

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2022年10月6日(06.10.2022)



(10) 国際公開番号

WO 2022/210708 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 1/21 (2006.01) C12N 15/53 (2006.01)
C12N 1/14 (2006.01) C12N 15/54 (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01) C12N 15/60 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01) C12P 7/02 (2006.01)
C12N 9/04 (2006.01) C12P 7/42 (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01) C12P 7/44 (2006.01)
C12N 9/88 (2006.01) C12P 13/00 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2022/015439

(22) 国際出願日: 2022年3月29日(29.03.2022)

(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 2021-057325 2021年3月30日(30.03.2021) JP
特願 2021-069632 2021年4月16日(16.04.2021) JP

(71) 出願人: 旭化成株式会社 (ASAHI KASEI KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒1000006 東京都千代田区有楽町一丁目1番2号 Tokyo (JP).

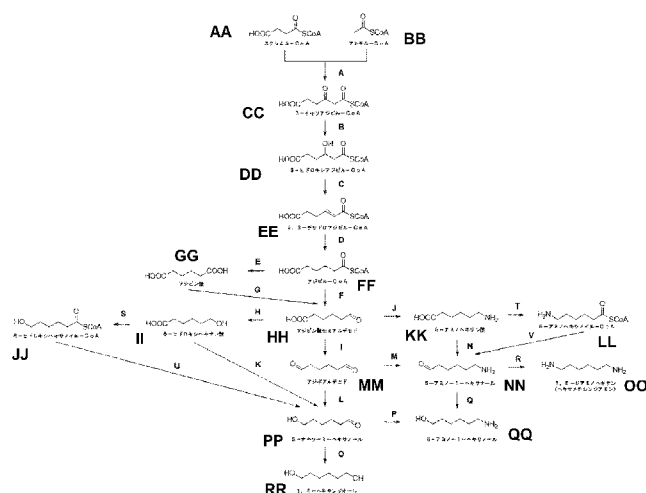
(72) 発明者: 山田 祐太郎 (YAMADA Yutaro); 〒1000006 東京都千代田区有楽町一丁目1番2号 旭化成株式会社内 Tokyo (JP). 牛木 章友 (USHIKI Norisuke); 〒1000006 東京都千代田区有楽町一丁目1番2号 旭化成株式会社内 Tokyo (JP). 宮武 令 (MIYATAKE Ryo); 〒1000006 東京都千代田区有楽町一丁目1番2号 旭化成株式会社内 Tokyo (JP). 井阪 光二 (ISAKA Koji); 〒1000006 東京都千代田区有楽町一丁目1番2号 旭化成株式会社内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 小野 誠, 外 (ONO Makoto et al.); 〒1008136 東京都千代田区大手町一丁目1番1号 大手町パークビルディング アンダーソン・毛利・友常法律事務所 外国法共同事業 Tokyo (JP).

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

(54) Title: RECOMBINANT MICROORGANISM AND METHOD FOR PRODUCING C6 COMPOUND

(54) 発明の名称: 組換え微生物及びC6化合物の製造方法



AA Succinyl-CoA
BB Acetyl-CoA
CC 3-Oxoadipyl-CoA
DD 3-Hydroxyadipyl-CoA
EE 2,3-Dehydroadipyl-CoA
FF Adipyl-CoA
GG Adipic acid
HH Adipic semialdehyde
II 6-Hydroxyhexanoic acid
JJ 6-Hydroxyhexanoyl-CoA
KK 6-Aminohexanoic acid
LL 6-Aminohexanoyl-CoA
MM Adipaldehyde
NN 6-Amino-1-hexanal
OO 1,6-Diaminohexane (hexamethylenediamine)
PP 6-Oxo-1-hexanol
QQ 6-Amino-1-hexanol
RR 1,6-Hexanediol

(57) Abstract: [Problem] To provide a recombinant microorganism having 2,3-dehydroadipyl-CoA reductase activity and a method for producing a C6 compound. Also, to provide a recombinant microorganism capable of producing adipic acid or an adipic acid derivative and a method for producing adipic acid or an adipic acid derivative. [Solution] A recombinant microorganism that contains an exogenous gene encoding a protein having an enzymatic activity to reduce 2,3-dehydroadipyl-CoA into adipyl-CoA and/or an exogenous gene encoding 3-hydroxyadipyl-CoA dehydratase.

HU, ID, IL, IN, 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))
- 規則13の2に基づいて明細書とは別に提出された、寄託された生物材料に関する表示 (規則13の2.4(d)(i)及び48.2(a)(viii))
- 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: 【課題】 2, 3-デヒドロアジピル-C o A還元酵素活性を有する組換え微生物、及び、C 6化合物の製造方法を提供すること、並びに、アジピン酸またはアジピン酸誘導体を生産することのできる組換え微生物、及び、アジピン酸またはアジピン酸誘導体の製造方法を提供すること。
【解決手段】 2, 3-デヒドロアジピル-C o Aを還元してアジピル-C o Aに変換する酵素活性を有するタンパク質をコードする外来性遺伝子、及び、3-ヒドロキシアジピル-C o Aデヒドラターゼをコードする外来性遺伝子のうちの少なくとも1つを含む組換え微生物。

明 細 書

発明の名称：組換え微生物及びC 6化合物の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、組換え微生物及びC 6化合物の製造方法に関する。本発明はまた、組換え微生物及びアジピン酸又はその誘導体の製造方法にも関する。

背景技術

[0002] アジピン酸、ヘキサメチレンジアミン、1, 6-ヘキサンジオール、6-アミノヘキサン酸、6-アミノ-1-ヘキサノールおよび6-ヒドロキシヘキサン酸といったC 6化合物は、ポリアミドやポリウレタン原料等に用いられており、化学産業において重要な化合物として位置づけられている。例えば、アジピン酸（CAS No. 124-04-9）は、ナイロン-66などに代表されるポリアミド原料、ウレタン、および可塑剤原料として使用されるモノマー化合物である。アジピン酸の現在の一般的な製造方法は、化学合成法、例えば、シクロヘキサノール単独、または、シクロヘキサノールとシクロヘキサノンとの混合物（K/Aオイル）を硝酸で酸化する方法である。

[0003] 近年、化石燃料は、枯渇が危惧され、かつ地球温暖化の一因とされていることから、化学品製造プロセスにおいては、化石燃料由来の原料から再生可能な原料、例えばバイオマス由来原料への移行が望まれており、遺伝子組換えにより代謝が改変された微生物の発酵生産による製造方法が提案されている。

[0004] 例えば、アジピン酸、6-アミノカプロン酸、またはカプロラクタム生合成のための微生物が報告されている（特許文献1）。一例として、スクシニル-CoAおよびアセチル-CoAを3-オキソアジピル-CoAに変換する「スクシニル-CoA：アセチル-CoAアシルトランスフェラーゼ」；3-オキソアジピル-CoAを3-ヒドロキシアジピル-CoAに変換する「3-ヒドロキシアシル-CoAデヒドロゲナーゼ」；3-ヒドロキシアジ

ピル-C o Aを5-カルボキシ-2-ペンテノイル-C o Aに変換する「3-ヒドロキシアジピル-C o Aデヒドラターゼ」；5-カルボキシ-2-ペンテノイル-C o Aをアジピル-C o Aに変換する「5-カルボキシ-2-ペンテノイル-C o Aレダクターゼ」；ならびに、アジピル-C o Aをアジペートに変換する「ホスホトランスアジピラーゼ」および「アジピン酸キナーゼ」を含む微生物を培養する方法を開示しているが、各酵素の例示として反応を進める可能性がある遺伝子を示しているに留まり、これら酵素の遺伝子に関し、バイオマス由来炭素源から効率的にC6化合物を生産することができることについては実証されていない。

[0005] また、酵素的に2, 3-デヒドロアジピン酸チオエステルをアジピン酸チオエステルに変換する工程を含むアジピン酸チオエステルの調製方法も提案されているものの（特許文献2）、*Candida tropicalis*、*Euglena gracilis*、*Clostridium beijerinckii*および*Yarrowia lipolytica*といった生物種由来のエノイルC o Aレダクターゼなどの一部が酵素活性を示すに留まり、C6化合物の発酵生産を実証した例は示されていない。

[0006] さらに、大腸菌由来の酵素PaaJ、PaaH、及びPaaF、ならびに、*Acinetobacter baylyi*由来の酵素DcaA及びTessBを共発現させた遺伝子組換え大腸菌の培養を用い、グルコースを炭素源として36mg/Lのアジピン酸を生産できることが報告されている（非特許文献1）。

[0007] 複数の生物種に由来するトランス-エノイルC o Aレダクターゼの酵素活性を示しており、さらに、*Candida tropicalis*または*Drosophila melanogaster*由来のトランス-エノイルC o Aレダクターゼ、もしくはそれらの酵素の変異体を発現させた大腸菌を培養することにより、アジピン酸および6-アミノカプロン酸を生産した例も提案されている（特許文献3）。

[0008] しかしながら、上記先行技術による発酵生産の例は、必ずしも工業的利用

に資する上で十分な生産性を満たしているとは限らず、微生物の生産能を改善することが求められている。

[0009] また、アジピン酸に関しては、バイオマス由来原料を用いた製造方法として、遺伝子組換え微生物を用いてバイオマス由来炭素源を *cis*, *cis*-ムコン酸に変換した後、得られた *cis*, *cis*-ムコン酸を水素化してアジピン酸を生産する方法も提案されている（特許文献4）。また、遺伝子組み換え体を用いて α -ケトグルタル酸からアジピン酸を生産する方法も提案されている（特許文献5）。

[0010] さらに、バイオマス由来原料からの直接的なアジピン酸の発酵生産方法についても提案されている（特許文献6）。この方法では、アジピン酸を生産することのできる天然に存在しない微生物として、スクシニル-CoAおよびアセチル-CoAを3-オキソアジピル-CoAに変換する「スクシニル-CoA：アセチル-CoAアシルトランスフェラーゼ」；3-オキソアジピル-CoAを3-ヒドロキシアジピル-CoAに変換する「3-ヒドロキシアシル-CoAデヒドロゲナーゼ」；3-ヒドロキシアジピル-CoAを5-カルボキシー-2-ペンテノイル-CoAに変換する「3-ヒドロキシアジピル-CoAデヒドラターゼ」；5-カルボキシー-2-ペンテノイル-CoAをアジピル-CoAに変換する「5-カルボキシー-2-ペンテノイル-CoAレダクターゼ」；およびアジピル-CoAをアジペートに変換する「ホスホトランスアジピラーゼ」／「アジピン酸キナーゼ」を含む天然に存在しない微生物が挙げられているが、各酵素に関し、反応を進める可能性がある酵素をコードする遺伝子を示しているに留まり、これらの遺伝子を用いることによってバイオマス由来炭素原料からアジピン酸を良好な収率で生産できることについては実証されていない。

先行技術文献

特許文献

[0011] 特許文献1：特許第5951990号明細書

特許文献2：特表2011-512868号公報

特許文献3：国際公開第2020／219859号

特許文献4：国際公開第1995／007996号

特許文献5：国際公開第2010／104391号

特許文献6：特開2011－515111号公報

非特許文献

- [0012] 非特許文献1：Kallischeuer, Nicolai, et al.
“Improved production of adipate with *Escherichia coli* by reversal of β -oxidation.” *Applied microbiology and biotechnology* 101.6 (2017): 2371–2382.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0013] 本発明の目的は、2，3－デヒドロアジピル－C○A還元酵素活性を有する組換え微生物、及び、C6化合物の効率的な製造方法を提供することにある。
- [0014] 本発明のさらなる目的は、アジピン酸またはアジピン酸誘導体を生産することのできる組換え微生物、及び、アジピン酸またはアジピン酸誘導体の製造方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

- [0015] 本発明者らは上記従来技術の課題を解決するために鋭意検討を行った結果、宿主微生物において、外来性の特定の酵素を発現させることで、2，3－デヒドロアジピル－C○A還元酵素活性の良好な組換え微生物を取得できること、さらには本組換え微生物を培養することでC6化合物を効率的に生産できることを見出し、本発明をなすに至った。
- [0016] すなわち、本発明は以下を提供する。

[1] 2，3－デヒドロアジピル－C○Aを還元してアジピルC○Aに変換

する酵素活性を有するタンパク質をコードする外来性遺伝子を含む組換え微生物であって、

前記外来性遺伝子が、

(i) 配列番号 8、9、10、11、12、13、14、15 または 16 に示すアミノ酸配列と 80% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする DNA、

(ii) 配列番号 8、9、10、11、12、13、14、15 または 16 に示すアミノ酸配列に対して 1～10 個のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする DNA、

(iii) 配列番号 57、58、59、60、61、62、63、64 または 65 に示すポリヌクレオチド配列と 80% 以上の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列からなる DNA、

(iv) 配列番号 57、58、59、60、61、62、63、64 または 65 に示すポリヌクレオチド配列によりコードされるタンパク質のアミノ酸配列に対して 1～10 個のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする DNA、

(v) 配列番号 57、58、59、60、61、62、63、64 または 65 に示すポリヌクレオチド配列に相補的なポリヌクレオチド配列からなる DNA と緊縮条件下でハイブリダイズする DNA、または

(vi) 配列番号 57、58、59、60、61、62、63、64 または 65 に示すポリヌクレオチド配列の縮重異性体からなる DNA である、組換え微生物；

[2] 前記外来性遺伝子が、

(xi) 配列番号 8、9、10、11、12、13、14、15 または 16 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする DNA、または、

(xiii) 配列番号 57、58、59、60、61、62、63、64 または 65 に示すポリヌクレオチド配列からなる DNA

である、[1]に記載の組換え微生物；

[3] 前記外来性遺伝子が、*Candida auris*、*Kluyveromyces marxianus*、*Pichia kudriavzevii*、*Thermothelomyces thermophilus*、*Thermothielavioides terrestris*、*Chaetomium thermophilum*、*Podospora anserina*、*Purpureocillium lilacinum*および*Pyrenophora teres*から選択される少なくとも1つに由来する、[1]または[2]に記載の組換え微生物；

[4] 前記組換え微生物が、C6化合物の生産経路を有し、

前記C6化合物が、アジピン酸、ヘキサメチレンジアミン、1,6-ヘキサジオール、6-アミノヘキサン酸、6-アミノ-1-ヘキサノールおよび6-ヒドロキシヘキサン酸からなる群から選択される少なくとも一つである、[1]～[3]のいずれか1項に記載の組換え微生物；

[5] 前記組換え微生物が、エスキリア (*Escherichia*) 属、バチルス (*Bacillus*) 属、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属、アルスロバクター (*Arthrobacter*) 属、ブレビバクテリウム (*Brevibacterium*) 属、クロストリジウム (*Clostridium*) 属、ザイモモナス (*Zymomonas*) 属、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属、バークホルデリア (*Burkholderia*) 属、ストレプトマイセス (*Streptomyces*) 属、ロドコッカス (*Rhodococcus*) 属、シネコシスティス (*Synechocystis*) 属、アルカリハロバチルス (*Alkalihalobacillus*) 属、サッカロマイセス (*Saccharomyces*) 属、シゾサッカロマイセス (*Schizosaccharomyces*) 属、ヤロウィア (*Yarrowia*) 属、カンジタ (*Candida*) 属、ピキア (*Pichia*) 属、またはアスペルギルス (*Aspergillus*) 属に属する、[1]～[4]のいずれか1項に記載の組換え微生物

;

[6] 前記組換え微生物が、大腸菌 (*Escherichia coli*) である、[1] ~ [5] のいずれか1項に記載の組換え微生物;

[7] ・ 3-オキソアジピルC o Aチオラーゼをコードする遺伝子、

・ 3-ヒドロキシアジピルC o Aデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子、

・ 3-ヒドロキシアジピルC o Aデヒドラターゼをコードする遺伝子、

・ カルボン酸レダクターゼをコードする遺伝子、

・ アルコールデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子、および

・ トランスアミナーゼ (アミノトランスフェラーゼ) をコードする遺伝子からなる群より選択される少なくとも1つをさらに含む、[1] ~ [6] のいずれか1項に記載の組換え微生物;

[8] [1] ~ [7] のいずれか1項に記載の組換え微生物を培養する培養工程を含む、C 6化合物の製造方法であって、

前記C 6化合物が、アジピン酸、ヘキサメチレンジアミン、1, 6-ヘキサンジオール、6-アミノヘキサン酸、6-アミノ-1-ヘキサノールおよび6-ヒドロキシヘキサン酸からなる群から選択される少なくとも一つである、製造方法;

[9] (a) 2, 3-デヒドロアジピルC o Aを還元してアジピルC o Aに変換する酵素活性を有し、

(b) 以下:

(i) 配列番号8、9、10、11、12、13、14、15または16に示すアミノ酸配列と80%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる、

(i i) 配列番号8、9、10、11、12、13、14、15または16に示すアミノ酸配列に対して1~10個のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなる、

(i i i) 配列番号57、58、59、60、61、62、63、64または65に示すポリヌクレオチド配列と80%以上の配列同一性を有するポ

リヌクレオチド配列からなるDNAによってコードされる、

(iv) 配列番号57、58、59、60、61、62、63、64または65に示すポリヌクレオチド配列によりコードされるタンパク質のアミノ酸配列に対して1～10個のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなる、

(v) 配列番号57、58、59、60、61、62、63、64または65に示すポリヌクレオチド配列に相補的なポリヌクレオチド配列からなるDNAと緊縮条件下でハイブリダイズするDNAによってコードされる、および

(vi) 配列番号57、58、59、60、61、62、63、64または65に示すポリヌクレオチド配列の縮重異性体からなるDNAによってコードされる

のいずれかである、組換えタンパク質；

[10] (xi) 配列番号8、9、10、11、12、13、14、15または16に示すアミノ酸配列からなるか、または、

(xiii) 配列番号57、58、59、60、61、62、63、64または65に示すポリヌクレオチド配列からなるDNAによってコードされる、組換えタンパク質；

[11] [9] または [10] に記載の組換えタンパク質を用いることを含む、C6化合物の製造方法。

[0017] さらに、本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、新たに自然界より単離された微生物であるバークホルデリア属 (*Burkholderia* sp.) LEBP-3株 (受託番号: NITE BP-03334) が有する所定の酵素を発現させた遺伝子組換え微生物物を培養することで効率的にアジピン酸類を生産できることを見出し、本発明に至った。

[0018] すなわち、本発明は、さらに以下を提供する：

[12] 3-ヒドロキシアジピルCoAデヒドラターゼをコードする外来性

遺伝子および2, 3-デヒドロアジピルC o Aレダクターゼをコードする外来性遺伝子のうちの少なくとも1つを含む、組換え微生物；

[13] 前記3-ヒドロキシアジピルC o Aデヒドラターゼおよび2, 3-デヒドロアジピルC o Aレダクターゼの少なくとも1つが、バークホルデリア属 (*Burkholderia* sp.) LEBP-3株 (受託番号: NITE BP-03334) に由来する、[12] に記載の組換え微生物；

[14] 前記3-ヒドロキシアジピルC o Aデヒドラターゼが、バークホルデリア属 (*Burkholderia* sp.) LEBP-3株の染色体DNAを鋳型とし、

(1a) 配列番号168に示す塩基配列からなるヌクレオチドおよび配列番号169に示す塩基配列からなるヌクレオチド、または

(1b) 配列番号168に示す塩基配列を含むヌクレオチドおよび配列番号169に示す塩基配列を含むヌクレオチド

をプライマーとして使用したPCR増幅物と配列同一性が80%以上、85%以上、88%以上、90%以上、93%以上、95%以上、97%以上、98%以上または99%以上であるDNAにコードされ、

当該DNAは、626～940bpを有する、[12] または[13] に記載の組換え微生物；

[15] 前記2, 3-デヒドロアジピルC o Aレダクターゼが、バークホルデリア属 (*Burkholderia* sp.) LEBP-3株の染色体DNAを鋳型とし、

(2a) 配列番号170に示す塩基配列からなるヌクレオチドおよび配列番号171に示す塩基配列からなるヌクレオチド、または

(2b) 配列番号170に示す塩基配列を含むヌクレオチドおよび配列番号171に示す塩基配列を含むヌクレオチド

をプライマーとして使用したPCR増幅物と配列同一性が80%以上、85%以上、88%以上、90%以上、93%以上、95%以上、97%以上、98%以上または99%以上であるDNAにコードされ、

当該DNAは、924～1386bpを有する、[12]～[14]のいずれか1項に記載の組換え微生物；

[16] 前記3-ヒドロキシアジピルCoAデヒドラターゼが、バークホルデリア属 (*Burkholderia* sp.) LEBP-3株の染色体DNAを鋳型とし、

(1a) 配列番号168に示す塩基配列からなるヌクレオチドおよび配列番号169に示す塩基配列からなるヌクレオチド、または

(1b) 配列番号168に示す塩基配列を含むヌクレオチドおよび配列番号169に示す塩基配列を含むヌクレオチド

をプライマーとして使用したPCR増幅物であるDNAにコードされ、

当該DNAは、783または784bpを有する、[12]または[13]に記載の組換え微生物；

[17] 前記2, 3-デヒドロアジピルCoAレダクターゼが、バークホルデリア属 (*Burkholderia* sp.) LEBP-3株の染色体DNAを鋳型とし、

(2a) 配列番号170に示す塩基配列からなるヌクレオチドおよび配列番号171に示す塩基配列からなるヌクレオチド、または

(2b) 配列番号170に示す塩基配列を含むヌクレオチドおよび配列番号171に示す塩基配列を含むヌクレオチド

をプライマーとして使用したPCR増幅物であるDNAにコードされ、

当該DNAは、1155または1156bpを有する、[12]～[14]のいずれか1項に記載の組換え微生物；

[18] 上記組換え微生物が、エッセリシア属、コリネバクテリウム属、バチルス属、アシネトバクター属、バークホルデリア属、シュードモナス属、クロストリジウム属、サッカロマイセス属、シゾサッカロマイセス属、ヤロウィア属、カンジタ属、ピキア属およびアスペルギルス属からなる群より選択される属に属する、[12]～[17]のいずれか1項に記載の組換え微生物；

[19] アジピン酸生産経路を有する、[12]～[18]のいずれか一項に記載の組換え微生物；

[20] ヘキサメチレンジアミン生産経路を有する、[12]～[19]のいずれか一項に記載の組換え微生物；

[21] 1, 6-ヘキサンジオール生産経路を有する、[12]～[19]のいずれか一項に記載の組換え微生物；

[22] 6-アミノ-1-ヘキサノール生産経路を有する、[12]～[19]のいずれか一項に記載の組換え微生物；

[23] [12]～[18]のいずれか1項に記載の組換え微生物を培養する培養工程を含む、目的化合物の製造方法であって、

前記目的化合物が、アジピン酸、アジピン酸誘導体、ヘキサメチレンジアミン、1, 6-ヘキサンジオールおよび6-アミノ-1-ヘキサノールからなる群より選択され、

前記アジピン酸誘導体が、オキソアジピン酸、レブリン酸、3-ヒドロキシアジピン酸および2, 3-デヒドロアジピン酸からなる群より選択される、製造方法；

[24] [19]に記載の組換え微生物を培養する培養工程を含む、アジピン酸の製造方法；

[25] [20]に記載の組換え微生物を培養する培養工程を含む、ヘキサメチレンジアミンの製造方法；

[26] [21]に記載の組換え微生物を培養する培養工程を含む、1, 6-ヘキサンジオールの製造方法；

[27] [22]に記載の組換え微生物を培養する培養工程を含む、6-アミノ-1-ヘキサノールの製造方法；

[28] (A-1) バークホルデリア属 (*Burkholderia* sp.) LEBP-3株の染色体DNAを鋳型とし、

(a1) 配列番号168に示す塩基配列からなるヌクレオチドおよび配列番号169に示す塩基配列からなるヌクレオチド、または

(a 2) 配列番号 1 6 8 に示す塩基配列を含むヌクレオチドおよび配列番号 1 6 9 に示す塩基配列を含むヌクレオチドをプライマーとして使用した P C R 増幅物と配列同一性が 8 0 % 以上、8 5 % 以上、8 8 % 以上、9 0 % 以上、9 3 % 以上、9 5 % 以上、9 7 % 以上、9 8 % 以上または 9 9 % 以上である D N A にコードされる組換えポリペプチドであって、

