(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
2017 年 3 月 30 日(30.03.2017)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2017/051896 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) *C12N 9/12* (2006.01)
C12P 7/42 (2006.01) *C12N 9/14* (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01) *C12N 9/16* (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01) *C12N 9/88* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2016/078093

(22) 国際出願日: 2016 年 9 月 23 日(23.09.2016)

(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 2015-187047 2015 年 9 月 24 日(24.09.2015) JP

(71) 出願人: 国立大学法人東京工業大学(TOKYO INSTITUTE OF TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒1528550 東京都目黒区大岡山２－１２－１ Tokyo (JP). 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: 福居 俊昭(FUKUI, Toshiaki); 〒1528550 東京都目黒区大岡山２－１２－１ 国立大学法人東京工業大学内 Tokyo (JP). 清水 理恵(SHIMIZU, Rie); 〒1528550 東京都目黒区大岡山２－１２－１ 国立大学法人東京工業大学内 Tokyo (JP). 大嶽 遼子(OTAKE, Ryoko); 〒1528550 東京都目黒区大岡山２－１２－１ 国立大学法人東京工業大学内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 青木 篤, 外(AOKI, Atsushi et al.); 〒1058423 東京都港区虎ノ門三丁目５番１号 虎ノ門３７森ビル 青和特許法律事務所 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, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

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

添付公開書類:
— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則 5.2(a)）

(54) **Title**: MORE EFFICIENT POLYHYDROXYALKANOIC ACID PRODUCTION FROM SACCHARIDE BY INTRODUCTION OF CARBONIC ACID FIXATION PATHWAY

(54) 発明の名称 : 炭酸固定経路の導入による糖質からのポリヒドロキシアルカン酸製造の効率化

(57) **Abstract**: Carbon derived from biomass raw material cannot be fully utilized in substance biosynthetic metabolism by microorganisms because of the production of byproducts and CO2 discharge due to decarboxylation in the metabolic process. If the carbon discharged as CO2 could be fixed and reused, this could be expected to further improve the effective utilization and carbon yield of the raw material biomass in the production of useful materials and in turn reduce costs by efficient production. The present invention provides a method for the more efficient production of polyhydroxyalkanoic acids from saccharides as a carbon source by introducing a gene that encodes a Calvin cycle enzyme present on chromosome 2 of C. necator H16 and a related protein (carbonic acid fixation pathway) into a microorganism having PHA production capacity as a strategy greatly different from conventional metabolic alteration in microorganisms.

(57) 要約: 微生物の物質生合成代謝では、代謝過程での脱炭酸反応によるCO_2排出や副産物の生成のため、バイオマス原料に由来する炭素を完全に利用できていない。CO_2として排出された炭素を固定して再利用することができれば、有用物資生産における原料バイオマスの一層の有効利用、炭素収率の向上、ひいては効率的生産による低コスト化が期待できる。本発明は、従来の微生物における代謝改変とは大きく異なる戦略として、ＰＨＡ生産能を付与した微生物に、Ｃ．ｎｅｃａｔｏｒ Ｈ１６株の染色体２に存在するカルビン回路酵素と関連タンパク質（炭酸固定経路）をコードする遺伝子を導入することによって、炭素源として糖質からのポリヒドロキシアルカン酸製造を効率化する方法を提供する。

WO 2017/051896 A1

明　細　書

発明の名称 ：

炭酸固定経路の導入による糖質からのポリヒドロキシアルカン酸製造の効率化

技術分野

[0001] 本発明は、微生物への炭酸固定経路を導入することによって、糖質を基本原料としたポリヒドロキシアルカン酸製造を効率化させる方法に関する。

背景技術

[0002] 低炭素で持続可能な社会の構築のための重要技術の１つが、カーボンニュートラルであるバイオマスの有効利用である。プラスチック素材は日本で年間約１，０００万トンが生産されているが、そのほとんどが石油を原料としており、カーボンニュートラルなバイオマス資源からのプラスチック生産、すなわちプラスチック素材のバイオベース化が望まれているが、生産コストの低減が技術的課題である。

[0003] 現在、バイオテクノロジーによるバイオマス資源からのバイオポリマーやバイオ基幹物質の生産が盛んに研究開発されているが、微生物変換による物質生産では添加した原料から目的物質を可能な限り高い収率で得ることが重要である。主要なバイオマス資源である多糖類を原料とした微生物変換では多くの場合、糖代謝に伴う脱炭酸反応により炭素収率（原料あたりの収率）が低下する。特に、ピルビン酸からアセチル－ＣｏＡへの変換で脱炭酸が生じるため、アセチル－ＣｏＡを前駆体とする物質の生産では、六炭糖由来炭素の１／３以上がCO_2として排出され、利用できていない。カーボンニュートラルであるバイオマス資源では脱炭酸反応が生じても正味の大気中CO_2濃度増加には寄与しないが、バイオマス資源の収穫、輸送集積、微生物が利用可能な炭素源にするための前処理と糖化の各プロセスの手間とコストを考慮すると、バイオマスに由来する炭素がCO_2として排出されることは無駄と考えられる。

[0004] カルビン・ベンソン回路（以下、カルビン回路）は植物、藻類、ラン藻や多くの光合成細菌、化学合成細菌が有する炭酸固定経路であり、地球上で最も重要な代謝経路の１つである。カルビン回路による炭酸固定反応は以下の式で示される。生成物であるグリセルアルデヒド－３－Ｐは糖代謝の中間体であり、この後には様々に代謝される。

３CO_2＋９ＡＴＰ＋６ＮＡＤ（Ｐ）Ｈ→グリセルアルデヒド－３－Ｐ＋９ＡＤＰ＋６ＮＡＤ（Ｐ）$^+$

[0005] 一般に、エネルギー（ＡＴＰ）及び還元力（ＮＡＤ（Ｐ）Ｈ）を多く消費する代謝経路は、その代謝が必要とされない状況では不活性となるように制御される。カルビン回路はまさにそのような代謝であり、植物やラン藻では光・細胞胞内レドックスバランス・ｐＨ・代謝物濃度・活性化酵素などによる複雑かつ厳密な制御により、炭酸固定が不要な条件でのエネルギー・還元力の無駄な消費を防いでいる。これら事実が先入観となり、糖質などの有機物の同化代謝で炭素を容易に獲得できる従属栄養条件でカルビン回路を物質生産に応用する発想はこれまでなかった。

[0006] 微生物の代謝工学では、目的物質の生合成代謝フラックスの強化や副産物生成経路の遮断といった改変を施すことで目的物質の生産性を向上させる。この場合、有効な改変箇所は個々の生合成代謝によって異なるうえに、脱炭酸反応を含む代謝であれば原料バイオマスの炭素の完全利用はできない。目的物質の原料あたり収率（炭素収率）は脱炭酸反応を考慮した理論収率が最大値となる。すなわち、既存の代謝工学は目的産物の炭素収率を最大理論収率に近づけようとするものであり、糖代謝に伴う脱炭酸反応で失われる炭素については考慮していない。

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 上記のように、バイオマス原料に由来する炭素が副産物やCO_2として排出されることは無駄であるため、副産物の生成を抑制し、かつ、排出されたCO_2を再利用することができれば、有用物資生産における原料バイオマスの一

層の有効利用、炭素収率の向上、ひいては効率的生産による低コスト化が期待できる。

[0008] そこで、本発明者らは、従来の微生物における代謝改変とは大きく異なる戦略として、微生物の物質生合成代謝の過程での脱炭酸反応で排出されたCO_2をカルビン回路によって固定し、これを再利用することで、ポリヒドロキシアルカン酸（ＰＨＡ）の収率を向上させることを目的とした。

課題を解決するための手段

[0009] ＰＨＡは微生物が貯蔵物質として蓄積する生分解性バイオマスプラスチックであり、環境低負荷型の高分子素材として石油由来プラスチックを代替することが期待されている。代表的なＰＨＡであるポリ（３－ヒドロキシブタン酸）［Ｐ（３ＨＢ）］は、炭素源代謝で生じたアセチル－ＣｏＡ　２分子が縮合し、（Ｒ）－特異的還元で（Ｒ）－３ＨＢ－ＣｏＡに変換され、次いでＰＨＡ合成酵素（ＰｈａＣ）による重合で生合成される。糖代謝中のピルビン酸からアセチル－ＣｏＡへの変換は酸化的脱炭酸反応であるため、六炭糖の炭素のうち４個のみがＰ（３ＨＢ）に変換され、２個は利用されずにCO_2として放出される。糖代謝中の脱炭酸反応により生じたCO_2を同じ微生物細胞内で固定し再利用することができれば、原料バイオマスの一層の有効利用による炭素収率の向上と効率的生産が期待できる。本発明では、ＰＨＡ（例えば、Ｐ（３ＨＢ））生産能を有する微生物、又は該生産能を付与した組換え微生物（例えば、組換え大腸菌株）にさらに炭酸固定経路を導入することによって、ＰＨＡ生産を高効率化する方法を提供する。

[0010] すなわち、本発明は、以下の通りである。

［１］ポリヒドロキシアルカン酸生産能を有する微生物、又はポリヒドロキシアルカン酸生産能を付与した組換え微生物に（ａ）リブロース－１，５－ビスリン酸カルボキシラーゼ／オキシゲナーゼ（「ルビスコ」）遺伝子、（ｂ）ルビスコ活性化因子遺伝子、及び（ｃ）ホスホリブロキナーゼ遺伝子が組み込まれた自律複製ベクターを導入する形質転換、又は前記株の染色体に該遺伝子を相同性組換えで導入する形質転換により取得した形質転換体を

用い、炭素源として糖質を含有する培地で形質転換体を増殖させることを含む、ポリヒドロキシアルカン酸を製造する方法。

［２］前記形質転換体において、（ｄ）ＬｙｓＲタイプ転写制御因子遺伝子、（ｅ）３－ヒドロキシアシル－ＣｏＡ脱水素酸素スーパーファミリーに属する推定加水分解酵素遺伝子、（ｆ）ペントース－５－リン酸－３－エピメラーゼ遺伝子、及び（ｇ）セドヘプツロース－１，７／フルクトース－１，６－ビスホスファターゼ遺伝子からなる群から少なくとも１つ選択される遺伝子が組み込まれた自律複製ベクターを導入する形質転換、又は前記株の染色体に該遺伝子を相同性組換えによって導入する形質転換をさらに含む、上記［１］に記載の方法。

［３］前記形質転換体において、（ｈ）トランスケトラーゼ遺伝子、（ｉ）ホスホグリコール酸ホスファターゼ遺伝子、（ｊ）グリセルアルデヒド－３－リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子、（ｋ）３－ホスホグリセリン酸キナーゼ遺伝子、及び（ｌ）セドヘプツロース－１，７／フルクトース－１，６－ビスリン酸アルドラーゼ遺伝子からなる群から少なくとも１つ選択される遺伝子が組み込まれた自律複製ベクターを導入する形質転換、又は前記株の染色体に該遺伝子を相同性組換えによって導入する形質転換をさらに含む、上記［１］又は［２］に記載の方法。

［４］ルビスコ遺伝子が、

－配列番号１で表される塩基配列を含む核酸；又は

－配列番号１で表される塩基配列を含む核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリブロース－１，５－ビスリン酸から３－ホスホグリセリン酸を生成する触媒活性を有するタンパク質をコードする核酸

を含み、

ルビスコ活性化因子遺伝子が、

－配列番号２で表される塩基配列を含む核酸；又は

－配列番号２で表される塩基配列を含む核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつルビスコを活性化する活性を有するタンパク質を

コードする核酸

を含み、及び

ホスホリブロキナーゼ遺伝子が、

－配列番号３で表される塩基配列を含む核酸；又は

－配列番号３で表される塩基配列を含む核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリブロース－５－リン酸からリブロース－１，５－ビスリン酸を生成する触媒活性を有するタンパク質をコードする核酸

を含む、上記［１］～［３］のいずれかに記載の方法。

［５］ＬｙｓＲタイプ転写制御因子遺伝子が、

－配列番号４で表される塩基配列を含む核酸；又は

－配列番号４で表される塩基配列を含む核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつルビスコ遺伝子の転写を制御する活性を有するタンパク質をコードする核酸

