素源を必要とする場合、P H A をヒドロキシアルカノエート（すなわちモノマー）へ再変換できることが生物にとって極めて重要である。ポリマーの個々のモノマー単位へのこの再転換に関与するものは、P H A デポリメラーゼである。

20

【 0 0 0 9 】

微生物が P H A 生産および分解に関与する両方のタイプのタンパク質を含有するので、生物が生存および繁殖を確実にするための重要な課題は、P H A シンターゼおよび P H A デポリメラーゼの相対量（それはそれらの調節された生産によって決定される）の調節である（Uchino et al., 2007; Ren et al., 2009a; および de Eugenio et al., 2010a, 2010b）。しかしながらこれまでのところ、重合および脱重合のプロセスを制御する因子はよく理解されていない。例えば、Pseudomonas 株中の P H A デポリメラーゼを単にノックアウトしても P H A の改善された蓄積をもたらさなかった（Huisman et al., 1991; Solaiman et al., 2003）。したがって、P H A 脱重合に関与する遺伝子の単なるサイレンシングが微生物中の P H A 含有量を効果的に増加させるのには十分ではないことが分かる。

30

【 0 0 1 0 】

微生物中の P H A 生産を増加させる異なるアプローチは、微生物における P H A の生産に関与する P H A シンターゼを操作することであった。例えば、P H A 遺伝子の代謝操作は、中鎖長 P H A 生産のスケールアップのための良い戦略として見出された。従来の研究は、phaC1 の過剰発現によって Pseudomonas putida における P H A 収率を増加させることを試みた（Kraak et al., 1997; Prieto et al., 1999; Conte et al., 2006; Kim et al., 2006; Ren et al., 2009b）。しかしながら、これらの研究は、増殖のために重大でなく細胞中で有害な効果を与える場合、phaC 含有プラスミドが失われるという問題に遭遇した。結果として、修飾された微生物は複製に際して安定的でなく、P H A の過剰生産に関与する遺伝情報を失った。他の事例において、プロモーターの高誘導は必ずしも遺伝子産物の高活性を引き起こすとは限らないので、達成された P H A 蓄積は少なかった（Diederich et al., 1994; Ren et al., 2009）。

40

【 0 0 1 1 】

これらの試みが失敗した理由は、微生物中の P H A の生産、保存および分解に関わる様々なタンパク質において見出すことができる。大部分の微生物は 1 つ以上の P H A シンターゼを有しており、そのため 1 つのシンターゼの遺伝子コピーの数を増加させることは、

50

他の P H A シンターゼの生産に重要な代謝物質を微生物から枯渇させ、微生物における P H A 合成の緩やかな改善しかもたらさない。

#### 【 0 0 1 2 】

加えて、ファジンは微生物中の P H A 顆粒安定化において重要な役割を果たす。例えば、ファジンは、P H A 顆粒の数およびサイズを制御し ( G r a g e e t a l . , 1 9 9 9 )、細胞質と P H A 顆粒の疎水性コアとの間に中間相を生成し、したがって個々の顆粒が結合することを防止する ( S t e i n b u c h e l e t a l . , 1 9 9 5 ; Y o r k e t a l . , 2 0 0 2 )。ファジン P h a F およびいくつかの全体的な転写因子 ( C r c として ) が P h a C 活性の調節に重要であることも示唆された ( P r i e t o e t a l . , 1 9 9 9 b ; C a s t a n e d a e t a l . , 2 0 0 0 ; K e s s l e r & W i t h o l t , 2 0 0 1 ; H o f f m a n n & R e h m , 2 0 0 5 ; R e n e t a l . , 2 0 1 0 )。P . p u t i d a K T 2 4 4 0 における最近の研究 ( G a l a n e t a l . , 2 0 1 1 ) は、P h a F が顆粒分離において重要な役割を果たし、さらにこのファジンの欠如はこれらの封入体の集塊を細胞質中で引き起こすことを実証した。

10

#### 【 0 0 1 3 】

したがって、微生物を P H A を有意な程度で過剰生産するように修飾し、一方同時に、過剰生産を導く修飾が微生物の複製に際して安定的であり、P H A の微生物の取り扱いに関わるタンパク質が、所望される結果が過剰補償されるほど著しく影響を与えられないことを確実にすることは、かなりの難題である。加えて、これまで取り組んだ大部分のアプローチでは、P H A 蓄積がピークである正確な時点を見出すことおよび P H A 分解が始まる前に P H A を回収することは困難であった。

20

#### 【 0 0 1 4 】

1 つのアプローチ ( この点に関してある程度まで成功を収めている ) は W O 2 0 0 7 / 0 1 7 2 7 0 A 1 中で記載され、そこでは、A l c a n i v o r a x b o r c u m e n s i s は t e s B 様の遺伝子をサイレンシングさせることによって修飾された。この遺伝子は、チオエステラーゼ ( それは ( R ) - 3 - O H - アシル C o A 中間体に対応する酸へ転換する ) をコードする。これは、微生物で P H A 合成のために重大な中間体を枯渇させる重要な副反応である。このアプローチがある程度まで成功を収めていることは P H A のより高い蓄積が達成されたという点で証明されているが、修飾された微生物が P H A の工業規模生産での成功した実施を可能にするのに要求される安定性を有するかどうかは今のところ不明である。

30

#### 【 0 0 1 5 】

別のアプローチは、P . p u t i d a K C T C 1 6 3 9 において p h a C 1 および p h a C 2 などの P H A シンターゼを過剰発現することであり、それは K i m e t a l . ( 2 0 0 6 , B i o t e c h n o l . P r o g . 2 2 : 1 5 4 1 - 1 5 4 6 ) によって記載されている。この調査において、p h a C 1 および p h a C 2 の遺伝子の追加のコピーはプラスミドを介して微生物の中へ導入され、そこで遺伝子はプロモーターの制御下になかった。修飾された微生物における P H A シンターゼ活性が野生型の活性の 1 . 6 倍を超えることを K i m e t a l . は記載する。p h a C 1 を過剰発現する微生物の場合には、P H A 生産の増加 ( 約 0 . 8 g / l まで ) を観察することができたが、p h a C 2 を過剰発現する微生物は野生型を超える P H A 生産の増加を示さなかった。この観察は恐らく p h a C 2 シンターゼの非活性形態の形成のためである。

40

#### 【 0 0 1 6 】

なおさらなるアプローチは、微生物の中への P H A シンターゼ遺伝子 ( それは野生型形態においては P H A を生産しない ) を挿入するものである。例えば、W O 9 9 / 1 4 3 1 3、D E 4 4 1 7 1 6 9 A 1 または Q i e t a l . ( 1 9 9 7 , F E M S M i c r o b i o l , L e t t . 1 5 7 : 1 5 5 - 1 6 2 ) は、大腸菌 ( E . c o l i ) の中への P H A シンターゼ遺伝子の導入を記載する。しかしながら、これらの操作された微生物において、生産された P H A の収率は非常に低く、P H A の工業生産に適さなかった。

50

## 【0017】

最終的に、Cai et al. (2009, Biores. Technol. 100: 2265 - 2270) は、P. putida KT2442 中の PHA デポリメラーゼ遺伝子のノックアウトによる PHA の生産促進を報告した。この研究において、微生物が高炭素源濃度 (12 g/l) の存在下において培養される場合、PHA 生産の増加を観察することができた。

## 【0018】

これらの進歩にもかかわらず、PHA の増加した過剰生産を有し、同時にこの目的のために挿入された遺伝情報を失わないという点で複製に際して安定的である、遺伝子組み換え微生物についての必要性が依然として存在する。本出願はこの必要性を検討する。

10

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0019】

本出願の1つの目的は、微生物における中鎖長または長鎖長の PHA の過剰生産に関与する遺伝情報が複製に際して安定的である遺伝子組み換え微生物を提供することである。本発明の別の目的は、PHA の下降が培養培地への特定の曝露時間後に回避され、同時に PHA 蓄積のパーセンテージが増加するように、微生物を修飾することである。本出願のさらに別の目的は、一旦 PHA が蓄積されたならば、有意な PHA 分解が防止されるように微生物を修飾することである。

## 【課題を解決するための手段】

20

## 【0020】

本発明は、PHA シンターゼをコードする少なくとも1つの遺伝子を野生型微生物と比較して増加したコピー数で有するように PHA 生産微生物を修飾することによって、これらの目的は達成することができるという所見に基づく。好ましくは、追加のコピー中に存在する遺伝子は phaC2 またはそのホモログをコードする。野生型微生物とは、この用語が本出願中で使用されるとき、天然に存在するときの微生物の典型的な形態を意味する。好ましくは、野生型微生物は、その本来の形態において PHA シンターゼをコードする少なくとも1つの遺伝子を含む。

## 【0021】

「ホモログ」という用語は、本出願の実践において、実質的に同じ機能のタンパク質またはペプチドであるが異なり、けれども親ペプチドに類似する構造および配列のものとして定義される。本出願の文脈中で、「パーセント相同性」および「配列類似性」という用語は互換的に使用される。本出願の実践において、ホモログは、少なくとも40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90% および最も好ましくは少なくとも95%の親ペプチドに対する配列同一性を有することが好ましい。2つの配列の比較のために使用される数学アルゴリズムの好ましい非限定例は、Karlin et al. (1993, PNAS 90: 5873 - 5877) のアルゴリズムである。かかるアルゴリズムは NBLAST プログラムの中へ取り込まれ、それを使用して、本発明の核酸配列に対して所望される同一性を有する配列を同定することができる。

30

## 【0022】

したがって、本出願の主要な1つの態様は、自然に PHA を生産する微生物の遺伝子組み換え品種であって、PHA シンターゼをコードする少なくとも1つの遺伝子を野生型微生物と比較して増加したコピー数で有し、過剰生産を評価するために参照する状態が 15 mM オクタン酸ナトリウムを含有する改変 MM 培地である場合に、前記増加したコピー数が前記 PHA シンターゼのバランスのとれた過剰生産を提供し、最終的には微生物に 24 時間後に野生型と比較して少なくとも1.2 倍の量で中鎖長または長鎖長の PHA を過剰生産させる、微生物の遺伝子組み換え品種である。好ましい実施形態において、遺伝子組み換え微生物は複製に際して安定的であり、好ましくは PHA シンターゼをコードする少なくとも1つの遺伝子を野生型微生物と比較して1コピー追加で有する。

40

## 【0023】

50

これらの遺伝的に修飾された微生物は、植物油脂に由来する脂肪酸を含む安価で容易に入手可能な原料からの極めてコスト効率の良いP H Aの生産を可能にすることが予想外に見出された。本発明の微生物は、わずか24時間後でさえにいくつかの事例において、高いP H Aピーク濃度（それは培養条件に依存して到達される）を提供することが観察された。さらに本発明の微生物は、高い遺伝学的安定性、および微生物中での個々のP H A顆粒の融合による1つだけのP H A顆粒の形成を示す。塩素系溶剤による抽出に同等の収率を持つ非塩素系溶剤（アセトン等）によりそれらを抽出することができるので、これは微生物からのP H Aの回収を大幅に単純化する。

【0024】

「遺伝子組み換え」（または遺伝的に修飾された）という用語は、本発明の微生物、その遺伝子（複数可）および／または遺伝子産物（複数可）（ポリペプチド）の人為的マニピュレーションを意味する。

10

【0025】

好ましくは、本発明の微生物は複製に際して安定的である。「複製に際して安定的」（この用語は本出願の実践において理解されるべきである）とは、生物が複数（例えば5以上等）の複製サイクルに際して遺伝情報を維持し、遺伝情報が失われないことを意味する。

【0026】

上で述べられるように、本発明の微生物は好ましくは複製に際して安定的であり、それは遺伝子修飾が複製および／または培養に際して微生物中で保たれることを意味する。かかる安定性に加えて、微生物が遺伝子修飾を維持するために抗生物質の圧を要求しないことが好ましい。抗生物質の添加を省略することができ、したがって抗生物質によるP H Aの汚染のリスクを消失できるので、かかる微生物はP H A生産のために非常に有利である。本出願の好ましい実施形態において、本発明の微生物はしたがって、抗生物質の存在または非存在に依存せずに、複製および／または培養の間に遺伝子修飾を維持する。

20

【0027】

「バランスのとれた過剰発現」という用語は、過剰発現によって生産されるタンパク質が増加したコピー数から期待可能な量未満で生産されるような過剰発現であることを意味する。例えば、野生型が遺伝子の1つのコピーを含み、遺伝的に修飾された微生物が2つのコピーを含むならば、遺伝的に修飾された微生物は野生型と比較して、約2倍のタンパク質を生産することが予想できる。タンパク質の量は微生物の増殖相における内因的なP H Aシンターゼ活性から推測することができる。バランスのとれた過剰発現という用語は、好ましくは、過剰発現が、野生型微生物と比較して、0.6倍まで、好ましくは0.5倍まで、より好ましくは0.35倍まで、および最も好ましくは0.2倍までだけ、24時間後の増殖相における内因的なP H Aシンターゼ活性の増加を導くことを意味する。

