(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
2019年7月25日(25.07.2019)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2019/142717 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 15/60 (2006.01) *C12N 9/88* (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01) *C12P 7/62* (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2019/000453

(22) 国際出願日： 2019年1月10日(10.01.2019)

(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 2018-004678 2018年1月16日(16.01.2018) JP

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

(72) 発明者: 小林 新吾(**KOBAYASHI, Shingo**). 吉田 慎一(**YOSHIDA, Shinichi**). 佐藤 俊輔(**SATO, Shunsuke**). 田岡 直明(**TAOKA, Naoaki**).

(74) 代理人: 特許業務法人 有古特許事務所 (**PATENT CORPORATE BODY ARCO PATENT OFFICE**); 〒6500031 兵庫県神戸市中央区東町１２３番地の１ 貿易ビル３階 Hyogo (JP).

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

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(54) **Title:** MUTANT POLYHYDROXYALKANOIC ACID SYNTHASE, GENE AND TRANSFORMANT THEREOF, AND METHOD FOR PRODUCING POLYHYDROXYALKANOIC ACID

(54) 発明の名称： 変異型ポリヒドロキシアルカン酸合成酵素、その遺伝子および形質転換体、並びに、ポリヒドロキシアルカン酸の製造方法

(57) **Abstract:** Provided is a mutant PHA synthase that achieves production of a PHA copolymer having a high or low 3HH ratio while maintaining PHA productivity. Mutant polyhydroxyalkanoic acid synthase having an amino acid sequence that exhibits 85% or more sequence identity with an amino acid sequence shown by SEQ ID NO: 1 and that includes one or more mutations from among (a)-(c) below. Mutation (a): a mutation in which serine 389 from the N-terminal of the amino acid sequence shown by SEQ ID NO: 1 is substituted by an amino acid other than serine; mutation (b): a mutation in which leucine 436 from the N-terminal of the amino acid sequence shown by SEQ ID NO: 1 is substituted by an amino acid other than leucine; mutation (c): a mutation in which 11-19 amino acid residues are deleted from the C-terminal of the amino acid sequence shown by SEQ ID NO: 1.

(57) 要約： ＰＨＡの生産性を維持したまま、３ＨＨ比率が高い又は低いＰＨＡ共重合体の製造を実現する変異型ＰＨＡ合成酵素の提供。配列番号１で示されるアミノ酸配列と８５％以上の配列同一性を示し、かつ、下記（ａ）～（ｃ）のいずれか１以上の変異を含むアミノ酸配列を有する、変異型ポリヒドロキシアルカン酸合成酵素。 変異（ａ）：配列番号１で示されるアミノ酸配列のＮ末端から３８９番目のセリンが、セリン以外のアミノ酸に置換された変異 変異（ｂ）：配列番号１で示されるアミノ酸配列のＮ末端から４３６番目のロイシンが、ロイシン以外のアミノ酸に置換された変異 変異（ｃ）：配列番号１で示されるアミノ酸配列のＣ末端から１１個以上１９個以下のアミノ酸残基が欠失された変異

WO 2019/142717 A1

［続葉有］

添付公開書類：

一　国際調査報告（条約第21条(3)）

一　明細書の別個の部分として表した配列リスト
（規則5.2(a)）

明　細　書

発明の名称 ：

変異型ポリヒドロキシアルカン酸合成酵素、その遺伝子および形質転換体、並びに、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、変異型ポリヒドロキシアルカン酸合成酵素、該酵素をコードする遺伝子、該遺伝子を有する形質転換体、及び該形質転換体を用いたポリヒドロキシアルカン酸の製造方法に関する。

背景技術

[0002] ポリヒドロキシアルカン酸（Ｐｏｌｙｈｙｄｒｏｘｙａｌｋａｎｏａｔｅ；以下、「ＰＨＡ」と略す）は、多くの微生物種の細胞内にエネルギー貯蔵物質として生産、蓄積される熱可塑性ポリエステルである。微生物によって様々な天然の炭素源から生産されるＰＨＡは、土中や水中の微生物により完全に生分解される環境調和型のプラスチックである。

[0003] ＰＨＡとして、３－ヒドロキシ酪酸（３－ｈｙｄｒｏｘｙｂｕｔｙｒａｔｅ；以下、「３ＨＢ」と略す）のホモポリマーであるポリヒドロキシブチレート（Ｐｏｌｙ－３－ｈｙｄｒｏｘｙｂｕｔｙｒａｔｅ；以下、「ＰＨＢ」と略す）が知られているが、ＰＨＢは高結晶性であり、結晶化度が高いため硬くて脆く、また、溶融加工性が低いという問題点を有している。

[0004] ＰＨＢの脆性や溶融加工性が改善されたＰＨＡとしては、３ＨＢと３－ヒドロキシヘキサン酸（３－ｈｙｄｒｏｘｙｈｅｘａｎｏａｔｅ；以下、「３ＨＨ」と略す）の共重合ポリエステルＰｏｌｙ（３ＨＢ－ｃｏ－３ＨＨ）（以下、「ＰＨＢＨ」と略す）が報告されている。ＰＨＢＨは、３ＨＨをモノマーユニットとして有することで、ＰＨＢと比べて結晶化度が低くなり、しやなかで柔らかい物性を有する共重合体である。

[0005] ＰＨＢＨの製造方法としては、土壌細菌カプリアヴィダス　ネカトール（Ｃｕｐｒｉａｖｉｄｕｓ　ｎｅｃａｔｏｒ）を宿主としてアエロモナス　キ

ャビエ（Ａｅｒｏｍｏｎａｓ　ｃａｖｉａｅ）由来のＰＨＡ合成酵素を導入した形質転換体を用いた発酵生産によるものが報告されているが、ＰＨＢＨの柔軟性を高めるため、ＰＨＢＨにおける３ＨＨ比率を高める検討が行なわれている。

[0006] 非特許文献１及び２では、ＰＨＢＨにおける３ＨＨ比率を高めるために、ＰＨＡ合成酵素に変異を導入する方法が検討されている。具体的には、非特許文献１では、Ａ．ｃａｖｉａｅ由来のＰＨＡ合成酵素に対し、１４９番目のアスパラギンのセリンへの置換、または、１７１番目のアスパラギン酸のグリシンへの置換という変異を導入することによって、ＰＨＡ合成酵素の活性と３ＨＨ－ＣｏＡに対する基質特異性が向上して、最大１８モル％の３ＨＨ比率を有するＰＨＢＨを製造できることが報告されている。

[0007] さらに非特許文献２では、この二つの変異を重複させたＰＨＡ合成酵素（以下、「ＮＳＤＧ」と略す）によって、さらに３ＨＨ比率の高いＰＨＢＨを生産できることが報告されている。

先行技術文献

非特許文献

[0008] 非特許文献1：Ｔ．Ｋｉｃｈｉｓｅ，Ｓ．Ｔａｇｕｃｈｉ，Ｙ．Ｄｏｉ，Ａｐｐｌ．Ｅｎｖｉｒｏｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．，６８，ｐｐ．２４１１－２４１９（２００２）

非特許文献2：Ｔ．Ｔｓｕｇｅ，Ｓ．Ｗａｔａｎａｂｅ，Ｄ．Ｓｈｉｍａｄａ，Ｈ．Ａｂｅ，Ｙ．Ｄｏｉ，Ｓ．Ｔａｇｕｃｈｉ，ＦＥＭＳ　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．Ｌｅｔｔ．，２７７，ｐｐ．２１７－２２２（２００７）

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] 現在、形質転換体の培養によって生産できるＰＨＡ共重合体の３ＨＨ比率は限定的である。また好ましい物性を有するＰＨＡを製造するためには、３ＨＨ比率は高いほど良いとは限らないため、３ＨＨ比率を高位又は低位に自

在に調節する技術が必要である。このため、３ＨＨ比率がより高い又は低いＰＨＡ共重合体を製造できるＰＨＡ合成酵素ライブラリーの構築が望まれている。

[0010] そこで、本発明は、ＰＨＡの生産性を維持したまま、３ＨＨ比率が高い又は低いＰＨＡ共重合体の製造を実現する変異型ＰＨＡ合成酵素、該酵素をコードする遺伝子、該遺伝子を有する形質転換体、及び、該形質転換体を用いたＰＨＡの製造方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0011] 本発明者らは上記課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、ＰＨＡ合成酵素の３８９番目のセリンに対する変異導入、４３６番目のロイシンに対する変異導入、又は、Ｃ末端領域の欠失によって、ＰＨＡの生産性を維持したまま、３ＨＨ比率が異なるＰＨＡ共重合体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] すなわち、本発明は、配列番号１で示されるアミノ酸配列と８５％以上の配列同一性を示し、かつ、下記（ａ）～（ｃ）のいずれか１以上の変異を含むアミノ酸配列を有する、変異型ポリヒドロキシアルカン酸合成酵素である。

[0013] 変異（ａ）：配列番号１で示されるアミノ酸配列のＮ末端から３８９番目のセリンが、セリン以外のアミノ酸に置換された変異

変異（ｂ）：配列番号１で示されるアミノ酸配列のＮ末端から４３６番目のロイシンが、ロイシン以外のアミノ酸に置換された変異

変異（ｃ）：配列番号１で示されるアミノ酸配列のＣ末端から１１個以上１９個以下のアミノ酸残基が欠失された変異。

[0014] 好ましくは、変異（ａ）が、配列番号１に示すアミノ酸配列のＮ末端から３８９番目のセリンがシステイン、イソロイシン、トレオニン又はバリンに置換された変異である。また、好ましくは、変異（ａ）が、配列番号１に示すアミノ酸配列のＮ末端から３８９番目のセリンがアスパラギン酸、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、リジン、アスパラギン、プロリン、アルギ