を含み、

３－ヒドロキシアシル－ＣｏＡ脱水素酸素スーパーファミリーに属する推定加水分解酵素遺伝子が、

－配列番号５で表される塩基配列を含む核酸；又は

－配列番号５で表される塩基配列を含む核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ加水分解活性を有するタンパク質をコードする核酸

を含み、

ペントース－５－リン酸－３－エピメラーゼ遺伝子が、

－配列番号６で表される塩基配列を含む核酸；又は

－配列番号６で表される塩基配列を含む核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつキシルロース－５－リン酸からリブロース－５－リン酸を生成する触媒活性を有するタンパク質をコードする核酸

を含み、及び

セドヘプツロース－１，７／フルクトース－１，６－ビスホスファターゼ

遺伝子が、

－配列番号７で表される塩基配列を含む核酸；又は

－配列番号７で表される塩基配列を含む核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつセドヘプツロース－１，７－ビスリン酸からセドヘプツロース－７－リン酸を生成する触媒活性、又はフルクトース－１，６－ビスリン酸からフルクトース－１，６－リン酸を生成する触媒活性を有するタンパク質をコードする核酸

を含む、上記［２］～［４］のいずれかに記載の方法。

［６］トランスケトラーゼ遺伝子が、

－配列番号８で表される塩基配列を含む核酸；又は

－配列番号８で表される塩基配列を含む核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつセドヘプツロース－７－リン酸からリボース－５－リン酸を生成する触媒活性を有するタンパク質をコードする核酸

を含み、

ホスホグリコール酸ホスファターゼ遺伝子が、

－配列番号９で表される塩基配列を含む核酸；又は

－配列番号９で表される塩基配列を含む核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ２－ホスホグリコール酸を脱リン酸化してグリコール酸を生成する触媒活性を有するタンパク質をコードする核酸

を含み、

グリセルアルデヒド－３－リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子が、

－配列番号１０で表される塩基配列を含む核酸；又は

－配列番号１０で表される塩基配列を含む核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ１，３－ビスホスホグリセリン酸からグリセルアルデヒド－３－リン酸を生成する触媒活性を有するタンパク質をコードする核酸

を含み、

３－ホスホグリセリン酸キナーゼ遺伝子が、

－配列番号１１で表される塩基配列を含む核酸；又は

－配列番号１１で表される塩基配列を含む核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ

３－ホスホグリセリン酸から１，３－ビスホスホグリセリン酸を生成する触媒活性

を有するタンパク質をコードする核酸

を含み、及び

セドヘプツロース－１，７／フルクトース－１，６－ビスリン酸アルドラーゼ遺伝子が、

－配列番号１２で表される塩基配列を含む核酸；又は

－配列番号１２で表される塩基配列を含む核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつエリトロース－４－リン酸とジヒドロキシアセトンリン酸からセドヘプツロース－１，７－ビスリン酸を生成する触媒活性、又はグリセルアルデヒド－３－リン酸とジヒドロキシアセトンリン酸からフルクトース－１，６－ビスリン酸を生成する触媒活性を有するタンパク質をコードする核酸

を含む、上記［３］～［５］のいずれかに記載の方法。

［７］ポリヒドロキシアルカン酸がポリ（３－ヒドロキシブタン酸）である、上記［１］～［６］のいずれかに記載の方法。

［８］微生物が大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）である、上記［１］～［７］のいずれかに記載の方法。

発明の効果

[0011] 微生物に炭酸固定経路を導入することによって、糖質を基本原料としてポリヒドロキシアルカン酸製造を効率化させる方法を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]Ｃ．ｎｅｃａｔｏｒ　Ｈ１６株の染色体２におけるｃｂｂオペロンの遺伝子配置を示す図である。ｃｂｂＲ：ＣｂｂＲ（ＬｙｓＲタイプ転写制御因子）；ｃｂｂＳ：リブロース－１，５－ビスリン酸カルボキシラーゼ／オキ

シゲナーゼ（「ルビスコ」）；ｃｂｂＸ：ＡＡＡ+タイプＲｕｂｉｓｃｏ活性化因子；ｃｂｂＹ：３－ヒドロキシアシル－ＣｏＡ脱水素酸素スーパーファミリーに属する推定加水分解酵素；ｃｂｂＥ：ペントース－５－リン酸－３－エピメラーゼ（ＰＰＥ）；ｃｂｂＦ：セドヘプツロース－１，７／フルクトース－１，６－ビスホスファターゼ（ＦＢＰ）；ｃｂｂＰ：ホスホリブロキナーゼ（ＰＲＫ）；ｃｂｂＴ：トランスケトラーゼ（ＴＫＴ）；ｃｂｂＺ：ホスホグリコール酸ホスファターゼ（ＰＧＰ）；ｃｂｂＧ：グリセルアルデヒド－３－リン酸デヒドロゲナーゼ（ＧＡＰ）；ｃｂｂＫ：３－ホスホグリセリン酸キナーゼ（ＰＧＫ）；ｃｂｂＡ：セドヘプツロース－１，７／フルクトース－１，６－ビスリン酸アルドラーゼ（ＦＢＡ）。

[図2]作製したプラスミドの概要を示す。

[図3]ｃｂｂオペロン及びＰ（３ＨＢ）生合成遺伝子を導入した組換え大腸菌における糖代謝経路を示す。Ｇ６Ｐ：グルコース－６－リン酸、Ｆ６Ｐ：フルクトース－６－リン酸、ＦＢＰ：フルクトース－１，６－ビスリン酸、ＧＡＰ：グリセルアルデヒド－３－リン酸、ＤＨＡＰ：ジヒドロキシアセトンリン酸、ＢＰＧ：１，３－ビスホスホグリセリン酸、３ＰＧ：３－ホスホグリセリン酸、２ＰＧ：２－ホスホグリセリン酸、ＰＥＰ：ホスホエノールピルビン酸、Ｐｙｒ：ピルビン酸、ＡｃＣｏＡ：アセチル－ＣｏＡ、６ＰＧＬ：６－ホスホグルコノ－１，５－ラクトン、６ＰＧＡ：６－ホスホグルコン酸、ＫＤＰＧ：６－ホスホ－２－デヒドロ－３－デオキシグルコン酸、Ｒｕ５Ｐ：リブロース－５－リン酸、ＲｕＢＰ：リブロース－１，５－ビスリン酸、Ｅ４Ｐ：エリトロース－４－リン酸、ＳＢＰ：セドヘプツロース－１，７－ビスリン酸、Ｓ７Ｐ：セドヘプツロース－７－リン酸、Ｘ５Ｐ：キシルロース－５－リン酸、Ｒ５Ｐ：リボース－５－リン酸。

発明を実施するための形態

[0013] 以下、本発明の説明のために、好ましい実施形態に関して詳述する。

（１）本発明の代謝改変戦略

上記の通り、本発明は物質生合成代謝の過程の脱炭酸により排出された炭

素をカルビン回路によって固定し再利用することで、バイオポリマーであるＰＨＡの収率を向上させるものである。具体的には以下の通りである。多くの微生物での主要な糖代謝経路であるエムデン－マイヤーホフ経路を経由するＰ（３ＨＢ）生合成は以下に示される。

グルコース＋２ＡＤＰ＋３ＮＡＤ$^{+}$→Ｐ（３ＨＢ）［モノマー］＋２CO_2＋２ＡＴＰ＋３ＮＡＤＨ

一方、カルビン回路により固定された炭素が、グリセルアルデヒド－３－Ｐを経由してＰ（３ＨＢ）に変換される代謝は以下に示される。

４CO_2＋１４ＡＴＰ＋９ＮＡＤ（Ｐ）Ｈ→Ｐ（３ＨＢ）［モノマー］＋１４ＡＤＰ＋９ＮＡＤ（Ｐ）$^{+}$

ここで、ＮＡＤＰＨとＮＡＤＨは等価とし、また好気的環境ではＮＡＤＨ１分子が２．５～３分子のＡＴＰに変換されることを考慮すると、グルコースからのＰ（３ＨＢ）生合成で生じた余剰のＡＴＰとＮＡＤ（Ｐ）Ｈを用いることで、脱炭酸反応で生じた２分子のCO_2のうち、約１分子が固定可能と推測される。例えば、Ｐ（３ＨＢ）生産能を有する組換え大腸菌にさらにカルビン回路を機能させることによって、１個のCO_2を固定し、これにより炭素収率が１２３％に増加することが期待される（図３参照）。さらにカルビン回路という糖代謝経路が新たに増えることによって、糖代謝そのものが強化される効果や、副産物の生成を抑制する効果も期待できる。

[0014] 本発明者らは、遺伝子組換え大腸菌、より具体的には、ポリ（３－ヒドロキシブタン酸）生産能を付与した組換え大腸菌株に、クプリアヴィダス・ネカトール（Ｃｕｐｒｉａｖｉｄｕｓ　ｎｅｃａｔｏｒ）Ｈ１６株（ＤＳＭ４２８）が有するカルビン回路酵素と関連タンパク質をコードする１３～１４遺伝子のうち、下記遺伝子：（ａ）ＬｙｓＲタイプ転写制御因子遺伝子、（ｂ）リブロース－１，５－ビスリン酸カルボキシラーゼ／オキシゲナーゼ（「ルビスコ」）遺伝子、（ｃ）ルビスコ活性化因子遺伝子、（ｄ）ホスホリブロキナーゼ遺伝子、（ｅ）３－ヒドロキシアシル－ＣｏＡ脱水素酸素スーパーファミリーに属する推定加水分解酵素遺伝子、（ｆ）ペントース－５－

リン酸－３－エピメラーゼ遺伝子、（ｇ）セドヘプツロース－１，７／フルクトース－１，６－ビスホスファターゼ遺伝子、（ｈ）トランスケトラーゼ遺伝子、（ｉ）ホスホグリコール酸ホスファターゼ遺伝子、（ｊ）グリセルアルデヒド－３－リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子、（ｋ）３－ホスホグリセリン酸キナーゼ遺伝子、及び（ｌ）セドヘプツロース－１，７／フルクトース－１，６－ビスリン酸アルドラーゼ遺伝子からなる群から選択した（ａ）～（ｇ）の遺伝子群又は（ａ）～（ｌ）の遺伝子群を組み込み、該大腸菌株に新たに炭酸固定経路を導入することによって、糖質を原料としてＰＨＡ製造の効率化に成功した（後述の実施例２参照）。

[0015] （２）宿主（微生物）

本発明のＰＨＡを製造する方法に使用される宿主（微生物）としては、限定されないが、ＰＨＡ生産能を有する微生物、及びＰＨＡ生産能を付与した組換え微生物が含まれる。より具体的には、ＰＨＡ生産能を有する微生物は、典型的には、Ｃｕｐｒｉａｖｉｄｕｓ（クプリアヴィダス）属、Ｒａｌｓｔｏｎｉａ（ラルストニア）属、Ａｌｃａｌｉｇｅｎｅｓ（アルカリゲネス）属、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ（シュードモナス）属等に属する微生物が挙げられる。また、ＰＨＡ生産能を付与した組換え微生物は、典型的には、大腸菌（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ）、Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ（コリネバクテリウム）属などのＰＨＡ生合成能を有さない微生物にＰＨＡ生合成遺伝子を導入することでＰＨＡ生合成能を付与した組換え株、あるいは野生株ではＰ（３ＨＢ）を生合成する微生物の改変によりＰ（３ＨＢ）以外のＰＨＡを生合成する能力を付与した微生物などが挙げられる。より典型には、市販の大腸菌（ＪＭ１０９など）にＣ．ｎｅｃａｔｏｒ由来のＰ（３ＨＢ）生合成遺伝子ｐｈａＣＡＢを挿入した多コピープラスミドの導入によってＰ（３ＨＢ）生合成能を付与した組換え大腸菌株が挙げられる。なお、「ポリヒドロキシアルカン酸」は、一般的に知られている用語であるが、限定されないが、例えば、グリコール酸、乳酸、２－ヒドロキシブタン酸、３－ヒドロキシブタン酸、４－ヒドロキシブタン酸、２－ヒドロキシ－３

－メチルブタン酸、２－ヒドロキシ－３，３－ジメチルブタン酸、３－ヒドロキシ－３－メチル－ブタン酸、３－ヒドロキシペンタン酸、４－ヒドロキシペンタン酸、５－ヒドロキシペンタン酸、３－ヒドロキシヘキサン酸、２－ヒドロキシカプロン酸、２－ヒドロキシイソカプロン酸、６－ヒドロキシカプロン酸、３－ヒドロキシプロピオン酸、３－ヒドロキシ－２，２－ジメチルプロピオン酸、３－ヒドロキシヘキサン酸などのヒドロキシアルカン酸をモノマーとする重合体であり、単一種のモノマーからなるホモポリマーと複数種のモノマーからなる共重合体が含まれる。

