

(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
2023年3月16日(16.03.2023)



(10) 国際公開番号

WO 2023/038128 A1

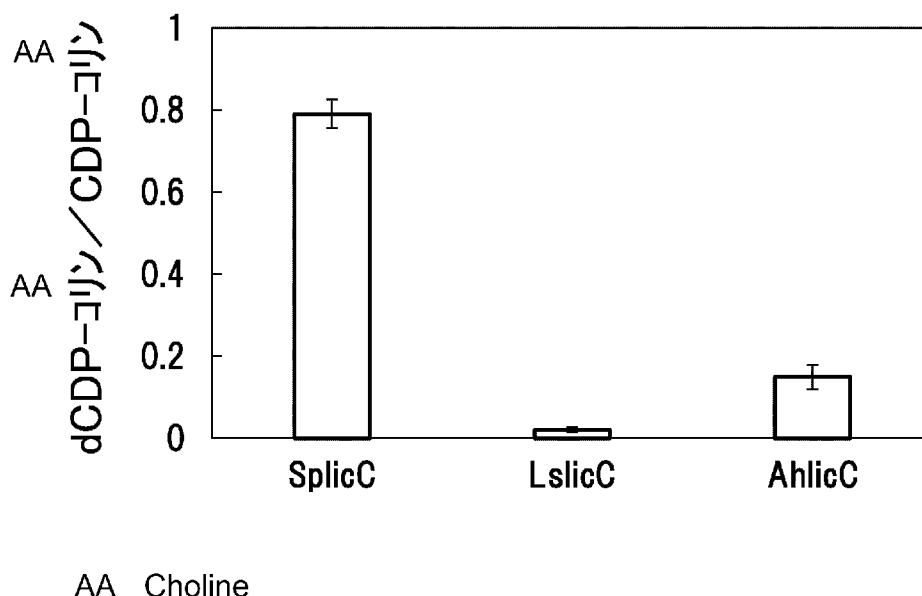
- (51) 国際特許分類:
C12N 15/54 (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01) *C12N 15/55* (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01) *C12P 19/32* (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2022/033972
- (22) 国際出願日: 2022年9月9日(09.09.2022)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2021-147985 2021年9月10日(10.09.2021) JP
- (71) 出願人: 協和発酵バイオ株式会社 (KYOWA HAKKO BIO CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1008185 東

京都千代田区大手町一丁目6番1号 Tokyo (JP).

- (72) 発明者: 堀 一将 (HORI Kazumasa); 〒1008185 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 協和発酵バイオ株式会社内 Tokyo (JP). 森田 敏彦 (MORITA Toshihiko); 〒1008185 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 協和発酵バイオ株式会社内 Tokyo (JP). 西野 恒代 (NISHINO Tsuneyo); 〒1008185 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 協和発酵バイオ株式会社内 Tokyo (JP). 氏原 哲朗 (UJIHARA Tetsuro); 〒1008185 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 協和発酵バイオ株式会社内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人栄光特許事務所 (EIKOH PATENT FIRM, P.C.); 〒1050003 東京都港区

(54) Title: RECOMBINANT MICROORGANISM USED FOR PRODUCING CDP-CHOLINE, AND METHOD FOR PRODUCING CDP-CHOLINE USING SAID RECOMBINANT MICROORGANISM

(54) 発明の名称: CDP-コリンの製造に用いる組換え微生物及び該組換え微生物を用いるCDP-コリンの製造方法



(57) Abstract: A recombinant microorganism having a capability of producing xenogeneic CTP:phosphocholine cytidylyltransferase, wherein the CTP:phosphocholine cytidylyltransferase is a polypeptide formed of a specific amino acid sequence and having a CTP:phosphocholine cytidylyltransferase activity. A method for producing CDP-choline, the method comprising producing CDP-choline by using said recombinant microorganism.

WO 2023/038128 A1

西新橋一丁目7番13号 虎ノ門イースト
ビルディング10階 Tokyo (JP).

- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 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))

(57) 要約: 異種のCTP: ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼを生産する能力を有する組換え微生物であって、前記CTP: ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼが特定のアミノ酸配列からなり、且つCTP: ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドである組換え微生物及び該組換え微生物を利用してCDP-コリンを生成することを含む、CDP-コリンの製造方法。

明 細 書

発明の名称：

CDP-コリンの製造に用いる組換え微生物及び該組換え微生物を用いる
CDP-コリンの製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、基質特異性に優れた、シチジンジリン酸コリンを合成する活性を有する蛋白質を生産する能力を有する形質転換体及び該形質転換体を用いた、効率的なシチジンジリン酸コリンの製造方法に関する。

背景技術

[0002] シチジンジリン酸コリン (Cytidine 5' -diphosphate Choline; 以下、CDP-コリン) は高等生物のリン脂質を構成する成分であるホスファチジルコリンの生合成前駆体であり、神経保護作用などが知られている (非特許文献1)。

[0003] 前記有用性にも関わらず、CDP-コリンは天然からの抽出や化学合成により大量に得ることは難しく、主に生物の持つ酵素反応によってシチジンリン酸 (以下、CMPという) やオロット酸を出発原料に合成されている (特許文献1 および2 並びに非特許文献2 および3)。

[0004] オロット酸からCDP-コリンを製造する場合、まず、オロット酸から複数の酵素反応によりシチジン三リン酸 (以下、CTPという) を合成する。続いて、得られたCTPを、コリンからの酵素反応により合成したホスホコリン (以下、P-コリンという) の存在下でCTP : ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼの働きにより縮合させることで、CDP-コリンを合成できる (非特許文献3)。

[0005] CMPを出発原料にした場合も同様に、CMPからCTPを生産させ、P-コリン存在下でCTP : ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼによって縮合させることで、CDP-コリンが得られる (非特許文献3)。

[0006] 以上のことから酵素反応を利用したCDP-コリンの生産においてはCT

P : ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼが重要な役割を担っていることがわかる。

[0007] CTP : ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼはヒトを含む哺乳類や酵母などの真核生物やバクテリアなどに広く分布している（非特許文献4、5および6）。これらのCTP : ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼは基本的にはCTPとP-コリンからCDP-コリンを合成する活性を有する。

[0008] しかしデオキシシチジン三リン酸（以下、dCTP）が存在する場合には、CTPの代わりにdCTPを基質として受け入れ、dCTPとP-コリンからデオキシシチジン三リン酸コリン（以下、dCDP-コリン）を生成することが知られている（非特許文献7）。

先行技術文献

特許文献

[0009] 特許文献1 : 国際公開第2003/095660号

特許文献2 : 国際公開第2007/023830号

非特許文献

[0010] 非特許文献1 : *Nutrients* (2020) Vol. 12 (3), 793, p. 1-17

非特許文献2 : *Bull. Inst. Chem. Res. Kyoto U.* (1976) Vol. 53, p. 546-562

非特許文献3 : *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (2017) Vol. 101, p. 1409-1417

非特許文献4 : *J. Bio. Chem.* (1998) Vol. 273, p. 14022-14029

非特許文献5 : *Eur. J. Biochem.* (1987) Vol. 169, p. 477-486

非特許文献6 : *J. Bio. Chem.* (2002) Vol. 277, p. 4343-4350

非特許文献7：Eur. J. Biochem. (1983) Vol. 131, p. 223-229

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0011] dCTPはDNAの合成原料として生命活動に必須の化合物であるため、微生物を用いたCDP-コリンの生産においてはdCDP-コリンの副生を完全に抑えることはできず、効率的なCDP-コリン生産の障害となる。加えて、dCDP-コリンはCDP-コリンと極めて近い物性を有するため、これらを分離することは困難である。

[0012] そこで、dCTPに対する反応性に比して、CTPに対する反応性が高い基質特異性を示すCTP：ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼが求められるが、そのような酵素はこれまでに知られていない。また、ストレプトコッカス・ニューモニア (*Streptococcus pneumoniae*) のCTP：ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼなどでは結晶構造が明らかになっているものの（非特許文献6）、dCTPに対する反応性は予測できていない。

[0013] 本発明はCDP-コリンの製造に用いる組換え微生物及び該組換え微生物を用いるCDP-コリンの製造方法の提供を目的とする。

課題を解決するための手段

[0014] 本発明者らは上記課題を検討した結果、dCTPに対する反応性に比して、CTPに対する反応性が高い、優れた基質特異性を示すCTP：ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼを見出した。さらに、異種の該CTP：ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼを生産する能力を有する組換え微生物を利用することにより、効率的にCDP-コリンを製造できることを見出し、これらの知見に基づいて本発明を完成させた。

[0015] すなわち、本発明は以下に関する。

1. 異種のCTP：ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼを生産する能力を有する組換え微生物であって、前記CTP：ホスホコリンシチジルトラ

ンスフェラーゼが下記の (A 1) ~ (A 3) および (B 1) ~ (B 3) から選ばれるいずれか 1 のポリペプチドである、組換え微生物。

(A 1) 配列番号 10 で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド

(A 2) 配列番号 10 で示されるアミノ酸配列と少なくとも 60% 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つ CTP : ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチド

(A 3) 配列番号 10 で表されるアミノ酸配列において、1~20 個のアミノ酸が欠失、置換、挿入または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ CTP : ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチド

(B 1) 配列番号 14 で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド

(B 2) 配列番号 14 で示されるアミノ酸配列と少なくとも 60% 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つ CTP : ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチド

(B 3) 配列番号 14 で表されるアミノ酸配列において、1~20 個のアミノ酸が欠失、置換、挿入または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ CTP : ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチド

2. 下記の (a 1) ~ (a 3) および (b 1) ~ (b 3) から選ばれるいずれか 1 の DNA が発現可能に導入された、前記 1 に記載の組換え微生物。

(a 1) 配列番号 10 で示されるアミノ酸配列をコードする DNA

(a 2) 配列番号 10 で示されるアミノ酸配列と少なくとも 60% 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つ CTP : ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする DNA

(a 3) 配列番号 10 で表されるアミノ酸配列において、1~20 個のアミノ酸が欠失、置換、挿入または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ CTP : ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする DNA

(b 1) 配列番号 14 で示されるアミノ酸配列をコードする DNA

(b 2) 配列番号 14 で表されるアミノ酸配列において、1~20 個のアミ

ノ酸が欠失、置換、挿入または付加されたアミノ酸配列からなり、かつCTP：ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNA

(b3) 配列番号14で示されるアミノ酸配列をコードするDNAと少なくとも60%以上の同一性を有するDNAからなり、且つCTP：ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNA3. 大腸菌である、前記1または2に記載の組換え微生物。

4. 前記CTP：ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼは、CTPに対する反応性を1とした場合、dCTPに対する反応性が0.75以下である、前記1～3のいずれか1に記載の組換え微生物。

5. 前記1～4のいずれか1に記載の組換え微生物を利用してCDP-コリンを生成することを含む、CDP-コリンの製造方法。

発明の効果

[0016] 本発明の組換え微生物は、dCTPに対する反応性に比して、CTPに対する反応性が高い、優れた基質特異性を示す、異種のCTP：ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼを生産する能力を有する。本発明の組換え微生物を利用することにより、dCDP-コリンの副生を抑制して、効率的にCDP-コリンを製造し得る。

図面の簡単な説明

[0017] [図1]図1は、SpliicC、LslicC又はAhlicCのCTP又はdCTPに対する反応性を示す図である。縦軸は、CTP又はdCTP及びP-コリンを基質として用いて生成されたCDP-コリン量に対するdCDP-コリン量の比率である。SpliicC、LslicC、AhlicCはそれぞれ、ストレプトコッカス・ニューモニア由来、ラクトバチルス・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius*) 由来、アナエロコッカス・ハイドロゲナリス (*Anaerococcus hydrogenalis*) 由来のCTP：ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼを表す。

発明を実施するための形態

[0018] 1. 組換え微生物およびその造成方法

本発明の組換え微生物は、異種のCTP：ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼを生産する能力を有する組換え微生物である。本発明において、前記CTP：ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼは、下記の(A1)～(A3)および(B1)～(B3)から選ばれるいずれか1のポリペプチドである。

(A1) 配列番号10で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド

(A2) 配列番号10で示されるアミノ酸配列と少なくとも60%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つCTP：ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチド

(A3) 配列番号10で表されるアミノ酸配列において、1～20個のアミノ酸が欠失、置換、挿入または付加されたアミノ酸配列からなり、かつCTP：ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチド

(B1) 配列番号14で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド

(B2) 配列番号14で示されるアミノ酸配列と少なくとも60%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つCTP：ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチド

(B3) 配列番号14で表されるアミノ酸配列において、1～20個のアミノ酸が欠失、置換、挿入または付加されたアミノ酸配列からなり、かつCTP：ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチド

[0019] 上記(A2)または(B2)に記載のポリペプチドとしては、配列番号10または14で示されるアミノ酸配列と少なくとも60%以上、好ましくは以下順に、70%以上、80%以上、90%以上、95%以上、より好ましくは98%以上、最も好ましくは99%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つCTP：ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドが挙げられる。

[0020] 上記(A3)または(B3)に記載のポリペプチドとしては、配列番号1

0または14で表されるアミノ酸配列において、1~20個、好ましくは1~10個、さらに好ましくは1~8個、最も好ましくは1~5個のアミノ酸が欠失、置換、挿入または付加されたアミノ酸配列からなり、かつCTP：ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドが挙げられる。

[0021] アミノ酸配列および塩基配列の同一性は、Lipman-Pearson法 [Science, 227 (4693), 1435-41 (1985)]、Karlin and AltschulによるアルゴリズムBLAST [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 5873 (1993)] やFASTA [Methods Enzymol., 183, 63 (1990)] を用いて決定できる。該アルゴリズムBLASTに基づいて、BLASTNやBLASTXとよばれるプログラムが開発されている [J. Mol. Biol., 215, 403 (1990)]。BLASTに基づいてBLASTNによって塩基配列を解析する場合には、パラメータは例えばScore=100、wordlength=12とする。また、BLASTに基づいてBLASTXによってアミノ酸配列を解析する場合には、パラメータは例えばscore=50、wordlength=3とする。BLASTとGapped BLASTプログラムを用いる場合には、各プログラムのデフォルトパラメーターを用いる。これらの解析方法の具体的な手法は公知である。

[0022] アミノ酸が欠失、置換、挿入または付加されたアミノ酸配列とは、元となるアミノ酸配列中のアミノ酸残基を人為的に欠失若しくは置換、または該アミノ酸配列中に人為的にアミノ酸残基を挿入若しくは付加して得られるアミノ酸配列をいう。

[0023] 欠失、置換、挿入または付加されるアミノ酸は天然型と非天然型とを問わない。天然型アミノ酸としては、L-アラニン、L-アスパラギン、L-アスパラギン酸、L-グルタミン、L-グルタミン酸、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン、L-アルギニン、L-

ーメチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン、L-システインなどが挙げられる。

[0024] 以下に、相互に置換可能なアミノ酸の例を示す。同一群に含まれるアミノ酸は相互に置換可能である。

A群：ロイシン、イソロイシン、ノルロイシン、バリン、ノルバリン、アラニン、2-アミノブタン酸、メチオニン、O-メチルセリン、t-ブチルグリシン、t-ブチルアラニン、シクロヘキシルアラニン

B群：アスパラギン酸、グルタミン酸、イソアスパラギン酸、イソグルタミン酸、2-アミノアジピン酸、2-アミノスベリン酸

C群：アスパラギン、グルタミン

D群：リジン、アルギニン、オルニチン、2, 4-ジアミノブタン酸、2, 3-ジアミノプロピオン酸

E群：プロリン、3-ヒドロキシプロリン、4-ヒドロキシプロリン

F群：セリン、スレオニン、ホモセリン

G群：フェニルアラニン、チロシン

[0025] CTP：ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼ活性とは、CTPとP-コリンからCDP-コリンを合成する活性をいう。

[0026] 上記ポリペプチドが、CTP：ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼ活性を有していることは、例えば以下の方法により確認できる。まず、後述する方法により、該ポリペプチドをコードするDNAを含む組換え体DNAを作製する。次に、該組換え体DNAで、CTP：ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼ活性を確認できない微生物、例えばエシェリヒア・コリBL 21株を形質転換して得られる微生物を培養し、得られる培養物から該ポリペプチドを含む細胞抽出液を調製する。続いて、該細胞抽出液を基質であるCTPとP-コリンに接触させ、CDP-コリンを生成させる。最後に、高速クロマトグラフィーまたはガスクロマトグラフィーなどを用いる一般的な分析方法により反応液中のCDP-コリンを検出することにより、対象の

ポリペプチドがCTP：ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼ活性を有していることを確認できる。

[0027] 「CTP：ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼを生産する能力を有する組換え微生物」は、CTP：ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼをコードするDNAを有する組換え体DNAを、発現可能に親株に導入することによって得ることができる。

[0028] 親株とは、遺伝子改変および形質転換等の対象となる元株のことをいう。DNAの導入による形質転換の対象となる元株を宿主株という。

[0029] 親株としては、原核生物または酵母菌株が好ましく、より好ましくはエシェリヒア属、セラチア属、バチルス属、ブレビバクテリウム属、コリネバクテリウム属、ミクロバクテリウム属、若しくはシュードモナス属等に属する原核生物、またはサッカロマイセス属、シゾサッカロマイセス属、クルイベロミセス属、トリコスポロン属、シワニオミセス属、ピチア属、若しくはキャンディダ属等に属する酵母菌株であり、これらの中でもエシェリヒア属に属する原核生物（大腸菌）が好ましい。

[0030] 親株として、具体的には例えば、Escherichia coli BL21 codon plus、Escherichia coli XL1-Blue、Escherichia coli XL2-Blue（いずれもアジレント・テクノロジー社製）、Escherichia coli BL21 (DE3) pLysS（メルクミリポア社製）、Escherichia coli BL21、Escherichia coli DH5 α 、Escherichia coli HST08 Premium、Escherichia coli HST02、Escherichia coli HST04 dam $-$ /dcm $-$ 、Escherichia coli JM109、Escherichia coli HB101、Escherichia coli CJ236、Escherichia coli BMH71-18 mutS、Escherichia coli MV1184、Escherichia coli TH2（い