ニン又はトリプトファンに置換された変異である。

[0015] 好ましくは、変異（ｂ）が、配列番号１に示すアミノ酸配列のＮ末端から４３６番目のロイシンがバリンに置換された変異である。また、好ましくは、変異（ｂ）が、配列番号１に示すアミノ酸配列のＮ末端から４３６番目のロイシンがアラニン、システイン、フェニルアラニン、アスパラギン、トレオニン、トリプトファン又はチロシンに置換された変異である。

[0016] 好ましくは、変異（ｃ）が、配列番号１に示すアミノ酸配列のＣ末端から１２個以上１９個以下のアミノ酸残基が欠失された変異である。

[0017] 本発明の変異型ポリヒドロキシアルカン酸合成酵素は、配列番号１に示すアミノ酸配列のＮ末端から１４９番目のアスパラギンがセリンに置換された変異をさらに含むアミノ酸配列を有することが好ましく、また、配列番号１に示すアミノ酸配列のＮ末端から１７１番目のアスパラギン酸がグリシンに置換された変異をさらに含むアミノ酸配列を有することが好ましい。

[0018] 本発明はまた、前記変異型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にも関する。

[0019] さらに本発明は、前記遺伝子を有する形質転換体にも関し、好ましくは宿主が真正細菌であり、より好ましくは真正細菌がカプリアビダス属に属する細菌であり、さらに好ましくはカプリアビダス　ネカトールであり、よりさらに好ましくはカプリアビダス　ネカトールＨ１６である。

[0020] さらにまた、本発明は、前記形質転換体を培養する工程を含む、ポリヒドロキシアルカン酸の製造方法にも関する。好ましくは、ポリヒドロキシアルカン酸が、３－ヒドロキシヘキサン酸をモノマーユニットとして含有する。より好ましくは、ポリヒドロキシアルカン酸が、３－ヒドロキシ酪酸と３－ヒドロキシヘキサン酸との共重合体である。

発明の効果

[0021] 本発明によれば、ＰＨＡの生産性を維持したまま、３ＨＨ比率が高い又は低いＰＨＡ共重合体の製造を実現する変異型ＰＨＡ合成酵素、該酵素をコードする遺伝子、及び該遺伝子を有する形質転換体を提供することができる。

また、該形質転換体を培養することにより、ＰＨＡの生産性を低下させることなく、３ＨＨ比率が高い又は低いＰＨＡ共重合体を発酵生産することが可能となる。

発明を実施するための形態

[0022] 以下に本発明を詳細に説明する。

[0023] （変異型ＰＨＡ合成酵素）

本発明に係る変異型ＰＨＡ合成酵素は、配列番号１で示されるアミノ酸配列と８５％以上の配列同一性を示し、かつ、下記（ａ）～（ｃ）のいずれか１以上の変異を含むアミノ酸配列を有するものである。また、本発明は、該変異型ＰＨＡ合成酵素をコードする遺伝子（以下、「変異型ＰＨＡ合成酵素遺伝子」と略す）も提供する。

[0024] 本発明の変異型ＰＨＡ合成酵素は、ＰＨＡの生産性を維持したまま、３ＨＨ比率が高い又は低いＰＨＡ共重合体の製造を実現するものであるが、本発明の変異型ＰＨＡ合成酵素により製造されるＰＨＡ共重合体の３ＨＨ比率が高い又は低いとは、本発明の特徴たる変異を導入していないこと以外は本発明の変異型ＰＨＡ合成酵素と同じアミノ酸配列を有するＰＨＡ合成酵素が同じ条件下で製造し得るＰＨＡ共重合体の３ＨＨ比率と比較して、相対的に高い又は低いことを意味する。

[0025] 本発明の変異型ＰＨＡ合成酵素は、ＰＨＡ合成活性を有する酵素であって、配列番号１で示されるアミノ酸配列に対し８５％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する。配列番号１で示されるアミノ酸配列は、Ａｅｒｏｍｏｎａｓ　ｃａｖｉａｅ由来のＰＨＡ合成酵素ＰｈａＣ$_{Ac}$のアミノ酸配列である。本発明の変異型ＰＨＡ合成酵素は、上記配列同一性を満足する範囲において、下記（ａ）～（ｃ）の変異以外の変異を有するものであってよい。

[0026] 本発明の変異型ＰＨＡ合成酵素は、異なる機能を有する異種タンパク質と結合して融合タンパク質を形成したものであってもよい。この場合、異種タンパク質のアミノ酸配列は、上記配列同一性を算出する際に考慮しない。

[0027] 本発明の変異型ＰＨＡ合成酵素において、配列番号１で示されるアミノ酸配列に対する配列同一性は、８５％以上であればよいが、好ましくは９０％以上、より好ましくは９５％以上、さらに好ましくは９７％以上、よりさらに好ましくは９８％以上、特に好ましくは９９％以上である。

[0028] また、本発明の変異型ＰＨＡ合成酵素遺伝子の塩基配列については、本発明の変異型ＰＨＡ合成酵素を構成するアミノ酸配列をコードする塩基配列である限り、塩基配列の配列同一性は限定されない。

[0029] 本発明の変異型ＰＨＡ合成酵素および変異型ＰＨＡ合成酵素遺伝子の由来については、特に限定されないが、Ａｅｒｏｍｏｎａｓ属由来であることが好ましく、Ａｅｒｏｍｏｎａｓ　ｃａｖｉａｅ由来であることがより好ましい。

[0030] 次に、本発明の変異型ＰＡＨ合成酵素が含む変異（ａ）～（ｃ）について説明する。本発明の変異型ＰＡＨ合成酵素は、変異（ａ）～（ｃ）のうちいずれか１つを含むものであってもよいし、これら変異の２以上を含むものであってもよい。

[0031] 変異（ａ）：配列番号１で示されるアミノ酸配列において、Ｎ末端から３８９番目のセリンが、セリン以外のアミノ酸に置換される。置換後のアミノ酸は、ＰＨＡ生産性及び、生産されるＰＨＡの３ＨＨ比率を考慮して選択することができる。ＰＨＡ生産性を維持したまま、３ＨＨ－ＣｏＡ特異性を低下させ、３ＨＨ比率が低いＰＨＡを生産するには、３８９番目のセリンが、アスパラギン酸、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、リジン、アスパラギン、プロリン、アルギニン、又は、トリプトファンに置換された変異が好ましく、アスパラギン酸、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、リジン、プロリン、アルギニン、又は、トリプトファンに置換された変異がより好ましく、アスパラギン酸、グルタミン酸、リジン、プロリン、又は、アルギニンに置換された変異がさらに好ましい。一方、ＰＨＡ生産性を維持したまま、３ＨＨ－ＣｏＡ特異性を上昇させ、３ＨＨ比率が高いＰＨＡを生産するには、３８９番目のセリンが、システイン、イソロイシン、トレオニン、又は

、バリンに置換された変異が好ましく、システイン、トレオニン、又は、バリンに置換された変異がより好ましい。

[0032] 変異（ｂ）:配列番号１で示されるアミノ酸配列において、Ｎ末端から４３６番目のロイシンが、ロイシン以外のアミノ酸に置換される。置換後のアミノ酸は、ＰＨＡ生産性及び、生産されるＰＨＡの３ＨＨ比率を考慮して選択することができる。ＰＨＡ生産性を維持したまま、３ＨＨ－ＣｏＡ特異性を低下させ、３ＨＨ比率が低いＰＨＡを生産するには、４３６番目のロイシンが、アラニン、システイン、フェニルアラニン、アスパラギン、トレオニン、トリプトファン、又は、チロシンに置換された変異が好ましく、アラニン、システイン、フェニルアラニン、又は、トレオニンに置換された変異がより好ましく、アラニン又はトレオニンに置換された変異がさらに好ましい。一方、ＰＨＡ生産性を維持したまま、３ＨＨ－ＣｏＡ特異性を上昇させ、３ＨＨ比率が高いＰＨＡを生産するには、４３６番目のロイシンが、バリンに置換された変異が好ましい。

[0033] 変異（ｃ）：配列番号１で示されるアミノ酸配列において、Ｃ末端領域のアミノ酸配列が欠失される。これにより、ＰＨＡ生産性を維持したまま、３ＨＨ－ＣｏＡ特異性を低下させ、３ＨＨ比率が低いＰＨＡを生産することができる。欠失させるアミノ酸残基の個数の上限としては、Ｃ末端から１９個のアミノ酸残基が好ましく、１８個のアミノ酸残基がより好ましく、１７個のアミノ酸残基がさらに好ましく、１６個のアミノ酸残基が特に好ましく、１５個のアミノ酸残基が最も好ましい。欠失させるアミノ酸残基の個数の下限としては、Ｃ末端から１１個のアミノ酸残基が好ましく、１２個のアミノ酸残基がより好ましく、１３個のアミノ酸残基がさらに好ましい。

[0034] 本発明の変異型ＰＨＡ合成酵素のアミノ酸配列は、ＰＨＡ生産性を高めるため、配列番号１で示されるアミノ酸配列において、Ｎ末端から１４９番目のアスパラギンがセリンに置換された変異をさらに含むこと、及び／又は、Ｎ末端から１７１番目のアスパラギン酸がグリシンに置換された変異をさらに含むことが好ましい。

