

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2024年8月8日(08.08.2024)



(10) 国際公開番号

WO 2024/162411 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 15/52 (2006.01) C12N 15/54 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01) C12N 15/60 (2006.01)
C12N 9/00 (2006.01) C12P 7/42 (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01) C12P 7/62 (2022.01)
C12N 9/88 (2006.01)

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

(21) 国際出願番号: PCT/JP2024/003169

(22) 国際出願日: 2024年1月31日(31.01.2024)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2023-015212 2023年2月3日(03.02.2023) JP

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

(72) 発明者: 喜多 恭介 (KITA, Kyosuke). 有川 尚志 (ARIKAWA, Hisashi). 佐藤 俊輔 (SATO, Shunsuke).

(74) 代理人: 弁理士法人有古特許事務所 (ARCO PATENT & TRADEMARK ATTORNEYS); 〒6510088 兵庫県神戸市中央区小野柄通7丁目1番1号 日本生命三宮駅前ビル5階 Hyogo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG,

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

添付公開書類:

- 一 国際調査報告(条約第21条(3))
- 一 明細書の別個の部分として表した配列リスト(規則5.2(a))

(54) Title: TRANSFORMED MICROORGANISM, AND METHOD FOR PRODUCING COPOLYMERIZED POLY-HYDROXYALKANOATE

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

(57) Abstract: This transformed microorganism: has a foreign gene encoding a polyhydroxyalkanoate synthase having an amino acid sequence indicated by any one of SEQ ID NO. 1-4 or a foreign gene encoding a protein having polyhydroxyalkanoate synthase activity and having an amino acid sequence with a sequence identity of 90% or more with respect to an amino acid sequence indicated by any one of SEQ ID NO. 1-4; and has the ability to produce a copolymerized polyhydroxyalkanoate including a 3-hydroxyalkanoic acid monomer unit having 8 or more carbon atoms.

(57) 要約: 配列番号1~4のいずれかで示されるアミノ酸配列からなるポリヒドロキシアルカン酸シンターゼをコードする外来遺伝子、または、配列番号1~4のいずれかで示されるアミノ酸配列に対して90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつポリヒドロキシアルカン酸シンターゼ活性を有するタンパク質をコードする外来遺伝子を有する、炭素数8以上の3-ヒドロキシアルカン酸モノマー単位を含む共重合ポリヒドロキシアルカン酸の産生能を有する形質転換微生物。



WO 2024/162411 A1

明 細 書

発明の名称：

形質転換微生物、及び共重合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、炭素数8以上の3-ヒドロキシアルカン酸モノマー単位を含む共重合ポリヒドロキシアルカン酸の産生能を有する形質転換微生物、及び、当該形質転換微生物を用いた共重合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（以下、PHAともいう）は、微生物がエネルギー貯蔵物質として細胞内に蓄積するポリエステルである。PHAは土壌中や水中で微生物によって完全に生分解されることから、近年では、従来の石油由来のプラスチックを代替する環境調和型プラスチックとして注目されている。

[0003] PHAを構成するモノマー単位としては、例えば、3-ヒドロキシ酪酸（略称：3HB）、3-ヒドロキシ吉草酸（略称：3HV）、3-ヒドロキシヘキサン酸（略称：3HH）、3-ヒドロキシオクタン酸（略称：3HO）、3-ヒドロキシデカン酸（略称：3HD）、3-ヒドロキシドデカン酸（略称：3HDD）等が知られている。現在、3HB単位と3HH単位から構成される共重合PHAである、ポリ（3-ヒドロキシブチレート-*co*-3-ヒドロキシヘキサノエート）（略称：PHBH）が実用化されている。

[0004] しかしながら、現在工業的に生産されている炭素数4～6の3-ヒドロキシアルカン酸モノマー単位から構成されるPHAは、ガラス転移温度（ T_g ）が0℃付近であり、低温環境下では機械物性が低下する傾向がある。そのため、 T_g が十分に低いPHAの開発が期待されている。

[0005] T_g が低いPHAとして、炭素数8以上の3-ヒドロキシアルカン酸（以下、中鎖長3HAともいう）モノマー単位を含むPHAが知られている。一

一般的に、PHAのT_gは、炭素数が多いモノマーの含有率が高いほど低下する傾向がある。

[0006] 非特許文献1では、PHAシンターゼ(PhaC)は、酵素の基質特異性やサブユニット構造によって、Class 1、Class 2、Class 3、及びClass 4の4クラスに分類されている。当該文献によると、Class 1、Class 3、及びClass 4に分類されるPhaCは、炭素数3～5の3-ヒドロキシアルカン酸に対する重合活性を有するのに対して、Class 2 PhaCは、炭素数6～14の3-ヒドロキシアルカン酸に対する重合活性を有する。

[0007] 従来、炭素数8以上の3HAモノマー単位を含む共重合PHAの生産方法として、Pseudomonas属細菌の培養、または、Pseudomonas属細菌由来のClass 2 PhaC又はその変異体をコードする遺伝子を導入した形質転換微生物の培養が知られている。

[0008] 例えば、非特許文献2及び3では、Pseudomonas属由来のClass 2 PhaCとして、Pseudomonas sp. H9由来のPhaC(PhaC1H9)、Pseudomonas putida Gpo1由来のPhaC(PhaC1po)、Pseudomonas mendocina由来のPhaC(PhaC1pm)をコードする遺伝子を導入した形質転換体の培養によって、中鎖長3HAモノマー単位を含む共重合PHAを生産したことが記載されている。

[0009] また、特許文献1及び2では、Pseudomonas sp. 61-3株由来のClass 2 PhaC(PhaC1ps)の変異体をコードする遺伝子を導入した形質転換体の培養によって、中鎖長3HAモノマー単位を含む共重合PHAを生産したことが記載されている。

[0010] 以上述べたPseudomonas属細菌由来のClass 2 PhaCとは異なるが、特許文献3では、放線菌Rhodococcus aetherivorans 124由来の、所属クラスが不明なPhaCであるCO9シンターゼ又はD12シンターゼの遺伝子を導入した形質転換体を培

養することで、炭素数が6である3-ヒドロキシヘキサノエート単位を含む共重合PHAを生産したことが記載されている。

- [0011] 当該文献ではこれらシンターゼが炭素数7～8までの基質をポリマー化し得ると記載されているが、炭素数8以上の3-ヒドロキシアルカン酸モノマー単位を含む共重合ポリヒドロキシアルカン酸を生産したとの記載はない。

先行技術文献

特許文献

- [0012] 特許文献1：特開2007-125004号公報
特許文献2：国際公開第2003/100055号
特許文献3：特表2013-510572号公報

非特許文献

- [0013] 非特許文献1：Rehm, Bernd H. A., Biochem. J. (2003) 376, 15-33
非特許文献2：Liu, Chung-Hsien, et al., Enzyme and Microbial Technology, 143 (2021) 109719
非特許文献3：Hein, S., et al., Appl Microbiol Biotechnol (2002) 58:229-236

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0014] 本発明者らが検討したところ、上述したPseudomonas属細菌由来のClass 2 PhaC又はその変異体や、放線菌Rhodococcus aetherivorans由来のCO9シンターゼ又はD12シンターゼをコードする遺伝子を導入した形質転換微生物では、生産される共重合ポリヒドロキシアルカン酸に含まれる炭素数8以上の3-ヒドロキシアルカン酸モノマー単位の含有率が高くない場合があり、この点で改善の余地があった。

[0015] 本発明は、上記現状に鑑み、炭素数8以上の3-ヒドロキシアルカン酸モノマー単位を高含有率で含む共重合ポリヒドロキシアルカン酸を生産可能な形質転換微生物、及び、当該形質転換微生物を用いた共重合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

[0016] 本発明者らは、前記課題を解決するために鋭意検討を重ねた結果、*Mycobacterium*属、*Mycollicibacterium*属、又は、*Nocardioides*属に由来するClass 2 PhaCをコードする外来遺伝子が導入された形質転換微生物を培養することで、中鎖長3HAモノマー単位を高含有率で含む共重合PHAを生産できることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0017] すなわち本発明は、炭素数8以上の3-ヒドロキシアルカン酸モノマー単位を含む共重合ポリヒドロキシアルカン酸の産生能を有する形質転換微生物であって、

配列番号1～4のいずれかで示されるアミノ酸配列からなるポリヒドロキシアルカン酸シンターゼをコードする外来遺伝子、または、配列番号1～4のいずれかで示されるアミノ酸配列に対して90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつポリヒドロキシアルカン酸シンターゼ活性を有するタンパク質をコードする外来遺伝子を有する、形質転換微生物に関する。

また本発明は、前記形質転換微生物を炭素源の存在下で培養する工程、及び、

前記形質転換微生物から、炭素数8以上の3-ヒドロキシアルカン酸モノマー単位を含む共重合ポリヒドロキシアルカン酸を回収する工程、を含む、共重合ポリヒドロキシアルカン酸の製造方法にも関する。

発明の効果

[0018] 本発明によれば、炭素数8以上の3-ヒドロキシアルカン酸モノマー単位を高含有率で含む共重合ポリヒドロキシアルカン酸を生産可能な形質転換微

生物を提供することができる。当該形質転換微生物を培養することによって、炭素数8以上の3-ヒドロキシアルカン酸モノマー単位を高含有率で含む共重合PHAを発酵生産することが可能となる。

得られる共重合PHAは、炭素数7以下の3-ヒドロキシアルカン酸モノマー単位のみから構成されるPHAと比較して、低温環境下での機械物性が良好になり得るとの利点を有する。

発明を実施するための形態

[0019] 以下、本発明の実施形態について説明するが、本発明は以下の実施形態に限定されるものではない。

[0020] 本開示に係る形質転換微生物は、炭素数8以上の3-ヒドロキシアルカン酸モノマー単位を含む共重合ポリヒドロキシアルカン酸の産生能を有する形質転換微生物である。

[0021] (共重合ポリヒドロキシアルカン酸)

本開示に係る形質転換微生物が産生する共重合ポリヒドロキシアルカン酸(以下、共重合PHAともいう)は、炭素数8以上の3-ヒドロキシアルカン酸(以下、中鎖長3HAともいう)と、当該中鎖長3HAと共重合可能な他のヒドロキシアルカン酸との共重合体である。共重合PHAは中鎖長3HAMonomer単位を有することによって、低温環境下での機械物性が改善され得る。