[0016] （３）宿主に組み込まれる遺伝子

上記の宿主（微生物）への炭酸固定経路を導入するための遺伝子は、糖質を基本原料としたポリヒドロキシアルカン酸の製造を効率化させるためのものであれば限定されない。一実施形態では、本発明に使用される遺伝子は、Ｃ．ｎｅｃａｔｏｒ　Ｈ１６株の染色体２（ゲノム配列：ＡＭ２６０４８０参照）とメガプラスミド（ゲノム配列：ＡＹ３０５３７８参照）に１コピーずつ存在する、カルビン回路酵素と関連タンパク質をコードする１３～１４遺伝子からなるｃｂｂオペロンを用いることができる（図１を参照されたい）。本発明によれば、該ｃｂｂオペロンのうち、最下流のｃｂｂＢ以外の１３遺伝子、すなわち、（ａ）ＬｙｓＲタイプ転写制御因子（ＣｂｂＲ）遺伝子（「ｃｂｂＲ」）、（ｂ）リブロース－１，５－ビスリン酸カルボキシラーゼ／オキシゲナーゼ（「ルビスコ」）遺伝子（「ｃｂｂＬＳ」）、（ｃ）ルビスコ活性化因子遺伝子（「ｃｂｂＸ」）、（ｄ）ホスホリブロキナーゼ遺伝子（「ｃｂｂＹ」）、（ｅ）３－ヒドロキシアシル－ＣｏＡ脱水素酸素スーパーファミリーに属する推定加水分解酵素遺伝子（「ｃｂｂＥ」）、（ｆ）ペントース－５－リン酸－３－エピメラーゼ遺伝子（「ｃｂｂＦ」）、（ｇ）セドヘプツロース－１，７／フルクトース－１，６－ビスホスファターゼ遺伝子（「ｃｂｂＰ」）、（ｈ）トランスケトラーゼ遺伝子（「ｃｂｂＴ」）、（ｉ）ホスホグリコール酸ホスファターゼ遺伝子（「ｃｂｂＺ」）、（ｊ）グリセルアルデヒド－３－リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子（「ｃｂ

ｂＧ」）、（ｋ）３－ホスホグリセリン酸キナーゼ遺伝子（「ｃｂｂＫ」）、及び（ｌ）セドヘプツロース－１，７／フルクトース－１，６－ビスリン酸アルドラーゼ遺伝子（「ｃｂｂＡ」）のうちの少なくとも１つを用いることができる。

[0017] 一態様において、好ましい遺伝子の組み合わせとしては、（ａ）～（ｄ）の遺伝子群が挙げられる。各遺伝子の機能については後述する通りであるが、組換え大腸菌において炭酸固定経路を導入し、所望の機能及び効果を発揮させる場合は、上記の４つの遺伝子の組み合わせは必須と考えられる。更なる態様としては、上記の４つの遺伝子に加えて、（ｅ）～（ｇ）の遺伝子群から少なくとも１つを選択した遺伝子を導入することが好ましい。より好ましくは（ａ）～（ｇ）の遺伝子群（ｃｂｂオペロンの前半）を導入する態様である。なお、後述するように、遺伝子（ｂ）によってコードされるタンパク質（すなわち、リブロース－１，５－ビスリン酸カルボキシラーゼ／オキシゲナーゼ（「ルビスコ」とも呼ばれる））は、Ｌサブユニット及びＳサブユニットから構成されるため、該遺伝子を２つとカウントしてもよい。

[0018] 別の態様において、遺伝子の組み合わせとしては、（ａ）～（ｄ）の遺伝子群に加えて、（ｅ）～（ｇ）の遺伝子群から少なくとも１つを選択した遺伝子を導入することができる。なお、遺伝子（ｈ）～（ｌ）は、ｃｂｂオペロンの後半に配置されている遺伝子群である。

[0019] 上記１２個の各遺伝子の具体的な塩基配列及び機能については、後述する通りであるが、塩基配列としては、例えば、Ｃ．ｎｅｃａｔｏｒ　Ｈ１６株の全塩基配列が決定されていることから、該株の染色体２のゲノム配列（ＡＭ２６０４８０）に記載された各遺伝子の塩基配列であってもよい。なお、本発明に使用される各遺伝子は、一本鎖又は二本鎖型ＤＮＡ、及びそのＲＮＡ相補体も含む。ＤＮＡには、例えば、天然由来のＤＮＡ、組換えＤＮＡ、化学合成したＤＮＡ、ＰＣＲによって増幅されたＤＮＡ、及びそれらの組み合わせが含まれる。本発明で使用される核酸としてはＤＮＡが好ましい。なお、周知の通り、コドンには縮重があり、１つのアミノ酸をコードする塩基

配列が複数存在するアミノ酸もあるが、上記遺伝子によってコードされた酵素等をコードする核酸の塩基配列、又はこのような酵素等と同程度に機能するものをコードする核酸の塩基配列であれば、いずれの塩基配列を有する核酸も本発明の範囲に含まれる。

[0020] 上記遺伝子の単離及び同定は、通常の分子生物学的手法により行うことができる。これらの遺伝子は、単独で又はいずれかと組み合わせて用いてもよく、例えば、前述の染色体２のゲノム配列を鋳型として増幅し、使用することができる。当業者であれば、各遺伝子を増幅するために使用可能なプライマーは、該ゲノム配列に基づいて適宜調製することができる。ここで、核酸を増幅するための手法としては、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）（Ｓａｉｋｉ，Ｒ．Ｋ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２３０：１３５０－１３５４（１９８５））、ライゲース連鎖反応（ＬＣＲ）（Ｗｕ，Ｄ．Ｙ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｇｅｎｏｍｉｃｓ，４：５６０－５６９（１９８９））、及び転写に基づく増幅（Ｋｗｏｈ，Ｄ．Ｙ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８６：１１７３－１１７７（１９８９））等の温度循環を必要とする反応、並びに鎖置換反応（ＳＤＡ）（Ｗａｌｋｅｒ，Ｇ．Ｔ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８９：３９２－３９６（１９９２）；Ｗａｌｋｅｒ，Ｇ．Ｔ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．，２０：１６９１－１６９６（１９９２））、自己保持配列複製（３ＳＲ）（Ｇｕａｔｅｌｌｉ，Ｊ．Ｃ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８７：１８７４－１８７８（１９９０））、及びＱβレプリカーゼシステム（Ｌｉｚａｒｄｉ，Ｐ．Ｍ．，ｅｔ　ａｌ．，ＢｉｏＴｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，６：１１９７－１２０２（１９８８））等の恒温反応を利用することができるが、これらに限定されない。本発明の生産法においては、ＰＣＲ法を使用することが好ましい。

[0021] 本発明に使用される各遺伝子は、典型的には、それぞれ、配列表に記載した配列番号１～１２で示される塩基配列であるが、各遺伝子の機能が保持さ

れる限りにおいて、各配列番号によって特定される塩基配列を含む核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズして得られる核酸を含む又は該核酸からなるものであってもよい。ここで、本明細書において、「ストリンジェントな条件下」とは、中程度又は高程度なストリンジェントな条件においてハイブリダイズすることを意味する。具体的には、中程度のストリンジェントな条件は、例えば、ＤＮＡの長さに基づき、一般の技術を有する当業者によって、容易に決定することが可能である。基本的な条件は、Ｓａｍｂｒｏｏｋ，Ｊ．ら、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ，Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ（３ｒｄ　ｅｄｉｔｉｏｎ），Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，７．４２－７．４５（２００１）に示されるが、ニトロセルロースフィルターに関し、５×ＳＳＣ、０．５％　ＳＤＳ、１．０ｍＭ　ＥＤＴＡ（ｐＨ８．０）の前洗浄溶液、約４０～５０℃での、約５０％ホルムアミド、２×ＳＳＣ～６×ＳＳＣ（又は約４２℃での約５０％ホルムアミド中の、スターク溶液（Ｓｔａｒｋ’ｓ　ｓｏｌｕｔｉｏｎ）などの他の同様のハイブリダイゼーション溶液）のハイブリダイゼーション条件、及び約６０℃、０．５×ＳＳＣ、０．１％　ＳＤＳの洗浄条件の使用が含まれる。高ストリンジェントな条件もまた、例えばＤＮＡの長さに基づき、当業者によって、容易に決定することが可能である。一般的に、こうした条件は、中程度にストリンジェントな条件よりも高い温度及び／又は低い塩濃度でのハイブリダイゼーション及び／又は洗浄を含み、例えば上記のようなハイブリダイゼーション条件、及び約６８℃、０．２×ＳＳＣ、０．１％　ＳＤＳの洗浄を伴うと定義される。当業者は、温度及び洗浄溶液塩濃度は、プローブの長さ等の要因に従って、必要に応じて調整可能であることを認識するであろう。

[0022] 上記のような核酸増幅反応又はハイブリダイゼーション等を使用してクローニングされる相同な核酸は、配列番号１～１２にそれぞれ記載の塩基配列に対して、それぞれ、少なくとも３０％以上、好ましくは５０％以上、より好ましくは７０％以上、さらにより好ましくは９０％以上、さらになお好ま

しくは９５％以上、最も好ましくは９８％以上の同一性を有する。なお、同一性パーセントは、視覚的検査及び数学的計算によって決定することが可能である。あるいは、２つの核酸配列の同一性パーセントは、Ｄｅｖｅｒｅｕｘ，Ｊ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．，１２：３８７（１９８４）に記載され、そしてウィスコンシン大学遺伝学コンピューターグループ（ＵＷＧＣＧ）より入手可能なＧＡＰコンピュータープログラム（ＧＣＧ　Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ　Ｐａｃｋａｇｅ、バージョン１０．３）を用いて、配列情報を比較することによって決定することができる。

[0023] （４）各遺伝子の特徴付け

（ａ）リブロース－１，５－ビスリン酸カルボキシラーゼ／オキシゲナーゼ遺伝子（「ｃｂｂＬＳ」又は「Ｌ及びＳ」）

本遺伝子によってコードされた「リブロース－１，５－ビスリン酸カルボキシラーゼ／オキシゲナーゼ」（「ルビスコ」）とは、リブロース－１，５－ビスリン酸とCO_2から３－ホスホグリセリン酸２分子を生成する触媒活性を有する酵素である。該酵素は、Ｌ（ラージ）サブユニット（約５４ｋＤａ）８個とＳ（スモール）サブユニット（約１６ｋＤａ）８個のヘテロ１６量体を構成している。本発明によれば、該活性を有する限り、それをコードするｃｂｂＬＳ遺伝子の生物種は特に限定されない。生物種によってはＳサブユニットがなくＬサブユニットのみからなるホモ８量体～１０量体を構成するが、本発明によれば、該活性を有する限り、Ｓサブユニットの有無や多量体構造には特に限定されない。一実施形態において、本発明に使用されるｃｂｂＬＳ遺伝子として、例えば、上記Ｃ．ｎｅｃａｔｏｒ　Ｈ１６株の染色体２のゲノム配列を利用することができ、該ゲノム中のヌクレオチド１５６０９８６－１５６２９２３からなる塩基配列（配列番号１）を用いてもよい。なお、Ｌサブユニットをコードする塩基配列は、上記ヌクレオチドのうち１５６１４６３－１５６２９２３に位置し、Ｓサブユニットをコードする塩基配列は、上記ヌクレオチドのうち１５６０９８６－１５６１４０５に位置する。

[0024] ｃｂｂＬＳの単離及び同定は、通常の分子生物学的手法により行うことができる。具体的には、ｃｂｂＬＳ遺伝子は、例えば、上記配列番号１の塩基配列に基づいてプライマーとして合成ヌクレオチドを設計し、ゲノムＤＮＡを鋳型として増幅することができる。ＰＣＲ産物として約１．５ｋｂｐのＤＮＡ断片が得られるので、例えば、これらをアガロースゲル電気泳動等の分子量によりＤＮＡ断片を篩い分ける方法で分離し、特定のバンドを切り出す方法等の常法に従って核酸を単離することができる。

