



## 明 細 書

発明の名称：

フェニルアラニンアンモニアリアーゼを用いた鎖状の不飽和カルボン酸化合物の製造方法

### 技術分野

[0001] 本発明は、フェニルアラニンアンモニアリアーゼの存在下、末端に炭素－炭素間二重結合を有する、第2の鎖状の不飽和カルボン酸化合物に、更に炭素－炭素間二重結合を導入し、第3の鎖状の不飽和カルボン酸化合物を製造する方法に関する。また、本発明は、末端アルケン生成酵素 *BesC* の存在下、末端にアミノ基を有する第1の鎖状の不飽和カルボン酸化合物から第2の鎖状の不飽和カルボン酸化合物を製造し、当該化合物から、更にフェニルアラニンアンモニアリアーゼの存在下、第3の鎖状の不飽和カルボン酸化合物を製造する方法に関する。さらに、本発明は、このようにして第3の鎖状の不飽和カルボン酸化合物を製造し、次いで、フェルラ酸デカルボキシラーゼの存在下、当該不飽和カルボン酸化合物から、両末端に炭素－炭素間二重結合を有する鎖状の不飽和炭化水素化合物を製造する方法に関する。

[0002] 本発明はまた、これら製造方法に用いられ得る、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ改変体、該改変体をコードするDNA、該DNAが挿入されているベクター、及び前記DNA又は前記ベクターが導入された宿主細胞に関する。さらに、本発明は、前記宿主細胞を用いた前記改変体の製造方法に関する。

### 背景技術

[0003] ブタジエン（1，3－ブタジエン）は、各種合成ゴム（ブタジエンゴム、スチレン－ブタジエンゴム、アクリロニトリル－ブタジエンゴム等）、ポリマー樹脂（ABS樹脂、ナイロン66等）といった様々な高分子化合物の原料として用いられるため、化学産業において極めて重要な有機化合物と言える。また、これらブタジエンを原料とする高分子化合物は、自動車用タイヤ

等の工業用品だけでなく、衣料品等の生活用品にも幅広く利用されている。そのため、ブタジエンの需要は年々増加しており、その年間需要は1300万トンとなり、また市場規模も150億ドルに達している。

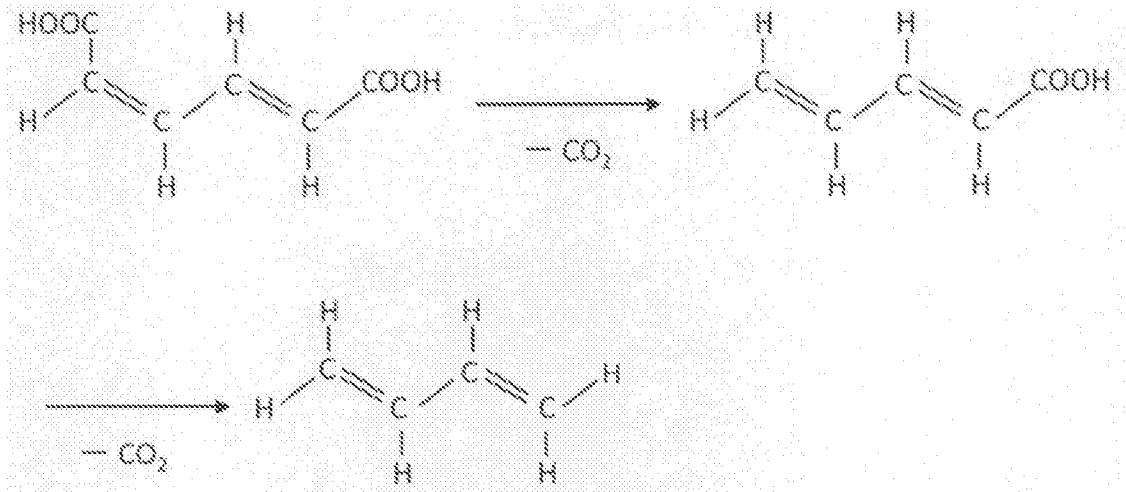
[0004] ブタジエンは、従前より、主に石油からエチレン及びプロピレンを製造する際に副生するC4留分を精製することにより製造されてきた。しかしながら、石油等の化石燃料の枯渇や温室効果ガス排出による地球温暖化等の環境問題により、前述の増加の一途を辿るブタジエン需要に対応すべく、持続可能なブタジエン製造を実現する必要性が高まっている。そして、その対応策として、再生可能資源であるバイオマス資源由来物質から、酵素を利用して、ブタジエンを製造する方法の開発が盛んに行なわれている。

[0005] 例えば、特許文献1においては、キシロースを原料とし、それをクロチルアルコール等に変換し得る酵素活性を有する微生物を用い、ブタジエンを製造する方法が開示されている。また、特許文献2においては、キシロースを原料とし、それを2,3-ブタンジオールに変換し得る酵素活性を有する微生物を用い、ブタジエンを製造する方法が開示されている。このように、酵素を利用したブタジエン等の不飽和炭化水素化合物の製造は多々試みられている。

[0006] さらに、本発明者らによって、フェルラ酸デカルボキシラーゼ(FDC)が関与する、フェルラ酸の脱炭酸反応による4-ビニルグアイヤコール(4VG)の生成(非特許文献1参照)を、ブタジエン等の不飽和炭化水素化合物の製造に応用できることが明らかとなっている(特許文献3)。すなわち、FDCを用い、ムコン酸等から、下記式に示すような脱炭酸反応を経て、ブタジエン等を製造できることが、本発明者らによって見出されている。

[0007]

[化1]



[0008] しかしながら、ムコン酸は高価であるため、実用化の弊害になることが懸念される。そのため、酵素を用いて、ブタジエン等の炭素-炭素間二重結合を少なくとも2つ有する不飽和化合物をより安価に製造する方法を開発することが望ましい。

### 先行技術文献

#### 特許文献

- [0009] 特許文献1：特開2014-30376号公報  
 特許文献2：特開2015-228804号公報  
 特許文献3：国際公開第2019-022083号

#### 非特許文献

- [0010] 非特許文献1：Karl A. P. Payneら、Nature、2015年、522巻、7557号、497～501ページ  
 非特許文献2：J A Marchandら、Nature、2019年、567巻、7748号、420～424ページ

### 発明の概要

#### 発明が解決しようとする課題

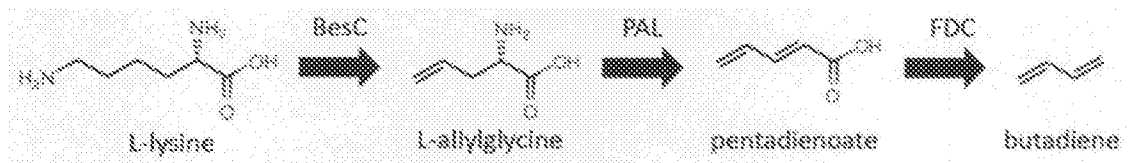
- [0011] 本発明は、前記従来技術の有する課題に鑑みてなされたものであり、酵素を用いて、炭素-炭素間二重結合を少なくとも2つ有する不飽和化合物を製

造する方法を提供することを目的とする。

### 課題を解決するための手段

[0012] 本発明者らは、前記目的を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、ムコン酸の代わりにL-リジン (L-lysine) を出発材料として、ブタジエンの生成に至る下記反応スキームを構想した。なお、L-リジンは比較的安価に入手することが可能であるため、ブタジエン製造におけるコストを抑えることが可能となる。

[0013] [化2]

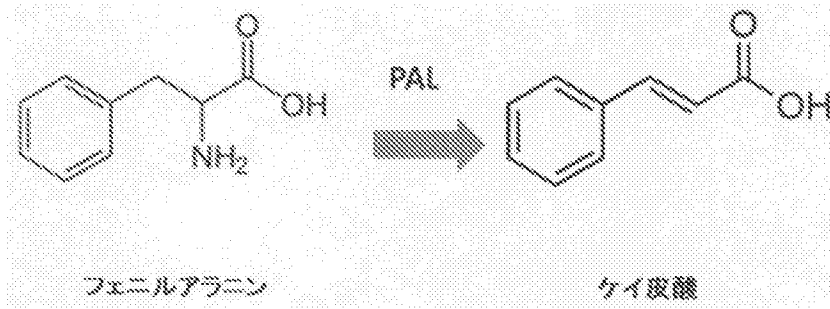


[0014] さらに、本発明者らは、L-リジンからL-アリルグリシン (L-allylglycine) の製造においては、非特許文献2に開示されている酵素、BesCを利用し得ることを着想した。当該酵素は、末端のプロピルアミノ基を酸化することにより、当該基中の炭素-炭素間結合を開裂し、末端に炭素-炭素間二重結合を形成させる反応を、触媒する活性を有する。また、ペンタジエン酸 (pentadienoate) からブタジエン (butadiene) の製造においては、上述のとおり本発明者らによって明らかにされているFDCを利用し得ることを着想した (特許文献3)。

[0015] しかしながら、L-アリルグリシンからペンタジエン酸の生成に関与する酵素の報告は見出せなかった。そこで、本発明者らは、下記フェニルアラニンからケイ皮酸の生成に関与するフェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL) がこれに利用し得るのではないかと考えた。

[0016]

[化3]



[0017] そして、実際に、*BesC*と*Arabidopsis thaliana*由来のPAL (*AtPAL*)を高発現させた大腸菌を培養し、それを処理して得た細胞溶解液と、*FDC*を高発現させた大腸菌を培養し、それを処理して得た細胞溶解液とを混合し、*L-リジン*を添加したところ、*ブタジエン*が生成されることが明らかになった。

[0018] さらに、由来が異なるPAL (*Anabaena variabilis*由来のPAL (*AvPAL*)、*Plagioclasma appendiculatum*由来のPAL (*PaPAL*))についても前記同様に*ブタジエン*生成について検証した。その結果、*AvPAL*又は*PaPAL*を用いても、前記*AtPAL*同様に*ブタジエン*を生成できることが明らかになった。さらに、これらの中では、*AvPAL*が際立って高い*ペンタジエン酸*の生成に関する触媒活性を有していることも本発明者らは見出した。

[0019] さらにまた、この*AvPAL*について、多種のアミノ酸置換を導入し、*ブタジエン*生成能について検証した結果、以下の(1)～(5)のいずれかのアミノ酸置換において、導入前の野生型と比較して、*ブタジエン*生産量が向上することも見出し、本発明を完成するに至った。

(1) 108位のロイシンを、メチオニン、フェニルアラニン又はバリンに置換、

(2) 107位のフェニルアラニンを、トリプトファンに置換、

(3) 219位のロイシンを、イソロイシンに置換、

(4) 223位のアスパラギンを、イソロイシンに置換、

(5) 104位のロイシンを、アラニンに置換。

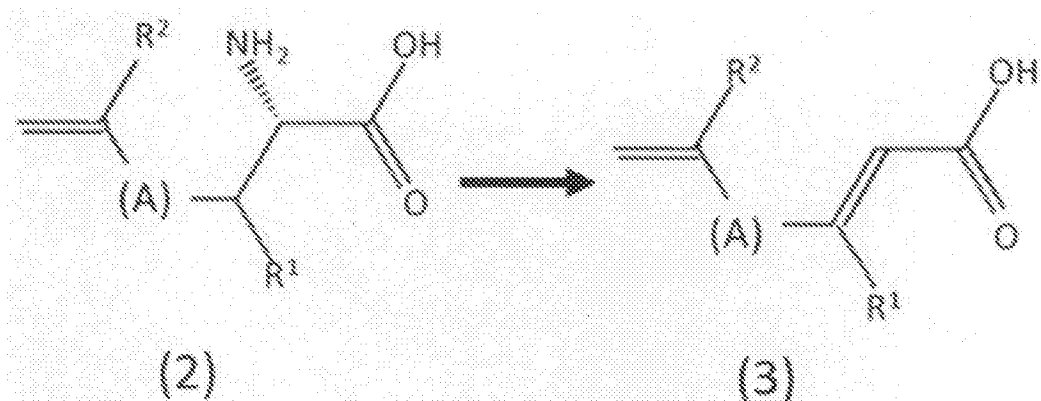
[0020] すなわち、本発明は、PALの存在下、末端に炭素-炭素間二重結合を有する、第2の鎖状の不飽和カルボン酸化合物に、更に炭素-炭素間二重結合を導入し、第3の鎖状の不飽和カルボン酸化合物を製造する方法に関する。また、本発明は、BesCの存在下、末端にアミノ基を有する第1の鎖状の不飽和カルボン酸化合物から第2の鎖状の不飽和カルボン酸化合物を製造し、当該化合物から、更にフェニルアラニンアンモリアーゼの存在下、第3の鎖状の不飽和カルボン酸化合物を製造する方法に関する。さらにまた、本発明は、このようにして第3の鎖状の不飽和カルボン酸化合物を製造し、当該不飽和カルボン酸化合物から、PDCの存在下、両末端に炭素-炭素間二重結合を有する鎖状の不飽和炭化水素化合物を製造する方法に関する。

[0021] 本発明はまた、これら製造方法に用いられ得る、PAL変異体、該変異体をコードするDNA、該DNAが挿入されているベクター、及び前記DNA又は前記ベクターが導入された宿主細胞に関する。さらに、本発明は、前記宿主細胞を用いた前記変異体の製造方法に関する。

[0022] より具体的に、本発明は、以下を提供するものである。

[1] フェニルアラニンアンモリアーゼの存在下、第1のアミノ基と末端に第1の炭素-炭素間二重結合とを有する、下記式(2)で表される鎖状の不飽和カルボン酸化合物又はその幾何異性体から、第1のアミノ基を脱離させ、第2の炭素-炭素間二重結合を形成させる工程を含む、下記式(3)で表される鎖状の不飽和カルボン酸化合物又はその幾何異性体を製造する方法

[0023] [化4]

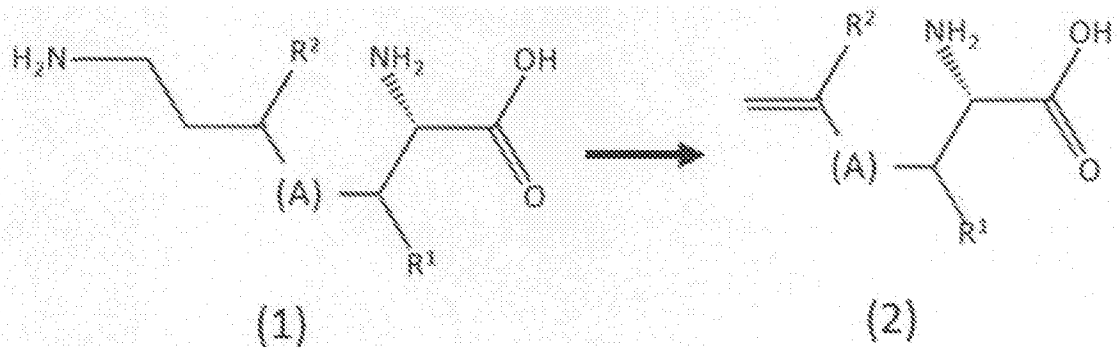


[0024] [前記式中 (A) は、置換されていてもよい炭素数 0～5 の直鎖状炭化水素基を示し、炭素数が 2～5 の場合は、隣接する炭素原子間で二重結合を形成してもよい。R<sup>1</sup> 及び R<sup>2</sup> は、各々独立して、水素原子、炭素数 1～5 の直鎖状若しくは分枝状のアルキル基、炭素数 1～5 の直鎖状若しくは分枝状のアルコキシ基又は水酸基を示す]。

