

(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
2022年9月1日(01.09.2022)



(10) 国際公開番号

WO 2022/181654 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 15/55 (2006.01) C12N 9/16 (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01) C12N 15/31 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01) C12P 7/44 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2022/007457

(22) 国際出願日: 2022年2月24日(24.02.2022)

(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 2021-028444 2021年2月25日(25.02.2021) JP

(71) 出願人: 東レ株式会社 (TORAY INDUSTRIES, INC.) [JP/JP]; 〒1038666 東京都中央区日本橋室町2丁目1番1号 Tokyo (JP). 国立研究開発法人産業技術総合研究所 (NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒1008921 東京都千代田区霞が関一丁目3番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 中村 仁美 (NAKAMURA Hitomi); 〒2488555 神奈川県鎌倉市手広6丁目10番1号 東レ株式会社 基礎研究センター内 Kanagawa (JP). 磯部 匡平 (ISOBE Kyohei); 〒2488555 神奈川県鎌倉市手広6丁目10番1号 東レ株式会社 基礎研究センター内 Kanagawa (JP). 河

村 健司 (KAWAMURA Kenji); 〒2488555 神奈川県鎌倉市手広6丁目10番1号 東レ株式会社 基礎研究センター内 Kanagawa (JP). 山田 勝成 (YAMADA Katsushige); 〒2488555 神奈川県鎌倉市手広6丁目10番1号 東レ株式会社 基礎研究センター内 Kanagawa (JP). 佐分元 (SABURI Hajime); 〒2488555 神奈川県鎌倉市手広6丁目10番1号 東レ株式会社 基礎研究センター内 Kanagawa (JP). 寺岡 佳晃 (TERAOKA Yoshiaki); 〒2488555 神奈川県鎌倉市手広6丁目10番1号 東レ株式会社 基礎研究センター内 Kanagawa (JP). 亀田 倫史 (KAMEDA Tomoshi); 〒1350064 東京都江東区青海2-3-26 国立研究開発法人産業技術総合研究所内 Tokyo (JP). 池部 仁善 (IKEBE Kimiyoshi); 〒1350064 東京都江東区青海2-3-26 国立研究開発法人産業技術総合研究所内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人平木国際特許事務所 (HIRAKI & ASSOCIATES); 〒1056232 東京都港区愛宕二丁目5-1 愛宕グリーンヒルズ MORI タワー32階 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH,

(54) Title: VARIANT ACYL-COA HYDROLASE

(54) 発明の名称: 変異型アシル-CoAヒドロラーゼ

(57) Abstract: The present invention addresses the problem of improving the capacity for producing 3-hydroxyadipic acid and/or α -hydromconic acid by using variant acyl-CoA hydrolase or bacteria with a nucleic acid that codes for the variant acyl-CoA hydrolase introduced thereto. Provided is a variant acyl-CoA hydrolase having acyl-CoA-hydrolase activity, comprising a polypeptide having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1, or a polypeptide having an amino acid sequence having at least 60% sequence identity with the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 and having acyl-CoA hydrolase activity, wherein a portion of the amino acids has been substituted. Or, provided is a microorganism with a nucleic acid that codes for said variant acyl-CoA hydrolase introduced thereto.

(57) 要約: 変異型アシル-CoAヒドロラーゼ、または当該変異型アシル-CoAヒドロラーゼをコードする核酸を導入した微生物を用いて、3-ヒドロキシアジピン酸および/または α -ヒドロムコン酸の生産能を向上させることを課題とする。配列番号1のアミノ酸配列を有するポリペプチド、あるいは配列番号1のアミノ酸配列と60%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を有し、アシル-CoAヒドロラーゼ活性を有するポリペプチドの一部のアミノ酸が置換した変異型アシル-CoAヒドロラーゼであって、アシル-CoAヒドロラーゼ活性を有する変異型アシル-CoAヒドロラーゼ、または当該変異型アシル-CoAヒドロラーゼをコードする核酸を導入した微生物。

WO 2022/181654 A1

KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY,
MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ,
NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT,
QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

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

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：変異型アシル-CoAヒドロラーゼ

技術分野

[0001] 本発明は、微生物による3-ヒドロキシアジピン酸および/または α -ヒドロムコン酸の製造に有用な変異型アシル-CoAヒドロラーゼ、および当該変異型酵素をコードする核酸を導入した微生物、および当該微生物を用いた3-ヒドロキシアジピン酸および/または α -ヒドロムコン酸の製造方法に関する。

背景技術

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

[0003] 微生物を利用した3-ヒドロキシアジピン酸等の製造方法として、特許文献1では、3-ヒドロキシアジピン酸および α -ヒドロムコン酸の生産に関与するポリペプチドをコードする核酸を導入、または当該ポリペプチドの発現を増強した遺伝子改変微生物および該当微生物を用いた物質製造方法が開示されている。

[0004] 微生物を利用した3-ヒドロキシアジピン酸の生合成に関連する文献の例としては、非天然の微生物を用いた1,3-ブタジエンの製造に関する特許文献2の中で、スクシニル-CoAから1,3-ブタジエンを生合成する経路において3-ヒドロキシアジピル-CoAから3-ヒドロキシアジピン酸(3-ヒドロキシアジペート)を代謝中間体として生成する反応が記載されている。

[0005] 微生物を利用した α -ヒドロムコン酸の生合成に関連する文献の例としては、非天然の微生物を用いたムコン酸の製造に関する特許文献3の中で、スクシニル-CoAからtrans, trans-ムコン酸を生成する経路において2, 3-デヒドロアジピル-CoAから α -ヒドロムコン酸(2, 3-デヒドロアジペート)を代謝中間体として生成する反応が記載されている。

[0006] 特許文献1から3に記載された3-ヒドロキシアジピン酸または α -ヒドロムコン酸生合成経路では、いずれもCoAトランスフェラーゼ、アシル-CoAヒドロラーゼあるいはアシル-CoAシクターゼ(アシル-CoAリガーゼ)が3-ヒドロキシアジピン酸または α -ヒドロムコン酸を生成する酵素としての記載があるが、特許文献1では3-ヒドロキシアジピル-CoAから3-ヒドロキシアジピン酸または2, 3-デヒドロアジピル-CoAから α -ヒドロムコン酸を生成する酵素としては、CoAトランスフェラーゼが好ましいとの記載がある。

[0007] 非特許文献1では、微生物を利用したアジピン酸の製造を目的とし、大腸菌のアシル-CoAヒドロラーゼであるTesBが、アジピン酸等を含む様々なアシル-CoAを加水分解することが記載されているが、当該酵素は基質許容性が広く、多様なアシル-CoAの加水分解を触媒することから、物質生産には適していないことが記載されている。

先行技術文献

特許文献

[0008] 特許文献1: WO2019/107516号

特許文献2: 特表2013-535203号公報

特許文献3: 米国特許出願公開第2011/0124911A1号明細書

非特許文献

[0009] 非特許文献1: Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 101, p. 2371-2382 (2017).

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0010] 3-ヒドロキシアジピン酸または α -ヒドロムコン酸の生合成経路に関しては、前述のとおりアシル-C_oAヒドロラーゼを用いることで、3-ヒドロキシアジピン酸または α -ヒドロムコン酸が生成され得ることが示唆されているものの、アシル-C_oAヒドロラーゼを用いた3-ヒドロキシアジピン酸または α -ヒドロムコン酸の生合成は推奨されておらず、実際に3-ヒドロキシアジピン酸または α -ヒドロムコン酸の製造を目的とした検証はなされていない。

[0011] そこで、3-ヒドロキシアジピル-C_oAおよび/または2, 3-デヒドロアジピル-C_oAを基質とした加水分解反応において優れた活性を示す変異型アシル-C_oAヒドロラーゼを見だし、新たな3-ヒドロキシアジピン酸または α -ヒドロムコン酸の生合成経路を確立することで、微生物を用いた3-ヒドロキシアジピン酸および/または α -ヒドロムコン酸の製造方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0012] 本発明者らは上記目的を達成するため鋭意検討した結果、特定のアミノ酸置換を導入した変異型アシル-C_oAヒドロラーゼが、3-ヒドロキシアジピル-C_oAを3-ヒドロキシアジピン酸へ、または2, 3-デヒドロアジピル-C_oAを α -ヒドロムコン酸へと加水分解する反応を触媒する優れた活性を示すことを見出し、本発明を完成させるに至った。

[0013] 具体的には、本発明は次の(1)～(8)から構成される。

(1) 下記の(i)および(ii)から選択されるポリペプチドの一部のアミノ酸が置換した、変異型アシル-C_oAヒドロラーゼであって、3-ヒドロキシアジピル-C_oAおよび/または2, 3-デヒドロアジピル-C_oA加水分解活性を有する、変異型アシルC_oA-ヒドロラーゼ：

(i) 配列番号1のアミノ酸配列を有するポリペプチド；または、

(ii) 配列番号1のアミノ酸配列と60%以上の配列同一性を有するア

ミノ酸配列を有し、アシル-C_oAヒドロラーゼ活性を有するポリペプチド。

(2) 前記置換が、アシル-C_oA基質と相互作用をする領域のいずれかのアミノ酸の置換である、(1)に記載の変異型アシル-C_oAヒドロラーゼ。

(3) 前記アシル-C_oA基質と相互作用をする領域が、配列番号1のアミノ酸配列でのアミノ酸残基30~40、64~70、82~89、202~228および/または277~286に相当する領域である、(2)に記載の変異型アシル-C_oAヒドロラーゼ。

(4) 前記置換が、配列番号1のアミノ酸配列における、L31、Q33、F35、F64、P67、G84、N85、S86、F87、D204、L205、N206、F207、L208、P209、および/またはF219残基に相当するアミノ酸の置換である、(3)に記載の変異型アシル-C_oAヒドロラーゼ。

(5) (1)~(4)のいずれかに記載の変異型アシル-C_oAヒドロラーゼをコードする遺伝子を有する微生物。

(6) (5)に記載の微生物を、炭素源を発酵原料として含む培地にて培養する工程を含む、3-ヒドロキシアジピン酸および/または α -ヒドロムコン酸の製造方法。

(7) アシル-C_oAヒドロラーゼ活性を有するポリペプチドのアミノ酸配列のうち一部のアミノ酸を置換したアミノ酸配列をコードする遺伝子を発現させて、3-ヒドロキシアジピル-C_oAおよび/または2,3-デヒドロアジピル-C_oA加水分解活性を有するポリペプチドを得る工程を含む、変異型アシル-C_oAヒドロラーゼの製造方法。

(8) 前記置換が、前記ポリペプチドにおけるアシル-C_oA基質と相互作用をする領域のいずれかのアミノ酸の置換である、(7)に記載の変異型アシル-C_oAヒドロラーゼの製造方法。

本明細書は本願の優先権の基礎となる日本国特許出願番号2021-028444号の

開示内容を包含する。

発明の効果

[0014] 本発明に係る変異型アシル-CoAヒドロラーゼは、3-ヒドロキシアジピル-CoAおよび/または2,3-デヒドロアジピル-CoAを基質とした加水分解反応において3-ヒドロキシアジピン酸および/または α -ヒドロムコン酸の生産性に優れる。そのため、本発明に係る微生物は変異型アシル-CoAヒドロラーゼをコードする遺伝子を有することから、3-ヒドロキシアジピン酸および/または α -ヒドロムコン酸の生産性に優れ、これらの物質の生産性を大幅に向上させることができる。

発明を実施するための形態

[0015] 以下、本発明をより詳細に説明するが、本発明は以下の実施の形態に限定されるものではなく、本発明の要旨の範囲内であれば種々変更して実施することができる。

[0016] 以下、本明細書では3-ヒドロキシアジピン酸を3HA、 α -ヒドロムコン酸をHMA、3-ヒドロキシアジピル-CoAを3HA-CoA、また2,3-デヒドロアジピル-CoAをHMA-CoAと略すことがある。

[0017] 1. 変異型アシル-CoAヒドロラーゼ

本明細書に記載の変異型アシル-CoAヒドロラーゼは、下記の(i)および(ii)から選択されるポリペプチドの一部のアミノ酸が置換した変異型アシル-CoAヒドロラーゼである。

(i) 配列番号1のアミノ酸配列を有するポリペプチド、

(ii) 配列番号1のアミノ酸配列と60%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を有し、アシル-CoAヒドロラーゼ活性を有するポリペプチド。

なお、本明細書において、「変異型」とは、「野生型」として同定されている公知のタンパク質または遺伝子に改変を加えたものを指す。

[0018] アシル-CoAヒドロラーゼとは、加水分解酵素のファミリー、特にチオエステル結合に作用するものに属しており、アシル-CoAと水を基質とし

て、C○Aとカルボキシレートを生成する化学反応を触媒する酵素である。本明細書において、アシル-C○Aヒドロラーゼの酵素活性は、3HA-C○Aおよび／またはHMA-C○A加水分解活性により判定することができる。3HA-C○Aおよび／またはHMA-C○A加水分解活性は、アシル-C○Aヒドロラーゼを発現し、3HA-C○Aおよび／またはHMA-C○Aを生産する機能を持つ微生物の培養により得られる3HAおよび／またはHMAの生産量から、あるいは、精製したアシル-C○Aヒドロラーゼと3HA-C○Aおよび／またはHMA-C○Aを溶液中で混合して得られるC○A、3HAおよび／またはHMAの生産量、あるいは3HA-C○Aおよび／またはHMA-C○Aの消費量から判定することができる。