れもタカラバイオ社製)、*Escherichia coli* W (ATC C9637)、*Escherichia coli* JM101、*Escherichia coli* W3110、*Escherichia coli* MG1655、*Escherichia coli* DH1、*Escherichia coli* MC1000、*Escherichia coli* W1485、*Escherichia coli* MP347、*Escherichia coli* NM522、*Serratia ficaria*、*Serratia fonticola*、*Serratia liquefaciens*、*Serratia marcescens*、*Bacillus subtilis*、*Bacillus amyloliquefaciens*、*Brevibacterium immariophilum* ATCC14068、*Brevibacterium saccharolyticum* ATCC14066、*Corynebacterium ammoniagenes*、*Corynebacterium glutamicum* ATCC13032、*Corynebacterium glutamicum* ATCC14067、*Corynebacterium glutamicum* ATCC13869、*Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC13870、*Microbacterium ammoniophilum* ATCC15354、若しくは*Pseudomonas* sp. D-0110等の原核生物、又は*Saccharomyces cerevisiae*、*Schizosaccharomyces pombe*、*Kluyveromyces lactis*、*Trichosporon pullulans*、*Schwanniomyces alluvius*、*Pichia pastoris*、若しくは*Candida utilis*等の酵母菌株が挙げられる。

[0031] また親株として、CTP：ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼの基質であるCTP及び／又はP-コリンを生成する能力を人工的に付与又は強化した育種株も、好適に使用できる。

[0032] 親株として用いる微生物に、CTP及び／又はP-コリンを生成する能力を人工的に付与又は強化する方法としては、下記の(1)～(5)などが挙げられ、上記公知の方法は単独又は組み合わせて使用できる。

(1) CTP及び／又はP-コリンの生合成経路を制御する機構の少なくとも1つを緩和又は解除する方法

(2) CTP及び／又はP-コリンの生合成経路に関与する酵素の少なくとも1つを発現強化する方法

(3) CTP及び／又はP-コリンの生合成経路に関与する酵素遺伝子の少なくとも1つのコピー数を増加させる方法

(4) CTP及び／又はP-コリンの生合成経路から該目的物質以外の代謝産物へ分岐する代謝経路の少なくとも1つを弱体化又は遮断する方法

(5) 野生株に比べ、CTP及び／又はP-コリンのアナログに対する耐性度が高い細胞株を選択する方法

[0033] 上記、CTP及びP-コリンを生成する能力を人工的に付与又は強化する方法の具体例としては、各種遺伝子操作による方法（特許文献1、特許文献2、非特許文献3）等、公知の方法が挙げられる。

[0034] 微生物が、CTP及びP-コリンを生成し得る微生物であることは、育種株と親株をそれぞれ培地に培養し、CTP及びP-コリンの生成量を比較することにより確認できる。また、配列番号10または14で表わされるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするDNAを含む組換え体DNAで該微生物を形質転換し、形質転換した該微生物を培地に培養し、培養物中に蓄積したCDP-コリンを後述のHPLCを用いて検出することによっても確認できる。

[0035] 親株として用いる微生物が、上記(A1)～(A3)および(B1)～(B3)以外のCTP：ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドを生産する能力を有している場合には、該ポリペプチドの機能を低下または欠損させた株を親株として用いることで、dCDP-コリンの副生を抑制しながら効率的にCDP-コリンを製造できる。該ポリペプチ

ドの機能を低下または欠損させる方法としては、該ポリペプチドの機能を低減若しくは完全に停止させるような形態であれば特に限定されず、例えば該ポリペプチドをコードするDNAの全部または一部を除去するなど、公知の方法を適宜使用できる。

[0036] CTP：ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼをコードするDNAとしては、以下の(a1)～(a3)、(b1)～(b3)および(c1)～(c3)から選ばれるいずれか1が挙げられる。

(a1) 配列番号10で示されるアミノ酸配列をコードするDNA

(a2) 配列番号10で示されるアミノ酸配列と少なくとも60%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つCTP：ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNA

(a3) 配列番号10で表されるアミノ酸配列において、1～20個のアミノ酸が欠失、置換、挿入または付加されたアミノ酸配列からなり、かつCTP：ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNA

(b1) 配列番号14で示されるアミノ酸配列をコードするDNA

(b2) 配列番号14で表されるアミノ酸配列において、1～20個のアミノ酸が欠失、置換、挿入または付加されたアミノ酸配列からなり、かつCTP：ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNA

(b3) 配列番号14で示されるアミノ酸配列をコードするDNAと少なくとも60%以上の同一性を有するDNAからなり、且つCTP：ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNA

(c1) 配列番号7または11で表される塩基配列からなるDNA

(c2) 配列番号7または11で表される塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジентな条件でハイブリダイズし、且つCTP：ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドをコード

するDNA

(c3) 配列番号7または11で表される塩基配列と95%以上、好ましくは97%以上、より好ましくは98%以上、最も好ましくは99%以上の同一性を有する塩基配列からなり、且つCTP：ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼ活性を有するDNAをコードするDNA

[0037] 「ハイブリダイズする」とは、特定の塩基配列を有するDNAまたは該DNAの一部にDNAがハイブリダイズすることである。したがって、該特定の塩基配列を有するDNAまたはその一部は、ノーザンまたはサザンブロット解析のプローブとして使用でき、またPCR解析のオリゴヌクレオチドプライマーとして使用できるDNAである。

[0038] プローブとして用いられるDNAとしては、少なくとも100塩基以上、好ましくは200塩基以上、より好ましくは500塩基以上のDNAが挙げられる。プライマーとして用いられるDNAとしては、少なくとも10塩基以上、好ましくは15塩基以上のDNAが挙げられる。

[0039] DNAのハイブリダイゼーション実験の方法はよく知られており、例えばモレキュラー・クローニング第4版(Cold Spring Harbor Laboratory Press(2012))、Methods for General and Molecular Bacteriology(ASM Press(1994))、Immunology methods manual(Academic press(1997))の他、多数の他の標準的な教科書に従ってハイブリダイゼーションの条件を決定し、実験を行うことができる。

[0040] また、市販のハイブリダイゼーションキットに付属した説明書に従うことによっても、ストリンジエントな条件下でハイブリダイズするDNAを取得できる。市販のハイブリダイゼーションキットとしては、例えば、ランダムプライム法によりプローブを作製し、ストリンジエントな条件下でハイブリダイゼーションを行うランダムプライムドDNAラベリングキット(ロシュ・ダイアグノスティックス社製)などが挙げられる。

- [0041] 上記のストリンジेंटな条件としては、例えばDNAを固定化したフィルターとプローブDNAとを50%ホルムアミド、5×SSC（750mMの塩化ナトリウム、75mMのクエン酸ナトリウム）、50mMのリン酸ナトリウム（pH7.6）、5×デンハルト溶液、10%の硫酸デキストラン、および20μg/lの変性させたサケ精子DNAを含む溶液中で42℃にて一晩、インキュベートした後、例えば約65℃の0.2×SSC溶液中で該フィルターを洗浄する条件が挙げられる。
- [0042] 上記した様々な条件は、ハイブリダイゼーション実験のバックグラウンドを抑えるために用いるブロッキング試薬を添加又は変更することにより設定することもできる。上記したブロッキング試薬の添加は、条件を適合させるために、ハイブリダイゼーション条件の変更を伴ってもよい。
- [0043] 上記したストリンジेंटな条件下でハイブリダイズ可能なDNAとしては、例えばBLASTやFASTA等を用いて上記したパラメータ等に基づいて計算したときに、配列番号7または11で表される塩基配列からなるDNAと少なくとも95%以上、好ましくは97%以上、より好ましくは98%以上、最も好ましくは99%以上の同一性を有するDNAが挙げられる。
- [0044] CTP：ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼをコードするDNAのうち、上記（a1）又は（c1）に記載のDNAは、例えば、配列番号10で表されるアミノ酸配列、又は配列番号7で表される塩基配列に基づき設計できるプローブDNAを用いた、微生物の染色体DNAライブラリーに対するサザンハイブリダイゼーション、又は該塩基配列に基づき設計できるプライマーDNAを用いた微生物の染色体DNAを鋳型としたPCR [PCR Protocols, Academic Press (1990)] により取得できる。前記操作に用いる微生物の染色体DNAの由来は特に限定されないが、例えば、ラクトバチルス属の乳酸菌、アナエロコッカス属、ストレプトコッカス属、フソバクテリウム属、バチルス属、パエニバチルス属、グラニュリカテラ属、クロストリジウム属の細菌が挙げられる。これらの中でもラクトバチルス属の乳酸菌、アナエロコッカス属の細菌が好ましく、ラク

トバチルス・サリバリウスがより好ましい。ラクトバチルス・サリバリウス ATCC 11741 株は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (ATCC) から入手できる。