[0025] （ｂ）ルビスコ活性化因子遺伝子（「ｃｂｂＸ」又は「Ｘ」）

本遺伝子によってコードされた「ルビスコ活性化因子」（又は「ＡＡＡ＋タイプＲｕｂｉｓｃｏ活性化因子」）とは、ルビスコを活性化する活性を有するタンパク質である。本発明によれば、該活性を有する限り、それをコードするｃｂｂＸ遺伝子の生物種は特に限定されない。一実施形態において、本発明に使用されるｃｂｂＸ遺伝子として、例えば、上記Ｃ．ｎｅｃａｔｏｒ　Ｈ１６株の染色体２のゲノム配列を利用することができ、該ゲノム中のヌクレオチド１５５９８７０－１５６０８２３からなる塩基配列（配列番号２）を用いてもよい。ｃｂｂＸの単離及び同定は、通常の分子生物学的手法により行うことができる。具体的には、ｃｂｂＸ遺伝子は、例えば、上記配列番号２の塩基配列に基づいてプライマーとして合成ヌクレオチドを設計し、ゲノムＤＮＡを鋳型として増幅することができる。ＰＣＲ産物として約９６０ｂｐのＤＮＡ断片が得られるので、例えば、これらをアガロースゲル電気泳動等の分子量によりＤＮＡ断片を篩い分ける方法で分離し、特定のバンドを切り出す方法等の常法に従って核酸を単離することができる。

[0026] （ｃ）ホスホリブロキナーゼ遺伝子（「ｃｂｂＰ」又は「Ｐ」）

本遺伝子によってコードされた「ホスホリブロキナーゼ」（又は「ＰＲＫ」）とは、リブロース－５－リン酸からリブロース－１，５－ビスリン酸を生成する触媒活性を有する酵素である。本発明によれば、該活性を有する限り、それをコードするｃｂｂＰ遺伝子の生物種は特に限定されない。一実施形態において、本発明に使用されるｃｂｂＰ遺伝子として、例えば、上記Ｃ

．ｎｅｃａｔｏｒ　Ｈ１６株の染色体２のゲノム配列を利用することができ、該ゲノム中のヌクレオチド１５５６３３４－１５５７２１２からなる塩基配列（配列番号３）を用いてもよい。ｃｂｂＰの単離及び同定は、通常の分子生物学的手法により行うことができる。具体的には、ｃｂｂＰ遺伝子は、例えば、上記配列番号３の塩基配列に基づいてプライマーとして合成ヌクレオチドを設計し、ゲノムＤＮＡを鋳型として増幅することができる。ＰＣＲ産物として約８８０ｂｐのＤＮＡ断片が得られるので、例えば、これらをアガロースゲル電気泳動等の分子量によりＤＮＡ断片を篩い分ける方法で分離し、特定のバンドを切り出す方法等の常法に従って核酸を単離することができる。

[0027] （ｄ）ＬｙｓＲタイプ転写制御因子遺伝子（「ｃｂｂＲ」又は「Ｒ」）

本遺伝子によってコードされた「ＬｙｓＲタイプ転写制御因子」（「ＣｂｂＲ」）とは、ルビスコ遺伝子の転写を制御する活性を有するタンパク質である。本発明によれば、該活性を有する限り、それをコードするｃｂｂＲ遺伝子の生物種は特に限定されない。一実施形態において、本発明に使用されるｃｂｂＲ遺伝子として、例えば、Ｃ．ｎｅｃａｔｏｒ　Ｈ１６株の染色体２のゲノム配列（ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＡＭ２６０４８０）を利用することができ、該ゲノム中のヌクレオチド１９３８６２７－１９３９５６８からなる塩基配列（配列番号４）を用いてもよい。ｃｂｂＲの単離及び同定は、通常の分子生物学的手法により行うことができる。具体的には、ｃｂｂＲ遺伝子は、例えば、上記配列番号４の塩基配列に基づいてプライマーとして合成ヌクレオチドを設計し、ゲノムＤＮＡを鋳型として増幅することができる。ＰＣＲ産物として約９４０ｂｐのＤＮＡ断片が得られるので、例えば、これらをアガロースゲル電気泳動等の分子量によりＤＮＡ断片を篩い分ける方法で分離し、特定のバンドを切り出す方法等の常法に従って核酸を単離することができる。

[0028] （ｅ）３－ヒドロキシアシル－ＣｏＡ脱水素酸素スーパーファミリーに属する推定加水分解酵素遺伝子（「ｃｂｂＹ」又は「Ｙ」）

本遺伝子によってコードされた「３－ヒドロキシアシル－ＣｏＡ脱水素酸素スーパーファミリーに属する推定加水分解酵素」とは、現時点において正確な機能は特定されていないが、ある種の加水分解活性を有する酵素であると推定されている。本発明によれば、ｃｂｂＹ発現産物と同等の機能を有する限り、それをコードするｃｂｂＹ遺伝子の生物種は特に限定されない。一実施形態において、本発明に使用されるｃｂｂＹ遺伝子として、例えば、上記Ｃ．ｎｅｃａｔｏｒ　Ｈ１６株の染色体２のゲノム配列を利用することができ、該ゲノム中のヌクレオチド１５５９１０２－１５５９８６６からなる塩基配列（配列番号５）を用いてもよい。ｃｂｂＹの単離及び同定は、通常の分子生物学的手法により行うことができる。具体的には、ｃｂｂＹ遺伝子は、例えば、上記配列番号５の塩基配列に基づいてプライマーとして合成ヌクレオチドを設計し、ゲノムＤＮＡを鋳型として増幅することができる。ＰＣＲ産物として約７６０ｂｐのＤＮＡ断片が得られるので、例えば、これらをアガロースゲル電気泳動等の分子量によりＤＮＡ断片を篩い分ける方法で分離し、特定のバンドを切り出す方法等の常法に従って核酸を単離することができる。

[0029] （ｆ）ペントース－５－リン酸－３－エピメラーゼ遺伝子（「ｃｂｂＥ」又は「Ｅ」）

本遺伝子によってコードされた「ペントース－５－リン酸－３－エピメラーゼ」（又は「ＰＰＥ」）とは、キシルロース－５－リン酸からリブロース－５－リン酸を生成する触媒活性を有する酵素である。本発明によれば、該活性を有する限り、それをコードするｃｂｂＥ遺伝子の生物種は特に限定されない。一実施形態において、本発明に使用されるｃｂｂＥ遺伝子として、例えば、上記Ｃ．ｎｅｃａｔｏｒ　Ｈ１６株の染色体２のゲノム配列を利用することができ、該ゲノム中のヌクレオチド１５５８３７５－１５５９１００からなる塩基配列（配列番号６）を用いてもよい。ｃｂｂＥの単離及び同定は、通常の分子生物学的手法により行うことができる。具体的には、ｃｂｂＥ遺伝子は、例えば、上記配列番号６の塩基配列に基づいてプライマーと

して合成ヌクレオチドを設計し、ゲノムＤＮＡを鋳型として増幅することができる。ＰＣＲ産物として約７３０ｂｐのＤＮＡ断片が得られるので、例えば、これらをアガロースゲル電気泳動等の分子量によりＤＮＡ断片を篩い分ける方法で分離し、特定のバンドを切り出す方法等の常法に従って核酸を単離することができる。

[0030] （ｇ）セドヘプツロース－１，７／フルクトース－１，６－ビスホスファターゼ遺伝子（「ｃｂｂＦ」又は「Ｆ」）

本遺伝子によってコードされた「セドヘプツロース－１，７／フルクトース－１，６－ビスホスファターゼ」（又は「ＦＢＰ」）とは、セドヘプツロース－１，７－ビスリン酸からセドヘプツロース－７－リン酸を生成する触媒活性、又はフルクトース－１，６－ビスリン酸からフルクトース－１，６－リン酸を生成する触媒活性を有する酵素である。本発明によれば、該活性を有する限り、それをコードするｃｂｂＦ遺伝子の生物種は特に限定されない。一実施形態において、本発明に使用されるｃｂｂＦ遺伝子として、例えば、上記Ｃ．ｎｅｃａｔｏｒ　Ｈ１６株の染色体２のゲノム配列を利用することができ、該ゲノム中のヌクレオチド１５５７２２４－１５５８３１８からなる塩基配列（配列番号７）を用いてもよい。ｃｂｂＦの単離及び同定は、通常の分子生物学的手法により行うことができる。具体的には、ｃｂｂＦ遺伝子は、例えば、上記配列番号７の塩基配列に基づいてプライマーとして合成ヌクレオチドを設計し、ゲノムＤＮＡを鋳型として増幅することができる。ＰＣＲ産物として約１．１ｋｂｐのＤＮＡ断片が得られるので、例えば、これらをアガロースゲル電気泳動等の分子量によりＤＮＡ断片を篩い分ける方法で分離し、特定のバンドを切り出す方法等の常法に従って核酸を単離することができる。

[0031] （ｈ）トランスケトラーゼ遺伝子（「ｃｂｂＴ」又は「Ｔ」）

本遺伝子によってコードされた「トランスケトラーゼ」（又は「ＴＫＴ」）とは、セドヘプツロース－７－リン酸からリボース－５－リン酸を生成する触媒活性を有する酵素である。本発明によれば、該活性を有する限り、そ

れをコードするｃｂｂＴ遺伝子の生物種は特に限定されない。一実施形態において、本発明に使用されるｃｂｂＴ遺伝子として、例えば、上記Ｃ．ｎｅｃａｔｏｒ　Ｈ１６株の染色体２のゲノム配列を利用することができ、該ゲノム中のヌクレオチド１５５４２８１－１５５６２９３からなる塩基配列（配列番号８）を用いてもよい。ｃｂｂＴの単離及び同定は、通常の分子生物学的手法により行うことができる。具体的には、ｃｂｂＴ遺伝子は、例えば、上記配列番号８の塩基配列に基づいてプライマーとして合成ヌクレオチドを設計し、ゲノムＤＮＡを鋳型として増幅することができる。ＰＣＲ産物として約２．０ｋｂｐのＤＮＡ断片が得られるので、例えば、これらをアガロースゲル電気泳動等の分子量によりＤＮＡ断片を篩い分ける方法で分離し、特定のバンドを切り出す方法等の常法に従って核酸を単離することができる。

[0032] （ｉ）ホスホグリコール酸ホスファターゼ遺伝子（「ｃｂｂＺ」又は「Ｚ」）

本遺伝子によってコードされた「ホスホグリコール酸ホスファターゼ」（又は「ＰＧＰ」）とは、２－ホスホグリコール酸を脱リン酸化してグリコール酸を生成する触媒活性を有する酵素である。本発明によれば、該活性を有する限り、それをコードするｃｂｂＺ遺伝子の生物種は特に限定されない。一実施形態において、本発明に使用されるｃｂｂＺ遺伝子として、例えば、上記Ｃ．ｎｅｃａｔｏｒ　Ｈ１６株の染色体２のゲノム配列を利用することができ、該ゲノム中のヌクレオチド１５５３５８６－１５５４２８１からなる塩基配列（配列番号９）を用いてもよい。ｃｂｂＺの単離及び同定は、通常の分子生物学的手法により行うことができる。具体的には、ｃｂｂＺ遺伝子は、例えば、上記配列番号９の塩基配列に基づいてプライマーとして合成ヌクレオチドを設計し、ゲノムＤＮＡを鋳型として増幅することができる。ＰＣＲ産物として約７００ｂｐのＤＮＡ断片が得られるので、例えば、これらをアガロースゲル電気泳動等の分子量によりＤＮＡ断片を篩い分ける方法で分離し、特定のバンドを切り出す方法等の常法に従って核酸を単離するこ

とができる。

[0033] （ｊ）グリセルアルデヒド－３－リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子（「ｃｂｂＧ」又は「Ｇ」）