[0019] 本明細書に記載の変異型アシル-C○Aヒドロラーゼは、下記の(i)および(ii)から選択されるポリペプチドの一部のアミノ酸が置換したポリペプチドであり：

(i) 配列番号1のアミノ酸配列を有するポリペプチド、すなわち、大腸菌由来のアシル-C○Aヒドロラーゼ(TesB)、

(ii) 配列番号1のアミノ酸配列と60%以上の配列同一性を示すアミノ酸配列を有し、アシル-C○Aヒドロラーゼ活性を有するポリペプチド；

好ましくは、前記の置換により3HA-C○Aおよび／またはHMA-C○A加水分解活性が向上した、変異型アシル-C○Aヒドロラーゼである。

[0020] 本明細書に記載の変異型アシル-C○Aヒドロラーゼは、一部のアミノ酸が置換した変異型アシル-C○Aヒドロラーゼであって、3HA-C○Aおよび／またはHMA-C○A加水分解活性を有することを特徴とする。具体的には、30℃の条件下で、3HA-C○Aおよび／またはHMA-C○A加水分解活性を有し、好ましくは置換前、すなわち、対応する野生型のアシル-C○Aヒドロラーゼと比較して高い3HA-C○Aおよび／またはHMA-C○A加水分解活性を有し、より好ましくは比活性で1.1～100倍、さらに好ましくは1.5～50倍、特に好ましくは2.0～20倍の3HA-C○Aおよび／またはHMA-C○A加水分解活性を有することを特徴

とする。

[0021] 配列番号1のアミノ酸配列と60%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドとは、T e s Bとして同定されているものとのアミノ酸配列の配列同一性が60%以上であり、アシル-CoAヒドロラーゼと類似の機能または構造を有すると推定されるポリペプチドのことをいう。本明細書に記載の発明で利用されるアシル-CoAヒドロラーゼとしては、配列番号1のアミノ酸配列に対して配列同一性が60%以上であり、65%以上、70%以上、80%以上、90%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上または99%以上であることが好ましい。以下、本明細書では配列番号1のアミノ酸配列と配列同一性を示すアミノ酸配列を有し、アシル-CoAヒドロラーゼ活性を有するポリペプチドを「ホモログ」と称することがある。

[0022] 配列番号1のアミノ酸配列と60%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドの例としては、S e r r a t i a g r i m e s i i由来のアシル-CoAヒドロラーゼ (NCBI Protein ID: WP__037425284、配列番号2)、H a f n i a p s y c h r o t o l e r a n s由来のアシル-CoAヒドロラーゼ (NCBI Protein ID: WP__188474315、配列番号3)、P s e u d o m o n a s a e r u g i n o s a由来のアシル-CoAヒドロラーゼ (NCBI Protein ID: MXH36765、配列番号4)、A c i n e t o b a c t e r b a u m a n i i由来のアシル-CoAヒドロラーゼ (NCBI Protein ID: SST03463、配列番号5)、S h i m w e l l i a b l a t t a e由来のアシル-CoAヒドロラーゼ (NCBI Protein ID: WP__002438960、配列番号6)、E n t e r o b a c t e r c l o a c a e由来のアシル-CoAヒドロラーゼ (NCBI Protein ID: WP__063144757、配列番号7)などが挙げられる。

[0023] 本明細書において「配列同一性」とは、2つのアミノ酸配列または塩基配

列にギャップを導入して、またはギャップを導入しないで整列させた場合の、最適なアラインメントにおいて、オーバーラップする全アミノ酸配列（翻訳開始点となるアミノ酸を含む）または塩基配列（開始コドンを含む）に対する同一アミノ酸または塩基の割合（パーセンテージ）を意味し、式（1）によって算出する。配列同一性は、この分野で汎用されているアルゴリズムであるBLAST（Basic Local Alignment Search Tool）を用いて容易に調べることができる。例えばBLASTは、NCBI（National Center for Biotechnology Information）やKEGG（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes）などのウェブサイトから誰でも利用可能であり、デフォルトのパラメーターを用いて容易に配列同一性を調べることができる。

配列同一性（％）＝一致数（ギャップ同士は無視する）／短いほうの配列長（ギャップを含まない長さ）×100・・・式（1）

式（1）に従い、Genetyxの機能（%Identity Matrix）を用いて配列番号1～7に記載のアミノ酸配列間の配列同一性を算出すると、配列番号1のアミノ酸配列と最も配列同一性の値が低い配列番号5の値は61.18％となり、配列番号1～7に記載のアミノ酸配列は、お互いに少なくとも60％以上の配列同一性を有している。Genetyxを用いた配列同一性の算出結果を表1に示す。なお、下記表1において、一番左側の数字は配列番号を示す。

[0024]

[表1]

[GENETYX : %Identity Matrix]

*Gaps are NOT taken into account.

[%]	1.Escheric	2.Serratia	3.Hafnia p	4.Pseudomo	5.Acinetob	6.Shimwell	7.Enteroba
1.Escherichia coli	↓						
2.Serratia grimesii	78.67	*					
3.Hafnia psychrotolerans	77.27	89.54	↓				
4.Pseudomonas aeruginosa	88.11	79.44	77.35	*			
5.Acinetobacter baumannii	61.18	67.59	67.01	62.02	*		
6.Shimwellia blattae	80.41	78.74	77.00	82.22	60.97	*	
7.Enterobacter cloacae	88.11	78.32	76.57	91.25	61.53	81.81	*

[Match Count/Length]

	1.Escheric	2.Serratia	3.Hafnia p	4.Pseudomo	5.Acinetob	6.Shimwell	7.Enteroba
1.Escherichia coli	↓						
2.Serratia grimesii	225/286	*					
3.Hafnia psychrotolerans	221/286	257/287	↓				
4.Pseudomonas aeruginosa	252/286	228/287	222/287	*			
5.Acinetobacter baumannii	175/286	194/287	193/288	178/287	↓		
6.Shimwellia blattae	230/286	226/287	221/287	236/287	175/287	*	
7.Enterobacter cloacae	252/286	224/286	219/286	261/286	176/286	234/286	*

[0025] 本明細書に記載の変異型アシル-C_oAヒドロラーゼの特徴として、配列番号1のアミノ酸配列を有するポリペプチド、あるいは配列番号1のアミノ酸配列と60%以上の配列同一性を示すアミノ酸配列を有し、アシル-C_oAヒドロラーゼ活性を有するポリペプチドの一部のアミノ酸が置換した変異型アシル-C_oAヒドロラーゼであって、3HA-C_oAおよび/またはHMA-C_oA加水分解活性を有する変異型アシル-C_oAヒドロラーゼであることが挙げられる。変異型アシル-C_oAヒドロラーゼのアミノ酸置換による変異は、その変異を有する変異型アシル-C_oAヒドロラーゼが、3HA-C_oAおよび/またはHMA-C_oA加水分解活性を有する限り、特に限定されないが、アシル-C_oA基質と相互作用をする領域におけるアミノ酸置換であることが好ましい。アシル-C_oA基質と相互作用をするアミノ酸を置換した領域の数は特に限定されず、1領域であっても複数の領域であってもよい。アシル-C_oA基質と相互作用をする領域におけるアミノ酸置換数は、その変異を有する変異型アシル-C_oAヒドロラーゼが3HA-C_oAおよび/またはHMA-C_oA加水分解活性を有する限り、特に限定されないが1~数個であることが好ましく、具体的には1~10個が好ましく、1~6個が好ましく、1~5個がより好ましく、1~4個がさらに好ましく、1~3個がよりさらに好ましく、1~2個がよりさらに好ましく、1個が特に好ましい。

[0026] 本明細書に記載の変異型アシル-C_oAヒドロラーゼは、アシルC_oA基質と相互作用する領域におけるアミノ酸が野生型から置換されていることが好ましい。本明細書において、「相互作用」とは、タンパク質や低分子化合物などが互いに影響を及ぼすことを指し、例えば、静電作用や分子間力、水素結合などの影響が挙げられる。アシル-C_oAヒドロラーゼにおける、アシル-C_oA基質と相互作用する領域を決定する手段は、特に限定されないが、例えば以下の手段を取り得る。野生型のTesB（配列番号1）とHMA-C_oA基質の共結晶構造の情報からTesBにおける基質と相互作用する領域を識別できる（詳細は後述する）。次いで、目的のアシル-C_oAヒ

ドローラーゼ、すなわちT e s Bのホモログにおいて、配列番号1の当該領域に相当する領域を、基質と相互作用する領域として決定する。

[0027] T e s BとHMA-C o Aの共結晶、すなわち複合体結晶は、タンパク質水溶液の調製工程（A）、結晶化工程（B）、結晶中のタンパク質に基質を結合させる工程（C）で調製できる。特に好ましい調製方法としては、T e s Bまたは配列表の配列番号8のアミノ酸配列を含むT e s Bを1～20 mg/mLの濃度で含有する標的タンパク質水溶液を調製するA工程と、1～5 M塩化ナトリウム水溶液を含有する10～200 mM酢酸ナトリウム水溶液を上記T e s B水溶液に加えてT e s Bの結晶を成長させ、塩析させるB工程と、B工程の後に析出したT e s B結晶を1～10 mMのHMA-C o A溶液に浸漬させ、結晶中のT e s BにHMA-C o Aを結合させるC工程、を備える調製方法が挙げられる。

[0028] 具体的には、T e s Bまたは配列表の配列番号8に示されるアミノ酸配列を含むT e s Bを緩衝水溶液に溶解する。緩衝水溶液は、例えば、トリス緩衝液やリン酸緩衝液などが挙げられ、トリス緩衝液が好ましい。タンパク質の濃度は0.1～20 mg/mLが好ましく、1～10 mg/mLがより好ましい。

[0029] 結晶化工程は蒸気拡散法が好ましく、例えば、ハンギングドロップ法およびシッティングドロップ法が利用できる。具体的には、タンパク質溶液約100 μL未満を、貯留層溶液と混合し、このタンパク質/貯留層溶液と貯留層をカバーガラス等で密封し、結晶が成長するまで静置すればよい。

[0030] 貯留層溶液としては、例えば、当該分野で公知の沈殿剤および緩衝水溶液が挙げられ、沈殿剤と緩衝水溶液を組み合わせ使用しても良い。沈殿剤としては、塩化ナトリウムやポリエチレングリコールが好ましく、塩化ナトリウムがより好ましい。塩化ナトリウムの濃度は1～10 Mが好ましく、1～5 Mがより好ましい。

[0031] 緩衝水溶液は1～1000 mMの市販の緩衝水溶液が好ましく、10～200 mM酢酸ナトリウム水溶液がより好ましい。また、結晶を成長させる温

度としては、3～25℃が好ましく、10～20℃がより好ましい。結晶を成長させる時間は1日～1年が好ましく、3日～3週間がより好ましい。

[0032] その後、上記TesB結晶をHMA-COA溶液に加えて、そのまま静置すればTesBとHMA-COAの複合体が形成される。基質濃度としては、1～50mMが好ましく、1～10mMがより好ましい。静置する時間は1～60分が好ましく、1～30分がより好ましい。静置する温度としては、3～25℃が好ましく、10～20℃がより好ましい。

[0033] 上記の結晶は、X線結晶構造解析に供した際に少なくとも10Å以下の分解能、好ましくは4.0Å以下の分解能、より好ましくは3.4Å以下の分解能、特に好ましくは2.2Å以下の分解能を与えるだけの品質を有していることが好ましい。

[0034] 本明細書に記載の変異型アシル-COAヒドロラーゼでアミノ酸置換導入の対象としたアミノ酸残基は、TesBとHMA-COA基質の共結晶構造を用いて実施した分子動力学(Molecular dynamics:MD)法により選出することができ、中でも、選択した基質結合領域の構造変化を促進させた改良MDシミュレーション手法であるAdaptive Lambda Square Dynamics(ALSD)法が好ましく用いられる。ALSD手法の詳細は、Journal of Computational Chemistry, 35, 39-50(2014)に記載されている。

[0035] ALSD法により本明細書に記載の変異型アシル-COAヒドロラーゼでアミノ酸置換導入の対象としたアミノ酸残基を選択する場合、基質であるHMA-COAの構造変化を促進させ、TesBとの複合体構造を網羅的に探索する。具体的には、シミュレーションから得られた立体構造のうち、TesBの活性部位とHMA-COAの反応部位が接触している複合体構造を選び出し、TesB中の各アミノ酸残基の、HMA-COAとの接触率を算出した。異なる基質である3HA-COAについても同様の計算を行い、3HA-COAとの接触率を算出し、各基質に対する選択性が高まった変異型T

e s Bを提案するために、基質によって接触率が大きく異なるアミノ酸残基を置換候補として選出する。すなわち、3 H A - C o Aとの複合体では高い接触率を持ち、H M A - C o Aとは低い接触率を持つアミノ酸残基を選出し、これらのアミノ酸残基の置換を選出する。本MD計算法では、各シミュレーションにつき、T e s B結晶構造中の全てのアミノ酸残基に対し、各基質との接触率を相対的に示すNスコアが付与される。なお、本明細書に記載の発明で得られたT e s BとH M A - C o A基質の共結晶構造では、T e s Bが4量体となっている（総残基数1144）。基質によって接触率が大きく異なるアミノ酸残基は、高いNスコアを示す。高いNスコアとは、0以上であり、0.1以上であることが好ましく、0.2以上であることがより好ましく、0.3以上であることがより好ましく、0.4以上であることが特に好ましい。置換候補となるアミノ酸残基は、2回のシミュレーションから選出する。Nスコアが1回の算出結果において上位10位以内であり、尚且つ、2回の算出結果で上位30位以内であるアミノ酸残基を置換候補として選出する。