[0045] CTP : ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼをコードする DNA のうち、上記 (b 1) 又は (c 1) に記載の DNA は、例えば、配列番号 14 で表されるアミノ酸配列、又は配列番号 11 で表される塩基配列に基づき設計し得るプローブ DNA を用いた、微生物の染色体 DNA ライブラリーに対するサザンハイブリダイゼーション、又は該塩基配列に基づき設計し得るプライマー DNA を用いた微生物の染色体 DNA を鋳型とした PCR により取得できる。前記操作に用いる微生物の染色体 DNA の由来は特に限定されないが、例えば、ラクトバチルス属の乳酸菌、アナエロコッカス属、ストレプトコッカス属、フソバクテリウム属、バチルス属、パエニバチルス属、グラニュリカテラ属、クロストリジウム属の細菌が挙げられる。これらの中でもラクトバチルス属の乳酸菌、アナエロコッカス属の細菌が好ましく、アナエロコッカス・ハイドロゲナリスがより好ましい。アナエロコッカス・ハイドロゲナリス ATCC 49630 株は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (ATCC) から入手できる。

[0046] CTP : ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼをコードする DNA のうち、上記 (a 2)、(b 2) 又は (c 2) に記載の DNA は、例えば、各種の蛋白質配列データベースに対して配列番号 10 若しくは 14 で表されるアミノ酸配列と 60% 以上、好ましくは以下順に、70% 以上、80% 以上、90% 以上、95% 以上、より好ましくは 98% 以上、最も好ましくは 99% 以上の同一性を有するアミノ酸配列を検索し、又は、各種の遺伝子配列データベースに対して配列番号 7 若しくは 11 で表される塩基配列と 95% 以上、好ましくは 97% 以上、より好ましくは 98% 以上、最も好ましくは 99% 以上の同一性を有する塩基配列を検索し、該検索によって得られたアミノ酸配列又は塩基配列に基づいて設計し得るプローブ DNA 又はプライマー DNA、及び当該 DNA を有する微生物を用いて、上記の DNA を取得す

る方法と同様のサザンハイブリダイゼーション又はPCRを用いた方法等によって取得できる。

[0047] CTP：ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼをコードするDNAのうち、上記(a3)、(b3)又は(c3)に記載のDNAは、例えば、配列番号10若しくは14で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列、又は配列番号7若しくは11で表される塩基配列からなるDNAを鋳型としてエラープローンPCR等に供することにより取得できる。

[0048] また、目的の変異(欠失、置換、挿入又は付加)が挿入されるように設計した塩基配列をそれぞれの5'端に持つ1組のPCRプライマーを用いたPCR[Gene, 77, 51(1989)]によっても、上記(a3)、(b3)又は(c3)に記載のDNAを取得できる。すなわち、まず配列番号10若しくは14で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列、又は配列番号7又は11で表される塩基配列からなるDNAの5'端に対応するセンスプライマーと、5'端に変異の配列と相補的な配列を有する、変異導入部位の直前(5'側)の配列に対応するアンチセンスプライマーで該DNAを鋳型にしてPCRを行い、該DNAの5'端から変異導入部位までの断片A(3'側に変異が導入されている)を増幅する。次いで、5'端に変異の配列を有する、変異導入部位の直後(3'側)の配列に対応するセンスプライマーと、該DNAの3'端に対応するアンチセンスプライマーで該DNAを鋳型にしてPCRを行い、5'端に変異が導入された該DNAの変異導入部位から3'端までの断片Bを増幅する。これらの増幅断片同士を精製後、混合して鋳型やプライマーを加えずにPCRを行うと、増幅断片Aのセンス鎖と増幅断片Bのアンチセンス鎖は変異導入部位が共通しているのでハイブリダイズし、プライマー兼鋳型としてPCRの反応が進行し、変異が導入されたDNAが増幅する。

[0049] 取得した上記(a1)～(a3)、(b1)～(b3)および(c1)～(c3)に記載のDNAは、そのまま、または適当な制限酵素等で切断し、常法によりベクターに組み込み、得られた組換え体DNAを宿主細胞に導入

した後、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばジデオキシ法 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 74, 5463 (1977)]、又はアプライド・バイオシステムズ3500ジェネティックアナライザやアプライド・バイオシステムズ3730DNAアナライザ（いずれもサーモフィッシャー・サイエンティフィック社製）等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより、該DNAの塩基配列を決定できる。

[0050] DNAの塩基配列を決定する際に使用できる宿主細胞としては、例えば、*Escherichia coli* DH5 α 、*Escherichia coli* HST08 Premium、*Escherichia coli* HST02、*Escherichia coli* HST04 dam-/dcm-、*Escherichia coli* JM109、*Escherichia coli* HB101、*Escherichia coli* CJ236、*Escherichia coli* BMH71-18 mutS、*Escherichia coli* MV1184、*Escherichia coli* TH2（いずれもタカラバイオ社製）、*Escherichia coli* XL1-Blue、*Escherichia coli* XL2-Blue（いずれもアジレント・テクノロジー社製）、*Escherichia coli* DH1、*Escherichia coli* MC1000、*Escherichia coli* W1485、*Escherichia coli* W3110、*Escherichia coli* MP347、*Escherichia coli* NM522等が挙げられる。

[0051] 上記のベクターとしては、例えば、pBluescript II KS (+)、pPCR-Script Amp SK (+)（いずれもアジレント・テクノロジー社製）、pT7Blue（メルクミリポア社製）、pCRII（サーモフィッシャー・サイエンティフィック社製）、pCR-TRAP（ジーンハンター社製）、及びpDIRECT [Nucleic Acids Res., 18, 6069 (1990)]等が挙げられる。

- [0052] 本発明のDNAを組み込んで得られる、組み換えDNAの宿主細胞への導入方法としては、宿主細胞へDNAを導入する方法であればいずれも使用できる。例えば、カルシウムイオンを用いる方法（Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 69, 2110, 1972）、プロトプラスト法（日本国特開昭63-248394号公報）、エレクトロポレーション法（Nucleic Acids Res., 16, 6127, 1988）等が挙げられる。
- [0053] 塩基配列を決定した結果、取得されたDNAが部分長であった場合は、該部分長DNAをプローブに用いた染色体DNAライブラリーに対するサザンハイブリダイゼーション法等により、全長DNAを取得できる。
- [0054] 更に、決定されたDNAの塩基配列または配列番号7若しくは11で表される塩基配列に基づいて、日本テクノサービス社製NTS MシリーズDNA合成装置等を用いて化学合成することにより、目的とするDNAを調製することもできる。
- [0055] 上記（a1）～（a3）、（b1）～（b3）および（c1）～（c3）に記載のDNAを有する組換え体DNAとは、例えば、該DNAが親株において自律複製可能なDNAであって、上記（a1）～（a3）、（b1）～（b3）および（c1）～（c3）のいずれか1つ以上に記載のDNAを転写できる位置にプロモーターを含有している発現ベクターに、上記（a1）～（a3）、（b1）～（b3）および（c1）～（c3）のいずれか1つ以上に記載のDNAが組み込まれているDNAをいう。
- [0056] 親株において染色体中への組込が可能なDNAであって、上記（a1）～（a3）、（b1）～（b3）および（c1）～（c3）のいずれか1つ以上に記載のDNAもまた、上記（a1）～（a3）、（b1）～（b3）および（c1）～（c3）に記載のDNAを有する組換え体DNAである。組換え体DNAが、親株の染色体DNAへの組込が可能なDNAである場合は、プロモーターを含有していなくてもよい。
- [0057] 細菌等の原核生物を親株として用いる場合は、親株において自律複製可能

な組換え体DNAは、プロモーター、リボソーム結合配列、上記(a1)～(a3)、(b1)～(b3)および(c1)～(c3)のいずれか1つ以上に記載のDNA、及び転写終結配列により構成された組換え体DNAであることが好ましい。プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。リボソーム結合配列であるシャインーダルガノ(Shine-Dalgarno)配列と開始コドンとの間を適当な距離(例えば6～18塩基)に調節した組換え体DNAを用いることが好ましい。

[0058] 親株において自律複製可能な組換え体DNAでは、該DNAの発現には転写終結配列は必ずしも必要ではないが、構造遺伝子の直下に転写終結配列を配置することが好ましい。

[0059] 発現ベクターとしては、目的DNAを宿主に導入し、増殖、発現させるための適当な核酸分子であれば特に限定されず、プラスミドのみならず、例えば、人工染色体、トランスポゾンを用いたベクター、コスミドを用いてもよい。

[0060] 親株にエシェリヒア属に属する微生物を用いる場合は、発現ベクターとしては、例えば、pCold1、pSTV28、pSTV29、pUC118(いずれもタカラバイオ社製)、pMW119(ニッポンジーン社製)、pET21a、pCOLADuet-1、pCDFDuet-1、pCDF-1b、pRSF-1b(いずれもメルクミリポア社製)、pMAL-c5x(ニューイングランドバイオラプス社製)、pGEX-4T-1、pTrc99A(いずれもジーイーヘルスケアバイオサイエンス社製)、pTrcHis、pSE280(いずれもサーモフィッシャー・サイエンティフィック社製)、pGEMEX-1(プロメガ社製)、pQE-30、pQE80L(いずれもキアゲン社製)、pET-3、pBluescript11SK(+)、pBluescript11KS(-)(いずれもアジレント・テクノロジー社製)、pKYP10(日本国特開昭58-110600号公報)、pKYP200[Agric. Biol. Chem., 48, 669(1984)]、pLSA1[Agric. Biol. Chem., 5