[2] 末端アルケン生成酵素 B e s C の存在下、第 1 のアミノ基と末端に第 2 のアミノ基とを有する、下記式 (1) で表される鎖状のカルボン酸化合物又はその幾何異性体から、第 2 のアミノ基及びメチレン基を脱離させ、前記式 (2) で表される鎖状の不飽和カルボン酸化合物又はその幾何異性体を製造する工程を含み、当該化合物又はその幾何異性体から、前記式 (3) で表される鎖状の不飽和カルボン酸化合物又はその幾何異性体を製造する、

[1] に記載の方法

[0025] [化5]

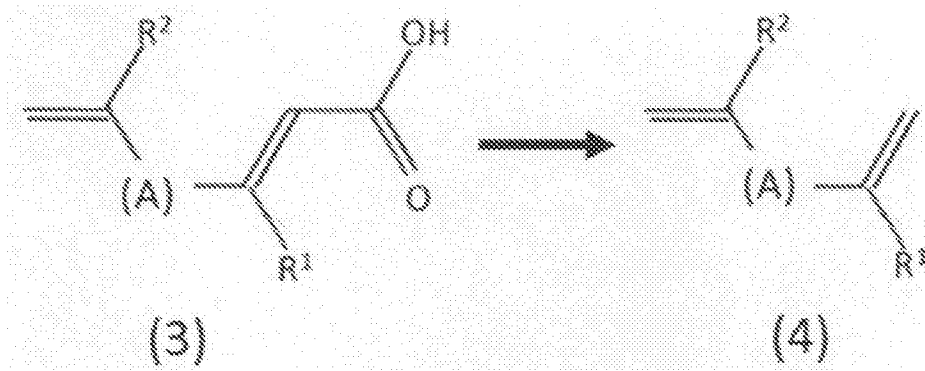


[0026] [前記式中 (A) は、置換されていてもよい炭素数 0～5 の直鎖状炭化水素基を示し、炭素数が 2～5 の場合は、隣接する炭素原子間で二重結合を形成してもよい。R<sup>1</sup> 及び R<sup>2</sup> は、各々独立して、水素原子、炭素数 1～5 の直鎖状若しくは分枝状のアルキル基、炭素数 1～5 の直鎖状若しくは分枝状のアルコキシ基又は水酸基を示す]。

[3] [1] 又は [2] に記載の方法により、前記式 (3) で表される鎖状の不飽和カルボン酸化合物又はその幾何異性体を製造し、フェルラ酸デカルボキシラーゼの存在下、前記不飽和カルボン酸化合物又はその幾何異性体から、カルボキシル基を脱離させる工程を含む、下記式 (4) で表される鎖

状の不飽和炭化水素化合物又はその幾何異性体を製造する方法

[0027] [化6]



[0028] [前記式中 (A) は、置換されていてもよい炭素数 0～5 の直鎖状炭化水素基を示し、炭素数が 2～5 の場合は、隣接する炭素原子間で二重結合を形成してもよい。R<sup>1</sup> 及び R<sup>2</sup> は、各々独立して、水素原子、炭素数 1～5 の直鎖状若しくは分枝状のアルキル基、炭素数 1～5 の直鎖状若しくは分枝状のアルコキシ基又は水酸基を示す]。

[4] 前記フェニルアラニンアンモニアラーゼが、下記 (1)～(5) のうちの少なくとも 1 の特徴を有するフェニルアラニンアンモニアラーゼである、[1]～[3] のうちのいずれか一項に記載の方法

(1) 配列番号：2 に記載のアミノ酸配列の 108 位又は該部位に対応するアミノ酸が、メチオニン、フェニルアラニン若しくはバリンである、

(2) 配列番号：2 に記載のアミノ酸配列の 107 位又は該部位に対応するアミノ酸が、トリプトファンである、

(3) 配列番号：2 に記載のアミノ酸配列の 219 位又は該部位に対応するアミノ酸が、イソロイシンである、

(4) 配列番号：2 に記載のアミノ酸配列の 223 位又は該部位に対応するアミノ酸が、イソロイシンである、

(5) 配列番号：2 に記載のアミノ酸配列の 104 位又は該部位に対応するアミノ酸が、アラニンである。

[5] 下記 (1)～(5) のうちの少なくとも 1 のアミノ酸置換が導入されている、フェニルアラニンアンモニアラーゼ改変体

(1) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列の108位又は該部位に対応するアミノ酸が、メチオニン、フェニルアラニン若しくはバリンに置換、

(2) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列の107位又は該部位に対応するアミノ酸が、トリプトファンに置換、

(3) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列の219位又は該部位に対応するアミノ酸が、イソロイシンに置換、

(4) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列の223位又は該部位に対応するアミノ酸が、イソロイシンに置換、

(5) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列の104位又は該部位に対応するアミノ酸が、アラニンに置換。

[6] [5]に記載のフェニルアラニンアンモリアーゼ改変体をコードするDNA。

[7] [6]に記載のDNAを含むベクター。

[8] [6]に記載のDNA又は[7]に記載のベクターが導入された宿主細胞。

[9] [8]に記載の宿主細胞を培養し、該宿主細胞に発現したタンパク質を採取する工程を含む、フェニルアラニンアンモリアーゼ改変体の製造方法。

[10] フェニルアラニンアンモリアーゼ改変体の製造方法であって、フェニルアラニンアンモリアーゼにおいて、下記(1)～(5)のうちの少なくとも1のアミノ酸置換を導入する工程を含む、方法

(1) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列の108位又は該部位に対応するアミノ酸を、メチオニン、フェニルアラニン若しくはバリンに置換、

(2) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列の107位又は該部位に対応するアミノ酸を、トリプトファンに置換、

(3) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列の219位又は該部位に対応するアミノ酸を、イソロイシンに置換、

(4) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列の223位又は該部位に対応する

アミノ酸を、イソロイシンに置換、

(5) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列の104位又は該部位に対応するアミノ酸を、アラニンに置換。

### 発明の効果

[0029] 本発明によれば、酵素を用いて、炭素-炭素間二重結合を少なくとも2つ有する不飽和化合物を製造する方法を提供することが可能となる。例えば、本発明によって、比較的安価なL-リジンを出発材料として、ブタジエンを製造することも可能となる。

### 図面の簡単な説明

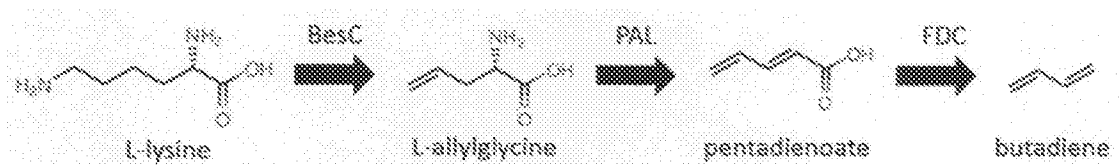
[0030] [図1] *Arabidopsis thaliana*、*Anabaena variabilis*、又は*Plagioclasma appendiculatum*由来のフェニルアラニンアンモニアラーゼ (AtPAL、AvPAL、又はPaPAL) と、フェルラ酸デカルボキシラーゼとの混合溶液に、フェニルアラニンを添加し、生成されたスチレン量を測定した結果を示す、グラフである。

[図2] AtPAL、AvPAL、又はPaPALと、フェルラ酸デカルボキシラーゼとの混合溶液に、アリルグリシンを添加し、生成されたブタジエン量を測定した結果を示す、グラフである。

### 発明を実施するための形態

[0031] 後述の実施例に示すとおり、本発明者らによって、下記のとおり、3種の酵素を用いた三段階の反応によって、ブタジエン等の炭素-炭素間二重結合を両末端に有する不飽和炭化水素化合物を製造できることが明らかになった。

[0032] [化7]

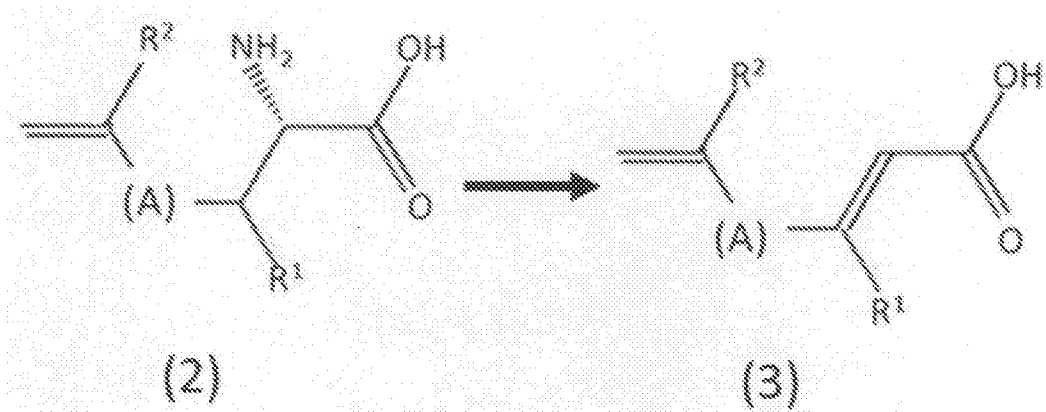


[0033] 特に、L-アリルグリシンからペンタジエン酸の生成に関与する酵素とし

て、フェニルアラニンアンモニアアレーゼ（PAL）が利用できることを、本発明者らが明らかにした。

[0034] したがって、本発明は、下記反応工程を含む、炭素-炭素間二重結合を少なくとも2つ有する鎖状の不飽和化合物を製造する方法に関する。

[0035] [化8]



[0036] <第3の鎖状の不飽和カルボン酸化合物の製造方法>

前記のとおり、本発明は、フェニルアラニンアンモニアアレーゼの存在下、第1のアミノ基と末端に第1の炭素-炭素間二重結合とを有する、前記式(2)で表される鎖状の不飽和カルボン酸化合物又はその幾何異性体（第2の鎖状の不飽和カルボン酸化合物）から、第1のアミノ基を脱離させ、第2の炭素-炭素間二重結合を形成させる工程を含む、前記式(3)で表される鎖状の不飽和カルボン酸化合物又はその幾何異性体（第3の鎖状の不飽和カルボン酸化合物）を製造する方法を、提供するものである。

[0037] 本発明において、前記反応において生成される「第3の鎖状の不飽和カルボン酸化合物」としては、末端の炭素-炭素間二重結合を含む、少なくとも2つの炭素-炭素間二重結合を有する、前記式(3)で表される鎖状の不飽和カルボン酸化合物又はその幾何異性体を意味する。

[0038] 本発明において、各化学式中の(A)は、置換されていてもよい炭素数0~5の直鎖状炭化水素基を示す。なお、「炭素数0の直鎖状炭化水素基」とは、各化学式で表される化合物、並びにそれらの幾何異性体において(A)を介して結合している炭素原子どうしが、(A)を介さずに直接結合してい

ることを意味する。さらに、置換されていてもよい直鎖状炭化水素基の炭素数が2～5の場合は、隣接する炭素原子間で二重結合を少なくとも1つ形成してもよい。また、(A)において炭化水素基が有していてもよい置換基とは、例えば、炭素数1～5の直鎖状又は分枝状のアルキル基、炭素数1～5の直鎖状又は分枝状のアルコキシ基、水酸基、ハロゲン原子（例えば、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素）、ニトロ基、シアノ基、アミノ基、カルボキシル基、ホルミル基が挙げられる。各化学式中の(A)として、好ましくは、炭素数0の直鎖状炭化水素基である。

[0039] 本発明において、各化学式中の $R^1$ 及び $R^2$ は、各々独立して、水素原子、炭素数1～5の直鎖状若しくは分枝状のアルキル基、炭素数1～5の直鎖状若しくは分枝状のアルコキシ基又は水酸基を示す。「炭素数1～5の直鎖状又は分枝状のアルキル基」としては、例えば、メチル基、エチル基、*n*-プロピル基、*i*-プロピル基、*n*-ブチル基、*i*-ブチル基、*s*-ブチル基、*t*-ブチル基、*n*-ペンチル基、*i*-ペンチル基が挙げられる。「炭素数1～5の直鎖状又は分枝状のアルコキシ基」としては、例えば、メトキシ基、エトキシ基、*n*-プロポキシ基、*i*-プロポキシ基、*n*-ブトキシ基、*i*-ブトキシ基、*s*-ブトキシ基、*t*-ブトキシ基、*n*-ペンチルオキシ基、*i*-ペンチルオキシ基、*n*-ペンチルオキシ基、1,2-ジメチル-*n*-プロポキシ基が挙げられる。各化学式中の $R^1$ として、好ましくは、水素原子である。 $R^2$ として、好ましくは、水素原子又はメチル基である。

[0040] 各化学式中の(A)、 $R^1$ 及び $R^2$ の組み合わせとして、好ましくは各々、炭素数0の直鎖状炭化水素基、水素基及び水素基、又は、炭素数0の直鎖状炭化水素基、水素基及びメチル基である。また、本発明において、「第3の鎖状の不飽和カルボン酸化合物」としては、好ましくは、ペンタジエン酸、4-メチルペンタジエン酸、3-メチルペンタジエン酸である。

[0041] 本発明にかかるフェニルアラニンアンモニアリアーゼの存在下、第2の鎖状の不飽和カルボン酸化合物を脱アミノさせる条件については、当該脱アミノが促進され、第3の鎖状の不飽和カルボン酸化合物が生成される条件であ

ればよく、当業者であれば、反応液の組成、反応液のpH、反応温度、反応時間等を適宜調整し、設定することができる。

[0042] 例えば、本発明にかかるフェニルアラニンアンモニアリアーゼと、その基質である第2の鎖状の不飽和カルボン酸化合物が添加される反応液としては、前記反応を妨げない限り、特に制限はないが、好ましくはpH6~8の緩衝液が挙げられ、より好ましくはpH6~7の塩化カリウム及びリン酸ナトリウムを含む緩衝液が挙げられる。