30

【0028】

「バランスのとれた過剰発現」の使用によって、実質的な量の不活性タンパク質が形成されないことが保証される。例えば、タンパク質の大規模な（またはバランスのとれない）過剰発現は、非活性形態でかつ非溶解性タンパク質としてタンパク質を含む封入体の形成を導き得る。したがって、タンパク質を過剰発現させたににもかかわらず、改善されたタンパク質活性を観察することはできない。バランスのとれた過剰発現を確実にする1つの方法はリーキーなプロモーターシステムの使用であり、それは誘導剤の非存在下においてでさえ抑制されたタンパク質生産を可能にする。

40

【0029】

本出願の好ましい実施形態において、過剰生産は、P H Aシンターゼをコードする少なくとも1つの遺伝子のコピー数の増加によって少なくとも部分的に引き起こされる。さらに好ましい実施形態において、微生物が1つ以上のコピーを含有する遺伝子は、P h a C 2シンターゼをコードする遺伝子である。本出願の実践において、p h a C 2遺伝子またはそのホモログの複数のコピーの挿入は有益な効果と関連し、特に、p h a C 2の過剰発現は、特に指数増殖相の間のP H A顆粒の形態（それはともに合体するように見える）に

50



おける変化を含むことが見出された。

【 0 0 3 0 】

さらに、リーキーなプロモーターの制御下での P h a C 2 シンターゼ遺伝子の複数のコピーの挿入は、微生物の全体的な P H A 生産および貯蔵システムにネガティブに影響を与えないように、P H A 代謝に関わる他のタンパク質にポジティブに影響を与えると考えられている。

【 0 0 3 1 】

さらに好ましい実施形態において、P H A シンターゼ遺伝子の発現は、リーキーなプロモーターシステムによってこのようにして調節される。プロモーターが対応する活性化因子により活性化されるシステムと比較して抑制された効率であるとはいえ、リーキーなプロモーターシステムは、プロモーター制御された遺伝子の転写を可能にする。リーキーなプロモーターシステムは、好ましくはタンパク質ベースのプロモーターシステム、およびより好ましくは T 7 ポリメラーゼ / T 7 ポリメラーゼプロモーターシステムである。さらに好ましい実施形態において、この T 7 ポリメラーゼ / T 7 ポリメラーゼプロモーターシステムにおける T 7 ポリメラーゼの生産は、低分子への曝露に際して T 7 ポリメラーゼの形成を誘導することが可能な誘導剤を含む。かかるシステムは、T 7 ポリメラーゼの形成の誘導をもたらす低分子の添加によって T 7 ポリメラーゼの生産を選択的に引き起こすことが可能であるという追加の利益を有する。次いでこれは今度は P H A シンターゼ生産を引き起こす。特定の好ましい実施形態において、低分子は 3 - 安息香酸メチルである。

10

20

【 0 0 3 2 】

自然に P H A を生産する微生物の極めて好ましい発明の遺伝子組み換えされた 1 つの品種は、Leibnitz Institute DSMZ German Collection of Microorganisms and Cell Cultures により DSM 26224 下で寄託された Pseudomonas 属であり、以下において P p U 1 0 - 3 3 と表記される。

【 0 0 3 3 】

本出願の実践において、遺伝子組み換え微生物が、P H A シンターゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子を野生型微生物と比較して増加したコピー数で含有し、加えて P H A の分解に関わるタンパク質をコードする少なくとも 1 つの遺伝子中に少なくとも 1 つの修飾を含有することがさらに好ましい。微生物における修飾のかかる組み合わせは、観察される P H A 蓄積に関して相乗効果をもたらすことが見出された。好ましい実施形態において、前記微生物中の P H A の分解に関わるタンパク質をコードする少なくとも 1 つの遺伝子中の少なくとも 1 つの修飾は、前記遺伝子の完全または部分的な不活性化、好ましくは遺伝子の完全な不活性化を引き起こす。かかる微生物はそれぞれの遺伝子についてのノックアウト微生物とも呼ばれる。

30

【 0 0 3 4 】

ノックアウト変異体は当業者に公知の任意の好適なプロセスによって調製することができる。しかしながら、遺伝子の完全または部分的な不活性化は二重組換え交差事象アプローチによって達成されることが好ましい。

40

【 0 0 3 5 】

特に好ましい実施形態において、P H A の分解に関わるタンパク質は P H A デポリメラーゼ、好ましくは P h a Z またはそのホモログである。加えて、P H A の分解に関わるタンパク質をコードする遺伝子が少なくとも 1 つの修飾を含有する遺伝子組み換え微生物は、前記微生物における P H A の分解に関わるタンパク質をコードするただ 1 つの遺伝子のみ（すなわち修飾される遺伝子のみ）を含有することが好ましい。言い換えれば、微生物が、前記微生物における P H A の分解に関わる酵素を代替することができる他の酵素を含有しないことが、好ましい。

【 0 0 3 6 】

P H A シンターゼをコードする遺伝子の複数のコピーおよび不活性化された p h a Z 遺

50

伝子の両方を含む、自然に P H A を生産する微生物の極めて好ましい発明の遺伝子組み換えされた 1 つの品種は、Leibnitz Institute DSMZ German Collection of Microorganisms and Cell Cultures により DSM 26225 下で寄託された *Pseudomonas* 属である。この微生物は以下において P p U 1 0 - 3 3 - p h a Z として表記される。

【 0 0 3 7 】

典型的なヒドロキシ酸単位のポリエステル ( P H A ) は、5 ~ 1 6 の炭素原子の側鎖ヒドロキシ酸単位 [ ( R ) - 3 - ヒドロキシ酸単位 ] を含有する。「長鎖長 P H A 」という用語は、1 つのモノマー ( 分子 ) あたり少なくとも 1 2 、好ましくは少なくとも 1 4 の炭素原子を含有する P H A を包含することが意図されるが、5 ~ 1 2 の炭素原子は本発明の実践において「中鎖長 P H A 」を意味することが意図される。好ましい実施形態において、遺伝子組み換え微生物は中鎖長 P H A を過剰生産する。

10

【 0 0 3 8 】

本出願の特に好ましい実施形態において、遺伝子組み換え微生物は、過剰生産を評価するために参照する状態が 1 5 m M オクタン酸ナトリウムを含有する改変 M M 培地である場合に、遺伝子操作 ( 例えば P H A シンターゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子を野生型と比較して増加したコピー数で挿入することおよび / または前記微生物における P H A の分解に関わるタンパク質をコードする少なくとも 1 つの遺伝子中に少なくとも 1 つの修飾を挿入すること ) によって、2 4 時間後の野生型と比較して、少なくとも 1 . 2 倍、好ましくは少なくとも 1 . 5 倍および特に少なくとも 2 倍 ( 重量で ) の量で P H A を過剰生産させられる。

20

【 0 0 3 9 】

本出願の遺伝子操作微生物のベースとなる微生物は、微生物が P H A シンターゼをコードする遺伝子を少なくとも 1 つ保持しなくてはならないこと以外は、いかなる手段でも限定されない。好ましくは、微生物は、前記微生物における P H A の分解に関わるタンパク質をコードする少なくとも 1 つの遺伝子、より好ましくは 1 つだけの遺伝子を有するべきでもある。

【 0 0 4 0 】

本出願に従う本発明の微生物は、好ましくは P H A を生産する細菌の群から、特に、*Pseudomonas putida*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Pseudomonas syringae*、*Pseudomonas fluorescens*、*Pseudomonas acitophila*、*Pseudomonas olevarans*、*Idiomarina loihiensis*、*Alcanivorax borkumensis*、*Acinetobacter* 属の種、*Caulobacter crescentus*、*Alcaligenes eutrophus*、*Alcaligenes latus*、*Azotobacter vinlandii*、*Rhodococcus eutropha*、*Chromobacterium violaceum* または *Chromatium vinosum* から選択される。本発明に従う特に好ましい微生物は、*Pseudomonas putida* 株、より好ましくは *Pseudomonas putida* U である。

30

40

【 0 0 4 1 】

本出願の微生物は誘導剤分子の非存在下において P H A シンターゼの過剰生産を示すことが観察された。予想外に、誘導されない微生物による P H A の生産は、誘導剤により処理された同一の微生物の P H A 生産に匹敵または場合によっては超えていた。これは、誘導された微生物が過剰発現した P H A シンターゼの最適量をオーバーシュートして、シンターゼの非活性形態 ( 封入体または非溶解形態等 ) の形成をもたらし得ることを示唆する。したがって、本出願のさらなる態様は、上述のように遺伝子組み換え微生物であって、誘導剤分子の添加なしに P H A を生産することが可能である微生物に関する。生産プロセスから高価な誘導剤および汚染可能性リスクを省くことが可能なので、これは P H A の工業規模生産のための利点を有する。

50

## 【 0 0 4 2 】

本出願の微生物は、個別の細胞が減少した数または場合によってはただ 1 つの P H A の顆粒のみを生産するという点で、野生型と比較して異なる形態により P H A を生産することがさらに予想外に観察された。したがって、本出願のさらなる態様は、上述のように遺伝子組み換え微生物であって、野生型細胞と比較して 1 つの微生物あたり減少した数の細胞間 P H A 顆粒を、好ましくは 1 つだけの細胞間 P H A 顆粒の形で生産することが可能である微生物に関する。1 つだけの顆粒の形成は P H A 安定化酵素の量の減少と関連しており、それは P H A の単離および精製を単純化すると考えられる。

## 【 0 0 4 3 】

本出願の微生物は P H A をより迅速に生産し、いくつかの事例において、長い期間にわたって高レベルの蓄積された P H A を維持することも予想外に観察された。したがって、本出願のさらなる態様は、上述のように遺伝子組み換え微生物であって、P H A 生産の評価するために参照する状態が 1 5 m M オクタン酸ナトリウムを含有する改変 M M 培地である場合、オクタン酸ナトリウムを含有する改変 M M 培地への曝露に際して 2 4 時間後に P H A の最大の含有量を生産することが可能であり、好ましくは P H A 含有量を維持することも可能であり、それは最初の 2 4 時間の蓄積期間後の少なくとも 4 8 時間の間で最大の P H A 含有量の重量で  $\pm 20\%$  の範囲内である微生物に関する。

## 【 0 0 4 4 】

本発明のさらなる態様は、以下の

- a . 本発明の微生物または細胞を培養する工程と
  - b . 培養培地から P H A を回収する工程と
- を含む P H A を生産する方法に関する。

## 【 0 0 4 5 】

好適な条件下で微生物または細胞を培養する標準的な方法は、当技術分野において周知である。例えば、以下の実施例、材料およびさらに S a m b r o o k & R u s s e l l ( 2 0 0 1 ) を参照されたい。遠心分離または濾過による培地からの細胞の分離、コンポーネント ( P H A ) の沈殿または濾過、続いて精製、例えばクロマトグラフィー手順 ( 例えばイオン交換、クロマトグラフィー、親和性クロマトグラフィー、類似の当技術分野で認められている手順 ) を含む従来の手順によって、P H A を培養培地から単離することができる。

## 【 0 0 4 6 】

上で言及されたプロセスにおける P H A は、3 ~ 8 の炭素原子を有するケトン、好ましくはアセトンによる抽出によって回収されることが好ましい。抽出は、抽出溶媒に非依存的に、60 以下、好ましくは 20 ~ 40 の温度で好ましくは実行される。

## 【 0 0 4 7 】

本出願の特に好ましい実施形態において、方法は、P H A の過剰生産および / または P H A シンターゼの過剰生産を開始する誘導剤分子の添加を含まないかまたは要求しない。加えて、本出願の実践において、微生物は抗生物質の非存在下においてでさえ導入された修飾に関して安定的であることが予想外に見出されたので、抗生物質の存在下において本発明の微生物を培養することは必須ではない。かかる抗生物質には、テルライト、リファンピシンおよびカナマイシンが限定されずに含まれる。

## 【 0 0 4 8 】

上で記載されたプロセスのための炭素原料として、植物油脂に由来可能な容易に入手可能で安価な脂肪酸を使用することが可能である。かかる脂肪酸の好ましい例には、飽和カルボン酸 ( ヘキサン酸、ヘプタン酸、オクタン酸およびデカン酸等 ) および不飽和脂肪酸 ( 1 - ウンデセン酸、オレイン酸またはリノール酸等 ) が含まれる。加えて、原料として多価アルコール ( 好ましくはグリセロール等 ) を使用することが可能である。

## 【 0 0 4 9 】

本発明の別の態様は、P H A 、特に中鎖長および / または長鎖長の P H A の過剰生産のための本発明の微生物、核酸、ベクターおよび / または細胞の使用に関する。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0050】

【図1】 P p U 細胞 ( a ~ c ) ; P p U 1 0 - 3 3 非誘導細胞 ( d ~ f ) および P p U 1 0 - 3 3 誘導細胞 ( g ~ i ) ; p h a Z - P p U 1 0 - 3 3 非誘導細胞 ( j ~ l ) および誘導細胞 ( m ~ o ) の電子顕微鏡写真。培養物を、炭素源として 3 5 m M オクタン酸ナトリウム ( 1 5 m M および 2 0 m M の 2 パルスで与えられる ) を含有する修飾 M M 中で増殖させ、 3 1 時間 ( a , d , g , j , m ) 、 4 8 時間 ( b , e , h , k , n ) 、 7 2 時間 ( c , f , i , l , o ) でサンプリングした。