[0036] 配列番号1～7のアミノ酸配列を有するアシル-C o Aヒドロラーゼの多重整列において、アシル-C o A基質と相互作用をする領域とMD計算法により選出した好ましいアミノ酸置換部位を表2に示すとおりである。すなわち、アシル-C o A基質と相互作用をする領域としては、配列番号1のアミノ酸配列でのアミノ酸残基30～40、64～70、82～89、202～228および／または277～286に相当する領域であることが好ましく、これら領域の中でも、配列番号1のアミノ酸配列におけるL31、Q33、F35、F64、P67、G84、N85、S86、F87、D204、L205、N206、F207、L208、P209、および／またはF219残基に相当するアミノ酸であることがより好ましく、配列番号1のアミノ酸配列におけるN206および／またはQ33残基に相当するアミノ酸であることがさらに好ましい。置換後のアミノ酸については、置換後の変異型アシル-C o Aヒドロラーゼが3 H A - C o Aおよび／またはH M A - C o

A加水分解活性を有する限り、特に制限はないが、アミノ酸置換は、アミノ酸残基の極性が維持される置換であることが好ましい。すなわち、疎水性アミノ酸残基は他の疎水性残基に、親水性アミノ酸残基は他の親水性残基に置換することが好ましい。この時、グリシンは疎水性と親水性のどちらにも分類することができる。また、置換するアミノ酸残基が芳香族側鎖を有する場合、極性が維持される残基に置換、または他の芳香族側鎖に置換することが好ましい。例えば、N206とQ33残基のアミノ酸置換では、親水性アミノ酸であるリシン、アルギニン、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、グリシン、セリン、トレオニン、システイン、チロシン、グルタミンまたはアスパラギンへの置換が好ましく、その中でも塩基性アミノ酸であるリジン、アルギニン、ヒスチジンへの置換がより好ましい。配列番号1のアミノ酸配列における好適な置換位置および好適な置換アミノ酸の候補を表3に示す。

[0037]

[表2]

1. Escherichia coli	1	MSQALKNLLTLNLEKIEEGLFRGQSEDI	GLRQVFGGQVV	QALYA	AAKETVPEERL	VHSE
2. Serratia grimesii	1	MSQALQNLLDLLDLEKIEEGLFRGQSEDI	GLRQVFGGQVV	QALYA	AAKQTVPAERS	SVHSE
3. Hafnia psychrotolerans	1	MSQALQNLLDLLDLEKIEEGLFRGQSEDI	GLRQVFGGQVV	QALYA	AAKQTVPSERGI	HSE
4. Pseudomonas aeruginosa	1	MSQALNLLALLDLEKIEEGLFRGQSEDI	GLRQVFGGQVV	QALYA	AAKETVPEERL	VHSE
5. Acinetobacter baumannii	1	MSPELQNLISLLELEKIEEGLFRGQSEDI	GLRQVFGGQVV	QALYA	AAEQTIPEGRV	INSE
6. Shimwellia blattae	1	MSHALDTLLALLNLEKIEEGLFRGQSDI	GLRQVFGGQVV	QALYA	AATDTPSER	FVNSE
7. Enterobacter cloacae	1	MSQALNLLTLNLEKIEEGLFRGQSEDI	GLRQVFGGQVV	QALYA	AAKETVPADRL	VHSE
1. Escherichia coli	61	HSYFLRPGDSKPKIYDVETL	RDGNSFS	RRVAALQ	NGKPIFYMTAS	FQAPEAGFEHQKT
2. Serratia grimesii	61	HSYFLRPGDSKPKIYDVEIL	RDGNSFS	RRVSAIQ	HGKPIFYMTAS	FQSPEDGFEHQNT
3. Hafnia psychrotolerans	61	HSYFLRPGDSKPKIYDVEIL	RDGNSFS	RRVKAQ	NGKPIFYMTAS	FQSQEEGFEHQNT
4. Pseudomonas aeruginosa	61	HSYFLRPGDSQKPIYDVETL	RDGNSFS	RRVAALQ	NGKPIFYMTAS	FQAPEHGYEHQKA
5. Acinetobacter baumannii	61	HSYFLRPGDSQRPYDVEIL	RDGNSFS	RRISAIQ	HGKPIFYMTAS	FQAEEGFNHQNL
6. Shimwellia blattae	61	HSYFLRPGDSQKPIYDVEIL	RDGNSFS	RRVSAIQ	NGKPIFYMTAS	FQGPPEGFEHQKP
7. Enterobacter cloacae	61	HSYFLRPGDSAKPIYDVEIL	RDGNSFS	RRVAALQ	NGKPIFYMTAS	FQAPEPGYEHQKV
1. Escherichia coli	121	MPSAPADGLPSETQIAQSLAHL	LPVYKDKFICDRP	IEVRPVE	FHNPLKGVH	VAEPHRQV
2. Serratia grimesii	121	MPDVFPPEGIMSESEIAQKLSH	MLPDKVREKFIGQKPIEM	RPVKFHNPLKGS	VEEPNRIV	
3. Hafnia psychrotolerans	121	MPDVPPPELMSSEDIKLNLAHL	PIPEKREKFIGQKPIEM	RPVKFYNPLRGT	VEEPNRVAV	
4. Pseudomonas aeruginosa	121	MPPAPTDLGLHSETDIARL	LAHLPPQVKDFLQDKPL	LEIRPVEFHNPMK	GHIAEPPVRQV	
5. Acinetobacter baumannii	121	MPDVPLPETLASQDEIIQRL	AQTLPEPVKXKALRPN	PFEPRIQFYS	PFNPPQEPFRYI	
6. Shimwellia blattae	121	MPEAPAPESIPFETDIAR	KEHLPPVJKEKFLIEK	LEIRPVVFNH	PLQGHVDFP	TRQV
7. Enterobacter cloacae	121	MPSAPAPDDLKSETDIAR	ALAHLLPPQVKEKFLC	DKPL	LEIRPVEFHN	PMKGHIAEPPKRQV
1. Escherichia coli	181	WIRANGVPPDDLVRHQYLLG	YASDLN	FLRVALQPHGIG	LEPGIQIATID	HSMWFHRPFFN
2. Serratia grimesii	181	WFRANGTMPDDLRIHQYLLG	YASDEN	FLRVALQPHGIG	LEPGIQVATID	HSMWFHRPFR
3. Hafnia psychrotolerans	181	WFRANGVMPDDLRIHQYLLG	YASDEN	FLRVALQPHGIG	LEPGIQVATID	HSMWFHRPFR
4. Pseudomonas aeruginosa	181	WLRANGAVPDDLRIHQYLLG	YASDEN	FLRVALQPHGIG	LEPGIQVATID	HSMWFHRPFFN
5. Acinetobacter baumannii	181	WFKAKGQLPDIPSLHNYLLG	YASDYN	FLRVALQPHGIG	LEPGIQVATID	HSMWFHRPFFK
6. Shimwellia blattae	181	WLRANGVTPDDLRIHQYLLG	YASDEN	FLRVALQPHGIG	LEPGIQVATID	HSMWFHRPFFN
7. Enterobacter cloacae	181	WIRANGVTPDEFDRVHQYLLG	YASDEN	FLRVALQPHGIG	LEPGIQVATID	HSMWFHRPFFN
1. Escherichia coli	241	LNEWLLYSVESTSASSARG	FVRGEFYTRDGV	LVA	TVQEGVM	RNRHN---
2. Serratia grimesii	241	MDDWLLYVVEPSASGARG	FVRGQFYTRDGV	LVA	TVQEGVIR	QRBA-
3. Hafnia psychrotolerans	241	MDDWLLYAVESTSASGARG	FVRGQFYTRDGV	LVA	TVQEGVIR	KRKRSE
4. Pseudomonas aeruginosa	241	INEWLLYSVESTSASSARG	FVRGEFYTRDGV	LVA	TVQEGVM	RNRNA--
5. Acinetobacter baumannii	241	IDDWLLYAIESTSASGARG	FVRGQFYDRQGV	LVA	TVQEGVIR	KRKRPR
6. Shimwellia blattae	241	MNDWLLYNVESTSASGARG	FVRGEFYTRDGV	LVA	SHVQEGVM	RQRQP-
7. Enterobacter cloacae	241	MNEWLLYSVESTSASSARG	FVRGEFYTRDGV	LVA	TVQEGVM	RNRG---

[表3]

置換位置	置換候補アミノ酸
L31	G, A, V, I, M, F, W, P
Q33	G, S, T, C, Y, N, D, E, K, R, H
F35	G, A, V, I, L, M, W, P, H, Y
F64	G, A, V, I, L, M, W, P, H, Y
P67	G, A, V, I, L, F, M, W
G84	A, V, I, L, M, F, W, P, S, T, C, Y, N, Q, D, E, K, R, H
N85	G, S, T, C, Y, Q, D, E, K, R, H
S86	G, T, C, Y, N, Q, D, E, K, R, H
F87	G, A, V, I, L, M, W, P, H, Y
D204	G, S, T, C, Y, N, Q, E, K, R, H
L205	G, A, V, I, M, F, W, P
N206	G, S, T, C, Y, Q, D, E, K, R, H
F207	G, A, V, I, L, M, W, P, H, Y
L208	G, A, V, I, M, F, W, P
P209	G, A, V, I, L, F, M, W
F219	G, A, V, I, L, M, W, P, H, Y

[0039] アシル-C_oAヒドロラーゼをコードする遺伝子は、配列番号1～7に記載のアミノ酸配列、またはこれらのホモログのアミノ酸配列に翻訳され得るような塩基配列であれば特に限定されず、各アミノ酸に対応するコドン（標準遺伝暗号）を参考に決定することができる。その際、本明細書において使用される宿主微生物にとってよく使用されているコドンで塩基配列を再設計してもよい。また、酵素精製などのため、タグ配列となるアミノ酸配列に翻訳され得る塩基配列を加えてもよい。

[0040] 配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする遺伝子の塩基配列の具体例としては、配列番号9に記載の塩基配列が挙げられる。

[0041] 2. 変異型アシル-C_oAヒドロラーゼを発現する微生物

本明細書に記載の微生物は、「1. 変異型アシル-C_oAヒドロラーゼ」の項に記載したいずれかの変異型アシル-C_oAヒドロラーゼをコードする

遺伝子を有する微生物である。本明細書に記載の微生物は、変異型アシル-C_oAヒドロラーゼを発現可能な遺伝子を含むことを特徴とし、3H₂A-C_oAおよび/またはHMA-C_oAの加水分解能を有する。好ましくは、アミノ酸の置換を有しないアシル-C_oAヒドロラーゼをコードする遺伝子を有する対応する微生物と比較して、高い3H₂A-C_oAおよび/またはHMA-C_oAの加水分解能を有する。具体的には、例えば、30℃の条件下の微生物培養において、野生型と比較して、3H₂Aおよび/またはHMAの比生産活性で1.05~10倍、特に1.1~5倍、さらには1.2~3倍の加水分解能を有することが好ましい。

[0042] 本明細書に記載の微生物にて変異型アシル-C_oAヒドロラーゼを発現させる方法は特に限定されず、公知の手法による、内在のアシル-C_oAヒドロラーゼをコードする遺伝子への変異の導入、微生物内で自律複製可能な発現ベクターを利用した変異型アシル-C_oAヒドロラーゼをコードする遺伝子の導入、微生物のゲノム上への相同組換え等の手法を用いた変異型アシル-C_oAヒドロラーゼをコードする遺伝子の導入、または内在のアシル-C_oAヒドロラーゼをコードする遺伝子の、変異型アシル-C_oAヒドロラーゼをコードする遺伝子への置換などの方法が具体例として挙げられるが、本明細書に記載の微生物では、微生物のゲノム上への相同組換え等の手法を用いた変異型アシル-C_oAヒドロラーゼをコードする遺伝子の導入や、微生物内で自律複製可能な発現ベクターを利用した変異型アシル-C_oAヒドロラーゼをコードする遺伝子の導入することが好ましい。

[0043] 本明細書において、発現させる変異型アシル-C_oAヒドロラーゼをコードする遺伝子を発現ベクターに組み込む場合、当該発現ベクターはプロモーター、リボソーム結合配列、発現させるタンパク質をコードする遺伝子、転写終結配列により構成されていることが好ましい。

[0044] 変異型アシル-C_oAヒドロラーゼをコードする遺伝子を微生物ゲノムに組み込む場合、ゲノム組み込み用核酸はプロモーター、リボソーム結合配列、発現させるタンパク質をコードする遺伝子、転写終結配列により構成され

ていること、微生物が従来保有している野生型アシル-C o Aヒドロラーゼまたはそのホモログを置き換える形で変異型アシル-C o Aヒドロラーゼをコードする遺伝子を組み込むことが好ましい。また、プロモーター活性を制御する遺伝子が含まれていてもよい。

[0045] 本明細書において、用いるプロモーターは、微生物内で酵素を発現させられるものであれば特に限定されないが、例えば *gap* プロモーター、*trp* プロモーター、*lac* プロモーター、*tac* プロモーター、T7 プロモーターなどが挙げられる。