3, 277 (1989)]、pGEL1 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 82, 4306 (1985)]、pTrs30 [Escherichia coli JM109/pTrs30 (FERM BP-5407) より調製]、pTrs32 [Escherichia coli JM109/pTrs32 (FERM BP-5408) より調製]、pTK31 [APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 2007, Vol. 73, No. 20, p6378-6385]、pPAC31 (国際公開第98/12343号)、pUC19 [Gene, 33, 103 (1985)]、pPA1 (日本国特開昭63-233798号公報) 等が挙げられる。

[0061] 上記発現ベクターを用いる場合のプロモーターとしては、エシェリヒア属に属する微生物の細胞中で機能するものであればいかなるものでもよいが、例えば、trpプロモーターやilvプロモーター等のアミノ酸生合成に関与する遺伝子のプロモーター、uspAプロモーター、lacプロモーター、PLプロモーター、PRプロモーター、PSEプロモーター等のEscherichia coliやファージ等に由来するプロモーターが挙げられる。また、trpプロモーターを2つ直列させたプロモーター、tacプロモーター、trcプロモーター、lacT7プロモーター、letIプロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーターを用いることもできる。

[0062] 親株にコリネ型細菌を用いる場合は、発現ベクターとしては、例えば、pCG1 (日本国特開昭57-134500号公報)、pCG2 (日本国特開昭58-35197号公報)、pCG4 (日本国特開昭57-183799号公報)、pCG11 (日本国特開昭57-134500号公報)、pCG116、pCE54、pCB101 (いずれも日本国特開昭58-105999号公報)、pCE51、pCE52、pCE53 [いずれもMolecular and General Genetics, 196, 175 (1984)] 等が挙げられる。

- [0063] 上記発現ベクターを用いる場合のプロモーターとしては、コリネ型細菌の細胞中で機能するものであればいかなるものでもよいが、例えば、P54-6プロモーター [Appl. Microbiol. Biotechnol., 53, p674-679 (2000)] が挙げられる。
- [0064] 親株に酵母菌株を用いる場合には、発現ベクターとしては、例えば、YEp13 (ATCC37115)、YEp24 (ATCC37051)、YEp50 (ATCC37419)、pHS19、pHS15等が挙げられる。
- [0065] 上記発現ベクターを用いる場合のプロモーターとしては、酵母菌株の細胞中で機能するものであればいかなるものでもよいが、例えば、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター、gal1プロモーター、gal10プロモーター、ヒートショックポリペプチドプロモーター、MF α 1プロモーター、CUP1プロモーター等のプロモーターが挙げられる。
- [0066] 本発明の組換え体DNAは、例えば、上述の方法により調製したDNA断片を制限酵素処理する等して、前記の適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することによって作製できる。
- [0067] ここで、該DNAの塩基配列を宿主での発現に最適なコドンとなるように塩基を置換することにより、該DNAがコードする蛋白質の発現量を向上させることもできる。本発明の製造方法に用いられる親株におけるコドン使用頻度の情報は、公共のデータベースを通じて入手できる。
- [0068] CTP：ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼをコードするDNAを有する組換え体DNAを宿主細胞において自律複製可能なプラスミドとして導入する方法としては、例えば、上述のカルシウムイオンを用いる方法、プロトプラスト法、エレクトロポレーション法、並びに、スフェロプラスト法 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 81, 4889 (1984)]、酢酸リチウム法 [J. Bacteriol., 153, 163 (1983)]等の方法が挙げられる。
- [0069] また、CTP：ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼをコードするD

NAを有する組換え体DNAを親株のゲノムに挿入する場合は、例えば相同組換えによる方法を用いればよい。すなわち、目的DNAの導入を起こさせる染色体領域の一部を結合したDNAを、微生物細胞内に取り込ませ、当該染色体領域の一部領域における相同組換えを起こさせることによって、ゲノムに組み込ませることができる。例えば、*Escherichia coli*で頻用される相同組換えを利用した方法としては、ラムダファージの相同組換え系を利用して、組換え体DNAを導入する方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 6641-6645 (2000)] が挙げられる。ここで、導入を起こさせる染色体領域としては、特に制限されないが、必須でない遺伝子領域、若しくは必須でない遺伝子領域上流の非遺伝子領域が好ましい。当該DNAを微生物細胞内に取り込ませる方法としては、宿主細胞へDNAを導入する方法であればいずれも使用でき、例えば、上記のカルシウムイオンを用いる方法、プロトプラスト法、エレクトロポレーション法等が挙げられる。

[0070] CTP：ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼをコードするDNAを有する組換え体DNAを発現可能に親株に導入することによって得られた微生物であることは、例えば、該微生物の該DNAの転写量をノーザン・ブロッティングにより、または該微生物の該蛋白質の生産量をウェスタン・ブロッティングにより、親株のそれと比較することにより確認できる。

[0071] 上記の方法で造成した微生物が、CTP：ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼを生産する能力を有する組換え微生物であることは、例えば以下の方法により確認できる。まず、親株と造成した微生物をそれぞれ培地に培養し、得られる培養物からCTP：ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼを含む細胞抽出液を調製する。続いて、該細胞抽出液を基質であるCTPとP-コリンに接触させ、CDP-コリンを生成させる。最後に、高速クロマトグラフィーまたはガスクロマトグラフィーなどを用いる一般的な分析方法により反応液中のCDP-コリンを検出することにより、造成した微生物がCTP：ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼを生産する能力を有す

る組換え微生物であることを確認できる。

[0072] 異種のCTP：ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼを生産する能力を有する組換え微生物としては、具体的には例えば、実施例において後述するBL21/pET21a-LslicCおよびBL21/pET21a-AhlicCが挙げられる。

[0073] 本発明におけるCTP：ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼは、基質特異性が高く、dCTPに対する反応性に比して、CTPに対する反応性が高いことが好ましい。具体的には、例えば、CTPに対する反応性を1とした場合、dCTPに対する反応性が0.75以下であることが好ましく、より好ましくは、以下順に、0.60以下、0.50以下、0.40以下、さらに好ましくは0.30以下、特に好ましくは0.20以下、最も好ましくは0.15以下である。CTPに対する反応性を1とした場合のdCTPに対する反応性は、例えば、 $[\text{CTP：ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼとP-コリンおよびdCTPを共存させたときのdCDP-コリンの生成量 (mM)}] / [\text{CTP：ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼとP-コリンおよびCTPを共存させたときのCDP-コリンの生成量 (mM)}]$ から算出できる。

[0074] このように、dCTPに対する反応性に比して、CTPに対する反応性が高い基質特異性を示すCTP：ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼを生産する能力を有する組換え微生物を利用することにより、dCDP-コリンの副生を抑制しながら、効率的にCDP-コリンを製造できる。

[0075] 2. CDP-コリンの製造方法

本発明のCDP-コリンの製造方法は、上記した異種のCTP：ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼを生産する能力を有する組換え微生物を利用してCDP-コリンを製造することを含む。

[0076] CDP-コリンの製造方法として、従来より発酵法または生体触媒を用いた方法が知られている（例えば、日本国特許第3369236号公報；Y.

Liu et al. Appl. Microbiol. Biote

chnol., 101, 1409, 2017.)。本発明のCDP-コリンの製造方法は、dCTPに対する反応性に比してCTPに対する反応性が高い、異種のCTP：ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼを生産する能力を有する組換え微生物を利用することにより、dCDP-コリンの副生を効果的に抑制でき、従来の方法と比較して効率的にCDP-コリンを製造し得る。具体的には例えば、日本国特許第3369236号公報及びY. Liu et al. Appl. Microbiol. Biotechnol., 101, 1409, 2017.に記載のCDP-コリンの製造方法において、CCT (choline phosphate cytidylyltransferase)の代わりに本発明におけるCTP：ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼを用いることにより本発明の効果が得られる。

[0077] 本発明のCDP-コリンを製造する方法としては、(I)発酵法によりCDP-コリンを製造する方法、(II)組換え微生物の培養物及び該培養物の処理物を用いてCDP-コリンを製造する方法が挙げられる。以下、各製造方法について説明する。

[0078] (I) 発酵法によりCDP-コリンを製造する方法

発酵法によりCDP-コリンを製造する方法としては、異種のCTP：ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼを生産する能力を有する組換え微生物を培地に培養し、培養物中にCDP-コリンを生成させることを特徴とする、CDP-コリンの製造方法が挙げられる。該製造方法は、例えば、培養物中にCDP-コリンを生成させたのち、蓄積せしめ、該培養物中からCDP-コリンを採取することを含んでいてもよい。

[0079] 発酵法によるCDP-コリンの製造方法に用いる組換え微生物としては、上記1の本発明の組換え微生物を用いることが好ましく、また、CTP：ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼの基質となるCTP及びP-コリンを生成する能力を有する微生物、及び／又は、CTP、P-コリン若しくはCDP-コリンの分解活性を人工的に弱化した微生物であることが好ましい