[0043] また、反応温度としても、前記反応を妨げない限り、特に制限はないが、通常20~40℃であり、好ましくは25~37℃である。さらに、反応時間としては、前記不飽和炭化水素化合物が生成し得る時間であればよく、特に制限はないが、通常30分~7日であり、好ましくは12時間~2日である。

[0044] また、生成される第3の鎖状の不飽和カルボン酸化合物は、公知の回収、精製方法（蒸留、クロマトグラフィー等）を適宜利用し、採取することができる。さらに、これらの方法は単独にて行ってもよく、また適宜組み合わせで多段階的に実施し得る。

[0045] （フェニルアラニンアンモニアリアーゼ）

「フェニルアラニンアンモニアリアーゼ」とは、EC番号：4.3.1.24として登録されている酵素であり、フェニルアラニンを基質とし、ケイ皮酸とアンモニアを生成する反応を、触媒する酵素を意味する。また、PAL、チラーゼ、フェニルアラニンデアミナーゼ、チロシンアンモニアリアーゼ、L-チロシンアンモニアリアーゼ、フェニルアラニンアンモニウムリアーゼ、L-フェニルアラニンアンモニアリアーゼとも称される酵素である。

[0046] 後述の実施例に示すとおり、その由来を問わず、上述の第3の鎖状の不飽和カルボン酸化合物の製造に関与し得る。したがって、本発明にかかるフェニルアラニンアンモニアリアーゼとしては、特に制限はなく、様々な生物由来のものを用いることができる。例えば、フェニルアラニンアンモニアリアーゼの由来としては、*Anabaena variabilis*、*Arab*

*idopsis thaliana*, *Plagioclasma appendiculatum*, *Rhodotorula glutinis*, *Planctomyces brasiliensis*, *Oryza sativa*, *Bambusa oldhamii*, *Taxus chinensis*, *Nicotiana tabacum*, *Streptomyces maritimus*, *Salvia miltiorrhiza*, *Solanum lycopersicum*が挙げられる。これらの中で、後述の実施例に示すとおり、第3の鎖状の不飽和カルボン酸化合物を生成する触媒活性がより高いという観点から、*Anabaena variabilis*由来のフェニルアラニンアンモリアーゼ（配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなるフェニルアラニンアンモリアーゼ）が好ましい。

[0047] また、本発明にかかるフェニルアラニンアンモリアーゼは、配列番号：2に記載のアミノ酸配列との同一性が、15%以上（例えば、16%以上、17%以上、18%以上、19%以上）であることが好ましく、20%以上（例えば、30%以上、40%以上）であることがより好ましく、50%以上（例えば、60%以上、70%以上）であることがさらに好ましく、80%以上（例えば、85%以上、86%以上、87%以上、88%以上、89%以上）であることがより好ましく、90%以上（例えば、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上）であることがより好ましい。なお、配列番号：2に記載のアミノ酸配列との「同一性」とは、本発明にかかるフェニルアラニンアンモリアーゼのアミノ酸総数に対する、本発明にかかるフェニルアラニンアンモリアーゼと配列番号：2に記載のアミノ酸配列と一致したアミノ酸数の割合（%）を意味する。

[0048] また、本発明にかかるフェニルアラニンアンモリアーゼは、配列番号：2に記載のアミノ酸配列に、天然又は非天然（人工的）に変異が導入されているものであってもよい。すなわち、本発明にかかるフェニルアラニンアンモリアーゼには、フェニルアラニンアンモリアーゼのアミノ酸配

列（配列番号：2に記載のアミノ酸配列等）において1又は複数のアミノ酸が置換、欠失、付加、及び／又は挿入されたアミノ酸配列からなるタンパク質も含まれる。ここで「複数」とは、特に制限はないが、通常2～200個、好ましくは2～150個、より好ましくは2～100個、さらに好ましくは2～70個、より好ましくは2～50個、さらに好ましくは2～30個、より好ましくは2～20個、さらに好ましくは2～10個（例えば、2～9個、2～8個、2～7個、2～6個、2～5個、2～4個、2～3個、2個）である。

[0049] さらに、後述の実施例に示すとおり、本発明にかかるフェニルアラニンアンモニアリアーゼは、下記（1）～（5）のうちの少なくとも1の特徴を有するフェニルアラニンアンモニアリアーゼであることが好ましい。

（1）配列番号：2に記載のアミノ酸配列の108位又は該部位に対応するアミノ酸が、メチオニン、フェニルアラニン又はバリンである、

（2）配列番号：2に記載のアミノ酸配列の107位又は該部位に対応するアミノ酸が、トリプトファンである、

（3）配列番号：2に記載のアミノ酸配列の219位又は該部位に対応するアミノ酸が、イソロイシンである、

（4）配列番号：2に記載のアミノ酸配列の223位又は該部位に対応するアミノ酸が、イソロイシンである、

（5）配列番号：2に記載のアミノ酸配列の104位又は該部位に対応するアミノ酸が、アラニンである。

[0050] なお、本発明において、フェニルアラニンアンモニアリアーゼに関し、「対応する部位」とは、ヌクレオチド及びアミノ酸配列解析ソフトウェア（GENETYX-MAC、Sequencher等）やBLAST（<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>）を利用し、配列番号：2に記載のアミノ酸配列と、他種に由来するフェニルアラニンアンモニアリアーゼ等のアミノ酸配列とを整列させた際に、配列番号：2に記載のアミノ酸配列における108位のロイシン、107位の

フェニルアラニン、104位のロイシン、219位のロイシン及び223位のアスパラギンの各々と同列になる部位のことである。

[0051] また、前記(1)～(5)の特徴に関し、配列番号：2に記載のアミノ酸配列の108位又は該部位に対応するアミノ酸がメチオニン、配列番号：2に記載のアミノ酸配列の107位又は該部位に対応するアミノ酸がトリプトファン、及び、配列番号：2に記載のアミノ酸配列の108位又は該部位に対応するアミノ酸がフェニルアラニンのうちの少なくとも1の特徴を有するフェニルアラニンアンモニアリアーゼであることが好ましく、配列番号：2に記載のアミノ酸配列の108位又は該部位に対応するアミノ酸がメチオニン及び配列番号：2に記載のアミノ酸配列の107位又は該部位に対応するアミノ酸がトリプトファンのうちの少なくとも1の特徴を有するフェニルアラニンアンモニアリアーゼであることがより好ましい。

[0052] さらにまた、このような各部位において特定のアミノ酸を有するフェニルアラニンアンモニアリアーゼは、野生型のフェニルアラニンアンモニアリアーゼであってもよく、また前記(1)～(5)のうちの少なくとも1の特徴を有するように、アミノ酸置換が導入された、フェニルアラニンアンモニアリアーゼの変異体であってもよい。

[0053] かかる変異体としては、より具体的に、以下の(a)～(c)のいずれかが挙げられる。

(a) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列において、下記(1)～(5)のうちの少なくとも1のアミノ酸置換が導入されているアミノ酸配列を含む、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ変異体

(1) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列の108位又は該部位に対応するアミノ酸が、メチオニン、フェニルアラニン若しくはバリンに置換、

(2) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列の107位又は該部位に対応するアミノ酸が、トリプトファンに置換、

(3) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列の219位又は該部位に対応するアミノ酸が、イソロイシンに置換、

(4) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列の223位又は該部位に対応するアミノ酸が、イソロイシンに置換、

(5) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列の104位又は該部位に対応するアミノ酸が、アラニンに置換。

(b) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列において、前記(1)～(5)のうちの少なくとも1のアミノ酸置換が導入され、更に、前記部位以外の1若しくは数個の部位にて、1又は複数のアミノ酸が置換、欠失、付加、及び／又は挿入されているアミノ酸配列を含む、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ変異体。

(c) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列と少なくとも15%の同一性を有するアミノ酸配列であって、前記(1)～(5)のうちの少なくとも1のアミノ酸置換が導入されているアミノ酸配列を含む、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ変異体。

[0054] 置換、欠失、付加、及び／又は挿入されている「複数」のアミノ酸、配列番号：2に記載のアミノ酸配列との「同一性」については、それらの好適な態様(範囲)を含め、上述のとおりである。また、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ変異体は、天然又は非天然(人工的)に生じるものであってもよい。すなわち、人工的にアミノ酸置換等が導入された、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ改変体も含まれる。

[0055] なお、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ、又は、その天然若しくは非天然の変異体が、第3の鎖状の不飽和カルボン酸化合物を生成する触媒活性を有するか否かは、当業者であれば、公知の手法(例えば、クロマトグラフィ質量分析)により、生成される当該不飽和カルボン酸化合物の量を直接測定することにより判定することができる。

[0056] また、本発明にかかるフェニルアラニンアンモニアリアーゼは、他の化合物が直接又は間接的に付加されていてもよい。かかる付加としては特に制限はなく、遺伝子レベルでの付加であってもよく、化学的な付加であってもよい。また付加される部位についても特に制限はなく、本発明にかかるフェニ

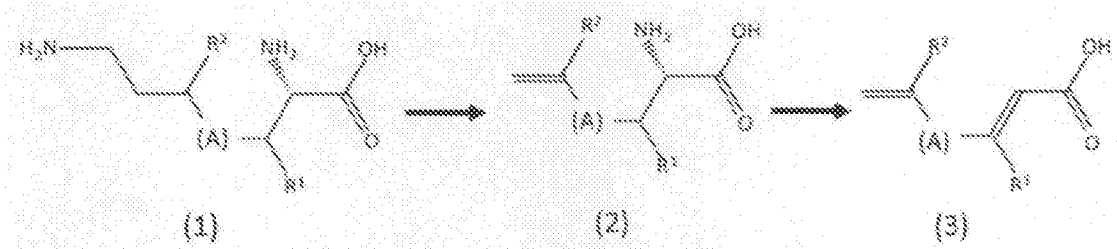
ルアラニンアンモニリアーゼのアミノ末端及びカルボキシル末端のいずれかであってもよく、その両方であってもよい。遺伝子レベルでの付加は、本発明にかかるフェニルアラニンアンモニリアーゼをコードするDNAに、他のタンパク質をコードするDNAの読み枠を合わせて付加させたものを用いることにより達成される。このようにして付加される「他のタンパク質」としては特に制限はなく、本発明にかかるフェニルアラニンアンモニリアーゼの精製を容易にする目的の場合には、ポリヒスチジン（His-）タグ（tag）タンパク質、FLAG-タグタンパク質（登録商標、Sigma-Aldrich社）、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）等の精製用タグタンパク質が好適に用いられ、また本発明にかかるフェニルアラニンアンモニリアーゼの検出を容易にする目的の場合には、GFP等の蛍光タンパク質、ルシフェラーゼ等の化学発光タンパク質等の検出用タグタンパク質が好適に用いられる。化学的な付加は、共有結合であってもよく、非共有結合であってもよい。「共有結合」としては特に制限はなく、例えば、アミノ基とカルボキシル基とのアミド結合、アミノ基とアルキルハライド基とのアルキルアミン結合、チオールどうし間のジスルフィド結合、チオール基とマレイミド基又はアルキルハライド基とのチオエーテル結合が挙げられる。「非共有結合」としては、例えば、ビオチン-アビジン間結合が挙げられる。また、このようにして化学的に付加される「他の化合物」としては、本発明にかかるフェニルアラニンアンモニリアーゼの検出を容易にする目的の場合には、例えば、Cy3、ローダミン等の蛍光色素が好適に用いられる。

[0057] また、本発明にかかるフェニルアラニンアンモニリアーゼは、他の成分と混合して用いてもよい。他の成分としては特に制限はなく、例えば、滅菌水、生理食塩水、植物油、界面活性剤、脂質、溶解補助剤、緩衝剤、プロテアーゼ阻害剤、保存剤が挙げられる。

[0058] <第2の鎖状の不飽和カルボン酸化合物の製造を介した、第3の鎖状の不飽和カルボン酸化合物の製造方法>

後述の実施例に示すとおり、本発明者らは、上述の第3の鎖状の不飽和カルボン酸化合物製造の原料となる、第2の鎖状の不飽和カルボン酸化合物も、下記反応に示すとおり、生成できることを見出している。

[0059] [化9]



[0060] すなわち、酵素 B e s Cを用いることによって、前記式(1)で表される鎖状の不飽和カルボン酸化合物又はその幾何異性体(第1の鎖状の不飽和カルボン酸化合物)の末端のプロピルアミノ基を酸化することにより、当該基中の炭素-炭素間結合を開裂し、末端に炭素-炭素間二重結合を形成させることによって、前記式(2)で表される第2の鎖状の不飽和カルボン酸化合物を製造できることを、本発明者らは見出している。したがって、本発明は、第2の鎖状の不飽和カルボン酸化合物の製造を介した、第3の鎖状の不飽和カルボン酸化合物の製造方法の態様もとり得る。

[0061] 本発明において、「第2の鎖状の不飽和カルボン酸化合物」としては、第1のアミノ基と末端に第1の炭素-炭素間二重結合とを有する、前記式(2)で表される鎖状の不飽和カルボン酸化合物又はその幾何異性体を意味する。また、それを生成するための原料となる「第1の鎖状の不飽和カルボン酸化合物」としては、第1のアミノ基と末端に第2のアミノ基とを有する、前記式(1)で表される鎖状の不飽和カルボン酸化合物又はその幾何異性体を意味する。

[0062] これら化合物において(A)及びR<sup>1</sup>については、それらの好適な態様を含め、上述のとおりであるが、「第2の鎖状の不飽和カルボン酸化合物」として、好ましくは、L-アシルグリシン、L-(2-メチルアシル)グリシン、L-(3-メチルアシル)グリシンである。「第1の鎖状の不飽和カルボン酸化合物」として、好ましくは、L-リジン、4-メチルリジン、3-メ

チルリジンである。

[0063] 本発明にかかる B e s C の存在下、第 1 の鎖状の不飽和カルボン酸化合物の末端に炭素-炭素間二重結合を形成させる条件については、当該二重結合の形成が促進され、第 2 の鎖状の不飽和カルボン酸化合物が生成される条件であればよく、当業者であれば、反応液の組成、反応液の pH、反応温度、反応時間等を適宜調整し、設定することができる。

[0064] 例えば、本発明にかかる B e s C と、その基質である第 1 の鎖状の不飽和カルボン酸化合物が添加される反応液としては、前記反応を妨げない限り、特に制限はないが、好ましくは pH 6 ~ 8 の緩衝液が挙げられ、より好ましくは pH 6 ~ 7 の塩化カリウム及びリン酸ナトリウムを含む緩衝液が挙げられる。さらに、前記反応をより促進し易くなるという観点から、硫酸鉄が含まれていることが好ましい。

[0065] 反応温度としても、前記反応を妨げない限り、特に制限はないが、通常 20 ~ 40 °C であり、好ましくは 25 ~ 37 °C である。さらに、反応時間としては、前記不飽和炭化水素化合物が生成し得る時間であればよく、特に制限はないが、通常 30 分 ~ 7 日であり、好ましくは 12 時間 ~ 2 日である。