[0046] 本明細書において、発現ベクターを用いて遺伝子の導入や、タンパク質の発現を行う場合は、当該微生物中で自律複製可能であれば特に限定されないが、例えば *pBBR1MCS* ベクター、*pBR322* ベクター、*pMW* ベクター、*pET* ベクター、*pRSF* ベクター、*pCDF* ベクター、*pACYC* ベクター、および上述のベクターの派生型などが挙げられる。

[0047] 本明細書において、ゲノム組み込み用核酸を用いて遺伝子の導入や、タンパク質の発現を行う場合は、部位特異的相同組換えを用いて導入する。部位特異的相同組換えの方法は特に限定されないが、例えば λ Redレコンビナーゼおよび *sacB* 遺伝子を用いる方法（例えば、*Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2007; 71 (12) : 2905-2911を参照）、 λ RedレコンビナーゼおよびFLPreコンビナーゼを用いる方法（例えば、*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2000; 97 (12) : 6640-6645を参照）が挙げられる。

[0048] 発現ベクターまたはゲノム組み込み用核酸の導入方法は、微生物に核酸を導入する方法であれば特に限定されないが、例えば、エレクトロポレーション法（例えば、*J. Bacteriol.* 1988; 170: 2796-2801を参照）、カルシウムイオン法（例えば、*J. Mol. Biol.* 1970; 53 (1) : 159-162を参照）などが挙げられる。

[0049] 本明細書において使用される微生物は、変異型アシル-C o Aヒドロラーゼをコードする遺伝子を有する遺伝子改変微生物であれば特に限定されない

が、3HAおよび／またはHMA生産能を有する微生物であることが好ましい。具体的には、*Serratia*属、*Escherichia*属、*Hafnia*属、*Corynebacterium*属、*Bacillus*属、*Streptomyces*属、*Cupriavidus*属、*Acinetobacter*属、*Alcaligenes*属、*Nocardioides*属、*Brevibacterium*属、*Delftia*属、*Shimwellia*属、および*Aerobacter*属からなる群より選ばれる微生物であることが好ましく、*Serratia*属または*Escherichia*属に属する微生物がより好ましく、*Escherichia*属微生物が特に好ましい。

[0050] 本明細書に記載の微生物が3HAおよび／またはHMA生産能を有する場合、変異型アシル-CoAヒドロラーゼを保有しない従来微生物よりも優れた3HAおよび／またはHMAの生産性を有することを特徴とする。ここで、「優れた3HAおよび／またはHMAの生産性」とは、同一の宿主微生物、発酵条件下で変異を導入していない野生型アシル-CoAヒドロラーゼのみを発現した微生物株に比べて高い蓄積濃度および／または収率で3HAおよび／またはHMAを生産することを意味する。

[0051] 本明細書に記載の微生物による3HAおよび／またはHMAの製造方法において、3HA収率は式(2)に従って算出する。HMA収率は、式(2)の3HAをHMAに置き換えることで算出する。

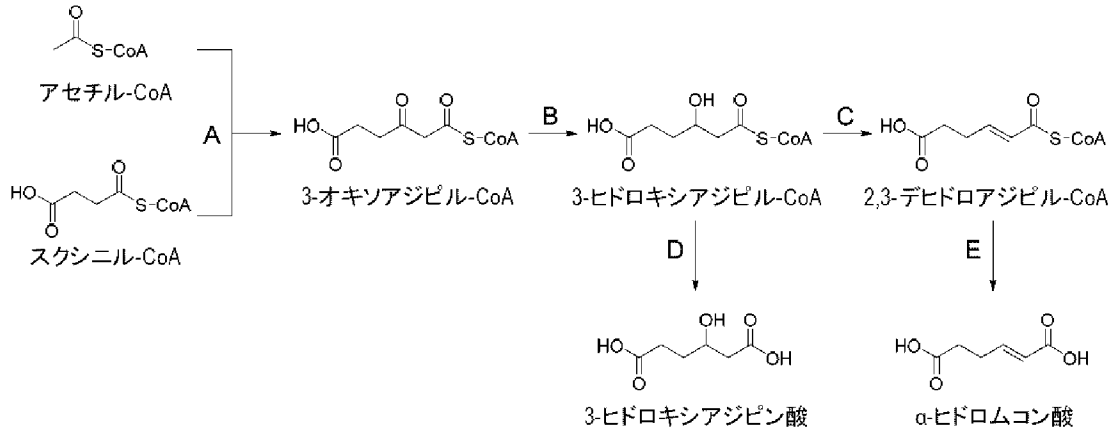
$$\text{収率 (\%)} = 3\text{HA (mol)} / \text{炭素源の消費量 (mol)} \times 100 \dots \text{式 (2)}$$

3HAおよびHMAは、下記スキーム1に示す反応経路により生産され、これら有機酸の発酵生産の際は、反応A、反応B、反応C、反応D、および反応Eを触媒する酵素を発現する微生物株を使用する。

[0052]

[化1]

スキーム 1



[0053] 上記スキーム 1 は、3 H A および / または H M A を生産するために必要な反応経路の例を示している。ここで、反応 A は、アセチル-C o A およびスクシニル-C o A から 3-オキソアジピル-C o A および補酵素 A を生成する反応を示す。反応 B は、3-オキソアジピル-C o A から 3-ヒドロキシアジピル-C o A を生成する反応を示す。反応 C は、3-ヒドロキシアジピル-C o A から 2, 3-デヒドロアジピル-C o A を生成する反応を示す。反応 D は、3-ヒドロキシアジピル-C o A から 3 H A を生成する反応を示す。反応 E は、2, 3-デヒドロアジピル-C o A から H M A を生成する反応を示す。

[0054] これらの反応を触媒する酵素の具体例としては、反応 A を触媒する酵素としてアシルトランスフェラーゼ、反応 B を触媒する酵素として 3-オキソアジピル-C o A レダクターゼ、反応 C を触媒する酵素としてエノイル-C o A ヒドラターゼ、反応 D および反応 E を触媒する酵素としてアシル-C o A ヒドロラーゼが挙げられる。

[0055] 反応 A を触媒する酵素をコードする遺伝子の具体例としては、*Pseudomonas putida* KT2440 株由来のアシルトランスフェラーゼ *pcaF* (NCBI Gene ID: 1041755、配列番号 10) が挙げられる。

[0056] 反応 B を触媒する酵素をコードする遺伝子の具体例としては、*Serra*

tia marcescens ATCC13880株由来の3-オキソアジピル-CoAレダクターゼ (NCBI Gene ID: JMPQ01000047, 1、配列番号11) が挙げられる。

[0057] 反応Cを触媒する酵素をコードする遺伝子の具体例としては、*Pseudomonas putida* KT2440株由来のエノイル-CoAヒドラーゼ *paaF* (NCBI Gene ID: 1046932、配列番号12) が挙げられる。

[0058] 反応Dおよび反応Eを触媒する酵素をコードする遺伝子の具体例としては、*Escherichia coli* MG1655株由来のTesB (NCBI Gene ID: HXW89_RS08820、配列番号9) が挙げられる。

[0059] 反応A~Cを触媒する酵素をコードする遺伝子は、微生物が従来保有する遺伝子でもよいし、人為的に導入しても良い。遺伝子の導入方法は特に限定されず、微生物内で自律複製可能な発現ベクターに当該遺伝子を組み込み微生物に導入する方法や、微生物のゲノムに当該遺伝子を組み込む方法などを用いることができる。

[0060] 3. 3-ヒドロキシアジピン酸および/または α -ヒドロムコン酸の製造方法

本明細書に記載の3HAおよび/またはHMAの製造方法は、「2. 変異型アシル-CoAヒドラーゼを発現する微生物」に記載の微生物を、炭素源を発酵原料として含む培地にて培養する工程を含む、ことを特徴とする。なお、前記微生物の細胞内で発現した変異型アシル-CoAヒドラーゼを微生物細胞から取り出し、精製して3HAおよび/またはHMAの製造に使用することもできる。本明細書に記載の3HAおよび/またはHMAの製造方法は、野生型のアシル-CoAヒドラーゼを有する微生物を使用した場合と比較して、例えば、1.05~10倍、特に1.1~5倍、さらには1.2~3倍の3HA-CoAおよび/またはHMA-CoA加水分解能を有することが好ましい。

[0061] 本明細書に記載の3HAおよび／またはHMAの製造方法では、前記遺伝子改変微生物を、通常の微生物が利用し得る炭素源を発酵原料として含有する培地、好ましくは液体培地中において培養し、有機酸を製造する。当該遺伝子改変微生物が利用し得る炭素源の他には、窒素源、無機塩および必要に応じてアミノ酸やビタミンなどの有機微量栄養素を程よく含有した培地を用いる。上記栄養源を含有していれば、天然培地、合成培地のいずれでも利用できる。

[0062] 発酵原料とは、当該遺伝子改変微生物が代謝し得る原料である。「代謝」とは、微生物が細胞外から取り入れた、あるいは細胞内で別の化学物質により生じたある化合物が、酵素反応により別の化学物質へと変換されることを指す。炭素源としては、糖類を好ましく用いることができる。また、糖以外にも、前記遺伝子改変微生物が単一炭素源として成育に利用可能なものであれば好ましく用いることができる。好ましい炭素源の具体例としては、グルコース、フルクトース、ガラクトース、マンノース、キシロース、アラビノース等の単糖類、これら単糖類が結合したシュクロース等の二糖類や、多糖類、これら糖類を含有する澱粉糖化液、糖蜜、セルロース含有バイオマス糖化液などが挙げられる。

[0063] また、3HAおよび／またはHMAを生産する場合、上記に挙げた糖以外にも、コハク酸などの炭素源を添加することで3HAおよび／またはHMAを生産することができる。

[0064] 上記に挙げた炭素源は、一種類のみ用いてもよいし、組み合わせて用いてもよい。炭素源の添加において、培地中の炭素源の濃度は、特に限定されず、炭素源の種類などに応じて適宜設定することができ、好ましくは、糖類は5～300g/L、コハク酸は0.1～100g/Lである。

[0065] 窒素源としては、例えば、アンモニアガス、アンモニア水、アンモニウム塩類、尿素、硝酸塩類、その他補助的に使用される有機窒素源、例えば、油粕類、大豆加水分解液、カゼイン分解物、その他のアミノ酸、ビタミン類、コーンステーパーリカー、酵母または酵母エキス、肉エキス、ペプトン等の

ペプチド類、各種発酵菌体およびその加水分解物などが使用できる。培地中の窒素源の濃度は、特に限定されないが、好ましくは0.1～50 g/Lである。

[0066] 当該遺伝子改変微生物の培養に用いる無機塩類としては、例えば、リン酸塩、マグネシウム塩、カルシウム塩、鉄塩およびマンガン塩等を適宜添加使用することができる。

[0067] 有機酸を生産するための遺伝子改変微生物の培養条件は、前記成分組成の培地、培養温度、攪拌速度、pH、通気量、植菌量などを、当該遺伝子改変微生物の種類および外部条件などに応じて、適宜調節あるいは選択して設定する。液体培養において発泡がある場合には、鉱油、シリコーン油および界面活性剤などの消泡剤を適宜培地に配合することができる。

[0068] 前記遺伝子改変微生物の培養物中に、有機酸が回収可能な量まで生産された後、生産された当該生産物を回収することができる。生産された当該生産物の回収、例えば単離は、蓄積量が適度に高まった時点で培養を停止し、その培養物から、発酵生産物を採取する一般的な方法に準じて行うことができる。具体的には、遠心分離、ろ過などにより菌体を分離したのち、カラムクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、活性炭処理、結晶化、膜分離、蒸留などにより、当該生産物を培養物から単離することができる。より具体的には、当該生産物の塩に酸性分を添加して析出物を回収する方法、培養物を逆浸透膜やエバポレーターなどを用いた濃縮操作により水を除去して当該生産物の濃度を高めた後、蒸留操作により回収、または冷却結晶化や断熱結晶化により当該生産物および／または当該生産物の塩の結晶を析出させ、遠心分離やろ過などにより当該生産物および／または当該生産物の塩の結晶を得る方法、培養物にアルコールを添加して糖が生産物をエステルとした後、蒸留操作により当該生産物のエステルを回収後、加水分解により当該生産物を得る方法などを挙げることが出来るがこれらに限定されるものではない。また、これらの回収方法は生成物の物性などにより適宜に選択して最適化することができる。

[0069] 4. 変異型アシル-C_oAヒドロラーゼの製造方法

本明細書に記載の変異型アシル-C_oAヒドロラーゼの製造方法（以下、「酵素製造方法」とも称する）は、アシル-C_oAヒドロラーゼ活性を有するポリペプチドのアミノ酸配列のうち一部のアミノ酸を置換したアミノ酸配列をコードする遺伝子を発現させる工程を含む、ことを特徴とする。本明細書に記載の酵素製造方法は、前記ポリペプチドよりも高い3-ヒドロキシアジピル-C_oAおよび/または2, 3-デヒドロアジピル-C_oA加水分解活性を有するアシル-C_oAヒドロラーゼを得ることが好ましい。

[0070] 本明細書に記載の酵素製造方法において、前記ポリペプチドにおけるアミノ酸の置換は、アシル-C_oA基質と相互作用をする領域のいずれかのアミノ酸の置換であることが好ましい。