【図2】 p h a 遺伝子の発現および P . P u t i d a U 中の P H A 蓄積。各々のパネルは、 P p U ( 各々の数について第 1 の棒 ) 、 P p U 1 0 - 3 3 非誘導 ( ( a ) および ( c ) 中の各々の数について第 2 の棒 ) および P p U 1 0 - 3 3 誘導 ( ( a ) および ( c ) 中の各々の数について第 3 の棒 ) 、 p h a Z - P p U 1 0 - 3 3 非誘導 ( ( b ) 中の各々の数について第 2 の棒 ) および p h a Z - P p U 1 0 - 3 3 誘導 ( ( b ) 中の各々の数について第 2 の棒 ) における p h a 遺伝子の発現の正規化された増加の倍数を示す。 P H A 含有量 ( g / l ) も、点と直線 ( P p U ) 、三角形と下側の破線 ( P p U 1 0 - 3 3 誘導 ) 、点 ( P p U 1 0 - 3 3 非誘導 ) 、グラフ ( c ) 中の三角形と上側の破線 ( p h a Z - P p U 1 0 - 3 3 非誘導 ) および四角形と破線 ( p h a Z - P p U 1 0 - 3 3 誘導 ) において示される。

【図3】 P . p u t i d a U における p h a C 2 の過剰発現のための 2 分節システムの遺伝子構成。図解は、染色体の中へ組み込まれた 2 つのベクター ( p C N B 1 m i n i - T n 5 x y l S / P m : : T 7 p o l および p U T m i n i T n 5 - T e l - T 7 p h a C 2 ) を示す。

【図4】野生型 P p U ( 正方形 ) に加えて、遺伝子組み換えされたコンストラクト P p U 1 0 - 3 3 非誘導 ( 黒円 ) 、 P p U 誘導 ( 白円 ) 、 p h a Z - P p U 1 0 - 3 3 非誘導 ( 黒三角形 ) および p h a Z - P p U 1 0 - 3 3 誘導 ( 白三角形 ) における経時的な P H A 生産。

【図5】対応する抗生物質の存在および非存在下で、 M M + 0 . 1 % Y E 培地および基質としてオクタノエート ( 2 0 m M ) 中で培養した場合の P p U および P p U 1 0 - 3 3 - p h a Z のバイオマスおよび P H A の収率。結果は二つのものの平均値である。

## 【発明を実施するための形態】

## 【0051】

以下において、本出願は、実施例によってさらに例証されるが、それは本出願の範囲をいかなる手段でも限定することは意図しない。

## 【実施例】

## 【0052】

## 実験手順

この作業において使用される微生物およびベクター、細菌株、変異体ならびにプラスミドは、添付書類 1 中で要約される。

## 【0053】

## 培養培地条件

特別の指示の無い限り、大腸菌および P . p u t i d a 株を L u r i a M i l l e r ブロス ( L B ) 中で培養し、それぞれ 3 7 および 3 0 でインキュベーションした。必要とされる場合、抗生物質を以下の通り培地へ添加した。リファンピシン ( R f 、液体培地中で固体で 2 0 μ g / m l または 5 μ g / m l ) 、カナマイシン ( K m 、液体培地中で固体で 2 5 μ g / m l または 1 2 . 5 μ g / m l ) 、アンピシリン ( A p 、 1 0 0 μ g / m l ) 、テルライト ( T e l 、 1 0 0 μ g / m l ) 、ゲンタマイシン ( G m 、 3 0 μ g / m l ) 、クロラムフェニコール ( C m 、 3 0 μ g / m l ) 、イソプロピル - D - チオガラクトピラノシド ( I P T G 、 7 0 μ M ) および 5 - プロモ - 4 - クロロ - 3 - インドリル - D - ガラクトピラノシド ( X G a l 、 3 4 μ g / m l ) 。

## 【0054】

## DNA 操作

すべての遺伝子手順は、Sambrook & Russell (2001) によって記載される通りに実行した。ゲノムDNAおよびプラスミドDNAの抽出、アガロースゲル精製およびPCRクリーニングは、対応するキアゲンキット(ドイツ)を使用して製造者の説明書に従って実行した。この作業において使用されるすべてのDNA修飾酵素(制限酵素、DNAリガーゼ、アルカリフォスファターゼなど)は、NEB (Massachusetts、米国)から購入した。ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)はEppendorf vapo . protect サーマルサイクラー(ドイツ)において実行した。50  $\mu$ l のPCR反応混合物は、2  $\mu$ l の希釈したゲノムDNA (50  $\mu$ g / ml)、1  $\times$  PCR バッファーおよび2 mMのMgCl<sub>2</sub> (PROMEGA Co.、米国)、0.2  $\mu$  の各プライマー (Eurofins mgw Operon)、0.2 mMのdNTPs (Amersham、GE Healthcare、イギリス)、1.25 UのGo-Taq ホットスタートポリメラーゼ (PROMEGA Co.、米国) からなっていた。PCR サイクルの条件は以下のとおりであった。96 / 10分の最初の工程、続いて96 / 30秒、60 / 30秒、72 / 1分の30サイクル、72 / 5分の最終的な伸長。Pseudomonas 株へのプラスミド伝達は三親接合実験によって行った (Selvaraj & Iyer, 1983; Herrero et al., 1990)。簡潔には、自殺プラスミド pCNB1mini-Tn5 xylSPm::T7pol または pUTminiTn5-Tel-phaC2 を保有する大腸菌 CC18 pirD ナー株、大腸菌 RK600 ヘルパー株および Pseudomonas レシピエント株を8時間分離して培養し、0.75:1:2の比で混合し、LBにより2回洗浄した。懸濁物をニトロセルロース膜上に回収し、LBプレート上で30 で一晚インキュベーションした。次いでフィルター上の増殖細菌を3 mlの滅菌生理食塩水溶液 (NaCl 0.9%) 中に再懸濁し、連続希釈物を対応する選択抗生物質を補足したLB寒天上にプレーティングした。プレートを30 で一晚インキュベーションし、プレート上に発生したトランス接合体クローンをPCRによって確認した。

10

20

30

40

50

## 【0055】

## DNA シーケンシング

シーケンシングのためのPCR反応は、特異的なオリゴヌクレオチドまたは普遍的なプライマー M13F および M13R のセットのいずれかを使用して実行した (添付書類3)。10  $\mu$ l の反応混合物は、6 ~ 12 ng の精製されたPCR産物 (または200 ~ 300 ng のプラスミド)、2  $\mu$ l のBigDye Ready Reaction Mix、1  $\mu$ l のBigDyeシーケンシングバッファーおよび1  $\mu$ l の特異的なプライマー (25  $\mu$ ) からなっていた。サイクルの条件は以下を含んでいた。96 / 1分の最初の工程、続いて96 / 20秒、52 ~ 58 / 20秒、60 / 4分の25サイクル、60 / 1分の最終的な伸長工程。ヌクレオチド配列は、ジデオキシチェンターミネーション法 (BigDye Terminator v3.1 Kit、Applied Biosystems、Foster City、米国) を使用して決定した。PCR産物はQiagen Dye Ex2.0 Spin Kit (ドイツ) を使用して精製した。ベレットを20  $\mu$ l の水中に再懸濁し、ABI PRISM 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems、California、米国) 上にロードした。得られた部分的な配列を、非冗長ヌクレオチドデータベース (www.ncbi.nlm.nih.gov) 中の公知の配列とアライメントさせた。可能性のある転写プロモーター領域およびターミネーターの同定は、Softberry (http://linux1.softberry.com/cgi-bin/programs/gfindb/bprom.pl)、PromScan (http://molbiol-tools.ca/promscan/)、およびPDBGオンライン (http://www.fruitfly.org/seq\_tools/promoter.html); およびArnold (http://rna.igmors.usud.fr/toolbox/arnold/index.php#Results) バ

イオインフォマティクスツールを使用して、行った。

【0056】

phaC2 過剰発現株 PpU10-33 のデザインおよび構築  
PpU10-33 は、phaC2 遺伝子発現の余剰のコピーが、T7 ポリメラーゼプロモーター：T7 ポリメラーゼシステムによって駆動される *Pseudomonas putida* U 派生物である。それは染色体に組み込まれた2つのカセットからなり、1つはT7 ポリメラーゼプロモーターから発現される phaC2 遺伝子を含み、もう1つは Pm プロモーターから発現され、TOL プラスミドに由来する同族安息香酸塩/トルエン酸塩誘導可能 *XylS* レギュレーターによって調節される T7 ポリメラーゼ遺伝子を含み、  
10  
phaC2 カセットを以下の通り構築した。P. putida U の phaC2 遺伝子を pBBR1MCS-3-phaC2 プラスミド (Arias et al., 2008) から切り取り、pUC18NotI/T7ベクター (Herrero et al., 1993) の中へクローニングし、遺伝子の正確な向きをシーケンシングによって確認した。次いで phaC2 遺伝子および T7 プロモーターを、pUTminiTn5-Telベクター (Sanchez-Romero et al., 1998) の中へカセットとして伝達した。最初に、miniTn5 派生物 pCNB1 xylS/Pm::T7 pol をフィルターメイティングによって P. putida U へ伝達し、Km 選択マーカー (Harayama et al., 1989; Herrero et al., 1993) によって選択した。ゲノム中へのトランスポゾンの組み込みが本質的にランダムであり、異なる挿入部位が挿入された遺伝子の転写レベルに著しく影響を及ぼし得るので、およ  
20  
そ100のトランス接合体のプールを第2の伝達のために調製した。このプールの5mlのLB培養を3時間(30、180rpm)インキュベーションし、レシピエントのプールを pUTmini-Tn5-Tel-T7 phaC2 コンストラクトの伝達のために使用した。トランス接合体は、テルライト(選択マーカー)を転換する場合にそれらが提示する黒い色によって容易にスコアリングされ、続いてPCRによって確認された。続いて両方のカセットの挿入部位が変化する最終的なレシピエントを、PhaC2 および PHA のレベルについてスコアリングし(結果)、最も良好なものを選択し、PpU10-33 と表記した。

【0057】

PpU10-33 における phaZ のノックアウトおよび相補性  
phaZ 遺伝子の欠失は、二重組換えの事象、および致死性 sacB 遺伝子の発現による要求される変異体の選択を含む、Quant & Hynes, 1983; Donnenberg & Kaper, 1991 によって記載された方法の使用によって遂行された。最初に、PhaC1 シンターゼおよび PhaC2 シンターゼをコードする、phaZ 遺伝子に隣接する ORF を含む DNA は、GENEART AG (ドイツ) によって合成され、  
30  
続いて Gm および SacB の選択マーカーを含む pJQ200SK ベクターの中へクローニングした。次いで、ハイブリッドプラスミドを三親メイティングによって PpU10-33 株の中へ導入した。プラスミドが1つだけの交差によって染色体の中へ組み込まれたトランス接合体を、Gm + km および Tel 含有プレート上で選択し、PCR によって確認した。続いて第2の組換えからもたらされた欠失変異体を10%スクロース含有LB  
40  
プレート上で選択し、Gm に対する感度についてスコアリングし、PCR によってさらに解析して欠失の位置および程度を確認した。このために、2つの異なるプライマーセット(相同組換えのために使用された断片の外側またはの内側にアニールする)を使用し、すなわち、それぞれ PhaC1-check-F/PhaC2-check-R および RT-phaZ F\_\_PpU/RT-phaZ R\_\_PpU であった。1つの欠失変異体を選択し、phaZ PpU10-33 と表記した。欠失変異体の相補性のために、phaZ 遺伝子(921bp)をPCR(phaZ-F-KpnI/phaZ-R-XbaI)によって増幅し、pBBR1MCS-5 ベクターの中へクローニングした。トランス接合体を Gm 耐性について選択し、PCR によってさらに確認した。

【0058】

## 蛍光顕微鏡法

1 ml の培養を 1.5 ml の Eppendorf チューブ中でジメチルスルホキシド中のナイルレッド溶液 (0.25 mg/ml) の 2 滴と混合し、4 で 5 分間 6,500 rpm で遠心分離した。ペレットを 2 ml の  $MgCl_2$  (10 mM) により 2 回洗浄し、500  $\mu$ l の溶液中に再懸濁し、5 ~ 10  $\mu$ l の細胞懸濁物を顕微鏡スライド上にマウントした。PHA 顆粒の存在および形態は、Cy3 フィルター (EX BP 550/25、BS FT 570、EM BP 605/70) (ZEISS、Jena、ドイツ) および AxioVision rel 4.6.3 ソフトウェア (Zeiss Imaging solutions GmbH、ドイツ) を装備した ZEISS Axio Imager A1 落射蛍光顕微鏡により可視化した。細胞は 1.1 秒の曝露時間でイメージ化した (Bassas et al., 2009)。