中鎖長3HAが有する炭素数の上限は特に限定されないが、例えば、14以下であってよく、12以下であってよい。

[0022] 中鎖長3HAの具体例としては、例えば、3-ヒドロキシオクタン酸(炭素数8、略称:3HO)、3-ヒドロキシノナン酸(炭素数9)、3-ヒドロキシデカン酸(炭素数10、略称:3HD)、3-ヒドロキシウンデカン酸(炭素数11)、3-ヒドロキシドデカン酸(炭素数12、略称:3HDD)、3-ヒドロキシテトラデカン酸(炭素数14)等が挙げられる。前記共重合PHAは、これら中鎖長3HAのうち1種類のみを含むものであってもよいし、2種類以上を含むものであってもよい。

- [0023] 前記共重合PHAは、中鎖長3HAとして、3HO、3HD、及び3HDDからなる群より少なくとも1種を含むことが好ましい。中鎖長3HAとして、3HO及び／又は3HDのみを含むものであってもよいし、3HOのみを含むものであってもよい。特に、中鎖長3HAとして、少なくとも3HOを含むことが好ましい。
- [0024] 中鎖長3HAと共重合する他のヒドロキシアルカン酸としては、特に限定されないが、炭素数7以下の3-ヒドロキシアルカン酸であってよく、例えば、3-ヒドロキシ酪酸（炭素数4、略称：3HB）、3-ヒドロキシ吉草酸（炭素数5）、3-ヒドロキシヘキサン酸（炭素数6、略称：3HH）、3-ヒドロキシヘプタン酸（炭素数7）等が挙げられる。また、前記他のヒドロキシアルカン酸は、3-ヒドロキシアルカン酸以外のヒドロキシアルカン酸であってよく、2-ヒドロキシアルカン酸、4-ヒドロキシアルカン酸、5-ヒドロキシアルカン酸、6-ヒドロキシアルカン酸等が挙げられる。前記共重合PHAは、これら他のヒドロキシアルカン酸のうち1種類のみを含むものであってもよいし、2種類以上を含むものであってもよい。
- [0025] 前記共重合PHAは、他のヒドロキシアルカン酸として、3HB及び／又は3HHを含むものであってもよく、また、3HB及び3HHを含むものであってもよい。3HB及び3HHの双方を含む場合、その含有比率（3HB：3HH）は特に限定されないが、モル基準で、例えば、およそ3：1～1：30であってよく、2：1～1：10であってよい。
- [0026] 特に、前記共重合PHAは、3HO、3HD、及び3HDDからなる群より少なくとも1種の中鎖長3HAと、3HB及び／又は3HHとを含むものであってもよく、また、3HO、3HD、及び3HDDからなる群より少なくとも1種の中鎖長3HAと、3HB、及び、3HHを含むものであってもよい。
- [0027] 前記共重合PHA中の中鎖長3HAMonomer単位の合計含有割合は、低温環境下での共重合PHAの機械物性が良好になるという観点から、1モル%以上であることが好ましく、5モル%以上であることがより好ましく、10

モル%以上であることがさらに好ましい。また、20モル%以上であってもよいし、30モル%以上であってもよいし、40モル%以上であってもよい。

[0028] 前記共重合PHA中の中鎖長3HAモノマー単位の合計含有割合の上限は特に限定されないが、例えば、90モル%以下であってもよいし、70モル%以下であってもよいし、50モル%以下であってもよいし、30モル%以下であってもよいし、20モル%以下であってもよい。

[0029] なお、前記共重合PHA中の中鎖長3HAモノマー単位の合計含有割合は、本開示に係る形質転換微生物の構成や、炭素源、培養条件等を変更することで調節することが可能である。

[0030] (形質転換微生物)

本開示に係る形質転換微生物の宿主としては特に限定されないが、例えば、カプリアビダス・ネカトル (*Cupriavidus necator*) 等のカプリアビダス属、アルカリゲネス・ラタス (*Alcaligenes latas*) 等のアルカリゲネス属、シュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*)、シュードモナス・フルオレッセンス (*Pseudomonas fluorescens*)、シュードモナス・エルギノーサ (*Pseudomonas aeruginosa*)、シュードモナス・レジノボランス (*Pseudomonas resinovorans*)、シュードモナス・オレオボランス (*Pseudomonas oleovorans*) 等のシュードモナス属、バチルス・メガテリウム (*Bacillus megaterium*) 等のバチルス属、アゾトバクター属、ノカルディア属、アエロモナス・キャビエ (*Aeromonas caviae*)、アエロモナス・ハイドロフィラ (*Aeromonas hydrophila*) 等のアエロモナス属、ラルストニア (*Ralstonia*) 属、ワウテルシア (*Wautersia*) 属、コマモナス (*Comamonas*) 属などが挙げられる。

[0031] また、エシェリキア (*Escherichia*) 属等のグラム陰性の細菌、

バチルス (*Bacillus*) 属等のグラム陽性の細菌、サッカロマイセス (*Saccharomyces*) 属、ヤロウィア (*Yarrowia*) 属、キャンディダ (*Candida*) 属等の酵母類等であっても良い。

[0032] 前記宿主としては、多量のPHAを蓄積可能であるため、細菌が好ましく、カプリアビダス属に属する細菌がより好ましく、カプリアビダス・ネカトル (*Cupriavidus necator*) が特に好ましい。

[0033] 本開示に係る形質転換微生物は、配列番号1～4のいずれかで示されるアミノ酸配列からなるポリヒドロキシアルカン酸シンターゼ（以下、PHAシンターゼともいう）又はその変異体をコードする外来遺伝子を有する。この遺伝子が導入されている形質転換微生物によると、炭素数8以上の3-ヒドロキシアルカン酸モノマー単位を高含有率で含む共重合ポリヒドロキシアルカン酸を生産することが可能になる。

[0034] 配列番号1又は2で示されるPHAシンターゼは、*Mycobacterium*属由来のClass 2 PhaCである。

配列番号3で示されるPHAシンターゼは、*Mycollicibacterium*属由来のClass 2 PhaCである。

配列番号4で示されるPHAシンターゼは、*Nocardioide*s属由来のClass 2 PhaCである。

これらのPHAシンターゼをコードする遺伝子を導入した形質転換微生物はこれまで報告されていない。

[0035] 配列番号1～4のいずれかで示されるアミノ酸配列からなるPHAシンターゼの変異体とは、配列番号1～4のいずれかで示されるアミノ酸配列に対して90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ、PHAシンターゼ活性を有するタンパク質をいう。前記配列同一性は95%以上が好ましく、97%以上がより好ましく、99%以上が特に好ましい。

[0036] 導入するPHAシンターゼ遺伝子の数は、1つでも良いし、複数であっても良い。また、複数のPHAシンターゼ遺伝子を導入する場合、それらは同一の遺伝子であっても良いし、異なる遺伝子であっても良い。

[0037] PHAシンターゼ遺伝子を宿主に導入する方法としては特に限定されないが、宿主の染色体上に対象遺伝子を直接挿入または置換する方法、宿主が保有するメガプラスミド上に対象遺伝子を直接挿入または置換する方法、あるいは、プラスミド、ファージ、ファージミドなどのベクター上に対象遺伝子を配置して宿主に導入する方法などが挙げられる。これらの方法のうち2つ以上を併用しても良い。

[0038] 導入遺伝子の安定性を考慮すると、宿主の染色体上または宿主が保有するメガプラスミド上に対象遺伝子を直接挿入または置換する方法が好ましく、宿主の染色体上に対象遺伝子を直接挿入または置換する方法がより好ましい。導入する遺伝子を確実に発現させるために、対象遺伝子が、宿主が元来有する「遺伝子発現調節配列」の下流に位置するように導入するか、または、対象遺伝子が、外来の「遺伝子発現調節配列」の下流に位置する形で導入することが好ましい。前記「遺伝子発現調節配列」とは、その遺伝子の転写量を制御する塩基配列（例えばプロモーター配列）、及び／または、その遺伝子から転写されたメッセンジャーRNAの翻訳量を調節する塩基配列（例えばシャイン・ダルガノ配列）を含むDNA配列であってよい。「遺伝子発現調節配列」としては、自然界に存在する任意の塩基配列を利用することもできるし、人工的に構築または改変された塩基配列を利用しても良い。

[0039] 外来遺伝子の導入は、当業者に周知の方法により行うことができる。代表的な方法としてはトランスポゾンと相同組換えの機構を利用した方法（Ohman et al., J. Bacteriol., 162:1068-1074 (1985)）や、相同組換えの機構によって起こる部位特異的な組み込みと第二段階の相同組換えによる脱落を原理とした方法（Notiet al., Methods Enzymol., 154:197-217 (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スクロース耐性株として容易に単離する方法（Schweizer, Mol. Microbiol., 6:1195-1204 (1992)、Len

z et al., J. Bacteriol., 176:4385-4393 (1994))、プラスミドベクターを用いて導入する方法などを利用することができる。

[0040] プラスミドベクターを用いた微生物への外来遺伝子導入は、一般的に行われている方法、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を用いて行うことができる。プラスミドベクターは、外来遺伝子の塩基配列を有するDNA断片をpCUP2等のプラスミドベクターと連結することにより作製すればよい。

[0041] 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または2001)などに記載される技術を利用することができる。

[0042] 導入遺伝子を発現させるためのプロモーターは特に限定されない。カプリアビダス・ネカトルのphaC1遺伝子のプロモーター、phaP1遺伝子のプロモーター、大腸菌に由来するtrpプロモーター、lacプロモーター、lacUV5プロモーター、trcプロモーター、ticプロモーター、tacプロモーターあるいは人工的に作製された大腸菌由来の改変塩基配列を有するlacN17プロモーター、人工的に作製された大腸菌由来の改変塩基配列を有するlacN19プロモーター等が使用可能である。

[0043] 好適な実施形態に係る形質転換微生物は、炭素数8以上のエノイル-COAを基質として認識するR体特異的エノイル-COAヒドラターゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子が導入され、または該遺伝子の発現が強化されるように形質転換されたものであってもよい。これにより、炭素数8以上の3HAモノマー生成量が増加し、生産される共重合PHA中の炭素数8以上の3HAモノマー単位の含有割合をより高めることができる。

[0044] 本明細書において「R体特異的エノイル-COAヒドラターゼ活性を有するタンパク質」とは、脂肪酸の β 酸化系の中間体であるエノイル-COAを

基質として、PHAのモノマーとなる(R)-3-ヒドロキシアシル-CoAを生成する酵素活性を有するタンパク質を指す。該タンパク質が炭素数8以上のエノイル-CoAを基質とすることによって、炭素数8以上の(R)-3-ヒドロキシアシル-CoAへの変換量が増大し、結果、共重合PHA中の炭素数8以上の3HAモノマー単位の含有割合がより高まるものと考えられる。

[0045] 炭素数8以上のエノイル-CoAを基質として認識するR体特異的エノイル-CoAヒドラターゼ活性を有するタンパク質としては、特に限定されないが、細菌由来のR体特異的エノイル-CoAヒドラターゼ(PhaJ)や、真核生物由来のMultifunctional enzyme type 2(MFE2)等が挙げられる。