[0071] 本明細書に記載の酵素製造方法は、好ましくは「2. 変異型アシル-C_oAヒドロラーゼを発現する微生物」の項に記載のいずれかの微生物を、当該微生物種に適した培地、温度等の条件下で培養する工程を含む。詳細な培養条件は、特に矛盾のない限り、「3. 3-ヒドロキシアジピン酸および/または α -ヒドロムコン酸の製造方法」の項の記載に準ずる。

[0072] 本明細書に記載の酵素製造方法は、好ましくは、微生物を培養した培養液より、変異型アシル-C_oAを単離・精製する工程を含む。具体的には、変異型アシル-C_oAヒドロラーゼは、例えば、液体培地で前記微生物を培養した培養液より、遠心分離によって菌体を回収し、菌体破碎を行った後、硫安沈殿、ゲルクロマトグラフィー等の公知の精製を行うことで製造することができる。本明細書に記載の酵素製造方法は、変異型アシル-C_oAヒドロラーゼを取得できれば、その具体的な手段は限定されず、公知の手段をいずれも使用することができる。

実施例

[0073] 本発明を以下の実施例によってさらに具体的に説明する。しかし、本発明の範囲は、この実施例によって制限されないものとする。

[0074] （参考例1）アシル-C_oAヒドロラーゼ発現用プラスミドの作製

大腸菌内で自律複製可能なベクター pCDF-1b (Novagen 製) を KpnI で切断し、pCDF-1b/KpnI を得た。大腸菌由来のアシル-CoA ヒドロラーゼである TesB (配列番号 1) をコードする遺伝子を増幅するために、Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655 株のゲノム DNA を鋳型としてアシル-CoA ヒドロラーゼ遺伝子 tesB (NCBI GeneID: HXW89_RS08820、配列番号 9) の全長を PCR 増幅するためのプライマーを設計し (配列番号 13、14)、常法に従って PCR 反応を行った。得られた断片および pCDF-1b/KpnI を、In-Fusion HD Cloning Kit を用いて連結し、大腸菌株 DH5 α に導入した。得られた組換え株から当該プラスミドを抽出し、常法により塩基配列を確認したプラスミドを pCDF-1b::tesB とした。

[0075] (参考例 2) 変異型アシル-CoA ヒドロラーゼ発現用プラスミドの作製
アシル-CoA ヒドロラーゼへのアミノ酸置換の導入には、QuickChange site-directed mutagenesis kit (New England Biolabs 製) を用いた。pCDF-1b::tesB を鋳型として、置換するアミノ酸残基の配列を含むプライマーを設計し (配列番号 15~21)、常法に従ってプラスミドの全長を PCR 反応で増幅した。得られた断片を KLD Enzyme Mix (New England Biolabs 製) を用いて処理し、大腸菌株 DH5 α に導入した。得られた組換え株から当該プラスミドを抽出し、常法により塩基配列を確認したプラスミドを pCDF-1b::tesB-N206K、pCDF-1b::tesB-N206H、pCDF-1b::tesB-N206G、pCDF-1b::tesB-N206R、pCDF-1b::tesB-Q33R とした。なお、2つのアミノ酸残基を置換した TesB-N206R-Q33R を発現するためのプラスミドは、pCDF-1b::tesB-N206R を鋳型とした PCR 反応により増幅した断片を用いて作製し、常法により塩基配列を確認したプラスミドを pCDF-1b:

: t e s B - N 2 0 6 R - Q 3 3 R とした。

[0076] (参考例3) 3HA-CoA合成酵素の発現用プラスミドの作製

大腸菌内で自律複製可能なベクターpBBR1MCS-2 (ME Kovach, (1995), Gene 166:175-176) をXhoIで切断し、pBBR1MCS-2/XhoIを得た。当該ベクターに構成的な発現プロモーターを組み込むために、Escherichia coli (E. coli) str. K-12 substr. MG1655のゲノムDNAを鋳型としてgapA (NCBI GeneID: NC_000913.3) の上流域200b (配列番号22) をPCR増幅するためのプライマーを設計し (配列番号23、24)、常法に従ってPCR反応を行った。得られた断片およびpBBR1MCS-2/XhoIを、In-Fusion HD Cloning Kit (タカラバイオ株式会社製) を用いて連結し、E. coli DH5 α に導入した。得られた組換え株から当該プラスミドを抽出し、常法により塩基配列を確認したプラスミドをpBBR1MCS-2::Pgapとした。続いてpBBR1MCS-2::PgapをScaIで切断し、pBBR1MCS-2::Pgap/ScaIを得た。反応Aを触媒する酵素をコードする遺伝子を増幅するために、Pseudomonas putida KT2440株のゲノムDNAを鋳型としてアシルトランスフェラーゼ遺伝子pcaF (配列番号10) の全長をPCR増幅するためのプライマーを設計し (配列番号25、26)、常法に従ってPCR反応を行った。得られた断片およびpBBR1MCS-2::Pgap/ScaIを、In-Fusion HD Cloning Kitを用いて連結し、大腸菌株DH5 α に導入した。得られた組換え株から当該プラスミドを抽出し、常法により塩基配列を確認したプラスミドをpBBR1MCS-2::ATとした。続いてpBBR1MCS-2::ATをScaIで切断し、pBBR1MCS-2::AT/ScaIを得た。反応Bを触媒する3-オキソアジピル-CoAレダクターゼをコードする核酸を増幅するために、Serratia marcescens ATCC13880株のゲ

ノムDNAを鋳型として3-オキソアジピル-CoAレダクターゼ遺伝子（配列番号11）の全長をPCR増幅するためのプライマーを設計し（配列番号27、28）、常法に従ってPCR反応を行った。得られた断片およびpBBR1MCS-2::AT/ScaIを、In-Fusion HD Cloning Kit（タカラバイオ株式会社製）を用いて連結し、E. coli DH5 α に導入した。得られた組換え株から当該プラスミドを抽出し、常法により塩基配列を確認したプラスミドをpBBR1MCS-2::AT3OR-kanRとした。続いてpBBR1MCS-2::AT3OR-kanRをSapIで切断し、pBBR1MCS-2::AT3OR-kanR/SapIを得た。クロラムフェニコール耐性遺伝子（配列番号36）の全長をPCR増幅するためのプライマーを設計し（配列番号37、38）、情報に従ってPCR反応を行った。得られた断片およびpBBR1MCS-2::AT3OR-kanR/SapIを、In-Fusion HD Cloning Kitを用いて連結し、大腸菌株DH5 α に導入した。得られた組換え株から当該プラスミドを抽出し、常法により塩基配列を確認したプラスミドをpBBR1MCS-2::AT3ORとした。

[0077] （参考例4）脱水酵素の発現用プラスミドの作製

pMW119（ニッポンジーン社製）をSacIで切断し、pMW119/SacIを得た。当該ベクターに構成的な発現プロモーターを組み込むために、E. coli str. K-12 substr. MG1655のゲノムDNAを鋳型としてgapA（NCBI Gene ID: NC_000913.3）の上流域200b（配列番号22）をPCR増幅するためのプライマーを設計し（配列番号29、30）、常法に従ってPCR反応を行った。得られた断片およびpMW119/SacIを、In-Fusion HD Cloning Kit（タカラバイオ株式会社製）を用いて連結し、E. coli DH5 α に導入した。得られた組換え株から当該プラスミドを抽出し、常法により塩基配列を確認したプラスミドをpMW119::Pgapとした。続いて、pMW119::PgapをSphIで切断し

、pMW119::Pgap/SphIを得た。反応Cを触媒する酵素をコードする遺伝子を増幅するために、*Pseudomonas putida* KT2440株のゲノムDNAを鋳型としてエノイル-CoAヒドラーゼ遺伝子paaF（配列番号12）の全長をPCR増幅するためのプライマーを設計し（配列番号31、32）、常法に従ってPCR反応を行った。得られた断片およびpMW119::Pgap/SphIを、In-Fusion HD Cloning Kit（タカラバイオ株式会社製）を用いて連結し、*E. coli* DH5 α に導入した。得られた組換え株から当該プラスミドを抽出し、常法により塩基配列を確認した。得られたプラスミドをpMW119::EHとした。

[0078] （参考例5）3HA-CoA合成酵素とアシル-CoAヒドロラーゼの発現用プラスミドの作製

pBBR1MCS-2::AT3ORをMfeIとKpnIで切断し、pBBR1MCS-2::AT3OR/MfeI_KpnIを得た。TesB（配列番号1）をコードする遺伝子を増幅するために、pCDF-1b::tesBを鋳型としてアシル-CoAヒドロラーゼ遺伝子tesB（NCBI GeneID:HXM89_RS08820、配列番号9）遺伝子の全長をPCR増幅するためのプライマーを設計し（配列番号39、40）、常法に従ってPCR反応を行った。得られた断片およびpBBR1MCS-2::AT3OR/MfeI_KpnIを、In-Fusion HD Cloning Kit（タカラバイオ株式会社製）を用いて連結し、*E. coli* DH5 α に導入した。得られた組換え株から当該プラスミドを抽出し、常法により塩基配列を確認したプラスミドをpBBR1MCS-2::AT3OR-tesBとした。

[0079] （参考例6）3HA-CoA合成酵素と変異型アシル-CoAヒドロラーゼの発現用プラスミドの作製

TesB-N206R（配列番号41）をコードする遺伝子を増幅するために、pCDF-1b::tesB-N206Rを鋳型としてアシル-CoA

ヒドロラーゼ遺伝子 *tesB-N206R* 変異型アシル-CoAヒドロラーゼ遺伝子の全長をPCR増幅するためのプライマーを設計し（配列番号39、40）、常法に従ってPCR反応を行った。得られた断片および *pBBR1MCS-2::AT3OR/MfeI_KpnI* を、*In-Fusion HD Cloning Kit*（タカラバイオ株式会社製）を用いて連結し、*E. coli DH5 α* に導入した。得られた組換え株から当該プラスミドを抽出し、常法により塩基配列を確認したプラスミドを *pBBR1MCS-2::AT3OR-tesB-N206R* とした。

[0080] （参考例7）アシル-CoAヒドロラーゼの発現と精製

アシル-CoAヒドロラーゼおよび変異型アシル-CoAヒドロラーゼは、*pCDF-1b::tesB* または *pCDF-1b::tesB-N206R* を導入した大腸菌 BL21 (DE3) 株で発現した。具体的には、LB培地（*Bacto*トリプトン（*Difco Laboratories* 製）10g/L、*Bacto*酵母エキス（*Difco Laboratories* 製）5g/L、塩化ナトリウム5g/L）50mLに、前記大腸菌を一白金耳植菌し、30℃、120rpmで振とう培養した。当該培養液10mLを2L坂口フラスコに入ったLB培地1Lに添加し、37℃、120rpmで振とう培養した。OD600が0.25~0.35になった時点で、振盪培養機の温度設定を18℃に下げ、振とう培養した。OD600が0.6程度になった時点で、イソプロピル- β -D-1チオガラクトピラノシド（IPTG）（*Sigma-Aldrich* 製）を終濃度500 μ Mとなるように添加し、18℃でさらに20時間振とう培養した。

[0081] 大腸菌で発現したアシル-CoAヒドロラーゼは、*His-Bind Kits*（*Novagen* 社製）を用いて精製した。*His-bind resin* 精製で得られた酵素液は、アミコンウルトラ（メルクミリポア製）UF膜（MW10000）を用いて濃縮し、保存用バッファー（20mM *Tris-HCl*、100mM *NaCl*、pH8.0）で置換した。精製した酵素溶液は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）で純

度を解析し、酵素濃度はバイオラッドプロテインアッセイ（ブラッドフォード法）により測定した。

[0082] （参考例8）HMA-CoA基質の合成

3-ヒドロキシアジピン酸-3,6-ラク톤は、国際公開第2016/068108号明細書に記載の方法で製造した。HMA-CoAの合成に使用した試薬は、記載がない限り富士フィルム和光純薬社製の試薬を使用した。3-ヒドロキシアジピン酸-3,6-ラク톤80mg（0.56mmol）をジクロロメタン2mLに溶解し、N,N-ジメチルホルムアミド5 μ L（0.05mmol）とオキサリクロリド90 μ L（1.0mmol）を加え、室温で30分間攪拌した。反応終了後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、得られた液体にテトラヒドロフラン2mLを加え、アシルクロライド溶液（0.28M）を得た。

[0083] Coenzyme A 9.6mg（0.012mmol、Sigma-Aldrich製）を0.5Mの炭酸水素ナトリウム溶液0.5mLに溶解し、アシルクロライド溶液0.5mLを加え、室温で攪拌した。15分後、1Nの塩酸を加え、反応液のpHを2~3に調整した。反応終了後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、ODSカラム（Purif-pack ODS 20, 30 μ m, Shoko Scientific）で3-ヒドロキシアジピン酸-3,6-ラクトン-CoAを粗精製した（メタノール：0.1%ギ酸水溶液、グラジエント=0-25%A、10分）。得られた溶出液をロータリーエバポレーターで濃縮し、0.5Mの炭酸水素ナトリウムを加えた。16時間後、pHが2~3になるまで50%ギ酸水溶液を加え、0.22 μ mフィルターでろ過した後、HPLCで精製した。

[0084] [HPLCによるHMA-CoAの精製]

HPLC：1260 Infinity（Agilent Technologies製）

カラム：Synergi hydro-RP（Phenomenex製）、長さ250mm、内径4.6mm、粒径4 μ m

移動相A：50 mMリン酸カリウム (pH 5.4)

移動相B：アセトニトリル

グラジエント (5–20%B、10分)