3-ヒドロキシアジピルC o A デヒドラターゼ活性を有し、

前記 D N A は、6 2 6 ~ 9 4 0 b p を有する、組換えポリペプチド；

(A-2) バークホルデリア属 (*Burkholderia* sp.) L E B P-3 株の染色体 D N A を鋳型とし、

(a 1) 配列番号 1 6 8 に示す塩基配列からなるヌクレオチドおよび配列番号 1 6 9 に示す塩基配列からなるヌクレオチド、または

(a 2) 配列番号 1 6 8 に示す塩基配列を含むヌクレオチドおよび配列番号 1 6 9 に示す塩基配列を含むヌクレオチドをプライマーとして使用した P C R 増幅物である D N A によりコードされるポリペプチドのアミノ酸配列に対して 1 ~ 1 0 個のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなる組換えポリペプチドであって、

3-ヒドロキシアジピルC o A デヒドラターゼ活性を有し、

前記 D N A は、6 2 6 ~ 9 4 0 b p を有する、組換えポリペプチド；

または

(A-3) バークホルデリア属 (*Burkholderia* sp.) L E B P-3 株の染色体 D N A を鋳型とし、

(a 1) 配列番号 1 6 8 に示す塩基配列からなるヌクレオチドおよび配列番号 1 6 9 に示す塩基配列からなるヌクレオチド、または

(a 2) 配列番号 1 6 8 に示す塩基配列を含むヌクレオチドおよび配列番号 1 6 9 に示す塩基配列を含むヌクレオチドをプライマーとして使用した P C R 増幅物の縮重異性体からなる D N A にコ

ードされる組換えポリペプチドであって、

3-ヒドロキシアジピルCoAデヒドラターゼ活性を有し、

前記DNAは、626～940bpを有する、組換えポリペプチド；

[29] (B-1) バークホルデリア属 (*Burkholderia* sp.) LEBP-3株の染色体DNAを鋳型とし、

(b1) 配列番号170に示す塩基配列からなるヌクレオチドおよび配列番号171に示す塩基配列からなるヌクレオチド、または

(b2) 配列番号170に示す塩基配列を含むヌクレオチドおよび配列番号171に示す塩基配列を含むヌクレオチド

をプライマーとして使用したPCR増幅物と配列同一性が80%以上、85%以上、88%以上、90%以上、93%以上、95%以上、97%以上、98%以上または99%以上であるDNAにコードされる組換えポリペプチドであって、

2, 3-デヒドロアジピルCoAレダクターゼ活性を有し、

前記DNAは、924～1386bpを有する、組換えポリペプチド；

(B-2) バークホルデリア属 (*Burkholderia* sp.) LEBP-3株の染色体DNAを鋳型とし、

(b1) 配列番号170に示す塩基配列からなるヌクレオチドおよび配列番号171に示す塩基配列からなるヌクレオチド、または

(b2) 配列番号170に示す塩基配列を含むヌクレオチドおよび配列番号171に示す塩基配列を含むヌクレオチド

をプライマーとして使用したPCR増幅物であるDNAによりコードされるポリペプチドのアミノ酸配列に対して1～10個のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなる組換えポリペプチドであって、

2, 3-デヒドロアジピルCoAレダクターゼ活性を有し、

前記DNAは、924～1386bpを有する、組換えポリペプチド；

または

(B-3) バークホルデリア属 (*Burkholderia* sp.) LEBP-3 株の染色体DNAを鋳型とし、

(b1) 配列番号170に示す塩基配列からなるヌクレオチドおよび配列番号171に示す塩基配列からなるヌクレオチド、または

(b2) 配列番号170に示す塩基配列を含むヌクレオチドおよび配列番号171に示す塩基配列を含むヌクレオチド

をプライマーとして使用したPCR増幅物の縮重異性体からなるDNAにコードされる組換えポリペプチドであって、

2, 3-デヒドロアジピルCoAレダクターゼ活性を有し、

前記DNAは、924～1386bpを有する、組換えポリペプチド。

発明の効果

[0019] 本発明により、2, 3-デヒドロアジピルCoA還元酵素活性を有する組換え微生物、及び、C6化合物の製造方法が提供される。

[0020] また、本発明により、アジピン酸またはアジピン酸誘導体を生産することのできる組換え微生物、及び、アジピン酸またはアジピン酸誘導体の製造方法が提供される。

図面の簡単な説明

[0021] [図1]図1は、アセチルCoA及びスクシニルCoAから、C6化合物への生合成経路の例を示す図である。

[図2]図2は、各酵素のアミノ酸配列、およびプライマーの塩基配列を示す図である。

[図3]図3は、各酵素のアミノ酸配列を示す図である。

[図4]図4は、各酵素のアミノ酸配列を示す図である。

[図5]図5は、各酵素のアミノ酸配列を示す図である。

[図6]図6は、各酵素をコードする塩基配列、および、プライマーの塩基配列を示す図である。

[図7]図7は、各酵素をコードする塩基配列、および、プライマーの塩基配列を示す図である。

[図8]図8は、各酵素をコードする塩基配列、および、プライマーの塩基配列を示す図である。

[図9]図9は、各酵素をコードする塩基配列を示す図である。

[図10]図10は、各酵素をコードする塩基配列を示す図である。

[図11]図11は、各プライマーの塩基配列を示す図である。

[図12]図12は、各酵素をコードする塩基配列、および、各プライマーの塩基配列を示す図である。

[図13]図13は、各プライマーの塩基配列を示す図である。

[図14]図14は、各酵素をコードする塩基配列、および、各プライマーの塩基配列を示す図である。

[図15]図15は、各酵素のアミノ酸配列、各酵素をコードする塩基配列、および、各プライマーの塩基配列を示す図である。

[図16]図16は、本発明に係る組換え微生物が有するアジピン酸、アジピン酸誘導体、ヘキサメチレンジアミン、1, 6-ヘキサジオールおよび6-アミノ-1-ヘキサノール生産経路の例を示す。

[図17]図17は、PCRにおける増幅対象の遺伝子および用いたプライマーを示す。

[図18]図18は、各酵素のアミノ酸配列を示す。

[図19A]図19Aは、各酵素をコードする塩基配列を示す。

[図19B]図19Bは、各酵素をコードする塩基配列を示す。

[図20A]図20Aは、PCRにおける増幅対象および用いたプライマーを示す。

[図20B]図20Bは、PCRにおける増幅対象および用いたプライマーを示す。

[図21]図21は、酵素のアミノ酸配列を示す。

[図22A]図22Aは、酵素のアミノ酸配列を示す。

[図22B]図22Bは、酵素のアミノ酸配列を示す。

[図22C]図22Cは、酵素のアミノ酸配列を示す。

[図22D]図 2 2 D は、酵素のアミノ酸配列を示す。

[図22E]図 2 2 E は、酵素のアミノ酸配列を示す。

[図23A]図 2 3 A は、酵素のアミノ酸配列を示す。

[図23B]図 2 3 B は、酵素のアミノ酸配列を示す。

[図23C]図 2 3 C は、酵素のアミノ酸配列を示す。

[図23D]図 2 3 D は、酵素のアミノ酸配列を示す。

[図24A]図 2 4 A は、酵素のアミノ酸配列を示す。

[図24B]図 2 4 B は、酵素のアミノ酸配列を示す。

[図24C]図 2 4 C は、酵素のアミノ酸配列を示す。

[図24D]図 2 4 D は、酵素のアミノ酸配列を示す。

[図24E]図 2 4 E は、酵素のアミノ酸配列を示す。

[図25]図 2 5 は、酵素のアミノ酸配列を示す。

発明を実施するための形態

[0022] 以下に本発明の実施形態について詳細に説明する。なお、本発明は、以下の実施形態に限定されるものではなく、その要旨の範囲内で種々変形して実施することができる。また、本明細書に記述されているDNAの取得、ベクターの調製および形質転換等の遺伝子操作は、特に明記しない限り、Molecular Cloning 4th Edition (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012)、Current Protocols in Molecular Biology (Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience)、および、遺伝子工学実験ノート（羊土社 田村隆明）等公知の文献に記載されている方法により行うことができる。本明細書において特に断りのない限りヌクレオチド配列は5' 方向から3' 方向に向けて記載される。本明細書において、「ポリペプチド」および「タンパク質」の語は、互換可能に使用される。

[0023] 本明細書において、「～」を用いて示された数値範囲は、「～」の前後に記載される数値をそれぞれ最小値及び最大値として含む範囲を示す。本明細

書に段階的に記載されている数値範囲において、ある段階の数値範囲の上限値又は下限値は、他の段階の数値範囲の上限値又は下限値と任意に組み合わせることができる。

[0024] 本明細書において、「内因」または「内因性」という用語は、言及している遺伝子組換えによる改変がなされていない宿主微生物が、言及している遺伝子またはそれによりコードされるタンパク質（典型的には酵素）を、当該宿主細胞内で優位な生化学的反応を進行させ得る程度に機能的に発現しているかどうかに関わらず、宿主微生物が有していることを意味するために用いられる。

[0025] 本明細書において、「外来」または「外来性」という用語は、遺伝子組換え前の宿主微生物が本発明により導入されるべき遺伝子を有していない場合、その遺伝子による酵素を実質的に発現していない場合、及びその遺伝子もしくは異なる遺伝子により当該酵素のアミノ酸配列をコードしているが、遺伝子組換え後に匹敵する内因性酵素活性を発現しない場合において、本発明に基づく遺伝子または核酸配列を宿主に導入することを意味するために用いられる。

[0026] < 1 > 発明 A：組換え微生物及び C 6 化合物の製造方法

本発明にかかる組換え微生物は、2, 3-デヒドロアジピル-C₆Aを還元してアジピル-C₆Aに変換する酵素活性を有するタンパク質をコードする外来性遺伝子を含む。2, 3-デヒドロアジピル-C₆Aを還元してアジピル-C₆Aに変換する反応は、図1のステップDに示される。「2, 3-デヒドロアジピル-C₆Aを還元してアジピル-C₆Aに変換する酵素活性を有するタンパク質」は、「2, 3-デヒドロアジピル-C₆Aレダクターゼ」とも称される。また、2, 3-デヒドロアジピル-C₆Aを還元してアジピル-C₆Aに変換する酵素活性は、「2, 3-デヒドロアジピル-C₆Aレダクターゼ活性」または「2, 3-デヒドロアジピル-C₆Aレダクターゼ酵素活性」とも称され、これらの語は互換可能に用いられる。

[0027] 本発明にかかる組換え微生物に含まれる外来性遺伝子は、以下から選択さ

れる：

(i) 配列番号 8、9、10、11、12、13、14、15 または 16 に示すアミノ酸配列と 80%以上、85%以上、88%以上、90%以上、93%以上、95%以上、97%以上、98%以上または 99%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする DNA、

(ii) 配列番号 8、9、10、11、12、13、14、15 または 16 に示すアミノ酸配列に対して 1～10 個、1～7 個、1～5 個または 1～3 個のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする DNA、

(iii) 配列番号 57、58、59、60、61、62、63、64 または 65 に示すポリヌクレオチド配列と 80%以上、85%以上、88%以上、90%以上、93%以上、95%以上、97%以上、98%以上または 99%以上の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列からなる DNA、

(iv) 配列番号 57、58、59、60、61、62、63、64 または 65 に示すポリヌクレオチド配列によりコードされるタンパク質のアミノ酸配列に対して 1～10 個、1～7 個、1～5 個または 1～3 個のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする DNA、

(v) 配列番号 57、58、59、60、61、62、63、64 または 65 に示すポリヌクレオチド配列に相補的なポリヌクレオチド配列からなる DNA と緊縮条件下でハイブリダイズする DNA、

(vi) 配列番号 57、58、59、60、61、62、63、64 または 65 に示すポリヌクレオチド配列の縮重異性体からなる DNA。

[0028] 本発明にかかる組換え微生物に含まれる外来性遺伝子は、好ましくは以下から選択される：

(i) 配列番号 8、9、10、11、12、13、14、15 または 16 に示すアミノ酸配列と 80%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする DNA、

(i i) 配列番号 8、9、10、11、12、13、14、15 または 16 に示すアミノ酸配列に対して 1～10 個のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする DNA、

(i i i) 配列番号 57、58、59、60、61、62、63、64 または 65 に示すポリヌクレオチド配列と 80% 以上の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列からなる DNA、

(i v) 配列番号 57、58、59、60、61、62、63、64 または 65 に示すポリヌクレオチド配列によりコードされるタンパク質のアミノ酸配列に対して 1～10 個のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする DNA、

(v) 配列番号 57、58、59、60、61、62、63、64 または 65 に示すポリヌクレオチド配列に相補的なポリヌクレオチド配列からなる DNA と緊縮条件下でハイブリダイズする DNA、

(v i) 配列番号 57、58、59、60、61、62、63、64 または 65 に示すポリヌクレオチド配列の縮重異性体からなる DNA。

[0029] 本発明にかかる組換え微生物に含まれる外来性遺伝子は、より好ましくは、

(x i) 配列番号 8、9、10、11、12、13、14、15 または 16 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする DNA、または、

(x i i i) 配列番号 57、58、59、60、61、62、63、64 または 65 に示すポリヌクレオチド配列からなる DNA である。

[0030] 上記外来性遺伝子は、例えば、*Candida auris*、*Kluyveromyces marxianus*、*Pichia kudriavzevii*、*Thermothelomyces thermophilus*、*Thermothielavioides terrestris*、*Chaetomium thermophilum*、*Podospora an*

serina、*Purpureocillium lilacinum*および*Pyrenophora teres*から選択される少なくとも1つに由来する。

[0031] 上記外来性遺伝子を含むことにより、組換え微生物は、良好な2，3-デヒドロアジピル-C o A還元酵素活性を有する。かかる酵素活性を有する組換え微生物を用いることにより、目的化合物を製造することができる。目的化合物としては、例えばC 6化合物が挙げられる。

[0032] 本明細書中において、「C 6化合物」には、

- ・アジピン酸 (CAS No. 124-04-9)、
- ・ヘキサメチレンジアミン (CAS No. 124-09-4)、
- ・1，6-ヘキサンジオール (CAS No. 629-11-8)、
- ・6-アミノヘキサン酸 (CAS No. 60-32-2)、
- ・6-アミノ-1-ヘキサノール (CAS No. 4048-33-3)

、及び

- ・6-ヒドロキシヘキサン酸 (CAS No. 1191-25-9)

が包含され、「C 6化合物」とは、これら化合物からなる群から選択される1または複数の化合物をいう。

[0033] 本明細書中における「C 6化合物」は、任意の塩形態を含めた中性または電離形態を取り得ること、および、本形態がp Hに依存することは当業者により理解される。

[0034] 本発明の微生物は、上記のとおり、外来性の酵素遺伝子を導入した遺伝子組換え微生物である。「遺伝子組換え微生物」は、単に「組換え微生物」とも称する。

[0035] 本発明に関連して、目的の外来性遺伝子が導入される宿主微生物は特に限定されず、原核生物および真核生物のいずれであってもよい。既に単離保存されているもの、新たに天然から分離したものおよび遺伝子改変をされたものから任意に選択することができる。宿主微生物は、例えば、エスキリキア (*Escherichia*) 属、バチルス (*Bacillus*) 属、コリネ

バクテリウム (*Corynebacterium*) 属、アルスロバクター (*Arthrobacter*) 属、ブレビバクテリウム (*Brevibacterium*) 属、クロストリジウム (*Clostridium*) 属、ザイモモナス (*Zymomonas*) 属、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属、バークホルデリア (*Burkholderia*) 属、ストレプトマイセス (*Streptomyces*) 属、ロドコッカス (*Rhodococcus*) 属、シネコシステイス (*Synechocystis*) 属、アルカリハロバチルス (*Alkalihalobacillus*) 属、サッカロマイセス (*Saccharomyces*) 属、シゾサッカロマイセス (*Schizosaccharomyces*) 属、ヤロウシア (*Yarrowia*) 属、カンジタ (*Candida*) 属、ピキア (*Pichia*) 属、またはアスペルギルス (*Aspergillus*) 属に属する。宿主微生物は、好ましくは、エスケリキア (*Escherichia*) 属に属し、より好ましくは、大腸菌 (*Escherichia coli*) である。

[0036] したがって、上記宿主微生物に外来性遺伝子を導入した本発明にかかる組換え微生物は、例えば、エスケリキア (*Escherichia*) 属、バチルス (*Bacillus*) 属、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属、アルスロバクター (*Arthrobacter*) 属、ブレビバクテリウム (*Brevibacterium*) 属、クロストリジウム (*Clostridium*) 属、ザイモモナス (*Zymomonas*) 属、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属、バークホルデリア (*Burkholderia*) 属、ストレプトマイセス (*Streptomyces*) 属、ロドコッカス (*Rhodococcus*) 属、シネコシステイス (*Synechocystis*) 属、アルカリハロバチルス (*Alkalihalobacillus*) 属、サッカロマイセス (*Saccharomyces*) 属、シゾサッカロマイセス (*Schizosaccharomyces*) 属、ヤロウシア (*Yarrowia*) 属、カンジタ (*Candida*) 属、ピキア (*Pichia*) 属、またはアスペルギルス (*Aspergillus*) 属に属する。

s) 属に属する。本発明にかかる組換え微生物は、好ましくは、エスキリア (*Escherichia*) 属に属し、より好ましくは、大腸菌 (*Escherichia coli*) である。

[0037] 本明細書において、ある化合物に関し、「生産経路を有する」とは、本発明にかかる遺伝子組換え微生物が、その化合物の生産経路の各反応段階が進行するために十分な量の酵素を発現し、その化合物を生合成可能であることを意味する。本発明の組換え微生物は、当該化合物を生産する能力を本来有する宿主微生物を用いたものであってもよく、本来は当該化合物を生産する能力を有さない宿主微生物に対して、その化合物の生産能を有するように改変を行ったものであってもよい。

[0038] 本明細書において、「由来する」とは、遺伝子またはそれによりコードされるタンパク質（典型的には酵素）が、言及する特定の生物種が内因的に有しているものであることを意味する。

[0039] 本発明の遺伝子組換え微生物は、2, 3-デヒドロアジピル-COAを還元してアジピル-COAに変換する酵素活性（すなわち、2, 3-デヒドロアジピル-COAレダクターゼ活性）を有するタンパク質をコードする外来性遺伝子を含んでいることにより、反応が進行するために十分な量の酵素（すなわち、2, 3-デヒドロアジピル-COAレダクターゼ）を発現する。本酵素は、図1のステップDの反応に関与する。

[0040] また、C6化合物生産経路の反応段階を触媒する酵素をさらに発現することで、C6化合物生産経路を有する遺伝子組換え微生物となり得る。

[0041] 一態様において、本発明にかかる組換え微生物は、

- ・ 3-オキソアジピル-COAチオラーゼをコードする遺伝子、
- ・ 3-ヒドロキシアジピル-COAデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子、
- ・ 3-ヒドロキシアジピル-COAデヒドラターゼをコードする遺伝子、
- ・ リン酸アジピルトランスフェラーゼをコードする遺伝子とアジピン酸キナーゼをコードする遺伝子との組み合わせ、
- ・ アジピル-COAヒドロラーゼをコードする遺伝子、

- ・ アジピン酸 C o A トランスフェラーゼをコードする遺伝子、
- ・ デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子、
- ・ カルボン酸レダクターゼをコードする遺伝子、
- ・ トランスアミナーゼ（アミノトランスフェラーゼ）をコードする遺伝子
- ・ アルコールデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子、および、
- ・ C o A トランスフェラーゼをコードする遺伝子、
- ・ 酸チオールリガーゼをコードする遺伝子、

からなる群より選択される少なくとも1つをさらに含む。

- [0042] ・ 3-オキソアジピル C o A チオラーゼは、図1のステップAの反応を、
- ・ 3-ヒドロキシアジピル C o A デヒドロゲナーゼは、図1のステップBの反応を、
- ・ 3-ヒドロキシアジピル C o A デヒドラターゼは、図1のステップCの反応を、
- ・ リン酸アジピルトランスフェラーゼとアジピン酸キナーゼとの組み合わせ、アジピル C o A ヒドロラーゼ、アジピン酸 C o A トランスフェラーゼは、図1のステップEの反応を、
- ・ デヒドロゲナーゼは、図1のステップF、UおよびVの少なくとも1つの反応を、
- ・ カルボン酸レダクターゼは、図1のステップG、I、KおよびNの少なくとも1つの反応を、
- ・ トランスアミナーゼ（アミノトランスフェラーゼ）は、図1のステップJ、M、PおよびRの少なくとも1つの反応を、
- ・ アルコールデヒドロゲナーゼは、図1のステップH、L、OおよびQの少なくとも1つの反応を、
- ・ C o A トランスフェラーゼまたは酸チオールリガーゼは、ステップSおよびTの少なくとも1つの反応を触媒する。

- [0043] 好ましい一態様において、本発明にかかる組換え微生物は、

- ・ 3-オキソアジピルC₆Aチオラーゼをコードする遺伝子、
 - ・ 3-ヒドロキシアジピルC₆Aデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子、
 - ・ 3-ヒドロキシアジピルC₆Aデヒドラターゼをコードする遺伝子、
 - ・ カルボン酸レダクターゼをコードする遺伝子、
 - ・ アルコールデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子、および
 - ・ トランスアミナーゼ（アミノトランスフェラーゼ）をコードする遺伝子
- からなる群より選択される少なくとも1つをさらに含む。

[0044] なお、本発明の遺伝子組換え微生物が、外来遺伝子の導入によらずとも、C₆化合物生産経路の反応段階を触媒する十分な量の酵素を発現する場合は、内因遺伝子にコードされる酵素によって反応が進行してもよい。

[0045] 本発明にかかる遺伝子組換え微生物が有しうるC₆化合物生産経路の一例を図1に示す。以下、各反応段階を触媒する酵素について図1を参照しながら説明する。

[0046] 図1のステップAでは、スクシニルC₆AとアセチルC₆Aが縮合し、3-オキソアジピルC₆Aへと変換される。本変換を触媒し得る酵素の例としては、β-ケトチオラーゼが挙げられる。更には、例えば、EC 2.3.1.9（アセトアセチルC₆Aチオラーゼ）、EC 2.3.1.16（3-ケトアシルC₆Aチオラーゼ）およびEC 2.3.1.174（3-オキソアジピルC₆Aチオラーゼ）などの群に分類される酵素も、本変換に対して活性を有し得る酵素として例示することができる。本変換で使用され得る酵素は、本変換に対する活性を有するものであれば限定されないが、例えば、スクシニルC₆A：アセチルC₆Aアシルトランスフェラーゼ、および、3-オキソアジピルC₆Aチオラーゼが挙げられる。一態様において、配列番号1に記載されるアミノ酸配列からなる大腸菌由来のPaajが使用される。

[0047] 図1のステップBでは、3-オキソアジピルC₆Aが、3-ヒドロキシアジピルC₆Aへと変換される。本変換を触媒し得る酵素の例としては、EC 1.1.1の群に分類されるオキシドレダクターゼが挙げられる。例

例えば、EC 1. 1. 1. 35 (3-ヒドロキシアシル-CoAデヒドロゲナーゼ) や、EC 1. 1. 1. 36 (アセトアセチル-CoAデヒドロゲナーゼ)、EC 1. 1. 1. 157 (3-ヒドロキシブタノイル-CoAデヒドロゲナーゼ)、EC 1. 1. 1. 211 (長鎖3-ヒドロキシアシル-CoAデヒドロゲナーゼ)、EC 1. 1. 1. 259 (3-ヒドロキシピメロイル-CoAデヒドロゲナーゼ) といった群に分類される酵素は、本変換に対して活性を有し得る酵素として例示することができる。本発明で使用され得る酵素は、本変換に対する活性を有するものであれば限定されないが、例えば、3-ヒドロキシアジピル-CoAデヒドロゲナーゼである。一態様において、配列番号2に記載されるアミノ酸配列からなる大腸菌由来の P a a H が使用される。