[0046] PhaJの由来としては特に限定されないが、例えば、Pseudomonas属細菌や放線菌等が挙げられる。一方、カプリアビダス属由来のPhaJは、炭素数8以上のエノイル-CoAに対する活性が低い。

MFE2の由来としては特に限定されないが、例えば、ドロソフィラ・メラノガスターやヤロウィア・リポリティカ等が挙げられる。

[0047] より具体的には、炭素数8以上のエノイル-CoAを基質として認識するR体特異的エノイル-CoAヒドラターゼ活性を有するタンパク質は、配列番号5、6、又は7で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質や、配列番号5、6、又は7で示されるアミノ酸配列に対して90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質であることが好ましい。前記配列同一性は、95%以上であることが好ましく、97%以上がより好ましく、99%以上がさらに好ましい。

[0048] 炭素数8以上のエノイル-CoAを基質として認識するR体特異的エノイル-CoAヒドラターゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子は、形質転換微生物に導入されてもよいし、形質転換微生物において該遺伝子の発現が強化されるよう形質転換がされていもよい。該遺伝子の導入は、上述した方法によって実施することができる。該遺伝子の発現を強化するには、例

例えば国際公開第2015/115619号に記載されるように、当該遺伝子の発現を増強するための発現調節配列（プロモーター配列および／またはSD配列）の改変を行うことができる。

[0049] 本明細書において遺伝子発現の強化とは、対象遺伝子の発現が強化されていない菌株と比較して、対象遺伝子の転写量または対象遺伝子のコードするポリペプチドの発現量が増加している状態を指す。その増加量は特に限定されないが、対象遺伝子の発現が強化されていない菌株と比較して1倍超であればよく、好ましくは1.1倍以上、より好ましくは1.2倍以上、さらに好ましくは1.5倍以上、さらにより好ましくは2倍以上の増加である。

[0050] 好適な実施形態に係る形質転換微生物は、 β -ケトチオラーゼをコードする遺伝子の発現が抑制されるように形質転換されたものであってもよい。前記 β -ケトチオラーゼは、炭素数8以下の β -ケトアシル-CoAに対するチオリシス活性を有する。 β -ケトチオラーゼ遺伝子の発現を抑制することによって、 β -ケトチオラーゼの酵素活性を消失又は低下させることができる。これにより、炭素数8以下の β -ケトアシル-CoAの分解を抑制し、中鎖長3HAモノマーを含む共重合PHAをより効率よく生産することができる。

発現が抑制される β -ケトチオラーゼ遺伝子は1つのみであってよいし、2つ以上であってよい。

また、好適な実施形態に係る形質転換微生物は、 β -ケトチオラーゼ遺伝子の発現抑制と、上述したR体特異的エノイル-CoAヒドラターゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子の導入または発現強化の双方を備えたものであってもよい。

[0051] 本明細書において「 β -ケトチオラーゼ」とは、脂肪酸の β 酸化において、 β -ケトアシル-CoAが補酵素Aの存在下でチオリシス（チオール開裂）を起こして2炭素分短くなった脂肪酸アシル-CoAとアセチル-CoAを生成する反応を触媒する酵素を指す。

[0052] 発現が抑制される β -ケトチオラーゼ遺伝子は、炭素数8以下の β -ケト

アシル- $\text{C}=\text{O}$ -Aに対するチオリシス活性を有する β -ケトチオラーゼをコードする遺伝子であればよい。当該 β -ケトチオラーゼは、炭素数8以下の β -ケトアシル- $\text{C}=\text{O}$ -Aに対するチオリシス活性に加えて、炭素数9以上の β -ケトアシル- $\text{C}=\text{O}$ -Aに対するチオリシス活性を同時に有するものであってもよい。例えば、炭素数4～8の β -ケトアシル- $\text{C}=\text{O}$ -Aに対するチオリシス活性を有してもよいし、炭素数4～18の β -ケトアシル- $\text{C}=\text{O}$ -Aに対するチオリシス活性を有してもよいし、また、炭素数6～20の β -ケトアシル- $\text{C}=\text{O}$ -Aに対するチオリシス活性を有していてもよいが、以上に限定されない。

[0053] 前記 β -ケトチオラーゼをコードする遺伝子としては、特に限定されないが、例えば、bktB遺伝子、A1528遺伝子が挙げられる。具体的には、配列番号8又は9で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子や、配列番号8又は9で示されるアミノ酸配列に対して90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子が挙げられる。前記配列同一性は、95%以上であることが好ましく、97%以上がより好ましく、99%以上がさらに好ましい。

[0054] β -ケトチオラーゼをコードする遺伝子の発現を抑制するには、例えば、形質転換微生物において当該酵素遺伝子を完全に欠失させる方法、あるいは、当該酵素遺伝子の配列内部に薬剤耐性遺伝子などの全く別の遺伝子を挿入する方法、あるいは、当該酵素遺伝子の配列の一部（好ましくは、酵素活性に関わる領域）を欠失するか、置換、付加又は挿入する方法等が挙げられる。遺伝子破壊操作は、例えば、破壊用遺伝子もしくは破壊用DNAを含むベクターを用いる相同組換え技術、トランスポゾンを利用する技術などを含む。あるいは、別の破壊方法として、標的遺伝子を破壊するためのCRISPR/Cas（例えば、Cas9）システムやTALENによるゲノム編集技術（Y. Wang et al., ACS Synth Biol. 2016, 5 (7) : 721-732; Bogdanove and Voytas, Science, 333 : 1843-1846, 2011; J

inek, et al., Science, 337:816–821, 2012; Shalem, et al., Science, 343:84–87, 2014; Wang, et al., Science, 343:80–84, 2014)などの公知の技術が挙げられる。例えばCRISPR/Cas9システムでは、ガイドRNA (gRNA) は破壊すべきβ-ケトチオラーゼ遺伝子の塩基配列の一部に結合しうる配列を有しており、Cas9を標的に運ぶ役割をもつ。また、該当遺伝子周辺の塩基配列の欠失、置換、付加、挿入などの変異により、遺伝子の転写・翻訳効率、mRNAの安定性を低下させるなどして、当該酵素活性を消失または低下させることもできる。

[0055] (微生物の培養)

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

[0056] 培養時の炭素源としては、前記形質転換微生物が資化可能であればどのような炭素源でも使用可能である。特に限定されないが、例えば、グルコース、フルクトース、シュクロース、キシロースなどの糖類；パーム油やパーム核油（これらを分別した低融点分画であるパームオレイン、パームダブルオレイン、パーム核油オレインなども含む）、コーン油、やし油、オリーブ油、大豆油、菜種油、ヤトロファ油などの油脂やその分画油類、あるいはその精製副産物；ラウリン酸、オレイン酸、ステアリン酸、パルミチン酸、ミリスチン酸などの脂肪酸やそれらの誘導体、あるいはグリセロール等が挙げられる。前記油脂は、その一部、又は、全部が、劣化油であってよい。劣化油とは、熱変性し、または、加熱下で酸素および／または水と反応して変質した油脂を指す。その呼称は限定されず、廃油、廃棄油、廃食油、廃食用油、廃植物油、使用済み油等と呼称されているものも含まれる。また、前記

形質転換微生物が二酸化炭素、一酸化炭素、メタン、メタノール、エタノールなどのガスやアルコール類を利用可能である場合、これらを炭素源として使用することもできる。中でも、炭素源は油脂（特に植物油）又は遊離脂肪酸を含むことが好ましい。

前記油脂の構成脂肪酸、又は前記遊離脂肪酸の炭素数は特に限定されないが、中鎖長3HAモノマーを含む共重合PHAの生産性の観点から、8以上であることが好ましく、10以上がより好ましく、12以上がさらに好ましい。

[0057] 前記形質転換微生物の培養では、前記炭素源、炭素源以外の栄養源である窒素源、無機塩類、その他の有機栄養源を含む培地を用いることが好ましい。下記に限定されないが、窒素源としては、例えば、アンモニア；塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等のアンモニウム塩；ペプトン、肉エキス、酵母エキス等が挙げられる。無機塩類としては、例えば、リン酸2水素カリウム、リン酸水素2ナトリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム等が挙げられる。その他の有機栄養源としては、例えば、グリシン、アラニン、セリン、スレオニン、プロリン等のアミノ酸、ビタミンB1、ビタミンB12、ビタミンC等のビタミン等が挙げられる。

[0058] 前記形質転換微生物の培養を適切な時間行なって微生物細胞内に前記共重合PHAを蓄積させた後、周知の方法を用いて前記共重合PHAを回収することができる。回収方法については特に限定されないが、工業的には、環境負荷の低い水系における分離・精製による回収が好ましい。例えば、培養終了後、機械的なせん断力を加えたり、界面活性剤やアルカリ、酵素などを用いて細胞を破碎することで、共重合PHA以外の細胞成分が水に溶解した細胞破碎液を得ることができる。前記細胞破碎液の濾過や遠心分離によって前記共重合PHAを水相から分離した後、乾燥させることで、前記共重合PHAを回収することができる。

[0059] 以下の各項目では、本開示における好ましい態様を列挙するが、本発明は

以下の項目に限定されるものではない。

[項目 1]

炭素数 8 以上の 3-ヒドロキシアリカン酸モノマー単位を含む共重合ポリヒドロキシアリカン酸の産生能を有する形質転換微生物であって、

配列番号 1～4 のいずれかで示されるアミノ酸配列からなるポリヒドロキシアリカン酸シンターゼをコードする外来遺伝子、または、配列番号 1～4 のいずれかで示されるアミノ酸配列に対して 90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつポリヒドロキシアリカン酸シンターゼ活性を有するタンパク質をコードする外来遺伝子を有する、形質転換微生物。

[項目 2]

炭素数 8 以上のエノイル-C₆A 基質に対して R 体特異的エノイル-C₆A ヒドラターゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子が導入され、または該遺伝子の発現が強化されるように形質転換されている、項目 1 に記載の形質転換微生物。

[項目 3]

前記 R 体特異的エノイル-C₆A ヒドラターゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子が、配列番号 5、6、又は、7 で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子、または、配列番号 5、6、又は 7 で示されるアミノ酸配列に対して 90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子である、項目 2 に記載の形質転換微生物。

[項目 4]

β -ケトチオラーゼをコードする遺伝子の発現が抑制されるように形質転換されている、項目 1～3 のいずれか 1 項に記載の形質転換微生物。

[項目 5]

前記 β -ケトチオラーゼをコードする遺伝子が、配列番号 8 又は 9 で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子、または、配列番号 8 又は 9 で示されるアミノ酸配列に対して 90%以上の配列同一性を有する

るアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子である、項目4に記載の形質転換微生物。

[項目6]

前記形質転換微生物の宿主がカプリアビダス属に属する、項目1～5のいずれか1項に記載の形質転換微生物。

[項目7]

前記形質転換微生物の宿主がカプリアビダス・ネカトールである、項目6に記載の形質転換微生物。

[項目8]

項目1～7のいずれか1項に記載の形質転換微生物を炭素源の存在下で培養する工程、及び、

前記形質転換微生物から、炭素数8以上の3-ヒドロキシアルカン酸モノマー単位を含む共重合ポリヒドロキシアルカン酸を回収する工程、を含む、
共重合ポリヒドロキシアルカン酸の製造方法。

[項目9]

前記共重合ポリヒドロキシアルカン酸中の、前記炭素数8以上の3-ヒドロキシアルカン酸モノマー単位の合計含有割合は1モル%以上である、項目8に記載の共重合ポリヒドロキシアルカン酸の製造方法。

実施例

[0060] 以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。ただし、本発明はこれら実施例に具体的に限定されるものではない。

[0061] (菌株の育種)

本実施例における遺伝子操作は、Molecular Cloning (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)に記載の方法で行うことができる。また、遺伝子操作に使用する酵素、クローニング宿主等は、市場の供給者から購入し、その取扱説明書に従い使用することができる。なお、本実施例に用いられる酵素は、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。

[0062] 以下の製造例で使用する「KNK005 dZ株」は、KNK005 Δ *phaZ* 1, 2, 6株とも呼ばれる形質転換微生物であり、*Cupriavidus necator* H16株の染色体上の*phaC* 1遺伝子が*Aeromonas caviae*由来のPHA重合酵素遺伝子変異体（NSDG）に置換され、染色体上のPHA分解酵素遺伝子である*phaZ* 1, 2, 6遺伝子が欠失した形質転換微生物である。この形質転換微生物は、国際公開第2014/065253号に記載の方法に準じて作製することができる。

[0063] （製造例1）KNK005 dZ／dNSDG株の作製

まず、NSDG破壊用プラスミドの作製を行った。作製は以下のように行った。

KNK005 dZ株のゲノムDNAを鋳型としたPCRにより、NSDG遺伝子より上流及び下流の塩基配列を連結したDNA断片を作製した（配列番号10）。このDNA断片を制限酵素*Smi* Iで消化し、得られたDNA断片を、同じく*Smi* I消化した特開2007-259708号公報に記載のベクターpNS2X-sacBとDNAリガーゼにて連結し、NSDG破壊用プラスミドベクターpNS2X-sacB+NSDGUDを作製した。

[0064] 次に、NSDG破壊用プラスミドベクターpNS2X-sacB+NSDGUDを用いて、以下のようにしてKNK005 dZ／dNSDG株の作製を行った。

[0065] pNS2X-sacB+NSDGUDで大腸菌S17-1株（ATCC47055）を形質転換し、それによって得た形質転換微生物を、KNK005 dZ株とNutrient Agar（Difco社製）培地上で混合培養して接合伝達を行った。

[0066] 得られた培養菌体を、250mg/Lのカナマイシンを含むシモンズ寒天培地（クエン酸ナトリウム2g/L、塩化ナトリウム5g/L、硫酸マグネシウム・7水塩0.2g/L、りん酸二水素アンモニウム1g/L、りん酸水素二カリウム1g/L、寒天15g/L、pH6.8）に播種し、寒天培

地上で生育してきた菌株を選択して、プラスミドがKNK005 dZ株の染色体上に組み込まれた株を取得した。この株をNutrient Broth培地で2世代培養した後、15%のスクロースを含むNutrient Agar培地上に希釈して塗布し、生育してきた菌株をプラスミドが脱落した株として取得した。さらにPCR解析あるいはシーケンス解析により、染色体上のNSDG遺伝子が除去された菌株1株を単離した。得られた株をKNK005 dZ/dNSDGと命名した。

- [0067] (製造例2) KNK005 dZ/dNSDG/dphaJ4a株の作製
まず、phaJ4a遺伝子破壊用プラスミドの作製を行った。作製は以下のように行った。

KNK005 dZ株のゲノムDNAを鋳型としたPCRにより、phaJ4a構造遺伝子より上流及び下流の塩基配列を連結したDNA断片を作製した(配列番号11)。このDNA断片を制限酵素SmiIで消化し、得られたDNA断片を、同じくSmiI消化したpNS2X-sacBとDNAリガーゼにて連結し、phaJ4a破壊用プラスミドベクターpNS2X-sacB+phaJ4aUDを作製した。

- [0068] phaJ4a遺伝子破壊用プラスミドベクターpNS2X-sacB+phaJ4aUDを用いて、製造例1で得たKNK005 dZ/dNSDGを親株として、上記と同様の方法で、phaJ4a遺伝子破壊株KNK005 dZ/dNSDG/dphaJ4aを作製した。得られた株を宿主1とする。

- [0069] (製造例3) KNK005 dZ/dNSDG/dphaJ4a/dbktB株の作製

まず、bktB遺伝子破壊用プラスミドの作製を行った。作製は以下のように行った。

KNK005 dZ株のゲノムDNAを鋳型としたPCRにより、bktB構造遺伝子より上流及び下流の塩基配列を連結したDNA断片を作製した(配列番号12)。このDNA断片を制限酵素SmiIで消化し、得られたD

NA断片を、同じくSmiI消化したpNS2X-sacBとDNAリガーゼにて連結し、bktB遺伝子破壊用プラスミドベクターpNS2X-sacB+bktBUDを作製した。

[0070] 次に、bktB遺伝子破壊用プラスミドベクターpNS2X-sacB+bktBUDを用いて、製造例2で得たKNK005dZ/dNSDG/dphaJ4aを親株として、上記と同様の方法で、bktB遺伝子破壊株KNK005dZ/dNSDG/dphaJ4a/dbktBを作製した。得られた株を宿主2とする。

[0071] (製造例4) KNK005dZ/dNSDG/dphaJ4a/dbktB/dA1528株の作製

まず、A1528遺伝子破壊用プラスミドの作製を行った。作製は以下のように行った。

KNK005dZ株のゲノムDNAを鋳型としたPCRにより、A1528構造遺伝子より上流及び下流の塩基配列を連結したDNA断片を作製した(配列番号13)。このDNA断片を制限酵素SmiIで消化し、得られたDNA断片を、同じくSmiI消化したpNS2X-sacBとDNAリガーゼにて連結し、A1528遺伝子破壊用プラスミドベクターpNS2X-sacB+A1528UDを作製した。

[0072] 次に、A1528遺伝子破壊用プラスミドベクターpNS2X-sacB+A1528UDを用いて、製造例3で得たKNK005dZ/dNSDG/dphaJ4a/dbktBを親株として、上記と同様の方法で、A1528遺伝子破壊株KNK005dZ/dNSDG/dphaJ4a/dbktB/dA1528を作製した。得られた株を宿主3とする。

[0073] (製造例5) KNK005dZ/dNSDG/dbktB/dphaJ4a::trc-phaJ4pp株の作製

まず、phaJ4pp遺伝子導入用プラスミドの作製を行った。作製は以下のように行った。

人工合成遺伝子を鋳型としたPCRにより、phaJ4a構造遺伝子より

上流及び下流の塩基配列、配列番号14に記載の塩基配列を有する *t r c* プロモーター、配列番号5に記載のアミノ酸配列を有する *p h a J 4 p p* をコードする遺伝子を含む塩基配列を含むDNA断片（配列番号15）を得た。このDNA断片を制限酵素 *S m i I* で消化し、得られたDNA断片を、同じく *S m i I* 消化した *p N S 2 X - s a c B* とDNAリガーゼにて連結し、*p h a J 4 p p* 遺伝子導入用プラスミドベクター *p N S 2 X - s a c B + p h a J 4 a U - t r c - p h a J 4 p p - p h a J 4 a D* を作製した。

[0074] 次に、*p h a J 4 p p* 遺伝子導入用プラスミドベクター *p N S 2 X - s a c B + p h a J 4 a U - t r c - p h a J 4 p p - p h a J 4 a D* を用いて、製造例3で得た *K N K 0 0 5 d Z / d N S D G / d p h a J 4 a / d b k t B* を親株として、上記の遺伝子破壊と同様の方法で染色体DNAの改変を行い、*p h a J 4 p p* 遺伝子挿入株 *K N K 0 0 5 d Z / d N S D G / d b k t B / d p h a J 4 a : : t r c - p h a J 4 p p* を作製した。得られた株を宿主4とする。

[0075] （製造例6）*K N K 0 0 5 d Z / d N S D G / d b k t B / d A 1 5 2 8 / d p h a J 4 a : : t r c - p h a J 4 p p* 株の作製

前記 *p h a J 4 p p* 遺伝子導入用プラスミドベクター *p N S 2 X - s a c B + p h a J 4 a U - t r c - p h a J 4 p p - p h a J 4 a D* を用いて、製造例4で得た *K N K 0 0 5 d Z / d N S D G / d p h a J 4 a / d b k t B / d A 1 5 2 8* を親株として、上記の遺伝子破壊と同様の方法で染色体DNAの改変を行い、*p h a J 4 p p* 遺伝子挿入株 *K N K 0 0 5 d Z / d N S D G / d b k t B / d A 1 5 2 8 / d p h a J 4 a : : t r c - p h a J 4 p p* を作製した。得られた株を宿主5とする。

[0076] （製造例7）*K N K 0 0 5 d Z / d N S D G / d b k t B / d A 1 5 2 8 / d p h a J 4 a : : l a c U V 5 - p h a J 4 p a* 株の作製

まず、*p h a J 4 p a* 遺伝子導入用プラスミドの作製を行った。作製は以下のように行った。

人工合成遺伝子を鋳型としたPCRにより、*p h a J 4 a* 構造遺伝子より

上流の塩基配列および、その直後の下流の塩基配列、配列番号16に記載の塩基配列を有するlacUV5プロモーター、配列番号6に記載のアミノ酸配列を有するphaJ4paをコードする遺伝子を連結したDNA断片（配列番号17）を得た。このDNA断片を制限酵素SmiIで消化し、得られたDNA断片を、同じくSmiI消化したpNS2X-sacBとDNAリガーゼにて連結し、phaJ4pa遺伝子導入用プラスミドベクターpNS2X-sacB+phaJ4aU-lacUV5-phaJ4pa-phaJ4aDを作製した。

[0077] 次に、phaJ4pa遺伝子導入用プラスミドベクターpNS2X-sacB+phaJ4aU-lacUV5-phaJ4pa-phaJ4aDを用いて、製造例4で得たKNK005dZ/dNSDG/dbk t B/dA1528を親株として、上記の遺伝子破壊と同様の方法で染色体DNAの改変を行い、phaJ4pa遺伝子挿入株KNK005dZ/dNSDG/dbk t B/dA1528/dphaJ4a::lacUV5-phaJ4paを作製した。得られた株を宿主6とする。