10

## 【0059】

## 透過電子顕微鏡法

細菌は増殖培地中の 2 % グルタルアルデヒドおよび 5 % ホルムアルデヒドにより 4 で固定し、カコジル酸緩衝液 (0.1 M カコジル酸塩、0.01 M  $CaCl_2$ 、0.01 M  $MgCl_2$ 、0.09 M スクロース、pH 6.9) により洗浄し、1 % オスミウム水溶液により室温で 1 時間オスミウム化する。次いで、サンプルは、各々の工程で 30 分間の段階的なシリーズのアセトン (10 %、30 %、50 %、70 %、90 % および 100 %) 中で脱水した。70 % アセトン脱水工程は 2 % の酢酸ウラニルを含み、一晚実行した。サンプルは、硬質樹脂のための Spurr 配合 (電子顕微鏡のための低粘度エポキシ樹脂包埋剤 (Spurr, 1969)) に従ってエポキシ樹脂を浸透させた。純粋な樹脂による浸透を数日間行った。超薄切片をダイヤモンドナイフにより切断し、酢酸ウラニルおよびクエン酸鉛により対比染色し、80 kV の加速電圧で TEM 910 透過率電子顕微鏡 (Carl Zeiss、ドイツ) において検査した。イメージはラインレプリカを使用してキャリブレーションされた倍率で採取し、ITEM ソフトウェア (Olympus Soft Imaging Solutions、ドイツ) を備えた Slow-Scan CCD-Camera (ProScan、1024 x 1024、Scheuring、ドイツ) によりデジタルで記録した。

20

## 【0060】

## RNA 操作

サンプル (3 ml) を増殖相を通して (4 時間、7 時間、24 時間、27 時間、31 時間、48 時間および 55 時間) 培養から採取し、等容量の RNA 保護バッファー (Qiagen、ドイツ) と直ちに混合した。室温で 5 分間のインキュベーション後に、懸濁液を 13,000 rpm で遠心分離し、上清液を廃棄し、ペレットを -80 で保存した。全 RNA は、製造者のプロトコルに従って、DNase 処理を含む RNeasy ミニキット (Qiagen、ドイツ) を使用して抽出した。最終的に、RNA を 100  $\mu$ l の RNase 不含有水中で溶出し、-80 で保存した。RNA の完全性はホルムアルデヒドアガロースゲル中の電気泳動によって査定し、濃度および純度は分光光度法で (分光光度計 ND-100、peqLab-biotechnologie GmbH、ドイツ) 決定した。cDNA は 10  $\mu$ g の全 RNA およびランダムプライマーを使用して 20  $\mu$ l の反応中で生じさせた。すべての試薬 (Superscript III RT を含む) は Invitrogen (米国) から購入し、反応は製造者のプロトコルに従って実行した。Superscript III RT が添加されなかったサンプルを陰性対照として使用した。cDNA 合成後に、残存する RNA を 1 M NaOH により沈殿させ、65 / 10 分、続いて 25 で 10 分間インキュベーションした。直ちに、反応を KCl 1 M により平衡化した。次いで、生じた cDNA を PCR 精製キット (Qiagen) を使用して精製し、濃度および純度を分光光度計により測定した。cDNA を DEPC 水により 100 ng /  $\mu$ l へ希釈し、4 で維持した。

40

## 【0061】

## 相対的 RT-PCR アッセイ

50

RT-PCRアッセイのために使用したオリゴヌクレオチド (Eurofins mgw Operon、ドイツ) は、Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) およびOligo Calc (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>) バイオインフォマティクツールの支援でデザインし、それらは添付書類2中で要約される。各々のセットは、類似したG+C含有量を有し、したがって類似したアニーリング温度 (約60℃) であり、300bpよりも短いアンプリコン産物サイズであり、予測されるヘアピンループ、二重らせんまたはプライマー二量体形成が存在しないようにデザインされた。実験デザインのためのMIQEガイドラインに従った (Bustin et al., 2009)。最初に、プライマーの各々のセットを最適PCR条件についてアッセイし、テンプレートとして標準的なサンプルのセット (ゲノムDNA) を使用してアニーリング温度およびプライマーの濃度を確立した。プライマー特異性は、融解曲線解析およびアンプリコンバンドのゲル可視化によって決定した。プライマー効率 はcDNAのプールにより決定し、5点にわたって連続的な4倍希釈ヘシリーズを行って標準曲線を実行した。標準的なPCRプロトコルは各々の希釈について三重で実行した。すべての事例において、効率は89%~100%の間の範囲で測定された。このアッセイのために、CFX96 (商標) リアルタイムPCR検出システム (Bio-Rad、米国) およびCFX Managerソフトウェア (バージョン1.5.534.0511、Bio-Rad) を使用した。データ正規化のための適切な参照遺伝子の選択はCFXソフトウェア中に存在するgeNorm方法を使用し、異なる実験条件および時間点間の標的安定性を考慮に入れて実行し、良好な値の係数変動および0.5~1付近のM値を判断した。「ハウスキーピング」遺伝子 (rpsL)、一般的な代謝 (glcA、gap-1、proC1、proC2)、細胞分裂 (mreB、ftsZ) またはシグナル伝達機能 (ffH) に関わる他のものが含まれる、複数の候補遺伝子を試験し、最終的にglcAおよびproC2を参照遺伝子として選択した。相対的RT-PCRのために三重実験を実行し、データ正規化のために各々のプレート中に内部キャリブレーターが常に含まれていた。cDNAなしのサンプルを陰性対照として使用した。PCR反応は、12.5μl iQ (商標) SYBR Green Supermix (2x) (Bio-Rad、米国)、1μl フォワードプライマー (10μM)、1μl リバースプライマー (10μM)、2μl cDNA (1/10希釈した) を含み、milliQ水により20μlにした。PCRサイクルの条件は以下のとおりであった。50℃/2分および95℃/10分、続いて95℃/15秒、60℃/30秒、72℃/30秒の40サイクル、72℃/10分の最終的な伸長。蛍光は各々のサイクルの終了時に測定した。融解曲線のために、95℃/10分で最初の変性工程を設定し、続いて65℃から開始して95℃まで0.5℃/5秒の増分で、シグナル取得を継続した。標的遺伝子の相対的発現比は、平均の標準誤差および正規化された表現方法 (Ct) を使用して、CFXソフトウェア (Bio-Rad、米国) により自動的に計算した。値は発現における正規化された増加の倍数として表現される。

#### 【0062】

##### PHA生産のための培養条件

3-安息香酸メチル (3-MB) は、T7ポリメラーゼ遺伝子を駆動するPmプロモーターによるXylS転写活性化因子の活性化のために誘導剤として使用され、今度はそれはphaC2シンターゼの発現を引き起こす。PpU10-33におけるphaC2発現/PHA合成のための最適条件を決定するために、3-MBの濃度 (0.2~3mMから)、誘導の時間 (OD<sub>550nm</sub> 0.4~1.5) および炭素源濃度は、異なる条件で行われた。400mlのMM修飾培地 (Martinez-Bianco et al., 1990) + 0.1%酵母エキス、15mMオクタン酸ナトリウムおよび適切な抗生物質を含有するエルレンマイヤーフラスコ (2リットル) に、20mMコハク酸塩を含むMM寒天プレート上で30℃で一晩培養した細胞懸濁物を接種した。次いでフラスコを180rpmのロータリーシェーカー (INFORS AG、スイス) 中で30℃でインキュベーション



した。一旦培養が約 0.8 の  $OD_{550nm}$  に到達すれば、培養を半分 (200 ml を含有する 1 リットルのエルレンマイヤーフラスコ) の中へ分割し、フラスコのうちの 1 つへ 0.5 mM の最終的な濃度で 3-MB を添加した。同時にオクタン酸ナトリウム (20 mM) の第 2 のパルス を添加した。野生型対照株については、手順は同じであるが誘導はなかった。サンプルを 24 時間ごとに回収し、バイオマス (CDW、細胞乾燥重量)、PHA、 $OD_{550nm}$ 、ナイルレッド染色および  $NH_4^+$  濃度を決定した。CDW 決定のために、サンプルを 80 で 24 時間乾燥させてもとの培養の g/l で表現した。

#### 【0063】

##### PHA の抽出および精製

培養サンプルを 4 で 15 分間 6,500 X g で遠心分離し (Allegra 25 R、Beckman Coulter、米国)、ペレットを蒸留水中で 2 回洗浄し、-59 および 0.140 mbar で凍結乾燥した (Lyophilizer alpha 1-4 LSC、Christ、ドイツ)。5 ml のサンプルを増殖相にわたって採取して PHA 生産をモニタリングし、上述のように凍結乾燥した。凍結乾燥されたバイオマスを、以前に記載される通りに (Basas-Galia et al, 2012) 10 ml のクロロホルムにより 80 で 3 時間抽出した。PHA 含有量 (% wt) は PHA によって表わされる CDW のパーセンテージとして定義される。

#### 【0064】

##### NMR 解析

$^1H$ -NMR 解析のために、5 ~ 10 mg のポリマーを 0.7 ml の  $CDCl_3$  の中へ溶解し、5 ~ 10 mg のポリマーを  $^{13}C$  スペクトルの記録のために使用した。 $^1H$  および  $^{13}C$  の NMR スペクトルを、溶媒 ( $CDCl_3$ ) の重水素共鳴へロックされた Bruker DPX-300 NMR スペクトロメーター上で 300 K で記録した。化学シフトは溶媒のシグナル ( $^1H$ : 7.26、 $^{13}C$ : 77.3) と比較して ppm で、およびカップリング定数は Hz で与えられる。標準的な Bruker パルスプログラムを全体にわたって使用した。

#### 【0065】

##### PHA の分子量の検出

平均分子量は、カラム Styragel HR5E を備え、2414 示差屈折率検出器 (Waters、米国) を装備した HPLC システム (Waters 2695 Alliance Separations Module) 中のゲル透過クロマトグラフィー (GPC) によって決定した。テトラヒドロフラン (THF) を 45 および 0.5 ml / 分のフロー率 (アイソクラティック) で溶出液として使用した。サンプル濃度および注入体積はそれぞれ 0.5 mg/ml および 50  $\mu$ l であった。キャリブレーションカーブは、10,000 ~ 700,000 g/mol の Mw 範囲中のポリスチレンスタンダードキット (Fluka) を使用して得た。

#### 【0066】

##### PHA の熱特性

微生物ポリエステルの熱特性は、10 ~ 20 mg の精製されたポリマーを解析のために使用して、示差走査熱量測定 (DSC) によって決定した。DSC 分析は DSC-30 (Mettler Toledo Instruments、米国) により実行した。サンプルをアルミニウムパン上に置き、窒素 (80 ml / 分) 下で 10 / 分で -100 ~ 400 まで加熱した。すべてのデータは STARe システム捕捉およびプロセッシングソフトウェア (Mettler Toledo) によって捕捉した。

#### 【0067】

実施例 1: *Pseudomonas putida* U における phaC2 の過剰発現 (i) XylS-3-安息香酸メチル (3-MB) により調節されるプロモーター Pm から T7 ポリメラーゼを発現する、特殊化された mini-Tn5 (pCNB1xylS/Pm::T7pol) と; (ii) T7 ポリメラーゼプロモーターから phaC2 を発現するハイブリッド pUT-miniTn5-Tel 派生物とからなる PpU PhaC2

シンターゼのための２分節のミニトランスポゾンベースの過剰発現システムを、デザインした（図３を参照）。２つのミニトランスポゾンコンポーネントは、*P. putida* U（以下において「P p U」）染色体の中へ分離してランダムに挿入された。細胞タンパク質のＳＤＳ－ＰＡＧＥ分離によるPhaC２生産の半定量化およびナイルレッド染色細胞の蛍光顕微鏡法によるPHA顆粒形成の検査を含むスクリーニングの２ラウンド後に、最も良好なPHA生産菌を選択した。この株をP p U 10－33と表記した。

#### 【 0 0 6 8 】

以下において、非誘導培養はNIおよび0.5 mMの3-MBにより誘導された細胞はIと称される。組換え株P p U 10－33におけるPHA含有量に対するphaC２遺伝子量の効果をアッセイした。培養は、それぞれ15 mMおよび20 mMの２パルス（第２のパルスは誘導の瞬間に与えられる）で与えられるオクタン酸ナトリウムを含む修飾MM中で増殖させた。ピークのバイオマス生産は、P p UおよびP p U 10－33の両方の株について48時間後に達成された（それぞれ3.1および3.2 g l<sup>-1</sup>のCDW）。結果を表１中で示す。

10

表１ 株P p U、P p U 10－33およびP p U 10－33－ΔphaZのバイオマス収量

時刻 (時間)	CDW (g/l)				
	P p U	P p U 10 － 3 3 (NI)	P p U 10 － 3 3 (I)	P p U 10 － 3 3－Δ phaZ (NI)	P p U 10 － 3 3－Δ phaZ (I)
24	1.31	1.36	1.09	1.49	1.20
48	3.07	2.52	3.16	1.83	3.10
72	2.50	2.42	2.39	3.11	3.29
96	2.13	2.16	2.68	3.20	3.25

20

30

#### 【 0 0 6 9 】

3-MBに曝露された細胞は、野生型細胞および非誘導細胞（24.4%および34.6%）と比較して、培養の最初の24時間の間により高い量のPHA（44%）を蓄積することができた。結果を以下の表２および図４中で示す。