流速：1.0 mL/分

カラム温度：40°C

上記の条件でHPLC精製したHMA-CoAをロータリーエバポレーターで濃縮し、Strata C18-Eカラム (Phenomenex製) でリン酸カリウムを除去し、ロータリーエバポレーターで濃縮後、真空下で乾燥させてHMA-CoA 2.7 mgを得た。得られたHMA-CoAのNMRスペクトルは以下の通りであった。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D₂O) : δ 0.79 (s, 3H)、0.92 (s, 3H)、 δ 2.39–2.42 (m, 2H)、 δ 2.51–2.56 (m, 2H)、 δ 2.80–2.83 (m, 2H)、 δ 2.98–3.01 (m, 2H)、 δ 3.30–3.33 (m, 3H)、 δ 3.42–3.45 (m, 2H)、 δ 3.55–3.59 (m, 1H)、 δ 3.83–3.86 (m, 1H)、4.02 (s, 1H)、 δ 4.24 (s, 2H)、4.58 (d, 1H)、4.75–4.94 (m, 3H)、 δ 5.85 (d, 1H)、 δ 6.21 (d, 1H)、 δ 6.91–6.97 (m, 1H) δ 8.42 (s, 1H)、 δ 8.67 (s, 1H)。

[0085] (参考例9) 野生型TesBと基質のMDシミュレーション

配列番号8に示されるアミノ酸配列を含むTesBとHMA-CoAの複合結晶構造、または前記構造のHMA-CoAを3HA-CoAに置換したTesBと3HA-CoAの複合結晶構造を使用し、ALDS法を用いたMDシミュレーションを行った。各シミュレーションについてTesBのアミノ酸残基と基質との接触率を算出し、各アミノ酸残基に対して異なる基質による接触率の変動をNスコアで表記した。各シミュレーションは2回ずつ実施し、いずれかのシミュレーションにおいて算出されたNスコアが0以上であったアミノ酸残基を表4に示す。なお、各アミノ酸残基の残基番号は、配

列番号1のアミノ酸配列に相当する番号を記載している。

[0086] [表4]

アミノ酸	残基番号	Nスコア1	Nスコア2	Nスコア1 順位	Nスコア2 順位
N	206	3.468	2.707	1	2
D	204	2.908	2.775	2	1
P	209	1.663	1.339	3	3
Q	33	1.514	1.224	4	4
F	64	1.046	1.095	5	5
L	208	0.917	1.082	6	6
F	207	0.547	0.69	9	8
P	67	0.379	0.725	12	7
F	219	0.452	0.533	10	11
L	205	0.594	0.007	7	22
F	35	0.43	0.235	11	16
G	36	0.313	0.246	13	15
R	66	-0.073	0.62	1131	9
L	31	-0.066	0.386	1130	13
Q	278	0.159	0.149	15	17
G	84	-0.047	0.263	1129	14
N	85	-0.402	0.553	1134	10
V	281	0.076	0.014	18	21
E	112	0.141	-0.056	16	1132
T	228	0.034	0.041	20	19
I	224	0.011	0.06	22	18
Y	63	0.044	0.001	19	28
K	99	0.004	0.003	23	24
A	113	0	0.005	24	23
D	83	0	0.003	24	24
M	282	0	0.002	24	27
A	257	0	-0.001	24	1126
G	30	-0.005	0.003	1128	24
G	68	-0.003	-0.001	1127	1126
G	37	0	-0.007	24	1130
Q	109	0	-0.014	24	1131

[0087] (参考例10) 変異型T e s B - N 2 0 6 Rと基質のMDシミュレーション

シミュレーションで使用した構造が配列番号42の変異型アシル-C o Aヒドロラーゼ (T e s B - N 2 0 6 R) である以外は、参考例8と同様の方法でNスコアを算出した。T e s B - N 2 0 6 Rの構造は、参考例8にT e s BとHMA-C o Aの複合結晶構造において、T e s B (配列番号8)のN206残基に相当するアスパラギンを、*in silico*でアルギニンに置換して作製した。各シミュレーションは2回ずつ実施し、いずれかのシミュレーションにおいて算出されたNスコアが0以上であったアミノ酸残基を表5に示す。なお、各アミノ酸残基の残基番号は、配列番号1のアミノ酸配列に相当する番号を記載している。

[0088]

[表5]

アミノ酸	残基番号	Nスコア 1	Nスコア 2	Nスコア 1 順位	Nスコア 2 順位
D	204	2.449	2.093	1	1
R	206	1.874	1.699	2	2
P	209	0.818	1.302	9	3
N	85	1.181	0.46	4	9
F	35	0.925	0.496	7	7
F	64	1.387	0.006	3	29
S	86	1.159	0.198	5	19
F	87	1.028	0.313	6	13
L	208	0.462	0.662	12	5
L	31	0.574	0.391	10	11
F	219	0.295	0.57	17	6
N	286	0.302	0.462	16	8
G	84	0.358	0.438	15	10
R	82	0.546	0.251	11	17
N	284	0.436	0.349	13	12
Q	33	-0.589	1.224	1138	4
F	207	0.244	0.299	18	15
L	205	0.237	0.301	19	14
Q	278	0.064	0.234	23	18
L	65	0.359	-0.108	14	1134
E	112	0.187	0.05	20	22
G	36	0.16	0.043	21	23
R	66	0.151	-0.034	22	1132
K	99	0.001	0.067	28	21
G	30	0.017	0	24	33
Q	96	0	0.014	30	24
Q	109	0.011	0.002	25	32
N	97	0	0.013	30	25
F	152	0	0.011	30	27
D	69	0	0.007	30	28
R	55	0.006	0	26	33
G	68	-0.008	0.013	1128	25

[0089] (比較例1) 野生型TesBをコードする遺伝子を保有する大腸菌株の培

養

配列番号1に記載の大腸菌由来の野生型アシル-CoAヒドロラーゼTesBを保有するコントロール株として、グルコース・トランスポーターPtsG（配列番号33）をコードする遺伝子、およびピルビン酸キナーゼPykFとPykA（配列番号34、35）をコードする遺伝子を削除し、pBR1MCS-2::AT3OR、pMW119::EHとpCDF-1b::tesBを保有する*Escherichia coli* HMS174（DE3）株を使用した。

[0090] pH7に調整したクロラムフェニコール15 μ g/mL、アンピシリン100 μ g/mLとストレプトマイシン50 μ g/mLを含有するLB培地（Bactoトリプトン（Difco Laboratories社製）10g/L、Bacto酵母エキス（Difco Laboratories社製）5g/L、塩化ナトリウム5g/L）5mLに、前記大腸菌株を一白金耳植菌し、30 $^{\circ}$ C、120rpmで18時間振とう培養した。当該培養液0.05mLを試験管に入ったpH6.5に調整したクロラムフェニコール15 μ g/mL、アンピシリン100 μ g/mLとストレプトマイシン50 μ g/mLを含有する培地I（グルコース10g/L、硫酸アンモニウム1g/L、リン酸カリウム50mM、硫酸マグネシウム0.025g/L、硫酸鉄0.0625mg/L、硫酸マンガン2.7mg/L、塩化カルシウム0.33mg/L、塩化ナトリウム1.25g/L、Bactoトリプトン2.5g/L、Bacto酵母エキス1.25g/L）5mLに添加し、30 $^{\circ}$ C、120rpmで24時間振とう培養した。

[0091] 当該培養液より菌体を遠心分離した上清をMilliplex-GV（0.22 μ m、PVDF、Merck社製）を用いて膜処理し、透過液をLC-MS/MSにて分析した。培養上清中に蓄積した3HAおよびHMAの定量分析を行った結果を表6に示す。

[0092] [LC-MS/MSによる3HAおよびHMAの定量分析条件]

HPLC: 1290 Infinity (Agilent Technol

ogies社製)

カラム: Synergi hydro-RP (Phenomenex社製)
、長さ100mm、内径3mm、粒径2.5 μ m

移動相: 0.1%ギ酸水溶液/メタノール=70/30

流速: 0.3mL/分

カラム温度: 40 $^{\circ}$ C

LC検出器: DAD (210nm)

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

イオン化方法: ESI ネガティブモード

[0093] (比較例2) 野生型TesBをコードする遺伝子を保有するセラチア属細菌株の培養

配列番号1に記載の大腸菌由来の野生型アシル-CoAヒドロラーゼTesBを保有するコントロール株として、グルコース・トランスポーターPtsG (配列番号43) をコードする遺伝子、およびピルビン酸キナーゼPykFとPykA (配列番号44、45) をコードする遺伝子を削除し、pBBR1MCS-2::AT3OR-tesBを保有するセラチア・グリメシー (*Serratia grimesii*) NBRC13537株を使用した。

[0094] pH7に調整したカナマイシン25 μ g/mLを含有するLB培地 (Bactoトリプトン (Difco Laboratories社製) 10g/L、Bacto酵母エキス (Difco Laboratories社製) 5g/L、塩化ナトリウム5g/L) 5mLに、前記大腸菌株を一白金耳植菌し、30 $^{\circ}$ C、120rpmで18時間振とう培養した。当該培養液0.05mLを試験管に入ったpH6.5に調整したカナマイシン25 μ g/mLを含有する培地I (グルコース10g/L、硫酸アンモニウム1g/L、リン酸カリウム50mM、硫酸マグネシウム0.025g/L、硫酸鉄0.0625mg/L、硫酸マンガン2.7mg/L、塩化カルシウム0.33

mg/L、塩化ナトリウム1.25g/L、Bactoトリプトン2.5g/L、Bacto酵母エキス1.25g/L) 5mLに添加し、30°C、120rpmで24時間振とう培養した。

[0095] 当該培養液より菌体を遠心分離した上清をMilliplex-GV (0.22 μm、PVDF、Merck社製) を用いて膜処理し、透過液をLC-MS/MSにて分析した。LC-MS/MSの分析条件は、比較例1と同様の条件とした。培養上清中に蓄積した3HAおよびHMAの定量分析を行った結果を表7に示す。

[0096] (比較例3) 野生型TesBの酵素活性評価

参考例7に記載の方法で精製した野生型TesBの酵素活性を測定した。具体的には、50mM Tris-HCl、50mM塩化ナトリウム、10mM塩化マグネシウムと1mMトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィンを含む溶液に、100 μMの基質(3HA-CoAまたはHMA-CoA)と0.175 mg/mLの野生型TesBを添加し、総液量100~200 μLで反応を行った。反応開始から2、5、15、30、60分経過後に反応液20 μLをギ酸水溶液(50% v/v) 5 μLで停止し、氷上で10分間置いた後、沈殿物を遠心除去し(13,000 rpm、10 min、4°C)、上清をLC-MS/MSにて分析した。LC-MS/MSの分析条件は、比較例1と同様の条件とした。反応上清中に蓄積した3HAおよびHMAの定量分析を行い、野生型TesBを添加していないネガティブコントロールの反応上清中に蓄積した3HAおよびHMA量との差分を、野生型TesBが加水分解した基質量とした。野生型TesB反応の経時変化から、k_{cat}/K_m値を算出した(Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2016; 113(14): E2001-10を参照)。その結果を表8に示す。

[0097] (実施例1) 変異型TesB-N206Kをコードする遺伝子を保有する大腸菌株の培養

変異型TesB-N206Kの活性評価株として、グルコース・トランス

ポーターP t s G（配列番号33）をコードする遺伝子、およびピルビン酸キナーゼP y k FとP y k A（配列番号34、35）をコードする遺伝子を削除し、p B B R 1 M C S - 2 : : A T 3 O R、p M W 1 1 9 : : E Hとp C D F - 1 b : : t e s B - N 2 0 6 Kを保有するE s c h e r i c h i a c o l i H M S 1 7 4（DE3）株を使用した。

[0098] pH7に調整したクロラムフェニコール15 μ g/mL、アンピシリン100 μ g/mLとストレプトマイシン50 μ g/mLを含有するLB培地（Bactotripton（Difco Laboratories社製）10g/L、Bacto酵母エキス（Difco Laboratories社製）5g/L、塩化ナトリウム5g/L）5mLに、前記大腸菌株を一白金耳植菌し、30 $^{\circ}$ C、120rpmで18時間振とう培養した。当該培養液0.05mLを試験管に入ったpH6.5に調整したクロラムフェニコール15 μ g/mL、アンピシリン100 μ g/mLとストレプトマイシン50 μ g/mLを含有する培地I（グルコース10g/L、硫酸アンモニウム1g/L、リン酸カリウム50mM、硫酸マグネシウム0.025g/L、硫酸鉄0.0625mg/L、硫酸マンガン2.7mg/L、塩化カルシウム0.33mg/L、塩化ナトリウム1.25g/L、Bactotripton2.5g/L、Bacto酵母エキス1.25g/L）5mLに添加し、30 $^{\circ}$ C、120rpmで24時間振とう培養した。

[0099] 当該培養液より菌体を遠心分離した上清をMilllex-GV（0.22 μ m、PVDF、Merck社製）を用いて膜処理し、透過液をLC-MS/MSにて分析した。LC-MS/MSの分析条件は、比較例1と同様の条件とした。培養上清中に蓄積した3HAおよびHMAの定量分析を行った結果を表6に示す。