[0066] また、生成される第 2 の鎖状の不飽和カルボン酸化合物は、公知の回収、精製方法（蒸留、クロマトグラフィー等）を適宜利用し、採取することができる。さらに、これらの方法は単独にて行ってもよく、また適宜組み合わせで多段階的に実施し得る。

[0067] また、原料となる第 1 の鎖状の不飽和カルボン酸化合物は、後述の実施例において示すように、市販の製品として購入することができる。また、当業者であれば、公知の合成方法（例えば、発酵法による L-リジンの製造法（JPH0530985A）に記載の方法）を適宜参酌しながら、合成することもできる。

[0068] ( B e s C )

「 B e s C 」とは、 $\beta$ -エチニルセリン生合成 ( B e s ) に関する 1 の酵素である。当該酵素は、末端のプロピルアミノ基を酸化することにより、当

該基中の炭素－炭素間結合を開裂し、末端に炭素－炭素間二重結合を形成させる反応を、触媒する活性を有する、末端アルケン生成酵素である（非特許文献2）。

[0069] *BesC*の由来としては、第2の鎖状の不飽和カルボン酸化合物の生成を促進する触媒活性を有する限り、特に制限はなく、様々な生物由来のものを用いることができる。例えば、*BesC*の由来としては、*Pseudomonas fluorescens*、*Streptomyces cattleya*が挙げられる。これらの中で、*Pseudomonas fluorescens*由来の*BesC*（配列番号：11に記載のアミノ酸配列からなる*BesC*）が好ましい。

[0070] また、本発明にかかる*BesC*は、配列番号：11に記載のアミノ酸配列との同一性が、15%以上（例えば、16%以上、17%以上、18%以上、19%以上）であることが好ましく、20%以上（例えば、30%以上、40%以上）であることがより好ましく、50%以上（例えば、60%以上、70%以上）であることがさらに好ましく、80%以上（例えば、85%以上、86%以上、87%以上、88%以上、89%以上）であることがより好ましく、90%以上（例えば、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上）であることがより好ましい。なお、配列番号：11に記載のアミノ酸配列との「同一性」とは、本発明にかかる*BesC*のアミノ酸総数に対する、本発明にかかる*BesC*と配列番号：11に記載のアミノ酸配列と一致したアミノ酸数の割合（%）を意味する。

[0071] また、本発明にかかる*BesC*は、配列番号：11に記載のアミノ酸配列に、天然又は非天然（人工的）に変異が導入されているものであってもよい。すなわち、本発明にかかる*BesC*には、*BesC*のアミノ酸配列（配列番号：11に記載のアミノ酸配列等）において1又は複数のアミノ酸が置換、欠失、付加、及び／又は挿入されたアミノ酸配列からなるタンパク質も含まれる。ここで「複数」とは、特に制限はないが、通常2～80個、好まし

くは2～70個、より好ましくは2～60個、さらに好ましくは2～50個、より好ましくは2～40個、さらに好ましくは2～30個、より好ましくは2～20個、さらに好ましくは2～10個（例えば、2～9個、2～8個、2～7個、2～6個、2～5個、2～4個、2～3個、2個）である。

[0072] なお、Be s C、又は、その天然若しくは非天然の変異体が、第2の鎖状の不飽和カルボン酸化合物を生成する触媒活性を有するか否かは、当業者であれば、公知の手法（例えば、クロマトグラフィー質量分析）により、生成される当該不飽和カルボン酸化合物の量を直接測定することにより判定することができる。

[0073] また、本発明にかかるBe s Cは、上述の本発明にかかるフェニルアラニンアンモニアリアーゼ同様に、他の化合物が直接又は間接的に付加されていてもよい。さらにまた、本発明にかかるBe s Cは、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ同様に、他の成分と混合して用いてもよい。

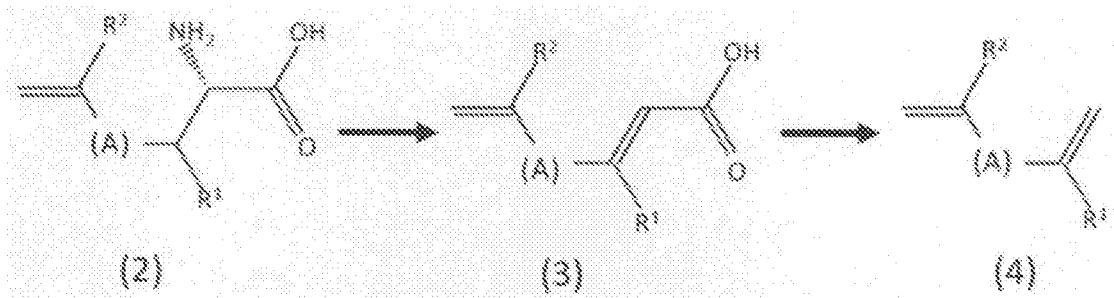
[0074] <鎖状の不飽和炭化水素化合物の製造方法>

後述の実施例に示すとおり、本発明者らは、上述の第3の鎖状の不飽和カルボン酸化合物から、両末端に炭素－炭素間二重結合を有する鎖状の不飽和炭化水素化合物を、生成できることも見出している。

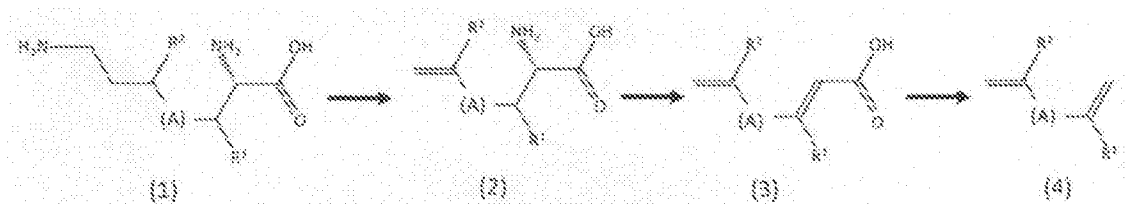
[0075] すなわち、上述のとおり、フェニルアラニンアンモニアリアーゼを用いることによって、下記式（2）で表される第2の鎖状の不飽和カルボン酸化合物から、下記式（3）で表される第3の鎖状の不飽和カルボン酸化合物を製造する工程と、当該不飽和カルボン酸化合物から、フェルラ酸デカルボキシラーゼを用いることによって、カルボキシル基を脱離させることによって、下記式（4）で表される鎖状の不飽和炭化水素化合物又はその幾何異性体（以下、単に「鎖状の不飽和炭化水素化合物」とも称する）を製造する工程とを含む、下記に示す製造方法の態様もとり得る。

[0076]

## [化10]



## [0077] [化11]



[0078] 本発明において、前記反応において生成される「鎖状の不飽和炭化水素化合物」としては、両末端に炭素-炭素間二重結合を有する、前記式(4)で表される鎖状の不飽和炭化水素化合物又はその幾何異性体を意味する。

[0079] 当該化合物において(A)及びR<sup>1</sup>については、それらの好適な態様含め、上述のとおりであるが、「鎖状の不飽和炭化水素化合物」として、好ましくは、ブタジエン、イソプレンである。

[0080] 本発明にかかるフェルラ酸デカルボキシラーゼの存在下、第3の鎖状の不飽和カルボン酸化合物を脱炭酸させる条件については、当該脱炭酸が促進され、不飽和炭化水素化合物が生成される条件であればよく、当業者であれば、反応液の組成、反応液のpH、反応温度、反応時間等を適宜調整し、設定することができる。

[0081] 例えば、本発明にかかるフェルラ酸デカルボキシラーゼと、その基質である不飽和炭化水素ジカルボン酸化合物が添加される反応液としては、前記反応を妨げない限り、特に制限はないが、好ましくはpH6~8の緩衝液が挙げられ、より好ましくはpH6~7の塩化カリウム及びリン酸ナトリウムを含む緩衝液が挙げられる。さらに、前記反応をより促進し易くなるという観点から、プレニル化されたフラビンモノヌクレオチド(p r FMN)又はそ

のアイソマー（ $p r F M N^{k e t i m i n e}$ 、 $p r F M N^{i m i n i u}$ 、これら  $p r F M N$  及びそのアイソマーについては、非特許文献 1 参照のほど）が含まれていることが好ましい。

[0082] また、反応温度としても、前記反応を妨げない限り、特に制限はないが、通常 20～40℃であり、好ましくは 25～37℃である。さらに、反応時間としては、前記不飽和炭化水素化合物が生成し得る時間であればよく、特に制限はないが、通常 30分～7日であり、好ましくは 12時間～2日である。

[0083] また、このような条件にて生成される鎖状の不飽和炭化水素化合物は、大概気化し易いため、揮発性ガスの公知の回収、精製方法により採取することができる。かかる採取方法としては、ガストリッピング、分留、吸着、脱着、パーベーパーション、固相に吸着させた不飽和炭化水素化合物の熱若しくは真空による固相からの脱着、溶媒による抽出、又はクロマトグラフィー（例えば、ガスクロマトグラフィー）等が挙げられる。また、生成される不飽和炭化水素化合物が液体である場合にも、公知の回収、精製方法（蒸留、クロマトグラフィー等）を適宜利用し、採取することができる。さらに、これらの方法は単独にて行ってもよく、また適宜組み合わせで多段階的に実施し得る。

[0084] （フェルラ酸デカルボキシラーゼ）

「フェルラ酸デカルボキシラーゼ」とは、EC 番号：4. 1. 1. 102 として登録されている酵素であり、通常、フェルラ酸を脱炭酸して 4-ビニルグアイヤコール（4VG）を生成する反応を、触媒する酵素を意味する。

[0085] 本発明において、「フェルラ酸デカルボキシラーゼ」は、第 3 の鎖状の不飽和カルボン酸化合物からカルボキシル基を脱離させ、鎖状の不飽和炭化水素化合物を生成する反応を、触媒する活性を有するものであれば、特に制限はなく、様々な生物由来のものを用いることができる。例えば、特許文献 3 の表 1～6 に示されるような、UNIPROT 上で「*Ferulic acid decarboxylase*」に該当するタンパク質が挙げられる。

また、本発明にかかるフェルラ酸デカルボキシラーゼとして、好ましくは、サッカロミケス由来のフェルラ酸デカルボキシラーゼ、コウジカビ由来のフェルラ酸デカルボキシラーゼ (UNIPROT ID: A2QHE5等) が挙げられ、より好ましくはサッカロミケス由来のフェルラ酸デカルボキシラーゼが挙げられる。なお、「サッカロミケス」とは、*Saccharomyces* (サッカロミケス) 属に属する細菌を意味し、例えば、*Saccharomyces cerevisiae*、*Saccharomyces kudriavzevii*、*Saccharomyces eubayanus*、*Saccharomyces bayanus*、*Saccharomyces boulardii*、*Saccharomyces bulderi*、*Saccharomyces cariocanus*、*Saccharomyces cariocus*、*Saccharomyces chevalieri*、*Saccharomyces dairenensis*、*Saccharomyces ellipsoideus*、*Saccharomyces florentinus*、*Saccharomyces kluyveri*、*Saccharomyces martiniae*、*Saccharomyces monacensis*、*Saccharomyces norbensis*、*Saccharomyces paradoxus*、*Saccharomyces pastorianus*、*Saccharomyces spencerorum*、*Saccharomyces turicensis*、*Saccharomyces unisporus*、*Saccharomyces uvarum*、*Saccharomyces zonatus* が挙げられる。

[0086] サッカロミケス由来のフェルラ酸デカルボキシラーゼとして、例えば、*Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 204508/S288c株) (パン酵母) 由来のFDC (UNIPROT ID: Q03034、配列番号: 13に記載のアミノ酸配列からなるフェルラ酸デカルボキシラーゼ) の他、UNIPROT上で「Ferulic acid

「decarboxylase」に該当するサッカロミケス由来のタンパク質が挙げられ、より具体的には、下記表1に記載のフェルラ酸デカルボキシラーゼが挙げられる。なお、自然界においてヌクレオチド配列が変異することにより、タンパク質のアミノ酸配列の変化が生じ得ることは理解されたい。

[0087] [表1]

Uniprot_ID	Entry Name	由来
Q03034	FDC1_YEAST	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (strain ATCC 204508 / S288c) (Baker's yeast)
H0GEV0	H0GEV0_SACCK	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> x <i>Saccharomyces kudriavzevii</i> (strain VN7)
E9P8F2	E9P8F2_YEASX	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
E9P8F1	E9P8F1_YEASX	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
A6ZZC4	A6ZZC4_YEAS7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (strain YJM769)
N1P7L1	N1P7L1_YEASC	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain CEN.PK113-7D
H0GTK3	H0GTK3_SACCK	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> x <i>Saccharomyces kudriavzevii</i> (strain VN7)
J8TRN5	J8TRN5_SACK1	<i>Saccharomyces kudriavzevii</i> (strain ATCC MYA-4449 / AS 2.2409 / CBS 8840 / NBRC 1802 / NCYC 2889)
A0A0L8RE03	A0A0L8RE03_SACEU	<i>Saccharomyces eubayanus</i>

[0088] また、本発明にかかるフェルラ酸デカルボキシラーゼは、配列番号：13に記載のアミノ酸配列との同一性が、15%以上（例えば、16%以上、17%以上、18%以上、19%以上）であることが好ましく、20%以上（例えば、30%以上、40%以上）であることがより好ましく、50%以上（例えば、60%以上、70%以上）であることがさらに好ましく、80%以上（例えば、85%以上、86%以上、87%以上、88%以上、89%

以上)であることがより好ましく、90%以上(例えば、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上)であることがより好ましい。なお、配列番号:13に記載のアミノ酸配列との「同一性」とは、本発明にかかるフェルラ酸デカルボキシラーゼのアミノ酸総数に対する、本発明にかかるフェルラ酸デカルボキシラーゼと配列番号:13に記載のアミノ酸配列と一致したアミノ酸数の割合(%)を意味する。

[0089] また、本発明にかかるフェルラ酸デカルボキシラーゼは、配列番号:13に記載のアミノ酸配列に変異が導入されているものであってもよい。すなわち、本発明にかかるフェルラ酸デカルボキシラーゼには、フェルラ酸デカルボキシラーゼのアミノ酸配列(配列番号:13に記載のアミノ酸配列等)において1又は複数のアミノ酸が置換、欠失、付加、及び/又は挿入されたアミノ酸配列からなるタンパク質も含まれる。ここで「複数」とは、特に制限はないが、通常2~150個、好ましくは2~100個、より好ましくは2~80個、さらに好ましくは2~50個、より好ましくは2~30個、さらに好ましくは2~20個、より好ましくは2~10個(例えば、2~9個、2~8個、2~7個、2~6個、2~5個、2~4個、2~3個、2個)である。また、かかるフェルラ酸デカルボキシラーゼ変異体は、天然又は非天然(人工的)に生じるものであってもよい。すなわち、人工的にアミノ酸置換等が導入された、フェルラ酸デカルボキシラーゼ改変体も含まれる。