表2 非誘導 (N I) および誘導 (I) の P p U、P p U および P p U 1 0 - 3 3 - Δ p h a Z における PHA 収率

時刻 (時間)	<sup>a</sup> PHA (g/l)					<sup>b</sup> PHA (%w t)				
	P p U	P p U 1 0 - 3 3 (N I)	P p U 1 0 - 3 3 (I)	P p U 1 0 - 3 3 Δ p h a Z (N I)	P p U 1 0 - 3 3 Δ p h a Z (I)	P p U	P p U 1 0 - 3 3 (N I)	P p U 1 0 - 3 3 (I)	P p U 1 0 - 3 3 Δ p h a Z (N I)	P p U 1 0 - 3 3 Δ p h a Z (I)
2 4	0. 3 2	0. 4 7	0. 4 8	0. 8 8	0. 7 5	24. 4	34. 6	44. 0	59. 1	62. 5
4 8	1. 0 8	1. 1 4	1. 0 8	1. 2 0	1. 5 6	35. 2	45. 2	34. 2	65. 6	50. 3
7 2	0. 5 3	0. 7 6	0. 6 3	1. 6 7	2. 0 3	21. 2	31. 4	26. 5	53. 7	61. 7
9 6	0. 1 4	0. 4 8	0. 3 9	1. 6 7	1. 8 0	6. 6	20. 5	14. 6	52. 2	54. 5

10

20

30

40

50

#### 【 0 0 7 0 】

培養は、3 5 m M オクタン酸ナトリウム ( 1 5 m M および 2 0 m M の 2 パルスで与えられる ) を含む修飾 M M 中で増殖させ、0 . 8 の O D <sub>550nm</sub> で 0 . 5 m M 3 - M B により誘導 ( I ) または誘導されなかった ( N I ) 。

#### 【 0 0 7 1 】

過剰発現株における P H A レベルは、2 4 時間で親株におけるものよりも約 5 0 % 高かったが、4 8 時間で親株のものよりも約 2 5 % 低く、7 2 時間で類似しており、P h a C 2 の増加が P H A の一過性増加を引き起こし、今度はレベルが正常になるまで、脱重合活性の増加を誘発することを示唆する。重要なことには、細胞乾燥重量 ( % w t ) の P H A パーセンテージは、4 8 時間後に、P p U の事例において 3 5 % から 7 % w t へ、P p U 1 0 - 3 3 誘導培養の事例において 3 9 % から 1 5 % w t へ急に低下した。

#### 【 0 0 7 2 】

P p U 1 0 - 3 3 の非誘導培養も、2 4 時間での P H A 蓄積において野生型株のものを超える 5 0 % の増加を示した理由は、さらに調査されなかったが、T 7 プロモーターのリークを反映すると推測された ( R T - P C R 結果によっても示された ) 。最も高いバイオマスレベル ( P p U の事例において 3 . 0 7 g / l 、ならびに P p U 1 0 - 3 3 の事例において 2 . 6 7 g / l ( 非誘導、N I ) および 2 . 7 3 g / l ( 誘導、I ) 、( 図 1 A 、表 1 ) ) 、および P H A 蓄積 ( それぞれ、1 . 0 8 g / l 、0 . 7 4 g / l および 1 . 0 7 の g / l 、( 図 4 、表 2 ) ) が、両方の株により培養の 4 8 時間で達成された。4 8 時間後に、バイオマスおよび P H A のレベルは低下し、P H A レベルはバイオマスレベルよりもより有意に減少または低下した。P p U 1 0 - 3 3 株は、ほとんどすべてのサンプリング時間でより高い P H A の収率 ( バイオマスのパーセンテージとして表現される ) を示した。この実験において測定された最も高い P H A 収率 ( 4 4 % w t ) が、P p U での 2 4 % w t および非誘導 P p U 1 0 - 3 3 細胞での 3 5 % w t と比較して、P p U 1 0 - 3 3 誘導細胞において 2 4 時間で得られた ( 表 2 ) 。4 8 時間で、最も高いバイオマス収量が得られた時に、P p U 培養での 3 5 % w t および誘導 P p U 1 0 - 3 3 培養での 4 0 % w t と比較して、最も高い絶対収率 ( 4 1 % の P H A の細胞乾燥重量 ( C D W ) ) が、1 0 - 3 3 の非誘導細胞において得られた。したがって、誘導の効果は主として比較的早期の培養において観察される。重要なことには、P H A のパーセンテージは、P p U の事例において 7 % w t および P p U 1 0 - 3 3 の事例において 1 5 ~ 2 2 % w t へ 4 8 時間後に急に低下した。

## 【 0 0 7 3 】

実施例 2：P H A 生産に対する p h a Z 突然変異の効果

P p U 1 0 - 3 3 株の p h a Z 欠失変異体 ( P p U 1 0 - 3 3 - p h a Z と表記する ) を生成し、続いて P H A 蓄積について査定した。図 4 および表 2 中で見ることができるよう、変異体の培養はより高い P H A レベル ( 6 2 % w t ) を示し、P h a Z を生産する株の状況とは対照的に、これらのレベルは培養の少なくとも 9 6 時間まで維持された。したがって、p h a Z ノックアウト表現型は、P h a Z デポリメラーゼが細胞において、P H A の蓄積および維持の主要な決定要素であることを示唆する。

## 【 0 0 7 4 】

参考実施例：p h a Z - P p U 1 0 - 3 3 変異体の相補性

観察された表現型へ p h a Z 遺伝子突然変異を原因として関連させるため、および p h a クラスターの発現に対する任意の間接的效果を除外するために、p h a Z 遺伝子を P C R 増幅し、p B B R 1 M C S - 5 プラスミドベクター中にクローニングし、P p U 1 0 - 3 3 - p h a Z 株の中へ導入した。次いで相補された変異体 ( P p U 1 0 - 3 3 - p h a Z p M C - p h a Z、株 p M C - p h a Z と表記される ) における P H A 生産および維持を査定した。表 3 は、オクタン酸ナトリウム ( 2 0 m M ) を含む修飾 M M 中での 4 4 時間増殖後の、P p U 1 0 - 3 3 株、p h a Z 欠失変異体および相補された派生物のバイオマスおよび P H A の収率を示す。

表 3：蓄積の P H A 収率に対する効果。P h a Z 構築および欠失の相補性。

株	<sup>a</sup> CDW ( g / l )	<sup>b</sup> P H A ( g / l )	<sup>c</sup> P H A ( % w t )
P p U 1 0 - 3 3 ( N I )	2 . 1 1	0 . 4 5	2 1 . 0
Δ p h a Z - P p U 1 0 - 3 3 ( N I )	2 . 1 8	0 . 9 0	4 1 . 0
p M C - p h a Z ( N I )	1 . 9 8	0 . 1 0	5 . 0

## 【 0 0 7 5 】

3 つの株についてのバイオマス収量は約 2 g / l で類似していたが、P H A 収率は、P p U 1 0 - 3 3 株について 2 1 % w t、p h a Z 変異体について 4 1 % w t および相補された株について 5 % w t であった。相補された株における P H A が野生型レベルよりも低いことは、おそらくマルチコピーベクター上に位置する相補遺伝子からもたらされるより高い細胞デポリメラーゼレベルを反映する。

## 【 0 0 7 6 】

ポリマー特徴

P h a C 2 ポリメラーゼの過剰発現および P h a Z デポリメラーゼの不活性化は、P H A タンパク質の正常細胞の化学量論および活性ならびに結び付いたタンパク質における変化に同調し得るので、表現型における他の変化はこれらの遺伝子操作に由来し得る。この可能性を査定するために、異なるコンストラクトの細胞における P H A 顆粒の超微細構造を、透過電子顕微鏡法 ( T E M ) によって比較した。図 1 は、P p U 野生型株 ( 図 1 A ~ C ) が細胞質内に均一に分布する 1 つの細胞あたり 1 または 2 つのはっきりした P H A 顆粒を含有し、一方 P p U 1 0 - 3 3 p h a C 2 過剰発現株 ( 図 1 D ~ F ) がより小さな顆粒の合体を示唆する形態を持つ 1 つの主要な顆粒を含有する傾向がある。これは、特に指数増殖相の中頃の間で誘導された培養において特に明らかである。p h a Z 欠失変異体は複数の顆粒を有する傾向があり、そのうちのいくつかは顆粒融合を示唆する不規則な境界を有していた ( 図 1 G ~ I )。顕微鏡による解析は図 4 中で示される結果も確認し、すなわち、P p U 株および P p U 1 0 - 3 3 株中に蓄積された細胞内 P H A は培養の 4 8 時間後に減少し始め、一方デポリメラーゼを欠損する変異体は実験の終了まで P H A の蓄積を維持した。

## 【 0 0 7 7 】

P p Uの2つのP H Aシンターゼが、P h a C 2は3 - ヒドロキシヘキサノイル - C o Aについての優先性を示し、P h a C 1は3 - ヒドロキシオクタノイル - C o Aに対して偏っているというわずかに異なる基質特異性を有することを考慮すると ( A r i a s e t t a l . , 2 0 0 8 )、P p U 1 0 - 3 3におけるP h a C 2ポリメラーゼの過剰発現が、生産されたポリマーのモノマー組成物および/または物理化学的性質を改変し得る可能性があった。表4は、N M Rによって決定されるように、P p U、P p U 1 0 - 3 3およびp h a Z欠失変異体によってオクタノ酸ナトリウム上で増殖の間に生産されるP H Aが類似した組成物を有し、3 - ヒドロキシオクタノアート ( 9 1 . 4 ~ 9 2 . 5 % m o l ) および3 - ヒドロキシヘキサノエート ( 7 . 5 ~ 8 . 6 % m o l ) からなるP ( 3 - ヒドロキシオクタノアート - c o - 3 - ヒドロキシヘキサノエート ) のコポリマーであったことを示す。

表4：異なる株からのP H Aの物理化学的特性

株	<sup>a</sup> Mn (kDa)	<sup>b</sup> Mw (kDa)	<sup>c</sup> PI	<sup>d</sup> Tg (℃)	<sup>e</sup> Tm (℃)	<sup>f</sup> Td (℃)	モノマー組成 (%mol)	
							3-HHx	3-HO
P p U	76.6	126.3	1.65	-35.90	61.40	294.03	8.6	91.4
P p U 1 0 - 3 3 N I	75.7	132.9	1.76	-35.92	59.68	294.93	7.5	92.5
P p U 1 0 - 3 3 I	74.9	141.1	1.88	-37.16	59.21	294.04	8.4	91.6
P p U 1 0 - 3 3 - Δ p h a Z N I	52.1	95.6	1.83	-40.82	59.60	293.84	8.6	91.4
P p U 1 0 - 3 3 - Δ p h a Z I	50.1	96.2	1.92	-36.09	61.57	293.65	8.7	91.3

ポリマーは、修飾MMオクタノエート35mM ( 15mMおよび20mMの2パルスで与えられる ) 中で培養されたP p U、P p U 1 0 - 3 3およびP p U 1 0 - 3 3 - p h a Zの非誘導 ( N I ) および誘導 ( I ) 細胞から得た。

<sup>a</sup>数平均分子量；<sup>b</sup>重量平均分子量；<sup>c</sup>多分散度指標 ( M w / M n ) ；<sup>d</sup>融解温度；<sup>e</sup>融合のエントルピー；<sup>f</sup>分解温度；3 - H H x = 3 - ヒドロキシヘキサノエート；3 - H O = 3 - ヒドロキシオクタノアート

## 【 0 0 7 8 】

さらに、3つのポリマーのガラス転移温度 ( T g - 3 5 . 9 ~ - 4 0 . 8 ) ( 表 4 ) は中鎖長 ( m c l ) - P H Aについて以前に記載されたTgに一致し、類似した融解温度 ( T m、59 ~ 61 ) を有し、類似した結晶性グレードを示す。

## 【 0 0 7 9 】

しかしながら、ポリマーは長さで異なっていた。P p U親株およびP p U 1 0 - 3 3 ( P h a C 2ポリメラーゼを過剰発現するコンストラクト ) からのポリマーの分子量 ( M w およびM nの値 ) は類似し、それぞれ126 ~ 142kDaおよび74 ~ 77kDaの範囲であるが、P h a Zノックアウトからのものはかなり低く、それぞれ96kDaおよび50kDaであった。

## 【 0 0 8 0 】

P p U、P p U 1 0 - 3 3 および P p U 1 0 - 3 3 - p h a Z における相対的 R T - P C R による p h a オペロンの転写解析

P H A ターンオーバーと p h a C 2 の過剰発現および p h a Z の不活性化との間の関係を調査するために、3つの株中の p h a クラスター（図2）の相対的 R T - P C R によって転写解析を実行した。R T - P C R データ正規化のための参照遺伝子は g l t A および p r o C 2 であった。

#### 【0081】

野生型において、2つの P H A ポリメラーゼ（P h a C 1 および P h a C 2）の転写量における主要な変化は、培養の最初の24時間の間に検出されず（ $P > 0.1$ ）、これには P H A 蓄積の安定した増加が伴っていた。しかしながら、p h a Z 転写における2倍の増加（ $P < 0.001$ ）は P H A 生産の開始に対応する4時間で測定され、次いでそれはより低いレベルへ低下した。48時間で、P H A 蓄積の最大レベルと相関して、p h a C 1 の転写における急速で本質的な増加（4.5倍、 $P < 0.0001$ ）および平行して p h a Z 転写活性における6倍の増加（ $P < 0.001$ ）が観察された。P H A 含有量（図2）ならびに p h a C 1 および p h a Z 転写量における急速な減少はこれに続いた。これらの結果は、一方では p h a C 1 転写と P H A 蓄積および他方では p h a Z 転写と P H A 移動の細かく調整されたカップリングを示す。