[0048] 図1のステップCでは、3-ヒドロキシアジピル-CoAが、2, 3-デヒドロアジピル-CoAへと変換される。本変換を触媒し得る酵素の例としては、EC 4. 2. 1の群に分類されるヒドロリアーゼが挙げられる。例えば、EC 4. 2. 1. 17 (エノイル-CoAヒドラターゼ) や、EC 4. 2. 1. 55 (3-ヒドロキシブタノイル-CoAデヒドラターゼ)、EC 4. 2. 1. 74 (長鎖エノイル-CoAヒドラターゼ) といった群に分類される酵素は、本変換に対して活性を有し得る酵素として例示することができる。本発明で使用され得る酵素は、本変換に対する活性を有するものであれば限定されないが、例えば、3-ヒドロキシアジピル-CoAデヒドラターゼである。一態様において、配列番号3に記載されるアミノ酸配列からなる大腸菌由来の P a a F が使用される。また、別の態様として、当該酵素としては、配列番号4に示すヌクレオチドおよび配列番号46に示すヌクレオチドをプライマーとして使用した、バークホルデリア属 (*Burkholderia* sp.) LEBP-3株の染色体DNAを鋳型としたPCR増幅物の塩基配列 (783bp) にコードされる3-ヒドロキシアジピル-CoAデヒドラターゼ P a a F (L3) が使用される。*Burkholderia* sp. LEBP-3株 (以下、「L3株」とも略称する。) は、独立

行政法人製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センター（NPMD）（住所：千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 122号室）に2020年12月4日に寄託申請し（受領番号：NITE ABP-03334）、「受託番号：NITE BP-03334」として国際寄託されている。

[0049] ここで、PCR増幅物の調製に用いるDNAポリメラーゼとしては当該分野で既知のものが用いられ、例えば、Taq DNAポリメラーゼ、ホットスタート調整されたDNAポリメラーゼ、ポリメラーゼ活性とは別に3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を有するプルーフリーディングDNAポリメラーゼ等が挙げられるが、これらには限定されない。PCR増幅物の調製条件の好ましい一態様において、特定のヌクレオチドを1 μ Mずつ、フォワードプライマーおよびリバースプライマーとして用い、且つ、酵素としてPrimeSTAR Max DNA Polymerase（製品名、タカラバイオ製）を用いて、25 μ L液の量で熱処理98℃10秒、アニーリング55℃15秒、伸長72℃5秒/kbの条件での処理を30サイクル実施することで調製される。

[0050] 図1のステップDでは、2, 3-デヒドロアジピル-CoAが、アジピル-CoAへと変換される。本変換を触媒し得る酵素の例としては、EC 1.3.1の群に分類されるオキシドレダクターゼが挙げられる。例えば、EC 1.3.1.8（アシル-CoAデヒドロゲナーゼ（NADP⁺））や、EC 1.3.1.9（エノイル-ACPレダクターゼ（NADH））、EC 1.3.1.38（トランス-2-エノイル-CoAレダクターゼ（NADP⁺））、EC 1.3.1.44（トランス-2-エノイル-CoAレダクターゼ（NAD⁺））、EC 1.3.1.86（クロトニル-CoAレダクターゼ）、EC 1.3.1.93（長鎖アシル-CoAレダクターゼ）、EC 1.3.1.104（エノイル-ACPレダクターゼ（NADPH））といった群に分類される酵素は、本変換に対して活性を有し得る酵素として例示することができる。本発明では、ステップDの変換に、先述の2, 3-デヒドロアジピル-CoAレダクターゼが使用される。

[0051] 本発明で使用される2, 3-デヒドロアジピルC o Aレダクターゼは、例えば、以下の生物種に由来する酵素である：*Candida auris*（配列番号8）、*Kluyveromyces marxianus*（配列番号9）、*Pichia kudriavzevii*（配列番号10）、*Thermothelomyces thermophilus*（配列番号11）、*Thermothielavioides terrestris*（配列番号12）、*Chaetomium thermophilum*（配列番号13）、*Podospora anserina*（配列番号14）、*Purpleocillium lilacinum*（配列番号15）、*Pyrenophora teres*（配列番号16）。好ましくは配列番号8～16に記載されるアミノ酸配列からなる酵素の少なくとも1つが使用され、より好ましくは配列番号11、12、13、14および16に記載されるアミノ酸配列からなる酵素の少なくとも1つが使用される（図3）。

[0052] 図1のステップEでは、アジピルC o Aがアジピン酸へと変換される。本変換を触媒し得る酵素の例としては、EC 3. 1. 2の群に分類されるチオエステルヒドロラーゼが挙げられる。例えば、EC 3. 1. 2. 1（アセチルC o Aヒドロラーゼ）や、EC 3. 1. 2. 20（アシルC o Aヒドロラーゼ）といった群に分類される酵素は、本変換に対して活性を有し得る酵素として例示することができる。本発明で使用され得る酵素は、本変換に対する活性を有するものであれば限定されないが、例えば、アジピルC o Aヒドロラーゼである。

[0053] また、図1のステップEの反応を触媒し得る別の酵素の例として、EC 2. 8. 3の群に分類されるC o A-トランスフェラーゼも挙げることができる。例えば、EC 2. 8. 3. 5（3-オキソ酸 C o A-トランスフェラーゼ）や、EC 2. 8. 3. 6（3-オキソアジピン酸 C o A-トランスフェラーゼ）、EC 2. 8. 3. 18（スクシニルC o A：アセチルC o A-トランスフェラーゼ）といった群に分類される酵素は、本変換に対して活性を有し得る酵素として例示することができる。本発明で使用

され得る酵素は、本変換に対する活性を有するものであれば限定されないが、例えば、アジピン酸 C o A トランスフェラーゼである。

[0054] さらに、図 1 のステップ E の反応を触媒し得る別の酵素変換の例として、E C 2. 3. 1 の群に分類されるアシルトランスフェラーゼによって、アジピル C o A のアジピル基をリン酸に転移してアジピルリン酸を生成した後、E C 2. 7. 2 の群に分類されるホスホトランスフェラーゼによる脱リン酸化を経る経路も例示することができる。例えば、アシルトランスフェラーゼとしては、E C 2. 3. 1. 8 (リン酸アセチルトランスフェラーゼ) や、E C 2. 3. 1. 19 (リン酸ブチルトランスフェラーゼ) といった群に分類される酵素は、本変換に対して活性を有し得る酵素として例示することができる。ホスホトランスフェラーゼとしては、E C 2. 7. 2. 1 (酢酸キナーゼ) や、E C 2. 7. 2. 7 (ブタン酸キナーゼ) といった群に分類される酵素は、本変換に対して活性を有し得る酵素として例示することができる。本発明で使用され得る酵素は、本変換に対する活性を有するものであれば限定されないが、例えば、リン酸アジピルトランスフェラーゼおよびアジピン酸キナーゼである。

[0055] 図 1 のステップ F、U および V では、アシル C o A がアルデヒドへと変換される。本変換を触媒し得る酵素の例としては、E C 1. 2. 1 の群に分類される酵素が挙げられる。例えば、E C 1. 2. 1. 10 (アセトアルデヒドデヒドロゲナーゼ (アセチル化))、E C 1. 2. 1. 17 (グリオキシル酸デヒドロゲナーゼ (アシル化))、E C 1. 2. 1. 42 (ヘキサデカナルデヒドロゲナーゼ (アシル化))、E C 1. 2. 1. 44 (シナモイル C o A レダクターゼ (アシル化))、E C 1. 2. 1. 75 (マロニル C o A レダクターゼ (マロン酸セミアルデヒド形成))、E C 1. 2. 1. 76 (コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ (アシル化)) といった群に分類される酵素は、本変換と同様に、C o A を脱離しアルデヒドを生成する変換反応を触媒することから、本変換に対しても活性を有し得る酵素として例示することができる。本発明で使用され得る酵素は

、本変換に対する活性を有するものであれば限定されないが、例えば、配列番号17に記載されるアミノ酸配列からなる*Clostridium kluyveri*由来のsucDが使用される(図4)。

[0056] 図1のステップG、I、KおよびNでは、カルボキシル基がアルデヒドへと変換される。本変換を触媒し得る酵素としては、例えば、カルボン酸レダクターゼ(Carboxylic Acid Reductase; CAR)が挙げられる。例えば、EC 1.2.1.30(カルボン酸レダクターゼ(NADP⁺))、EC 1.2.1.31(L-アミノアジピン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ)、EC 1.2.1.95(L-2-アミノアジピン酸レダクターゼ)、EC 1.2.99.6(カルボン酸レダクターゼ)といった群に分類される酵素が、本変換と同様に、カルボン酸からアルデヒドを生成する変換反応を触媒することから、本変換に対しても活性を有し得る酵素として例示することができる。酵素の由来となる生物種の典型的な例としては、*Nocardia iowensis*、*Nocardia asteroides*、*Nocardia brasiliensis*、*Nocardia farcinica*、*Segniliparus rugosus*、*Segniliparus rotundus*、*Tsukamurella paurometabola*、*Mycobacterium marinum*、*Mycobacterium neoaurum*、*Mycobacterium abscessus*、*Mycobacterium avium*、*Mycobacterium chelonae*、*Mycobacterium immunogenum*、*Mycobacterium smegmatis*、*Serpula lacrymans*、*Heterobasidion annosum*、*Coprinopsis cinerea*、*Aspergillus flavus*、*Aspergillus terreus*、*Neurospora crassa*、*Saccharomyces cerevisiae*が挙げられるが、これらに限定されない。本発明で使用され得る酵素は、本変換に対する活性を有するものであ

れば限定されないが、例えば、配列番号18～22のいずれかに記載されるアミノ酸配列からなる酵素の少なくとも一種が使用されてもよく、好ましくは、配列番号20に記載されるアミノ酸配列からなる*Mycobacterium abscessus*由来の酵素MaCar、配列番号22に記載されるアミノ酸配列からなるMaCarの変異体であるMaCar(m)の少なくとも一方が使用され、より好ましくは配列番号22に記載されるアミノ酸配列からなるMaCar(m)が使用される(図4)。

[0057] また、カルボン酸レダクターゼは、ホスホパンテティニル化されることにより活性型のホロ酵素に変換され得る(Venkita subramanian et al., Journal of Biological Chemistry, Vol. 282, No. 1, 478-485 (2007))。ホスホパンテティニル化はホスホパンテティニル基転移酵素(Phosphopantetheinyl Transferase; PT)により触媒される。本反応を触媒し得る酵素としては、例えば、EC 2.7.8.7に分類される酵素が挙げられる。したがって、本発明の微生物は更に、ホスホパンテティニル基転移酵素の活性が増大するように改変されている。ホスホパンテティニル基転移酵素の活性を増大する方法としては、外来のホスホパンテティニル基転移酵素遺伝子を導入する方法や、内因性のホスホパンテティニル基転移酵素遺伝子の発現を強化する方法が挙げられるが、これらに限定されない。本発明で使用され得る酵素は、ホスホパンテティニル基転移活性を有する限り、これらに限定されないが、典型的な酵素としては、例えば、大腸菌のEntDや、*Bacillus subtilis*のSfp、*Nocardia iowensis*のNpt(Venkita subramanian et al., Journal of Biological Chemistry, Vol. 282, No. 1, 478-485 (2007))、*Saccharomyces cerevisiae*のLys5(Ehmann et al., Biochemistry 38. 19 (1999): 6171-6177.)が挙げられる。

本発明で使用され得る酵素は、本変換に対する活性を有するものであれば限定されないが、例えば、配列番号23～26に記載されるアミノ酸配列からなる酵素の少なくともいずれか一種が使用されてもよく、好ましくは、配列番号24に記載されるアミノ酸配列からなる *Nocardia iowensis* 由来の *Nocardia iowensis* の Npt が使用される（図5）。

[0058] 図1のステップJ、M、PおよびRの変換は、アミノ基転移反応である。この変換を触媒し得る酵素の例としては、EC 2. 6. 1の群に分類されるトランスアミナーゼ（アミノトランスフェラーゼ）が挙げられる。例えば、EC 2. 6. 1. 19（4-アミノブタン酸-2-オキソグルタル酸トランスアミナーゼ）や、EC 2. 6. 1. 29（ジアミントランスアミナーゼ）、EC 2. 6. 1. 48（5-アミノ吉草酸トランスアミナーゼ）といった群に分類される酵素は、本変換に対しても活性を有し得る酵素として例示することができる。本発明で使用され得る酵素は、各ステップの変換活性を有するものであれば、特に限定されないが、例えば、カダベリンやスペルミジンをアミノ基転移することが報告されている大腸菌のプトレシニアミノトランスフェラーゼである YgjG (Samsonova, , et al., BMC microbiology 3. 1 (2003) : 2.) や、シュードモナス属のプトレシニアミノトランスフェラーゼである SpuC (Lu et al., Journal of bacteriology 184. 14 (2002) : 3765-3773.、Galman et al., Green Chemistry 19. 2 (2017) : 361-366.)、大腸菌のGABAアミノトランスフェラーゼ GabT や、PuuE が使用されてもよい。さらには、*Ruegeria pomeroyi*、*Chromobacterium violaceum*、*Arthrobacter citreus*、*Sphaerobacter thermophilus*、*Aspergillus fischeri*、*Vibrio fluvialis*、*Agrobacterium*

tumefaciens、Mesorhizobium loti等の生物種由来のω-トランスアミナーゼも、1, 8-ジアミノオクタンや1, 10-ジアミノデカンなどのジアミン化合物へのアミノ基転移活性を有することが報告されており、本発明で使用されてもよい (Sung et al., Green Chemistry 20, 20 (2018): 4591-4595., Sattler et al., Angewandte Chemie 124, 36 (2012): 9290-9293.)。本発明で使用され得る酵素は、本変換に対する活性を有するものであれば限定されないが、例えば、配列番号27~31および158に記載されるアミノ酸配列からなる酵素の少なくともいずれか一種が使用されてもよい (図5および図15)。典型的なアミノ基供与体としては、L-グルタミン酸、L-アラニンおよびグリシンが挙げられるが、これらには限定されない。

[0059] 図1のステップH、L、OおよびQでは、アルデヒドがアルコールに変換される。本変換を触媒し得る酵素の例としては、EC 1. 1. 1の群に分類されるオキシドレダクターゼが挙げられる。例えば、EC 1. 1. 1. 1 (アルコールデヒドロゲナーゼ) や、EC 1. 1. 1. 2 (アルコールデヒドロゲナーゼ (NADP⁺))、EC 1. 1. 1. 71 (アルコールデヒドロゲナーゼ [NAD (P)⁺]) といった群に分類される酵素は、本変換と同様に、アルデヒドからアルコールへの変換反応を触媒することから、本変換に対しても活性を有し得る酵素として例示することができる。本発明で使用され得る酵素は、本変換に対する活性を有するものであれば限定されないが、例えば、配列番号32に記載される大腸菌由来のAhrである (図5)。

[0060] 図1のステップSおよびTの反応では、カルボキシル基にCoAが付加される。本変換を触媒し得る酵素の例としては、EC 2. 8. 3の群に分類されるCoAトランスフェラーゼ、EC 6. 2. 1の群に分類される酸チオールリガーゼが挙げられる。本発明で使用される酵素は、本変換に対する活性を有するものであれば限定されない。

- [0061] 本発明に利用できる上記の酵素をコードする遺伝子は、例示された生物以外に由来するものであっても、または人工的に合成したものであってもよく、宿主微生物細胞内で実質的な酵素活性を発現できるものであればよい。
- [0062] 本発明にかかる組換え微生物は、宿主微生物において、適宜、任意の遺伝子が破壊されたものであってもよい。標的遺伝子の破壊は、当該分野で公知の方法により行われる。
- [0063] また、本発明に利用できる上記の酵素のアミノ酸配列、または酵素をコードする遺伝子の塩基配列には、前記宿主微生物細胞で実質的な酵素活性を発現できるものであれば、自然界で発生し得るすべての変異や、人工的に導入された変異及び修飾を有してよく、例えば、欠失、置換、挿入、付加といった変異が含有され得る。例えば、上記の酵素のアミノ酸配列に対して1又は複数個、好ましくは1～20個、より好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～7個、さらにより好ましくは1～5個、特に好ましくは1～3個のアミノ酸の欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列を含んでいてよい。
- [0064] さらに、本発明で利用できる上記の酵素をコードする遺伝子の塩基配列には、前記宿主微生物細胞で実質的な酵素活性を発現できるものであれば、相補的な塩基配列を有するDNAと緊縮条件下でハイブリダイズするDNAも利用可能である。「緊縮条件」とは、例えば、「1×SSC、0.1%SDS、60℃」程度の条件であり、より厳しい条件としては「0.1×SSC、0.1%SDS、60℃」程度の条件であり、さらに厳しい条件としては「0.1×SSC、0.1%SDS、68℃」程度の条件である。
- [0065] 加えて、特定のアミノ酸をコードする種々のコドンには余分のコドンが存在することが知られており、そのため本発明においても同一のアミノ酸に最終的に翻訳されることになる代替コドンを利用してよい。つまり、遺伝子コードは縮重しているので、ある特定のアミノ酸をコードするのに複数のコドンを使用でき、そのためアミノ酸配列は任意の1セットの類似のDNAオリゴヌクレオチドでコードされ得る。なお、ほとんどの生物は特定のコドン（

最適コドン)のサブセットを優先的に用いることが知られているので(Gene、Vol. 105、pp. 61-72、1991等)、宿主微生物に応じて「コドン最適化」を行うことは本発明においても有用であり得る。

[0066] したがって、本発明にかかる遺伝子組換え微生物は、酵素活性を発現できることを条件に、上記酵素遺伝子の塩基配列と、例えば80%以上、85%以上、88%以上、90%以上、93%以上、95%以上、97%以上、98%以上または99%以上の配列同一性を有する塩基配列を含み得る。あるいは、上記酵素のアミノ酸配列と、例えば80%以上、85%以上、88%以上、90%以上、95%以上、97%以上、98%以上または99%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする遺伝子を含み得る。

[0067] なお、本明細書において、参照アミノ酸配列に対する比較アミノ酸配列の「配列同一性」の割合(%)は、これら2つの配列間の同一性が最大となるように配列を整列させ、必要であれば2つの配列の一方または双方にギャップが導入されたときの、参照配列中のアミノ酸残基と同一である、比較配列中のアミノ酸残基の百分率として定義される。このとき、保存的置換は配列同一性の一部として考慮しない。配列同一性は、公に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用することによって決定することができ、例えば、BLAST(登録商標。以下、省略。)(Basic Local Alignment Search Tool)等のアライメントサーチツールを用いて決定することができる。当業者は、アラインメントにおいて、比較配列の最大のアラインメントを得るために適切なパラメーターを決定することができる。ヌクレオチド配列の「配列同一性」についても、同様の方法によって決定することができる。

[0068] 本発明において、上記のC6化合物生合成酵素遺伝子が「発現カセット」として宿主微生物細胞内に導入されることで、より安定的で高レベルの酵素活性を得ることができる。本明細書において、「発現カセット」とは、発現対象の核酸または発現対象の遺伝子に機能的に結合された転写および翻訳を

レギュレートする核酸配列を含むヌクレオチドを意味する。典型的に、本発明の発現カセットは、コード配列から5'上流にプロモーター配列、3'下流にターミネーター配列、場合により更なる通常の調節エレメントを機能的に結合された状態で含み、そのような場合に、発現対象の核酸または発現対象の遺伝子が宿主微生物に導入される。

[0069] プロモーターとは、構成発現型プロモーターであるか誘導発現型プロモーターであるかに拘わらず、RNAポリメラーゼをDNAに結合させ、RNA合成を開始させるDNA配列と定義される。強いプロモーターとはmRNA合成を高頻度で開始させるプロモーターであり、本発明においても好適に使用される。大腸菌ではlac系、trp系、tacまたはtrc系、λファージの主要オペレーター及びプロモーター領域、fdコートタンパク質の制御領域、解糖系酵素（例えば、3-ホスホグリセレートキナーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素）、グルタミン酸デカルボキシラーゼA、セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼに対するプロモーター、T7ファージ由来RNAポリメラーゼのプロモーター領域等が利用可能である。コリネ菌（*Corynebacterium glutamicum*）ではHCE（high-level constitutive expression）プロモーター、cspBプロモーター、sodAプロモーター、伸長因子（EF-Tu）プロモーターなどが利用可能である。ターミネーターとしては、T7ターミネーター、rrnBT1T2ターミネーター、lacターミネーターなどが利用可能である。プロモーターおよびターミネーター配列のほかに、他の調節エレメントの例として挙げられ得るのは、選択マーカー、増幅シグナル、複製起点などである。好適な調節配列については、例えば、”Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185”、Academic Press（1990）に記載されている。

[0070] 上記で説明した発現カセットは、例えば、プラスミド、ファージ、トランスポゾン、ISエレメント、フォスミド、コスミド、又は線状もしくは環状

のDNA等から成るベクターに組み入れて、宿主微生物中に挿入される。プラスミドおよびファージが好ましい。これらのベクターは、宿主微生物中で自律複製されるものでもよいし、また染色体により複製されてもよい。好適なプラスミドは、例えば、大腸菌のpLG338、pACYC184、pBR322、pUC18、pUC19、pKC30、pRep4、pHS1、pKK223-3、pDHE19.2、pHS2、pPLc236、pMBL24、pLG200、pUR290、pIN-111113-B1、λgt11又はpBdCl；桿菌のpUB110、pC194又はpBD214；コリネバクテリウム属のpSA77又はpAJ667などである。バチルス属などの桿菌ではpUB110、pC194またはpBD214などが挙げられる。これらの他にも使用可能なプラスミド等は、“Gene Cloning and DNA analysis 7th edition”、Wiley-Blackwell（2016）に記載されている。ベクターへの発現カセットの導入は、適当な制限酵素による切り出し、クローニング、及びライゲーションを含む慣用の方法によって可能である。各々の発現カセットは、1つのベクター上に配置されてもよく、2つまたはそれ以上のベクターに配置されてもよい。

[0071] 上記のようにして本発明の発現カセットを有するベクターが構築された後、該ベクターを宿主微生物に導入する際に適用できる手法は慣用の方法を用いることができる。例えば、塩化カルシウム法、エレクトロポレーション法、接合伝達法、プロトプラスト融合法などが挙げられるが、これらに限定されず、宿主微生物に好適な方法が選択可能である。

[0072] 本発明の第二の側面は、先述の組換え微生物を培養する培養工程を含む、目的化合物の製造方法に関する。

[0073] ここで、当該化合物は、好ましくはC6化合物である。C6化合物は、アジピン酸、ヘキサメチレンジアミン、1,6-ヘキサジオール、6-アミノヘキサン酸、6-アミノ-1-ヘキサノールおよび6-ヒドロキシヘキサン酸からなる群から選択される少なくとも一つである。

[0074] C 6 化合物の製造方法には、本発明にかかる遺伝子組換え微生物を培養する培養工程が含まれる。培養工程では、組換え微生物を、炭素源および窒素源を含有する培地で培養することによって、菌体を含む培養物が得られる。本発明の遺伝子組換え微生物は、C 6 化合物生産、及び微生物の生育・維持に適した条件下で培養され、好適な培地組成、培養時間、培養条件は当業者により容易に設定できる。

[0075] 炭素源としては、D-グルコース、スクロース、ラクトース、フルクトース、マルトース、オリゴ糖、多糖、でんぷん、セルロース、米ぬか、廃糖蜜、油脂（例えば大豆油、ヒマワリ油、ピーナッツ油、ヤシ油など）、脂肪酸（例えばパルミチン酸、リノール酸、オレイン酸、リノレン酸など）、アルコール（例えばグリセロール、エタノールなど）、有機酸（例えば酢酸、乳酸、コハク酸など）、トウモロコシ分解液、セルロース分解液が挙げられる。好ましくは、D-グルコース、スクロースまたはグリセロールである。これらの炭素源は、個別にあるいは混合物として使用することができる。