[0090] なお、フェルラ酸デカルボキシラーゼ、又は、その天然若しくは非天然の変異体が、鎖状の不飽和炭化水素化合物を生成する触媒活性を有するか否かは、当業者であれば、例えば、後述の実施例に示すとおり、ガスクロマトグラフィー質量分析(GC-MS)にて、不飽和炭化水素化合物の量を直接測定することにより判定することができる。

[0091] また、本発明にかかるフェルラ酸デカルボキシラーゼは、上述の本発明にかかるフェニルアラニンアンモニアリアーゼ同様に、他の化合物が直接又は間接的に付加されていてもよい。さらにまた、本発明にかかるフェルラ酸デ

カルボキシラーゼは、フェニルアラニンアンモリアーゼ同様に、他の成分と混合して用いてもよい。

[0092] <本発明にかかる酵素をコードするDNA、及び該DNAを有するベクター>

次に、本発明にかかる酵素（本発明にかかるフェニルアラニンアンモリアーゼ、本発明にかかるBesC、本発明にかかるフェルラ酸デカルボキシラーゼ）をコードするDNA等について説明する。かかるDNAを導入することによって、宿主細胞の形質を転換し、本発明にかかる各種酵素を当該細胞において製造させること、ひいては第3の鎖状の不飽和カルボン酸化合物、又は鎖状の不飽和炭化水素化合物を製造させることが可能となる。

[0093] 本発明にかかるDNAは、上述の本発明にかかる酵素をコードする限り、天然のDNAであってもよく、天然のDNAに人為的に変異が導入されたDNAであってもよく、人工的に設計されたヌクレオチド配列からなるDNAであってもよい。さらに、その形態について特に制限はなく、cDNAの他、ゲノムDNA、及び化学合成DNAが含まれる。これらDNAの調製は、当業者にとって常套手段を利用して行うことが可能である。ゲノムDNAは、例えば、各種細菌からゲノムDNAを抽出し、ゲノミックライブラリー（ベクターとしては、プラスミド、ファージ、コスミド、BAC、PAC等が利用できる）を作製し、これを展開して、本発明にかかる酵素をコードする遺伝子のヌクレオチド配列（例えば、配列番号：1に記載のヌクレオチド配列）を基に調製したプローブを用いてコロニーハイブリダイゼーションあるいはプラークハイブリダイゼーションを行うことにより調製することが可能である。また、本発明にかかる酵素をコードする遺伝子に特異的なプライマーを作製し、これを利用したPCRを行うことにより調製することも可能である。また、cDNAは、例えば、各種細菌から抽出したmRNAを基にcDNAを合成し、これをλZAP等のベクターに挿入してcDNAライブラリーを作製し、これを展開して、上記と同様にコロニーハイブリダイゼーションあるいはプラークハイブリダイゼーションを行うことにより、また、

PCRを行うことにより調製することが可能である。

[0094] そして、このように調製したDNAに、必要に応じ、上述のアミノ酸置換をコードする変異を導入することは、当業者であれば、公知の部異特異的変異導入法を利用することで行うことができる。部異特異的変異導入法としては、例えば、Kunkel法 (Kunkel, T. A., Proc Natl Acad Sci USA, 1985年、82巻、2号、488~492ページ)、SOE (splicing-by-overlap-extension)-PCR法 (Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K., and Pease, L. R., Gene, 1989年、77巻、51~59ページ) が挙げられる。

[0095] また、当業者であれば、上述のアミノ酸置換が導入されたタンパク質をコードするヌクレオチド配列を人工的に設計し、該配列情報に基づき、自動核酸合成機を用いて、本発明にかかるDNAを化学的に合成することもできる。

[0096] さらに、本発明にかかるDNAは、コードする本発明にかかるデカルボキシラーゼの発現効率を宿主細胞においてより向上させるという観点から、当該宿主細胞の種類に合わせて、コドン最適化した本発明にかかる酵素をコードするDNAの態様もとり得る。

[0097] また、本発明においては、前述のDNAを宿主細胞内において複製することができるよう、当該DNAが挿入されているベクターの態様もとり得る。

[0098] 本発明において「ベクター」は、自己複製ベクター、すなわち、染色体外の独立体として存在し、その複製が染色体の複製に依存しない、例えば、プラスミドを基本に構築することができる。また、ベクターは、宿主細胞に導入されたとき、その宿主細胞のゲノム中に組み込まれ、それが組み込まれた染色体と一緒に複製されるものであってもよい。

[0099] このようなベクターとしては、例えば、プラスミド、ファージDNAが挙げられる。また、プラスミドとしては、大腸菌由来のプラスミド (pET22、pBR322、pBR325、pUC118、pUC119、pUC1

8、pUC19等)、酵母由来のプラスミド(YE p13、YE p24、YC p50等)、枯草菌由来のプラスミド(pUB110、pTP5等)が挙げられる。ファージDNAとしてはλファージ(Charon4A、Charon21A、EMBL3、EMBL4、λgt10、λgt11、λZAP等)が挙げられる。さらに、宿主細胞が昆虫由来であれば、バキュロウイルス等の昆虫ウイルスベクターを、植物由来であればT-DNA等、動物由来であればレトロウイルス、アデノウイルスベクター等の動物ウイルスベクターも、本発明にかかるベクターとして用いることもできる。また、本発明にかかるベクター構築の手順及び方法は、遺伝子工学の分野で慣用されているものを用いることができる。例えば、本発明にかかるDNAをベクターに挿入するには、まず、精製されたDNAを適当な制限酵素で切断し、適当なベクターの制限酵素部位又はマルチクローニングサイトに挿入してベクターに連結する方法等が採用される。

[0100] また、本発明にかかるベクターは、前記DNAがコードする本発明にかかる酵素を宿主細胞内にて発現可能な状態で含んでなる発現ベクターの形態であってもよい。本発明にかかる「発現ベクター」は、これを宿主細胞に導入して本発明にかかる酵素を発現させるために、前記DNAの他に、その発現を制御するDNA配列や形質転換された宿主細胞を選択するための遺伝子マーカー等を含むことが望ましい。発現を制御するDNA配列としては、プロモーター、エンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、リボソーム結合配列(SD配列)及びターミネーター等がこれに含まれる。プロモーターは宿主細胞において転写活性を示すものであれば特に限定されず、宿主細胞と同種若しくは異種のいずれかのタンパク質をコードする遺伝子の発現を制御するDNA配列として得ることができる。また、前記発現を制御するDNA配列以外に発現を誘導するDNA配列を含んでも良い。かかる発現を誘導するDNA配列としては、宿主細胞が細菌である場合には、イソプロピルーβ-D-チオガラクトピラノシド(IPTG)の添加により、下流に配置された遺伝子の発現を誘導することのできるラクトースオペ

ロンが挙げられる。本発明における遺伝子マーカーは、形質転換された宿主細胞の選択の方法に応じて適宜選択されてよいが、例えば薬剤耐性をコードする遺伝子、栄養要求性を相補する遺伝子を利用することができる。

[0101] ベクターには、本発明にかかる酵素をコードするDNAが1種ずつ挿入されていてもよく、また複数種のDNAを1のベクターに挿入してもよい。ベクターに複数種のDNAを挿入する場合において、一つのベクターに複数種のDNAが挿入される場合、これらのDNAはオペロンを形成することが好ましい。ここで「オペロン」とは、同一のプロモーターの制御下に転写される1又は複数の遺伝子から構成される核酸配列単位である。

[0102] 本発明において、かかるベクターの態様としては、  
本発明にかかるフェニルアラニンアンモリアーゼをコードするDNAが挿入されているベクター、  
本発明にかかるB e s CをコードするDNAが挿入されているベクターと、  
本発明にかかるフェニルアラニンアンモリアーゼをコードするDNAが挿入されているベクターとの組み合わせ、  
本発明にかかるフェニルアラニンアンモリアーゼをコードするDNAが挿入されているベクターと、本発明にかかるフェルラ酸デカルボキシラーゼをコードするDNAが挿入されているベクターとの組み合わせ、又は  
本発明にかかるB e s CをコードするDNAが挿入されているベクターと、  
本発明にかかるフェニルアラニンアンモリアーゼをコードするDNAが挿入されているベクターと、本発明にかかるフェルラ酸デカルボキシラーゼをコードするDNAが挿入されているベクターとの組み合わせが、挙げられる。

また、本発明にかかるB e s CをコードするDNAと、本発明にかかるフェニルアラニンアンモリアーゼをコードするDNAとが挿入されているベクター、

本発明にかかるフェニルアラニンアンモリアーゼをコードするDNAと、本発明にかかるフェルラ酸デカルボキシラーゼとが挿入されているベクター

一、又は

本発明にかかる B e s C をコードする D N A と、本発明にかかるフェニルアラニンアンモニアリアーゼをコードする D N A と、本発明にかかるフェルラ酸デカルボキシラーゼとが挿入されているベクターも、挙げることができる。

[0103] また、本発明にかかる D N A 又はベクターは、他の成分と混合して用いてもよい。他の成分としては特に制限はなく、例えば、滅菌水、生理食塩水、植物油、界面活性剤、脂質、溶解補助剤、緩衝剤、D N a s e 阻害剤、保存剤が挙げられる。

[0104] <第3の鎖状の不飽和カルボン酸化合物、又は鎖状の不飽和炭化水素化合物の生成を促進するための剤>

上述のとおり、本発明にかかる酵素、該酵素をコードする D N A 又は該 D N A が挿入されているベクターを用いることにより、第3の鎖状の不飽和カルボン酸化合物、又は鎖状の不飽和炭化水素化合物の生成を促進することが可能となる。

[0105] したがって、本発明は、本発明にかかる酵素、該酵素をコードする D N A 又は該 D N A が挿入されているベクターを含む、第3の鎖状の不飽和カルボン酸化合物、又は鎖状の不飽和炭化水素化合物の生成を促進するための剤を提供する。

[0106] より具体的には、以下の態様が挙げられる

本発明にかかるフェニルアラニンアンモニアリアーゼ、該酵素をコードする D N A 又は該 D N A が挿入されているベクターを含む、第2の鎖状の不飽和カルボン酸化合物から第3の鎖状の不飽和カルボン酸化合物の生成を促進するための剤、

本発明にかかる B e s C、該酵素をコードする D N A 又は該 D N A が挿入されているベクターと、本発明にかかるフェニルアラニンアンモニアリアーゼ、該酵素をコードする D N A 又は該 D N A が挿入されているベクターとを含む、第1の鎖状の不飽和カルボン酸化合物から第3の鎖状の不飽和カルボ

ン酸化合物の生成を促進するための剤、

本発明にかかる B e s C をコードする DNA と、本発明にかかるフェニルアラニンアンモリアーゼをコードする DNA とが挿入されているベクターを含む、第 1 の鎖状の不飽和カルボン酸化合物から第 3 の鎖状の不飽和カルボン酸化合物の生成を促進するための剤、

本発明にかかるフェニルアラニンアンモリアーゼ、該酵素をコードする DNA 又は該 DNA が挿入されているベクターと、本発明にかかるフェルラ酸デカルボキシラーゼ、該酵素をコードする DNA 又は該 DNA が挿入されているベクターとを含む、第 2 の鎖状の不飽和カルボン酸化合物から鎖状の不飽和炭化水素化合物の生成を促進するための剤、

本発明にかかるフェニルアラニンアンモリアーゼをコードする DNA と、本発明にかかるフェルラ酸デカルボキシラーゼをコードする DNA とが挿入されているベクターを含む、第 2 の鎖状の不飽和カルボン酸化合物から鎖状の不飽和炭化水素化合物の生成を促進するための剤、

本発明にかかる B e s C、該酵素をコードする DNA 又は該 DNA が挿入されているベクターと、本発明にかかるフェニルアラニンアンモリアーゼ、該酵素をコードする DNA 又は該 DNA が挿入されているベクターと、本発明にかかるフェルラ酸デカルボキシラーゼ、該酵素をコードする DNA 又は該 DNA が挿入されているベクターとを含む、第 1 の鎖状の不飽和カルボン酸化合物から鎖状の不飽和炭化水素化合物の生成を促進するための剤、

本発明にかかる B e s C をコードする DNA と、本発明にかかるフェニルアラニンアンモリアーゼをコードする DNA と、本発明にかかるフェルラ酸デカルボキシラーゼをコードする DNA とが挿入されているベクターを含む、第 1 の鎖状の不飽和カルボン酸化合物から鎖状の不飽和炭化水素化合物の生成を促進するための剤。

[0107] このような剤としては、本発明にかかる酵素等を含むものであれば良いが、他の成分と混合して用いてもよい。かかる他の成分としては特に制限はなく、例えば、滅菌水、生理食塩水、植物油、界面活性剤、脂質、溶解補助剤

、緩衝剤、プロテアーゼ阻害剤、DNase阻害剤、保存剤が挙げられる。

[0108] また、本発明は、このような剤を含むキットをも提供することができる。本発明のキットにおいて、上記剤は、本発明にかかるDNA等が導入され、形質転換された、後述の宿主細胞の態様にて含まれていてもよい。さらに、このような剤の他、各種基質（第1の鎖状の不飽和カルボン酸化合物、第2の鎖状の不飽和カルボン酸化合物）、本発明にかかるDNA等を導入するための宿主細胞、該宿主細胞を培養するための培地、及びそれらの使用説明書等が、本発明のキットに含まれていてもよい。また、このような使用説明書は、本発明の剤等を上述の第3の鎖状の不飽和カルボン酸化合物又は鎖状の不飽和炭化水素化合物の製造方法に利用するための説明書である。説明書は、例えば、本発明の製造方法の実験手法や実験条件、及び本発明の剤等に関する情報（例えば、ベクターのヌクレオチド配列等が示されているベクターマップ等の情報、本発明にかかる酵素の配列情報、宿主細胞の由来、性質、当該宿主細胞の培養条件等の情報）を含むことができる。

[0109] <本発明にかかる酵素をコードするDNA等が導入された宿主細胞>

次に、本発明にかかるDNA又はベクターが導入された宿主細胞について説明する。前述のDNA又はベクターの導入によって形質転換された宿主細胞を用いれば、本発明にかかる酵素を製造することが可能となり、ひいては、第3の鎖状の不飽和カルボン酸化合物、又は鎖状の不飽和炭化水素化合物を製造させることも可能となる。