[0078] （製造例8）KNK005dZ/dNSDG/dbk t B/dA1528/dphaJ4a::poe1-mfe2dm株の作製

まず、mfe2dm遺伝子導入用プラスミドの作製を行った。作製は以下のように行った。

人工合成遺伝子を鋳型としたPCRにより、phaJ4a構造遺伝子の上流の塩基配列およびその塩基配列の下流に直後に続く塩基配列、配列番号18に記載の塩基配列を有するpoe1プロモーター、配列番号7に記載のアミノ酸配列を有するMfe2dmをコードする遺伝子を含むDNA断片（配列番号19）を得た。このDNA断片を制限酵素SmiIで消化し、得られたDNA断片を、同じくSmiI消化したpNS2X-sacBとDNAリガーゼにて連結し、mfe2dm遺伝子導入用プラスミドベクターpNS2X-sacB+phaJ4aU-poe1-mfe2dm-phaJ4aDを作製した。

[0079] 次に、m f e 2 d m 遺伝子導入用プラスミドベクター p N S 2 X - s a c B + p h a J 4 a U - p o e 1 - m f e 2 d m - p h a J 4 a D を用いて、製造例 4 で得た K N K 0 0 5 d Z / d N S D G / d p h a J 4 a / d b k t B / d A 1 5 2 8 を親株として、上記の遺伝子破壊と同様の方法で染色体 DNA の改変を行い、m f e 2 d m 遺伝子挿入株 K N K 0 0 5 d Z / d N S D G / d b k t B / d A 1 5 2 8 / d p h a J 4 a : : p o e 1 - m f e 2 d m を作製した。得られた株を宿主 7 とする。

[0080] (製造例 9) S T Q K 遺伝子導入用プラスミドの作製

P s e u d o m o n a s s p. 6 1 - 3 由来の P h a C 1 p s 変異体酵素 S T Q K (特許文献 2 に開示) の遺伝子を P H A 生産評価用宿主に導入するため、S T Q K 遺伝子導入用プラスミド p C U P 2 - l a c U V 5 - S T Q K を作製した。

[0081] まず、配列番号 2 2 で示される S T Q K のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む人工合成 DNA 断片 (配列番号 3 2) を制限酵素 M u n I、S p e I で消化した。この DNA 断片を特開 2 0 0 7 - 2 5 9 7 0 8 号公報記載の p C U P 2 ベクターを M u n I と S p e I で消化したものと、DNA リガーゼを用いて連結し、p C U P 2 - S T Q K プラスミドを作製した。

[0082] 次に、l a c U V 5 プロモーターを、特開 2 0 2 0 - 5 8 3 9 1 号公報記載の p C U P 2 - P l a c U V 5 - p h a C R e を鋳型として、配列番号 2 0 および配列番号 2 1 で示した DNA をプライマーとして PCR を行い、得られた DNA 断片を M u n I で消化した。この DNA 断片を、p C U P 2 - S T Q K を M u n I で消化したものと DNA リガーゼを用いて連結し、l a c U V 5 プロモーター下流に S T Q K 遺伝子配列が位置するように連結された p C U P 2 - l a c U V 5 - S T Q K を作製した。

[0083] (製造例 1 0) 各 P h a C 遺伝子導入用プラスミドの作製

配列番号 2 3 ~ 3 1、及び配列番号 1 ~ 4 のいずれかで示されるアミノ酸配列からなる各 P h a C の遺伝子を P H A 生産評価用宿主に導入するため、各 P h a C 遺伝子導入用プラスミドをそれぞれ作製した。

[0084] 配列番号23～31、および配列番号1～4で示されるPhaCは、それぞれ以下の通りである。

Pseudomonas 属由来のPhaCまたはその変異体酵素：

配列番号23で示されるSTSRQR（特許文献2に開示）、

配列番号24で示されるEDSCSR（特許文献2に開示）、

配列番号25で示されるPhaC1H9（非特許文献2に開示）、

配列番号26で示されるPhaC1po（非特許文献2に開示）、

配列番号27で示されるPhaC1pm（非特許文献3に開示）。

Rhodococcus 属由来のPhaC：

配列番号28で示されるPhaCrw、

配列番号29で示されるPhaC1ra（CO9シンターゼ、特許文献3に開示）、

配列番号30で示されるPhaC2ra（D12シンターゼ、特許文献3に開示）。

Gordonia 属由来のPhaC：

配列番号31で示されるPhaCgs。

[0085] *Mycobacterium* 属由来のPhaC：

配列番号1で示されるPhaCmc、

配列番号2で示されるPhaCmp。

Mycollicibacterium 属由来のPhaC：

配列番号3で示されるPhaCmi。

Nocardioides 属由来のPhaC：

配列番号4で示されるPhaCna

[0086] PhaCをコードする塩基配列を含む人工合成DNA断片として、配列番号32で示される塩基配列に代えて、配列番号33～45のいずれかで示される塩基配列を用いる以外は、製造例9と同様の手順で、STQK遺伝子導入用プラスミドpCUP2-lacUV5-STQKにおけるSTQK遺伝子が前述した各PhaC遺伝子に置き換わった以下のPhaC遺伝子導入用

プラスミドを作製した。

pCUP2-lacUV5-STSRQR、
pCUP2-lacUV5-EDSCSR、
pCUP2-lacUV5-phaC1H9、
pCUP2-lacUV5-phaC1po、
pCUP2-lacUV5-phaC1pm、
pCUP2-lacUV5-phaC1rw、
pCUP2-lacUV5-phaC1ra、
pCUP2-lacUV5-phaC2ra、
pCUP2-lacUV5-phaCgs、
pCUP2-lacUV5-phaCmc、
pCUP2-lacUV5-phaCmp、
pCUP2-lacUV5-phaCmi、
pCUP2-lacUV5-phaCna。

[0087] (製造例11) 宿主2を親株とするPhaC遺伝子導入用プラスミド導入株の作製

生産試験株の作製を目的とし、製造例3で作製した宿主2 (KNK005 dZ/dNSDG/dphaJ4a/dbktB) を親株とし、製造例9または製造例10で作製した各PhaC遺伝子導入用プラスミドを導入した菌株を以下の手順で作製した。

[0088] まず、宿主2 (KNK005 dZ/dNSDG/dphaJ4a/dbktB) を5ml Nutrient Broth培地で一晚培養した。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。そのうち、1mlの菌体液を各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・ラッド社製) 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1ml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2日間培養し、得られたコロニーから各プラスミドが導入された菌株を取得した。

[0089] (製造例12)

宿主3～5を親株とするPhaC遺伝子導入用プラスミド導入株の作製
製造例11と同様の方法で、製造例4で作製した宿主3、又は、製造例5で作製した宿主4、製造例6で作製した宿主5を親株とし、製造例9または製造例10で作製した各PhaC遺伝子遺伝子導入用プラスミドを導入した菌株を作製した。

[0090] (製造例13)

宿主1、6、7を親株とするPhaC遺伝子導入用プラスミド導入株の作製
製造例11と同様の方法で、製造例2で作製した宿主1、製造例7で作製した宿主6、製造例8で作製した宿主7を親株とし、製造例10で作製した各PhaC遺伝子遺伝子導入用プラスミドのうちPhaCmc、PhaCmp、PhaCmi、又は、PhaCnaの遺伝子導入用プラスミドを導入した菌株を作製した。

[0091] (比較例1) STQKによるPHA生産

宿主2～5のそれぞれにSTQK遺伝子導入用プラスミドpCUP2-IacUV5-STQKを導入して得た菌株のPHA生産評価を以下の方法で実施した。

[0092] 種母培地の組成は、1% (w/v) 肉エキス、1% (w/v) Bacter-Trypton、0.2% (w/v) イーストエキス、0.9% (w/v) リン酸水素二ナトリウム12水和物、0.15% (w/v) リン酸二水素カリウム、50μg/Lカナマイシン、pH6.8とした。

[0093] PHA生産に使用したPHA生産培地の組成は、1.1% (w/v) リン

酸水素二ナトリウム 12水和物、0.19% (w/v) リン酸二水素カリウム、1.29% (w/v) 硫酸アンモニウム、0.1% (w/v) 硫酸マグネシウム七水和物、0.5% (v/v) 微量金属塩溶液 (0.1 N 塩酸に 1.6% (w/v) 塩化鉄 (III) 六水和物、1% (w/v) 塩化カルシウム二水和物、0.02% (w/v) 塩化コバルト六水和物、0.016% (w/v) 硫酸銅五水和物、0.012% (w/v) 塩化ニッケル六水和物を溶かしたもの)、50 μ g/L カナマイシンとした。炭素源には、パーム核油を 1.0% (w/v) の濃度で用いた。

[0094] PHA フラスコ生産培養方法は、次のように行った。まず、菌株のグリセロールストック 50 μ l を種母培地 5 ml に接種して 16 時間培養し、得られた培養液を種母とした。次に、種母培養液 0.5 ml を、50 ml の PHA 生産培地を入れた 500 ml 容坂口フラスコに接種した。運転条件は、培養温度 30°C、攪拌速度 130 rpm とし、72 時間培養した。培養終了後、培養液から菌体を回収、エタノールで洗浄、真空乾燥し、乾燥菌体重量を測定した。

[0095] (PHA 生産量、モノマー組成分析)

得られた PHA の生産量、及びモノマー組成はガスクロマトグラフィーによって分析した。

培養終了後に回収した乾燥菌体約 20 mg に 1 ml の硫酸-メタノール混液 (15 : 85) と 1 ml のクロロホルムを添加して密栓し、100°C で 140 分間加熱することによって、乾燥菌体中に含まれる PHA をメチルエステル化した。冷却後、これに 0.5 ml の純水を加えて 30 分程度静置し、2 層分離させた。その後、下層のクロロホルム層を回収し、フィルターに通した後、PHA をキャピラリーガスクロマトグラフィーにより分析し、3HB (炭素数 4)、3HH (炭素数 6)、3HO (炭素数 8)、3HD (炭素数 10)、及び 3HDD (炭素数 12) を定量し、各モノマー重合比率を算出した。

また、各モノマー重合量から、乾燥菌体内に含まれていた PHA 量と PH

A含有率（w t %）を算出した。最後に、培養液の乾燥菌体重量（D C W）とP H A含有率（w t %）から、培養液中のP H A生産量（g / L）を算出した。