[0076] バイオマス由来の原料を用いて製造されたC 6 化合物は、I S O 1 6 6 2 0-2またはA S T M D 6 8 6 6に規定されるC a r b o n-1 4（放射性炭素）分析に基づくバイオベース炭素含有率の測定により、例えば石油、天然ガス、石炭などを由来とする合成原料と明確に区別することができる。

[0077] 窒素源としては、含窒素有機化合物（例えば、ペプトン、カザミノ酸、トリプトン、酵母抽出物、肉抽出物、麦芽抽出物、コーンステープリカー、大豆粉、アミノ酸および尿素など）、または無機化合物（例えば、アンモニア水溶液、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、硝酸ナトリウム、硝酸アンモニウムなど）が挙げられる。これらの窒素源は、個別にあるいは混合物として使用することが出来る。

[0078] また、培地は、組換え微生物が有用な付加的形質を発現する場合、例えば抗生物質への耐性マーカーを有する場合、対応する抗生物質を含んでいてよい。それにより、培養時の雑菌による汚染リスクが低減される。抗生物質としては、アンピシリンなどの β -ラクタム系抗生物質、カナマイシンなどの

アミノグリコシド系抗生物質、エリスロマイシンなどのマクロライド系抗生物質、テトラサイクリン系抗生物質、クロラムフェニコールなどが挙げられるが、これらに限定されない。

[0079] 培養は、バッチ式であっても連続式であってもよい。また、いずれの場合にも、培養の適切な時点で追加の前記炭素源等を補給する形式であってもよい。更に、培養は、好適な温度、酸素濃度、pH等の条件を制御しながら培養されてもよい。一般的な微生物宿主細胞に由来する形質転換体の好適な培養温度は、通常15℃～55℃、好ましくは25℃～40℃の範囲である。宿主微生物が好気性の場合、発酵中の適切な酸素濃度を確保するために振盪（フラスコ培養等）、攪拌／通気（ジャー・ファーメンター培養等）を行ってもよい。それらの培養条件は、当業者にとって容易に設定可能である。

[0080] 培養工程において、組換え微生物の培養物および／または培養物の抽出物を得ることを含んでもよい。

[0081] 本発明にかかる化合物の製造方法は、前記培養物および／または前記培養物の抽出物を、基質化合物と混合して混合液を得る混合工程をさらに含んでもよい。基質化合物は、酵素および目的化合物に応じて適宜選択されてよい。

[0082] 本発明にかかる化合物の製造方法は、目的化合物であるC6化合物を分離および／または精製する工程を含んでよい。当該分離および／または精製する工程では、任意の手法、例えば、遠心分離、ろ過、膜分離、晶析、抽出、蒸留、吸着、相分離、イオン交換および各種のクロマトグラフィーなどが挙げられるが、これらに限定されない。分離および／または精製工程では、一種類の方法を選択しても良く、また複数の方法を組み合わせても良い。

[0083] 本発明の更なる側面は、タンパク質に関する。具体的には、当該タンパク質は、

(a) 2, 3-デヒドロアジピルーC o Aを還元してアジピルC o Aに変換する酵素活性を有し、

(b) 以下：

(i) 配列番号 8、9、10、11、12、13、14、15 または 16 に示すアミノ酸配列と 80%以上、85%以上、88%以上、90%以上、93%以上、95%以上、97%以上、98%以上または 99%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる、

(ii) 配列番号 8、9、10、11、12、13、14、15 または 16 に示すアミノ酸配列に対して 1～10 個、1～7 個、1～5 個または 1～3 個のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなる、

(iii) 配列番号 57、58、59、60、61、62、63、64 または 65 に示すポリヌクレオチド配列と 80%以上、85%以上、88%以上、90%以上、93%以上、95%以上、97%以上、98%以上または 99%以上の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列からなる DNA によってコードされる、

(iv) 配列番号 57、58、59、60、61、62、63、64 または 65 に示すポリヌクレオチド配列によりコードされるタンパク質のアミノ酸配列に対して 1～10 個、1～7 個、1～5 個または 1～3 個のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなる、

(v) 配列番号 57、58、59、60、61、62、63、64 または 65 に示すポリヌクレオチド配列に相補的なポリヌクレオチド配列からなる DNA と緊縮条件下でハイブリダイズする DNA によってコードされる、および

(vi) 配列番号 57、58、59、60、61、62、63、64 または 65 に示すポリヌクレオチド配列の縮重異性体からなる DNA によってコードされる

のいずれかである、組換えタンパク質である。

[0084] 当該タンパク質は、好ましくは、

(a) 2, 3-デヒドロアジピルー CoA を還元してアジピル CoA に変換する酵素活性を有し、

(b) 以下：

(i) 配列番号 8、9、10、11、12、13、14、15 または 16 に示すアミノ酸配列と 80% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる、

(ii) 配列番号 8、9、10、11、12、13、14、15 または 16 に示すアミノ酸配列に対して 1～10 個のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなる、

(iii) 配列番号 57、58、59、60、61、62、63、64 または 65 に示すポリヌクレオチド配列と 80% 以上の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列からなる DNA によってコードされる、

(iv) 配列番号 57、58、59、60、61、62、63、64 または 65 に示すポリヌクレオチド配列によりコードされるタンパク質のアミノ酸配列に対して 1～10 個のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなる、

(v) 配列番号 57、58、59、60、61、62、63、64 または 65 に示すポリヌクレオチド配列に相補的なポリヌクレオチド配列からなる DNA と緊縮条件下でハイブリダイズする DNA によってコードされる、および

(vi) 配列番号 57、58、59、60、61、62、63、64 または 65 に示すポリヌクレオチド配列の縮重異性体からなる DNA によってコードされる

のいずれかである、組換えタンパク質である。

[0085] 好ましい一態様において、組換えタンパク質は、

(xi) 配列番号 8、9、10、11、12、13、14、15 または 16 に示すアミノ酸配列からなるか、または、

(xiii) 配列番号 57、58、59、60、61、62、63、64 または 65 に示すポリヌクレオチド配列からなる DNA によってコードされる。

[0086] 本発明のさらに別の側面は、先述のタンパク質を用いることを含む、C₆化合物の製造方法に関する。

[0087] 以上説明したとおり、本発明によれば、宿主微生物に前記2, 3-デヒドロアジピルC₆Aレダクターゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を導入することにより、2, 3-デヒドロアジピルC₆A還元酵素活性の良好な組換え微生物を得ることができる。また、良好な2, 3-デヒドロアジピルC₆Aレダクターゼ活性を有するタンパク質も提供される。

[0088] 前記組換え微生物または前記タンパク質を用いることにより、目的のC₆化合物を効率的に製造できる。また、所望のC₆化合物に応じて、追加の酵素を用いて変換を行うことにより、種々のC₆化合物を得ることができる。さらに、本発明にかかる組換え微生物は、良好なC₆化合物生産能を有するので、工業的規模での目的化合物の生産に利用できることが期待される。

[0089] <2>発明B：組換え微生物及びアジピン酸又はその誘導体の製造方法

本発明にかかる組換え微生物は、アジピン酸 (Adipic acid ; ADA) (CAS No. 124-04-9) またはアジピン酸誘導体を効率よく生産することができるよう、宿主微生物に対して遺伝子の改変が行われた微生物である。

[0090] 本明細書において、「アジピン酸誘導体」は、炭素数3～5の脂肪族炭化水素基と、1または複数のカルボキシル基とを有する、脂肪族カルボン酸である。アジピン酸誘導体の有する脂肪族炭化水素基は、飽和または不飽和である。脂肪族炭化水素基において、炭素は、例えば、ヒドロキシル基、カルボキシル基、ケトン基、アミノ基等の置換基によって置換されていても良い。「アジピン酸誘導体」の有する脂肪族炭化水素基の炭素数は、好ましくは、3または4である。「アジピン酸誘導体」の有するカルボキシル基は、好ましくは、1または2である。「アジピン酸誘導体」の具体例としては、炭素数4の脂肪族炭化水素基と2つのカルボン酸とを有する3-オキソアジピン酸 (3-Oxoadipic acid ; 3-OA)、炭素数3の脂肪族炭化水素基と1つのカルボン酸とを有するレブリン酸 (Levulinic

acid;LEV)、炭素数4の脂肪族炭化水素基と2つのカルボン酸とを有する3-ヒドロキシアジピン酸(3-Hydroxyadipic acid;3HA)および炭素数4の脂肪族炭化水素基と2つのカルボン酸とを有する2,3-デヒドロアジピン酸(2,3-Dehydroadipic acid;23DA)が挙げられる(図16参照)。

[0091] 本明細書におけるアジピン酸およびアジピン酸誘導体は、任意の塩形態を含めた中性または電離形態を取り得ることや、本形態がpHに依存することは当業者により理解される。したがって、「アジピン酸」および「アジピン酸誘導体」には、遊離酸の形態のほか、任意の塩形態および電離形態が含まれる。本明細書において、アジピン酸およびアジピン酸誘導体をまとめて、「アジピン酸類」または「アジピン酸類縁体」と総称することがある。

[0092] 本発明にかかる組換え微生物によって生産されたアジピン酸を原料として、6-アミノカプロン酸、ヘキサメチレンジアミン、1,6-ヘキサジオールおよび6-アミノ-1-ヘキサノールを合成することも可能である。合成方法は化学合成法や酵素や酵素を内在する微生物を利用する生物学的合成法などを問わない。また、アジピン酸を上記化合物に変換するための代謝経路を含む微生物であれば、細胞内でアジピン酸を中間体として使用する原料からの代謝変換も可能である。

[0093] 本発明にかかる遺伝子組換え微生物は、具体的に、3-ヒドロキシアジピルCoAデヒドラターゼをコードする外来性遺伝子および2,3-デヒドロアジピルCoAレダクターゼをコードする外来性遺伝子のうちの少なくとも1つを含む。このような外来性遺伝子の少なくとも1つを含むことにより、組換え微生物は、アジピン酸生産経路を有することとなり、アジピン酸またはアジピン酸誘導体を製造することができる。本明細書において、「遺伝子組換え微生物」は、単に「組換え微生物」とも称する。

[0094] 3-ヒドロキシアジピルCoAデヒドラターゼおよび2,3-デヒドロアジピルCoAレダクターゼの少なくとも1つは、バークホルデリア属(*Burkholderia* sp.)LEBP-3株(受託番号:NITE B

P-03334) に由来する。好ましくは、3-ヒドロキシアジピルC o Aデヒドラターゼおよび2, 3-デヒドロアジピルC o Aレダクターゼの両方が、バークホルデリア属 (*Burkholderia* sp.) LEBP-3株に由来する。

[0095] 3-ヒドロキシアジピルC o Aデヒドラターゼをコードする外来性遺伝子および2, 3-デヒドロアジピルC o Aレダクターゼをコードする外来性遺伝子の少なくとも1つは、バークホルデリア属 (*Burkholderia* sp.) LEBP-3株 (受託番号: NITE BP-03334) に由来する。好ましくは、3-ヒドロキシアジピルC o Aデヒドラターゼをコードする外来性遺伝子および2, 3-デヒドロアジピルC o Aレダクターゼをコードする外来性遺伝子の両方が、バークホルデリア属 (*Burkholderia* sp.) LEBP-3株 (受託番号: NITE BP-03334) に由来する。

[0096] 本発明の遺伝子組換え微生物は、上記酵素をコードする外来遺伝子のうちの少なくとも1つが導入されていればよい。本発明の遺伝子組換え微生物は、好ましくは、アジピン酸生産経路の各反応段階を触媒する酵素をコードする外来遺伝子のうち少なくとも1つが導入され、外来性酵素を発現する。また、本発明の遺伝子組換え微生物が、外来遺伝子の導入によらずとも、アジピン酸生産経路の反応段階を触媒する十分な量の酵素を発現する場合は、内因遺伝子にコードされる酵素によって反応が進行してもよい。

[0097] 本発明にかかる組換え微生物は、3-ヒドロキシアジピルC o Aデヒドラターゼおよび2, 3-デヒドロアジピルC o Aレダクターゼの少なくとも1つを発現していることが好ましい。本発明にかかる組換え微生物が、これら酵素の少なくとも一方を発現していることにより、アジピン酸生産経路の反応段階が進行し、目的化合物を生産することができる。

[0098] より好ましくは、本発明にかかる組換え微生物は、3-ヒドロキシアジピルC o Aデヒドラターゼおよび2, 3-デヒドロアジピルC o Aレダクターゼの双方を発現する。本発明にかかる組換え微生物が、これら酵素を発現し

ていることにより、アジピン酸生産経路の反応段階の各々が進行し、目的化合物を生産することができる。

[0099] さらに好ましくは、本発明にかかる組換え微生物は、3-ヒドロキシアジピルC α Aデヒドラターゼおよび2, 3-デヒドロアジピルC α Aレダクターゼに加えて、オキシドレダクターゼおよび／または β -ケトチオラーゼを発現する。本発明にかかる組換え微生物が、これら酵素を発現していることにより、アジピン酸生産経路の反応段階の各々が進行し、目的化合物を効率よく生産することができる（図16参照）。

[0100] 以下、本発明にかかる組換え微生物が含む遺伝子がコードする酵素の各々について詳述する。

[0101] <3-ヒドロキシアジピルC α Aデヒドラターゼ>

3-ヒドロキシアジピルC α Aデヒドラターゼは、3-ヒドロキシアジピルC α Aを2, 3-デヒドロアジピルC α Aへと変換する反応を触媒する酵素である（図16のステップC）。

[0102] 一態様において、3-ヒドロキシアジピルC α Aデヒドラターゼは、バークホルデリア属（*Burkholderia* sp.）LEBP-3株の染色体DNAを鋳型とし、所定のヌクレオチドをプライマーとして使用したPCR増幅物と配列同一性が65%以上、70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、88%以上、90%以上、93%以上、95%以上、97%以上、98%以上または99%以上であるDNAにコードされる。ここで、当該DNAは、例えば626～940bp、好ましくは740～862bp、より好ましくは743～823bp、さらに好ましくは767～799bp、特により好ましくは775～791bp、最も好ましくは778～788bpを有する。PCRに用いるプライマーについては後述する。

[0103] 好ましい一態様において、3-ヒドロキシアジピルC α Aデヒドラターゼは、バークホルデリア属（*Burkholderia* sp.）LEBP-3株の染色体DNAを鋳型とし、所定のヌクレオチドをプライマーとして使用したPCR増幅物であるDNAにコードされる。当該DNAは、例えば6

26～940bp、好ましくは740～862bp、より好ましくは743～823bp、さらにより好ましくは767～799bp、特により好ましくは775～791bp、最も好ましくは778～788bpを有する。

[0104] 更なる態様において、3-ヒドロキシアジピルCoAデヒドラターゼは、以下から選択される：

(A-1) バークホルデリア属 (*Burkholderia* sp.) LEBP-3株の染色体DNAを鋳型とし、所定のヌクレオチドをプライマーとして使用したPCR増幅物と配列同一性が65%以上、70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、88%以上、90%以上、93%以上、95%以上、97%以上、98%以上または99%以上であるDNAにコードされる組換えポリペプチドであって、

3-ヒドロキシアジピルCoAデヒドラターゼ活性を有し、

前記DNAは、先述の塩基対数 (bp) を有する、組換えポリペプチド；

(A-2) バークホルデリア属 (*Burkholderia* sp.) LEBP-3株の染色体DNAを鋳型とし、所定のヌクレオチドをプライマーとして使用したPCR増幅物であるDNAによりコードされるポリペプチドのアミノ酸配列に対して例えば1～10個、好ましくは1～7個、より好ましくは1～5個、さらに好ましくは1～3個のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなる組換えポリペプチドであって、

3-ヒドロキシアジピルCoAデヒドラターゼ活性を有し、

前記DNAは、先述の塩基対数 (bp) を有する、組換えポリペプチド；および

(A-3) バークホルデリア属 (*Burkholderia* sp.) LEBP-3株の染色体DNAを鋳型とし、所定のヌクレオチドをプライマーとして使用したPCR増幅物の縮重異性体からなるDNAにコードされる組換えポリペプチドであって、

3-ヒドロキシアジピルCoAデヒドラターゼ活性を有し、

前記DNAは、先述の塩基対数 (bp) を有する、組換えポリペプチド。

[0105] 更なる好ましい態様において、3-ヒドロキシアジピルCoAデヒドラターゼは、バークホルデリア属 (*Burkholderia* sp.) LEBP-3株の染色体DNAを鋳型とし、所定のヌクレオチドをプライマーとして使用したPCR増幅物にコードされる組換えポリペプチドであり、当該増幅物の塩基対数は783または784bpである。

[0106] 3-ヒドロキシアジピルCoAデヒドラターゼに関し、PCRに用いられるプライマー（フォワードおよびリバース）としては、以下が挙げられる（図17参照）。

（1a）配列番号168に示す塩基配列からなるヌクレオチドおよび配列番号169に示す塩基配列からなるヌクレオチド、

（1b）配列番号168に示す塩基配列を含むヌクレオチドおよび配列番号169に示す塩基配列を含むヌクレオチド、

（1c）配列番号168に示す塩基配列をコドン最適化した塩基配列からなるヌクレオチドおよび配列番号169に示す塩基配列をコドン最適化した塩基配列からなるヌクレオチド、

（1d）配列番号168に示す塩基配列をコドン最適化した塩基配列を含むヌクレオチドおよび配列番号169に示す塩基配列をコドン最適化した塩基配列を含むヌクレオチド。

[0107] 前記（1b）の「配列番号168に示す塩基配列を含むヌクレオチドおよび配列番号169に示す塩基配列を含むヌクレオチド」は、それぞれ、「配列番号168に示す塩基配列」および「配列番号169に示す塩基配列」に加えて、例えば1～20bp、好ましくは1～15bp、より好ましくは5～15bp、さらに好ましくは10～15bpがさらに追加されたヌクレオチド長を有する。

[0108] 前記（1d）の「配列番号168に示す塩基配列をコドン最適化した塩基配列を含むヌクレオチドおよび配列番号169に示す塩基配列をコドン最適化した塩基配列を含むヌクレオチド」は、それぞれ、「配列番号168に示す塩基配列をコドン最適化した塩基配列」および「配列番号169に示す塩

基配列をコドン最適化した塩基配列」に加えて、ベクター末端との相同配列を含み、例えば1～20bp、好ましくは1～15bp、より好ましくは5～15bp、さらに好ましくは10～15bpがさらに追加されたヌクレオチド長を有する。前記(1d)の「配列番号168に示す塩基配列をコドン最適化した塩基配列を含むヌクレオチド、および、配列番号169に示す塩基配列をコドン最適化した塩基配列を含むヌクレオチド」の例としては、

(1d') 配列番号198に示す塩基配列からなるヌクレオチドおよび配列番号199に示す塩基配列からなるヌクレオチドが挙げられる(図20A)。

[0109] 3-ヒドロキシアジピルC o Aデヒドラターゼに関し、好ましいプライマーは、

(1a) 配列番号168に示す塩基配列からなるヌクレオチドおよび配列番号169に示す塩基配列からなるヌクレオチド、および

(1b) 配列番号168に示す塩基配列を含むヌクレオチドおよび配列番号169に示す塩基配列を含むヌクレオチドである。

[0110] 上記ヌクレオチドをプライマーとして用いた、バークホルデリア属(*Burkholderia* sp.) LEBP-3株の染色体DNAを鋳型としたPCR増幅物であるDNAは、好ましくは783または784bpを有する。ここで、PCRで用いるDNAポリメラーゼとしては当該分野で既知のものが用いられ、例えばTaq DNAポリメラーゼ、ホットスタート調整されたDNAポリメラーゼ、ポリメラーゼ活性とは別に3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を有するブルーフリーディングDNAポリメラーゼ等が挙げられる。

[0111] <2, 3-デヒドロアジピルC o Aレダクターゼ>

2, 3-デヒドロアジピルC o Aレダクターゼは、2, 3-デヒドロアジピルC o AをアジピルC o Aへと変換する反応を触媒する酵素である(図16のステップD参照)。

[0112] 一態様において、2, 3-デヒドロアジピルC o Aレダクターゼは、バークホルデリア属 (*Burkholderia* sp.) LEBP-3株の染色体DNAを鋳型とし、所定のヌクレオチドをプライマーとして使用したPCR増幅物と配列同一性が65%以上、70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、88%以上、90%以上、93%以上、95%以上、97%以上、98%以上または99%以上であるDNAにコードされる。当該DNAは、例えば924~1386bp、好ましくは1039~1249bp、より好ましくは1097~1213bp、さらにより好ましくは1131~1179bp、特により好ましくは1143~1167bp、さらに特により好ましくは1145~1165bp、最も好ましくは1150~1160bpを有する。

[0113] 好ましい一態様において、2, 3-デヒドロアジピルC o Aレダクターゼは、バークホルデリア属 (*Burkholderia* sp.) LEBP-3株の染色体DNAを鋳型とし、所定のヌクレオチドをプライマーとして使用したPCR増幅物であるDNAにコードされる。当該DNAは、例えば924~1386bp、好ましくは1039~1249bp、より好ましくは1097~1213bp、さらにより好ましくは1131~1179bp、特により好ましくは1143~1167bp、さらに特により好ましくは1145~1165bp、最も好ましくは1150~1160bpを有する。

[0114] 更なる態様において、2, 3-デヒドロアジピルC o Aレダクターゼは、以下から選択される：

(B-1) バークホルデリア属 (*Burkholderia* sp.) LEBP-3株の染色体DNAを鋳型とし、所定のヌクレオチドをプライマーとして使用したPCR増幅物と配列同一性が65%以上、70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、88%以上、90%以上、93%以上、95%以上、97%以上、98%以上または99%以上であるDNAにコードされる組換えポリペプチドであって、

2, 3-デヒドロアジピルC o Aレダクターゼ活性を有し、

前記DNAは、先述の塩基対数（bp）を有する、組換えポリペプチド；
（B-2）バークホルデリア属（*Burkholderia* sp.）LEBP-3株の染色体DNAを鋳型とし、所定のヌクレオチドをプライマーとして使用したPCR増幅物であるDNAによりコードされるポリペプチドのアミノ酸配列に対して、例えば1～10個、好ましくは1～7個、より好ましくは1～5個、さらに好ましくは1～3個のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなる組換えポリペプチドであって、

2, 3-デヒドロアジピルC o Aレダクターゼ活性を有し、

前記DNAは、先述の塩基対数（bp）を有する、組換えポリペプチド；
および

（B-3）バークホルデリア属（*Burkholderia* sp.）LEBP-3株の染色体DNAを鋳型とし、所定のヌクレオチドをプライマーとして使用したPCR増幅物の縮重異性体からなるDNAにコードされる組換えポリペプチドであって、

2, 3-デヒドロアジピルC o Aレダクターゼ活性を有し、

前記DNAは、先述の塩基対数（bp）を有する、組換えポリペプチド。

[0115] 更なる好ましい態様において、外来性の2, 3-デヒドロアジピルC o Aレダクターゼは、バークホルデリア属（*Burkholderia* sp.）LEBP-3株の染色体DNAを鋳型とし、所定のヌクレオチドをプライマーとして使用したPCR増幅物であり、当該増幅物の塩基対数は1155または1156bpである。

[0116] 2, 3-デヒドロアジピルC o Aレダクターゼに関し、PCRに用いられるプライマー（フォワードおよびリバース）としては、以下が挙げられる（図17参照）。

（2a）配列番号170に示す塩基配列からなるヌクレオチドおよび配列番号171に示す塩基配列からなるヌクレオチド、

（2b）配列番号170に示す塩基配列を含むヌクレオチドおよび配列番

号 1 7 1 に示す塩基配列を含むヌクレオチド、

(2 c) 配列番号 1 7 0 に示す塩基配列をコドン最適化した塩基配列からなるヌクレオチドおよび配列番号 1 7 1 に示す塩基配列をコドン最適化した塩基配列からなるヌクレオチド、