[0110] 本発明にかかるDNA又はベクターが導入される宿主細胞は特に限定されず、例えば、微生物（大腸菌、出芽酵母、分裂酵母、枯草菌、放線菌、糸状菌等）、植物細胞、昆虫細胞、動物細胞が挙げられるが、比較的安価な培地にて、短時間にて高い増殖性を示し、ひいては生産性高い、第3の鎖状の不飽和カルボン酸化合物、又は鎖状の不飽和炭化水素化合物の製造に寄与し得るという観点から、微生物を宿主細胞として利用することが好ましく、大腸菌を利用することがより好ましい。

[0111] また、本発明にかかるDNA又はベクターが導入される宿主細胞は、フラ

ビンモノヌクレオチド (FMN) のプレニル化を誘導し、鎖状の不飽和炭化水素化合物の生産性向上に寄与する p r FMN 又はそのアイソマーを産生するという観点から、フラビンプレニルトランスフェラーゼを保持する細胞であることが好ましい。

[0112] また、本発明にかかる DNA 又はベクターが導入される宿主細胞は、扱いが容易であり、毒性タンパク質の発現が可能であるとの観点から、大腸菌 C 4 1 (D E 3) 細胞が好ましい。

[0113] 本発明にかかる DNA 又はベクターの導入も、この分野で慣用されている方法に従い実施することができる。例えば、大腸菌等の微生物への導入方法としては、ヒートショック法、エレクトロポレーション法、スフェロプラスト法、酢酸リチウム法が挙げられ、植物細胞への導入方法としては、アグロバクテリウムを用いる方法やパーティクルガン法が挙げられ、昆虫細胞への導入方法としては、バキュロウィルスを用いる方法やエレクトロポレーション法が挙げられ、動物細胞への導入方法としては、リン酸カルシウム法、リポフェクション法、エレクトロポレーション法が挙げられる。

[0114] このようにして宿主細胞内に導入された DNA 等は、宿主細胞内において、そのゲノム DNA にランダムに挿入されることによって保持されてもよく、相同組み換えによって保持されてもよく、またベクターであれば、そのゲノム DNA 外の独立体として複製され保持し得る。

[0115] <宿主細胞を用いた、第 3 の鎖状の不飽和カルボン酸化合物、又は鎖状の不飽和炭化水素化合物の製造方法>

上述のとおり、本発明にかかる酵素を発現するように形質転換された宿主細胞を、培養することにより、第 3 の鎖状の不飽和カルボン酸化合物又は鎖状の不飽和炭化水素化合物を製造することができる。したがって、本発明においては、本発明にかかる酵素をコードする DNA 又はベクターが導入された宿主細胞を培養し、該宿主細胞及び／又はその培養物において生成された、第 3 の鎖状の不飽和カルボン酸化合物又は鎖状の不飽和炭化水素化合物を採取する工程を含む、第 3 の鎖状の不飽和カルボン酸化合物又は鎖状の不飽

和炭化水素化合物の製造方法も提供される。

[0116] 「本発明にかかる酵素を発現するように形質転換された宿主細胞」については、上述のとおりである。また、かかる宿主細胞において発現又は保持させる、本発明にかかる酵素、該酵素をコードするDNA、及び該DNAが挿入されたベクターの組み合わせは、上述の<本発明にかかる酵素をコードするDNA、及び該DNAを有するベクター>及び<第3の鎖状の不飽和カルボン酸化合物、又は鎖状の不飽和炭化水素化合物の生成を促進するための剤>に示した例に基づき、出発とする材料（基質）及び最終生成物の組み合わせを鑑み、当業者であれば適宜設計変更することができる。

[0117] 前記細胞の培養条件については、後述のとおりであるが、培地には、各種基質（第1の鎖状の不飽和カルボン酸化合物、第2の鎖状の不飽和カルボン酸化合物）が添加されていることが好ましい。培養温度は、用いる宿主細胞の種類に合わせて適宜設計変更し得るが、通常20～40℃であり、好ましくは25～37℃である。

[0118] 本発明において、「培養物」とは、宿主細胞を培地で培養することによって得られる、増殖した宿主細胞、該宿主細胞の分泌産物及び該宿主細胞の代謝産物等を含有する培地のことであり、それらの希釈物、濃縮物を含む。このような宿主細胞及び／又は培養物からの、第3の鎖状の不飽和カルボン酸化合物又は鎖状の不飽和炭化水素化合物の採取についても、特に制限はなく、上述の公知の回収、精製方法を用いて行うことができる。また、採取の時期としては、用いる宿主細胞の種類に合わせて適宜調整され、第3の鎖状の不飽和カルボン酸化合物又は鎖状の不飽和炭化水素化合物が生成し得る時間であればよいが、通常30分～7日であり、好ましくは12時間～2日である。

[0119] <本発明にかかるフェニルアラニンアンモリアーゼ改変体の製造方法>

後述の実施例に示す通り、本発明にかかるフェニルアラニンアンモリアーゼ改変体をコードするDNA等が導入された宿主細胞を培養することに

より、該宿主細胞内にて当該改変体を製造することができる。

[0120] したがって、本発明は、本発明にかかるフェニルアラニンアンモニアリアーゼ改変体をコードするDNA又は該DNAを含むベクターが導入された宿主細胞を培養し、該宿主細胞に発現したタンパク質を採取する工程を含む、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ改変体の製造方法をも提供することができる。

[0121] 本発明において、「宿主細胞を培養する」条件は、前記宿主細胞が本発明にかかるフェニルアラニンアンモニアリアーゼ改変体を製造できる条件であればよく、当業者であれば、宿主細胞の種類、用いる培地等に合わせて、温度、空気の添加の有無、酸素の濃度、二酸化炭素の濃度、培地のpH、培養温度、培養時間、湿度等を適宜調整し、設定することができる。

[0122] かかる培地としては、宿主細胞が資化し得るものが含有されていればよく、炭素源、窒素源、硫黄源、無機塩類、金属、ペプトン、酵母エキス、肉エキス、カゼイン加水分解物、血清等が含有物として挙げられる。また、かかる培地には、例えば、本発明にかかるフェニルアラニンアンモニアリアーゼ改変体をコードするDNAの発現を誘導するためのIPTGや、本発明にかかるベクターがコードし得る薬剤耐性遺伝子に対応する抗生物質（例えば、アンピシリン）や、本発明にかかるベクターがコードし得る栄養要求性を相補する遺伝子に対応する栄養物（例えば、アルギニン、ヒスチジン）を添加してもよい。

[0123] そして、このようにして培養した宿主細胞から、「該細胞に発現したタンパク質を採取する」方法としては、例えば、宿主細胞を濾過、遠心分離等により培地から回収し、回収した宿主細胞を、細胞溶解、磨砕処理又は加圧破砕等によって処理し、さらに、限外濾過処理、塩析、硫酸沈殿等の溶媒沈殿、クロマトグラフィー（例えば、ゲルクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー）等によって、宿主細胞において発現したタンパク質を精製、濃縮する方法が挙げられる。また、本発明にかかるフェニルアラニンアンモニアリアーゼ改変体に、前述の精製

タグタンパク質が付加されている場合には、該タグタンパク質が吸着する基質を用いて精製し、採取することもできる。さらに、これらの精製、濃縮方法は単独にて行ってもよく、また適宜組み合わせで多段階的に実施し得る。

[0124] また、本発明にかかるフェニルアラニンアンモニアリアーゼ改変体は、上記生物学的合成に限定されることなく、本発明にかかるDNA等及び無細胞タンパク質合成系を用いても製造することができる。かかる無細胞タンパク質合成系としては特に制限はないが、例えば、コムギ胚芽由来、大腸菌由来、ウサギ網状赤血球由来、昆虫細胞由来の合成系が挙げられる。さらに、当業者であれば、市販のペプチド合成機等を用い、本発明にかかるフェニルアラニンアンモニアリアーゼ改変体を化学的に合成することもできる。

[0125] また、本発明は、第2の鎖状の不飽和カルボン酸化合物から第3の鎖状の不飽和カルボン酸化合物を生成する触媒活性が高められたフェニルアラニンアンモニアリアーゼ改変体の製造方法であって、フェニルアラニンアンモニアリアーゼにおいて、下記(1)～(5)のうちの少なくとも1のアミノ酸置換を導入する工程を含む、製造方法をも提供する。

(1) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列の108位又は該部位に対応するアミノ酸を、メチオニン、フェニルアラニン若しくはバリンに置換、

(2) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列の107位又は該部位に対応するアミノ酸を、トリプトファンに置換、

(3) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列の219位又は該部位に対応するアミノ酸を、イソロイシンに置換、

(4) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列の223位又は該部位に対応するアミノ酸を、イソロイシンに置換、

(5) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列の104位又は該部位に対応するアミノ酸を、アラニンに置換。

[0126] 「第2の鎖状の不飽和カルボン酸化合物から第3の鎖状の不飽和カルボン酸化合物を生成する触媒活性が高められたフェニルアラニンアンモニアリアーゼ改変体」とは、前記アミノ酸置換が導入されることにより、前記導入前

と比較して第3の鎖状の不飽和カルボン酸化合物を生成する触媒活性が高いフェニルアラニンアンモリアラーゼを意味し、その比較対象は通常、上記様々な生物由来のフェニルアラニンアンモリアラーゼ及びその天然の変異体である。

[0127] フェニルアラニンアンモリアラーゼにおける「アミノ酸置換の導入」は、コードするDNAの改変によって行うことができる。このような「DNAの改変」は、上記の通り、当業者においては公知の方法、例えば、部位特異的変異誘発法、改変された配列情報に基づくDNAの化学的合成法を用いて、適宜実施することが可能である。また、「アミノ酸置換の導入」は、上述の通り、ペプチドの化学的合成法を用いても行うことができる。

[0128] このようなアミノ酸置換導入によって、オレフィン化合物を生成する触媒活性が高められたかどうかは、上記の通り、クロマトグラフィー質量分析等により評価することができる。また、このようにして製造されるフェニルアラニンアンモリアラーゼ改変体は、第3の鎖状の不飽和カルボン酸化合物を生成する触媒活性において、配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなるフェニルアラニンアンモリアラーゼに対し、1.2倍以上（1.3倍以上、1.4倍以上、1.5倍以上、1.6倍以上、1.7倍以上、1.8倍以上、1.9倍以上）であることが好ましく、2倍以上であることがより好ましく、3倍以上であることがさらに好ましく、4倍以上であることがより好ましく、5倍以上であることがさらに好ましい。

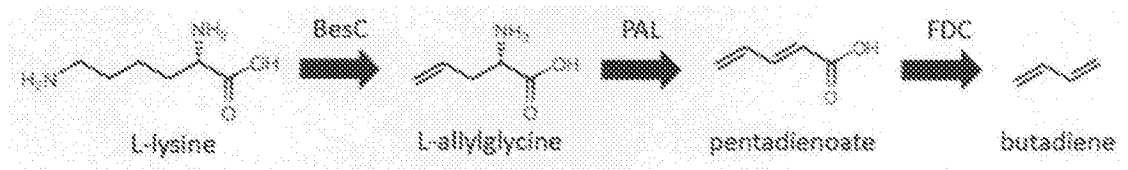
### 実施例

[0129] 以下、実施例に基づいて本発明をより具体的に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

[0130] 本発明者らは、3種（BesC、PAL、FDC）の酵素を用いた3段階の反応にて、L-リジンを出発材料としてブタジエンを生成する、下記反応スキームを構想した。

[0131]

[化12]



[0132] そこで、この反応スキームについて以下のとおりにして実証実験を行った。

[0133] (実施例1)

<プラスミドベクターの調製>

先ず、*Pseudomonas fluorescens*由来BesC、*Arabidopsis thaliana*由来のPAL、そして*Saccharomyces cerevisiae*由来のFDCを大腸菌にて効率良く発現させるために、大腸菌におけるコドンの使用頻度を考慮して改変したヌクレオチド配列を設計した。次いで、かかる改変ヌクレオチド配列からなるDNAを常法に沿って化学合成した。そして、このようにして調製したDNAとpET22b(+)ベクター(Novagen社製)を、Gibson Assembly法(New England Biolabs社のキットNEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix(登録商標)を使用)により連結することによって、当該各種野生型遺伝子を大腸菌において各々発現可能なプラスミドベクター(BesCベクター、PALベクター、FDCベクター1)として調製した。同様に、大腸菌(K-12)株からフラビンプレニルトランスフェラーゼ(以下「UbiX」とも称する)をコードする遺伝子(配列番号:15)をPCR法により増幅したDNAとpColADuetベクター(Novagen社製)を、Gibson Assembly法により連結することにより、当該野生型のUbiXを大腸菌において発現可能なプラスミドベクター(UbiXベクター)を調製した。

[0134] なお、実施例1及び後述の実施例2にて用いた各酵素のアミノ酸配列、それをコードするDNA配列(野生型の配列、大腸菌におけるコドンの使用頻

度を考慮して改変された配列) は、下記表 2 に示す配列番号に記載の配列を参照のほど。

[0135] [表2]

	アミノ酸配列	野生型のDNA配列	コドンが最適化されたDNA配列
AvPAL	配列番号:2	配列番号:1	配列番号:3
PpPAL	配列番号:5	配列番号:4	配列番号:6
AtPAL	配列番号:6	配列番号:7	配列番号:9
PIBesC	配列番号:11	—	配列番号:10
ScFDC	配列番号:13	配列番号:12	配列番号:14
UbxX	配列番号:16	配列番号:15	—

[0136] <酵素発現用培地の調製及び酵素活性の測定>

前記のとおり調製したベクター (5  $\mu$ g の BesC ベクター、又は 5  $\mu$ g の PAL ベクター) を、大腸菌 C41 (DE3) 株 (Lucigen Corporation 社製、100  $\mu$ L) に、ヒートショック法により導入し、野生型の BesC 又は PAL を発現する形質転換体を調製した。そして、これら形質転換体を各々、アンピシリンを添加した LB 培地にて 6 時間培養した。なお、かかる 6 時間の培養 (前培養) により、これら形質転換体の増殖は頭打ちとなる。そのため、後述の酵素反応開始時点での菌体量は、これら形質転換体間において均一となる。

[0137] また、12 g/L トリプトン、24 g/L イーストエクストラクト、10 g/L グリセロール、9.4 g/L リン酸水素二カリウム、2.2 g/L リン酸二水素カリウム、20 g/L ラクトース、100 mg/L アンピシリンとなるように添加し、酵素発現用培地を調製した。

[0138] 500 mL バッフル付き三角フラスコに、前記 6 時間培養した大腸菌培養液 1 mL と前記酵素発現用培地 100 mL とを添加し、37°C、振盪速度 180 rpm にて更に 18 時間培養した。培養後の培地を 5,000 rpm で 10 分間遠心分離し、上清を除去した後、タンパク質抽出溶液 B-PERT<sup>M</sup> Bacterial Cell Lysis Reagent (サーモフィッシャーサイエンティフィック社) を 10 mL 添加し、ペレットを懸濁さ