ガスクロマトグラフは、島津製作所G C - 2 0 1 4 A F / S P L、キャピラリーカラムはフロンティアラボ社製U l t r a A L L O Y U A 1（M S / H T）- 1 5 M - 0. 2 5 F（カラム長1 5 m、カラム内径0. 2 5 m m、液膜厚0. 2 5 μ m）を用いた。キャリアガスとしてH eを用い、カラム入口圧4 3. 8 k P aとし、サンプルは1 μ lを注入した。温度条件は、初発温度5 0 $^{\circ}$ Cを2分間保持した後、5 0 $^{\circ}$ Cから2 7 5 $^{\circ}$ Cまで2 2. 5 $^{\circ}$ C / 分の速度で昇温し、その後2 7 5 $^{\circ}$ Cを1 0分間保持した。

上記条件にて分析した結果、得られたP H Aの生産量およびモノマー組成比率を表1に示した。

[0096] [表1]

	宿主	PhaC	乾燥菌体重量 (g/L)	PHA 生産量 (g/L)	PHA 含有率 (%)	3HB (mol%)	3HH (mol%)	3HO (mol%)	3HD (mol%)	3HDD (mol%)
比較例1	2	STQK	12.2	7.3	59.8	95.5	4.3	0.1	0.0	0.0
	3	STQK	2.0	0	0	-	-	-	-	-
	4	STQK	2.2	0	0	-	-	-	-	-
	5	STQK	2.8	0	0	-	-	-	-	-

[0097] 比較例1で評価した菌株のうち、宿主3～5を用いた菌株ではP H Aの生産が確認されなかった。宿主2を用いた菌株のみでP H Aの生産が確認されたが、得られたP H Aにおける炭素数8以上の3 H Aモノマー割合（3 H O、3 H D及び3 H D Dの合計割合）は1モル%未満であった。

[0098] （比較例2）S T S R Q RによるP H A生産

宿主2～5のそれぞれにプラスミドp C U P 2 - l a c U V 5 - S T S R Q Rを導入して得た菌株を、比較例1と同様の方法で培養し、P H A生産量およびモノマー組成比率を比較例1と同様の方法で算出した。得られたP H A生産量およびモノマー組成比率を表2に示した。

[0099]

[表2]

	宿主	PhaC	乾燥菌体重量 (g/L)	PHA生産量 (g/L)	PHA含有率 (%)	3HB (mol%)	3HH (mol%)	3HO (mol%)	3HD (mol%)	3HDD (mol%)
比較例2	2	STSRQR	8.8	4.3	49.0	94.1	5.7	0.1	0.1	0.0
	3	STSRQR	2.1	0	0	—	—	—	—	—
	4	STSRQR	2.0	0	0	—	—	—	—	—
	5	STSRQR	2.5	0	0	—	—	—	—	—

[0100] 比較例2で評価した菌株のうち、宿主3～5を用いた菌株ではPHAの生産が確認されなかった。宿主2を用いた菌株のみでPHAの生産が確認されたが、得られたPHAにおける炭素数8以上の3HAモノマー割合は1モル%未満であった。

[0101] (比較例3) EDSCSRによるPHA生産

宿主2～5のそれぞれにプラスミドpCUP2-lacUV5-EDSCSRを導入して得た菌株を、比較例1と同様の方法で培養し、PHA生産量およびモノマー組成比率を比較例1と同様の方法で算出した。得られたPHA生産量およびモノマー組成比率を表3に示した。

[0102] [表3]

	宿主	PhaC	乾燥菌体重量 (g/L)	PHA生産量 (g/L)	PHA含有率 (%)	3HB (mol%)	3HH (mol%)	3HO (mol%)	3HD (mol%)	3HDD (mol%)
比較例3	2	EDSCSR	12.6	6.7	53.1	95.8	4.2	0.0	0.0	0.0
	3	EDSCSR	2.6	0	0	—	—	—	—	—
	4	EDSCSR	2.4	0	0	—	—	—	—	—
	5	EDSCSR	2.3	0	0	—	—	—	—	—

[0103] 比較例3で評価した菌株のうち、宿主3～5を用いた菌株ではPHAの生産が確認されなかった。宿主2を用いた菌株のみでPHAの生産が確認されたが、得られたPHAにおける炭素数8以上の3HAモノマー割合は1モル%未満であった。

[0104] (比較例4) PhaC1H9によるPHA生産

宿主2～5のそれぞれにプラスミドpCUP2-lacUV5-phaC1H9を導入して得た菌株を、比較例1と同様の方法で培養し、PHA生産量およびモノマー組成比率を比較例1と同様の方法で算出した。得られたP

H A 生産量およびモノマー組成比率を表 4 に示した。

[0105] [表4]

	宿主	PhaC	乾燥菌体重量 (g/L)	PHA 生産量 (g/L)	PHA 含有率 (%)	3HB (mol%)	3HH (mol%)	3HO (mol%)	3HD (mol%)	3HDD (mol%)
比較例4	2	PhaC1H9	2.3	0	0	-	-	-	-	-
	3	PhaC1H9	1.9	0	0	-	-	-	-	-
	4	PhaC1H9	2.9	0	0	-	-	-	-	-
	5	PhaC1H9	2.4	0	0	-	-	-	-	-

[0106] 比較例 4 で評価した全ての菌株において、P H A の生産が確認されなかった。

[0107] (比較例 5) P h a C 1 p o による P H A 生産

宿主 2 ～ 5 のそれぞれにプラスミド p C U P 2 - l a c U V 5 - p h a C 1 p o を導入して得た菌株を、比較例 1 と同様の方法で培養し、P H A 生産量およびモノマー組成比率を比較例 1 と同様の方法で算出した。得られた P H A 生産量およびモノマー組成比率を表 5 に示した。

[0108] [表5]

	宿主	PhaC	乾燥菌体重量 (g/L)	PHA 生産量 (g/L)	PHA 含有率 (%)	3HB (mol%)	3HH (mol%)	3HO (mol%)	3HD (mol%)	3HDD (mol%)
比較例5	2	PhaC1po	2.3	0	0	-	-	-	-	-
	3	PhaC1po	2.3	0	0	-	-	-	-	-
	4	PhaC1po	2.2	0	0	-	-	-	-	-
	5	PhaC1po	2.1	0	0	-	-	-	-	-

[0109] 比較例 5 で評価した全ての菌株において、P H A の生産が確認されなかった。

[0110] (比較例 6) P h a C 1 p m による P H A 生産

宿主 2 ～ 5 のそれぞれにプラスミド p C U P 2 - l a c U V 5 - p h a C 1 p m を導入して得た菌株を、比較例 1 と同様の方法で培養し、P H A 生産量およびモノマー組成比率を比較例 1 と同様の方法で算出した。得られた P H A 生産量およびモノマー組成比率を表 6 に示した。

[0111]

[表6]

	宿主	PhaC	乾燥菌体重量 (g/L)	PHA 生産量 (g/L)	PHA 含有率 (%)	3HB (mol%)	3HH (mol%)	3HO (mol%)	3HD (mol%)	3HDD (mol%)
比較例6	2	PhaC1pm	2.6	0	0	-	-	-	-	-
	3	PhaC1pm	2.3	0	0	-	-	-	-	-
	4	PhaC1pm	3.3	0	0	-	-	-	-	-
	5	PhaC1pm	2.6	0	0	-	-	-	-	-

[0112] 比較例6で評価した全ての菌株において、PHAの生産が確認されなかった。

[0113] (比較例7～10) PhaC1ra、PhaC2ra、PhaCrw、又はPhaCgsによるPHA生産

宿主5に、プラスミドpCUP2-lacUV5-phaC1ra、pCUP2-lacUV5-phaC2ra、pCUP2-lacUV5-phaCrw、又は、pCUP2-lacUV5-phaCgsを導入して得た菌株を、比較例1と同様の方法で培養し、PHA生産量およびモノマー組成比率を比較例1と同様の方法で算出した。得られたPHA生産量およびモノマー組成比率を表7に示した。

[0114] [表7]

	宿主	PhaC	乾燥菌体重量 (g/L)	PHA 生産量 (g/L)	PHA 含有率 (%)	3HB (mol%)	3HH (mol%)	3HO (mol%)	3HD (mol%)	3HDD (mol%)
比較例7	5	PhaC1ra	2.8	0.0	0.0	-	-	-	-	-
比較例8	5	PhaC2ra	3.8	1.1	29.9	54.3	45.3	0.4	0.0	0.0
比較例9	5	PhaCrw	2.8	0	0	-	-	-	-	-
比較例10	5	PhaCgs	2.7	0	0	-	-	-	-	-

[0115] 比較例7、9、及び10で評価した、PhaC1ra (CO9シンターゼ) 遺伝子、PhaCrw遺伝子、PhaCgs遺伝子を導入した菌株では、PHAの生産が確認されなかった。一方、比較例8で評価したPhaC2ra (D12シンターゼ) 遺伝子導入株ではPHAの生産が確認されたが、得られたPHAにおける炭素数8以上の3HAモノマー割合は1モル%未満であった。

[0116] 以上の比較例1～10より、Pseudomonas属、Rhodoco

c c u s 属、又は G o r d o n i a 属に由来する P h a C 酵素遺伝子又はその変異体をコードする遺伝子を導入した菌株は、いずれの宿主においても、炭素数 8 以上の 3 H A モノマー単位を 1 モル%以上含む P H A を生産できなかったことが分かる。

[0117] (実施例 1) P h a C m c による P H A 生産

宿主 1 ~ 7 のそれぞれにプラスミド p C U P 2 - l a c U V 5 - p h a C m c を導入して得た菌株を、比較例 1 と同様の方法で培養し、P H A 生産量およびモノマー組成比率を比較例 1 と同様の方法で算出した。得られた P H A 生産量およびモノマー組成比率を表 8 に示した。

[0118] [表8]

	宿主	PhaC	乾燥菌体重量 (g/L)	PHA 生産量 (g/L)	PHA 含有率 (%)	3HB (mol%)	3HH (mol%)	3HO (mol%)	3HD (mol%)	3HDD (mol%)
実施例 1	1	PhaCmc	2.5	0.15	5.8	61.5	32.9	3.3	2.0	0.2
	2	PhaCmc	3.8	0.81	21.1	45.7	51.6	1.5	1.0	0.1
	3	PhaCmc	3.6	0.70	19.1	37.3	59.5	1.9	1.1	0.1
	4	PhaCmc	3.1	0.14	4.6	39.9	43.9	12.4	3.6	0.2
	5	PhaCmc	3.4	0.36	10.4	26.2	56.4	12.9	4.1	0.4
	6	PhaCmc	2.6	0.49	18.5	44.3	49.4	4.5	1.8	0.1
	7	PhaCmc	3.2	0.24	7.3	33.3	52.3	10.5	3.5	0.4