本遺伝子によってコードされた「グリセルアルデヒド－３－リン酸デヒドロゲナーゼ」（又は「ＧＡＰ」）とは、１，３－ビスホスホグリセリン酸からグリセルアルデヒド－３－リン酸を生成する触媒活性を有する酵素である。本発明によれば、該活性を有する限り、それをコードするｃｂｂＧ遺伝子の生物種は特に限定されない。一実施形態において、本発明に使用されるｃｂｂＧ遺伝子として、例えば、上記Ｃ．ｎｅｃａｔｏｒ　Ｈ１６株の染色体２のゲノム配列を利用することができ、該ゲノム中のヌクレオチド１５５２５１６－１５５３５２６からなる塩基配列（配列番号１０）を用いてもよい。ｃｂｂＧの単離及び同定は、通常の分子生物学的手法により行うことができる。具体的には、ｃｂｂＧ遺伝子は、例えば、上記配列番号１０の塩基配列に基づいてプライマーとして合成ヌクレオチドを設計し、ゲノムＤＮＡを鋳型として増幅することができる。ＰＣＲ産物として約１．０ｋｂｐのＤＮＡ断片が得られるので、例えば、これらをアガロースゲル電気泳動等の分子量によりＤＮＡ断片を篩い分ける方法で分離し、特定のバンドを切り出す方法等の常法に従って核酸を単離することができる。

[0034] （ｋ）３－ホスホグリセリン酸キナーゼ遺伝子（「ｃｂｂＫ」又は「Ｋ」）

本遺伝子によってコードされた「３－ホスホグリセリン酸キナーゼ」（又は「ＰＧＫ」）とは、３－ホスホグリセリン酸から１，３－ビスホスホグリセリン酸を生成する触媒活性を有する酵素である。本発明によれば、該活性を有する限り、それをコードするｃｂｂＫ遺伝子の生物種は特に限定されない。一実施形態において、本発明に使用されるｃｂｂＫ遺伝子として、例えば、上記Ｃ．ｎｅｃａｔｏｒ　Ｈ１６株の染色体２のゲノム配列を利用することができ、該ゲノム中のヌクレオチド１５５１２６５－１５５２５０６からなる塩基配列（配列番号１１）を用いてもよい。ｃｂｂＫの単離及び同定は、通常の分子生物学的手法により行うことができる。具体的には、ｃｂｂ

Ｋ遺伝子は、例えば、上記配列番号１１の塩基配列に基づいてプライマーとして合成ヌクレオチドを設計し、ゲノムＤＮＡを鋳型として増幅することができる。ＰＣＲ産物として約１．２ｋｂｐのＤＮＡ断片が得られるので、例えば、これらをアガロースゲル電気泳動等の分子量によりＤＮＡ断片を篩い分ける方法で分離し、特定のバンドを切り出す方法等の常法に従って核酸を単離することができる。

[0035] （ｌ）セドヘプツロース－１，７／フルクトース－１，６－ビスリン酸アルドラーゼ遺伝子（「ｃｂｂＡ」又は「Ａ」）

本遺伝子によってコードされた「セドヘプツロース－１，７／フルクトース－１，６－ビスリン酸アルドラーゼ」（又は「ＦＢＡ」）とは、３－ホスホグリセリン酸からエリトロース－４－リン酸とジヒドロキシアセトンリン酸からセドヘプツロース－１，７－ビスリン酸を生成する触媒活性、又はグリセルアルデヒド－３－リン酸とジヒドロキシアセトンリン酸からフルクトース－１，６－ビスリン酸を生成する触媒活性を有する酵素である。本発明によれば、該活性を有する限り、それをコードするｃｂｂＡ遺伝子の生物種は特に限定されない。一実施形態において、本発明に使用されるｃｂｂＡ遺伝子として、例えば、上記Ｃ．ｎｅｃａｔｏｒ　Ｈ１６株の染色体２のゲノム配列を利用することができ、該ゲノム中のヌクレオチド１５５０１８５－１５５１２２２からなる塩基配列（配列番号１２）を用いてもよい。ｃｂｂＡの単離及び同定は、通常の分子生物学的手法により行うことができる。具体的には、ｃｂｂＡ遺伝子は、例えば、上記配列番号１２の塩基配列に基づいてプライマーとして合成ヌクレオチドを設計し、ゲノムＤＮＡを鋳型として増幅することができる。ＰＣＲ産物として約１．０ｋｂｐのＤＮＡ断片が得られるので、例えば、これらをアガロースゲル電気泳動等の分子量によりＤＮＡ断片を篩い分ける方法で分離し、特定のバンドを切り出す方法等の常法に従って核酸を単離することができる。

[0036] （５）発現ベクター（又はプラスミドベクター）

上記の各遺伝子をコードするＤＮＡを適切な発現ベクター（又はプラスミ

ドベクター）中に組み込み、これを上述した宿主（微生物）に導入して、宿主内で発現させることにより所望の酵素又は転写制御因子若しくは活性化因子を得ることができる。

ベクターとは、細胞にトランスフェクトすることができ、細胞ゲノムとは独立して又は細胞ゲノム中で複製し得る一本鎖又は二本鎖の核酸分子を表す。発現ベクターは、ＤＮＡの発現を駆動するプロモーター領域を含み、さらに転写及び翻訳の制御配列、例えばＴＡＴＡボックス、キャッピング配列、ＣＡＡＴ配列、３’非コード領域、エンハンサー等を含んでいてもよい。プロモーターの例としては、原核生物宿主中で用いる場合には、ｂｌａプロモーター、ｃａｔプロモーター、ｌａｃＺプロモーター、真核生物宿主中で用いる場合には、マウスメタロチオネインＩ遺伝子配列のプロモーター、ヘルペスウイルスのＴＫプロモーター、ＳＶ４０初期プロモーター、酵母解糖系酵素遺伝子配列プロモーター等が挙げられる。ベクターの例には、限定されないが、ｐＢＲ３２２、ｐＵＣ１１８、ｐＵＣ１１９、ｐＳＣ１０１、ｐＡＣＹＣ１８４、λｇｔＩ０、λｇｔ１１、ｐＭＡＭ－ｎｅｏ、ｐＫＲＣ、ＢＰＶ、ワクチニア、ＳＶ４０、２－ミクロン等が含まれる。

[0037] 発現ベクターは、これを含有する宿主細胞を選択することができるように、１又はそれ以上のマーカーを有することが好ましい。マーカーとしては、栄養要求性宿主に対する栄養、抗生物質耐性（例えば、ゲンタマイシン、アンピシリン、テトラサイクリン、ネオマイシン、ハイグロマイシン、ゼオシン等）、又は重金属耐性（例えば銅）を与えるものを用いることができる。さらに、シグナル配列を用いて本発明のタンパク質を分泌発現させるように、あるいは、本発明のタンパク質を別のタンパク質との融合タンパク質の形で発現させるように、ベクターを構築することができる。融合タンパク質を用いることにより、タンパク質の安定性を改良し、又は精製を容易にすることができる。そのような発現ベクターの構築は当該技術分野においてよく知られている。

[0038] （６）発現ベクターの構築及び組換え微生物の作製

本発明によれば、本発明の方法に使用され得る前述の各遺伝子の各々若しくはいずれかの組み合わせを自律複製ベクター又は相同性組換え用ベクターに組み込んだ発現ベクターが提供される。ここで、ベクターに遺伝子を組み込む方法としては、例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ，Ｊ．ら，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ，Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ（３ｒｄ ｅｄｉｔｉｏｎ），Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，１．１（２００１）に記載の方法などが挙げられる。簡便には、市販のライゲーションキット（例えば、トーヨーボー社製等）を用いることもできる。

[0039] 一般的に、組換え微生物（形質転換体）は、発現ベクターを宿主細胞に組み込むことによって作製することができる。この場合、上述した通り、宿主細胞として原核細胞（例えば、大腸菌（ＪＭ１０９等）、枯草菌）であっても真核細胞（哺乳類細胞、酵母、昆虫細胞等）であっても使用することができる。発現ベクターの宿主細胞への導入（形質転換）は公知の方法を用いて行うことができる。例えば、細菌（大腸菌、Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｕｂｔｉｌｉｓ等）の場合は、例えばＣｏｈｅｎらの方法（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，６９：２１１０（１９７２））、プロトプラスト法（Ｍｏｌ．Ｇｅｎ．Ｇｅｎｅｔ．，１６８：１１１（１９７９））やコンピテント法（Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，５６：２０９（１９７１））、塩化カルシウム法、エレクトロポレーション法等が挙げられる。また、Ｃｕｐｒｉａｖｉｄｕｓ（クプリアヴィダス）属、Ｒａｌｓｔｏｎｉａ（ラルストニア）属、Ａｌｃａｌｉｇｅｎｅｓ（アルカリゲネス）属、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ（シュードモナス）属等に属する菌体への発現ベクターの導入では、接合伝達法を使用することができる（Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．，１４７：１９８（１９８１））。

[0040] （７）組換え微生物によるＰＨＡ製造の効率化

本発明によれば、典型例として、Ｐ（３ＨＢ）の合成は、例えば、Ｐ（３ＨＢ）生産能を付与した組換え大腸菌内にカルビン回路酵素と関連タンパク

質をコードする遺伝子（例えば、上述した遺伝子（ａ）～（ｌ））を導入することによって、該組換え微生物（例えば、大腸菌）内又は培養物（例えば、培地）中にＰ（３ＨＢ）を生成及び蓄積させ、組換え微生物又は培養物から目的とする該Ｐ（３ＨＢ）を採取することにより行われる。なお、当業者にも理解されるように、該Ｐ（３ＨＢ）を合成させるために、上記組換え微生物を適切な培養条件下に置くことが好ましい。このような組換え微生物の培養、遺伝子組換えを行う前の親株の培養条件に従ってもよい。また、本発明の特定の一実施形態において、炭素源として糖質を含有する培地中で組換え株を増殖させてもよい。

[0041] 一例として、組換え大腸菌を宿主とした場合の培地として、該大腸菌が資化し得る糖質を添加し、窒素源、無機塩類、その他の有機栄養源のいずれかを制限したＬＢ培地が挙げられる。典型的には、培地温度を２５℃～３７℃の範囲にし、好気的に１～１０日培養することにより、ＰＨＡを菌体内に生成し蓄積させ、その後、回収・精製することによって所望のＰＨＡを生産することができる。また、糖質を炭素源として用いる場合、使用可能な糖質としては、一般的に市販されている糖質を使用することができ、その供給源は特に限定されない。「糖質」とは、アルデヒド基又はケトン基を持つ多価アルコールであって、単糖、少糖（オリゴ糖）、多糖、糖の誘導体を意味する。具体的には、単糖では、グルコース、ガラクトース、マンノース、グルコサミン、Ｎ－アセチルグルコサミン、フルクトースなどが挙げられる。二糖では、マルトース、イソマルトース、ラクトース、ラクトサミン、Ｎ－アセチルラクトサミン、セロビオース、メリビオースなどが挙げられる。オリゴ糖としては、グルコース、ガラクトース、マンノース、グルコサミン、Ｎ－アセチルグルコサミン、フルクトースなどから構成されるホモオリゴマー、あるいは、グルコース、ガラクトース、マンノース、グルコサミン、Ｎ－アセチルグルコサミン、フルクトース、シアル酸などの２成分以上より構成されるヘテロオリゴマーが挙げられ、例えば、マルトオリゴ糖、イソマルトオリゴ糖、ラクトオリゴ糖、ラクトサミンオリゴ糖、Ｎ－アセチルラクトサミ

ンオリゴ糖、セロオリゴ糖、メリビオオリゴ糖などが挙げられる。多糖としては、動物、植物（海藻を含む）、昆虫、微生物など広範囲な生物で見いだされているものが挙げられ、例えば、Ｎ結合型糖鎖、Ｏ結合型糖鎖、グリコサミノグリカン、澱粉、アミロース、アミロペクチン、セルロース、キチン、グリコーゲン、アガロース、アルギン酸、ヒアルロン酸、イヌリン、グルコマンナンなどが挙げられる。糖の誘導体としては、デオキシリボース（$C_5H_{10}O_4$）、硫酸化多糖類などが挙げられる。グリセリンは上記の定義によれば糖ではないが、その細胞内での代謝はグルコース代謝に合流するため、糖質と同等とみなすことができる。なお、培地中の糖質の濃度は、０．１～５％が好ましいが、当業者であれば適宜調整することができる。

[0042] また、必要であれば、培地中に窒素源や無機物を添加してもよい。窒素源としては、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の他、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスティープリカー等が挙げられる。無機物としては、例えばリン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、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。