(2 d) 配列番号 1 7 0 に示す塩基配列をコドン最適化した塩基配列を含むヌクレオチドお

よび配列番号 1 7 1 に示す塩基配列をコドン最適化した塩基配列を含むヌクレオチド。

[0117] 前記 (2 b) の「配列番号 1 7 0 に示す塩基配列を含むヌクレオチドおよび配列番号 1 7 1 に示す塩基配列を含むヌクレオチド」は、それぞれ、「配列番号 1 7 0 に示す塩基配列」および「配列番号 1 7 1 に示す塩基配列」に加えて、例えば 1 ~ 2 0 b p、好ましくは 1 ~ 1 5 b p、より好ましくは 5 ~ 1 5 b p、さらに好ましくは 1 0 ~ 1 5 b p がさらに追加されたヌクレオチド長を有する。

[0118] 前記 (2 d) の「配列番号 1 7 0 に示す塩基配列をコドン最適化した塩基配列を含むヌクレオチドおよび配列番号 1 7 1 に示す塩基配列をコドン最適化した塩基配列を含むヌクレオチド」は、それぞれ、「配列番号 1 7 0 に示す塩基配列をコドン最適化した塩基配列」および「配列番号 1 7 1 に示す塩基配列をコドン最適化した塩基配列」に加えて、ベクター末端との相同配列を含み、例えば 1 ~ 2 0 b p、好ましくは 1 ~ 1 5 b p、より好ましくは 5 ~ 1 5 b p、さらに好ましくは 1 0 ~ 1 5 b p がさらに追加されたヌクレオチド長を有する。前記 (2 d) の「配列番号 1 7 0 に示す塩基配列をコドン最適化した塩基配列を含むヌクレオチドおよび配列番号 1 7 1 に示す塩基配列をコドン最適化した塩基配列を含むヌクレオチド」の例としては、

(2 d') 配列番号 2 1 0 に示す塩基配列からなるヌクレオチドおよび配列番号 2 1 1 に示す塩基配列からなるヌクレオチド
が挙げられる (図 2 0 A)。

[0119] 2, 3-デヒドロアジピル C o A レダクターゼに関し、好ましいプライマ

ーは、

(2a) 配列番号170に示す塩基配列からなるヌクレオチドおよび配列番号171に示す塩基配列からなるヌクレオチド、および、

(2b) 配列番号170に示す塩基配列を含むヌクレオチドおよび配列番号171に示す塩基配列を含むヌクレオチドである。

[0120] 上記ヌクレオチドをプライマーとして用いた、バークホルデリア属 (*Burkholderia* sp.) LEBP-3株の染色体DNAを鋳型としたPCR増幅物であるDNAは、好ましくは1155または1156bpを有する。ここで、PCRで用いるDNAポリメラーゼとしては当該分野で既知のものが用いられ、例えばTaq DNAポリメラーゼ、ホットスタート調整されたDNAポリメラーゼ、ポリメラーゼ活性とは別に3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有するプルーフリーディングDNAポリメラーゼ等が挙げられる。

[0121] 本明細書において、「PCR増幅物」とは、特定のヌクレオチドをプライマーとしてPCRを行った結果得られた産物をいう。なお、特段示さない限り、本明細書において、PCR増幅では、特定のヌクレオチドを1 μ Mずつ、フォワードプライマーおよびリバースプライマーとして用い、且つ、酵素としてPrimeSTAR Max DNA Polymerase (製品名、タカラバイオ製) を用いて、25 μ L液の量で熱処理98°C 10秒、アニーリング55°C 15秒、伸長72°C 5秒/kbの条件での処理を30サイクル実施する。

[0122] 本発明に関し、目的の外来性遺伝子が導入される宿主微生物は特に限定されず、原核生物および真核生物のいずれであってもよい。既に単離保存されているもの、新たに天然から分離したものおよび遺伝子改変をされたものから任意に選択することができる。宿主微生物は、例えば、エッセリシア属、コリネバクテリウム属、バチルス属、アシネトバクター属、バークホルデリア属、シュードモナス属、クロストリジウム属、サッカロマイセス属、シゾ

サッカロマイセス属、ヤロウィア属、カンジタ属、ピキア属、アスペルギルス属、クレブシエラ属、グルコノバクター属、ザイモモナス属、ラクトバチルス属、ラクトコッカス属、ストレプトコッカス属およびストレプトマイセス属からなる群より選択される属に属する。本発明の宿主微生物は、好ましくは、エッセリシア属、コリネバクテリウム属、バチルス属、アシネトバクター属、バークホルデリア属、シュードモナス属、クロストリジウム属、サッカロマイセス属、シゾサッカロマイセス属、ヤロウィア属、カンジタ属、ピキア属およびアスペルギルス属からなる群より選択される属に属する。宿主微生物は、より好ましくは、大腸菌 (*Escherichia coli*) である。

[0123] したがって、上記宿主微生物に外来性遺伝子を導入した本発明にかかる組換え微生物は、例えば、エッセリシア属、コリネバクテリウム属、バチルス属、アシネトバクター属、バークホルデリア属、シュードモナス属、クロストリジウム属、サッカロマイセス属、シゾサッカロマイセス属、ヤロウィア属、カンジタ属、ピキア属、アスペルギルス属、クレブシエラ属、グルコノバクター属、ザイモモナス属、ラクトバチルス属、ラクトコッカス属、ストレプトコッカス属およびストレプトマイセス属からなる群より選択される属に属し、好ましくは、エッセリシア属、コリネバクテリウム属、バチルス属、アシネトバクター属、バークホルデリア属、シュードモナス属、クロストリジウム属、サッカロマイセス属、シゾサッカロマイセス属、ヤロウィア属、カンジタ属、ピキア属およびアスペルギルス属からなる群より選択される属に属する。本発明にかかる組換え微生物は、より好ましくは、大腸菌 (*Escherichia coli*) である。

[0124] 本発明にかかる遺伝子組換え微生物が有するアジピン酸、アジピン酸誘導体、ヘキサメチレンジアミン、1, 6-ヘキサンジオールおよび6-アミノ-1-ヘキサノール生産経路および当該経路の各反応段階を触媒する酵素について、図16を参照しながら以下に説明する。

[0125] 図16のステップAの変換では、例えば、スクシニルCoA：アセチルC

○ Aアシルトランスフェラーゼ、または3-オキソアジピルC○Aチオラーゼが関与し、スクシニルC○AとアセチルC○Aとが縮合し、3-オキソアジピルC○Aへと変換される。本変換を触媒し得る酵素他の例としては、β-ケトチオラーゼが挙げられる。更には、例えば、EC 2.3.1.9 (アセトアセチルC○Aチオラーゼ)、EC 2.3.1.16 (3-ケトアシルC○Aチオラーゼ) およびEC 2.3.1.174 (3-オキソアジピルC○Aチオラーゼ) などの群に分類される酵素も、本変換に対して活性を有し得る酵素として例示することができる。本発明で使用される酵素は、本変換に対する活性を有するものであれば限定されないが、一態様において、配列番号172に示すアミノ酸配列からなる大腸菌由来のPa a Jが使用される。好ましい一態様において、当該酵素は、配列番号164に示すヌクレオチドおよび配列番号165に示すヌクレオチドをプライマーとして使用した、バークホルデリア属 (*Burkholderia* sp.) LEBP-3株の染色体DNAを鋳型としたPCR増幅物であるDNA配列(1203bp)にコードされるスクシニルC○A:アセチルC○Aアシルトランスフェラーゼである。

- [0126] 図16のステップBの変換では、3-ヒドロキシアジピルC○Aデヒドロゲナーゼが関与し、3-オキソアジピルC○Aが、3-ヒドロキシアジピルC○Aへと変換される。本変換を触媒し得る他の酵素の例としては、EC 1.1.1の群に分類されるオキシドレダクターゼが挙げられる。具体的に、例えば、EC 1.1.1.35 (3-ヒドロキシアシルC○Aデヒドロゲナーゼ)、EC 1.1.1.36 (アセトアセチルC○Aデヒドロゲナーゼ)、EC 1.1.1.157 (3-ヒドロキシブタノイルC○Aデヒドロゲナーゼ)、EC 1.1.1.211 (長鎖3-ヒドロキシアシルC○Aデヒドロゲナーゼ) およびEC 1.1.1.259 (3-ヒドロキシピメロイルC○Aデヒドロゲナーゼ) などの群に分類される酵素が、本変換に対して活性を有し得る酵素として例示することができる。本発明で使用される酵素は、本変換に対する活性を有するものであれば限定

されないが、例えば配列番号173に示すアミノ酸配列からなる大腸菌由来のPaaHが使用される（図18）。好ましい一態様において、当該酵素は、配列番号166に示すヌクレオチドおよび配列番号167に示すヌクレオチドをプライマーとして使用した、バークホルデリア属（*Burkholderia* sp.）LEBP-3株の染色体DNAを鋳型としたPCR増幅物のDNA配列（1521bp）にコードされる3-ヒドロキシアジピルCoAデヒドロゲナーゼである。

[0127] 図16のステップCの変換では、例えば、3-ヒドロキシアジピルCoAデヒドラターゼが関与し、3-ヒドロキシアジピルCoAが、2, 3-デヒドロアジピルCoAへと変換される。本変換を触媒し得る他の酵素の例としては、EC 4. 2. 1の群に分類されるヒドロリアーゼが挙げられる。具体的に、例えば、EC 4. 2. 1. 17（エノイルCoAヒドラターゼ）、EC 4. 2. 1. 55（3-ヒドロキシブタノイルCoAデヒドラターゼ）およびEC 4. 2. 1. 74（長鎖エノイルCoAヒドラターゼ）などの群に分類される酵素は、本変換に対して活性を有し得る酵素として例示することができる。好ましい一態様において、当該酵素は、先述の3-ヒドロキシアジピルCoAデヒドラターゼである。

[0128] 図16のステップDの変換では、例えば2, 3-デヒドロアジピルCoAレダクターゼが関与し、2, 3-デヒドロアジピルCoAが、アジピルCoAへと変換される。本変換を触媒し得る酵素の他の例としては、EC 1. 3. 1の群に分類されるオキシドレダクターゼが挙げられる。具体的に、例えば、EC 1. 3. 1. 8（アシルCoAデヒドロゲナーゼ（NADP⁺））や、EC 1. 3. 1. 9（エノイルACPレダクターゼ（NADH））、EC 1. 3. 1. 38（トランス-2-エノイルCoAレダクターゼ（NADP⁺））、EC 1. 3. 1. 44（トランス-2-エノイルCoAレダクターゼ（NAD⁺））、EC 1. 3. 1. 86（クロトニルCoAレダクターゼ）、EC 1. 3. 1. 93（長鎖アシルCoAレダクターゼ）およびEC 1. 3. 1. 104（エノイルACPレダク

ターゼ (NADPH)) などの群に分類される酵素は、本変換に対して活性を有し得る酵素として例示することができる。好ましい一態様において、当該酵素は、先述の2, 3-デヒドロアジピルC o Aレダクターゼである。

[0129] 図16のステップEの変換では、アジピルC o Aがアジピン酸へと変換される。本変換を触媒し得る酵素の例としては、EC 3. 1. 2の群に分類されるチオエステルヒドラターゼが挙げられる。例えば、EC 3. 1. 2. 1 (アセチルC o Aヒドラターゼ) およびEC 3. 1. 2. 20 (アシルC o Aヒドラターゼ) などの群に分類される酵素は、本変換に対して活性を有し得る酵素として例示することができる。好ましい一態様において、当該酵素は、本変換に対する活性を有するものであれば限定されないが、配列番号179に示す、アシネトバクターADP1株由来のtesB (Ab) が使用される。使用する酵素の基質特異性に応じて、3-オキソアジピルC o A、3-ヒドロキシアジピルC o Aおよび2, 3-デヒドロアジピルC o AのC o Aが脱離され、それぞれ3-オキソアジピン酸、3-ヒドロキシアジピン酸、2, 3-デヒドロアジピン酸を生成する。

[0130] また、図16のステップEの変換を触媒し得る別の酵素の例として、EC 2. 8. 3の群に分類されるC o A-トランスフェラーゼも挙げることができる。例えば、EC 2. 8. 3. 5 (3-オキソ酸 C o A-トランスフェラーゼ) や、EC 2. 8. 3. 6 (3-オキソアジピン酸 C o A-トランスフェラーゼ)、EC 2. 8. 3. 18 (スクシニルC o A : 酢酸 C o A-トランスフェラーゼ) といった群に分類される酵素は、本変換に対して活性を有し得る酵素として例示することができる。

[0131] さらに、図16のステップEの変換を触媒し得る別の酵素変換の例として、EC 2. 3. 1の群に分類されるアシルトランスフェラーゼによって、アジピルC o Aのアジピル基をリン酸に転移してアジピルリン酸を生成した後、EC 2. 7. 2の群に分類されるホスホトランスフェラーゼによる脱リン酸化を経る経路も例示することができる。例えば、アシルトランスフェラーゼとしては、EC 2. 3. 1. 8 (リン酸アセチルトランスフェ

ラーゼ)や、EC 2.3.1.19 (リン酸ブチリルトランスフェラーゼ)、ホスホトランスフェラーゼについては、EC 2.7.2.1 (酢酸キナーゼ)や、EC 2.7.2.7 (ブタン酸キナーゼ)といった群に分類される酵素は、本変換に対して活性を有し得る酵素として例示することができる。

[0132] 図16のステップTでは、3-オキソアジピン酸がレブリン酸へと変換される。本変換は、酵素(3-オキソアジピン酸デカルボキシラーゼ)によって触媒されるか、または、自然発生的に起こる。

[0133] 図16のステップFの変換では、アジピルーCoAからアジピン酸セミアルデヒドへと変換される。本変換を触媒し得る酵素の例としては、EC 1.2.1.10 (アセトアルデヒドデヒドロゲナーゼ(アセチル化))、EC 1.2.1.17 (グリオキシル酸デヒドロゲナーゼ(アシル化))、EC 1.2.1.42 (ヘキサデカナルデヒドロゲナーゼ(アシル化))、EC 1.2.1.44 (シナモイル-CoAレダクターゼ(アシル化))、EC 1.2.1.75 (マロニル-CoAレダクターゼ(マロン酸セミアルデヒド形成))、EC 1.2.1.76 (コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(アシル化))といった群に分類される酵素は、本変換と同様に、CoAを脱離しアルデヒドを生成する変換反応を触媒することから、本変換に対しても活性を有し得る酵素として例示することができる。本発明で 사용되는酵素は、本変換に対する活性を有するものであれば限定されないが、例えば、配列番号236に記載されるアミノ酸配列からなる*Clostridium kluyveri*由来のsucDが使用される(図21)。

[0134] 図16のステップG、J、Qの変換では、カルボキシル基がアルデヒドへと変換される。本変換を触媒し得る酵素としては、例えば、カルボン酸レダクターゼ(Carboxylic Acid Reductase; CAR)が挙げられる。例えば、EC 1.2.1.30 (カルボン酸レダクターゼ(NADP+))、EC 1.2.1.31 (L-アミノアジピン酸セミ

アルデヒドデヒドロゲナーゼ)、EC 1. 2. 1. 95 (L-2-アミノアジピン酸レダクターゼ)、EC 1. 2. 99. 6 (カルボン酸レダクターゼ)といった群に分類される酵素が、本変換と同様に、カルボン酸からアルデヒドを生成する変換反応を触媒することから、本変換に対しても活性を有し得る酵素として例示することができる。酵素の由来となる生物種の典型的な例としては、*Nocardia iowensis*、*Nocardia asteroides*、*Nocardia brasiliensis*、*Nocardia farcinica*、*Segniliparus rugosus*、*Segniliparus rotundus*、*Tsukamurella paurometabola*、*Mycobacterium marinum*、*Mycobacterium neoaurum*、*Mycobacterium abscessus*、*Mycobacterium avium*、*Mycobacterium chelonae*、*Mycobacterium immunogenum*、*Mycobacterium smegmatis*、*Serpula lacrymans*、*Heterobasidion annosum*、*Coprinopsis cinerea*、*Aspergillus flavus*、*Aspergillus terreus*、*Neurospora crassa*、*Saccharomyces cerevisiae*が挙げられるが、これらに限定されない。本発明で使用される酵素は、本変換に対する活性を有するものであれば限定されないが、例えば、配列番号237～241のいずれかに記載されるアミノ酸配列からなる酵素の少なくとも一種が使用されてもよく(図22A～図22E)、好ましくは、配列番号239に記載されるアミノ酸配列からなる*Mycobacterium abscessus*由来の酵素MaCar、配列番号241に記載されるアミノ酸配列からなるMaCarの変異体であるMaCar(m)の少なくとも一方が使用され、より好ましくは配列番号241に記載されるアミノ酸配列からなるMaCar(m)が使用される。

[0135] また、カルボン酸レダクターゼは、ホスホパンテティニル化されることにより活性型のホロ酵素に変換され得る (Venkitasubramanian et al., Journal of Biological Chemistry, Vol. 282, No. 1, 478-485 (2007))。ホスホパンテティニル化はホスホパンテティニル基転移酵素 (Phosphopantetheinyl Transferase; PT) により触媒される。本反応を触媒し得る酵素としては、例えば、EC 2.7.8.7 に分類される酵素が挙げられる。したがって、本発明の微生物は更に、ホスホパンテティニル基転移酵素の活性が増大するように改変されている。ホスホパンテティニル基転移酵素の活性を増大する方法としては、外来のホスホパンテティニル基転移酵素遺伝子を導入する方法や、内因性のホスホパンテティニル基転移酵素遺伝子の発現を強化する方法が挙げられるが、これらに限定されない。本発明で使用する酵素は、ホスホパンテティニル基転移活性を有する限り、これらに限定されないが、典型的な酵素としては、例えば、大腸菌の EntD や、Bacillus subtilis の Sfp、Nocardia iowensis の Npt (Venkitasubramanian et al., Journal of Biological Chemistry, Vol. 282, No. 1, 478-485 (2007))、Saccharomyces cerevisiae の Lys5 (Ehmann et al., Biochemistry 38.19 (1999): 6171-6177.) が挙げられる。本発明で使用する酵素は、本変換に対する活性を有するものであれば限定されないが、例えば、配列番号 242~245 に記載されるアミノ酸配列からなる酵素の少なくともいずれか一種が使用されてもよく (図 23A~図 23D)、好ましくは、配列番号 243 に記載されるアミノ酸配列からなる Nocardia iowensis 由来の Nocardia iowensis の Npt が使用される。

[0136] 図 16 のステップ M、N、S の変換は、アミノ基転移反応である。この変

換を触媒し得る酵素の例としては、EC 2. 6. 1の群に分類されるトランスアミナーゼ（アミノトランスフェラーゼ）が挙げられる。例えば、EC 2. 6. 1. 19（4-アミノブタン酸-2-オキソグルタル酸トランスアミナーゼ）や、EC 2. 6. 1. 29（ジアミノトランスアミナーゼ）、EC 2. 6. 1. 48（5-アミノ吉草酸トランスアミナーゼ）といった群に分類される酵素は、本変換に対しても活性を有し得る酵素として例示することができる。本発明で使用される酵素は、各ステップの変換活性を有するものであれば、特に限定されないが、例えば、カダベリンやスペルミジンのアミノ基転移することが報告されている大腸菌のプトレシンアミノトランスフェラーゼであるYg j G (Samsonova, et al., BMC microbiology 3. 1 (2003) : 2.) や、シュードモナス属のプトレシンアミノトランスフェラーゼであるSp u C (Lu et al., Journal of bacteriology 184. 14 (2002) : 3765-3773.、Galman et al., Green Chemistry 19. 2 (2017) : 361-366.)、大腸菌のGABAアミノトランスフェラーゼGa b Tや、P u u Eが使用されてもよい。さらには、Ruegeria pomeroyi、Chromobacterium violaceum、Arthrobacter citreus、Sphaerobacter thermophilus、Aspergillus fischeri、Vibrio fluvialis、Agrobacterium tumefaciens、Mesorhizobium loti等の生物種由来のω-トランスアミナーゼも、1, 8-ジアミノオクタンや1, 10-ジアミノデカンなどのジアミン化合物へのアミノ基転移活性を有することが報告されており、本発明で使用されてもよい (Sung et al., Green Chemistry 20. 20 (2018) : 4591-4595.、Sattler et al., Angewandte Chemie 124. 36 (2012) : 9290-929

3.)。本発明で使用される酵素は、本変換に対する活性を有するものであれば限定されないが、例えば、配列番号246～250に記載されるアミノ酸配列からなる酵素の少なくともいずれか一種が使用されてもよい(図24A～図24E)。典型的なアミノ基供与体としては、L-グルタミン酸、L-アラニン、グリシンが挙げられるが、これらには限定されない。

[0137] 図16のステップH、L、Rの変換では、アルデヒドがアルコールに変換される。本変換を触媒し得る酵素の例としては、EC 1.1.1の群に分類されるオキシドレダクターゼが挙げられる。例えば、EC 1.1.1.1(アルコールデヒドロゲナーゼ)や、EC 1.1.1.2(アルコールデヒドロゲナーゼ(NADP⁺))、EC 1.1.1.71(アルコールデヒドロゲナーゼ[NAD(P)⁺])といった群に分類される酵素は、本変換と同様に、アルデヒドからアルコールへの変換反応を触媒することから、本変換に対しても活性を有し得る酵素として例示することができる。本発明で使用される酵素は、本変換に対する活性を有するものであれば限定されないが、例えば、配列番号251に記載される大腸菌由来のAhrが使用される(図25)。

[0138] 図16のステップI、Oの変換では、カルボキシル基にCoAが付加される。本変換を触媒し得る酵素の例としてはEC 2.8.3の群に分類されるCoAトランスフェラーゼ、EC 6.2.1の群に分類される酸チオールリガーゼが挙げられる。本発明で使用される酵素は、本変換に対する活性を有するものであれば限定されない。

[0139] 本発明に利用できる上記の酵素をコードする遺伝子は、例示された生物以外に由来するものであっても、または人工的に合成したものであってもよく、宿主微生物細胞内で実質的な酵素活性を発現できるものであればよい。

[0140] 本発明にかかる遺伝子組換え微生物は、先述の3-ヒドロキシアジピルCoAデヒドラターゼおよび/または2,3-デヒドロアジピルCoAレダクターゼをコードする外来性遺伝子に加え、スクシニルCoA:アセチルCoAアシルトランスフェラーゼおよび3-ヒドロキシアジピルCoAデヒドロ

ゲナーゼからなる群より選択される少なくとも1つの酵素をコードする外来性遺伝子が導入されていることが好ましい。

[0141] すなわち、本発明にかかる組換え微生物は、好ましくは、スクシニルC○A：アセチルC○Aアシルトランスフェラーゼをコードする外来性遺伝子および3-ヒドロキシアジピルC○Aデヒドロゲナーゼをコードする外来性遺伝子のうちの少なくとも1つをさらに含む。

[0142] 本発明にかかる組換え微生物は、上記外来性遺伝子、すなわち、3-ヒドロキシアジピルC○Aデヒドラターゼ、2, 3-デヒドロアジピルC○Aレダクターゼ、スクシニルC○A：アセチルC○Aアシルトランスフェラーゼおよび3-ヒドロキシアジピルC○Aデヒドロゲナーゼ以外にも、更なる外来性遺伝子が導入されていてもよい。

[0143] 本発明にかかる組換え微生物は、宿主微生物において、適宜、任意の遺伝子が破壊されたものであってもよい。標的遺伝子の破壊は、当該分野で既知の方法に従って行われてよい。