[0119] 配列番号 1 で示される P h a C m c の遺伝子を導入した実施例 1 の菌株では、全ての宿主において P H A の生産が確認された。また、生産された P H A における炭素数 8 以上の 3 H A モノマー割合 (3 H O、3 H D 及び 3 H D D の合計割合) は、 β -ケトチオラーゼ遺伝子非破壊かつ p h a J 4 p p 非導入株である宿主 1 では 5. 5 モル%であった。また、 β -ケトチオラーゼ遺伝子破壊株である宿主 2 及び 3 ではそれぞれ、2. 6 モル%、3. 1 モル%であった。一方、さらに p h a J 4 p p、p h a J 4 p a、または m f e 2 d m が導入された宿主 4、5、6 及び 7 ではそれぞれ、1 6. 2 モル%、1 7. 4 モル%、6. 4 モル%、1 4. 4 モル%であった。また、 β -ケトチオラーゼ遺伝子非破壊株である宿主 1 導入時の P H A 生産性は 0. 1 5 g / L、 β -ケトチオラーゼ遺伝子破壊株である宿主 2、3 の導入時の P H A

生産性はそれぞれ0.81 g/L、0.70 g/Lだった。

[0120] (実施例2) PhaCmpによるPHA生産

宿主1～7のそれぞれにプラスミドpCUP2-lacUV5-phaCmpを導入して得た菌株を、比較例1と同様の方法で培養し、PHA生産量およびモノマー組成比率を比較例1と同様の方法で算出した。得られたPHA生産量およびモノマー組成比率を表9に示した。

[0121] [表9]

	宿主	PhaC	乾燥菌体重量 (g/L)	PHA生産量 (g/L)	PHA含有率 (%)	3HB (mol%)	3HH (mol%)	3HO (mol%)	3HD (mol%)	3HDD (mol%)
実施例2	1	PhaCmp	2.9	0.04	1.5	21.4	62.7	15.0	0.9	0.0
	2	PhaCmp	3.5	0.20	5.8	5.2	86.7	6.1	1.8	0.2
	3	PhaCmp	3.1	0.20	6.5	3.5	88.8	6.1	1.4	0.2
	4	PhaCmp	2.4	0.03	1.3	6.0	45.6	45.7	2.8	0.0
	5	PhaCmp	2.6	0.04	1.4	12.3	32.7	51.8	3.1	0.0
	6	PhaCmp	2.6	0.14	5.2	18.8	53.9	24.6	2.6	0.1
	7	PhaCmp	2.6	0.06	2.1	1.8	36.1	56.9	4.7	0.4

[0122] 配列番号2で示されるPhaCmpの遺伝子を導入した実施例2の菌株では、全ての宿主においてPHAの生産が確認された。また、生産されたPHAにおける炭素数8以上の3HAモノマー割合は、 β -ケトチオラーゼ遺伝子非破壊かつphaJ4pp非導入株である宿主1では15.9モル%であった。また、 β -ケトチオラーゼ遺伝子破壊株である宿主2及び3ではそれぞれ、8.1モル%、7.7モル%であった。一方、さらにphaJ4pp、phaJ4pa、またはmfe2dmが導入された宿主4、5、6及び7ではそれぞれ、48.5モル%、54.9モル%、27.3モル%、62.0モル%であった。また、 β -ケトチオラーゼ遺伝子非破壊株である宿主1導入時のPHA生産性は0.04 g/L、 β -ケトチオラーゼ遺伝子破壊株である宿主2、3の導入時のPHA生産性はそれぞれ0.20 g/L、0.20 g/Lだった。

[0123] (実施例3) PhaCmiによるPHA生産

宿主1～7のそれぞれにプラスミドpCUP2-lacUV5-phaC

m i を導入して得た菌株を、比較例 1 と同様の方法で培養し、P H A 生産量およびモノマー組成比率を比較例 1 と同様の方法で算出した。得られた P H A 生産量およびモノマー組成比率を表 1 0 に示した。

[0124] [表10]

	宿主	PhaC	乾燥菌体重量 (g/L)	PHA 生産量 (g/L)	PHA 含有率 (%)	3HB (mol%)	3HH (mol%)	3HO (mol%)	3HD (mol%)	3HDD (mol%)
実施例3	1	PhaCmi	2.9	0.47	16.1	74.6	21.5	2.8	1.1	0.0
	2	PhaCmi	4.6	1.37	29.5	55.1	42.8	1.4	0.7	0.0
	3	PhaCmi	4.9	1.70	34.7	48.0	49.2	1.9	0.8	0.0
	4	PhaCmi	2.6	0.07	2.8	42.1	42.6	11.7	3.4	0.3
	5	PhaCmi	4.1	0.42	10.4	25.8	58.9	13.4	1.9	0.0
	6	PhaCmi	4.1	1.05	25.9	49.9	42.8	6.1	1.3	0.0
	7	PhaCmi	3.5	0.52	14.9	42.4	46.2	10.0	1.4	0.0

[0125] 配列番号 3 で示される P h a C m i の遺伝子を導入した実施例 3 の菌株では、全ての宿主において P H A の生産が確認された。また、生産された P H A における炭素数 8 以上の 3 H A モノマー割合は、 β -ケトチオラーゼ遺伝子非破壊かつ p h a J 4 p p 非導入株である宿主 1 では 3. 9 モル%であった。また、 β -ケトチオラーゼ遺伝子破壊株である宿主 2 及び 3 ではそれぞれ、2. 1 モル%、2. 7 モル%であった。一方、さらに p h a J 4 p p、p h a J 4 p a、または m f e 2 d m が導入された宿主 4、5、6 及び 7 ではそれぞれ、1 5. 4 モル%、1 5. 3 モル%、7. 4 モル%、1 1. 4 モル%であった。また、 β -ケトチオラーゼ遺伝子非破壊株である宿主 1 導入時の P H A 生産性は 0. 4 7 g / L、 β -ケトチオラーゼ遺伝子破壊株である宿主 2、3 の導入時の P H A 生産性はそれぞれ 1. 3 7 g / L、1. 7 0 g / L だった。

[0126] (実施例 4) P h a C n a による P H A 生産

宿主 1 ~ 7 のそれぞれにプラスミド p C U P 2 - l a c U V 5 - p h a C n a を導入して得た菌株を、比較例 1 と同様の方法で培養し、P H A 生産量およびモノマー組成比率を比較例 1 と同様の方法で算出した。得られた P H A 生産量およびモノマー組成比率を表 1 1 に示した。

[0127] [表11]

	宿主	PhaC	乾燥固体重量 (g/L)	PHA 生産量 (g/L)	PHA 含有率 (%)	3HB (mol%)	3HH (mol%)	3HO (mol%)	3HD (mol%)	3HDD (mol%)
実施例4	1	PhaCna	2.4	0.08	3.5	70.6	26.1	2.4	0.7	0.2
	2	PhaCna	3.8	0.71	18.7	39.2	58.4	1.6	0.7	0.2
	3	PhaCna	4.0	0.61	15.4	31.9	65.9	1.5	0.6	0.1
	4	PhaCna	2.6	0.03	1.3	60.4	30.6	7.1	1.4	0.6
	5	PhaCna	3.0	0.14	4.7	36.5	53.5	7.7	1.7	0.6
	6	PhaCna	2.9	0.28	9.5	39.7	55.9	3.3	0.9	0.1
	7	PhaCna	2.9	0.10	3.3	43.8	46.9	7.1	1.8	0.5

[0128] 配列番号4で示されるPhaCnaの遺伝子を導入した実施例4の菌株では、全ての宿主においてPHAの生産が確認された。また、生産されたPHAにおける炭素数8以上の3HAモノマー割合は、 β -ケトチオラーゼ遺伝子非破壊かつphaJ4pp非導入株である宿主1では3.3モル%であった。また、 β -ケトチオラーゼ遺伝子破壊株である宿主2及び3ではそれぞれ、2.5モル%、2.2モル%であった。一方、さらにphaJ4pp、phaJ4pa、またはmfe2dmが導入された宿主4、5、6及び7ではそれぞれ、9.1モル%、10.0モル%、4.3モル%、9.4モル%であった。また、 β -ケトチオラーゼ遺伝子非破壊株である宿主1導入時のPHA生産性は0.08g/L、 β -ケトチオラーゼ遺伝子破壊株である宿主2、3の導入時のPHA生産性はそれぞれ0.71g/L、0.61g/Lだった。

[0129] 実施例1～4の結果から、Mycobacterium属、Mycobacterium属、又はNocardioideus属に由来するClass 2 PhaCである配列番号1～4で表されるPhaCmc、PhaCmp、PhaCmi、又はPhaCnaの遺伝子を導入した菌株は、炭素数8以上の3HAモノマーを1モル%以上含有する共重合PHAの産生能を有することが分かる。

[0130] また、宿主にphaJ4pp、phaJ4pa、又は、mfe2dmを発現させることによって、生産される共重合PHAに含まれる炭素数8以上の

3 H Aモノマーの割合が向上することが分かる。また、 β -ケトチオラーゼ遺伝子を欠損させることで、中鎖長3 H Aモノマーを含む共重合P H Aの生産性が向上することがわかる。

[0131] 次の表12では、実施例1～4で使用した配列番号1～4で表されるP h a C m c、P h a C m p、P h a C m i、又はP h a C n aと、比較例1～10で使用した各P h a C間の配列同一性を示した。

[0132] [表12]

配列同一性(%)		実施例1	実施例2	実施例3	実施例4
		PhaCmc (配列番号1)	PhaCmp (配列番号2)	PhaCmi (配列番号3)	PhaCna (配列番号4)
比較例1	STQK	42.2	40.8	43.6	44.6
比較例2	STSRQR	42.2	40.6	43.4	44.4
比較例3	EDSCSR	41.8	40.6	43.0	44.0
比較例4	PhaC1H9	42.3	42.2	41.5	44.5
比較例5	PhaC1po	43.6	42.0	43.4	45.0
比較例6	PhaC1pm	42.2	41.6	45.3	45.0
比較例7	PhaC1ra	42.3	36.3	36.8	38.8
比較例8	PhaC2ra	42.8	42.6	42.5	46.0
比較例9	PhaCrw	43.5	42.9	43.2	45.6
比較例10	PhaCgs	66.6	46.1	60.9	53.6

[0133] 表12より、実施例1～4の各P h a Cと比較例1～10の各P h a C間の配列同一性はいずれも低い値を示しており、最も高いものでも60%台にすぎないことが分かる。