[0035] （３ＨＨ単位含有共重合ＰＨＡを生産する形質転換体）

本発明の形質転換体は、本発明の変異型ＰＨＡ合成酵素をコードする遺伝子を有する形質転換体であり、該遺伝子を宿主の微生物に導入することにより製造される。

[0036] 本発明の形質転換体の宿主としては特に限定はなく、真菌（カビ、きのこ、酵母など）、真正細菌（バクテリア）、古細菌など任意の微生物を利用できるが、真正細菌が好ましい。当該真正細菌としては、例えば、ラルストニア（Ｒａｌｓｔｏｎｉａ）属、カプリアビダス（Ｃｕｐｒｉａｖｉｄｕｓ）属、ワウテルシア（Ｗａｕｔｅｒｓｉａ）属、アエロモナス（Ａｅｒｏｍｏｎａｓ）属、エシェリキア（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ）属、アルカリゲネス（Ａｌｃａｌｉｇｅｎｅｓ）属、シュードモナス（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）属等に属する細菌が好ましい例として挙げられる。安全性及び生産性の観点から、より好ましくはラルストニア属、カプリアビダス属、アエロモナス属、又は、ワウテルシア属に属する細菌であり、さらに好ましくはカプリアビダス属又はアエロモナス属に属する細菌であり、さらにより好ましくはカプリアビダス属に属する細菌であり、特に好ましくはカプリアビダス　ネカトール（Ｃｕｐｒｉａｖｉｄｕｓ　ｎｅｃａｔｏｒ）であり、最も好ましくはカプリアビダス　ネカトールＨ１６株である。

[0037] 本発明の形質転換体を製造するにあたって、本発明の変異型ＰＨＡ合成酵素遺伝子を宿主の微生物に導入する方法としては、任意の方法を利用することができる。一例として、公知の遺伝子組換え技術を用いて、本発明の変異型ＰＨＡ合成酵素遺伝子を、宿主となる微生物が保有する染色体、プラスミド、メガプラスミドなどのＤＮＡ上に導入してもよいし、また、該遺伝子を導入したプラスミドベクターまたは人工染色体を宿主の微生物に導入してもよい。しかし、導入された遺伝子の保持という観点から、微生物が保有する染色体あるいはメガプラスミド上に該遺伝子を導入する方法が好ましく、微生物が保有する染色体上に該遺伝子を導入する方法がより好ましい。

[0038] 微生物が保有するＤＮＡ上に任意の塩基配列を部位特異的に置換又は挿入

する方法、または、微生物が保有するＤＮＡ中の任意の塩基配列を欠失させる方法は当業者に広く知られており、本発明の形質転換体を製造する際に使用できる。特に限定されないが、代表的な方法としては、トランスポゾンと相同組換えの機構を利用した方法（Ｏｈｍａｎ等，Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．，ｖｏｌ．１６２：ｐ．１０６８（１９８５））、相同組換えの機構によって起こる部位特異的な組み込みと第二段階の相同組換えによる脱落を原理とした方法（Ｎｏｔｉ等，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ．，ｖｏｌ．１５４，ｐ．１９７（１９８７））、Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｕｂｔｉｌｉｓ由来のｓａｃＢ遺伝子を共存させて、第二段階の相同組換えによって遺伝子が脱落した微生物株をシュークロース添加培地耐性株として容易に単離する方法（Ｓｃｈｗｅｉｚｅｒ，Ｍｏｌ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．，ｖｏｌ．６，ｐ．１１９５（１９９２）；Ｌｅｎｚ等，Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．，ｖｏｌ．１７６，ｐ．４３８５（１９９４））等が挙げられる。また、微生物へのベクターの導入方法としても特に限定されないが、例えば、塩化カルシウム法、エレクトロポレーション法、ポリエチレングリコール法、スフェロプラスト法等が挙げられる。

[0039] なお、遺伝子クローニングや遺伝子組み換え技術については、Ｓａｍｂｒｏｏｋ，Ｊ． ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ，Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ（１９８９又は２００１）などに記載される技術を利用することができる。

[0040] 本発明の変異型ＰＨＡ合成酵素遺伝子を導入するにあたっては、該遺伝子を任意の発現調節配列に連結することができる。本明細書において、発現調節配列は、プロモーターとシャイン・ダルガノ配列から構成される配列として記載する。このような発現調節配列としては、例えばカプリアビダス ネカトールのｐｈａＣ１遺伝子の発現調節配列（配列番号２）やｐｈａＰ１遺伝子の発現調節配列（配列番号３）が使用できる。または、大腸菌に由来するｌａｃプロモーター（配列番号４）やｔｒｐプロモーター（配列番号５）

、あるいは人工的に作製されたｌａｃＵＶ５プロモーター（配列番号６）、ｔｒｃプロモーター（配列番号７）、ｔｉｃプロモーター（配列番号８）、ｔａｃプロモーター（配列番号９）、ｌａｃＮ１７プロモーター（配列番号１０）等を、カプリアヴィダス　ネカトールＨ１６株由来のＳＤ配列（配列番号１１）と連結し、発現調節配列として使用することもできる。

[0041] （ＰＨＡの製造方法）

本発明の形質転換体を培養することで、該形質転換体にＰＨＡを生産させ、得られたＰＨＡを回収することでＰＨＡを製造することができる。

[0042] 本発明によるＰＨＡの生産においては、炭素源、炭素源以外の栄養源である窒素源、無機塩類、そのほかの有機栄養源を含む培地において、前記形質転換体を培養することが好ましい。

[0043] 炭素源としては、本発明の形質転換体が資化可能な、油脂および／または脂肪酸などを含む炭素源であれば特に限定されず、どのような炭素源でも使用可能である。具体的には、パーム油、パーム核油、コーン油、やし油、オリーブ油、大豆油、菜種油、ヤトロファ油などの油脂やその分画油類；ラウリン酸、オレイン酸、ステアリン酸、パルミチン酸、ミリンスチン酸などの脂肪酸やそれらの誘導体等が挙げられる。

[0044] 窒素源としては、例えば、アンモニア；塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等のアンモニウム塩；ペプトン、肉エキス、酵母エキス等が挙げられる。

[0045] 無機塩類としては、例えば、リン酸２水素カリウム、リン酸水素２ナトリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム等が挙げられる。

[0046] そのほかの有機栄養源としては、例えば、グリシン、アラニン、セリン、スレオニン、プロリン等のアミノ酸；ビタミンＢ１、ビタミンＢ１２、ビタミンＣ等のビタミン等が挙げられる。

[0047] 本発明の形質転換体を培養する際の、培養温度、培養時間、培養時ｐＨ、培地等の条件は、宿主の微生物、例えばラルストニア属、カプリアビダス属

、ワウテルシア属、アエロモナス属、エシェリキア属、アルカリゲネス属、シュードモナス属等の微生物の培養で通常使用されるような条件であってよく、特に限定されない。

[0048] 本発明において生産されるＰＨＡの種類としては、３ＨＨをモノマーユニットとして含有するＰＨＡ共重合体であれば特に限定されない。なかでも、炭素数４～１６の２－ヒドロキシアルカン酸、３－ヒドロキシアルカン酸（３ＨＨを除く）および４－ヒドロキシアルカン酸から選択される１種以上のモノマーと３ＨＨとを重合して得られるＰＨＡ共重合体が好ましく、３－ヒドロキシ酪酸と３－ヒドロキシヘキサン酸との共重合体であるＰ（３ＨＢ－ｃｏ－３ＨＨ）が最も好ましい。なお、生産されるＰＨＡの種類は、使用する微生物の保有する又は別途導入されたＰＨＡ合成酵素遺伝子の種類や、ＰＨＡ合成に関与する代謝系の遺伝子の種類、培養に使用する炭素源、その他の培養条件などによって適宜選択しうる。

[0049] 本発明において、形質転換体を培養した後、菌体からのＰＨＡの回収は、特に限定されず、公知の方法によって実施することができる。一例として、次のような方法によってＰＨＡを回収することができる。培養終了後、培養液から遠心分離機等で菌体を分離し、その菌体を蒸留水、メタノール等により洗浄し、乾燥させる。この乾燥菌体から、クロロホルム等の有機溶剤を用いてＰＨＡを抽出する。このＰＨＡを含んだ有機溶剤溶液から、濾過等によって菌体成分を除去し、そのろ液にメタノールやヘキサン等の貧溶媒を加えてＰＨＡを沈殿させる。さらに、濾過や遠心分離によって上澄み液を除去し、乾燥させてＰＨＡを回収する。

[0050] 得られたＰＨＡに含まれる３ＨＨ単位等のモノマー単位組成（ｍｏｌ％）の分析は、例えば、ガスクロマトグラフ法や核磁気共鳴法等により実施することができる。

実施例

[0051] 以下に実施例を掲げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

[0052] 以下で説明する遺伝子操作は、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ（Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ（１９８９））の記載を参照して実施することができる。また、遺伝子操作に使用する酵素、クローニング宿主等は、市場の供給者から購入し、その説明に従い使用することができる。なお、前記酵素としては、遺伝子操作に使用できるものであれば特に限定されない。