#### 【0082】

P p U 1 0 - 3 3 株の事例において、p h a C 2 遺伝子の発現は、予想されたように、培養期間を通じて（ $P < 0.008$ ）、特にそれがピークに達した時の48時間で（3.5倍の増加、 $P < 0.0001$ ）、P p U 親株よりも高いことが見出された。興味深いことには、この株における p h a C 1 の発現は、大半は、特に7時間、24時間および48時間での誘導培養において、P p U においてよりも低く、p h a C 2 の過剰発現が p h a C 1 の発現に負の影響を及ぼすことを示唆する（図2）。しかしながら、p h a C 2 の過剰発現が p h a C 1 の発現の減少をもたらしたにもかかわらず、合わせた細胞シンターゼ活性は P H A 生産の増加をもたらした。P p U 1 0 - 3 3 における p h a Z の転写レベルは、それがより高い時に（24時間を除いて）、親株におけるものに類似する傾向があり、p h a C 2 もまたより高い48時間よりも古い培養での p h a C 2 のより高い発現と相関し、P h a C 2 および P H A のより高いレベルと一致する。したがって P h a C 2 ポリメラーゼとデポリメラーゼ合成の強いカップリングもある。P p U 1 0 - 3 3 - D p h a Z 株において、野生型と比較した場合、p h a C 2 の有意に高い転写レベルが培養期間を通して観察され（ $P = 0.0005 \sim 0.017$ ）、それは、より高い P H A 収率が得られること（60% w t ~ 66% w t、図4を参照）と一致する。p h a C 1 の事例において、より高いレベルは24時間および38時間でも測定されたが、p h a C 2 が誘導された場合のみであった（ $P < 0.0017$ ）。したがって、p h a Z の不活性化は合成された P H A のターンオーバーおよびリサイクルを防止するだけでなく、P H A ポリメラーゼのより高い転写レベルも可能にする。

#### 【0083】

P p U 株からの P H A 回収のための溶媒抽出方法

修飾 P p U 株において生産された P H A のための抽出条件は、クロロホルム、ジクロロメタンおよびアセトンから選択される異なる溶媒システムにおいて調査した。抽出を2つの異なる温度（室温（R T）および80℃）で実行し、3回の抽出（30分、1時間、3時間および18時間）を使用した。この実験において使用される凍結乾燥細胞は、P . p u t t i d a U およびその派生物のための以下の標準的な培養条件に従って得られた。3つの株は200mlの培地を含有する1Lのフラスコ中で300および200rpmで72時間 M M + 0.1% の Y E 中で培養し、基質としてオクタン酸（10 + 20 mM）を使用した。変異株（P p U 1 0 - 3 3 および P p U 1 0 - 3 3 - p h a Z）は誘導されなかった。40mgの凍結乾燥したバイオマスのサンプルを抽出チューブ中に配置し、対応する溶媒中で再懸濁し、上記の異なる条件下で抽出した。P H A 回収のパーセンテージは最初の40mgの凍結乾燥されたバイオマスを参照する（表5）。クロロホルム（3時間お

10

20

30

40

50

よび 80 ) による古典的抽出を対照として使用した。

表5 異なる溶媒、抽出の時間および温度を使用するPHA回収(%wt)。

PpU		3時間-80℃	1時間-室温	3時間-室温	18時間-室温
	CHCl <sub>3</sub>	33.1±0.9	30.6±0.1	32.4±2.3	30.6±4.7
	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	34.4±2.0	31.5±0.7	30.7±0.6	31.6±2.5
	アセトン			21.3±1.5	25.1±0.5
PpU10-33		3時間-80℃	1時間-室温	3時間-室温	18時間-室温
	CHCl <sub>3</sub>	36.4±0.8	33.6±1.2	34.0±1.1	33.2±1.7
	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	30.0±2.8	34.3±3.2	34.1±1.9	34.4±2.3
	アセトン			26.8±2.5	27.9±1.7
PpU10-33ΔphaZ		3時間-80℃	1時間-室温	3時間-室温	18時間-室温
	CHCl <sub>3</sub>	58.8±3.2	56.2±2.0	58.0±0.2	56.9±2.3
	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	59.5±1.2	58.7±4.3	56.6±2.6	58.3±0.1
	アセトン			57.3±1.1	57.4±2.2

結果は三重の平均値±標準偏差である。CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:ジクロロメタンおよびCHCl<sub>3</sub>:クロロホルム

#### 【0084】

PpU10-33-phaZにおいて、条件の中では有意な差は観察されず、PHA回収のパーセンテージは56~59%wtの間の範囲だった。しかしながら、PpU(野生型)および単一の変異体において、アセトンが溶媒として使用された場合、PHA回収のパーセンテージは21~28%wtの間であり、一方他の溶媒については、回収のパーセンテージは約31~34%wtであった。

#### 【0085】

対照条件(クロロホルム、3時間および80 )については、PHA回収が最大値(100%)であったと推測して、株の中で任意の差があるかどうかを評価するために、PHA回収の相対的パーセンテージを計算した。抽出溶媒としてクロロホルムの事例においては、有意な差が株のうちのどれにも観察されなかった。しかしながら、PHA回収の相対的パーセンテージは、phaZ変異体においてわずかに高く(96~98相対%)、一方野生型および単一変異体については回収は約91~93相対%であった。

#### 【0086】

ジクロロメタンが溶媒として使用された場合、類似した挙動が観察された。phaZ変異体は96~100相対%の相対%のPHA回収を示し、一方2つの他の株は93~96相対%の間のPHA回収の値を示した。

#### 【0087】

アセトンを溶媒として使用した場合、最も有意な差を観察することができた。試験された溶媒の中で、アセトンは最も環境にやさしいものであるが、同時に恐らく最小の抽出能力の溶媒でもある。この後者の観点は、恐らく、二重変異体(PpU10-33-phaZ)と2つの他の株(PpUおよびPpU10-33)との間のPHA回収のパーセンテージの差異を説明する鍵であった。

#### 【0088】

phaZ変異体は最も高い回収の収率(97~98相対%)を示したものである。意

外にも、3時間または18時間の抽出後に差は観察されず、3時間の抽出は既に十分であることが示された。これとは対照的に、他の2つの株（P p UおよびP p U 10 - 33）において、P H A回収の相対的パーセンテージは3時間の抽出後にそれぞれ64相対%および74相対%に大幅に減少した。これらのパーセンテージは、野生型および単一変異体について18時間の抽出後にある程度に増加（それぞれ76相対%および78相対%まで）した。

#### 【0089】

著しいものは、相対的P H A回収パーセンテージにおける最も高い差異を示した、溶媒としてアセトンおよび抽出の短い時間（30分）により得られた結果であり、野生型（P p U）および単一変異体（P p U 10 - 33）について50～55相対%であり、二重変異体（P p U 10 - 33 - p h a Z）において86相対%であった。したがって、アセトンは、相対的P H A回収の最も高い収率を示した株である二重変異体（P p U 10 - 33 - p h a Z）で、その株が最も顕著な差を提示した溶媒である。

10

#### 【0090】

したがって、株P p U 10 - 33 - p h a Zについては、アセトンは、P H A回収プロセスにおいてクロロホルムを置き換えるために等しく良好であり環境にやさしい代替溶媒である。さらに、結果は、効果が細胞形態（すなわちP H A顆粒合体）によって大いに促進されることを示す。

#### 【0091】

P p U 10 - 33 - p h a Zの基質依存性P H A生産の最適化  
操作された株を3つの異なる培地（E 2、MM + 0.1% Y EおよびC - Y（2N））中で最初に培養し、8つの異なる基質を試験した（ヘキサノエート（C 6）、ヘプタノエート（C 7）、オクタノエート（C 8）、デカノエート（C 10）、10 - ウンデシノエート（C 11：1）、オレイン酸、リノール酸およびグリセロール）。培地は以下の組成物を有していた。

20

1. Vogel & Borner（1956, J. Biol. Chem. 218: 97 - 106）によって記載された、E 2培地。

2. Martinez - Blanco et al.（1990, J. Biol. Chem. 265; 7084 - 7090）によって記載された、MM培地 + 0.1% 酵母エキス。

30

3. Choi et al.（1994, Appl. Environ. Microbiol. 60: 3245 - 3254）によって記載された、通常または2倍（C - Y（2N））の窒素濃度（0.66および1.32 g / lの（NH<sub>4</sub>）<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>）のC - Y培地。

#### 【0092】

最も良好な結果がMM + 0.1% Y EおよびC - Y（2N）培地中で得られ、したがって、8つの基質を使用し、対照としてP. putida U野生型（P p U）を使用して、速度論的生産研究をこれらの2つの培地中で実行した。サンプルはすべての株 / 培地 / 基質の組み合わせで24時間ごとに採取して、バイオマスおよびP H A生産を決定した。試験された異なる培養条件に加えて収穫時間におけるP H A生産に関する最も良好な生産収率を表6中にまとめる。

40



表6 2つの異なる培地 (MM+0.1%のYEおよびC-Y (2N)) 中で培養した*P. putida* U (PpU)および操作された株PpU10-33-ΔphaZにより得られたバイオマスおよびPHAの生産収率。

	PpU				PpU10-33-ΔphaZ			
MM+0.1%YE								
基質	時刻 (時間)	CDW (g/L)	PHA (g/L)	PHA (%wt)	時刻 (時間)	CDW (g/L)	PHA (g/L)	PHA (%wt)
C6 (10+20mM)	72	1.69	0.04	2.4	72	1.65	0.15	9.1
C7 (10+20mM)	72	1.38	0.23	16.7	72	2.04	0.67	32.8
C8 (10+20mM)	48	2.56	1.05	41.0	48	3.25	1.82	56.0
C10 (10+20mM)	72	3.40	1.14	33.5	72	2.49	1.21	48.6
C11:1 (27mM)	72	0.46	0.26	56.5	72	0.42	0.23	54.8
グリセロール (3%)	96	6.68	1.00	15.0	96	6.44	1.35	21.0
グリセロール (4%)	120	6.09	0.78	12.8	120	6.31	1.44	22.8
オレイン酸 (1%)	96	5.90	2.09	35.4	96	5.73	2.33	40.7
リノール酸 (1%)	72	4.75	1.28	26.9	72	5.78	2.47	42.7
C-Y (2N)								
基質								
C6 (10+20mM)	72							
C7 (10+20mM)	72							
C8 (10+20mM)	24							
C10 (10+20mM)	24							
C11:1 (27mM)	96							
グリセロール (3%)	120	3.97	0.31	7.8	120	4.09	0.64	21.0
グリセロール (4%)	120	4.94	0.55	11.1	120	6.31	1.18	23.0
オレイン酸 (1%)	72	5.18	1.48	28.6	96	4.82	1.99	41.2
リノール酸 (1%)	96	5.68	1.72	30.3	96	4.21	1.51	35.7

C6 : ヘキサノエート ; C7 : ヘプタノエート ; C8 : オクタノエート ; C10 ; デカノエート ; C11 : 1 : 10 - ウンデシノエート。

【0093】

試験された大部分の基質において、P H A 生産は野生型よりも操作された株においてより高く、6 % ~ 3 0 0 % の範囲の増分を得た。炭素源としてヘキサノエートまたは 1 0 - ウンデシノエートを含む両方の培地中で培養した場合、P p U - 1 0 - 3 3 - p h a Z は劣ったポリマー生産を示した。これとは対照的に、基質としてデカノエートを使用する C - Y ( 2 N ) 中で P p U 1 0 - 3 3 - p h a を増殖させた場合、P H A 生産の有意な増加が観察され、同じ炭素源を含む M M + 0 . 1 % Y E において得られた P H A 収率よりも多い P H A 収率であった。二重変異体は、C - Y ( 2 N ) 中で培養した場合 2 4 時間で最大 2 . 4 8 g / L ( 5 3 . 0 % w t ) の P H A を蓄積することができ、一方 M M + 0 . 1 % Y E 中では 1 . 2 1 g / L ( 4 8 . 6 % w t ) の P H A を生産するのに最大 7 2 時間かかった。これとは対照的に、オクタノエートを使用して P p U - 1 0 - 3 3 - p h a Z を培養した場合、類似した生産レベルが得られ、両方の培地において 1 . 8 2 ~ 1 . 8 6 g / L ( 5 5 . 0 ~ 5 6 . 0 % w t ) の P H A 生産を達成した。

10

#### 【 0 0 9 4 】

一般に、グリセロール、オレイン酸およびリノール酸における P H A ピーク生産には、より長い培養時間が要求された。グリセロールの事例において、変異体の P H A 蓄積は野生型よりも高かった（それぞれ 2 1 ~ 2 3 % w t 対 8 ~ 1 5 % w t ）。類似したパターンはオレイン酸および（部分的に）リノール酸で観察され、後者の基質の両方は一般的にはより高いパーセンテージの P H A 蓄積（ 3 5 ~ 4 2 % w t ）を可能にしたが、たとえ野生型（ 8 ~ 1 5 % w t ）に関して有意な増加があったとしても、P H A 生産は試験された他の基質と比較してより低かった。