請求の範囲

- [請求項1] 炭素数 8 以上の 3-ヒドロキシアリカン酸モノマー単位を含む共重合ポリヒドロキシアリカン酸の産生能を有する形質転換微生物であって、
- 配列番号 1～4 のいずれかで示されるアミノ酸配列からなるポリヒドロキシアリカン酸シンターゼをコードする外来遺伝子、または、配列番号 1～4 のいずれかで示されるアミノ酸配列に対して 90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつポリヒドロキシアリカン酸シンターゼ活性を有するタンパク質をコードする外来遺伝子を有する、形質転換微生物。
- [請求項2] 炭素数 8 以上のエノイル-C₆A 基質に対して R 体特異的エノイル-C₆A ヒドラターゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子が導入され、または該遺伝子の発現が強化されるように形質転換されている、請求項 1 に記載の形質転換微生物。
- [請求項3] 前記 R 体特異的エノイル-C₆A ヒドラターゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子が、配列番号 5、6、又は、7 で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子、または、配列番号 5、6、又は 7 で示されるアミノ酸配列に対して 90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子である、請求項 2 に記載の形質転換微生物。
- [請求項4] β -ケトチオラーゼをコードする遺伝子の発現が抑制されるように形質転換されている、請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の形質転換微生物。
- [請求項5] 前記 β -ケトチオラーゼをコードする遺伝子が、配列番号 8 又は 9 で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子、または、配列番号 8 又は 9 で示されるアミノ酸配列に対して 90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子である、請求項 4 に記載の形質転換微生物。

- [請求項6] 前記形質転換微生物の宿主がカプリアビダス属に属する、請求項1～3のいずれか1項に記載の形質転換微生物。
- [請求項7] 前記形質転換微生物の宿主がカプリアビダス・ネカトールである、請求項6に記載の形質転換微生物。
- [請求項8] 請求項1～3のいずれか1項に記載の形質転換微生物を炭素源の存在下で培養する工程、及び、
前記形質転換微生物から、炭素数8以上の3-ヒドロキシアリカン酸モノマー単位を含む共重合ポリヒドロキシアリカン酸を回収する工程、を含む、
共重合ポリヒドロキシアリカン酸の製造方法。
- [請求項9] 前記共重合ポリヒドロキシアリカン酸中の、前記炭素数8以上の3-ヒドロキシアリカン酸モノマー単位の合計含有割合は1モル%以上である、請求項8に記載の共重合ポリヒドロキシアリカン酸の製造方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/003169

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>C12N 15/52</i> (2006.01)i; <i>C12N 1/21</i> (2006.01)i; <i>C12N 9/00</i> (2006.01)i; <i>C12N 9/10</i> (2006.01)i; <i>C12N 9/88</i> (2006.01)i; <i>C12N 15/54</i> (2006.01)i; <i>C12N 15/60</i> (2006.01)i; <i>C12P 7/42</i> (2006.01)i; <i>C12P 7/62</i> (2022.01)i FI: C12N15/52 Z ZNA; C12P7/42; C12P7/62; C12N15/54; C12N15/60; C12N1/21; C12N9/00; C12N9/10; C12N9/88 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) C12N15/52; C12N1/21; C12N9/00; C12N9/10; C12N9/88; C12N15/54; C12N15/60; C12P7/42; 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 1971-2024 Registered utility model specifications of Japan 1996-2024 Published registered utility model applications of Japan 1994-2024 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAPus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (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	ACCESSION: A 0A 7I 7L 344, Gene: phaC 1, Organism: Mycobacterium cookii, UniProt Entry history [online], UniProt, 14 December 2022, <URL: https://rest.uniprot.org/unisave/A 0A 7I 7L 344?format=txt&versions=5 >, retrieved on 12 Apr 2024, which retrieved from the internet: <URL: https://www.uniprot.org/uniprotkb/A 0A 7I 7L 344/history > particularly, Amino acid sequence information	1, 8, 9
A		2-7
Y	ACCESSION: A 0A 8E 2LRB 7, RecName: Full=PhaC_N domain-containing protein, Organism: Mycobacterium persicum, UniProt Entry history [online], UniProt, 14 December 2022, <URL: https://rest.uniprot.org/unisave/A 0A 8E 2LRB 7?format=txt&versions=4 >, retrieved on 12 Apr 2024, which retrieved from the internet: <URL: https://www.uniprot.org/uniprotkb/A 0A 8E 2LRB 7/history > particularly, Amino acid sequence information	1, 8, 9
A		2-7
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: “A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance “D” document cited by the applicant in the international application “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed “T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention “X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone “Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art “&” document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 12 April 2024		Date of mailing of the international search report 23 April 2024
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/003169

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ACCESSION: A 0A 7M 3S 8B 2, Gene: phaC 1, Organism: Mycolicibacterium insubricum, UniProt Entry history [online], UniProt, 14 December 2022, <URL: https://rest.uniprot.org/unisave/A 0A 7M 3S 8B 2?format=txt&versions=4 >, retrieved on 12 Apr 2024, which retrieved from the internet: <URL: https://www.uniprot.org/uniprotkb/A 0A 7M 3S 8B 2/history >	1, 8, 9
A	particularly, Amino acid sequence information	2-7
Y	ACCESSION: A 0A 653UFP 2, Gene: phaC, Organism: Nocardioides sp. AX 2bis, UniProt Entry history [online], UniProt, 14 December 2022, <URL: https://rest.uniprot.org/unisave/A 0A 653UFP 2?format=txt&versions=7 >, retrieved on 12 Apr 2024, which retrieved from the internet: <URL: https://www.uniprot.org/uniprotkb/A 0A 653UFP 2/history >	1, 8, 9
A	particularly, Amino acid sequence information	2-7
Y	ARIKAWA, H. and SATO, S.. Impact of various β -ketothiolase genes on PHBHHx production in Cupriavidus necator H16 derivatives, Applied microbiology and biotechnology, 22 April 2022, vol. 106, no. 8, pp. 3021-3032	1, 8, 9
A	abstract, pp. 3027, 3028	2-7
A	JP 2013-510572 A (MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 28 March 2013 (2013-03-28)	1-9
	abstract, claims, paragraphs [0008]-[0025], [0032], [0075], examples	
A	REHM, B. Polyester synthases: natural catalysts for plastics. The Biochemical journal, 20030904, vol. 376, pp. 15-33, 04 September 2003, vol. 376, pp. 15-33	1-9
	abstract, pp. 16, 17, table 2	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/003169

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

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2024/003169

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP	2013-510572	A	28 March 2013	US 2013/0017583 A1 abstract, claims, paragraphs [0008]-[0033], [0050], [0099], examples WO 2011/060048 A2 EP 2499235 A2	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12N 15/52(2006.01)i; C12N 1/21(2006.01)i; C12N 9/00(2006.01)i; C12N 9/10(2006.01)i; C12N 9/88(2006.01)i; C12N 15/54(2006.01)i; C12N 15/60(2006.01)i; C12P 7/42(2006.01)i; C12P 7/62(2022.01)i FI: C12N15/52 Z ZNA; C12P7/42; C12P7/62; C12N15/54; C12N15/60; C12N1/21; C12N9/00; C12N9/10; C12N9/88		
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）） C12N15/52; C12N1/21; C12N9/00; C12N9/10; C12N9/88; C12N15/54; C12N15/60; C12P7/42; 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 1971-2024年 日本国実用新案登録公報 1996-2024年 日本国登録実用新案公報 1994-2024年		
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); 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	ACCESSION: A0A7I7L344, Gene: phaC1, Organism: Mycobacterium cookii, UniProt Entry history [online], UniProt, 2022.12.14, <URL: https://rest.uniprot.org/unisave/A0A7I7L344?format=txt&versions=5 >, retrieved on 12 Apr 2024, which retrieved from the internet: <URL: https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A7I7L344/history > 特に、アミノ酸配列情報	1, 8, 9
A		2-7
Y	ACCESSION: A0A8E2LRB7, RecName: Full=PhaC_N domain-containing protein, Organism: Mycobacterium persicum, UniProt Entry history [online], UniProt, 2022.12.14, <URL: https://rest.uniprot.org/unisave/A0A8E2LRB7?format=txt&versions=4 >, retrieved on 12 Apr 2024, which retrieved from the internet: <URL: https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A8E2LRB7/history > 特に、アミノ酸配列情報	1, 8, 9
A		2-7
☒ 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 “D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献 “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 12.04.2024		国際調査報告の発送日 23.04.2024
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		権限のある職員（特許庁審査官） 中野 あい 4U 3758 電話番号 03-3581-1101 内線 3439

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	ACCESSION: A0A7M3S8B2, Gene: phaC1, Organism: Mycolicibacterium insubricum, UniProt Entry history [online], UniProt, 2022.12.14, <URL: https://rest.uniprot.org/unisave/A0A7M3S8B2?format=txt&versions=4 >, retrieved on 12 Apr 2024, which retrieved from the internet: <URL: https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A7M3S8B2/history > 特に、アミノ酸配列情報	1, 8, 9
A		2-7
Y	ACCESSION: A0A653UFP2, Gene: phaC, Organism: Nocardioides sp. AX2bis, UniProt Entry history [online], UniProt, 2022.12.14, <URL: https://rest.uniprot.org/unisave/A0A653UFP2?format=txt&versions=7 >, retrieved on 12 Apr 2024, which retrieved from the internet: <URL: https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A653UFP2/history > 特に、アミノ酸配列情報	1, 8, 9
A		2-7
Y	ARIKAWA H. and SATO S., Impact of various β -ketothiolase genes on PHBHHx production in Cupriavidus necator H16 derivatives, Applied microbiology and biotechnology, 2022.04.22, vol. 106, no. 8, pp. 3021-3032 Abstract, 3027-3028頁	1, 8, 9
A		2-7
A	JP 2013-510572 A (マサチューセッツ インスティテュート オブ テクノロジー) 28.03.2013 (2013 - 03 - 28) 要約, 特許請求の範囲, [0008]-[0025], [0032], [0075], 実施例	1-9
A	REHM B., Polyester synthases: natural catalysts for plastics, The Biochemical journal, 20030904, vol. 376, pp. 15-33, 2003.09.04, vol. 376, pp. 15-33 Abstract, 16-17頁, Table 2	1-9

第 I 欄 ス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スクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

- a. ☒ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
- b. ☐ 国際出願日後に、国際調査のために提出された配列表（PCT規則13の3.1(a)）
☐ 配列表が出願時の国際出願の開示の範囲を超えるものではない旨の陳述書が添付されていた。

2. ☐ この国際出願で開示されたスクレオチド又はアミノ酸配列に関して、この国際調査報告は、WIPO標準ST.26に準拠する配列表なしで有意義な国際調査をすることができる限度において作成された。

3. 補足意見：

国際出願番号
PCT/JP2024/003169

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP	2013-510572	A	28.03.2013	US 2013/0017583 A1 Abstract, Claims, [0008]- [0033], [0050], [0099], Examples WO 2011/060048 A2 EP 2499235 A2	