- 。
- [0080] 微生物の培養は、通常の方法に従って実施できる。該微生物を培養する培地としては、CTP：ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼの基質又は該基質の出発原料、該微生物が資化し得る炭素源、窒素源および無機塩類等を含む、該微生物の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。
- [0081] CTP：ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼの基質としては、例えば、CTPおよびP-コリンが挙げられる。基質の出発原料としては、例えば、オロト酸、CMP、塩化コリン、グルコース等が挙げられる。炭素源としては、該微生物が資化し得るものであればよく、例えば、グルコース、フラクトース、シュクロース、これらを含む糖蜜、デンプンおよびデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸およびプロピオン酸等の有機酸、並びにエタノールおよびプロパノール等のアルコール類等が挙げられる。
- [0082] 窒素源としては、例えば、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウムおよびリン酸アンモニウム等の無機酸もしくは有機酸のアンモニウム塩、その他の含窒素化合物、並びに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスチープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体、およびその消化物等が挙げられる。
- [0083] 無機塩としては、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、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅および炭酸カルシウム等が挙げられる。
- [0084] 発酵法によるCDP-コリンの製造方法において、用いる微生物がCTP：ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼの基質となるCTP及びP-コリンを生成する能力を有していない場合には、CTP及びP-コリンを培地に添加する。
- [0085] また、発酵法によるCDP-コリンの製造方法において、用いる微生物がCTP：ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼの基質となるCTP及びP-コリンを生成する能力を有していない場合には、CTP及びP-コリン

を培地に添加する代わりに、CTP及び／又はP-コリンを生成する能力を有する微生物を、本発明の組換え微生物と共培養することにより、本発明の組換え微生物にCTP及びP-コリンを供給してもよい。

[0086] 培養は、通常振盪培養または深部通気攪拌培養等の好氣的条件下で行うことが好ましい。培養温度は15～40℃が好ましく、培養時間は、通常5時間～7日間である。培養中のpHは3.0～9.0に保持することが好ましい。pHの調整は、無機または有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニア等を用いて行う。

[0087] また、培養中必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。

[0088] 例えば、lacプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド等を、trpプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸等を培地に添加してもよい。

[0089] 上記の培養により、培養物中にCDP-コリンを生成させることにより、CDP-コリンを製造できる。CDP-コリンの定量は、HPLC（例えば、島津製作所社製の分析装置SPD-M20A）を用いて実施できる。

[0090] 該培養物中からのCDP-コリンの採取は通常イオン交換樹脂法、沈殿法その他の公知の方法を組み合わせるにより実施できる。なお、菌体内にCDP-コリンが蓄積する場合には、例えば菌体を超音波などにより破碎し、遠心分離によって菌体を除去して得られる上清からイオン交換樹脂法などによって、CDP-コリンを採取できる。

[0091] (I I) 組換え微生物の培養物及び該培養物の処理物を用いてCDP-コリンを製造する方法

組換え微生物の培養物及び該培養物の処理物を用いてCDP-コリンを製造する方法は、酵素源としての、異種のCTP：ホスホコリンシチジルトラ

ンスフェラーゼを生産する能力を有する組換え微生物の培養物または該培養物の処理物と、基質とを、水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中にCDP-コリンを生成させることを特徴とする。該製造方法は、例えば、水性媒体中にCDP-コリンを生成させたのち、蓄積せしめ、該水性媒体中からCDP-コリンを採取することを含んでいてもよい。

[0092] 微生物を培養する方法及び培地としては、(1)において上述したものと同様である。

[0093] 本明細書において、培養物の処理物としては、例えば、上記の培養物の濃縮物、該培養物の乾燥物、該培養物を遠心分離、または濾過等して得られる菌体、該菌体の乾燥物、該菌体の凍結乾燥物、該菌体の界面活性剤処理物、該菌体の溶媒処理物、該菌体の酵素処理物、および該菌体の固定化物などの酵素源として該培養物と同様の機能を保持する生菌体を含んでいるもの、並びに該菌体の超音波処理物、該菌体の機械的摩砕処理物、当該処理した菌体から得られる粗酵素抽出物、および当該処理した菌体から得られる精製酵素が挙げられる。

[0094] これらの中でも、好ましくは、上記の培養物の濃縮物、該培養物の乾燥物、該培養物を遠心分離、または濾過等して得られる菌体、該菌体の乾燥物、該菌体の凍結乾燥物、該菌体の界面活性剤処理物、該菌体の溶媒処理物、該菌体の酵素処理物、および該菌体の固定化物などの酵素源として該培養物と同様の機能を保持する生菌体を含んでいるもの、並びに該菌体の超音波処理物、該菌体の機械的摩砕処理物が挙げられ、最も好ましくは、上記の培養物の濃縮物、該培養物の乾燥物、該培養物を遠心分離、または濾過等して得られる菌体、該菌体の乾燥物、該菌体の凍結乾燥物、該菌体の界面活性剤処理物、該菌体の溶媒処理物、該菌体の酵素処理物、および該菌体の固定化物などの酵素源として該培養物と同様の機能を保持する生菌体を含んでいるものが挙げられる。

[0095] 酵素源としてのCTP：ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼの量は、1～500g/lであることが好ましく、より好ましくは1～300g/l

lである。

- [0096] 基質の濃度は、0.1 mM～10 Mであることが好ましく、より好ましくは1 mM～1 Mである。基質としては、例えば、CTPおよびP-コリンが挙げられる。
- [0097] 水性媒体としては、例えば、水、りん酸塩、炭酸塩、酢酸塩、ほう酸塩、クエン酸塩およびトリスなどの緩衝液、メタノールおよびエタノールなどのアルコール類、酢酸エチルなどのエステル類、アセトンなどのケトン類、並びにアセトアミドなどのアミド類などが挙げられる。また、酵素源として用いた微生物の培養液を水性媒体として使用できる。
- [0098] CDP-コリンの生成反応においては、必要に応じてフィチン酸等のキレート剤、界面活性剤あるいは有機溶媒を添加してもよい。界面活性剤としては、ポリオキシエチレン・オクタデシルアミン（例えば、ナイミンS-215、日本油脂社製）などの非イオン界面活性剤、セチルトリメチルアンモニウム・ブロマイドやアルキルジメチル・ベンジルアンモニウムクロライド（例えば、カチオンF2-40E、日本油脂社製）などのカチオン系界面活性剤、ラウロイル・ザルコシネートなどのアニオン系界面活性剤、アルキルジメチルアミン（例えば、三級アミンFB、日本油脂社製）などの三級アミン類など、CDP-コリンの生成を促進するものであればいずれでもよく、1種または数種を混合して使用してもよい。界面活性剤は、通常0.1～50 g/lの濃度で用いられる。
- [0099] 有機溶媒としては、キシレン、トルエン、脂肪族アルコール、アセトン、酢酸エチルなどが挙げられ、通常0.1～50 ml/lの濃度で用いられる。CDP-コリンの生成反応は、水性媒体中、pH5～10、好ましくはpH6～8、20～50℃の条件で1～96時間行う。該生成反応を促進させるために、アデニン、アデノシン-5'-リン酸（AMP）、アデノシン-5'-三リン酸（ATP）、硫酸マグネシウム、塩化マグネシウムなどを添加してもよい。アデニン、AMP、ATPは、通常0.01～100 mMの濃度で用いられる。

[0100] 水性媒体中に生成したCDP-コリンは(1)において上述した方法により定量及び採取できる。

実施例

[0101] 以下に本発明の実施例を示すが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

[0102] [分析例]

HPLC法によるCDP-コリン及びdCDP-コリンの分析は、島津製作所社製の分析装置SPD-M20Aを用いて以下の条件で行った。

[0103] カラム：Shodex Asahipak

分析温度：50℃

流速：0.5ml/min

溶離液組成：30mM リン酸二水素カリウム/10% アセトニトリル (pH3.5)

検出器：SPD-M20A

[0104] 標品としてCDP-コリン(協和発酵バイオ社製)をそれぞれ0、0.005、0.01、0.02g/Lの濃度で含有する溶液を分析に供し、保持時間10.56minのピークのエリア値から検量線を作成した。サンプルは0.005~0.02g/Lの濃度となるよう希釈して分析に供し、保持時間10.56minのピークのエリア値から検量線を用いてサンプル中に含まれるCDP-コリンの定量を行った。dCDP-コリンの標品は入手困難であるため、保持時間9.37minのピークのエリア値から、CDP-コリンの検量線を用いてdCDP-コリンの定量を行った。

[0105] [実施例1] ストレプトコッカス・ニューモニア由来のCTP：ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼ(SplcC)をコードするDNAで親株を形質転換して得られる微生物の造成

配列番号1で表される塩基配列を有する染色体DNA(GenBank:CP053210.1)を鋳型として、配列番号2及び3で表される塩基配列からなるDNAをプライマーセットとしてPCRを行った。配列番号1で

表される塩基配列からなるDNAを含む約700bpのDNA断片を精製した。

[0106] 発現ベクターであるpET21a (Novagen社製)を鋳型として、配列番号4及び5で表される塩基配列からなるDNAをプライマーセットとしてPCRを行い、約5.2kbpのDNA断片(以下、pET21a Inverse断片という)を精製した。

[0107] 上記の2種類のDNA断片をIn-Fusion HD Cloning Kit (タカラバイオ社製)を用いて連結し、該連結反応液を用いてEscherichia coli BL21株を形質転換することにより、BL21/pET21a-Spl i c Cを造成した(インサートのアミノ酸配列を配列番号6に記載する)。