[0043] 培養は、通常、振とう培養が用いられ、好気的条件下で、２５℃～３７℃で遺伝子発現誘導後少なくとも１日以上行うことが好ましい。抗生物質として、ゲンタマイシン、カナマイシン、アンピシリン等を培地に添加してもよい。また、必要であれば、遺伝子発現誘導剤として、アラビノース、インドールアクリル酸（ＩＡＡ）、イソプロピル－β－Ｄ－チオガラクトピラノシド（ＩＰＴＧ）等を使用することができる。当業者であれば、所望の遺伝子発現のために可能な培養条件、遺伝子発現の誘導条件等を適宜選択できる。

[0044] 本発明によれば、上記の通り、Ｐ（３ＨＢ）生産能を付与した組換え大腸菌内にカルビン回路酵素と関連タンパク質をコードする遺伝子（例えば、上述した遺伝子（ａ）～（ｌ））を導入することによって、Ｐ（３ＨＢ）製造の効率化を図ることができる。ここで、「効率化」とは、通常の意味で使用される用語であり、本発明との関連では、例えば、「無駄を省く」などが意

図される。より具体的には、微生物の物質生合成代謝の過程での脱炭酸により排出された炭素をカルビン回路によって固定し、これを再利用すること、および／または副産物の生成を抑制することで、結果として、ポリヒドロキシアルカン酸（ＰＨＡ）の収率を高めることを意味する。本明細書において、効率化が図れたというときは、ＰＨＡ生産量は、対照（例えば、原料由来炭素がCO_2や副産物として無駄に排出され利用されていない場合など）と比較して、約１．１倍、約１．２倍、約１．３倍、約１．４倍、約１．５倍、約１．６倍、約１．７倍、約１．８倍、約１．９倍、約２倍、約３倍、約４倍、約５倍になる又はそれらを超えている。

実施例

[0045] 以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。なお、以下の実施例において、ＰＣＲは基本的にＫＯＤ　Ｐｌｕｓ　ＤＮＡポリメラーゼ（トーヨーボー社製）を用い、９８℃で２０秒、６０℃で２０秒、６８℃で２分３０秒の反応を１サイクルとしてこれを３０サイクル行い、必要に応じて温度条件を適宜、調節した。DNA断片の５’－末端をリン酸化にはT4ポリヌクレオチドキナーゼ（トーヨーボー社製）を用いた。

[0046] 実施例１：大腸菌Ｐ（３ＨＢ）生産株へのカルビン回路の導入

（１）ｐＮＷ２１８Ｇｍの構築

ｐＳＣ１０１複製起点を有する大腸菌用低コピープラスミドｐＭＷ２１８（ＧｅｎＢａｎｋ　ＡＢ００５４７７）のカナマシン耐性遺伝子をゲンタマイシン耐性遺伝子に置き換えることにより、ｐＭＷ２１８Ｇｍを作製した。まず、プラスミドｐＪＱ２００（Ｑｕａｎｄｔ　Ｊ．，Ｈｙｎｅｓ　Ｍ．Ｆ．；“Ｖｅｒｓａｔｉｌｅ　ｓｕｉｃｉｄｅ　ｖｅｃｔｏｒｓ　ｗｈｉｃｈ　ａｌｌｏｗ　ｄｉｒｅｃｔ　ｓｅｌｅｃｔｉｏｎ　ｆｏｒ　ｇｅｎｅ　ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ　ｉｎ　ｇｒａｍ－ｎｅｇａｔｉｖｅ　ｂａｃｔｅｒｉａ”；Ｇｅｎｅ　１２７：１５－２１（１９９３））を鋳型、下記の配列１と配列２のオリゴヌクレオチドをプライマーとしたＰＣＲ法によって、ゲ

ンタマイシン耐性遺伝子を増幅した。増幅した断片の５’－末端をリン酸化した。

配列１：ＴＧＣＣＧＧＧＴＧＡＣＧＣＡＣＡＣＣＧＴ（配列番号１３）

配列２：ＧＣＡＴＡＣＣＧＧＴＡＣＡＡＧＧＡＣＡＡＴＴＡＡＣＡＧＴＴ（配列番号１４）

次に、ｐＭＷ２１８を鋳型、下記の配列３と配列４のオリゴヌクレオチドをプライマーとしたインバースＰＣＲ法によって、カナマイシン耐性遺伝子を除くプラスミド骨格を増幅した。

配列３：ＣＴＡＣＣＧＣＡＴＴＡＡＡＧＣＡＴＡＴＣ（配列番号１５）

配列４：ＧＣＡＣＡＣＡＧＣＣＣＡＧＣＴＴＧＧＡＧＣＧ（配列番号１６）

５’－末端をリン酸化したゲンタマイシン耐性遺伝子断片と、ｐＭＷ２１８のプラスミド骨格をＬｉｇａｔｉｏｎ　Ｈｉｇｈ　ｖｅｒ．２（トーヨーボー社製）を用いて連結し、大腸菌ＤＨ５α株を形質転換した。ゲンタマイシン耐性遺伝子がｐＭＷ２１８におけるカナマイシン耐性遺伝子と同じ方向に連結されたクローンを選抜し、ｐＭＷ２１８Ｇｍを得た。

[0047] （２）ｐＣｂｂの構築

Ｃ．ｎｅｃａｔｏｒ野生株であるＨ１６株のゲノムＤＮＡを鋳型、下記の配列５と配列６のオリゴヌクレオチドをプライマーとしたＰＣＲ法によって、染色体２上のｃｂｂオペロン（「ｃｂｂ$_c$オペロン」）のｃｂｂＲからｃｂｂＡまでの１３．７ｋｂｐ領域を増幅した。

配列５：ＴＣＧＣＴＡＴＴＡＣＧＣＣＡＧＴＣＴＡＧＡＡＣＧＧＡＴＧＧＣＴＣＴＣＴＡＡＴＣＣＣＡＧＣＣＡＡ（配列番号１７）

配列６：ＧＡＴＴＣＡＴＴＡＡＴＧＣＡＧＴＣＴＡＧＡＴＴＧＧＧＧＴＴＡＧＴＣＡＣＧＣＧＡＡＣＡＡＣＴＣＣＴ（配列番号１８）

得られた増幅断片のｐＭＷ２１８Ｇｍへの挿入には、ＩｎＦｕｓｉｏｎ　ＨＤ　Ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｋｉｔ　ｗ／Ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｅｎｈａｎｃｅｒ（タカラバイオ）を用いた。配列５と配列６には、あらかじめｐＭＷ２１８を制限酵素ＰｖｕＩＩで切断した際の末端１５ｂｐの配列を含ませており、Ｉ

ｎＦｕｓｉｏｎリコンビナーゼにより連結することができる。まず、増幅したｃｂｂＲ－ｃｂｂＡ領域の断片をＣｌｏｎｉｎｇ　Ｅｎｈａｎｃｅｒで処理し、ついで制限酵素ＰｖｕＩＩで切断したｐＭＷ２１８Ｇｍと混合し、キット添付のプロトコールに従ってＩｎＦｕｓｉｏｎ反応を行った。反応後の溶液を用いて大腸菌ＤＨ５αを形質転換し、得られた形質転換体からｃｂｂＲ－ｃｂｂＡ領域が正しく挿入されたクローンを選抜し、ｐＣｂｂとした（図２参照）。

[0048] （３）ｐＣｂｂ－Ｔ２の構築

ｐＣｂｂを鋳型、下記の配列７と配列８のオリゴヌクレオチドをプライマーとしたインバースＰＣＲ法によって、ｃｂｂ。オペロンのｃｂｂＴからｃｂｂＡまでの領域を除くプラスミド部分の１１．５ｋｂｐ断片を増幅した。

配列７：ＡＧＴＣＧＧＣＧＴＴＴＣＡＣＧＧＴＣＧＡＧＴＣＣＴＴＡＣＴ（配列番号１９）

配列８：ＴＣＴＡＧＡＣＴＧＣＡＴＴＡＡＴＧＡＡＴＣＧＧＣＣＡＡ（配列番号２０）

得られた増幅断片の５’－末端をリン酸化し、セルフライゲーションさせることによってｐＣｂｂ－Ｔ２を得た（図２参照）。

[0049] （４）カルビン回路を導入したＰ（３ＨＢ）生産用大腸菌株の作製

Ｃ．ｎｅｃａｔｏｒ野生株であるＨ１６株は、Ｐ（３ＨＢ）生合成経路を構成するＰＨＡ重合酵素（ＰｈａＣ）、β－ケトチオラーゼ（ＰｈａＡ）、アセトアセチル－ＣｏＡ還元酵素（ＰｈａＢ１）をコードするｐｈａＣＡＢ１オペロンを染色体上に有する。また、このｐｈａＣＡＢ１オペロンを導入した大腸菌株はＰ（３ＨＢ）生合成能を示すことが知られている。

本発明では、ｐｈａＣＡＢ１オペロンを含むプラスミドｐＧＥＭ－ＣＡＢを保持する大腸菌ＪＭ１０９株を用いた。ｐＧＥＭ－ＣＡＢは公知のｐＧＥＭ’－ｐｈｂＣＢＡ（Ｍａｔｓｕｓａｋｉ　Ｈ，Ａｂｅ　Ｈ，Ｔａｇｕｃｈｉ　Ｋ，Ｆｕｋｕｉ　Ｔ，Ｄｏｉ　Ｙ．：“Ｂｉｏｓｙｎｔｈｅｓｉｓ　ｏｆ　ｐｏｌｙ（３－ｈｙｄｒｏｘｙｂｕｔｙｒａｔｅ－ｃｏ－３－ｈｙｄｒ

ｏｘｙａｌｋａｎｏａｔｅｓ）ｂｙ ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ ｂａｃｔｅｒｉａ ｅｘｐｒｅｓｓｉｎｇ ｔｈｅ ＰＨＡ ｓｙｎｔｈａｓｅ ｇｅｎｅ ｐｈａＣ１ ｆｒｏｍ Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ｓｐ．６１－３” Ａｐｐｌ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．５３：４０１－４１９（２０００））を本発明での仕様に際して改名したものである。

この大腸菌ＪＭ１０９／ｐＧＥＭ－ＣＡＢを宿主とし、塩化カルシウム法によってｐＣｂｂ又はｐＣｂｂ－Ｔ２を導入した株を作製した。

[0050] 実施例２：カルビン回路を導入した大腸菌株によるＰ（３ＨＢ）生産

大腸菌ＪＭ１０９／ｐＧＥＭ－ＣＡＢ／ｐＭＷ２１８Ｇｍ株（コントロール）、ＪＭ１０９／ｐＧＥＭ－ＣＡＢ／ｐＣｂｂ株、ＪＭ１０９／ｐＧＥＭ－ＣＡＢ／ｐＣｂｂ－Ｔ２株を試験管に入れた３ｍＬのＬＢ培地（１０ｇ／Ｌトリプトン、５ｇ／Ｌ酵母エキス、５ｇ／Ｌ塩化ナトリウム）、３７℃、１８０回／分で一夜、振とう培養した。その培養液１ｍＬを、５００ｍＬ坂口フラスコに入れた１００ｍＬのグルコース（２重量％）添加ＬＢ培地に植菌し、３７℃、１３６回／分で７２時間、振とう培養した。培養終了後に遠心分離によって菌体を回収し、脱イオン水で洗浄した。得られた菌体は凍結乾燥し、乾燥菌体重量を測定した。

[0051] 乾燥菌体１０～３０ｍｇに２ｍｌの硫酸－メタノール混液（１５：８５）と２ｍｌのクロロホルムを添加して密栓し、１００℃で１４０分間加熱することにより、菌体内ポリエステル分解物のメチルエステルを得た。これに１ｍｌの蒸留水を添加して激しく攪拌した。静置して二層に分離させた後、下層の有機層を取り出した。有機層０．５ｍｌをキャピラリーガラスクロマトグラフィーにより分析した。ガスクロマトグラフは島津製作所製ＧＣ－１７Ａ、キャピラリーカラムはＧＬサイエンス社製ＩｎｅｒｔＣａｐ－１（カラム長２５ｍ、カラム内径０．２５ｍｍ、液膜厚０．４μｍ）を用いた。温度条件は、初発温度１００℃から８℃／分の速度で昇温した。検出には水素炎イオン化型検出器を用いた。

[0052]

[表1]