[0053] （製造例１）Ｈ１６ ΔｐｈａＣ１ Ｐｔｒｃ－ｐｈａＪ４ｂ ｄＺ１，２，６株の作製

まず、ｐｈａＣ１遺伝子破壊用プラスミドを作製した。合成オリゴＤＮＡを用いたＰＣＲにより、ｐｈａＣ１遺伝子より上流および下流の塩基配列を有するＤＮＡ断片（配列番号１２）を得た。得られたＤＮＡ断片を制限酵素ＳｗａＩで消化した。このＤＮＡ断片を、同じくＳｗａＩで消化した特開２００７－２５９７０８号公報に記載のベクターｐＮＳ２Ｘ－ｓａｃＢと連結し、ｐｈａＣ１より上流および下流の塩基配列を有する遺伝子破壊用プラスミドベクターｐＮＳ２Ｘ－ｓａｃＢ－ｐｈａＣ１ＵＬを作製した。

[0054] 次に、ｐＮＳ２Ｘ－ｓａｃＢ－ｐｈａＣ１ＵＬを用いてΔｐｈａＣ１ Ｐｔｒｃ－ｐｈａＪ４ｂ ｄＺ１，２，６株を作製した。ｐＮＳ２Ｘ－ｓａｃＢ－ｐｈａＣ１ＵＬを大腸菌Ｓ１７－１株（ＡＴＣＣ４７０５５）に導入した。得られた形質転換体を、ＫＮＫ００５ ｔｒｃ－ｐｈａＪ４ｂ ΔｐｈａＺ１，２，６株（国際公開第２０１５／１１５６１９号参照）とＮｕｔｒｉｅｎｔ Ａｇａｒ培地（Ｄｉｆｃｏ社製）上で混合培養して接合伝達を行った。

[0055] 得られた培養液を、２５０ｍｇ／Ｌのカナマイシンを含むシモンズ寒天培地（クエン酸ナトリウム２ｇ／Ｌ、塩化ナトリウム５ｇ／Ｌ、硫酸マグネシウム・７水塩０．２ｇ／Ｌ、りん酸二水素アンモニウム１ｇ／Ｌ、りん酸水素二カリウム１ｇ／Ｌ、寒天１５ｇ／Ｌ、ｐＨ６．８）に播種し、ｐＮＳ２Ｘ－ｓａｃＢ－ｐｈａＣ１ＵＬがＫＮＫ００５ ｔｒｃ－ｐｈａＪ４ｂ ΔｐｈａＺ１，２，６株の染色体上に組み込まれた株を取得した。この株をＮｕ

ｔｒｉｅｎｔ　Ｂｒｏｔｈ培地（Ｄｉｆｃｏ社製）で２世代培養した後、１５％のショ糖を含むＮｕｔｒｉｅｎｔ　Ａｇａｒ培地上に希釈して塗布し、プラスミドが脱落した株を取得した。得られた形質転換体から、ＰＣＲおよびＤＮＡシーケンサーによる解析により染色体上のｐｈａＣ１遺伝子の開始コドンから終止コドンまでを欠失した菌株１株を単離した。この遺伝子破壊株をＨ１６　ΔｐｈａＣ１　Ｐｔｒｃ－ｐｈａＪ４ｂ　ｄＺ１，２，６株と命名した。

[0056] 得られたＨ１６　ΔｐｈａＣ１　Ｐｔｒｃ－ｐｈａＪ４ｂ　ｄＺ１，２，６株は、カプリアビダス　ネカトールＨ１６株の染色体上のｐｈａＺ１遺伝子及びｐｈａＺ６遺伝子の開始コドンから終止コドンまでを欠失し、さらにｐｈａＺ２遺伝子の１６番目のコドンから終止コドンまでを欠失し、染色体上のＲ体特異的エノイル－ＣｏＡヒドラターゼ遺伝子の発現が強化され、さらにｐｈａＣ１遺伝子の開始コドンから終止コドンまでを欠失した菌株である。

[0057] （製造例２）ｐＣＵＰ２－Ｐｔｒｐ－ＮＳＤＧの作製

合成オリゴＤＮＡ等を用いたＰＣＲにより、配列番号１３で示される塩基配列を有するＤＮＡ断片を増幅した。取得したＤＮＡ断片を、特開２００７－２５９７０８号公報記載のｐＣＵＰ２ベクターをＭｕｎＩとＳｐｅＩで消化したＤＮＡ断片と、Ｉｎ－ｆｕｓｉｏｎ　ＨＤ　Ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｋｉｔ（タカラバイオ）にて連結し、ｐＣＵＰ２－Ｐｔｒｐ－ＮＳＤＧを得た。

[0058] 得られたｐＣＵＰ２－Ｐｔｒｐ－ＮＳＤＧは、ｔｒｐプロモーター下でＮＳＤＧを発現するプラスミドである。

[0059] ＮＳＤＧとは、配列番号１４で示されるアミノ酸配列からなる変異型ＰＨＡ合成酵素であって、配列番号１で示されるアミノ酸配列に対し、Ｎ末端から１４９番目のアスパラギンのセリンへの置換、及び、１７１番目のアスパラギン酸のグリシンへの置換という２種類の変異が導入されたものである。

[0060] （製造例３）ｐＣＵＰ２－Ｐｔｒｐ－ＮＳＤＧ－Ｓ３８９Ｘの作製

製造例２で作製したｐＣＵＰ２－Ｐｔｒｐ－ＮＳＤＧを鋳型とし、配列番

号１５および配列番号１６で示したＤＮＡをプライマーペアとして、ＰＣＲを行った。同様に配列番号１７および配列番号１８で示したＤＮＡをプライマーペアとして、ＰＣＲを行った。上記ＰＣＲで得られた２種類のＤＮＡ断片を鋳型とし、配列番号１５および配列番号１８で示したＤＮＡをプライマーペアとして、同様の条件でＰＣＲを行い、ＤＮＡ断片を取得した。このＤＮＡ断片を、ｐＣＵＰ２ベクターをＭｕｎＩとＳｐｅＩで消化したＤＮＡ断片と、Ｉｎ－ｆｕｓｉｏｎ　ＨＤ　Ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｋｉｔにて連結し、大腸菌ＪＭ１０９コンピテントセル（タカラバイオ）に導入した。各大腸菌コロニーからプラスミドを回収し、ＤＮＡ配列を確認することにより、ｐＣＵＰ２－Ｐｔｒｐ－ＮＳＤＧ－Ｓ３８９Ｘを取得した。ここで、Ｘは、アミノ酸Ａ，Ｃ，Ｄ，Ｅ，Ｆ，Ｇ，Ｈ，Ｉ，Ｋ，Ｌ，Ｍ，Ｎ，Ｐ，Ｑ，Ｒ，Ｔ，Ｖ，Ｗ，又は、Ｙを表す。得られたｐＣＵＰ２－Ｐｔｒｐ－ＮＳＤＧ－Ｓ３８９Ｘは、ｔｒｐプロモーター下で、Ｎ末端から３８９番目のセリンがＸに置換された変異を有するＮＳＤＧを発現するプラスミドである。

[0061] （製造例４）ｐＣＵＰ２－Ｐｔｒｐ－ＮＳＤＧ－Ｌ４３６Ｘの作製

製造例２で作製したｐＣＵＰ２－Ｐｔｒｐ－ＮＳＤＧを鋳型とし、配列番号１５および配列番号１９で示したＤＮＡをプライマーペアとして、ＰＣＲを行った。同様に配列番号２０および配列番号１８で示したＤＮＡをプライマーペアとして、ＰＣＲを行った。上記ＰＣＲで得られた２種類のＤＮＡ断片を鋳型とし、配列番号１５および配列番号１８で示したＤＮＡをプライマーペアとして、同様の条件でＰＣＲを行い、ＤＮＡ断片を取得した。このＤＮＡ断片を、ｐＣＵＰ２ベクターをＭｕｎＩとＳｐｅＩで消化したＤＮＡ断片と、Ｉｎ－ｆｕｓｉｏｎ　ＨＤ　Ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｋｉｔにて連結し、大腸菌ＪＭ１０９コンピテントセル（タカラバイオ）に導入した。各大腸菌コロニーからプラスミドを回収し、ＤＮＡ配列を確認することにより、ｐＣＵＰ２－Ｐｔｒｐ－ＮＳＤＧ－Ｌ４３６Ｘを取得した。ここで、Ｘは、アミノ酸Ａ，Ｃ，Ｄ，Ｅ，Ｆ，Ｇ，Ｈ，Ｉ，Ｋ，Ｍ，Ｎ，Ｐ，Ｑ，Ｒ，Ｓ，Ｔ，Ｖ，Ｗ，又は、Ｙを表す。得られたｐＣＵＰ２－Ｐｔｒｐ－ＮＳＤＧ－Ｌ４３

６Ｘは、ｔｒｐプロモーター下で、Ｎ末端から４３６番目のロイシンがＸに置換された変異を有するＮＳＤＧを発現するプラスミドである。

[0062] （製造例５）ｐＣＵＰ２－Ｐｔｒｐ－ＮＳＤＧΔＣＴ５の作製

製造例２で作製したｐＣＵＰ２－Ｐｔｒｐ－ＮＳＤＧを鋳型とし、配列番号１５および配列番号２１で示したＤＮＡをプライマーペアとして、ＰＣＲを行った。得られたＤＮＡ断片を、ｐＣＵＰ２ベクターをＭｕｎＩとＳｐｅＩで消化したＤＮＡ断片と、Ｉｎ－ｆｕｓｉｏｎ　ＨＤ　Ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｋｉｔにて連結し、ｐＣＵＰ２－Ｐｔｒｐ－ＮＳＤＧΔＣＴ５を取得した。得られたｐＣＵＰ２－Ｐｔｒｐ－ＮＳＤＧΔＣＴ５は、ｔｒｐプロモーター下で、Ｃ末端から５個のアミノ酸残基が欠失された変異を有するＮＳＤＧを発現するプラスミドである。