せた。氷浴上で浸透速度60rpmにて振盪させたあと、15,000rpmで15分間遠心分離することで、各種細胞溶解液を調製した。

[0139] 同様に、調製したベクター（5 $\mu$ gのFDCベクター1と、5 $\mu$ gのUbixベクター）を、大腸菌C41（DE3）株（Lucigen Corporation社製、100 $\mu$ L）に、ヒートショック法により導入し、野生型のFDCとUbixとを共発現する形質転換体を調製した。アンピシリンおよびカナマイシンを添加したLB培地にて6時間培養した。50mg/Lカナマイシンを添加した上記酵素反应用培地を調製し、同様にして細胞溶解液を調製した。

[0140] そして、ヘッドスペース型ガスクロマトグラフィー質量分析計（HS/GSMS）用の10mLバイアルに、各種細胞溶解液100 $\mu$ Lずつと、1Mリン酸緩衝液（pH6.8）を100 $\mu$ L、最終濃度が10mMとなるようにL-リジンを添加し、1mLとなるように超純水を加えた。その直後にバイアルのキャップを閉め、37 $^{\circ}$ C、振盪速度180rpmにて酵素反応を行った。当該反応を開始してから18時間後にバイアルのヘッドスペース中に生成された1,3-ブタジエン量を表すピーク面積を、GC-MS（製品名：GCMS-QP Ultra、島津製作所社製）によって測定した。

[0141] その結果、図には示さないが、L-リジンを添加しない場合ブタジエンが検出されなかったが、L-リジンを添加した場合において、1,3-ブタジエンの生成が確認された。

[0142] （実施例2）

実施例1に示したように、各種野生型酵素の組み合わせによって、L-リジンからのブタジエンの生成が認められた。そこで、この触媒活性をより向上させるべく、二段階目の反応を行うPALについて、他の宿主由来のPALを検討した。

[0143] <プラスミドベクターの調製>

Anabaena variabilis又はPlagiochasma appendiculatum由来のPALを大腸菌にて効率良く発現さ

せるために、大腸菌におけるコドンの使用頻度を考慮して改変したヌクレオチド配列を設計した。次いで、かかる改変ヌクレオチド配列からなるDNAを常法に沿って化学合成し、前述と同様に当該各種野遺伝子を、大腸菌において発現可能なプラスミドベクター（各種PALベクター）を各々調製した。

[0144] 次に、FDCベクター1及びpTrcHis Bベクター（サーモフィッシュャーサイエンティフィック社）をPCR法により増幅したDNAとpZA33Lucベクター（Expressys社製）を、Gibson Assembly法により連結することにより、大腸菌内での酵素活性測定用FDCプラスミドベクター（FDCベクター2）を調製した。

[0145] <酵素活性測定用培地の調製及び酵素活性の測定>

調整したベクター（5  $\mu$ gのPALベクター、5  $\mu$ gのUbiXベクターと5  $\mu$ gのFDCベクター2）を、大腸菌C41（DE3）株（Lucigen Corporation社製、100  $\mu$ L）に、ヒートショック法により導入し、各種PALと野生型のFDCとUbiXとを共発現する形質転換体を調製した。

[0146] そして、これら形質転換体を各々、アンピシリンとカナマイシンとクロラムフェニコールを添加したLB培地にて6時間培養した。なお、かかる6時間の培養（前培養）により、これら形質転換体の増殖は頭打ちとなる。そのため、後述の酵素反応開始時点での菌体量は、これら形質転換体間において均一となる。

[0147] また、12 g/L トリプトン、24 g/L イーストエクストラクト、10 g/L グリセロール、9.4 g/L リン酸水素二カリウム、2.2 g/L リン酸二水素カリウム、20 g/L ラクトース、100 mg/L アンピシリン、50 mg/L カナマイシン、30 mg/L クロラムフェニコールに加えて、基質として1 mM フェニルアラニン又は1 mM アリルグリシンを添加し、酵素活性測定用培地を調製した。

[0148] そして、HS/GSMS用の10 mLバイアルに、前述の形質転換体の培

養溶液を50 $\mu$ Lと、酵素活性測定用培地1mLを加え、その直後にバイアルのキャップを閉め、37 $^{\circ}$ C、振盪速度180rpmにて酵素反応を行った。当該反応を開始してから18時間後にバイアルのヘッドスペース中に生成されたスチレン又は1,3-ブタジエン量を表すピーク面積を、GC-MSによって測定した。

[0149] その結果、図1に示すとおり、フェニルアラニンを基質として加えた場合、下記のとおり、いずれのPALについてもスチレンの生成が見られた。またその生成量も3種のPALの間で大きな違いは見られなかった。

[0150] 一方、図2に示すとおり、アリルグリシンを基質として加えた場合においても、いずれのPALからもブタジエンの生成が見られた。しかしながら、ブタジエンの生成量には大きな違いが見られ、AvPALを用いた場合において最大のブタジエン生産が確認された。

[0151] (実施例3)

実施例2に示したように、野生型のAvPALにおいて、高いブタジエンの生成触媒活性が認められた。そこで、この高い触媒活性をより向上させるべく、酵素活性部位を各々他のアミノ酸に置換する変異を導入した。そして、得られた変異導入体について、前記触媒活性を評価した。

[0152] 具体的には、各変異が導入されたアミノ酸配列をコードするプライマーを設計し、合成した。そして、実施例2にて調製した、野生型のAvPALをコードするベクターを鋳型として、前記プライマーを用い、Gibson Assembly法のプロトコールに従って、各変異が導入されたPALを、大腸菌において発現可能なプラスミドベクター(PAL改変体ベクター)を調製した。そして、上記<酵素活性測定用培地の調製及び酵素活性の測定>にて、野生型PALベクターの代わりに、PAL改変体ベクターを導入し、形質転換体を調製し、酵素活性を測定した。野生型のPALを用いた場合のブタジエン生成量を1.0として、PAL改変体を用いた場合のブタジエン生産量を、下記表3に示す。

[0153]

[表3]

	F94	L104	F107	L108	L171	L219	N223	K419	M23	Q448	E452
G	0.0	0.4	0.2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
A	0.0	1.3	0.4	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0
V	0.1	0.2	0.1	1.4	0.0	0.1	0.1	0.0	0.7	0.0	0.0
I	0.1	0.2	0.0	0.7	0.3	1.6	1.6	0.0		0.0	0.0
L	0.2		0.2					0.0	0.7	0.0	0.0
M	0.0	0.3	0.2	5.2	0.1	0.0	0.0	0.0	0.9	0.0	0.0
F		0.2		3.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	0.0	0.2
Y	0.4	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
W	0.2	0.0	5.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0

[0154] 表3に示すとおり、多種のアミノ酸置換を導入した結果、以下のアミノ酸置換において、導入前の野生型と比較して、ブタジエン生産量の向上が認められた。

- (1) 108位のロイシンが、メチオニン、フェニルアラニン又はバリンに置換、
- (2) 107位のフェニルアラニンが、トリプトファンに置換、
- (3) 219位のロイシンが、イソロイシンに置換、
- (4) 223位のアスパラギンが、イソロイシンに置換、
- (5) 104位のロイシンが、アラニンに置換。

### 産業上の利用可能性

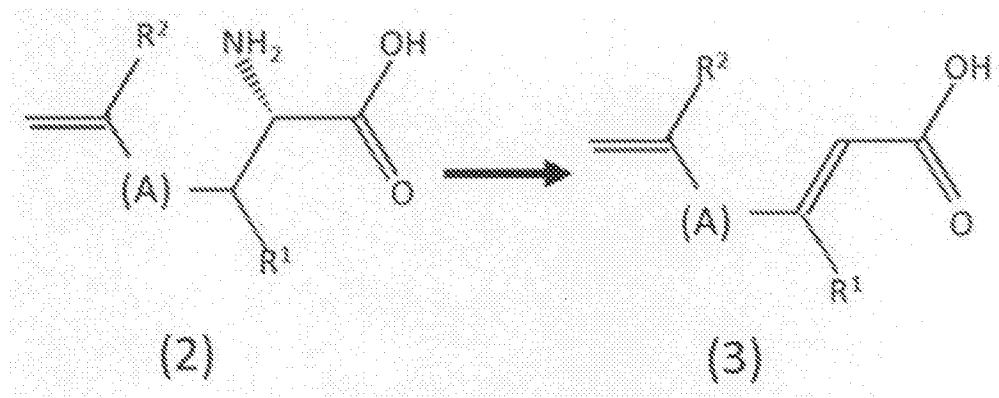
[0155] 以上説明したように、本発明によれば、酵素を用いて、炭素-炭素間二重結合を少なくとも2つ有する不飽和化合物を製造する方法を提供することが可能となる。例えば、本発明によって、比較的安価なL-リジンを出発材料として、ブタジエンを製造することも可能となる。また、本発明によれば、化学合成によらず、生合成によって不飽和化合物を製造できるため、環境への負荷が少ない。したがって、本発明は、ブタジエンといった、合成ゴム等の様々な合成ポリマーの原料の製造において極めて有用である。

## 請求の範囲

## [請求項1]

フェニルアラニンアンモリアーゼの存在下、第1のアミノ基と末端に第1の炭素-炭素間二重結合とを有する、下記式(2)で表される鎖状の不飽和カルボン酸化合物又はその幾何異性体から、第1のアミノ基を脱離させ、第2の炭素-炭素間二重結合を形成させる工程を含む、下記式(3)で表される鎖状の不飽和カルボン酸化合物又はその幾何異性体を製造する方法

[化1]

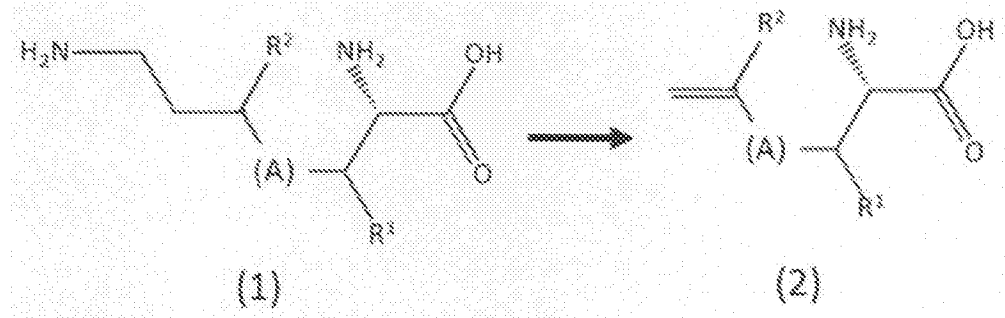


[前記式中(A)は、置換されていてもよい炭素数0~5の直鎖状炭化水素基を示し、炭素数が2~5の場合は、隣接する炭素原子間で二重結合を形成してもよい。R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>は、各々独立して、水素原子、炭素数1~5の直鎖状若しくは分枝状のアルキル基、炭素数1~5の直鎖状若しくは分枝状のアルコキシ基又は水酸基を示す]。

## [請求項2]

末端アルケン生成酵素 BesCの存在下、第1のアミノ基と末端に第2のアミノ基とを有する、下記式(1)で表される鎖状のカルボン酸化合物又はその幾何異性体から、第2のアミノ基及びメチレン基を脱離させ、前記式(2)で表される鎖状の不飽和カルボン酸化合物又はその幾何異性体を製造する工程を含み、当該化合物又はその幾何異性体から、前記式(3)で表される鎖状の不飽和カルボン酸化合物又はその幾何異性体を製造する、請求項1に記載の方法

[化2]

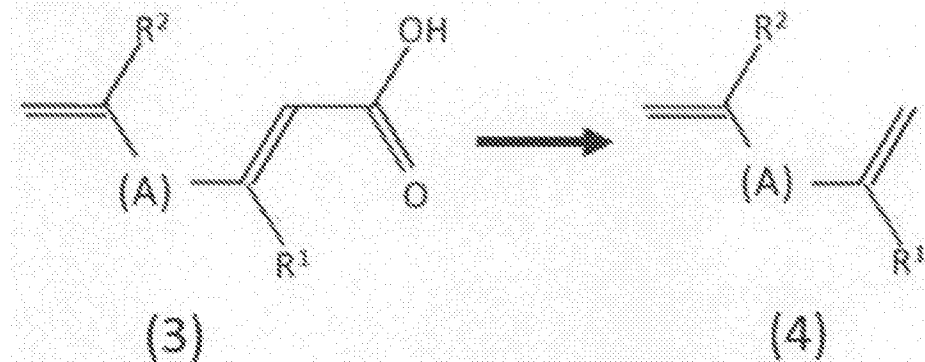


[前記式中 (A) は、置換されていてもよい炭素数0～5の直鎖状炭化水素基を示し、炭素数が2～5の場合は、隣接する炭素原子間で二重結合を形成してもよい。R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>は、各々独立して、水素原子、炭素数1～5の直鎖状若しくは分枝状のアルキル基、炭素数1～5の直鎖状若しくは分枝状のアルコキシ基又は水酸基を示す]。

[請求項3]

請求項1又は2に記載の方法により、前記式(3)で表される鎖状の不飽和カルボン酸化合物又はその幾何異性体を製造し、フェルラ酸デカルボキシラーゼの存在下、前記不飽和カルボン酸化合物又はその幾何異性体から、カルボキシル基を脱離させる工程を含む、下記式(4)で表される鎖状の不飽和炭化水素化合物又はその幾何異性体を製造する方法

[化3]



[前記式中 (A) は、置換されていてもよい炭素数0～5の直鎖状炭化水素基を示し、炭素数が2～5の場合は、隣接する炭素原子間で二重結合を形成してもよい。R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>は、各々独立して、水素原子

、炭素数 1～5 の直鎖状若しくは分枝状のアルキル基、炭素数 1～5 の直鎖状若しくは分枝状のアルコキシ基又は水酸基を示す]。

[請求項4]

前記フェニルアラニンアンモニアリアーゼが、下記(1)～(5)のうち少なくとも1の特徴を有するフェニルアラニンアンモニアリアーゼである、請求項1～3のうちいずれか一項に記載の方法

(1) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列の108位又は該部位に対応するアミノ酸が、メチオニン、フェニルアラニン若しくはバリンである、

(2) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列の107位又は該部位に対応するアミノ酸が、トリプトファンである、

(3) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列の219位又は該部位に対応するアミノ酸が、イソロイシンである、

(4) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列の223位又は該部位に対応するアミノ酸が、イソロイシンである、

(5) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列の104位又は該部位に対応するアミノ酸が、アラニンである。

[請求項5]

下記(1)～(5)のうち少なくとも1のアミノ酸置換が導入されている、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ改変体