20

#### 【 0 0 9 5 】

株 P p U - 1 0 - 3 3 - p h a Z は、M M + 0 . 1 % Y E / オクタノエート、M M + 0 . 1 % Y E / オレイン酸および C - Y ( 2 N ) / デカノエート中で培養した場合、最も高い P H A 収率を示した。これらの 3 つの培地 / 基質組み合わせのうちのどれでも、P H A 生産を促進するために、小規模な（ 5 L ）ベンチトップバイオリクターへとスケールアップするのに適した候補である。

#### 【 0 0 9 6 】

抗生物質圧の非存在下における P H A 生産の調査

プロセスのスケールアップを促進し発酵のコストを低下させるために、抗生物質圧下での変異株の維持を研究した。操作された株はリファンピシン（ R f ）、カナマイシン（ K m ）およびテルライト（ T e l l ）下で通常維持した。テルライト（ T e l l ）の存在および培養中でのその酸化は液体培地の黒化を誘発し、バイオマス測定および回収に影響を与える。したがって、以下の調査において、抗生物質を培養から省略した。テルライトの存在および非存在下で培養を実行して、生産収率に対するその効果を評価した。調査は変動が検出されないことを示した。さらに、バイオマスおよびポリマー生産におけるリファンピシンおよびカナマイシンの存在の影響を研究するために、それぞれの抗生物質（野生型についてリファンピシン（ R f ）および操作された株についてリファンピシン + カナマイシン（ R f + K m ）の組み合わせ）の存在および非存在下で、基質としてオクタノエートを使用して、無機培地 M M + 0 . 1 % Y E 中で、野生型および操作された株を培養した。これらの調査の結果を図 5 中に示す。

30

40

#### 【 0 0 9 7 】

差異はバイオマスおよびポリマー生産において観察されず、抗生物質の存在または非存在が生産収率へ影響しないことを意味した。加えて、操作された株の遺伝子型は抗生物質の非存在によって修飾されないことが確かめられた。以前に記載されたように両方の株を抗生物質なしで培養した。4 8 時間および 7 2 時間で、各々の培養の希釈物を抗生物質なしの L B プレートにプレーティングし、3 0 で 2 4 時間インキュベーション後に、5 0 コロニーを取り、L B プレート + 抗生物質上にストリークし、3 0 で 2 4 時間インキュベーションして各々の株における耐性パターンの維持を検証した。インキュベーション後に、すべてのコロニーは抗生物質を含むプレートで増殖し、それは抗生物質の非存在が耐性表現型に影響しないことを示し、したがって耐性遺伝子型は操作された株において保た

50

れるはずである。

【 0 0 9 8 】

得られた結果は、抗生物質 ( R f + K m ) 圧およびテルライトなしでの二重変異体 ( P p U 1 0 - 3 3 - p h a Z ) の培養は P H A 生産に影響しないことを示す。

参考文献：

- Arias S., Sandoval, A., Arcos, M., Canedo, .L., Naharro, G., and Luengo, J.M. (2008) *Micro Biotech* 1 : 170-176.
- Bassas, M. (2010) Isolation and Analysis of Storage Compounds. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology: Experimental Protocols and Appendices*. Timmis K.N. (ed.). Berlin : . Springer Verlag, pp. 3725-3741. 10
- Castaneda, M., Guzman, J., Moreno, S., and Espin, G. (2000) *J Bacteriol* 182: 2624-2628.
- Choi, J., Lee, S.Y. (1997) *Bioprocess Eng.* 17: 335-342.
- Conte, E., Catara, V., Greco, S., Russo, M., Alicata, R., Strano, L., Lombardo, A., Di Silvestro, S., and Catara, A. (2006) *Appl Microbiol Biotechnol* 72: 1054-1062.
- de Eugenio, L.I., Escapa, I.F., Morales, V., Dinjaski, N., Galan, B., Garcia, J. L., Prieto, M.A. (2010a). *Environ Microbiol* 12 207-221.
- de Eugenio, L.I., Galan, B., Escapa, I .E., Maestro, B., Sanz, J.M., Garcia, J.L , Prieto, M.A. (2010b) *Environ Microbiol* 12: 1591-1603. 20
- Diederich, L., Roth, A., and Messer, W. (1994) *Bio Techniques* 16: 916-923.
- Donnenberg, M.S., and Kaper, J.B. (1991) *Infect Immun* 59: 4310-4317.
- Galan, B., Dinjaski, N., Maestro, B., de Eugenio, L.I., Escapa, I.E., Sanz, J.M., Garcia, J.L., Prieto, M.A. (2011) *Mol Microbiol* 79:402-418.
- Grage, K., Jahns, A.C., Pariane, N., Palanisamy, R., Rasiah, I.A., Atwood, J.A., Rehm, B.H. (2009) *Biomacromolecules* 10: 660-669.
- Harayama, S., Rekik, M., Wubbolts, M., Rose, K.R., Leppik, R.A. and Timmis, K.N. (1989) . *J Bacterioi* 171 :5048-5055.
- Herrero, M., de Lorenzo, V., and Timmis, K.N. (1990) *J Bacterioi* 172: 6557-6567. 30
- Herrero, M., de Lorenzo, V., Ensley, B., and Timmis, K.N. (1993) *Gene* 134: 103-106.
- Hoffmann, N., and Rehm, B.H . (2005) *Biotechnol Lett* 27: 279-282.
- Hrabak, O. (1992) *FEMS Microbiol. Rev.* 103: 251-256.
- Huisman, G. W., Wonink, E., Meima, R., Kazemier, B., Terpstra, P., and Witholt, B, (1991) *J Biol Chem* 266: 2191-2198.
- Kessler, B., and Witholt, B. (2001) *J Biotechnol* 86: 97-104.
- Kraak, M.N., Kessler, B., and Witholt, B. (1997) *Eur Biochem* 250: 432-439.
- Luengo, J. M., Garcia, B., Sandoval, A., Naharro, G., Olivera, E.R. (2003) *Curr Opin Microbiol* 6: 251-260. 40
- Madison, L. L., and Huisman, G.W. (1999) *Microbiol Mol Biol Rev* 63 : 21-53.
- Martinez-Bianco, H., Reglero, A., Rodriguez-Aparicio, L.B., and Luengo, J.M. (1990). *J Biol Chem.* 265: 7084-7090.
- Prieto, M.A., Bihler, B., Jung, K., Witholt, B., and Kessler, B. (1999a) *J Bacterioi* 181: 858-868.
- Prieto, M .A., Kellerhals, M.B., Bozzato, G.B., Radnovic, D., Witholt, B., and Kessler, B. (1999b) *Appl Environ Microbiol* 65: 3265-3271.
- Quant, J., and Hynes, M.P. (1983) *Gene* 127: 15-21.
- Ren, Q., de Roo, G., Ruth, K., Witholt, B., Zinn, M., Thdny-Meyer, L, (2009a) *Biomacromolecules* 10: 916-22. 50

- Ren, Q., de Roo, G., Witholt, B., Zinn, M., and Thony-meyer, L. (2010) BMC Microbiol 10; 254.
- Sambrook, J., and Russell, D.W. (2001) Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y: CSHL Press.
- Sanchez-Romero, J.M., Diaz-Orejas, R., and de Lorenzo, V. (1998) Appl Environ Microbiol 64; 4040-4046.
- Selvaraj, J., and Iyer, V.N. (1983) J Bacteriol 156: 1292-1300.
- Solalman, D.K., Ashby, R.D., and Foglia, T.A. (2003) Appl Microbial Biotechnol 62: 536-543.
- Spurr, A. R. (1969) J. Ultrastruct Res 26: 31-43.
- Steinbuchel, A. Polyhydroxyalkanoic acids in Biomaterials, D. Byrom, ed., MacMillan Publishers, Basingstoke (1991), p. 123 ff.
- Steinbuchel, A., Aerts, K., Babel, W., Follner, C, Liebergesell, M., Madkour, M. H., et al, (1995) Can J Microbiol 41 : 94-105.
- Uchino, K., Saito, T., Gebauer, B., Jendrossek, D. (2007) J Bacteriol 189: 8250-8256.
- Williams and Peoples (1996) Chemtech 26, 38-44.
- York, G.M., Stubbe, J., and Sinskey, A.J. (2002) J Bacteriol 184: 59-66.

10

20

添付書類1：使用した株、変異体およびプラスミド

ベクターおよびコンストラクション	記載	参照文献
RK600	Cm <sup>R</sup> , oriColE1, oriV, RK2mob <sup>+</sup> tra <sup>+</sup> 、三親接合事象におけるヘルパープラスミド。	Herrero et al., 1990
pUC18Not/T7	Ap <sup>R</sup> , oriColE1, lacZα+, プロモーターlac, pUC18NotIに派生するベクターであり、その中には合成T7プロモーター配列がポリリンカーのEcoRI部位から導入される。	Herrero et al., 1993
pCNB1mini-Tn5xylS/Pm::T7pol	Km <sup>R</sup> , tnp <sup>-</sup> , xylSPmプロモーター、T7 RNAポリメラーゼ。 Tel <sup>R</sup> , tnp <sup>-</sup> 。	Harayama et al., 1989; Herrero et al., 1993
pUTminiTn5-Tel	Tel <sup>R</sup> , tnp <sup>-</sup> 。	Sanchez-Romero et al., 1998
pGEM®-T Easy	Ap <sup>R</sup> , oriColE1, lacZα+, SP6 T7, lacプロモーター。	PROMEGA
pJQ200 (KS/SK)	Gm <sup>R</sup> , ori p15A, Mob+, lacZα+, sacB、二重組換え事象による欠失の生成のために使用されるベクター。	Quandt & Hynes, 1993
pBBR1MCS-5	Gm <sup>R</sup> , oriBBR1, Mob+, lacZα+, プロモーターlac、広い宿主範囲のクローニングと発現用のベクター。	Kovach et al., 1995
pBBR1MCS-3-phaC2	位置-26~+1832のATGからのphaC1のpGEMT Easyインサートを、制限部位SacII-SacIを使用してpBBR1MCS-3ベクターの中へクローニングした。Tc <sup>R</sup> 。	Arias et al., 2008
pUC18Not/T7-phaC2	pBBR1MCS-3-phaC2コンストラクトから切り取られ、制限部位EcoRIを使用してクローニングされたphaC2を含む、pUC18/Not/T7。	本研究
pUTminiTn5-Tel-T7phaC2	pUC18/Not/T7-phaC2からNotIカセットとして切り取られたT7プロモーターphaC2を含む、mini-Tn5-Tel。	本研究
pMS-phaC1C2-0941347	PhaC1シンターゼおよびPhaC2シンターゼをコードする合成DNAカセット (3531bp) を含み、HindIIIおよびKpnIの制限部位の中へクローニングしたpMSベクター。Sm <sup>R</sup> 。	本研究 (GENEART AG)
pJQ200SK-phaC1C2	位置-106~+3383のATGからのphaC1の合成DNAインサートを、制限部位NotIを使用して、pJQ200SKの中へクローニングした。	本研究
pBBR1MCS-5-phaZ	位置-27~+890のATGからのphaZのpGEMT Easyインサートを、pBBR1MCS-5のKpnI-XbaI部位の中へクローニングした。	本研究
株		
E. coli DH10B	F <sup>-</sup> , mcrA, Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80dlacZ1M15, ΔlacX74, deoR, recA1, endA1, araD139, Δ(ara-leu) 7697, galU, galK, λ <sup>-</sup> , rpsL, nupG。	Invitrogen
E. coli CC18λpir	F <sup>-</sup> , Δ(ara-leu), araD, ΔlacX74, galE, galK, phoA20, thi-I, rps-I, rpoB, argE (Amp), recA, thi pro hsdRM+, RF4-2-Tc (λpirファージにより溶原化されたCC18)	Herrero et al., 1990
PpU	P. putida U株 (CECT4848), Rf <sup>R</sup> 。	Martinez-Blanco et al., 1990
PpU-pCNB1mini-Tn5xylS/Pm::T7	pCNB1mini-Tn5xylS/Pm::T7polベクターを含有する、P. putida U。Km <sup>R</sup> Rf <sup>R</sup> 。	本研究
PpU10-33	pCNB1mini-Tn5xylS/Pm::T7polおよびpUTmini-Tn5-Tel-phaC2を含有する、P. putida U。Km <sup>R</sup> Tel <sup>R</sup> Rf <sup>R</sup> 。	本研究
ΔphaZ-PpU10-33	phaZを欠損したPpU10-33。Km <sup>R</sup> Tel <sup>R</sup> Rf <sup>R</sup> 。	本研究
pMC-PhaZ	phaZ遺伝子によって相補された、ΔphaZ PpU10-33 (pBBR1MCS-5-phaZ-1-ΔphaZ-PpU10-33)。Gm <sup>R</sup> Km <sup>R</sup> Tel <sup>R</sup> Rf <sup>R</sup> 。	本研究

10

20

30

40

添付書類2：本研究におけるPT-PCRアッセイのために用いられるオリゴヌクレオチドのリスト。番号（<sup>1</sup>・<sup>2</sup>）は、それぞれP. putida KT2440またはP. putida UからのDNAがテンプレートとして使用されたかを示す。