[0063] （製造例６）ｐＣＵＰ２－Ｐｔｒｐ－ＮＳＤＧΔＣＴ１０の作製

製造例２で作製したｐＣＵＰ２－Ｐｔｒｐ－ＮＳＤＧを鋳型とし、配列番号１５および配列番号２２で示したＤＮＡをプライマーペアとして、ＰＣＲを行った。得られたＤＮＡ断片を、ｐＣＵＰ２ベクターをＭｕｎＩとＳｐｅＩで消化したＤＮＡ断片と、Ｉｎ－ｆｕｓｉｏｎ　ＨＤ　Ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｋｉｔにて連結し、ｐＣＵＰ２－Ｐｔｒｐ－ＮＳＤＧΔＣＴ１０を取得した。得られたｐＣＵＰ２－Ｐｔｒｐ－ＮＳＤＧΔＣＴ１０は、ｔｒｐプロモーター下で、Ｃ末端から１０個のアミノ酸残基が欠失された変異を有するＮＳＤＧを発現するプラスミドである。

[0064] （製造例７）ｐＣＵＰ２－Ｐｔｒｐ－ＮＳＤＧΔＣＴ１３の作製

製造例２で作製したｐＣＵＰ２－Ｐｔｒｐ－ＮＳＤＧを鋳型とし、配列番号１５および配列番号２３で示したＤＮＡをプライマーペアとして、ＰＣＲを行った。得られたＤＮＡ断片を、ｐＣＵＰ２ベクターをＭｕｎＩとＳｐｅＩで消化したＤＮＡ断片と、Ｉｎ－ｆｕｓｉｏｎ　ＨＤ　Ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｋｉｔにて連結し、ｐＣＵＰ２－Ｐｔｒｐ－ＮＳＤＧΔＣＴ１３を取得した。得られたｐＣＵＰ２－Ｐｔｒｐ－ＮＳＤＧΔＣＴ１３は、ｔｒｐプロモーター下で、Ｃ末端から１３個のアミノ酸残基が欠失された変異を有するＮＳ

ＤＧを発現するプラスミドである。

[0065] （製造例８）ｐＣＵＰ２－Ｐｔｒｐ－ＮＳＤＧΔＣＴ１５の作製

製造例２で作製したｐＣＵＰ２－Ｐｔｒｐ－ＮＳＤＧを鋳型とし、配列番号１５および配列番号２４で示したＤＮＡをプライマーペアとして、ＰＣＲを行った。得られたＤＮＡ断片を、ｐＣＵＰ２ベクターをＭｕｎＩとＳｐｅＩで消化したＤＮＡ断片と、Ｉｎ－ｆｕｓｉｏｎ　ＨＤ　Ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｋｉｔにて連結し、ｐＣＵＰ２－Ｐｔｒｐ－ＮＳＤＧΔＣＴ１５を取得した。得られたｐＣＵＰ２－Ｐｔｒｐ－ＮＳＤＧΔＣＴ１５は、ｔｒｐプロモーター下で、Ｃ末端から１５個のアミノ酸残基が欠失された変異を有するＮＳＤＧを発現するプラスミドである。

[0066] （製造例９）ｐＣＵＰ２－Ｐｔｒｐ－ＮＳＤＧΔＣＴ２０の作製

製造例２で作製したｐＣＵＰ２－Ｐｔｒｐ－ＮＳＤＧを鋳型とし、配列番号１５および配列番号２５で示したＤＮＡをプライマーペアとして、ＰＣＲを行った。得られたＤＮＡ断片を、ｐＣＵＰ２ベクターをＭｕｎＩとＳｐｅＩで消化したＤＮＡ断片と、Ｉｎ－ｆｕｓｉｏｎ　ＨＤ　Ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｋｉｔにて連結し、ｐＣＵＰ２－Ｐｔｒｐ－ＮＳＤＧΔＣＴ２０を取得した。得られたｐＣＵＰ２－Ｐｔｒｐ－ＮＳＤＧΔＣＴ２０は、ｔｒｐプロモーター下で、Ｃ末端から２０個のアミノ酸残基が欠失された変異を有するＮＳＤＧを発現するプラスミドである。

[0067] （製造例１０）Ｈ１６　ΔｐｈａＣ１　Ｐｔｒｃ－ｐｈａＪ４ｂ　ｄＺ１，２，６／ｐＣＵＰ２－Ｐｔｒｐ－ＮＳＤＧ株の作製

まず、製造例１で作製したＨ１６　ΔｐｈａＣ１　Ｐｔｒｃ－ｐｈａＪ４ｂ　ｄＺ１，２，６株をＮｕｔｒｉｅｎｔ　Ｂｒｏｔｈ培地（ＤＩＦＣＯ）で一晩培養した。得られた培養液０．５ｍＬをＮｕｔｒｉｅｎｔ　Ｂｒｏｔｈ培地１００ｍＬに接種し、３０℃で３時間培養した。得られた培養液を氷上で速やかに冷却し、菌体を回収して氷冷した蒸留水で良く洗浄した後、得られた菌体を２ｍＬの蒸留水に懸濁した。菌体液を、製造例２で作製したｐＣＵＰ２－Ｐｔｒｐ－ＮＳＤＧプラスミド溶液と混合し、キュベットに注入

してエレクトロポレーションを行った。エレクトロポレーションは、ＭｉｃｒｏＰｕｌｓｅｒエレクトロポレーター（バイオ・ラッド）を使用し、電圧１．５ｋＶ、抵抗８００Ω、電流２５μＦの条件で行った。エレクトロポレーション後、菌体溶液を回収して５ｍＬのＮｕｔｒｉｅｎｔ　Ｂｒｏｔｈ培地を添加し、３０℃で３時間培養した。得られた培養液を、１００ｍｇ／Ｌのカナマイシン硫酸塩を含むＮｕｔｒｉｅｎｔ　Ａｇａｒ培地に塗布した。３０℃で３日間培養し、得られたコロニーからプラスミドが導入された菌株を取得した。得られた菌株をＨ１６　ΔｐｈａＣ１　Ｐｔｒｃ－ｐｈａＪ４ｂ　ｄＺ１，２，６／ｐＣＵＰ２－Ｐｔｒｐ－ＮＳＤＧ株と命名した。

[0068] （製造例１１）Ｈ１６　ΔｐｈａＣ１　Ｐｔｒｃ－ｐｈａＪ４ｂ　ｄＺ１，２，６／ｐＣＵＰ２－Ｐｔｒｐ－ＮＳＤＧ－Ｓ３８９Ｘ株の作製

製造例１０と同様の方法で、製造例１で作製したＨ１６　ΔｐｈａＣ１　Ｐｔｒｃ－ｐｈａＪ４ｂ　ｄＺ１，２，６株を親株とし、製造例３で作製したｐＣＵＰ２－Ｐｔｒｐ－ＮＳＤＧ－Ｓ３８９Ｘを導入した。得られた菌株をＨ１６　ΔｐｈａＣ１　Ｐｔｒｃ－ｐｈａＪ４ｂ　ｄＺ１，２，６／ｐＣＵＰ２－Ｐｔｒｐ－ＮＳＤＧ－Ｓ３８９Ｘ株と命名した。

[0069] （製造例１２）Ｈ１６　ΔｐｈａＣ１　Ｐｔｒｃ－ｐｈａＪ４ｂ　ｄＺ１，２，６／ｐＣＵＰ２－Ｐｔｒｐ－ＮＳＤＧ－Ｌ４３６Ｘ株の作製

製造例１０と同様の方法で、製造例１で作製したＨ１６　ΔｐｈａＣ１　Ｐｔｒｃ－ｐｈａＪ４ｂ　ｄＺ１，２，６株を親株とし、製造例４で作製したｐＣＵＰ２－Ｐｔｒｐ－ＮＳＤＧ－Ｌ４３６Ｘを導入した。得られた菌株をＨ１６　ΔｐｈａＣ１　Ｐｔｒｃ－ｐｈａＪ４ｂ　ｄＺ１，２，６／ｐＣＵＰ２－Ｐｔｒｐ－ＮＳＤＧ－Ｌ４３６Ｘ株と命名した。

[0070] （製造例１３）Ｈ１６　ΔｐｈａＣ１　Ｐｔｒｃ－ｐｈａＪ４ｂ　ｄＺ１，２，６／ｐＣＵＰ２－Ｐｔｒｐ－ＮＳＤＧΔＣＴ５株の作製

製造例１０と同様の方法で、製造例１で作製したＨ１６　ΔｐｈａＣ１　Ｐｔｒｃ－ｐｈａＪ４ｂ　ｄＺ１，２，６株を親株とし、製造例５で作製したｐＣＵＰ２－Ｐｔｒｐ－ＮＳＤＧΔＣＴ５を導入した。得られた菌株をＨ