[0108] [実施例2] ラクトバチルス・サリバリウス由来のCTP:ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼ(LslicC)をコードするDNAで親株を形質転換して得られる微生物の造成

配列番号7で表される塩基配列を有する染色体DNA (GenBank: CP011403.1)を鋳型として、配列番号8及び9で表される塩基配列からなるDNAをプライマーセットとしてPCRを行った。配列番号7で表される塩基配列からなるDNAを含む約700bpのDNA断片を精製した。

[0109] 当該DNA断片及びpET21a Inverse断片をIn-Fusion HD Cloning Kitを用いて連結し、該連結反応液を用いてEscherichia coli BL21株を形質転換することにより、BL21/pET21a-LslicCを造成した(インサートのアミノ酸配列を配列番号10に記載する)。

[0110] [実施例3] アナエロコッカス・ハイドロゲナリス由来のCTP:ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼ(AhlicC)をコードするDNAで親株を形質転換して得られる微生物の造成

配列番号11で表される塩基配列を有する染色体DNA (GenBank

: NZ_ABXA01000041. 1) を鋳型として、配列番号12及び13で表される塩基配列からなるDNAをプライマーセットとしてPCRを行った。配列番号11で表される塩基配列からなるDNAを含む約700bpのDNA断片を精製した。

[0111] 当該DNA断片及びpET21a Inverse断片をIn-Fusion HD Cloning Kitを用いて連結し、該連結反応液を用いてEscherichia coli BL21株を形質転換することにより、BL21/pET21a-AhlicCを造成した（インサートのアミノ酸配列を配列番号14に記載する）。

[0112] Lipman-Pearson法により、SplicC、LslicC及びAhlicCをコードするアミノ酸配列の同一性を解析した結果を表1に示す。

[0113] [表1]

同一性(%)	SplicC	LslicC	AhlicC
SplicC		33	31
LslicC	33		62
AhlicC	31	62	

[0114] 表1に示すように、LslicCとAhlicCとは60%以上の同一性を示した。一方SplicCは、LslicCおよびAhlicCとの同一性が30%程度と低く、60%未満であった。

[0115] [実施例4] CTP又はdCTP及びP-コリンを基質として用いるCDP-コリン又はdCDP-コリンの製造

BL21/pET21a-SplicC並びにBL21/pET21a-LslicC及びBL21/pET21a-AhlicCをアンピシリン100mg/mlを含むLB培地〔バクトトリプトン（ディフコ社製）10g/l、酵母エキス（ディフコ社製）5g/l、塩化ナトリウム10g/l〕5mlの入った太型試験管に接種し、30℃で16時間培養した

。該培養液をアンピシリン 100 mg/ml を含む LB 培地 50 ml の入ったバツフル付三角フラスコに 1% 接種し、30℃、220 rpm で 24 時間培養した。培養開始から 2 時間目に、IPTG 0.1 mM を添加した。該培養液 50 ml 分を遠心分離し湿菌体を取得した。

[0116] 各菌株の培養液各 50 ml 分を、懸濁バッファー [50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0)] 5 ml に懸濁し、超音波破碎を行った。破碎後 5,800 × g で 10 分間遠心し、未破碎菌体を沈殿させた後、上清を採取した。上清はブラッドフォード法を用いてタンパク量を定量し、反応に用いた。

[0117] 反応は 150 mM のリン酸水素二カリウム-HCl (pH 7.0) (富士フィルム和光純薬社製)、25 mM の塩化マグネシウム 6 水和物 (関東化学社製)、5 mM の CTP 又は dCTP (共にシグマアルドリッチ社製)、5 mM の P-コリン (東京化成工業社製) を含む反応液に前述した上清タンパク質液を終濃度 0.1 mg/ml になるように添加して、30℃、1,000 rpm で振とうすることにより行った。反応開始後 10 分が経過した時点で 1/5 量の 0.6 N 酢酸 (富士フィルム和光純薬社製) を添加することで反応を終了させた。

[0118] 試験は独立して三回行い、HPLC 法により CDP-コリン及び dCDP-コリンの定量を行い、平均±標準偏差の値を求めた。結果を表 2 及び図 1 に示す。

[0119] [表2]

	SplicC	LslicC	AhlicC
CDP-コリン(mM)	0.950±0.101	1.717±0.026	1.666±0.149
dCDP-コリン(mM)	0.749±0.057	0.036±0.010	0.252±0.067
dCDP-コリン/CDP-コリン	0.790±0.035	0.021±0.006	0.149±0.030

[0120] 表 2 及び図 1 に示すように、結晶構造が明らかになっている SplicC よりも LslicC、AhlicC の方が dCDP-コリン/CDP-コリンの値が低く、CTP に対する反応性を 1 とした場合、dCTP に対する反応性が 0.15 以下であった。この結果から、LslicC 及び AhlicC は、dCTP に対する反応性に比して、CTP に対する反応性が高いとい

う優れた基質特異性を示すことが示された。さらに、表1に示すアミノ酸配列の同一性を考慮すると、L s l i c Cのアミノ酸配列（配列番号10）又はA h l i c Cのアミノ酸配列（配列番号14）に対して60%以上の同一性を有するポリペプチドは、d C T Pに対する反応性に比してC T Pに対する反応性が高いという優れた基質特異性を示すことが示された。

[0121] 本発明を特定の態様を参照して詳細に説明したが、本発明の精神と範囲を離れることなく様々な変更および修正が可能であることは、当業者にとって明らかである。なお、本出願は、2021年9月10日付けで出願された日本特許出願（特願2021-147985）に基づいており、その全体が引用により援用される。また、ここに引用されるすべての参照は全体として取り込まれる。

配列表フリーテキスト

[0122] 配列番号1：S p l i c Cの塩基配列

配列番号2：S p l i c Cクローニング用プライマー__F wの塩基配列

配列番号3：S p l i c Cクローニング用プライマー__R vの塩基配列

配列番号4：p E T 2 1 a I n v e r s e用プライマー__F wの塩基配列

配列番号5：p E T 2 1 a I n v e r s e用プライマー__R vの塩基配列

配列番号6：p E T 2 1 a - S p l i c Cのインサートのアミノ酸配列

配列番号7：L s l i c Cの塩基配列

配列番号8：L s l i c Cクローニング用プライマー__F wの塩基配列

配列番号9：L s l i c Cクローニング用プライマー__R vの塩基配列

配列番号10：p E T 2 1 a - L s l i c Cのインサートのアミノ酸配列

配列番号11：A h l i c Cの塩基配列

配列番号12：A h l i c Cクローニング用プライマー__F wの塩基配列

配列番号13：A h l i c Cクローニング用プライマー__R vの塩基配列

配列番号14：p E T 2 1 a - A h l i c Cのインサートのアミノ酸配列

請求の範囲

[請求項1]

異種のCTP：ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼを生産する能力を有する組換え微生物であって、前記CTP：ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼが下記の(A1)～(A3)および(B1)～(B3)から選ばれるいずれか1のポリペプチドである、組換え微生物。

(A1) 配列番号10で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド

(A2) 配列番号10で示されるアミノ酸配列と少なくとも60%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つCTP：ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチド

(A3) 配列番号10で表されるアミノ酸配列において、1～20個のアミノ酸が欠失、置換、挿入または付加されたアミノ酸配列からなり、かつCTP：ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチド

(B1) 配列番号14で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド

(B2) 配列番号14で示されるアミノ酸配列と少なくとも60%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つCTP：ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチド

(B3) 配列番号14で表されるアミノ酸配列において、1～20個のアミノ酸が欠失、置換、挿入または付加されたアミノ酸配列からなり、かつCTP：ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチド

[請求項2]

下記の(a1)～(a3)および(b1)～(b3)から選ばれるいずれか1のDNAが発現可能に導入された、請求項1に記載の組換え微生物。

(a1) 配列番号10で示されるアミノ酸配列をコードするDNA

(a2) 配列番号10で示されるアミノ酸配列と少なくとも60%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つCTP：ホスホコリン

ンシチジルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNA

(a 3) 配列番号10で表されるアミノ酸配列において、1~20個のアミノ酸が欠失、置換、挿入または付加されたアミノ酸配列からなり、かつCTP：ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNA

(b 1) 配列番号14で示されるアミノ酸配列をコードするDNA

(b 2) 配列番号14で表されるアミノ酸配列において、1~20個のアミノ酸が欠失、置換、挿入または付加されたアミノ酸配列からなり、かつCTP：ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNA

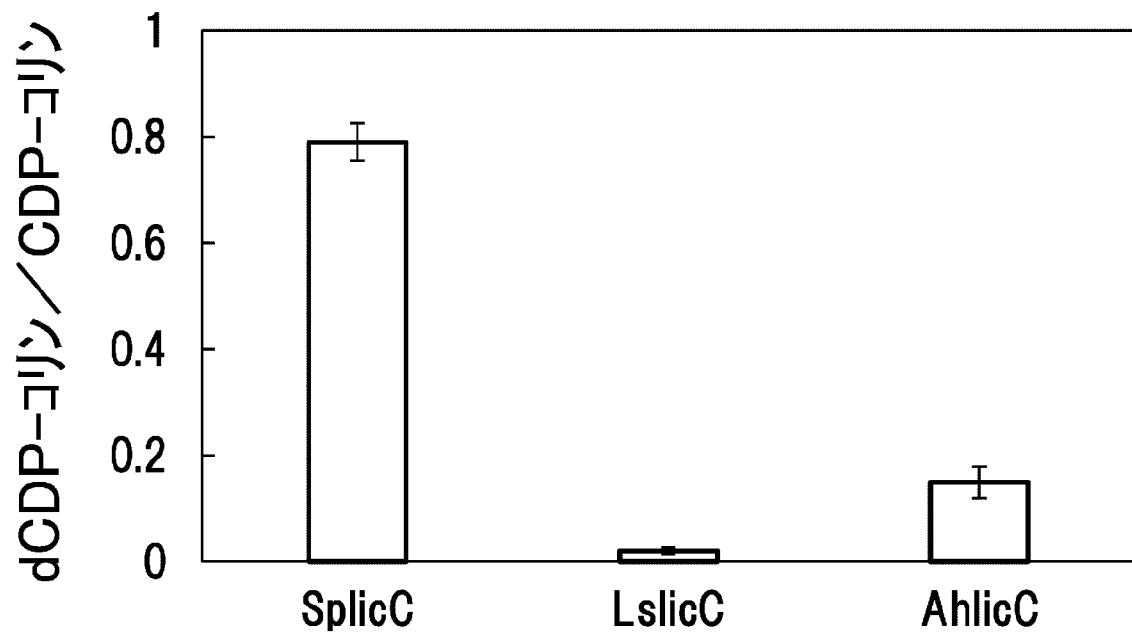
(b 3) 配列番号14で示されるアミノ酸配列をコードするDNAと少なくとも60%以上の同一性を有するDNAからなり、且つCTP：ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNA

[請求項3] 大腸菌である、請求項1または2に記載の組換え微生物。

[請求項4] 前記CTP：ホスホコリンシチジルトランスフェラーゼは、CTPに対する反応性を1とした場合、dCTPに対する反応性が0.75以下である、請求項1~3のいずれか1項に記載の組換え微生物。

[請求項5] 請求項1~4のいずれか1項に記載の組換え微生物を利用してCDPーコリンを生成することを含む、CDPーコリンの製造方法。

[図1]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/033972

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>C12N 15/54</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 15/55</i> (2006.01)i; <i>C12P 19/32</i> (2006.01)i FI: C12N15/54; C12N1/15 ZNA; C12N1/19; C12N5/10; C12N15/55; C12P19/32 Z; C12N1/21		
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) C12N15/54; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C12N15/55; C12P19/32		
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) UniProt/GeneSeq		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Database Uniprot [online]. 22 November 2017 uploaded, [retrieved on 03 October 2022], Retrieved from the internet: <URL: https://rest.uniprot.org/uniprotkb/A0A1H9I468.txt >, Definition: SubName: Full=CTP:phosphocholine cytidylyltransferase, Accession No.A0A1H9I468 entire text	1-5
X	Database Uniprot [online]. 13 November 2019 uploaded, [retrieved on 03 October 2022], Retrieved from the internet: <URL: https://rest.uniprot.org/uniprotkb/A0A5C8H8H0.txt >, Definition: Full=Phosphocholine cytidylyltransferase family protein, Accession No.A0A5C8H8H0 entire text	1-5
X	Database Uniprot [online]. 18 May 2010 uploaded, [retrieved on 03 October 2022], Retrieved from the internet: <URL: https://rest.uniprot.org/uniprotkb/D4J4S5.txt >, Definition: SubName: Full=CTP:phosphocholine cytidylyltransferase involved in choline phosphorylation for cell surface LPS epitopes, Accession No.D4J4S5 entire text	1-5
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: “A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed “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 03 October 2022		Date of mailing of the international search report 18 October 2022
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/033972

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Database Uniprot [online]. 20 January 2009 uploaded, [retrieved on 03 October 2022], Retrieved from the internet: <URL: https://rest.uniprot.org/uniprotkb/B6WAF1.txt >, Definition: SubName: Full=Cholinephosphate cytidylyltransferase/choline kinase, Accession No.B6WAF1 entire text	1-5
.....		

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:

The “form of an Annex C/ST.25 text file” is replaced with the “form of ST.26.”

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））</p> <p>C12N 15/54(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 15/55(2006.01)i; C12P 19/32(2006.01)i FI: C12N15/54; C12N1/15 ZNA; C12N1/19; C12N5/10; C12N15/55; C12P19/32 Z; C12N1/21</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>C12N15/54; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C12N15/55; C12P19/32</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>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>Database Uniprot[online], 2017.11.22 uploaded, [retrieved on 2022.10.03], Retrieved from the internet: <URL: https://rest.uniprot.org/uniprotkb/A0A1H9I468.txt>, Definition: SubName: Full=CTP:phosphocholine cytidylyltransferase, Accession No.A0A1H9I468 全文</td> <td>1-5</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>Database Uniprot[online], 2019.11.13 uploaded, [retrieved on 2022.10.03], Retrieved from the internet: <URL: https://rest.uniprot.org/uniprotkb/A0A5C8H8H0.txt>, Definition: Full=Phosphocholine cytidylyltransferase family protein, Accession No.A0A5C8H8H0 全文</td> <td>1-5</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>Database Uniprot[online], 2010.05.18 uploaded, [retrieved on 2022.10.03], Retrieved from the internet: <URL: https://rest.uniprot.org/uniprotkb/D4J4S5.txt>, Definition: SubName: Full=CTP:phosphocholine cytidylyltransferase involved in choline phosphorylation for cell surface LPS epitopes, Accession No.D4J4S5 全文</td> <td>1-5</td> </tr> </tbody> </table> <p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p> <table border="0"> <tr> <td>* 引用文献のカテゴリー</td> <td>“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</td> </tr> <tr> <td>“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの</td> <td>“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</td> </tr> <tr> <td>“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</td> <td>“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</td> </tr> <tr> <td>“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）</td> <td>“&” 同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td></td> </tr> <tr> <td>“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</td> <td></td> </tr> </table>			引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	X	Database Uniprot[online], 2017.11.22 uploaded, [retrieved on 2022.10.03], Retrieved from the internet: <URL: https://rest.uniprot.org/uniprotkb/A0A1H9I468.txt>, Definition: SubName: Full=CTP:phosphocholine cytidylyltransferase, Accession No.A0A1H9I468 全文	1-5	X	Database Uniprot[online], 2019.11.13 uploaded, [retrieved on 2022.10.03], Retrieved from the internet: <URL: https://rest.uniprot.org/uniprotkb/A0A5C8H8H0.txt>, Definition: Full=Phosphocholine cytidylyltransferase family protein, Accession No.A0A5C8H8H0 全文	1-5	X	Database Uniprot[online], 2010.05.18 uploaded, [retrieved on 2022.10.03], Retrieved from the internet: <URL: https://rest.uniprot.org/uniprotkb/D4J4S5.txt>, Definition: SubName: Full=CTP:phosphocholine cytidylyltransferase involved in choline phosphorylation for cell surface LPS epitopes, Accession No.D4J4S5 全文	1-5	* 引用文献のカテゴリー	“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	“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの	“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	“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	“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	“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）	“&” 同一パテントファミリー文献	“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	
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号																								
X	Database Uniprot[online], 2017.11.22 uploaded, [retrieved on 2022.10.03], Retrieved from the internet: <URL: https://rest.uniprot.org/uniprotkb/A0A1H9I468.txt>, Definition: SubName: Full=CTP:phosphocholine cytidylyltransferase, Accession No.A0A1H9I468 全文	1-5																								
X	Database Uniprot[online], 2019.11.13 uploaded, [retrieved on 2022.10.03], Retrieved from the internet: <URL: https://rest.uniprot.org/uniprotkb/A0A5C8H8H0.txt>, Definition: Full=Phosphocholine cytidylyltransferase family protein, Accession No.A0A5C8H8H0 全文	1-5																								
X	Database Uniprot[online], 2010.05.18 uploaded, [retrieved on 2022.10.03], Retrieved from the internet: <URL: https://rest.uniprot.org/uniprotkb/D4J4S5.txt>, Definition: SubName: Full=CTP:phosphocholine cytidylyltransferase involved in choline phosphorylation for cell surface LPS epitopes, Accession No.D4J4S5 全文	1-5																								
* 引用文献のカテゴリー	“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																									
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの	“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																									
“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	“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																									
“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）	“&” 同一パテントファミリー文献																									
“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																										
<p>国際調査を完了した日</p> <p>03.10.2022</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p>18.10.2022</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>長谷川 強 4B 1783</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3446</p>																									

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	Database Uniprot[online], 2009.01.20 uploaded, [retrieved on 2022.10.03], Retrieved from the internet: <URL: https://rest.uniprot.org/uniprotkb/B6WAF1.txt >, Definition: SubName: Full=Cholinephosphate cytidylyltransferase/choline kinase, Accession No.B6WAF1 全文	1-5

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:
- 上記「附属書C/ST.25テキストファイル形式」は「ST.26形式」と読み替える。