[0100] （実施例2）変異型T e s B - N 2 0 6 Hをコードする遺伝子を保有する大腸菌株の培養

変異型T e s B - N 2 0 6 Hの活性評価株として、グルコース・トランスポーターP t s G（配列番号33）をコードする遺伝子、およびピルビン酸

キナーゼPykFとPykA（配列番号34、35）をコードする遺伝子を削除し、pBBR1MCS-2::AT3OR、pMW119::EHとpCDF-1b::tesB-N206Hを保有する*Escherichia coli* HMS174（DE3）株を使用した。

[0101] pH7に調整したクロラムフェニコール15 μ g/mL、アンピシリン100 μ g/mLとストレプトマイシン50 μ g/mLを含有するLB培地（Bactoトリプトン（Difco Laboratories社製）10g/L、Bacto酵母エキス（Difco Laboratories社製）5g/L、塩化ナトリウム5g/L）5mLに、前記大腸菌株を一白金耳植菌し、30 $^{\circ}$ C、120rpmで18時間振とう培養した。当該培養液0.05mLを試験管に入ったpH6.5に調整したクロラムフェニコール15 μ g/mL、アンピシリン100 μ g/mLとストレプトマイシン50 μ g/mLを含有する培地I（グルコース10g/L、硫酸アンモニウム1g/L、リン酸カリウム50mM、硫酸マグネシウム0.025g/L、硫酸鉄0.0625mg/L、硫酸マンガン2.7mg/L、塩化カルシウム0.33mg/L、塩化ナトリウム1.25g/L、Bactoトリプトン2.5g/L、Bacto酵母エキス1.25g/L）5mLに添加し、30 $^{\circ}$ C、120rpmで24時間振とう培養した。

[0102] 当該培養液より菌体を遠心分離した上清をMillex-GV（0.22 μ m、PVDF、Merck社製）を用いて膜処理し、透過液をLC-MS/MSにて分析した。LC-MS/MSの分析条件は、比較例1と同様の条件とした。培養上清中に蓄積した3HAおよびHMAの定量分析を行った結果を表6に示す。

[0103] （実施例3）変異型TesB-N206Gをコードする遺伝子を保有する大腸菌株の培養

変異型TesB-N206Kの活性評価株として、グルコース・トランスポーターPtsG（配列番号33）をコードする遺伝子、およびピルビン酸キナーゼPykFとPykA（配列番号34、35）をコードする遺伝子を

削除し、pBBR1MCS-2::AT3OR、pMW119::EHとpCDF-1b::tesB-N206Gを保有する*Escherichia coli* HMS174 (DE3)株を使用した。

[0104] pH7に調整したクロラムフェニコール15 μ g/mL、アンピシリン100 μ g/mLとストレプトマイシン50 μ g/mLを含有するLB培地 (Bactoトリプトン (Difco Laboratories社製) 10g/L、Bacto酵母エキス (Difco Laboratories社製) 5g/L、塩化ナトリウム5g/L) 5mLに、前記大腸菌株を一白金耳植菌し、30 $^{\circ}$ C、120rpmで18時間振とう培養した。当該培養液0.05mLを試験管に入ったpH6.5に調整したクロラムフェニコール15 μ g/mL、アンピシリン100 μ g/mLとストレプトマイシン50 μ g/mLを含有する培地I (グルコース10g/L、硫酸アンモニウム1g/L、リン酸カリウム50mM、硫酸マグネシウム0.025g/L、硫酸鉄0.0625mg/L、硫酸マンガン2.7mg/L、塩化カルシウム0.33mg/L、塩化ナトリウム1.25g/L、Bactoトリプトン2.5g/L、Bacto酵母エキス1.25g/L) 5mLに添加し、30 $^{\circ}$ C、120rpmで24時間振とう培養した。

[0105] 当該培養液より菌体を遠心分離した上清をMilllex-GV (0.22 μ m、PVDF、Merck社製)を用いて膜処理し、透過液をLC-MS/MSにて分析した。LC-MS/MSの分析条件は、比較例1と同様の条件とした。培養上清中に蓄積した3HAおよびHMAの定量分析を行った結果を表6に示す。

[0106] (実施例4) 変異型TesB-N206Rをコードする遺伝子を保有する大腸菌株の培養

変異型TesB-N206Rの活性評価株として、グルコース・トランスポーターPtsG (配列番号33)をコードする遺伝子、およびピルビン酸キナーゼPykFとPykA (配列番号34、35)をコードする遺伝子を削除し、pBBR1MCS-2::AT3OR、pMW119::EHとp

CDF-1b::tesB-N206Rを保有する*Escherichia coli* HMS174 (DE3) 株を使用した。

[0107] pH7に調整したクロラムフェニコール15 μ g/mL、アンピシリン100 μ g/mLとストレプトマイシン50 μ g/mLを含有するLB培地 (Bactoトリプトン (Difco Laboratories社製) 10g/L、Bacto酵母エキス (Difco Laboratories社製) 5g/L、塩化ナトリウム5g/L) 5mLに、前記大腸菌株を一白金耳植菌し、30 $^{\circ}$ C、120rpmで18時間振とう培養した。当該培養液0.05mLを試験管に入ったpH6.5に調整したクロラムフェニコール15 μ g/mL、アンピシリン100 μ g/mLとストレプトマイシン50 μ g/mLを含有する培地I (グルコース10g/L、硫酸アンモニウム1g/L、リン酸カリウム50mM、硫酸マグネシウム0.025g/L、硫酸鉄0.0625mg/L、硫酸マンガン2.7mg/L、塩化カルシウム0.33mg/L、塩化ナトリウム1.25g/L、Bactoトリプトン2.5g/L、Bacto酵母エキス1.25g/L) 5mLに添加し、30 $^{\circ}$ C、120rpmで24時間振とう培養した。

[0108] 当該培養液より菌体を遠心分離した上清をMillex-GV (0.22 μ m、PVDF、Merck社製) を用いて膜処理し、透過液をLC-MS/MSにて分析した。LC-MS/MSの分析条件は、比較例1と同様の条件とした。培養上清中に蓄積した3HAおよびHMAの定量分析を行った結果を表6に示す。

[0109] (実施例5) 変異型TesB-Q33Rをコードする遺伝子を保有する大腸菌株の培養

変異型TesB-Q33Rの活性評価株として、グルコース・トランスポーターPtsG (配列番号33) をコードする遺伝子、およびピルビン酸キナーゼPykFとPykA (配列番号34、35) をコードする遺伝子を削除し、pBBR1MCS-2::AT3OR、pMW119::EHとpCDF-1b::tesB-Q33Rを保有する*Escherichia c*

o l i HMS 174 (DE3) 株を使用した。

[0110] pH7に調整したクロラムフェニコール15 μ g/mL、アンピシリン100 μ g/mLとストレプトマイシン50 μ g/mLを含有するLB培地 (Bactoトリプトン (Difco Laboratories社製) 10g/L、Bacto酵母エキス (Difco Laboratories社製) 5g/L、塩化ナトリウム5g/L) 5mLに、前記大腸菌株を一白金耳植菌し、30 $^{\circ}$ C、120rpmで18時間振とう培養した。当該培養液0.05mLを試験管に入ったpH6.5に調整したクロラムフェニコール15 μ g/mL、アンピシリン100 μ g/mLとストレプトマイシン50 μ g/mLを含有する培地I (グルコース10g/L、硫酸アンモニウム1g/L、リン酸カリウム50mM、硫酸マグネシウム0.025g/L、硫酸鉄0.0625mg/L、硫酸マンガン2.7mg/L、塩化カルシウム0.33mg/L、塩化ナトリウム1.25g/L、Bactoトリプトン2.5g/L、Bacto酵母エキス1.25g/L) 5mLに添加し、30 $^{\circ}$ C、120rpmで24時間振とう培養した。

[0111] 当該培養液より菌体を遠心分離した上清をMilliplex-GV (0.22 μ m、PVDF、Merck社製) を用いて膜処理し、透過液をLC-MS/MSにて分析した。LC-MS/MSの分析条件は、比較例1と同様の条件とした。培養上清中に蓄積した3HAおよびHMAの定量分析を行った結果を表6に示す。

[0112] (実施例6) 変異型TesB-N206R-Q33Rをコードする遺伝子を保有する大腸菌株の培養

変異型TesB-N206R-Q33Rの活性評価株として、グルコース・トランスポーターPtsG (配列番号33) をコードする遺伝子、およびピルビン酸キナーゼPykFとPykA (配列番号34、35) をコードする遺伝子を削除し、pBBR1MCS-2::AT3OR、pMW119::EHとpCDF-1b::tesB-N206R-Q33Rを保有する*Escherichia coli* HMS174 (DE3) 株を使用した。

[0113] pH7に調整したクロラムフェニコール15 μ g/mL、アンピシリン100 μ g/mLとストレプトマイシン50 μ g/mLを含有するLB培地（Bactoトリプトン（Difco Laboratories社製）10g/L、Bacto酵母エキス（Difco Laboratories社製）5g/L、塩化ナトリウム5g/L）5mLに、前記大腸菌株を一白金耳植菌し、30 $^{\circ}$ C、120rpmで18時間振とう培養した。当該培養液0.05mLを試験管に入ったpH6.5に調整したクロラムフェニコール15 μ g/mL、アンピシリン100 μ g/mLとストレプトマイシン50 μ g/mLを含有する培地I（グルコース10g/L、硫酸アンモニウム1g/L、リン酸カリウム50mM、硫酸マグネシウム0.025g/L、硫酸鉄0.0625mg/L、硫酸マンガン2.7mg/L、塩化カルシウム0.33mg/L、塩化ナトリウム1.25g/L、Bactoトリプトン2.5g/L、Bacto酵母エキス1.25g/L）5mLに添加し、30 $^{\circ}$ C、120rpmで24時間振とう培養した。

[0114] 当該培養液より菌体を遠心分離した上清をMilliplex-GV（0.22 μ m、PVDF、Merck社製）を用いて膜処理し、透過液をLC-MS/MSにて分析した。LC-MS/MSの分析条件は、比較例1と同様の条件とした。培養上清中に蓄積した3HAおよびHMAの定量分析を行った結果を表6に示す。

[0115] （実施例7）変異型TesB-N206Rをコードする遺伝子を保有するセラチア属細菌株の培養

配列番号41に記載の大腸菌由来の変異型アシル-CoAヒドロラーゼTesB-N206Rを保有する株として、グルコース・トランスポーターPtsG（配列番号43）をコードする遺伝子、およびピルビン酸キナーゼPykFとPykA（配列番号44、45）をコードする遺伝子を削除し、pBBR1MCS-2::AT3OR-tesB-N206Rを保有するセラチア・グリメシー（*Serratia grimesii*）NBRC13537株を使用した。

[0116] pH7に調整したカナマイシン $25\mu\text{g}/\text{mL}$ を含有するLB培地 (Bactotripton (Difco Laboratories社製) $10\text{g}/\text{L}$ 、Bacto酵母エキス (Difco Laboratories社製) $5\text{g}/\text{L}$ 、塩化ナトリウム $5\text{g}/\text{L}$) 5mL に、前記大腸菌株を一白金耳植菌し、 30°C 、 120rpm で18時間振とう培養した。当該培養液 0.05mL を試験管に入ったpH6.5に調整したカナマイシン $25\mu\text{g}/\text{mL}$ を含有する培地I (グルコース $10\text{g}/\text{L}$ 、硫酸アンモニウム $1\text{g}/\text{L}$ 、リン酸カリウム 50mM 、硫酸マグネシウム $0.025\text{g}/\text{L}$ 、硫酸鉄 $0.0625\text{mg}/\text{L}$ 、硫酸マンガン $2.7\text{mg}/\text{L}$ 、塩化カルシウム $0.33\text{mg}/\text{L}$ 、塩化ナトリウム $1.25\text{g}/\text{L}$ 、Bactotripton $2.5\text{g}/\text{L}$ 、Bacto酵母エキス $1.25\text{g}/\text{L}$) 5mL に添加し、 30°C 、 120rpm で24時間振とう培養した。

[0117] 当該培養液より菌体を遠心分離した上清をMilliplex-GV ($0.22\mu\text{m}$ 、PVDF、Merck社製)を用いて膜処理し、透過液をLC-MS/MSにて分析した。LC-MS/MSの分析条件は、比較例1と同様の条件とした。培養上清中に蓄積した3HAおよびHMAの定量分析を行った結果を表7に示す。

[0118] (実施例8) 変異型TesB-N206Rの酵素活性評価

参考例7に記載の方法で精製した変異型TesB-N206Rの酵素活性を測定した。具体的には、 50mM Tris-HCl、 50mM 塩化ナトリウム、 10mM 塩化マグネシウムと 1mM トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィンを含む溶液に、 $100\mu\text{M}$ の基質(3HA-CoAまたはHMA-CoA)と $0.175\text{mg}/\text{mL}$ の変異型TesB-N206Rを添加し、総液量 $100\sim 200\mu\text{L}$ で反応を行った。反応開始から2、5、15、30、60分経過後に反応液 $20\mu\text{L}$ をギ酸水溶液($50\%v/v$) $5\mu\text{L}$ で停止し、氷上で10分間置いた後、沈殿物を遠心除去し($13,000\text{rpm}$ 、 10min 、 4°C)、上清をLC-MS/MSにて分析した。LC-MS/MSの分析条件は、比較例1と同様の条件とした。反応上清中に蓄積

した3HAおよびHMAの定量分析を行い、野生型TesBを添加していないネガティブコントロールの反応上清中に蓄積した3HAおよびHMA量との差分を、変異型TesB-N206Rが加水分解した基質量とした。変異型TesB-N206R反応の経時変化から、 k_{cat}/K_m 値を算出した (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2016; 113 (14) : E2001-10を参照)。その結果を表8に示す。