１６　ΔｐｈａＣ１　Ｐｔｒｃ－ｐｈａＪ４ｂ　ｄＺ１，２，６／ｐＣＵＰ２－Ｐｔｒｐ－ＮＳＤＧΔＣＴ５株と命名した。

[0071] （製造例１４）Ｈ１６　ΔｐｈａＣ１　Ｐｔｒｃ－ｐｈａＪ４ｂ　ｄＺ１，２，６／ｐＣＵＰ２－Ｐｔｒｐ－ＮＳＤＧΔＣＴ１０株の作製

製造例１０と同様の方法で、製造例１で作製したＨ１６　ΔｐｈａＣ１　Ｐｔｒｃ－ｐｈａＪ４ｂ　ｄＺ１，２，６株を親株とし、製造例６で作製したｐＣＵＰ２－Ｐｔｒｐ－ＮＳＤＧΔＣＴ１０を導入した。得られた菌株をＨ１６　ΔｐｈａＣ１　Ｐｔｒｃ－ｐｈａＪ４ｂ　ｄＺ１，２，６／ｐＣＵＰ２－Ｐｔｒｐ－ＮＳＤＧΔＣＴ１０株と命名した。

[0072] （製造例１５）Ｈ１６　ΔｐｈａＣ１　Ｐｔｒｃ－ｐｈａＪ４ｂ　ｄＺ１，２，６／ｐＣＵＰ２－Ｐｔｒｐ－ＮＳＤＧΔＣＴ１３株の作製

製造例１０と同様の方法で、製造例１で作製したＨ１６　ΔｐｈａＣ１　Ｐｔｒｃ－ｐｈａＪ４ｂ　ｄＺ１，２，６株を親株とし、製造例７で作製したｐＣＵＰ２－Ｐｔｒｐ－ＮＳＤＧΔＣＴ１３を導入した。得られた菌株をＨ１６　ΔｐｈａＣ１　Ｐｔｒｃ－ｐｈａＪ４ｂ　ｄＺ１，２，６／ｐＣＵＰ２－Ｐｔｒｐ－ＮＳＤＧΔＣＴ１３株と命名した。

[0073] （製造例１６）Ｈ１６　ΔｐｈａＣ１　Ｐｔｒｃ－ｐｈａＪ４ｂ　ｄＺ１，２，６／ｐＣＵＰ２－Ｐｔｒｐ－ＮＳＤＧΔＣＴ１５株の作製

製造例１０と同様の方法で、製造例１で作製したＨ１６　ΔｐｈａＣ１　Ｐｔｒｃ－ｐｈａＪ４ｂ　ｄＺ１，２，６株を親株とし、製造例８で作製したｐＣＵＰ２－Ｐｔｒｐ－ＮＳＤＧΔＣＴ１５を導入した。得られた菌株をＨ１６　ΔｐｈａＣ１　Ｐｔｒｃ－ｐｈａＪ４ｂ　ｄＺ１，２，６／ｐＣＵＰ２－Ｐｔｒｐ－ＮＳＤＧΔＣＴ１５株と命名した。

[0074] （製造例１７）Ｈ１６　ΔｐｈａＣ１　Ｐｔｒｃ－ｐｈａＪ４ｂ　ｄＺ１，２，６／ｐＣＵＰ２－Ｐｔｒｐ－ＮＳＤＧΔＣＴ２０株の作製

製造例１０と同様の方法で、製造例１で作製したＨ１６　ΔｐｈａＣ１　Ｐｔｒｃ－ｐｈａＪ４ｂ　ｄＺ１，２，６株を親株とし、製造例９で作製したｐＣＵＰ２－Ｐｔｒｐ－ＮＳＤＧΔＣＴ２０を導入した。得られた菌株を

Ｈ１６　ΔｐｈａＣ１　Ｐｔｒｃ－ｐｈａＪ４ｂ　ｄＺ１，２，６／ｐＣＵＰ２－Ｐｔｒｐ－ＮＳＤＧΔＣＴ２０株と命名した。

[0075] （ＰＨＡにおける３ＨＨ比率の分析方法）

ＰＨＡを含む乾燥菌体約２０ｍｇに１ｍＬの硫酸－メタノール混液（１５：８５）と１ｍＬのクロロホルムを添加して密栓し、１００℃で１４０分間加熱することでＰＨＡ分解物のメチルエステルを得た。冷却後、これに０．５ｍＬの脱イオン水を加えてよく混合した後、水層と有機層が分離するまで放置した。その後、分取した有機層中のＰＨＡ分解物のモノマー単位組成をキャピラリーガスクロマトグラフィーにより分析した。得られたピーク面積から、３ＨＨ比率を算出した。

[0076] ガスクロマトグラフは島津製作所製ＧＣ－１７Ａ、キャピラリーカラムはＧＬサイエンス社製ＮＥＵＴＲＡ　ＢＯＮＤ－１（カラム長２５ｍ、カラム内径０．２５ｍｍ、液膜厚０．４μｍ）を用いた。キャリアガスとしてＨｅを用い、カラム入口圧１００ｋＰａとし、サンプルは１μＬを注入した。温度条件は、初発温度５０℃から２００℃までは８℃／分の速度で昇温し、さらに２００℃から２９０℃までは３０℃／分の速度で昇温した。

[0077] （比較例１）Ｈ１６　ΔｐｈａＣ１　Ｐｔｒｃ－ｐｈａＪ４ｂ　ｄＺ１，２，６／ｐＣＵＰ２－Ｐｔｒｐ－ＮＳＤＧ株によるＰＨＡ生産

種母培地の組成は、１０ｇ／Ｌ　肉エキス、１０ｇ／Ｌ　バクトトリプトン、２ｇ／Ｌ　酵母エキス、９ｇ／Ｌ　リン酸二水素ナトリウム１２水和物、１．５ｇ／Ｌ　リン酸水素二カリウムとした。

[0078] ＰＨＡ生産培地の組成は、１１ｇ／Ｌ　リン酸水素二ナトリウム１２水和物、１．９ｇ／Ｌ　リン酸水素二カリウム、１．３ｇ／Ｌ　硫酸アンモニウム、５ｍＬ／Ｌ　マグネシウム溶液、１ｍＬ／Ｌ　微量金属塩溶液とした。マグネシウム溶液は、水に２００ｇ／Ｌ　硫酸マグネシウム七水和物を溶かして調製した。微量金属塩溶液は、０．１Ｎ塩酸に、０．２１８ｇ／Ｌ　塩化コバルト六水和物、１６．２ｇ／Ｌ　塩化鉄（ＩＩＩ）六水和物、１０．３ｇ／Ｌ　塩化カルシウム二水和物、０．１１８ｇ／Ｌ　塩化ニッケル六水

和物、０．１５６ｇ／Ｌ　硫酸銅五水和物を溶かして調製した。

[0079] 製造例１０で作製したＨ１６　ΔｐｈａＣ１　Ｐｔｒｃ－ｐｈａＪ４ｂ　ｄＺ１，２，６／ｐＣＵＰ２－Ｐｔｒｐ－ＮＳＤＧ株のグリセロールストック溶液５０μＬを種母培地１０ｍＬに接種し、３０℃で２４時間振盪培養した。得られた培養液を前培養液とした。

[0080] ＰＨＡ生産培養は、フラスコで行った。５００ｍＬ容量の振盪フラスコにＰＨＡ生産培地５０ｍＬを入れた。植菌直前に、マグネシウム溶液を２５０μＬ、微量金属溶液を５０μＬ、パーム核油を１ｇ添加した。培地調製後、振盪フラスコに前培養液を５００μＬ接種し、３０℃で７２時間振盪培養を行った。培養終了後、培養液１０ｍＬから菌体を回収、エタノールで洗浄後、６０℃で真空乾燥し、ＰＨＡを含む乾燥菌体を取得し、乾燥菌体重量を測定した。乾燥菌体重量、および３ＨＨ比率の結果を表１に示した。

[0081] （実施例１～１３、比較例２～７）Ｈ１６　ΔｐｈａＣ１　Ｐｔｒｃ－ｐｈａＪ４ｂ　ｄＺ１，２，６／ｐＣＵＰ２－Ｐｔｒｐ－ＮＳＤＧ－Ｓ３８９Ｘ株によるＰＨＡ生産

製造例１１で作製したＨ１６　ΔｐｈａＣ１　Ｐｔｒｃ－ｐｈａＪ４ｂ　ｄＺ１，２，６／ｐＣＵＰ２－Ｐｔｒｐ－ＮＳＤＧ－Ｓ３８９Ｘ株を用いて、比較例１と同様の方法で培養を行い、乾燥菌体重量および３ＨＨ比率を分析した。結果を表１に示した。

[0082]

[表1]

	宿主	プラスミド	乾燥菌体重量 (g/L)	3HH比率 (mol%)
実施例１	H16 *ΔphaC1* P_{trc}-*phaJ4b* *ΔphaZ1,2,6*	pCUP2-Ptrp-NSDG-S389D	16.3	11.3
実施例２		pCUP2-Ptrp-NSDG-S389E	18.9	10.3
実施例３		pCUP2-Ptrp-NSDG-S389G	18.0	12.1
実施例４		pCUP2-Ptrp-NSDG-S389H	20.9	12.4
実施例５		pCUP2-Ptrp-NSDG-S389K	16.6	4.0
実施例６		pCUP2-Ptrp-NSDG-S389N	21.1	14.0
実施例７		pCUP2-Ptrp-NSDG-S389P	17.8	6.1
実施例８		pCUP2-Ptrp-NSDG-S389R	19.2	5.8
実施例９		pCUP2-Ptrp-NSDG-S389W	20.4	12.7
実施例１０		pCUP2-Ptrp-NSDG-S389C	20.6	17.2
実施例１１		pCUP2-Ptrp-NSDG-S389I	22.4	16.1
実施例１２		pCUP2-Ptrp-NSDG-S389T	18.1	15.6
実施例１３		pCUP2-Ptrp-NSDG-S389V	20.0	18.0
比較例１		pCUP2-Ptrp-NSDG	20.6	14.9
比較例２		pCUP2-Ptrp-NSDG-S389A	22.1	14.9
比較例３		pCUP2-Ptrp-NSDG-S389F	20.1	15.2
比較例４		pCUP2-Ptrp-NSDG-S389L	22.9	15.2
比較例５		pCUP2-Ptrp-NSDG-S389M	22.2	14.9
比較例６		pCUP2-Ptrp-NSDG-S389Q	20.7	14.8
比較例７		pCUP2-Ptrp-NSDG-S389Y	19.7	14.7