表１．カルビン回路酵素を導入した組換えＥ．ｃｏｌｉによるグルコース原料からのＰ（３ＨＢ）生合成

大腸菌株(遺伝子型)	乾燥菌体重量 (g/L)	P(3HB)蓄積率 (wt%)	P(3HB)生産量 (g/L)	ｸﾞﾙｺｰｽ消費量 (g/L)	炭素収率 (g/g)
JM109/pGEM-CAB/pMW-Gm [ｺﾝﾄﾛｰﾙ]	5.91	47.6	2.82	18.6	0.15
JM109/pGEM-CAB/pCbb (cbbRLSXYEFPTZGKA)	1.96	5.97	0.12	8.0	0.015
JM109/pGEM-CAB/pCbb-T2 (cbbRLSXYEFP)	7.74	68.6	5.09	20	0.25

[0053] Ｃ．ｎｅｃａｔｏｒ　Ｈ１６株に由来するｃｂｂ$_c$オペロンの遺伝子を全く有さない大腸菌ＪＭ１０９／ｐＧＥＭ－ＣＡＢ／ｐＭＷ２１８Ｇｍ株（コントロール）では、１８．６ｇのグルコース原料を消費して２．８ｇ／ＬのＰ（３ＨＢ）を生合成した。ｃｂｂ$_c$オペロンの１３遺伝子を含むプラスミドベクターを導入したＪＭ１０９／ｐＧＥＭ－ＣＡＢ／ｐＣｂｂ株ではＰ（３ＨＢ）生合成量が０．１２ｇ／Ｌと大きく低下した。これは多数の遺伝子を含むｃｂｂ$_c$オペロンからの遺伝子発現が大腸菌細胞に過大な負荷をかけていることや、発現したカルビン回路酵素によって糖代謝全体が乱されたなどの理由が推測された。一方、カルビン回路に固有な酵素の遺伝子を含む、ｃｂｂ$_c$オペロンの前半８遺伝子のみを含むＪＭ１０９／ｐＧＥＭ－ＣＡＢ／ｐＣｂｂ－Ｔ２株では、Ｐ（３ＨＢ）生産量が５．０９ｇ／Ｌと１．８倍に増加し、炭素収率も０．２５と顕著に増加した。この結果はｃｂｂオペロンの一部を導入することで組換えＥ．ｃｏｌｉ細胞内でカルビン回路が機能して炭酸固定が生じたことに加えて、糖代謝全体が強化され副産物の生成が抑制された効果と考えられた。

産業上の利用可能性

[0054] 本発明により、遺伝子組換え大腸菌へのカルビン回路酵素の導入によって

、糖質を原料としたＰ（３ＨＢ）生産の効率を向上させうることが示された。この代謝改変戦略はＰ（３ＨＢ）に限らず、微生物を用いた糖質原料からの他の有用物質の生産にも有用であることが期待できる。

[0055] 本明細書に引用する全ての刊行物及び特許文献は、参照により全体として本明細書中に援用される。なお、例示を目的として、本発明の特定の実施形態を本明細書において説明したが、本発明の精神及び範囲から逸脱することなく、種々の改変が行われる場合があることは、当業者に容易に理解されるであろう。

請求の範囲

[請求項1] ポリヒドロキシアルカン酸生産能を有する微生物、又はポリヒドロキシアルカン酸生産能を付与した組換え微生物に（ａ）リブロース－１，５－ビスリン酸カルボキシラーゼ／オキシゲナーゼ（「ルビスコ」）遺伝子、（ｂ）ルビスコ活性化因子遺伝子、及び（ｃ）ホスホリブロキナーゼ遺伝子が組み込まれた自律複製ベクターを導入する形質転換、又は前記株の染色体に該遺伝子を相同性組換えで導入する形質転換により取得した形質転換体を用い、炭素源として糖質を含有する培地で形質転換体を増殖させることを含む、ポリヒドロキシアルカン酸を製造する方法。

[請求項2] 前記形質転換体において、（ｄ）ＬｙｓＲタイプ転写制御因子遺伝子、（ｅ）３－ヒドロキシアシル－ＣｏＡ脱水素酸素スーパーファミリーに属する推定加水分解酵素遺伝子、（ｆ）ペントース－５－リン酸－３－エピメラーゼ遺伝子、及び（ｇ）セドヘプツロース－１，７／フルクトース－１，６－ビスホスファターゼ遺伝子からなる群から少なくとも１つ選択される遺伝子が組み込まれた自律複製ベクターを導入する形質転換、又は前記株の染色体に該遺伝子を相同性組換えによって導入する形質転換をさらに含む、請求項１に記載の方法。

[請求項3] 前記形質転換体において、（ｈ）トランスケトラーゼ遺伝子、（ｉ）ホスホグリコール酸ホスファターゼ遺伝子、（ｊ）グリセルアルデヒド－３－リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子、（ｋ）３－ホスホグリセリン酸キナーゼ遺伝子、及び（ｌ）セドヘプツロース－１，７／フルクトース－１，６－ビスリン酸アルドラーゼ遺伝子からなる群から少なくとも１つ選択される遺伝子が組み込まれた自律複製ベクターを導入する形質転換、又は前記株の染色体に該遺伝子を相同性組換えによって導入する形質転換をさらに含む、請求項１又は２に記載の方法。

[請求項4] ルビスコ遺伝子が、

－配列番号１で表される塩基配列を含む核酸；又は

－配列番号１で表される塩基配列を含む核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリブロース－１，５－ビスリン酸とＣＯ2から３－ホスホグリセリン酸２分子を生成する触媒活性を有するタンパク質をコードする核酸

を含み、

ルビスコ活性化因子遺伝子が、

－配列番号２で表される塩基配列を含む核酸；又は

－配列番号２で表される塩基配列を含む核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつルビスコを活性化する活性を有するタンパク質をコードする核酸

を含み、及び

ホスホリブロキナーゼ遺伝子が、

－配列番号３で表される塩基配列を含む核酸；又は

－配列番号３で表される塩基配列を含む核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつリブロース－５－リン酸からリブロース－１，５－ビスリン酸を生成する触媒活性を有するタンパク質をコードする核酸

を含む、請求項１～３のいずれか１項に記載の方法。

[請求項5] ＬｙｓＲタイプ転写制御因子遺伝子が、

－配列番号４で表される塩基配列を含む核酸；又は

－配列番号４で表される塩基配列を含む核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつルビスコ遺伝子の転写を制御する活性を有するタンパク質をコードする核酸

を含み、

３－ヒドロキシアシル－ＣｏＡ脱水素酸素スーパーファミリーに属する推定加水分解酵素遺伝子が、

－配列番号５で表される塩基配列を含む核酸；又は

－配列番号５で表される塩基配列を含む核酸とストリンジェントな

条件下でハイブリダイズし、かつ加水分解活性を有するタンパク質をコードする核酸

を含み、

ペントース－５－リン酸－３－エピメラーゼ遺伝子が、

－配列番号６で表される塩基配列を含む核酸；又は

－配列番号６で表される塩基配列を含む核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつキシルロース－５－リン酸からリブロース－５－リン酸を生成する触媒活性を有するタンパク質をコードする核酸

を含み、及び

セドヘプツロース－１，７／フルクトース－１，６－ビスホスファターゼ遺伝子が、

－配列番号７で表される塩基配列を含む核酸；又は

－配列番号７で表される塩基配列を含む核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつセドヘプツロース－１，７－ビスリン酸からセドヘプツロース－７－リン酸を生成する触媒活性、又はフルクトース－１，６－ビスリン酸からフルクトース－１，６－リン酸を生成する触媒活性を有するタンパク質をコードする核酸

を含む、請求項２～４のいずれか１項に記載の方法。

[請求項6] トランスケトラーゼ遺伝子が、

－配列番号８で表される塩基配列を含む核酸；又は

－配列番号８で表される塩基配列を含む核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつセドヘプツロース－７－リン酸からリボース－５－リン酸を生成する触媒活性を有するタンパク質をコードする核酸

を含み、

ホスホグリコール酸ホスファターゼ遺伝子が、

－配列番号９で表される塩基配列を含む核酸；又は

－配列番号９で表される塩基配列を含む核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ２－ホスホグリコール酸を脱リン酸化してグリコール酸を生成する触媒活性を有するタンパク質をコードする核酸

を含み、

グリセルアルデヒド－３－リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子が、

－配列番号１０で表される塩基配列を含む核酸；又は

－配列番号１０で表される塩基配列を含む核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ１，３－ビスホスホグリセリン酸からグリセルアルデヒド－３－リン酸を生成する触媒活性を有するタンパク質をコードする核酸

を含み、

３－ホスホグリセリン酸キナーゼ遺伝子が、

－配列番号１１で表される塩基配列を含む核酸；又は

－配列番号１１で表される塩基配列を含む核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ３－ホスホグリセリン酸から１，３－ビスホスホグリセリン酸を生成する触媒活性を有するタンパク質をコードする核酸

を含み、及び

セドヘプツロース－１，７／フルクトース－１，６－ビスリン酸アルドラーゼ遺伝子が、

－配列番号１２で表される塩基配列を含む核酸；又は

－配列番号１２で表される塩基配列を含む核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつエリトロース－４－リン酸とジヒドロキシアセトンリン酸からセドヘプツロース－１，７－ビスリン酸を生成する触媒活性、又はグリセルアルデヒド－３－リン酸とジヒドロキシアセトンリン酸からフルクトース－１，６－ビスリン酸を生成する触媒活性を有するタンパク質をコードする核酸

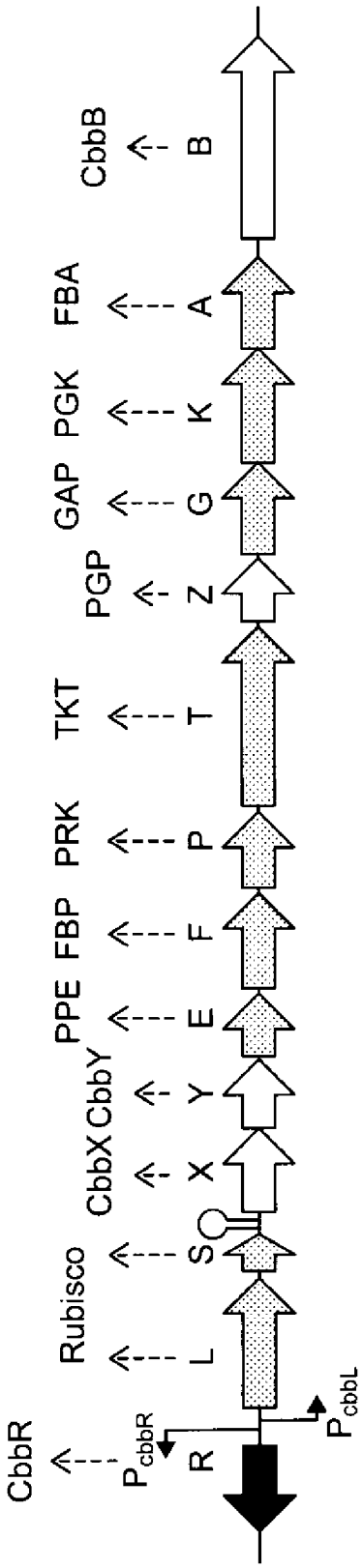
を含む、請求項３～５のいずれか１項に記載の方法。

[請求項7] ポリヒドロキシアルカン酸がポリ（３－ヒドロキシブタン酸）である、請求項１～６のいずれか１項に記載の方法。

[請求項8] 微生物が大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）である、請求項１～７のいずれか１項に記載の方法。