[0144] また、本発明の目的に利用できる上記酵素遺伝子は、前記宿主微生物細胞内で実質的な酵素活性を発現できるものであれば、自然界で発生し得るすべての変異や、人工的に導入された変異及び修飾を有していてもよい。例えば、特定のアミノ酸をコードする種々のコドンには余分のコドンが存在することが知られている。そのため本発明においても同一のアミノ酸に最終的に翻訳されることになる代替コドンを利用してよい。つまり、遺伝子コードは縮重しているので、ある特定のアミノ酸をコードするのに複数のコドンを使用でき、そのためアミノ酸配列は任意の1セットの類似のDNAオリゴヌクレオチドでコードされ得る。そのセットの唯一のメンバーだけが天然型酵素の遺伝子配列に同一であるが、ミスマッチのあるDNAオリゴヌクレオチドでさえ適切な緊縮条件下（例えば、3×SSC、68℃でハイブリダイズし、2×SSC、0.1%SDS及び68℃で洗浄）で天然型配列にハイブリダイズでき、天然型配列をコードするDNAを同定、単離でき、更にそのような遺伝子も本発明において利用できる。特に、ほとんどの生物は特定のコード

ン（最適コドン）のサブセットを優先的に用いることが知られているので（Gene、Vol. 105、pp. 61–72、1991等）、宿主微生物に応じて「コドン最適化」を行うことは本発明においても有用であり得る。

[0145] したがって、本発明にかかる遺伝子組換え微生物は、実質的な酵素活性を発現できることを条件に、上記酵素遺伝子の塩基配列と、例えば65%以上、70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、97%以上、98%以上または99%以上の配列同一性を有する塩基配列を含み得る。あるいは、本発明にかかる遺伝子組換え微生物は、上記酵素のアミノ酸配列をコードする塩基配列と、例えば65%以上、70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、97%以上、98%以上または99%以上の配列同一性を有する塩基配列を含み得る。

[0146] 本発明において、上記の生合成酵素遺伝子が「発現カセット」として宿主微生物細胞内に導入されることで、より安定的で高レベルの酵素活性を得ることができる。本明細書において、「発現カセット」とは、発現対象の核酸または発現対象の遺伝子に機能的に結合された転写および翻訳をレギュレートする核酸配列を含むヌクレオチドを意味する。典型的に、本発明の発現カセットは、コード配列から5'上流にプロモーター配列、3'下流にターミネーター配列、場合により更なる通常の調節エレメントを機能的に結合された状態で含み、そのような場合に、発現対象の核酸または発現対象の遺伝子が宿主微生物に導入される。

[0147] 本明細書において、プロモーターとは、構成発現型プロモーターであるか誘導発現型プロモーターであるかに拘わらず、RNAポリメラーゼをDNAに結合させ、RNA合成を開始させるDNA配列と定義される。強いプロモーターとはmRNA合成を高頻度で開始させるプロモーターであり、本発明においても好適に使用される。大腸菌ではlac系、trp系、tacまたはtrc系、λファージの主要オペレーター及びプロモーター領域、fdコートタンパク質の制御領域、解糖系酵素（例えば、3-ホスホグリセレート

キナーゼ、グリセルアルデヒド - 3 - リン酸脱水素酵素)、グルタミン酸デカルボキシラーゼA、セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼに対するプロモーター、T7ファージ由来RNAポリメラーゼのプロモーター領域等が利用可能である。コリネ菌 (*Corynebacterium glutamicum*) ではHCE (high-level constitutive expression) プロモーター、cspBプロモーター、sodAプロモーターおよび伸長因子 (EF-Tu) プロモーターなどが利用可能である。

[0148] ターミネーターとしては、T7ターミネーター、rrnBT1T2ターミネーター、lacターミネーターなどが利用可能である。

[0149] プロモーターおよびターミネーター配列のほかに、他の調節エレメントとしては、例えば、選択マーカー、増幅シグナルおよび複製起点などが挙げられる。好適な調節エレメントについては、例えば、"Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185"、Academic Press (1990) に記載されている。

[0150] 本発明で用いる宿主微生物は、当該微生物が本来有する酵素をコードする遺伝子が破壊された微生物であってもよい。当該酵素をコードする遺伝子としては、例えば、乳酸デヒドロゲナーゼをコードするldh遺伝子、アセチルCoAアセチルトランスフェラーゼをコードするatoB遺伝子、およびスクシニルCoAシンセターゼ α サブユニットをコードするsucD遺伝子が挙げられる。このように、宿主微生物が本来有する酵素の遺伝子のうちの一部を破壊した宿主微生物を用いることで、不純物の混入を避け、目的外の反応の進行を抑制することができる。具体的には、乳酸デヒドロゲナーゼをコードするldh遺伝子を破壊することで、不純物である乳酸の生成を低減することができる。アセチルCoAアセチルトランスフェラーゼをコードするatoB遺伝子、およびスクシニルCoAシンセターゼ α サブユニットをコードするsucD遺伝子を破壊することで、アジピン酸の収率を改善する

ことができる。

[0151] 上記で説明した発現カセットは、例えば、プラスミド、ファージ、トランスポゾン、ISエレメント、フォスミド、コスミド、又は線状もしくは環状のDNA等から成るベクターに組み入れて、宿主微生物中に挿入される。プラスミドおよびファージが好ましい。これらのベクターは、宿主微生物中で自律複製されるものでもよいし、また染色体により複製されてもよい。好適なプラスミドは、例えば、大腸菌のpLG338、pACYC184、pBR322、pUC18、pUC19、pKC30、pRep4、pHS1、pKK223-3、pDHE19.2、pHS2、pPLc236、pMBL24、pLG200、pUR290、pIN-111113-B1、λgt11又はpBdC1；桿菌のpUB110、pC194又はpBD214；コリネバクテリウム属のpSA77又はpAJ667などである。バチルス属などの桿菌ではpUB110、pC194またはpBD214などが挙げられる。これらの他にも使用可能なプラスミド等は、“Gene Cloning and DNA analysis 6th edition”、Wiley-Blackwell（2016）に記載されている。ベクターへの発現カセットの導入は、適当な制限酵素による切り出し、クローニング、及びライゲーションを含む慣用の方法によって可能である。各々の発現カセットは、1つのベクター上に配置されてもよく、2つまたはそれ以上のベクターに配置されてもよい。

[0152] 上記のようにして本発明の発現カセットを有するベクターが構築された後、該ベクターを宿主微生物に導入する際に適用できる手法は慣用の方法を用いることができる。例えば、塩化カルシウム法、エレクトロポレーション法、接合伝達法、プロトプラスト融合法などが挙げられるが、これらに限定されず、宿主微生物に好適な方法が選択可能である。

[0153] 本発明の別の側面は、前記組換え微生物を用いた、目的化合物の製造方法に関する。より具体的には、前記組換え微生物を培養する培養工程を含む、目的化合物の製造方法に関する。

- [0154] ここで、目的化合物は、アジピン酸、アジピン酸誘導体、ヘキサメチレンジアミン、1, 6-ヘキサンジオールおよび6-アミノ-1-ヘキサノールからなる群より選択される。アジピン酸誘導体としては、上記のとおり、例えば、3-オキソアジピン酸(3-OA)、レブリン酸(LEV)、3-ヒドロキシアジピン酸(3HA)および2, 3-デヒドロアジピン酸(23DA)が挙げられる。
- [0155] 一態様において、本発明にかかる組換え微生物は、アジピン酸生産経路を有する。この場合、本発明は、当該組換え微生物を培養する培養工程を含む、アジピン酸の製造方法にも関する。
- [0156] 一態様において、本発明にかかる組換え微生物は、ヘキサメチレンジアミン生産経路を有する。この場合、本発明は、当該組換え微生物を培養する培養工程を含む、ヘキサメチレンジアミンの製造方法にも関する。
- [0157] 一態様において、本発明にかかる組換え微生物は、1, 6-ヘキサンジオール生産経路を有する。この場合、本発明は、当該組換え微生物を培養する培養工程を含む、1, 6-ヘキサンジオールの製造方法にも関する。
- [0158] 一態様において、本発明にかかる組換え微生物は、6-アミノ-1-ヘキサノール生産経路を有する。この場合、本発明は、当該組換え微生物を培養する培養工程を含む、6-アミノ-1-ヘキサノールの製造方法にも関する。
- [0159] 培養工程では、組換え微生物を、炭素源および窒素源を含有する培地で培養することによって、菌体を含む培養物が得られる。本発明の遺伝子組換え微生物は、アジピン酸生産、ならびに、微生物の生育および維持に適した条件下で培養され、好適な培地組成、培養時間および培養条件は当業者により容易に設定できる。
- [0160] 炭素源は、D-グルコース、スクロース、ラクトース、フルクトース、マルトース、オリゴ糖、多糖、でんぷん、セルロース、米ぬか、廃糖蜜、油脂(例えば大豆油、ヒマワリ油、ピーナッツ油、ヤシ油など)、脂肪酸(例えばパルミチン酸、リノール酸、オレイン酸、リノレン酸など)、アルコール

(例えばグリセロール、エタノールなど)、有機酸(例えば酢酸、乳酸、コハク酸など)、トウモロコシ分解液、セルロース分解液、二酸化炭素、一酸化炭素などが挙げられる。好ましくは、D-グルコース、スクロースまたはグリセロールである。これらの炭素源は、個別にあるいは混合物として使用することが出来る。

[0161] バイオマス由来の原料を用いて製造されたアジピン酸は、ISO 16620-2またはASTM D 6866に規定されるCarbon-14(放射性炭素)分析に基づくバイオベース炭素含有率の測定により、例えば石油、天然ガス、石炭などを由来とする合成原料と明確に区別することができる。

[0162] 窒素源は、含窒素有機化合物(例えば、ペプトン、カザミノ酸、トリプトン、酵母抽出物、肉抽出物、麦芽抽出物、コーンステープリカー、大豆粉、アミノ酸および尿素など)、または無機化合物(例えば、アンモニア水溶液、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、硝酸ナトリウム、硝酸アンモニウムなど)が挙げられる。これらの窒素源は、個別にあるいは混合物として使用することが出来る。

[0163] また、培地は、組換え微生物が有用な付加的形質を発現する場合、例えば抗生物質への耐性マーカーを有する場合、対応する抗生物質を含んでよい。それにより、培養時の雑菌による汚染リスクが低減される。抗生物質としては、アンピシリンなどのβ-ラクタム系抗生物質、カナマイシンなどのアミノグリコシド系抗生物質、エリスロマイシンなどのマクロライド系抗生物質、テトラサイクリン系抗生物質、クロラムフェニコールなどが挙げられるが、これらに限定されない。

[0164] 培養は、バッチ式であっても連続式であってもよい。また、いずれの場合にも、培養の適切な時点で追加の前記炭素源等を補給する形式であってもよい。更に、培養は、好適な温度、酸素濃度、pH等の条件を制御しながら培養されてもよい。一般的な微生物宿主細胞に由来する形質転換体の好適な培養温度は、通常15℃~45℃、好ましくは25℃~37℃の範囲である。宿主微生物が好気性の場合、発酵中の適切な酸素濃度を確保するために振盪

(フラスコ培養等)、攪拌／通気(ジャー・ファーメンター培養等)を行ってもよい。それらの培養条件は、当業者にとって容易に設定可能である。

[0165] 本発明にかかる目的化合物の製造方法は、培養物から生産化合物を分離精製する分離精製工程を含んでもよい。当該工程では、任意の手法を、例えば、遠心分離、膜ろ過、膜分離、晶析、抽出、蒸留、吸着、相分離および各種のクロマトグラフィーといった手法を用いることができるが、これらに限定されない。分離精製工程は、一種類の工程からなっても良く、また複数の工程の組み合わせからなってもよい。

[0166] 以上の説明を与えられた当業者は、本発明を十分に実施できる。以下、更なる説明の目的として実施例を与え、従って、本発明は当該実施例に限定されるものではない。

実施例

[0167] <1>発明A

以下、本発明Aを実施例に基づいて説明するが、本発明Aはこれらの実施例に限定されるものではない。

[0168] 実施例で用いた試料のアミノ酸配列および塩基配列を、図2～15に示す。

[0169] <C6化合物生産経路酵素遺伝子発現プラスミドの構築>

PCR断片の増幅にはPrimeSTAR Max DNA Polymerase (製品名、タカラバイオ製)、または、KOD FX Neo (製品名、東洋紡製)、プラスミドの調製には大腸菌JM109株を用いた。塩基配列の最適化には、GeneArt GeneOptimizer (ソフトウェア名、サーモフィッシャーサイエンティフィック社)、または、ユーロフィンジェノミクス社の人工遺伝子合成サービスを用いた。

[0170] *Escherichia coli*のPaaJ (Ec) (配列番号1) をコードするポリヌクレオチドは、*Escherichia coli* W3110株 (NBRC12713) ゲノムDNAからクローニングを行って取得した。配列番号34および35のオリゴヌクレオチドをプライマーと

してPCRを行い、*paaJ* (*Ec*) 遺伝子のコード領域 (配列番号33) を含むPCR産物を得た。次に、*pRSFDuet-1* (製品名、Merck社製) を鋳型として、配列番号36および37のオリゴヌクレオチドをプライマーとしてPCRを行い、*pRSFDuet-1* 断片を得た。*paaJ* (*Ec*) 遺伝子コード領域を含むDNA断片と*pRSFDuet-1* 断片とを、*In-Fusion* (登録商標。以下、省略。) *HD cloning kit* (製品名、Clontech社製) を用いて接続した。大腸菌JM109株に形質転換し、得られた形質転換体からプラスミドを抽出した。*PaaJ* (*Ec*) 発現プラスミドとして「*paaJ* (*Ec*) -*pRSFDuet*」を得た。

[0171] *Escherichia coli* の *PaaH* (*Ec*) (配列番号2) をコードするポリヌクレオチドは、*Escherichia coli* W3110株 (NBRC12713) のゲノムDNAからクローニングを行って取得した。配列番号39および40のオリゴヌクレオチドをプライマーとしてPCRを行い、*paaH* (*Ec*) 遺伝子のコード領域 (配列番号38) を含むPCR産物を得た。次に、「*paaJ* (*Ec*) -*pRSFDuet*」を鋳型とし、配列番号41および42のオリゴヌクレオチドをプライマーとしてPCRを行い、「*paaJ* (*Ec*) -*pRSFDuet*」断片を得た。*paaH* (*Ec*) 遺伝子コード領域を含むDNA断片と「*paaJ* (*Ec*) -*pRSFDuet*」断片とを、*In-Fusion HD cloning kit* (製品名、Clontech社製) を用いて接続した。大腸菌JM109株に形質転換し、得られた形質転換体より、プラスミドを抽出した。*PaaJ* (*Ec*)、*PaaH* (*Ec*) 共発現プラスミドとして「*paaJ* (*Ec*) -*paaH* (*Ec*) -*pRSFDuet*」を得た。

[0172] *Escherichia coli* の *PaaF* (*Ec*) (配列番号3) をコードするポリヌクレオチドは、*Escherichia coli* W3110株 (NBRC12713) ゲノムDNAからクローニングを行って取得した。配列番号44および45のオリゴヌクレオチドをプライマーと

してPCRを行い、p a a F (E c) 遺伝子のコード領域（配列番号43）を含むPCR産物を得た。配列番号4に示すヌクレオチドおよび配列番号46に示すヌクレオチドをプライマーとして使用し、L3株の染色体DNAを鋳型としたPCR増幅物の塩基配列にコードされるL3株のP a a F (L 3) をコードするヌクレオチドは、大腸菌発現用に塩基配列の最適化を行い、ユーロフィンジェノミクス社の人工遺伝子合成サービスを利用して取得した。配列番号47および48のオリゴヌクレオチドをプライマーとしてPCRを行い、p a a F (L 3) 遺伝子のコード領域の最適化配列を含むPCR産物を得た。p E T D u e t - 1（製品名、M e r c k 社製）を鋳型として、配列番号49および50のオリゴヌクレオチドをプライマーとしてPCRを行い、p E T D u e t - 1断片を得た。p a a F (E c)、p a a F (L 3) それぞれのコード領域を含むDNA断片とp E T D u e t - 1断片とを、I n - F u s i o n H D c l o n i n g k i t（製品名、C l o n t e c h 社製）を用いて接続した。大腸菌J M 1 0 9株に形質転換し、得られた形質転換体からプラスミドを抽出した。P a a F (E c) 発現プラスミドとして「p a a F (E c) - p E T D u e t」を、P a a F (L 3) 発現プラスミドとして「p a a F (L 3) - p E T D u e t」を得た。

[0173] A c i n e t o b a c t e r b a y l y i の d c a A (A b)（配列番号5）をコードするポリヌクレオチドは、大腸菌発現用に塩基配列の最適化を行い、ユーロフィンジェノミクス社の人工遺伝子合成サービスを利用して取得した。配列番号52および53のオリゴヌクレオチドをプライマーとしてPCRを行い、d c a A (A b) 遺伝子のコード領域（配列番号51）を含むPCR産物を得た。「p a a F (E c) - p E T D u e t」を鋳型とし、配列番号84および85のオリゴヌクレオチドをプライマーとしてPCRを行い、「p a a F (E c) - p E T D u e t」断片を得た。d c a A (A b) 遺伝子のコード領域を含むDNA断片と、「p a a F (E c) - p E T D u e t」断片とをI n - F u s i o n H D c l o n i n g k i t（製品名、C l o n t e c h 社製）を用いて接続した。大腸菌J M 1 0 9株に

形質転換し、得られた形質転換体より、プラスミドを抽出した。P a a F (E c)、D c a A (A b) 共発現プラスミドとして「p a a F (E c) - d c a A (A b) - p E T D u e t」を得た。

[0174] *Candida tropicalis* の T e r (C t) (配列番号 6) は、N 末端領域を 22 残基分除去した配列 (配列番号 7) としてクローニングされた。コードするポリヌクレオチドは、大腸菌発現用に塩基配列の最適化を行い、ユーロフィンジェノミクス社の人工遺伝子合成サービスを利用して取得した。配列番号 55 および 56 のオリゴヌクレオチドをプライマーとして P C R を行い、t e r (C t) 遺伝子のコード領域 (配列番号 54) を含む P C R 産物を得た。「p a a F (L 3) - p E T D u e t」を鋳型とし、配列番号 84 および 85 のオリゴヌクレオチドをプライマーとして P C R を行い、「p a a F (L 3) - p E T D u e t」断片を得た。t e r (C t) 遺伝子のコード領域を含む DNA 断片と、「p a a F (L 3) - p E T D u e t」断片とを I n - F u s i o n H D c l o n i n g k i t (製品名、C l o n t e c h 社製) を用いて接続した。大腸菌 J M 109 株に形質転換し、得られた形質転換体より、プラスミドを抽出した。P a a F (L 3)、T e r (C t) 共発現プラスミドとして「p a a F (L 3) - t e r (C t) - p E T D u e t」を得た。

[0175] B L A S T S e a r c h (<https://www.genome.jp/tools/blast/>) B L A S T P を用いて、K E G G G E N E S データベース中から、2, 3 - デヒドロアジピルー C o A レダクターゼの機能を有すると推測されるタンパク質を選択した。選択した候補酵素タンパク質を表 A - 1 に示す。

[0176]

[表A-1]

表A-1 候補2、3-デヒドロアジピルーC o Aレダクターゼタンパク質

酵素	アミノ酸配列 配列番号	由来生物種	アクセッション番号
Ter(caur)	8	<i>Candida auris</i>	XP_028888110
Ter(kmx)	9	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	XP_022677345
Ter(pkz)	10	<i>Pichia kudriavzevii</i>	XP_029321276
Ter(mtm)	11	<i>Thermothelomyces thermophilus</i>	XP_003660060
Ter(ttt)	12	<i>Thermothielavioides terrestris</i>	XP_003651510
Ter(cthr)	13	<i>Chaetomium thermophilum</i>	XP_006691841
Ter(pan)	14	<i>Podospora anserina</i>	XP_001907468
Ter(plj)	15	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	XP_018182887
Ter(pte)	16	<i>Pyrenophora teres</i>	EFQ85170

[0177] 選択した2、3-デヒドロアジピルーC o Aレダクターゼ候補タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、大腸菌発現用に塩基配列の最適化を行い、ユーロフィンジェノミクス社の人工遺伝子合成サービスを利用して取得し、各酵素遺伝子のコード領域を含むDNA断片をPCRによって得た。各酵素遺伝子のコード領域の塩基配列と、PCRに用いたプライマーセットの塩基配列の配列番号を表2に示す。「p a a F (L 3) - p E T D u e t」を鋳型とし、配列番号84および85のオリゴヌクレオチドをプライマーとしてPCRを行い、「p a a F (L 3) - p E T D u e t」断片を得た。各遺伝子のコード領域を含むDNA断片と、「p a a F (L 3) - p E T D u e t」断片とをIn-Fusion HD cloning kit（製品名、Clontech社製）を用いて接続した。大腸菌JM109株に形質転換し、得られた形質転換体より、プラスミドを抽出した。P a a F (L 3) と、各2、3-デヒドロアジピルーC o Aレダクターゼ候補タンパク質の共発現プラスミドを得た。

[0178]

[表A-2]

表A-2：候補2，3-デヒドロアジピルー
C o A レダクターゼ遺伝子塩基配列およびプライマーセット

酵素	コード領域 塩基配列 配列番号	プライマーセット 配列番号
Ter(caur)	57	66,67
Ter(kmx)	58	68,69
Ter(pkz)	59	70,71
Ter(mtm)	60	72,73
Ter(ttt)	61	74,75
Ter(cthr)	62	76,77
Ter(pan)	63	78,79
Ter(plj)	64	80,81
Ter(pte)	65	82,83

[0179] *Mycobacterium abscessus* のカルボン酸レダクターゼ MaCar（配列番号20）は、アミノ酸配列の283番目のトリプトファン残基をアルギニン残基に、303番目のアラニン残基をメチオニン残基に置換した変異体 MaCar（m）として使用した（配列番号22）。MaCar（m）をコードするポリヌクレオチドは、大腸菌発現用に塩基配列の最適化を行い、ユーロフィンジェノミクス社の人工遺伝子合成サービスを利用して取得した。配列番号87および88のオリゴヌクレオチドをプライマーとしてPCRを行い、MaCar（m）遺伝子のコード領域（配列番号86）を含むPCR産物を得た。

[0180] 次に本PCR産物を In-Fusion HD cloning kit（製品名、Clontech社製）を用いて、pACYCDuet-1（製品名、Merck社製）の制限酵素NdeIおよびAvrII切断部位間に挿入した。大腸菌JM109株に形質転換し、得られた形質転換体からプラスミドを抽出した。MaCar（m）発現プラスミドとして「MaCar（m）-pACYCDuet」を得た。

[0181] *Nocardia iowensis* の *Npt* (配列番号 24) をコードするポリヌクレオチドは、*Nocardia iowensis* JCM18299 株 (文部科学省ナショナルバイオリソースプロジェクトを介して理研 BRC から提供された。) のゲノム DNA からクローニングを行って取得した。配列番号 90 および 91 のオリゴヌクレオチドをプライマーとして PCR を行い、*npt* 遺伝子のコード領域 (配列番号 89) を含む PCR 産物を得た。次に、「*MaCar* (m) -*pACYCDuet*」を鋳型とし、配列番号 92 および 93 のオリゴヌクレオチドをプライマーとして PCR を行い、「*Macar* (m) -*pACYCDuet*」断片を得た。PCR 産物同士を *In-Fusion HD cloning kit* (製品名、*Clontech* 社製) を用いて接続した。大腸菌 JM109 株に形質転換し、得られた形質転換体より、プラスミドを抽出した。*MaCar* (m)、*Npt* 共発現プラスミドとして「*Macar* (m) -*npt* -*pACYCDuet*」を得た。