[0083] ＜考察＞

表１の結果から、配列番号１４で示されるアミノ酸配列の３８９番目のセリンをいずれのアミノ酸に置換しても、乾燥菌体重量に大きな変化はないことが分かる。このことから、ポリマー生産量にも劇的な変化は無いと考えられる。

[0084] ＰＨＡの３ＨＨ比率を比較すると、配列番号１４で示されるアミノ酸配列の３８９番目のセリンをアスパラギン酸（Ｄ）、グルタミン酸（Ｅ）、グリシン（Ｇ）、ヒスチジン（Ｈ）、リジン（Ｋ）、アスパラギン（Ｎ）、プロ

リン（Ｐ）、アルギニン（Ｒ）、又は、トリプトファン（Ｗ）に置換した９種類の変異体（実施例１～９）では、比較例１と比較して３ＨＨ比率の低下が認められた。一方、３８９番目のセリンをシステイン（Ｃ）、イソロイシン（Ｉ）、トレオニン（Ｔ）、又は、バリン（Ｖ）に置換した４種類の変異体（実施例１０～１３）では３ＨＨ比率の上昇が認められた。しかし、３８９番目のセリンをアラニン（Ａ）、フェニルアラニン（Ｆ）、ロイシン（Ｌ）、メチオニン（Ｍ）、グルタミン（Ｑ）、又は、チロシン（Ｙ）に置換した６種類の変異体（比較例２～７）では３ＨＨ比率には大きな変化は認められなかった。

[0085] 以上の結果から、配列番号１で示されるアミノ酸配列の３８９番目のセリンをアスパラギン酸、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、リジン、アスパラギン、プロリン、アルギニン、又は、トリプトファンに置換した変異を有するＰＨＡ合成酵素は、ポリマー生産性を維持したまま３ＨＨ比率が低いＰＨＡを製造するのに有用であり、また、前記アミノ酸配列の３８９番目のセリンをシステイン、イソロイシン、トレオニン、又は、バリンに置換した変異を有するＰＨＡ合成酵素は、ポリマー生産性を維持したまま３ＨＨ比率が高いＰＨＡを製造するのに有用であることが分かる。

[0086] （実施例１４～２１、比較例８～１８）Ｈ１６ ΔｐｈａＣ１ Ｐｔｒｃ－ｐｈａＪ４ｂ ｄＺ１，２，６／ｐＣＵＰ２－Ｐｔｒｐ－ＮＳＤＧ－Ｌ４３６Ｘ株によるＰＨＡ生産

製造例１２で作製したＨ１６ ΔｐｈａＣ１ Ｐｔｒｃ－ｐｈａＪ４ｂ ｄＺ１，２，６／ｐＣＵＰ２－Ｐｔｒｐ－ＮＳＤＧ－Ｌ４３６Ｘ株を用いて、比較例１と同様の方法で培養を行い、乾燥菌体重量および３ＨＨ比率を分析した。結果を表２に示した。

[0087]

[表2]

	宿主	プラスミド	乾燥菌体重量 (g/L)	3HH比率 (mol%)
実施例１４	H16 *ΔphaC1* P_{trc}-*phaJ4b* *ΔphaZ1,2,6*	pCUP2-Ptrp-NSDG-L436A	13.7	11.0
実施例１５		pCUP2-Ptrp-NSDG-L436C	20.9	13.8
実施例１６		pCUP2-Ptrp-NSDG-L436F	22.8	9.8
実施例１７		pCUP2-Ptrp-NSDG-L436N	13.5	8.2
実施例１８		pCUP2-Ptrp-NSDG-L436T	21.6	14.3
実施例１９		pCUP2-Ptrp-NSDG-L436W	17.9	6.9
実施例２０		pCUP2-Ptrp-NSDG-L436Y	15.8	4.8
実施例２１		pCUP2-Ptrp-NSDG-L436V	22.1	15.6
比較例１		pCUP2-Ptrp-NSDG	20.6	14.9
比較例８		pCUP2-Ptrp-NSDG-L436D	4.1	-
比較例９		pCUP2-Ptrp-NSDG-L436E	5.2	3.4
比較例１０		pCUP2-Ptrp-NSDG-L436G	9.6	4.8
比較例１１		pCUP2-Ptrp-NSDG-L436H	10.9	4.6
比較例１２		pCUP2-Ptrp-NSDG-L436I	21.7	15.1
比較例１３		pCUP2-Ptrp-NSDG-L436K	10.3	3.2
比較例１４		pCUP2-Ptrp-NSDG-L436M	22.6	14.7
比較例１５		pCUP2-Ptrp-NSDG-L436P	3.7	-
比較例１６		pCUP2-Ptrp-NSDG-L436Q	10.6	7.2
比較例１７		pCUP2-Ptrp-NSDG-L436R	3.6	-
比較例１８		pCUP2-Ptrp-NSDG-L436S	10.7	7.7

[0088] ＜考察＞

表２の結果から、配列番号１４で示されるアミノ酸配列の４３６番目のロイシンをアスパラギン酸（Ｄ）、グルタミン酸（Ｅ）、グリシン（Ｇ）、ヒスチジン（Ｈ）、リジン（Ｋ）、プロリン（Ｐ）、グルタミン（Ｑ）、アルギニン（Ｒ）、又は、セリン（Ｓ）に置換した９種類の変異体（比較例８～１１、１３、１５～１８）では、比較例１と比較して乾燥菌体重量が大きく低下しており、ポリマー生産性が低下したと考えられる。また、４３６番目のロイシンをイソロイシン（Ｉ）、又は、メチオニン（Ｍ）に置換した変異

体（比較例１２、１４）では、比較例１と比較して乾燥菌体重量および３ＨＨ比率のいずれにも変化は認められなかった。

[0089] 一方、４３６番目のロイシンをアラニン（Ａ）、システイン（Ｃ）、フェニルアラニン（Ｆ）、アスパラギン（Ｎ）、トレオニン（Ｔ）、トリプトファン（Ｗ）、又は、チロシン（Ｙ）に置換した変異体（実施例１４～２０）では、比較例１と比較して乾燥菌体重量に大きな変化がなく、かつ、３ＨＨ比率の低下が認められた。また、４３６番目のロイシンをバリン（Ｖ）に置換した変異体（実施例２１）では、比較例１と比較して乾燥菌体重量に大きな変化がなく、かつ、３ＨＨ比率の上昇が認められた。

[0090] 以上の結果から、配列番号１で示されるアミノ酸配列の４３６番目のロイシンをアラニン、システイン、フェニルアラニン、アスパラギン、トレオニン、トリプトファン、又は、チロシンに置換した変異を有するＰＨＡ合成酵素は、ポリマー生産性を維持したまま３ＨＨ比率が低いＰＨＡを製造するのに有用であり、また、前記アミノ酸配列の４３６番目のロイシンをバリンに置換した変異を有するＰＨＡ合成酵素は、ポリマー生産性を維持したまま３ＨＨ比率が高いＰＨＡを製造するのに有用であることが分かる。

[0091] （実施例２３，２４、比較例１９～２１）Ｈ１６ ΔｐｈａＣ１ Ｐｔｒｃ－ｐｈａＪ４ｂ ｄＺ１，２，６／ｐＣＵＰ２－Ｐｔｒｐ－ＮＳＤＧΔＣ５，ΔＣ１０，ΔＣ１３，ΔＣ１５，又はΔＣ２０株によるＰＨＡ生産

製造例１３～１７で作製したＨ１６ ΔｐｈａＣ１ Ｐｔｒｃ－ｐｈａＪ４ｂ ｄＺ１，２，６／ｐＣＵＰ２－Ｐｔｒｐ－ＮＳＤＧΔＣ５，ΔＣ１０，ΔＣ１３，ΔＣ１５，又はΔＣ２０株を用いて、比較例１と同様の方法で培養を行い、乾燥菌体重量および３ＨＨ比率を分析した。結果を表３に示した。

[0092]

[表3]

	宿主	プラスミド	乾燥菌体重量 (g/L)	3HH比率 (mol%)
実施例２２	H16 *ΔphaC1* P_{trc}-*phaJ4b* *ΔphaZ1,2,6*	pCUP2-Ptrp-NSDG-ΔCT13	24.2	13.1
実施例２３		pCUP2-Ptrp-NSDG-ΔCT15	21.3	10.2
比較例１		pCUP2-Ptrp-NSDG	20.6	14.9
比較例１９		pCUP2-Ptrp-NSDGΔCT5	24.0	15.3
比較例２０		pCUP2-Ptrp-NSDGΔCT10	20.7	15.5
比較例２１		pCUP2-Ptrp-NSDGΔCT20	4.2	-