[0119] [表6]

比較例・実施例	アシル-CoA ヒドロラーゼ (TesB)	3HA (mg/L)	HMA (mg/L)
比較例 1	野生型	57.6	1.9
実施例 1	N206K 変異型	51.6	4.4
実施例 2	N206H 変異型	75.3	1.9
実施例 3	N206G 変異型	64.2	3.2
実施例 4	N206R 変異型	60.1	5.0
実施例 5	Q33R 変異型	86.2	1.9
実施例 6	N206R-Q33R 変異型	132.8	5.0

[0120] [表7]

比較例・実施例	アシル-CoA ヒドロラーゼ (TesB)	3HA (mg/L)	HMA (mg/L)
比較例 2	野生型	66	35
実施例 7	N206R 変異型	74	52

[0121] [表8]

比較例・実施例	アシル-CoA ヒドロラーゼ (TesB)	3HA 生成反応 $k_{cat}/K_m (M^{-1} s^{-1})$	HMA 生成反応 $k_{cat}/K_m (M^{-1} s^{-1})$
比較例 3	野生型	319	101
実施例 8	N206R 変異型	902	1452

[0122] 比較例1および実施例1の結果から、配列番号1に示されるアミノ酸配列において、206番目のアスパラギン残基をリジンに置換した変異型TesBをコードする遺伝子を保有する大腸菌株は、野生型TesBをコードする

遺伝子を保有する大腸菌株と比較し、HMAの生産量が高いことが示された。

[0123] 比較例1、実施例2および実施例5の結果から、配列番号1に示されるアミノ酸配列において、206番目のアスパラギン残基をヒスチジンに、または33番目のグルタミンをアルギニンに置換した変異型T e s Bをコードする遺伝子を保有する大腸菌株は、野生型T e s Bをコードする遺伝子を保有する大腸菌株と比較し、3HAの生産量が高いことが示された。

[0124] 比較例1、実施例3および実施例4の結果から、配列番号1に示されるアミノ酸配列において、206番目のアスパラギン残基をグリシンまたはアルギニンに置換した変異型T e s Bをコードする遺伝子を保有する大腸菌株は、野生型T e s Bをコードする遺伝子を保有する大腸菌株と比較し、3HAおよびHMAの生産量が高いことが示された。

[0125] 比較例1および実施例6の結果から、配列番号1に示されるアミノ酸配列において、206番目のアスパラギン残基と33番目のグルタミンをアルギニンに置換した変異型T e s Bをコードする遺伝子を保有する大腸菌株は、野生型T e s Bをコードする遺伝子を保有する大腸菌株と比較し、3HAおよびHMAの生産量が高いことが示された。

[0126] 比較例2および実施例7の結果から、配列番号1に示されるアミノ酸配列において、206番目のアスパラギン残基をアルギニンに置換した変異型T e s Bをコードする遺伝子を保有するセラチア・グリメシー株は、野生型T e s Bをコードする遺伝子を保有するセラチア・グリメシー株と比較し、3HAおよびHMAの生産量が高いことが示された。

[0127] 比較例3および実施例8の結果から、配列番号1に示されるアミノ酸配列において、206番目のアスパラギン残基をアルギニンに置換した変異型T e s Bは、野生型T e s Bと比較し、高い3HAおよびHMA生成活性を有することが示された。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願はそのまま引用により本明細書に組み入れられるものとする。

請求の範囲

- [請求項1] 下記の (i) および (ii) から選択されるポリペプチドの一部のアミノ酸が置換した変異型アシル-C_oAヒドロラーゼであって、3-ヒドロキシアジピル-C_oAおよび/または2, 3-デヒドロアジピル-C_oA加水分解活性を有する、変異型アシル-C_oAヒドロラーゼ:
- (i) 配列番号1のアミノ酸配列を有するポリペプチド; または
- (ii) 配列番号1のアミノ酸配列と60%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を有し、アシル-C_oAヒドロラーゼ活性を有するポリペプチド。
- [請求項2] 前記置換が、アシル-C_oA基質と相互作用をする領域のいずれかのアミノ酸の置換である、請求項1に記載の変異型アシル-C_oAヒドロラーゼ。
- [請求項3] 前記アシル-C_oA基質と相互作用をする領域が、配列番号1のアミノ酸配列でのアミノ酸残基30~40、64~70、82~89、202~228および/または277~286に相当する領域である、請求項2に記載の変異型アシル-C_oAヒドロラーゼ。
- [請求項4] 前記置換が、配列番号1のアミノ酸配列における、L31、Q33、F35、F64、P67、G84、N85、S86、F87、D204、L205、N206、F207、L208、P209、および/またはF219残基に相当するアミノ酸の置換である、請求項3に記載の変異型アシル-C_oAヒドロラーゼ。
- [請求項5] 請求項1~4のいずれか1項に記載の変異型アシル-C_oAヒドロラーゼをコードする遺伝子を有する微生物。
- [請求項6] 請求項5に記載の微生物を、炭素源を発酵原料として含む培地にて培養する工程を含む、3-ヒドロキシアジピン酸および/または α -ヒドロムコン酸の製造方法。
- [請求項7] アシル-C_oAヒドロラーゼ活性を有するポリペプチドのアミノ酸

配列のうち一部のアミノ酸を置換したアミノ酸配列をコードする遺伝子を発現させて、3-ヒドロキシアジピル-C₀Aおよび/または2,3-デヒドロアジピル-C₀A加水分解活性を有するポリペプチドを得る工程を含む、変異型アシル-C₀Aヒドロラーゼの製造方法。

[請求項8] 前記置換が、前記ポリペプチドにおけるアシル-C₀A基質と相互作用をする領域のいずれかのアミノ酸の置換である、請求項7に記載の変異型アシル-C₀Aヒドロラーゼの製造方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/007457

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<p><i>C12N 15/55</i>(2006.01)i; <i>C12N 1/15</i>(2006.01)i; <i>C12N 1/19</i>(2006.01)i; <i>C12N 1/21</i>(2006.01)i; <i>C12N 9/16</i>(2006.01)i; <i>C12N 15/31</i>(2006.01)i; <i>C12P 7/44</i>(2006.01)i FI: C12N15/55 ZNA; C12N9/16 Z; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12P7/44; C12N15/31</p> <p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N15/55; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N9/16; C12N15/31; C12P7/44		
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 1971-2022 Registered utility model specifications of Japan 1996-2022 Published registered utility model applications of Japan 1994-2022		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/REGISTRY (STN); CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq; UniProt/GeneSeq		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Database DDBJ/EMBL/GenBank [online]. Accession No. STM59535, 30 July 2018 uploaded. [retrieved on 14 April 2022]. DOYLE, S. et al. Definition: acyl-CoA thioesterase [<i>Escherichia coli</i>]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/STM59535.1/ in particular, sections "DEFINITION", "FEATURES", "ORIGIN"	1-5, 7-8
Y		6
X	Database DDBJ/EMBL/GenBank [online]. Accession No. WP_037425284. 24 December 2014 uploaded. [retrieved on 14 April 2022]. Definition: acyl-CoA thioesterase [<i>Serratia grimesii</i>]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/739567204?sat=21&satkey=41410470 in particular, sections "DEFINITION", "FEATURES", "ORIGIN"	1-5, 7-8
Y		6
X	NAGGERT, J. et al. Cloning, sequencing, and characterization of <i>Escherichia coli</i> thioesterase II. <i>J. Biol. Chem.</i> (1991) vol. 266, no. 17, pp. 11044-11050, ISSN:0021-9258 in particular, abstract, fig. 2	1-5, 7-8
Y		6
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 "™" 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 18 April 2022		Date of mailing of the international search report 26 April 2022
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/007457

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KALLSCHEUER, N. et al. Improved production of adipate with Escherichia coli by reversal of β -oxidation. Appl. Microbiol. Biotechnol. (2017) vol. 101, pp. 2371-2382, ISSN:0175-7598 in particular, abstract, p. 2378, lines 1-14, fig. 1-2	1-5, 7-8
Y		6
X	JP 2011-515111 A (GENOMATICA, INC) 19 May 2011 (2011-05-19) claims, paragraph [0115]	1-5, 7-8
Y		6
Y	WO 2019/107516 A1 (TORAY INDUSTRIES, INC) 06 June 2019 (2019-06-06) claims, paragraphs [0039], [0100]	6
A	JP 2011-512868 A (DSM IP ASSETS B.V) 28 April 2011 (2011-04-28) entire text, all drawings	1-8

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - on paper or in the form of an image file.
 - b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2022/007457

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP	2011-515111	A	19 May 2011	US 2009/0305364 A1 claims, paragraph [0123]	
				EP 2265709 A1	
				WO 2009/151728 A2	
WO	2019/107516	A1	06 June 2019	US 2020/0291435 A1 claims, paragraphs [0031], [0093]	
				EP 3719121 A1	
JP	2011-512868	A	28 April 2011	US 2011/0091944 A1 entire text, all drawings	
				EP 2252698 A1	
				WO 2009/113853 A2	

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12N 15/55(2006.01)i; C12N 1/15(2006.01)i; C12N 1/19(2006.01)i; C12N 1/21(2006.01)i; C12N 9/16(2006.01)i; C12N 15/31(2006.01)i; C12P 7/44(2006.01)i FI: C12N15/55 ZNA; C12N9/16 Z; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12P7/44; C12N15/31</p>										
<p>B. 調査を行った分野</p>										
<p>調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） C12N15/55; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N9/16; C12N15/31; C12P7/44</p>										
<p>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</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922 - 1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971 - 2022年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996 - 2022年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994 - 2022年</td> </tr> </table>			日本国実用新案公報	1922 - 1996年	日本国公開実用新案公報	1971 - 2022年	日本国実用新案登録公報	1996 - 2022年	日本国登録実用新案公報	1994 - 2022年
日本国実用新案公報	1922 - 1996年									
日本国公開実用新案公報	1971 - 2022年									
日本国実用新案登録公報	1996 - 2022年									
日本国登録実用新案公報	1994 - 2022年									
<p>国際調査で利用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CPlus/REGISTRY (STN); CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq; UniProt/GeneSeq</p>										
<p>C. 関連すると認められる文献</p>										
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号								
X	Database DDBJ/EMBL/GenBank [online], Accession No. STM59535, 30-JUL-2018 uploaded, [retrieved on 14 April 2022], DOYLE, S. et al., Definition: acyl- CoA thioesterase [Escherichia coli], https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/ STM59535.1/ 特に「DEFINITION」、「FEATURES」、「ORIGIN」の項	1-5, 7-8								
Y		6								
X	Database DDBJ/EMBL/GenBank [online], Accession No. WP_037425284, 24-DEC-2014 uploaded, [retrieved on 14 April 2022], Definition: acyl-CoA thioesterase [Serratia grimesii], https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/739567204? sat=21&satkey=41410470 特に「DEFINITION」、「FEATURES」、「ORIGIN」の項	1-5, 7-8								
Y		6								
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>										
* 引用文献のカテゴリー	<p>“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p>									
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの	<p>“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</p>									
“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	<p>“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</p>									
“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）	<p>“&” 同一パテントファミリー文献</p>									
“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										
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日									
18.04.2022	26.04.2022									
名称及びあて先	権限のある職員（特許庁審査官）									
日本国特許庁 (ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	藤澤 雅樹 4B 5802									
	電話番号 03-3581-1101 内線 3448									

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	NAGGERT, J. et al., Cloning, sequencing, and characterization of Escherichia coli thioesterase II, J. Biol. Chem. (1991) Vol.266, No.17, pp.11044-11050, ISSN:0021-9258	1-5, 7-8
Y	特に要約、図2	6
X	KALLSCHEUER, N. et al., Improved production of adipate with Escherichia coli by reversal of β -oxidation, Appl. Microbiol. Biotechnol. (2017) Vol.101, pp.2371-2382, ISSN:0175-7598	1-5, 7-8
Y	特に要約、第2378頁第1-14行、図1-2	6
X	JP 2011-515111 A (ジェノマティカ, インコーポレイテッド) 19.05.2011 (2011 - 05 - 19)	1-5, 7-8
Y	特許請求の範囲、[0115]	6
Y	WO 2019/107516 A1 (東レ株式会社) 06.06.2019 (2019 - 06 - 06)	6
	請求の範囲、[0039]、[0100]	
A	JP 2011-512868 A (ディーエスエム アイピー アセッツ ビー. ブイ.) 28.04.2011 (2011 - 04 - 28)	1-8
	全文、全図	

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。
- a. 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
- 附属書C/ST.25テキストファイル形式
- 紙形式又はイメージファイル形式
- b. 国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c. 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
- 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))
- 紙形式又はイメージファイル形式 (PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)
2. さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。
3. 補足意見:

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
 PCT/JP2022/007457

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
JP	2011-515111	A	19.05.2011	US	2009/0305364	A1	
					請求の範囲、[0123]		
				EP	2265709	A1	
				WO	2009/151728	A2	
WO	2019/107516	A1	06.06.2019	US	2020/0291435	A1	
					請求の範囲、[0031]、[0093]		
				EP	3719121	A1	
JP	2011-512868	A	28.04.2011	US	2011/0091944	A1	
					全文、全図		
				EP	2252698	A1	
				WO	2009/113853	A2	