遺伝子	フォワードプライマー（5'→3'）	リバースプライマー（5'→3'）
<sup>1</sup> 16SリボソームDNA（16SrDNA）	ACGATCCGTAAC TGGTCTGA	TTCGCACCTCAG TGTCAAGTA
<sup>1</sup> クエン酸シンターゼ（glpA）PP_4194	GCCGATTTTCATC CAGCATGGTC	TGGACCGGATCT TCATCCTCCA
<sup>1</sup> リボソームタンパク質S12（rpsL）PP_0449	GGCAACTATCAA CCAGCTGGT	GCTGTGCTCTTG CAGGTTGTG
<sup>1</sup> グリセルアルデヒド3-ホスフェート脱水素酵素（gap-1）PP_1009	CTTGAGGTTGAC GGTGAGGTC	AGGTGCTGACTG ACGTTTACCA
<sup>1</sup> シグナル認識粒子タンパク質Ffh（ffh）PP_1461	CGGTAGTCAAGG ATTTCTGTCAAC	CACCATCACGCT CTTTTTCTTG
<sup>1</sup> ロッド形状決定タンパク質（rod shape-determining protein）MreB（mreB）PP_0933	CGTGAAGTGTTT CTGACGAAG	CCGATTTCTCTGC TTGATACGTT
<sup>1</sup> 細胞分裂タンパク質FtsZ（ftsZ）PP_1342	CGGTATCTCCGA CATCATCATCAA G	GAGTACTCACCC AGCGACAGGT
<sup>1</sup> ピロリン-5-カルボキシレートレダクターゼ1（prc1）PP_3778	GCATTTTACCAGC CCTTTGAAGC	CAATGACGAAAG GCAAATCGAC
<sup>1</sup> ピロリン-5-カルボキシレートレダクターゼ2（prc2）PP_5095	CTCCCAACTGAC CTTGACAGAC	GCTCCTTATTTG CCCAGTTGTTT
<sup>2</sup> PHAシンターゼ1（phaC1）	GCATGTGGCCCA CTTTGGC	CCCAGGTTCTTG CCCAGTT
<sup>2</sup> PHAデポリメラーゼ（phaZ）	AGCAGTTTGGCC ACGACTACC	GGTGGATCTTGT GCAGCCAGT
<sup>2</sup> PHAシンターゼ2（phaC2）	GGCAACCCCAAG GCCTACTAC	CCGAGCGGTGGA TAGGTAAGT
<sup>2</sup> ファジンPhaF（phaF）	GTCAGCTTCTCG ATCTGCTTGGT	GAAGAAGACGGC TGAAGATGTAGC
<sup>2</sup> ファジンPhaI（phaI）	CTCTTTTGTGAT GCGTTTCTTG	CATGGCCAAAGT GATTGTGAAG
<sup>2</sup> PhaD転写調節因子（phaD）	GAACGTATCCAC CCTGGAGATT	ATAAGGTGCAGG AACAGCCAGTAG
<sup>2</sup> 長鎖脂肪酸CoAリガーゼ1（fadD1）	CGTGATCAAGTA CGTGAAGAAGAT G	GTGAAGGCGTAG ATGTGGTACAG
<sup>2</sup> 長鎖脂肪酸CoAリガーゼ1（fadD1）	GCTGTACCACAT CTATGCCTTCAC	GCCGGAGTTGGT GACTTTCAG

10

20

30

40

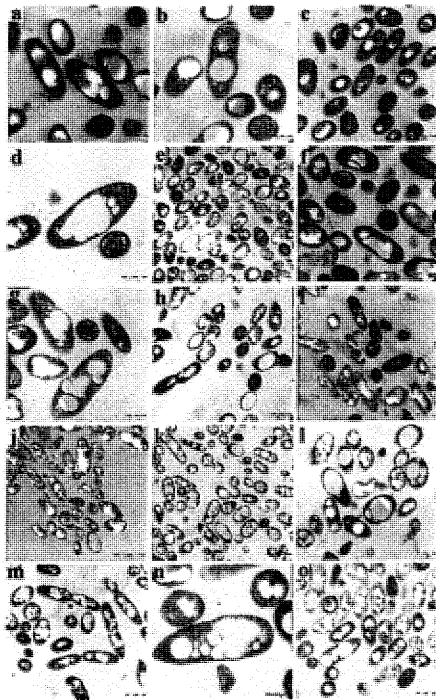
添付書類 3：使用される追加のオリゴヌクレオチドのリスト

プライマー	配列 (5' 3')
M13 F	GTAAAACGACGGCCAG
M13 r	AGGAAACAGCTATGAC
PhaC1-check-F	GAATCGGTTGTGAAACTCATGCTC
PhaC2-check-R	CCTTGCCATGGAAGTGGTACAG
RT-phaZF_PpU	AGCAGTTTGCCACGACTACC
RT-phaZR_PpU	GGTGGATCTTGTGCAGCCAGT
phaZ-F-KpnI	GGGGTACCCCCACTTTTTCACGACAGAGTCGAACG
phaZ-R-KbaI	GCTCTAGAGCGCAACACTCCCTCGTCTTACC

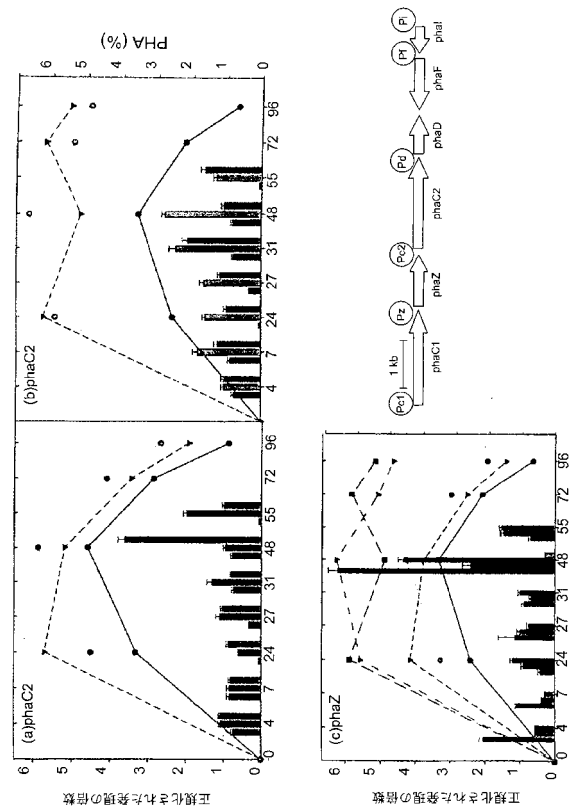
10

【図 1】

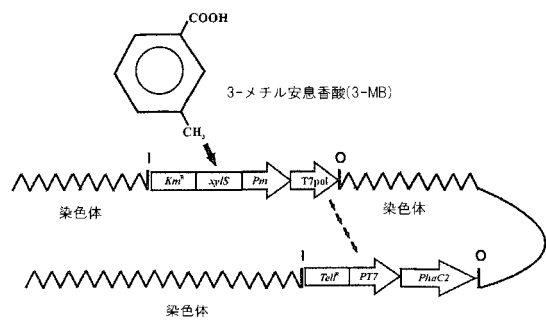
Figure 1



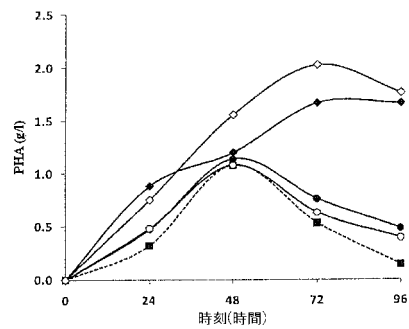
【図 2】



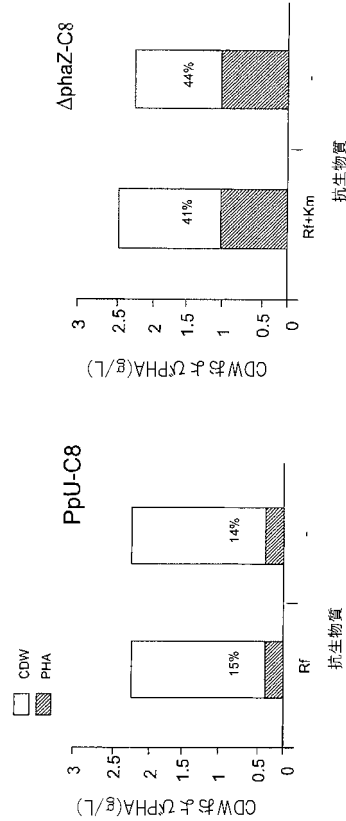
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】





## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2013/057630

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12P7/62 C12N9/10 C12N9/18 C12N1/20  
ADD.

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)

C12N C12P C12R

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

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

EPO-Internal, WPI Data, Sequence Search, BIOSIS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99/14313 A2 (METABOLIX INC [US]) 25 March 1999 (1999-03-25) Whole document, especially claims 1-8 -----	1,2,12, 13,15
X	DE 44 17 169 A1 (VOGELBUSCH GMBH [AT]) 23 November 1995 (1995-11-23) The whole document, especially claim 1. ----- -/--	1,2,12, 13,15

☒ 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

17 June 2013

Date of mailing of the international search report

24/06/2013

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel: (+31-70) 340-2040,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Kools, Patrick

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2013/057630

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	T.-K. KIM ET AL: "Metabolic Engineering and Characterization of phaC1 and phaC2 Genes from <i>Pseudomonas putida</i> KCTC1639 for Overproduction of Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoate", BIOTECHNOLOGY PROGRESS, vol. 22, no. 6, 1 December 2006 (2006-12-01), pages 1541-1546, XP055036735, ISSN: 8756-7938, DOI: 10.1021/bp0601746 Whole document, especially figure 2 -----	1-3,7-15
X	QI QINGSHENG ET AL: "Synthesis of poly (3-hydroxyalkanoates) in <i>Escherichia coli</i> expressing the PHA synthase gene phaC2 from <i>Pseudomonas aeruginosa</i> : Comparison of PhaC1 and PhaC2", FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, vol. 157, no. 1, 1 December 1997 (1997-12-01), pages 155-162, XP002682603, ISSN: 0378-1097 the whole document -----	1-3,7-15
Y	CAI L ET AL: "Enhanced production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates (PHA) by PHA depolymerase knockout mutant of <i>Pseudomonas putida</i> KT2442", BIORESOURCE TECHNOLOGY, ELSEVIER BV, GB, vol. 100, no. 7, 1 April 2009 (2009-04-01), pages 2265-2270, XP025868462, ISSN: 0960-8524, DOI: 10.1016/J.BIORTECH.2008.11.020 [retrieved on 2009-01-07] abstract -----	4-6
Y		4-6
A	SATOSHI TOMIZAWA ET AL: "Molecular Weight Change of Polyhydroxyalkanoate (PHA) Caused by the PhaC Subunit of PHA Synthase from <i>Bacillus cereus</i> YB-4 in Recombinant <i>Escherichia coli</i> ", BIOMACROMOLECULES, vol. 12, no. 7, 11 July 2011 (2011-07-11), pages 2660-2666, XP055036738, ISSN: 1525-7797, DOI: 10.1021/bm2004687 the whole document ----- -/--	1-15

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2013/057630

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>KIM DO YOUNG ET AL: "Biosynthesis, modification, and biodegradation of bacterial medium-chain-length polyhydroxyalkanoates.", JOURNAL OF MICROBIOLOGY (SEOUL, KOREA) APR 2007 LNKD- PUBMED:17483792, vol. 45, no. 2, April 2007 (2007-04), pages 87-97, XP002682604, ISSN: 1225-8873 the whole document -----</p>	1-15

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2013/057630

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9914313	A2	25-03-1999	AT 323152 T 15-04-2006
		AU 725516 B2 12-10-2000	
		AU 9496898 A 05-04-1999	
		CA 2303070 A1 25-03-1999	
		DE 69834199 T2 14-12-2006	
		DE 69838768 T2 30-10-2008	
		EP 1015565 A2 05-07-2000	
		JP 2001516574 A 02-10-2001	
		JP 2003310262 A 05-11-2003	
		JP 2009082147 A 23-04-2009	
		JP 2009171960 A 06-08-2009	
		US 6316262 B1 13-11-2001	
		US 2002187530 A1 12-12-2002	
		US 2004137586 A1 15-07-2004	
		US 2006084155 A1 20-04-2006	
		US 2010093043 A1 15-04-2010	
		US 2011008856 A1 13-01-2011	
		WO 9914313 A2 25-03-1999	
-----			
DE 4417169	A1	23-11-1995	NONE
-----			

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(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), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), 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, 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, PA, 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

(72)発明者 バッサス, モニカ

スペイン国 0 8 3 5 8 バルセロナ アレニス デ ムント カレッテラ サント セロニ 3  
7

(72)発明者 モリナリ, ガブリエラ

ドイツ連邦共和国 3 8 3 0 4 ヴォルフエンビュッテル マンツィヌスヴェーグ 4 3

(72)発明者 ティメス, ケネス・ナイジェル

ドイツ連邦共和国 3 8 3 0 0 ヴォルフエンビュッテル シュトベンシュトラーク 5

Fターム(参考) 4B024 AA03 DA05 DA06 EA04 GA11

4B064 AD83 CA02 CA19 CC24 DA20

4B065 AA01X AA04X AA12X AA14X AA41X AA42X AA43X AA44X AA45X AB01

AC14 BA02 BB08 CA12