[0093] ＜考察＞

表３の結果から、配列番号１４で示されるアミノ酸配列のＣ末端から５個のアミノ酸残基が欠失した変異体（比較例１９）および前記Ｃ末端から１０個のアミノ酸残基が欠失した変異体（比較例２０）では、比較例１と比較して乾燥菌体重量および３ＨＨ比率のいずれにも変化は認められず、前記Ｃ末端から２０個のアミノ酸残基が欠失した変異体（比較例２１）では、乾燥菌体重量が大きく低下した。しかし、前記Ｃ末端から１３個のアミノ酸残基が欠失した変異体（実施例２２）および前記Ｃ末端から１５個のアミノ酸残基が欠失した変異体（実施例２３）では、乾燥菌体重量に大きな変化がなく、かつ、３ＨＨ比率の低下が認められた。

[0094] 以上の結果から、配列番号１で示されるアミノ酸配列のＣ末端から適切な個数のアミノ酸残基が欠失した変異を有するＰＨＡ合成酵素は、ポリマー生産性を維持したまま３ＨＨ比率が低いＰＨＡを製造するのに有用であることが分かる。

請求の範囲

[請求項1] 配列番号１で示されるアミノ酸配列と８５％以上の配列同一性を示し、かつ、下記（ａ）～（ｃ）のいずれか１以上の変異を含むアミノ酸配列を有する、変異型ポリヒドロキシアルカン酸合成酵素。

変異（ａ）：配列番号１で示されるアミノ酸配列のＮ末端から３８９番目のセリンが、セリン以外のアミノ酸に置換された変異

変異（ｂ）：配列番号１で示されるアミノ酸配列のＮ末端から４３６番目のロイシンが、ロイシン以外のアミノ酸に置換された変異

変異（ｃ）：配列番号１で示されるアミノ酸配列のＣ末端から１１個以上１９個以下のアミノ酸残基が欠失された変異

[請求項2] 変異（ａ）が、配列番号１に示すアミノ酸配列のＮ末端から３８９番目のセリンがシステイン、イソロイシン、トレオニン又はバリンに置換された変異である、請求項１に記載の変異型ポリヒドロキシアルカン酸合成酵素。

[請求項3] 変異（ａ）が、配列番号１に示すアミノ酸配列のＮ末端から３８９番目のセリンがアスパラギン酸、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、リジン、アスパラギン、プロリン、アルギニン又はトリプトファンに置換された変異である、請求項１に記載の変異型ポリヒドロキシアルカン酸合成酵素。

[請求項4] 変異（ｂ）が、配列番号１に示すアミノ酸配列のＮ末端から４３６番目のロイシンがバリンに置換された変異である、請求項１～３のいずれか１項に記載の変異型ポリヒドロキシアルカン酸合成酵素。

[請求項5] 変異（ｂ）が、配列番号１に示すアミノ酸配列のＮ末端から４３６番目のロイシンがアラニン、システイン、フェニルアラニン、アスパラギン、トレオニン、トリプトファン又はチロシンに置換された変異である、請求項１～３のいずれか１項に記載の変異型ポリヒドロキシアルカン酸合成酵素。

[請求項6] 変異（ｃ）が、配列番号１に示すアミノ酸配列のＣ末端から１２個

以上１９個以下のアミノ酸残基が欠失された変異である、請求項１～５のいずれか１項に記載の変異型ポリヒドロキシアルカン酸合成酵素。

[請求項7] 配列番号１に示すアミノ酸配列のＮ末端から１４９番目のアスパラギンがセリンに置換された変異をさらに含むアミノ酸配列を有する、請求項１～６のいずれか１項に記載の変異型ポリヒドロキシアルカン酸合成酵素。

[請求項8] 配列番号１に示すアミノ酸配列のＮ末端から１７１番目のアスパラギン酸がグリシンに置換された変異をさらに含むアミノ酸配列を有する、請求項１～７のいずれか１項に記載の変異型ポリヒドロキシアルカン酸合成酵素。

[請求項9] 請求項１～８のいずれか１項に記載の変異型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。

[請求項10] 請求項９に記載の遺伝子を有する形質転換体。

[請求項11] 宿主が真正細菌である請求項１０に記載の形質転換体。

[請求項12] 真正細菌がカプリアビダス属に属する細菌である請求項１１に記載の形質転換体。

[請求項13] 真正細菌がカプリアビダス　ネカトールである請求項１１に記載の形質転換体。

[請求項14] 真正細菌がカプリアビダス　ネカトールＨ１６である請求項１１に記載の形質転換体。

[請求項15] 請求項１０～１４のいずれか１項に記載の形質転換体を培養する工程を含む、ポリヒドロキシアルカン酸の製造方法。

[請求項16] ポリヒドロキシアルカン酸が、３－ヒドロキシヘキサン酸をモノマーユニットとして含有する、請求項１５に記載のポリヒドロキシアルカン酸の製造方法。

[請求項17] ポリヒドロキシアルカン酸が、３－ヒドロキシ酪酸と３－ヒドロキシヘキサン酸との共重合体である、請求項１５に記載のポリヒドロキ

シアルカン酸の製造方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2019/000453

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl. C12N15/60(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N9/88(2006.01)i, C12P7/62(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)
Int.Cl. C12N15/60, C12N1/21, C12N9/88, C12P7/62

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

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2019
Registered utility model specifications of Japan	1996-2019
Published registered utility model applications of Japan	1994-2019

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), WPIDS/WPIX (STN), UniProt/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 03/050277 A1 (RIKEN) 19 June 2003, claims, page 1, line 26 to page 2, line 3, page 2, paragraph [0002], page 6, lines 2-4, example 2, table 3, SEQ ID NO: 1 & US 2005/0009949 A1, claims, paragraphs [0005]-[0006], [0036], example 2, table 3, SEQ ID NO: 1 & EP 1457554 A1	1-17

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
13 March 2019 (13.03.2019)	26 March 2019 (26.03.2019)

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2019/000453

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KICHISE, T. et al., "Enhanced accumulation and changed monomer composition in polyhydroxyalkanoate (PHA) copolyester by in vitro evolution of Aeromonas caviae PHA synthase", Applied and Environmental Microbiology (2002) vol. 68, no. 5, pp. 2411-2419, ISSN: 0099-2240, page 2411, abstract, page 2414, fig. 2, page 2416, table 1	1-17
Y	TSUGE, T. et al., "Combination of N149S and D171G mutations in Aeromonas caviae polyhydroxyalkanoate synthase and impact on polyhydroxyalkanoate biosynthesis", FEMS Microbiol. Lett. (2007) vol. 277, pp. 217-222, ISSN: 0378-1097, page 217, abstract, page 219, table 1, page 220, table 2	1-17
Y	JP 2015-77103 A (INST OF PHYSICAL & CHEMICAL RES) 23 April 2015, claims, paragraphs [0015], [0019] (Family: none)	12-17
Y	WO 2017/104722 A1 (KANEKA CORP.) 22 June 2017, claims, paragraphs [0024], [0032] & US 2018/0371509 A1, claims, paragraphs [0033], [0041]	12-17
Y	WO 2017/056442 A1 (KANEKA CORP.) 06 April 2017, claims, paragraphs [0028], [0090] & US 2018/0305722 A1, claims, paragraphs [0035], [0106] & EP 3358002 A1	12-17

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１９／０００４５３

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N15/60(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N9/88(2006.01)i, C12P7/62(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.　C12N15/60, C12N1/21, C12N9/88, C12P7/62

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　１９７１－２０１９年
日本国実用新案登録公報　１９９６－２０１９年
日本国登録実用新案公報　１９９４－２０１９年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), WPIDS/WPIX (STN), UniProt/GeneSeq

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
Y	WO 03/050277 A1 (理化学研究所) 2003.06.19, 特許請求の範囲, 第１頁第２６行－第２頁第３行, 第２頁第２段落, 第６頁第２－４行, 実施例２, 表３, 配列番号１ & US 2005/0009949 A1, 特許請求の範囲,［０００５］－［０００６］, ［００３６］, 実施例２, 表３, 配列番号１ & EP 1457554 A1	1-17

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と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	国際調査報告の発送日
１３．０３．２０１９	２６．０３．２０１９

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
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）　４Ｂ　５８０２
藤澤　雅樹
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	KICHISE, T., et al., Enhanced accumulation and changed monomer composition in polyhydroxyalkanoate (PHA) copolyester by in vitro evolution of Aeromonas caviae PHA synthase, Applied and Environmental Microbiology (2002) Vol.68, No.5, pp.2411-2419, ISSN:0099-2240, 第２４１１頁要約、第２４１４頁図２、第２４１６頁表１	1-17
Y	TSUGE, T., et al., Combination of N149S and D171G mutations in Aeromonas caviae polyhydroxyalkanoate synthase and impact on polyhydroxyalkanoate biosynthesis, FEMS Microbiol. Lett. (2007) Vol.277, pp.217-222, ISSN:0378-1097, 第２１７頁要約、第２１９頁表１、第２２０頁表２	1-17
Y	JP 2015-77103 A (独立行政法人理化学研究所) 2015.04.23, 特許請求の範囲, ［００１５］, ［００１９］ (ファミリーなし)	12-17
Y	WO 2017/104722 A1 (株式会社カネカ) 2017.06.22, 特許請求の範囲, ［００２４］, ［００３２］ & US 2018/0371509 A1, 特許請求の範囲, ［００３３］, ［００４１］	12-17
Y	WO 2017/056442 A1 (株式会社カネカ) 2017.04.06, 特許請求の範囲, ［００２８］, ［００９０］ & US 2018/0305722 A1, 特許請求の範囲, ［００３５］, ［０１０６］ & EP 3358002 A1	12-17