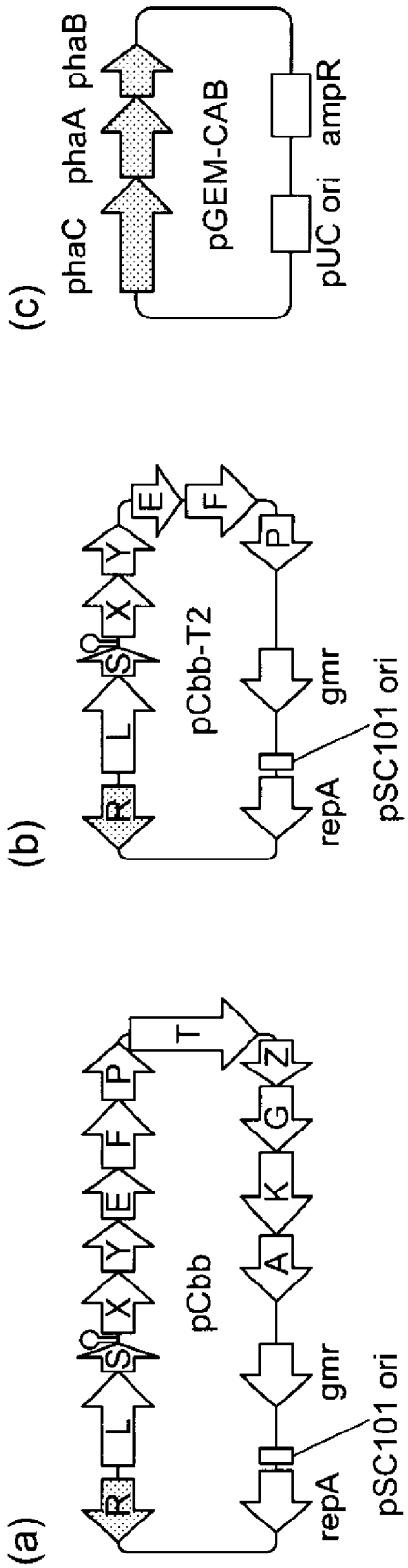
[図1]

図1


CbbR
P_{cbbR}
R
P_{cbbL}
Rubisco
L
S
CbbX
X
CbbY
Y
PPE
E
FBP
F
PRK
P
TKT
T
PGP
Z
GAP
G
PGK
K
FBA
A
CbbB
B

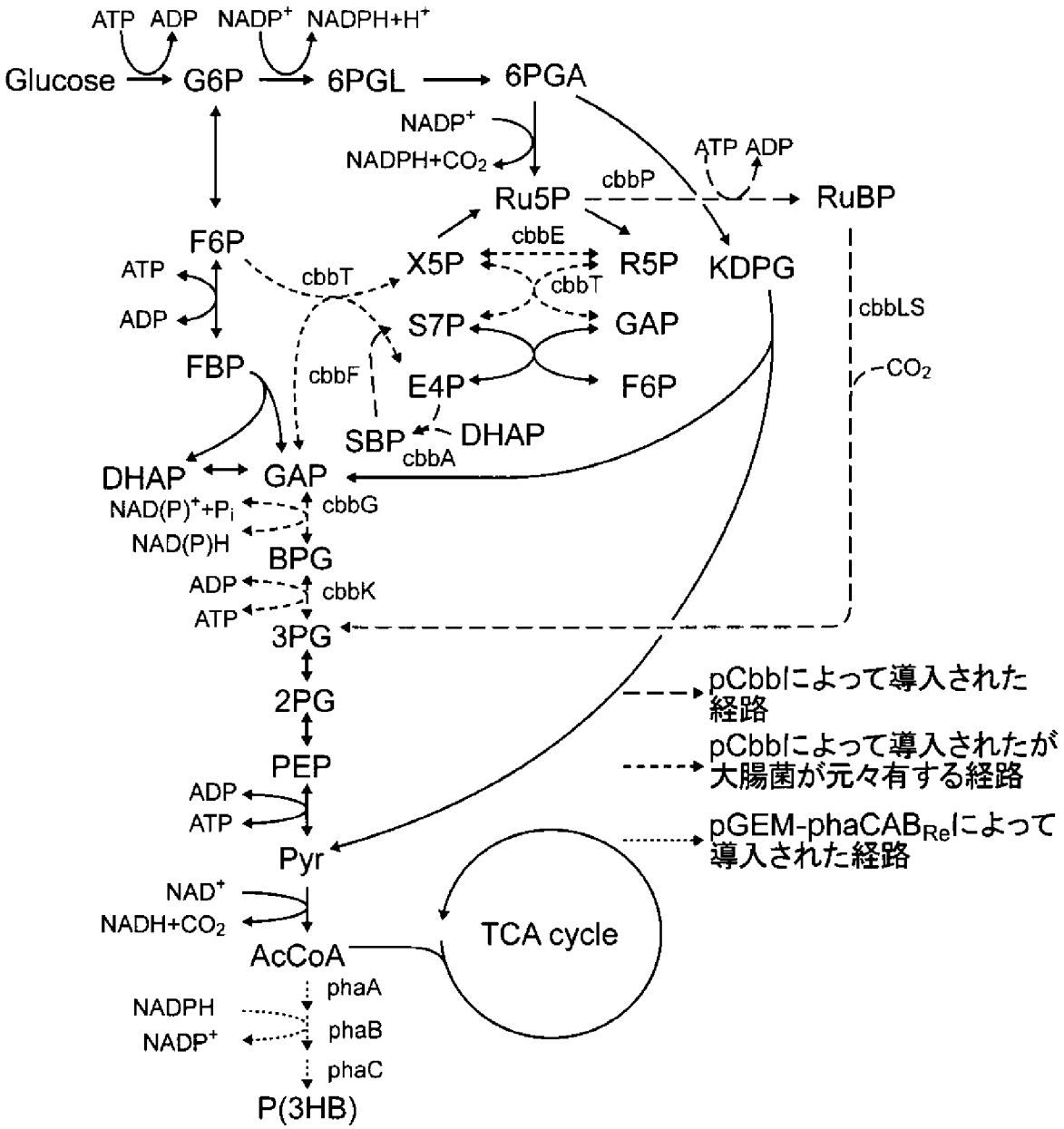
[図2]

図2


(c)
phaC
phaA
phaB
pGEM-CAB
pUC ori
ampR
(b)
R
L
S
X
Y
E
F
P
pCbb-T2
repA
pSC101 ori
gmr
(a)
R
L
S
X
Y
E
F
P
T
Z
G
K
A
pCbb
repA
pSC101 ori
gmr

[図3]

図3


ATP ADP NADP+ NADPH+H+
Glucose
G6P
6PGL
6PGA
NADP+
NADPH+CO2
ATP ADP
cbbP
Ru5P
RuBP
F6P
cbbE
X5P
R5P
KDPG
ATP
ADP
cbbT
cbbT
S7P
GAP
cbbLS
FBP
cbbF
E4P
F6P
CO2
SBP
DHAP
cbbA
DHAP
GAP
NAD(P)+ +Pi
NAD(P)H
cbbG
BPG
ADP
ATP
cbbK
3PG
2PG
PEP
ADP
ATP
Pyr
NAD+
NADH+CO2
AcCoA
TCA cycle
NADPH
NADP+
phaA
phaB
phaC
P(3HB)
pCbbによって導入された経路
pCbbによって導入されたが大腸菌が元々有する経路
pGEM-phaCAB Reによって導入された経路

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2016/078093

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N15/09(2006.01)i, *C12P7/42*(2006.01)i, *C12N1/21*(2006.01)n, *C12N9/02*(2006.01)n, *C12N9/12*(2006.01)n, *C12N9/14*(2006.01)n, *C12N9/16*(2006.01)n, *C12N9/88*(2006.01)n
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)
C12N15/09, C12P7/42, C12N1/21, C12N9/02, C12N9/12, C12N9/14, C12N9/16, C12N9/88

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2016 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2016

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	SHIMIZU R. et al., New Insight into the Role of the Calvin Cycle: Reutilization of CO_2 Emitted through Sugar Degradation, Scientific Reports, Published: 01 July 2015, 5:11617, Abstract, p.7, lines 11-12, DOI: 10.1038/srep11617	1/2-8
X/Y	Rie SHIMIZU et al., "Calvin Kairo no Shin Kino: Tsusei Dokuritsu Eiyo Saikin Ralstonia eutropha ni Okeru Toshitsu Yurai Datsu Tansan Tanso no Kotei to Poly(3-Hydroxybutanoic acid) Seigosei eno Sairiyo", Proceedings of the Annual Meeting of Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry, Issued date 05 March 2015 (05.03.2015), page 343, 2B33a09, column of 'Method and Result'	1/2-8

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

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

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
01 December 2016 (01.12.16)	13 December 2016 (13.12.16)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3,Kasumigaseki,Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915,Japan	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2016/078093

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	BOWIEN B. et al., Genetics and control of CO_2 assimilation in the chemoautotroph Ralstonia eutropha, Arch Microbiol, 2002, vol.178, p.85-93, Figure 1, DOI: 10.1007/s00203-002-0441-3	2-8
Y	NCBI, GenBank Accession No. AM260480 [online], 07-MAR-2015, URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/113528459 [retrieved on 2016.11.25], the sequence lying between position-1560986 and position-1562923 is 100% identical to the sequence represented by SEQ ID NO: 1 described in the present invention, the sequence lying between position-1559870 and position-1560823 is 100% identical to the sequence represented by SEQ ID NO: 2 described in the present invention, the sequence lying between position-1556334 and position-1557212 is 100% identical to the sequence represented by SEQ ID NO: 3 described in the present invention, the sequence lying between position-1938627 and position-1939568 is 100% identical to the sequence represented by SEQ ID NO: 4 described in the present invention, the sequence lying between position-1559102 and position-1559866 is 100% identical to the sequence represented by SEQ ID NO: 5 described in the present invention, the sequence lying between position-1558375 and position-1559100 is 100% identical to the sequence represented by SEQ ID NO: 6 described in the present invention, the sequence lying between position-1557224 and position-1558318 is 100% identical to the sequence represented by SEQ ID NO: 7 described in the present invention, the sequence lying between position-1554281 and position-1556293 is 100% identical to the sequence represented by SEQ ID NO: 8 described in the present invention, the sequence lying between position-1553586 and position-1554281 is 100% identical to the sequence represented by SEQ ID NO: 9 described in the present invention, the sequence lying between position-1552516 and position-1553526 is 100% identical to the sequence represented by SEQ ID NO: 10 described in the present invention, the sequence lying between position-1551265 and position-1552506 is 100% identical to the sequence represented by SEQ ID NO: 11 described in the present invention,	2-8

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	and the sequence lying between position-1550185 and position-1551222 is 100% identical to the sequence represented by SEQ ID NO: 12 described in the present invention.	

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１６／０７８０９３

A.　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N15/09(2006.01)i, C12P7/42(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)n, C12N9/02(2006.01)n, C12N9/12(2006.01)n, C12N9/14(2006.01)n, C12N9/16(2006.01)n, C12N9/88(2006.01)n

B.　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N15/09, C12P7/42, C12N1/21, C12N9/02, C12N9/12, C12N9/14, C12N9/16, C12N9/88

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	１９７１－２０１６年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１６年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１６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）

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq, SwissProt/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
X/Y	SHIMIZU R. et al., New Insight into the Role of the Calvin Cycle: Reutilization of CO_2 Emitted through Sugar Degradation, Scientific Reports, Published: 01 July 2015, 5:11617, Abstract, p.7, lines 11-12, DOI: 10.1038/srep11617	1/2-8
X/Y	清水理恵　他，カルビン回路の新機能:通性独立栄養細菌 Ralstonia eutropha における糖質由来脱炭酸炭素の固定とポリ(3-ヒドロキシブタン酸)生合成への再利用，日本農芸化学会大会講演要旨集，2015 年 3 月 5 日発行，343 頁 2B33a09，「方法と結果」の欄	1/2-8

☑　C欄の続きにも文献が列挙されている。　　☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
０１．１２．２０１６	１３．１２．２０１６

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
郵便番号１００－８９１５
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｎ　３５３９
福間　信子
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４８８

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
Y	BOWIEN B. et al., Genetics and control of CO_2 assimilation in the chemoautotroph Ralstonia eutropha, Arch Microbiol, 2002, vol.178, p.85-93, Figure 1, DOI: 10.1007/s00203-002-0441-3	2-8
Y	NCBI, GenBank Accession No. AM260480 [online], 07-MAR-2015, URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/113528459 [retrieved on 2016.11.25], 1560986～1562923番目が本願配列番号１と100%一致し、 1559870～1560823番目が本願配列番号２と100%一致し、 1556334～1557212番目が本願配列番号３と100%一致し、 1938627～1939568番目が本願配列番号４と100%一致し、 1559102～1559866番目が本願配列番号５と100%一致し、 1558375～1559100番目が本願配列番号６と100%一致し、 1557224～1558318番目が本願配列番号７と100%一致し、 1554281～1556293番目が本願配列番号８と100%一致し、 1553586～1554281番目が本願配列番号９と100%一致し、 1552516～1553526番目が本願配列番号１０と100%一致し、 1551265～1552506番目が本願配列番号１１と100%一致し、 1550185～1551222番目が本願配列番号１２と100%一致する。	2-8