(1) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列の108位又は該部位に対応するアミノ酸が、メチオニン、フェニルアラニン若しくはバリンに置換、

(2) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列の107位又は該部位に対応するアミノ酸が、トリプトファンに置換、

(3) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列の219位又は該部位に対応するアミノ酸が、イソロイシンに置換、

(4) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列の223位又は該部位に対応するアミノ酸が、イソロイシンに置換、

(5) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列の104位又は該部位に対

応するアミノ酸が、アラニンに置換。

[請求項6] 請求項5に記載のフェニルアラニンアンモニアリアーゼ改変体をコードするDNA。

[請求項7] 請求項6に記載のDNAを含むベクター。

[請求項8] 請求項6に記載のDNA又は請求項7に記載のベクターが導入された宿主細胞。

[請求項9] 請求項8に記載の宿主細胞を培養し、該宿主細胞に発現したタンパク質を採取する工程を含む、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ改変体の製造方法。

[請求項10] フェニルアラニンアンモニアリアーゼ改変体の製造方法であって、フェニルアラニンアンモニアリアーゼにおいて、下記(1)～(5)

のうちの少なくとも1のアミノ酸置換を導入する工程を含む、方法

(1) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列の108位又は該部位に対応するアミノ酸を、メチオニン、フェニルアラニン若しくはバリンに置換、

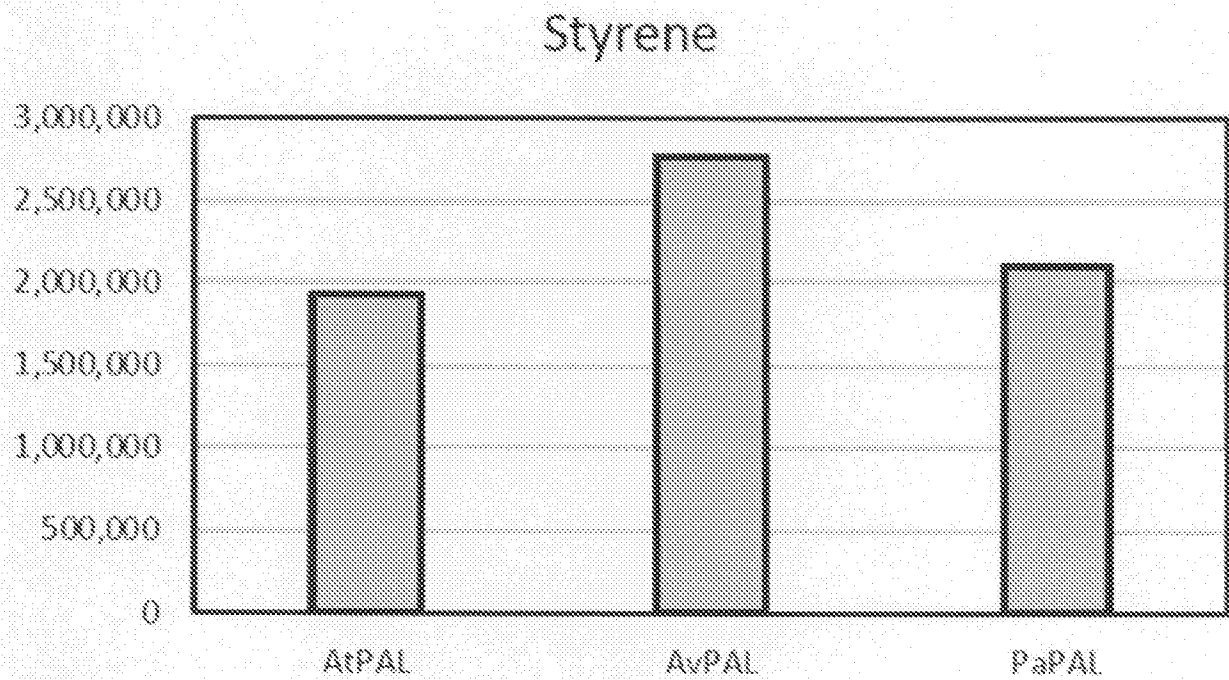
(2) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列の107位又は該部位に対応するアミノ酸を、トリプトファンに置換、

(3) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列の219位又は該部位に対応するアミノ酸を、イソロイシンに置換、

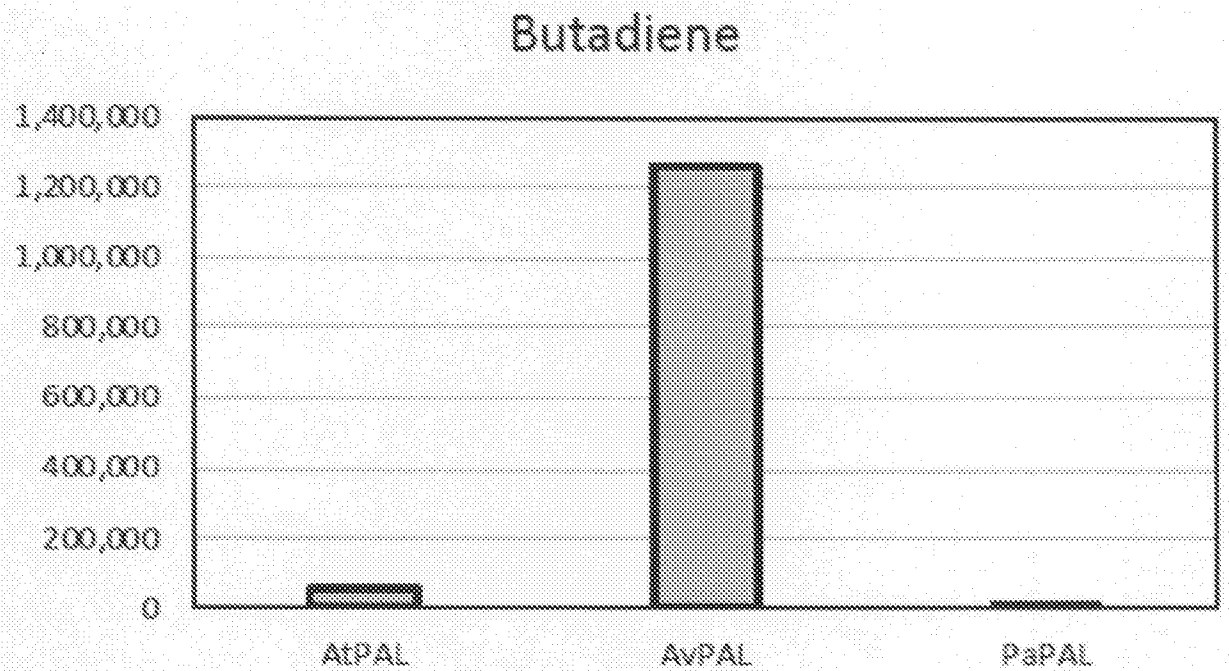
(4) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列の223位又は該部位に対応するアミノ酸を、イソロイシンに置換、

(5) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列の104位又は該部位に対応するアミノ酸を、アラニンに置換。

[図1]



[図2]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/JP2021/044890**

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
<i>C12N 15/60</i> (2006.01)i; <i>C12N 1/15</i> (2006.01)i; <i>C12N 1/19</i> (2006.01)i; <i>C12N 1/21</i> (2006.01)i; <i>C12N 5/10</i> (2006.01)i; <i>C12N 9/88</i> (2006.01)i; <i>C12N 15/63</i> (2006.01)i; <i>C12P 7/40</i> (2006.01)i FI: C12N15/60; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C12N9/88; C12N15/63 Z; C12P7/40 ZNA		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N15/60; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C12N9/88; C12N15/63; C12P7/40		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2022 Registered utility model specifications of Japan 1996-2022 Published registered utility model applications of Japan 1994-2022		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CApplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq; UniProt/GeneSeq		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2020/013951 A1 (CODEXIS, INC.) 16 January 2020 (2020-01-16) claims, examples, table 4.1, SEQ ID NO: 45, 46	5-10
A		1-4
A	US 2020/0048674 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 13 February 2020 (2020-02-13) fig. 2-4, paragraph [0051]	1-10
A	US 2016/0230194 A1 (NIELSEN David) 11 August 2016 (2016-08-11) claims, examples, fig. 1	1-10
A	US 2013/0005012 A1 (PHYTOGENE, INC.) 03 January 2013 (2013-01-03) claims, examples	1-10
A	US 2015/0337336 A1 (PHYTOGENE, INC.) 26 November 2015 (2015-11-26) claims, examples	1-10
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:	"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	
"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		
Date of the actual completion of the international search <b>17 February 2022</b>	Date of mailing of the international search report <b>08 March 2022</b>	
Name and mailing address of the ISA/JP <b>Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan</b>	Authorized officer  Telephone No.	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/JP2021/044890**

<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2019/022083 A1 (RIKEN) 31 January 2019 (2019-01-31) claims, examples	1-10
<hr/>		

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

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

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/JP2021/044890**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO	2020/013951	A1	16 January 2020	US 2020/0017845 A1 JP 2021-531749 A claims, examples, table 4.1, SEQ ID NO: 45, 46 EP 3820833 A1 CN 112672989 A	
US	2020/0048674	A1	13 February 2020	WO 2018/200592 A1	
US	2016/0230194	A1	11 August 2016	WO 2015/041776 A1	
US	2013/0005012	A1	03 January 2013	WO 2012/178126 A1	
US	2015/0337336	A1	26 November 2015	WO 2013/192543 A2 EP 2864491 B1 CN 104487581 A	
WO	2019/022083	A1	31 January 2019	US 2021/0130854 A1 claims, examples EP 3660156 A1 CN 111108204 A	

<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>C12N 15/60(2006.01)i; C12N 1/15(2006.01)i; C12N 1/19(2006.01)i; C12N 1/21(2006.01)i;                  C12N 5/10(2006.01)i; C12N 9/88(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; C12P 7/40(2006.01)i                  FI: C12N15/60; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C12N9/88; C12N15/63 Z; C12P7/40 ZNA</p>																										
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>C12N15/60; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C12N9/88; C12N15/63; C12P7/40</p> <p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922 - 1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971 - 2022年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996 - 2022年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994 - 2022年</td> </tr> </table> <p>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)</p> <p>JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq; UniProt/GeneSeq</p>			日本国実用新案公報	1922 - 1996年	日本国公開実用新案公報	1971 - 2022年	日本国実用新案登録公報	1996 - 2022年	日本国登録実用新案公報	1994 - 2022年																
日本国実用新案公報	1922 - 1996年																									
日本国公開実用新案公報	1971 - 2022年																									
日本国実用新案登録公報	1996 - 2022年																									
日本国登録実用新案公報	1994 - 2022年																									
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>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</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>WO 2020/013951 A1 (CODEXIS, INC.) 16.01.2020 (2020-01-16) CLAIMS, EXAMPLES, TABLE 4.1, SEQ ID NO:45, 46</td> <td>5-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td></td> <td>1-4</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2020/0048674 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 13.02.2020 (2020-02-13) FIGS 2-4, [0051]</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2016/0230194 A1 (NIELSEN David) 11.08.2016 (2016-08-11) CLAIMS, EXAMPLES, FIG.1</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2013/0005012 A1 (PHYTOGENE, INC.) 03.01.2013 (2013-01-03) CLAIMS, EXAMPLES</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2015/0337336 A1 (PHYTOGENE, INC.) 26.11.2015 (2015-11-26) CLAIMS, EXAMPLES</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2019/022083 A1 (国立研究開発法人理化学研究所) 31.01.2019 (2019-01-31) 特許請求の範囲、実施例</td> <td>1-10</td> </tr> </tbody> </table> <p><input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p> <p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>“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</p> <p>“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)</p> <p>“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>“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</p> <p>“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</p> <p>“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</p> <p>“&amp;” 同一パテントファミリー文献</p>			引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	X	WO 2020/013951 A1 (CODEXIS, INC.) 16.01.2020 (2020-01-16) CLAIMS, EXAMPLES, TABLE 4.1, SEQ ID NO:45, 46	5-10	A		1-4	A	US 2020/0048674 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 13.02.2020 (2020-02-13) FIGS 2-4, [0051]	1-10	A	US 2016/0230194 A1 (NIELSEN David) 11.08.2016 (2016-08-11) CLAIMS, EXAMPLES, FIG.1	1-10	A	US 2013/0005012 A1 (PHYTOGENE, INC.) 03.01.2013 (2013-01-03) CLAIMS, EXAMPLES	1-10	A	US 2015/0337336 A1 (PHYTOGENE, INC.) 26.11.2015 (2015-11-26) CLAIMS, EXAMPLES	1-10	A	WO 2019/022083 A1 (国立研究開発法人理化学研究所) 31.01.2019 (2019-01-31) 特許請求の範囲、実施例	1-10
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	WO 2020/013951 A1 (CODEXIS, INC.) 16.01.2020 (2020-01-16) CLAIMS, EXAMPLES, TABLE 4.1, SEQ ID NO:45, 46	5-10																								
A		1-4																								
A	US 2020/0048674 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 13.02.2020 (2020-02-13) FIGS 2-4, [0051]	1-10																								
A	US 2016/0230194 A1 (NIELSEN David) 11.08.2016 (2016-08-11) CLAIMS, EXAMPLES, FIG.1	1-10																								
A	US 2013/0005012 A1 (PHYTOGENE, INC.) 03.01.2013 (2013-01-03) CLAIMS, EXAMPLES	1-10																								
A	US 2015/0337336 A1 (PHYTOGENE, INC.) 26.11.2015 (2015-11-26) CLAIMS, EXAMPLES	1-10																								
A	WO 2019/022083 A1 (国立研究開発法人理化学研究所) 31.01.2019 (2019-01-31) 特許請求の範囲、実施例	1-10																								
<p>国際調査を完了した日</p> <p>17.02.2022</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p>08.03.2022</p>																									
<p>名称及びあて先</p> <p>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</p>	<p>権限のある職員 (特許庁審査官)</p> <p>山本 匡子 4B 3038</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3448</p>																									

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

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

国際調査報告  
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2021/044890

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
WO	2020/013951	A1	16.01.2020	US	2020/0017845	A1	
				JP	2021-531749	A	
				特許請求の範囲、実施例、 表4. 1、配列番号4 5、 4 6			
				EP	3820833	A1	
				CN	112672989	A	
US	2020/0048674	A1	13.02.2020	WO	2018/200592	A1	
US	2016/0230194	A1	11.08.2016	WO	2015/041776	A1	
US	2013/0005012	A1	03.01.2013	WO	2012/178126	A1	
US	2015/0337336	A1	26.11.2015	WO	2013/192543	A2	
				EP	2864491	B1	
				CN	104487581	A	
WO	2019/022083	A1	31.01.2019	US	2021/0130854	A1	
				CLAIMS, EXAMPLES			
				EP	3660156	A1	
				CN	111108204	A	