[0182] *Escherichia coli* の *Ahr* (配列番号 32) をコードするポリヌクレオチドは、*Escherichia coli* W3110 株 (NBRC12713) ゲノム DNA からクローニングを行って取得した。配列番号 95 および 96 のオリゴヌクレオチドをプライマーとして PCR を行い、*ahr* 遺伝子 (配列番号 94) のコード領域を含む PCR 産物を得た。次に「*Macar* (m) -*npt* -*pACYCDuet*」を鋳型とし、配列番号 97 および 98 のオリゴヌクレオチドをプライマーとして PCR を行い、「*macar* (m) -*npt* -*pACYCDuet*」断片を得た。各遺伝子のコード領域を含む PCR 産物と「*macar* (m) -*npt* -*pACYCDuet*」断片とを *In-Fusion HD cloning kit* (製品名、*Clontech* 社製) を用いて接続した。大腸菌 JM109 株に形質転換し、得られた形質転換体より、プラスミドを抽出した。*Ahr*、*MaCar*、*Npt* 共発現プラスミドとして「*ahr* -*macar* (m) -*npt* -*pACYCDuet*」をそれぞれ得た。

[0183] <C 6 化合物生産菌株の構築>

構築したプラスミドを大腸菌 B L 2 1 (D E 3) 株コンピテントセル（ニッポンジーン社製）に形質転換し、アンピシリンナトリウム 5 0 m g / L、カナマイシン硫酸塩 3 0 m g / L、（菌株 H D O 1 の構築はさらにクロラムフェニコール 3 0 m g / L）を含む L B 寒天培地（トリプトン 1 0 g / L、酵母エキス 5 g / L、塩化ナトリウム 5 g / L、寒天末 1 5 g / L）に塗布し、3 7 °C で 2 4 時間インキュベートして形質転換体のシングルコロニーを得た。取得した形質転換体を表 A - 3 に示す。

[0184] [表A-3]

表 A - 3 : 形質転換体

形質転換体	プラスミド①	プラスミド②	プラスミド③
ADA1	paaJ(Ec)-paaH(Ec)-pRSFDuet	paaF(Ec)-dcaA(Ab)-pETDuet	-
ADA2	paaJ(Ec)-paaH(Ec)-pRSFDuet	paaF(L3)-ter(Ct)-pETDuet	-
ADA3	paaJ(Ec)-paaH(Ec)-pRSFDuet	paaF(L3)-ter(caur)-pETDuet	-
ADA4	paaJ(Ec)-paaH(Ec)-pRSFDuet	paaF(L3)-ter(kmx)-pETDuet	-
ADA5	paaJ(Ec)-paaH(Ec)-pRSFDuet	paaF(L3)-ter(pkz)-pETDuet	-
ADA6	paaJ(Ec)-paaH(Ec)-pRSFDuet	paaF(L3)-ter(mtm)-pETDuet	-
ADA7	paaJ(Ec)-paaH(Ec)-pRSFDuet	paaF(L3)-ter(ttt)-pETDuet	-
ADA8	paaJ(Ec)-paaH(Ec)-pRSFDuet	paaF(L3)-ter(cthr)-pETDuet	-
ADA9	paaJ(Ec)-paaH(Ec)-pRSFDuet	paaF(L3)-ter(pan)-pETDuet	-
ADA10	paaJ(Ec)-paaH(Ec)-pRSFDuet	paaF(L3)-ter(plj)-pETDuet	-
ADA11	paaJ(Ec)-paaH(Ec)-pRSFDuet	paaF(L3)-ter(pte)-pETDuet	-
HDO1	paaJ(Ec)-paaH(Ec)-pRSFDuet	paaF(L3)-ter(mtm)-pETDuet	ahr-macar(m)-npt-pACYCDuet

[0185] <組換え大腸菌培養によるアジピン酸生産試験>

形質転換体 A D A 1 ~ 1 1 を、アンピシリンナトリウム 5 0 m g / L、カナマイシン硫酸塩 3 0 m g / L を含む L B 液体培地（トリプトン 1 0 g / L、酵母エキス 5 g / L、塩化ナトリウム 5 g / L）2 m L（1 4 m L 容ラウンドボトムチューブ）に一白金耳植菌し、3 7 °C で 2 4 時間振盪培養を行い、前培養液を得た。得られた前培養液 1 0 μ L を、アンピシリンナトリウム 5 0 m g / L、カナマイシン硫酸塩 3 0 m g / L を含む MM 培地 1 m L（9 6 穴ディープウェルプレート）に植菌し、3 7 °C で 4 8 時間振盪培養を行っ

た。MM培地の組成を表A-4に示す。

[0186] [表A-4]

表A-4 : MM培地組成

KH_2PO_4	3 g/L
K_2HPO_4	6 g/L
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2.5 g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.3 g/L
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1 mg/L
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	6 mg/L
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1.5 mg/L
$\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.5 mg/L
CoCl_2	0.6 mg/L
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.3 mg/L
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.3 mg/L
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.2 mg/L
H_3BO_3	0.1 mg/L
MOPS (KOHでpH7.4に調整)	125 mM
Glycerol	20 g/L

[0187] 培養終了後、培養液中のアジピン酸濃度を分析した。分析は、トリメチルシリル誘導体化を用いたGC/MS分析によって行った。培養液遠心上清40 μL (内部標準としてセバシン酸二ナトリウムを終濃度10 mMとなるように添加) に水：メタノール：クロロホルム＝5：2：2 (v/v/v) となるように混合された抽出液を360 μL 添加し、ボルテックスミキサーでよく攪拌した。遠心分離 (16,000 $\times g$ 、5分) 後、上清40 μL を別のマイクロチューブに採取し、遠心エバポレータで1時間遠心乾固した。得られた乾固物にメトキシアミン塩酸塩20 mg/mLピリジン溶液100 μL を添加し、30℃で90分振盪した。N-メチル-N-トリメチルシリルトリフルオロアセトアミド50 μL を添加し、37℃で30分振盪した。反応溶液をGC/MS測定試料とし、下記の条件で分析を行った。

[0188] GC/MS分析条件

装置：GCMS-QP-2020NX (島津製作所製)

カラム：フューズドシリカキャピラリーチューブ 不活性処理チューブ (長さ1 m、外径0.35 mm、内径0.25 mm、GLサイエンス社製)、InertCap 5MS/NP (長さ30 m、内径0.25 mm、膜厚0.

25 μ m、GLサイエンス社製)

試料注入量：1 μ L

試料導入法：スプリット（スプリット比25：1）

気化室温度：230℃

キャリアガス：ヘリウム

キャリアガス線速度：39.0 cm/秒

オープン温度：80℃、2分保持→15℃/分昇温→325℃、13分保持

イオン化法：電子イオン化法（EI）

イオン化エネルギー：70 eV

イオン源温度：230℃

スキャン範囲：m/z = 50～500

[0189] 結果を表A-5に示す。形質転換体ADA1～ADA11は、図1のステップA、B、C、Dの反応を進行させ得る酵素遺伝子の発現プラスミドを導入した形質転換体である。ステップEの反応は、大腸菌の内因性酵素によって進行する。

[0190] 大腸菌由来のPaaJ (Ec)、PaaH (Ec)、PaaF (Ec)、及びAcinetobacter baylyi由来のdcaA (Ab)を発現させた形質転換体ADA1の培養（比較例1）では、アジピン酸が0.14 g/L生成した。大腸菌由来のPaaJ (Ec)、PaaH (Ec)、L3株由来のPaaF (L3)、及びCandida tropicalisのTer (Ct)を発現させた形質転換体ADA2の培養（比較例2）では、アジピン酸が0.33 g/L生成した。

[0191] 大腸菌由来のPaaJ (Ec)、PaaH (Ec)、L3株由来のPaaF (L3)、図1のステップDの反応を触媒させる酵素として、Ter (caur)、Ter (kmx)、Ter (pkz)、Ter (mtm)、Ter (ttt)、Ter (cthr)、Ter (pan)、Ter (plj)、またはTer (pte)を発現させた形質転換体ADA3～ADA11の培養（実施例1～9）では、それぞれアジピン酸を生成し、Ter (cau

r)、Ter(kmx)、Ter(pkz)、Ter(mtm)、Ter(ttt)、Ter(cthr)、Ter(pan)、Ter(plj)、またはTer(pte)が、アジピン酸生産経路反応を進行させる酵素活性を有することが示された。

[0192] また、形質転換体ADA6（実施例4）、ADA7（実施例5）、ADA8（実施例6）、ADA9（実施例7）およびADA11（実施例9）の培養では、比較例を上回るアジピン酸を生成し、酵素Ter(mtm)、Ter(ttt)、Ter(cthr)、Ter(pan)、またはTer(pte)を発現させることによりC6化合物生成量が向上したことが示された。また、これらの結果から、実施例として示される微生物では、良好な2, 3-デヒドロアジピルーCoA還元酵素活性を示すことがわかる。

[0193] [表A-5]

表A-5：アジピン酸生産試験結果

	菌株	ステップA (3-オキシアジピルーCoAチオラーゼ)	ステップB (3-ヒドロキシアジピルーCoAチトログナーゼ)	ステップC (3-ヒドロキシアジピルーCoAチトログナーゼ)	ステップD (2,3-デヒドロアジピルーCoAレダクターゼ)	アジピン酸濃度 [g/L]
比較例1	ADA1	PaaJ(Ec)	PaaH(Ec)	PaaF(Ec)	DcaA(Ab)	0.14
比較例2	ADA2	PaaJ(Ec)	PaaH(Ec)	PaaF(L3)	Ter(Ct)	0.33
実施例1	ADA3	PaaJ(Ec)	PaaH(Ec)	PaaF(L3)	Ter(caur)	0.18
実施例2	ADA4	PaaJ(Ec)	PaaH(Ec)	PaaF(L3)	Ter(kmx)	0.19
実施例3	ADA5	PaaJ(Ec)	PaaH(Ec)	PaaF(L3)	Ter(pkz)	0.10
実施例4	ADA6	PaaJ(Ec)	PaaH(Ec)	PaaF(L3)	Ter(mtm)	1.32
実施例5	ADA7	PaaJ(Ec)	PaaH(Ec)	PaaF(L3)	Ter(ttt)	0.94
実施例6	ADA8	PaaJ(Ec)	PaaH(Ec)	PaaF(L3)	Ter(cthr)	1.27
実施例7	ADA9	PaaJ(Ec)	PaaH(Ec)	PaaF(L3)	Ter(pan)	0.84
実施例8	ADA10	PaaJ(Ec)	PaaH(Ec)	PaaF(L3)	Ter(plj)	0.16
実施例9	ADA11	PaaJ(Ec)	PaaH(Ec)	PaaF(L3)	Ter(pte)	0.76

[0194] <組換え大腸菌培養による1, 6-ヘキサジオールおよび6-ヒドロキシヘキサン酸生産試験>

形質転換体HDO1を、アンピシリンナトリウム50mg/L、カナマイシン硫酸塩30mg/L、クロラムフェニコール30mg/Lを含むLB液体培地2mL（14mL容ラウンドボトムチューブ）に一白金耳植菌し、37℃で24時間振盪培養を行い、前培養液を得た。得られた前培養液10μLをアンピシリンナトリウム50mg/L、カナマイシン硫酸塩30mg/L

L、クロラムフェニコール 30 mg/L を含む MM 培地 1 mL (96 穴ディープウェルプレート) に植菌し、37℃で48時間振盪培養を行った。

[0195] 培養終了後、培養液中の 1, 6-ヘキサンジオール濃度、6-ヒドロキシヘキサン酸濃度を分析した。6-ヒドロキシヘキサン酸濃度は GC/MS を用いてアジピン酸濃度分析と同様の条件で分析した。1, 6-ヘキサンジオール濃度の分析は、高速液体クロマトグラフ Prominence システム (島津製作所製) を用いて下記の条件で行った。

[0196] 高速液体クロマトグラフ (HPLC) 分析条件

検出器：示差屈折率検出器

カラム：Shim-pack Fast-OA (G)、Fast-OA (島津製作所製)

オーブン温度：40℃

移動相：8 mM メタンスルホン酸水溶液

流速：0.6 mL/min

注入量：10 μL

[0197] 結果を表 A-6 に示す。形質転換体 HD01 は、図 1 のステップ A、B、C、D の反応を進行させ得る酵素遺伝子の発現プラスミドに加え、カルボン酸レダクターゼ、アルコールデヒドロゲナーゼの発現プラスミドを導入した形質転換体である。形質転換体 HD01 の培養 (実施例 10) では、6-ヒドロキシヘキサン酸および 1, 6-ヘキサンジオールを生成した。

[0198]

[表A-6]

表A-6 : 6-ヒドロキシヘキサノ酸および1, 6-ヘキサジオールの生産試験結果

	菌株	ステップA (3-オキシアラビノ酸 誘導体)	ステップB (3-ヒドロキシアラビノ酸 誘導体)	ステップC (3-ヒドロキシアラビノ酸 誘導体)	ステップD (2,3-アセトアセリルCoA 誘導体)	カルボン酸 レダクターゼ	アルコール デヒドロゲナーゼ	1,6-ヘキサジオール 濃度(mg/L)	6-ヒドロキシヘキサノ酸 濃度(mg/L)
実施例10	HDO1	Paal(Ec)	Paal(Ec)	Paal(L3)	Ter(mtm)	MeCat(m)	Ahr	56	3

[0199] <遺伝子破壊用プラスミドの構築>

大腸菌の遺伝子の破壊・挿入には、pHAK1（受領番号NITE P-02919として、独立行政法人製品評価技術基盤機構 バイオテクノロジーセンター 特許微生物寄託センター（NPMD）（住所：千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 122号室）に2019年3月18日に寄託した。国際寄託番号：NITE BP-02919）を用いた相同組換え法により行った。pHAK1は温度感受性変異型repA遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、Bacillus subtilis由来レバンスクラゼ遺伝子sacBを含む。レバンスクラゼ遺伝子は、スクロース存在下において宿主微生物に対して致死的に作用する。PCR断片の増幅にはPrimeSTAR Max DNA Polymerase（製品名、タカラバイオ製）、または、KOD FX Neo（製品名、東洋紡製）、プラスミド調製は大腸菌HST08株を用いて行った。

[0200] 大腸菌BL21（DE3）株のゲノムDNAを鋳型とし、破壊標的遺伝子の5' 相同領域、コード領域、および3' 相同領域を含むPCR産物を得た。標的遺伝子とプライマー配列の組み合わせを下記表A-7に示した。

[0201] [表A-7]

表A-7：プラスミド構築に用いたプライマーセット

遺伝子名	配列番号
atoB	99,100
sucD	101,102
ldhA	103,104
adhE	105,106
yqhD, dkgA	107,108
yahK	109,110
ahr	111,112
pflB	113,114

[0202] 次に本PCR産物をIn-Fusion HD cloning kit（製品名、Clontech社製）を用いて、配列番号115及び116のプライマーを用いて増幅したpHAK1プラスミド断片に挿入し、環状化した。大腸菌HST08株に形質転換し、得られた形質転換体からプラスミド

を抽出した。

[0203] 上記で抽出した、破壊標的遺伝子の5' 相同領域、コード領域、および3' 相同領域のDNA断片が挿入されたpHAK1プラスミドを鋳型として、下記表A-8に記載するプライマーを用いてPCRを行い、破壊標的遺伝子のコード領域の一部領域または全領域が除かれ、5' 相同領域および3' 相同領域を内含するpHAK1プラスミド断片を得た。

[0204] [表A-8]

表A-8：プラスミド構築に用いたプライマーセット

遺伝子名	配列番号
atoB	117,118
sucD	119,120
ldhA	121,122
adhE	123,124
yqhD, dkgA	125,126
yahK	127,128
ahr	129,130
pflB	131,132

[0205] 得られたプラスミド断片を末端リン酸化、セルフライゲーションにより環状化した。大腸菌HST08株に形質転換し、得られた形質転換体からプラスミドを抽出し、遺伝子破壊用プラスミドを得た。

[0206] <ヘキサメチレンジアミン生産経路酵素遺伝子挿入用プラスミドの構築>

*Escherichia coli*のPaaJ (Ec) (配列番号1) をコードするポリヌクレオチド (配列番号33) は、*Escherichia coli* W3110株 (NBRC12713) ゲノムDNAからクローニングを行った。*Escherichia coli*のPaaH (Ec) (配列番号2) をコードするポリヌクレオチド (配列番号38) は、*Escherichia coli* W3110株 (NBRC12713) のゲノムDNAからクローニングを行って取得した。

[0207] paaJ (Ec) およびpaaH (Ec) 遺伝子は、発現カセットとしてpflB遺伝子領域に挿入されるよう、遺伝子挿入用プラスミドを設計した。先に構築したpflB遺伝子破壊用プラスミドに内含されるpflB遺伝

子コード領域の5' 相同領域と3' 相同領域の間に、プロモーター領域（配列番号133）、p a a J（E c）遺伝子コード領域、リンカー配列（配列番号134）、p a a H遺伝子コード領域、ターミネーター領域（配列番号135）の順に配置した発現カセットを組み込んだ。

[0208] 配列番号4に示すヌクレオチドおよび配列番号46に示すヌクレオチドをプライマーとして使用し、L3株の染色体DNAを鋳型としたPCR増幅物の塩基配列にコードされるL3株のP a a F（L3）をコードするヌクレオチドは、大腸菌発現用に塩基配列の最適化を行い、ユーロフィンジェノミクス社の人工遺伝子合成サービスを利用して取得した。配列番号162に示すヌクレオチドおよび配列番号163に示すヌクレオチドをプライマーとして使用し、L3株の染色体DNAを鋳型としたPCR増幅物の塩基配列にコードされるL3株のM m g C（L3）をコードするポリヌクレオチド（1155bp）は、大腸菌発現用に塩基配列の最適化を行い、ユーロフィンジェノミクス社の人工遺伝子合成サービスを利用して取得した。

[0209] p a a F（L3）およびm m g C（L3）遺伝子のコード領域の最適化配列は、発現カセットとしてy a h K遺伝子領域に挿入されるよう、遺伝子挿入用プラスミドを設計した。先に構築したy a h K遺伝子破壊用プラスミドに内含されるy a h K遺伝子コード領域の5' 相同領域と3' 相同領域の間に、プロモーター領域（配列番号136）、p a a F（L3）遺伝子コード領域、リンカー配列（配列番号137）、m m g C（L3）遺伝子コード領域、ターミネーター領域（配列番号138）の順に配置した発現カセットを組み込んだ。

[0210] *Mycobacterium abscessus*のカルボン酸レダクターゼMaC a r（配列番号20）は、アミノ酸配列の283番目のトリプトファン残基をアルギニン残基に、303番目のアラニン残基をメチオニン残基に置換した変異体MaC a r（m）を用いた（配列番号22）。MaC a r（m）をコードするポリヌクレオチド（配列番号86）は、大腸菌発現用に塩基配列の最適化を行い、ユーロフィンジェノミクス社の人工遺伝子合成

サービスを利用して取得した。*Nocardia iowensis*のNpt（配列番号24）をコードするポリヌクレオチド（配列番号89）は、*Nocardia iowensis* JCM18299株（文部科学省ナショナルバイオリソースプロジェクトを介して理研BRCから提供された。）のゲノムDNAからクローニングを行って取得した。

[0211] *macar* (m) および *npt* 遺伝子は、発現カセットとして *ldhA* 遺伝子領域に挿入されるよう、遺伝子挿入用プラスミドを設計した。先に構築した *ldhA* 遺伝子破壊用プラスミドに内含される *ldhA* 遺伝子コード領域の5' 相同領域と3' 相同領域の間に、プロモーター領域（配列番号139）、*macar* (m) 遺伝子コード領域、リンカー配列（配列番号140）、*npt* 遺伝子コード領域、ターミネーター領域（配列番号141）の順に配置した発現カセットを組み込んだ。

[0212] <大腸菌改変株の構築>

エレクトロポレーション法（羊土社 遺伝子工学実験ノート 田村隆明著、参照）により、大腸菌BL21（DE3）株に所望の遺伝子の破壊または挿入のためのプラスミドを形質転換した後、カナマイシン硫酸塩100mg/Lを含有するLB寒天培地（トリプトン10g/L、酵母エキス5g/L、塩化ナトリウム5g/L、寒天末15g/L）に塗布し、30℃で一晩インキュベートしてシングルコロニーを取得し、形質転換体を得た。本形質転換体をカナマイシン硫酸塩100mg/Lを含有するLB液体培地（トリプトン10g/L、酵母エキス5g/L、塩化ナトリウム5g/L）1mLに一白金耳植菌し、30℃で振盪培養を行った。得られた培養液を、カナマイシン硫酸塩100mg/Lを含有するLB寒天培地に塗布し、42℃で一晩インキュベートし、コロニーを取得した。得られたコロニーをLB液体培地1mLに一白金耳植菌し、30℃で振盪培養を行った。得られた培養液を、スクロース20%を含有するLB寒天培地に塗布し、30℃で2日間インキュベートした。得られたコロニーについて、所望の遺伝子が破壊または挿入されていることを、表A-9に示すプライマーセットを用いたコロニーダイ

レクトPCRにより確認した。

[0213] 以上の操作を繰り返し、表A-10に示す、複数の遺伝子破壊および遺伝子挿入を含む大腸菌株「No. 060」を構築した。表中、 Δ は該酵素遺伝子が欠損していることを示し、「遺伝子名A::遺伝子名B」は、遺伝子A領域が遺伝子Bを含む領域に置換されていることを示す。

[0214] [表A-9]

表A-9：破壊・挿入標的確認用プライマーセット

遺伝子名	配列番号
atoB	142,143
sucD	144,145
ldhA	146,147
adhE	148,149
yqhD, dkgA	150,151
yahK	152,153
ahr	154,155
pflB	156,157

[0215] [表A-10]

表A-10：大腸菌改変株

菌株No.	遺伝子破壊・挿入
No.060	Δ atoB, Δ sucD, Δ ldhA, Δ adhE, Δ yqhD, Δ dkgA, Δ yahK, Δ ahr, Δ pflB pflB::paaJ(Ec)-paaH(Ec) yahK::paaF(L3)-mmgC(L3) ldhA::macar(m)-npt

[0216] <ヘキサメチレンジアミン生産経路酵素遺伝子発現プラスミドの構築>

PCR断片の増幅にはPrimeSTAR Max DNA Polymerase（製品名、タカラバイオ製）、または、KOD FX Neo（製品名、東洋紡製）、プラスミドの調製には大腸菌JM109株を用いた。

[0217] *Escherichia coli*のYgjG（配列番号27）は、一部のアミノ酸配列を置換した変異型YgjG(m)（配列番号158）を用いた。YgjG(m)をコードするポリヌクレオチドは、配列番号160および161のオリゴヌクレオチドをプライマーとしてPCRを行い、ygyG(m)遺伝子（配列番号159）のコード領域を含むPCR産物を得た。次に本PCR産物をIn-Fusion HD cloning kit（

製品名、C l o n t e c h社製）を用いて、p A C Y C D u e t - 1（製品名、M e r c k社製）の制限酵素N c o IおよびH i n d I I I切断部位間に挿入した。大腸菌J M 1 0 9株に形質転換し、得られた形質転換体からプラスミドを抽出した。M a C a r (m) 発現プラスミドとして「y g j G (m) - p A C Y C D u e t」を得た。

[0218] <組換え大腸菌培養によるヘキサメチレンジアミン生産試験>

エレクトロポレーション法により、大腸菌改変株No. 060に「p a a F (L 3) - t e r (m t m) - p E T D u e t」および「y g j G (m) - p A C Y C D u e t」を形質転換し、アンピシリンナトリウム50mg/L、クロラムフェニコール30mg/Lを含むLB寒天培地上で、37℃、一日間培養して、コロニーを形成させ、形質転換体HMD1を得た。アンピシリンナトリウム50mg/L、クロラムフェニコール30mg/Lを含むLB液体培地2mL（14mL容ラウンドボトムチューブ）に形質転換体HMD1のコロニーを一白金耳植菌し、37℃、3～5時間振盪培養を行い、前培養液を得た。250mL容のJ a r培養装置（機種名 バイオJ r. 8、バイオット社製）に、カルベニシリンナトリウム50mg/L、クロラムフェニコール30mg/L、IPTG 0.02mMを含む合成培地（下表）に前培養液0.5mLを添加し、本培養を行った。培養条件は次の通り；培養温度 37℃；培養pH 7.0；pH調整 10%（w/v）アンモニア水；攪拌 750rpm；通気 1vvm。前培養液植菌から22時間経過時点でグルコースを終濃度35g/Lとなるよう追添し、41時間経過まで培養した。

[0219]

[表A-11]

表 A - 1 1 : 合成培地組成

KH_2PO_4	3 g/L
K_2HPO_4	6 g/L
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2.5 g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.3 g/L
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1 mg/L
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	6 mg/L
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1.5 mg/L
$\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.5 mg/L
CoCl_2	0.6 mg/L
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.3 mg/L
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.3 mg/L
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.2 mg/L
H_3BO_3	0.1 mg/L
MOPS (KOHでpH7.4に調整)	125 mM
Glucose	20 g/L

[0220] 培養終了後、培養液を遠心分離により菌体と上清に分離し、上清中のヘキサメチレンジアミン濃度を分析した。ヘキサメチレンジアミン濃度の分析はイオンクロマトグラフを用いて下記の条件で行った。

[0221] イオンクロマトグラフ分析条件

装置：ICS-3000 (Dionex社製)

検出器：電気伝導度検出器

カラム：IonPac CG19 (2×50mm) / CS19 (2×250mm) (Thermo Scientific社製)

オーブン温度：30℃

移動相：8mMメタンスルホン酸水溶液 (A)、70mMメタンスルホン酸水溶液 (B)

グラジエント条件：(A：100%、B：0%) - (10min) - (A：0%、B：100%) - (1min保持)

流速：0.28mL/min

注入量：20μL

[0222] 結果を表A-12に示す。形質転換体HMD1は、図1のステップA、B、C、Dの反応を進行させ得る酵素遺伝子に加え、カルボン酸レダクターゼ、アミノトランスフェラーゼ遺伝子を導入した形質転換体である。形質転換

体HMD 1 の培養（実施例 1 1）でヘキサメチレンジアミンを生成した。

[0223]

[表A-12]

表A-12：ヘキサメチレンジアミン生産菌株の培養結果

	形質 菌株名	ステップA (3-オキシベンゾイルCoA チオエステラーゼ)	ステップB (3-ヒドロキシベンゾイルCoA チオエステラーゼ)	ステップC (3-ヒドロキシベンゾイルCoA チオエステラーゼ)	ステップD (2,3-二ヒドロキシベンゾイルCoA レダクターゼ)	カルボン酸 レダクターゼ	アミノトランスフェラーゼ	ヘキサメチレンジアミン 濃度[mg/L]
実施例11	HMD1	PaaJ(Ec)	PaaH(Ec)	PaaF(L3)	Ter(mtm)	MaCar(m)	YglG(m)	16

[0224] <2>発明B

以下、本発明Bを実施例に基づいて説明するが、本発明Bはこれらの実施例に限定されるものではない。

[0225] <バークホルデリア属 (*Burkholderia* sp.) LEBP-3株の単離と同定>

日本国内の活性汚泥より、アジピン酸を唯一の炭素源及びエネルギー源とする培地を用いて、バークホルデリア属 (*Burkholderia* sp.) LEBP-3株を分離した。バークホルデリア属 (*Burkholderia* sp.) LEBP-3株は、独立行政法人製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センター (NPMD) (住所：千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 122号室) に2020年12月4日 (原寄託日) 付けで寄託申請し (受領番号：NITE ABP-03334)、「受託番号：NITE BP-03334」として国際寄託されている。*Burkholderia* sp. LEBP-3株の分類性状は以下に示す通りである。

[0226] <LEBP-3株の菌学的諸性質>

培養温度：37℃、

細胞形態：桿菌 (0.7 × 1.7-3.0 μm)、

グラム染色性：-、

芽胞の有無：-、

運動性：+、

LB寒天培地48h培養時のコロニー形態：直径1.9~2.5mm、淡黄色、円形、

レンズ状、全縁、平滑、不透明、バター様、

30℃生育：+、

45℃生育：+、

カタラーゼ反応：+、

オキシダーゼ反応：+、

グルコースからの酸/ガス産生：+/-、

O/Fテスト（酸化／発酵）：＋／－、

硝酸塩還元性：－、

インドール産生性：－、

ブドウ糖酸性化性：－、

ウレアーゼ：持たない、

エスクリン分解性：＋、

ブドウ糖、L－アラビノース、D－マンノース、N－アセチル－D－グルコサミン、グルコン酸、n－カプリン酸、アジピン酸、リンゴ酸、クエン酸および酢酸フェニル：資化できる、

マルトース：資化できない。

[0227] <LEBP-3株の16S rRNA遺伝子配列相同性による系統解析>

16S rDNA遺伝子の塩基配列解析を行うことにより同定を行った。16S rDNA遺伝子の塩基配列をPCRにて増幅し、シーケンス解析を行った。BLAST相同性検索のデータベースはDB-BANK（テクノスルガ・ラボ社）および国際塩基配列データベースを使用した。その結果、LEBP-3株はBurkholderia属で構成されるクラスター内に含まれたが、何れの既知種とも異なる分子系統学的位置を示したことから、種名の同定に至らなかった。

[0228] <PCR増幅による酵素遺伝子の取得と相同性評価>

Burkholderia sp. LEBP-3株の全ゲノムドラフト解析を実施した。LEBP-3株を2mLのLB培地（トリプトン10g/L、酵母エキス5g/L、塩化ナトリウム10g/L）で37℃振とう培養を実施した。培養終了後、培養液から菌体を回収し、Nucleo Spin Tissue（製品名、MACHEREY-NAGEL社製）を使用してゲノムDNAを抽出した。Burkholderia sp. LEBP-3株の全ゲノムドラフト解析およびアノテーションを実施し、7679個のオープンリーディングフレーム（Open reading frame; ORF）を同定した。この情報を元に、スクシニルCoA：アセチルCoAアシル

トランスフェラーゼとして *p a a J* (L3) を、3-ヒドロキシアジピル CoA デヒドロゲナーゼとして *p a a H* (L3) を、3-ヒドロキシアジピル CoA デヒドラターゼとして *p a a F* (L3) を、2, 3-デヒドロアジピル CoA レダクターゼとして *m m g C* (L3) を同定した。

[0229] *P a a J* (L3) 配列をクエリとして BLAST 検索を実施した結果を表 B-1 に、*P a a H* (L3) 配列をクエリとして BLAST 検索を実施した結果を表 B-2 に、*P a a F* (L3) 配列をクエリとして BLAST 検索を実施した結果を表 B-3 に、*M m g C* (L3) 配列をクエリとして BLAST 検索を実施した結果を表 B-4 に示す。なお、配列検索時のデータベースは「Refseq_Protein」を指定した。

[0230] [表B-1]

名称	カバー率(%)	配列 同一性(%)	アクセッションNo.
3-oxoadipyl-CoA thiolase [Sphingomonas sp. 3P27F8]	99%	94.0	WP_137788344.1
3-oxoadipyl-CoA thiolase [Aromatoleum bremense]	99%	89.0	WP_169204100.1
3-oxoadipyl-CoA thiolase [Aromatoleum tolulyticum]	99%	86.0	WP_076601068.1
3-oxoadipyl-CoA thiolase [Noviherbaspirillum massiliense]	99%	86.3	WP_019143081.1
3-oxoadipyl-CoA thiolase [Azoarcus sp. CIB]	99%	84.8	WP_050416542.1
3-oxoadipyl-CoA thiolase [Aromatoleum diolicum]	99%	86.5	WP_169259361.1
3-oxoadipyl-CoA thiolase [Saezia sanguinis]	99%	82.8	WP_126979818.1
3-oxoadipyl-CoA thiolase [unclassified Massilia]	99%	82.7	WP_047825632.1
3-oxoadipyl-CoA thiolase [Burkholderia cepacia]	99%	81.0	WP_043186899.1
3-oxoadipyl-CoA thiolase [Burkholderia anthina]	99%	81.0	WP_175781473.1

[0231] [表B-2]

名称	カバー率(%)	配列 同一性(%)	アクセッションNo.
3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase [Aromatoleum diolicum]	93%	75.9	WP_169259360.1
3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase [Aromatoleum bremense]	93%	76.0	WP_169204099.1
3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase [Noviherbaspirillum massiliense]	93%	76.6	WP_019143080.1
3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase [Saezia sanguinis]	93%	74.0	WP_126979819.1
3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase [Aromatoleum tolulyticum]	93%	74.0	WP_076601067.1
3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase [unclassified Massilia]	93%	74.1	WP_047825631.1
3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase [Azoarcus sp. CIB]	93%	72.3	WP_050416541.1
3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase [Massilia sp. HP4]	93%	68.0	WP_137174141.1
3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase [Azoarcus sp. KH32C]	93%	67.4	WP_041656320.1
3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase [Aromatoleum diolicum]	93%	66.6	WP_169260331.1

[0232]

[表B-3]

名称	カバー率(%)	配列	アクセッションNo.
		同一性(%)	
enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein [Noviherbaspirillum massiliense]	97%	83.9	WP_019143079.1
enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein [Unclassified Massilia]	97%	82.8	WP_047825630.1
enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein [Azoarcus sp. CIB]	97%	81.2	WP_050416540.1
enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein [Saezia sanguinis]	97%	78.0	WP_126979820.1
enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein [Aromatoleum tolulyticum]	97%	79.2	WP_076601066.1
enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein [Aromatoleum diolicum]	99%	73.9	WP_169259359.1
enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein [Brachymonas denitrificans]	93%	78.7	WP_091813494.1
enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein [Brachymonas chironomi]	94%	77.2	WP_018715326.1
enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein [Pseudomonas alkylphenolica]	93%	75.8	WP_157192348.1
enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein [Pseudomonas alkylphenolica]	93%	75.4	WP_128326511.1

[0233] [表B-4]

名称	カバー率(%)	配列	アクセッションNo.
		同一性(%)	
acyl-CoA dehydrogenase family protein [Paraburkholderia diazotrophica]	98%	90.6	WP_090867470.1
acyl-CoA dehydrogenase family protein [Burkholderiaceae]	98%	90.6	WP_028365992.1
acyl-CoA dehydrogenase family protein [Massilia niastensis]	99%	90.4	WP_026355172.1
acyl-CoA dehydrogenase family protein [Paraburkholderia dipogonis]	98%	90.6	WP_134465218.1
acyl-CoA dehydrogenase family protein [Paraburkholderia piptadeniae]	98%	90.3	WP_087738639.1
acyl-CoA dehydrogenase family protein [Paraburkholderia sp. 5N]	98%	89.5	WP_172166833.1
acyl-CoA dehydrogenase family protein [Noviherbaspirillum massiliense]	99%	90.3	WP_019143077.1
acyl-CoA dehydrogenase family protein [Paraburkholderia steinii]	98%	90.6	WP_131239939.1
acyl-CoA dehydrogenase family protein [Paraburkholderia sp. PGU16]	98%	90.0	WP_180723506.1
acyl-CoA dehydrogenase family protein [Unclassified Massilia]	99%	89.3	WP_047825629.1

[0234] 以上の結果より、*Burkholderia* sp. LEBP-3株の持つ上記酵素は新規配列として同定された。paaJ (L3) 遺伝子は配列番号164に示すヌクレオチドおよび配列番号165に示すヌクレオチドをプライマーとしてPCR増幅を行うことができる。paaH (L3) 遺伝子は配列番号166に示すヌクレオチドおよび配列番号167に示すヌクレオチドをプライマーとしてPCR増幅を行うことができる。paaF (L3) 遺伝子は配列番号168に示すヌクレオチドおよび配列番号169に示すヌクレオチドをプライマーとしてPCR増幅を行うことができる。mmgC (L3) 遺伝子は配列番号170に示すヌクレオチドおよび配列番号171に示すヌクレオチドをプライマーとしてPCR増幅を行うことができる。PCRに用いたプライマー、各酵素および酵素をコードする塩基配列を、図17～20に示す。

[0235] PCR増幅条件の一例を下記に示す。酵素はPrimeSTAR Max

DNA Polymerase（製品名、タカラバイオ製）を用いた。熱処理 98℃ 10 秒、アニーリング 55℃ 15 秒、伸長 72℃ 5 秒/kb を 30 サイクル実施した。プライマーとして使用するオリゴヌクレオチドは各 1 μ M 添加した。液量は 25 μ L で実施した。

[0236] <取得酵素遺伝子を発現する組換え大腸菌の構築>

PCR 断片の増幅には PrimeSTAR Max DNA Polymerase（製品名、タカラバイオ製）、プラスミドの調製には大腸菌 JM109 株を用いた。塩基配列のコドン最適化には、GeneArt GeneOptimizer（ソフトウェア名、サーモフィッシャーサイエンティフィック社）、または、ユーロフィンジェノミクス社の人工遺伝子合成サービスを用いた。

[0237] *Eshcherichia coli* の PaaJ (Ec) をコードするポリヌクレオチドは、*Eshcherichia coli* W3110 株 (NBRC12713) ゲノム DNA からクローニングを行った。配列番号 188 および 189 のオリゴヌクレオチド (図 20A) をプライマーとして PCR を行い、paaJ (Ec) 遺伝子のコード領域 (配列番号 180) (図 19A) を含む PCR 増幅物を得た。次に、pRSFDuet-1（製品名、Merck 社製）を鋳型として、配列番号 190 および 191 に示すヌクレオチド (図 20A) をプライマーとして PCR を行い、pRSFDuet-1 断片を得た。遺伝子コード領域を含む DNA 断片と pRSFDuet-1 断片とを、In-Fusion HD cloning kit（製品名、Clontech 社製）を用いて接続した。大腸菌 JM109 株に形質転換し、得られた形質転換体からプラスミドを抽出した。PaaJ (Ec) 発現プラスミドとして「prm203」を得た。

[0238] *Eshcherichia coli* の PaaH (Ec) をコードするポリヌクレオチドは、*Eshcherichia coli* W3110 株 (NBRC12713) のゲノム DNA からクローニングを行った。配列番号 192 および 193 に示すヌクレオチド (図 20A) をプライマーとして P

CRを行い、*paaH* (*Ec*) 遺伝子のコード領域 (配列番号 181) (図 19A) を含む PCR 増幅物を得た。次に、*prm203* を鋳型とし、配列番号 194 および 195 に示すヌクレオチド (図 20A) をプライマーとして PCR を行い、*prm203* 断片を得た。各遺伝子コード領域を含む DNA 断片と *prm203* 断片とを、*In-Fusion HD cloning kit* (製品名、*Clontech* 社製) を用いて接続した。大腸菌 JM109 株に形質転換し、得られた形質転換体より、プラスミドを抽出した。*PaaJ* (*Ec*) - *PaaH* (*Ec*) 発現プラスミドとして「*prm69*」を得た。

[0239] *Escherichia coli* の *PaaF* (*Ec*) をコードするポリヌクレオチドは、*Escherichia coli* W3110 株 (NBRC12713) ゲノム DNA からクローニングを行った。配列番号 196 および 197 に示すヌクレオチド (図 20A) をプライマーとして PCR を行い、*paaF* (*Ec*) 遺伝子のコード領域 (配列番号 182) (図 19A) を含む PCR 増幅物を得た。L3 株の *PaaF* (L3) をコードするポリヌクレオチドは、大腸菌発現用に塩基配列の最適化を行い、ユーロフィンジェノミクス社の人工遺伝子合成サービスを利用して取得した。配列番号 198 および 199 に示すヌクレオチド (図 20A) をプライマーとして PCR を行い、*paaF* (L3) 遺伝子のコード領域を含む PCR 増幅物を得た。*pETDuet-1* (製品名、*Merck* 社製) を鋳型として、配列番号 204 および 205 に示すヌクレオチド (図 20A) をプライマーとして PCR を行い、*pETDuet-1* 断片を得た。各遺伝子のコード領域を含む DNA 断片と *pETDuet-1* 断片とを、*In-Fusion HD cloning kit* (製品名、*Clontech* 社製) を用いて接続した。大腸菌 JM109 株に形質転換し、得られた形質転換体からプラスミドを抽出した。*PaaF* (*Ec*) 発現プラスミドとして「*prm74*」を、*PaaF* (L3) 発現プラスミドとして「*prm194*」を得た。

[0240] *Acinetobacter baylyi* の *dcaA* (*Ab*)、*The*

*rmobifida fusca*のTfu1647、L3株のMmgC (L3) をコードするポリヌクレオチドは、大腸菌発現用に塩基配列の最適化を行い、ユーロフィンジェノミクス社の人工遺伝子合成サービスを利用して取得した。dcaA (Ab) 遺伝子 (配列番号185) (図19B) は、配列番号206および207に示すヌクレオチド (図20A) をプライマーとして、*Thermobifida fusca*のTfu1647遺伝子 (配列番号186) (図19B) は配列番号208および209に示すヌクレオチド (図20A) をプライマーとして、mmgC5 (L3) 遺伝子は配列番号210および211 (図20A) に示すヌクレオチドをプライマーとしてPCRを行い、dcaA (Ab)、Tfu1647、mmgC5 (L3) 各遺伝子のコード領域を含むPCR増幅物をそれぞれ得た。prm74およびprm194を鋳型とし、配列番号212および213に示すヌクレオチド (図20A) をプライマーとしてPCRを行い、prm74断片およびprm194断片をそれぞれ得た。各遺伝子のコード領域を含むDNA断片と、prm74断片およびprm194断片とをIn-Fusion HD cloning kit (製品名、Clontech社製) を用いて接続した。大腸菌JM109株に形質転換し、得られた形質転換体より、プラスミドを抽出した。PaaF (Ec) -dcaA (Ab) 発現プラスミドとして「prm127」を、PaaF (Ec) -mmgC (L3) 発現プラスミドとして「prm234」を、PaaF (L3) -mmgC (L3) 発現プラスミドとして「prm166」を、それぞれ得た。

[0241] *Acinetobacter baylyi*のtesB (Ab) をコードするポリヌクレオチドは、*Acinetobacter baylyi*の染色体DNAから配列番号214および215に示すヌクレオチド (図20A) をプライマーとしてPCRを行い、tesB (Ab) 遺伝子のコード領域を含むPCR増幅物をそれぞれ得た。pCDFDuet-1を鋳型とし、配列番号216および217に示すヌクレオチド (図20A) をプライマーとしてPCRを行い、pCDFDuet-1断片を得た。各tesB (Ab)

遺伝子コード領域を含むDNA断片と、pCDFDuet-1断片とをIn-Fusion HD cloning kit（製品名、Clontech社製）を用いて接続した。大腸菌JM109株に形質転換し、得られた形質転換体より、プラスミドを抽出した。TesB (Ab) 発現プラスミドとして「prm92」を得た。

[0242] 大腸菌BL21 (DE3) 株の遺伝子破壊株を下記の通りに作製した。乳酸デヒドロゲナーゼをコードするldh遺伝子、アセチルCoAアセチルトランスフェラーゼをコードするatoB遺伝子、およびスクシニルCoAシンセターゼ α サブユニットをコードするsucD遺伝子の破壊は、pHAK1（受領番号NITE P-02919として、独立行政法人製品評価技術基盤機構 バイオテクノロジーセンター 特許微生物寄託センター (NPM D)（住所：千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 122号室）に2019年3月18日に寄託した。国際寄託番号：NITE BP-02919）を用いた相同組換え法により行った。pHAK1は温度感受性変異型repA遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、Bacillus subtilis由来レバンスクララーゼ遺伝子SacBを含む。レバンスクララーゼ遺伝子は、スクロース存在下において宿主微生物に対して致死的に作用する。PCR断片の増幅にはPrimeSTAR Max DNA Polymerase（製品名、タカラバイオ製）、プラスミド調製は大腸菌HST08株を用いて行った。

[0243] 大腸菌BL21 (DE3) 株のゲノムDNAを鋳型とし、破壊標的遺伝子上流領域、コード領域、および下流領域を含むPCR増幅物を得た。ldh遺伝子周辺領域は配列番号218および219に示すヌクレオチド（図20B）をプライマーとしてPCRを行い、atoB遺伝子周辺領域は配列番号220および221に示すヌクレオチド（図20B）をプライマーとしてPCRを行い、sucD遺伝子周辺領域は配列番号222および223に示すヌクレオチド（図20B）をプライマーとしてPCRを行い、それぞれの断片を得た。

- [0244] 次に本PCR増幅物を In-Fusion HD cloning kit（製品名、Clontech社製）を用いて、配列番号224及び225に示すプライマーを（図20B）用いて増幅したpHAK1プラスミド断片に挿入し、環状化した。
- [0245] 得られた破壊標的遺伝子上流領域、コード領域、および下流領域のDNA断片が挿入されたpHAK1プラスミドを鋳型として、ldh遺伝子周辺領域は配列番号226および227に示すヌクレオチド（図20B）をプライマーとしてPCRを行い、atoB遺伝子周辺領域は配列番号228および229に示すヌクレオチド（図20B）をプライマーとしてPCRを行い、sucD遺伝子周辺領域は配列番号230および231に示すヌクレオチドをプライマー（図20B）としてPCRを行い、破壊標的遺伝子のコード領域の一部領域または全領域が除かれたプラスミド断片を得た。
- [0246] 得られたプラスミド断片を末端リン酸化、セルフライゲーションにより環状化し、遺伝子破壊用プラスミドを得た。
- [0247] 塩化カルシウム法（羊土社 遺伝子工学実験ノート 田村隆明著、参照）により、大腸菌BL21（DE3）株に所望の遺伝子の破壊のためのプラスミドを形質転換した後、カナマイシン硫酸塩100mg/Lを含有するLB寒天培地（トリプトン10g/L、酵母エキス5g/L、塩化ナトリウム5g/L、寒天末15g/L）に塗布し、30℃で一晩培養してシングルコロニーを取得し、形質転換体を得た。本形質転換体をカナマイシン硫酸塩100mg/Lを含有するLB液体培地（トリプトン10g/L、酵母エキス5g/L、塩化ナトリウム5g/L）1mLに一白金耳植菌し、30℃で振盪培養を行った。得られた培養液を、カナマイシン硫酸塩100mg/Lを含有するLB寒天培地に塗布し、42℃で一晩培養した。得られるコロニーはシングルクロスオーバーにより、プラスミドがゲノム中に挿入されている。コロニーをLB液体培地1mLに一白金耳植菌し、30℃で振盪培養を行った。得られた培養液を、スクロース10%を含有するLB寒天培地に塗布し、一晩培養した。得られたコロニーについて、所望の遺伝子が破壊されてい

ることをコロニーダイレクトPCRにより確認した。まず、*ldh* 遺伝子破壊株を構築し、本 *ldh* 遺伝子破壊株を元に *atoB* 遺伝子破壊株を構築し、さらに *ldh*、*atoB* 二重破壊株を元に *sucD* 遺伝子破壊株を構築した。作製した *ldh*、*atoB*、*sucD* 遺伝子の三重破壊株を ASL000 株とした。

[0248] 構築したプラスミドを ASL000 株に形質転換し、アンピシリンナトリウム 50 mg/L、カナマイシン硫酸塩 30 mg/L、ストレプトマイシン硫酸塩 50 mg/L を含む LB 寒天培地（トリプトン 10 g/L、酵母エキス 5 g/L、塩化ナトリウム 5 g/L、寒天末 15 g/L）に塗布し、37℃で24時間インキュベートして形質転換体のシングルコロニーを得た。取得した形質転換体を表 B-5 に示す。

[0249] [表B-5]

菌株名	宿主	プラスミド①	pRSFDuet		プラスミド②	pETDuet		プラスミド③	pCDFDuet	
			step1	step2		step3	step4		step5	
ADA197	対照株	ASL000	prm69	paal(Ec)	paah(Ec)	prm127	paaf(Ec)	dcaA(Ab)	prm92	tesB(Ab)
ADA500	発明株	ASL000	prm69	paal(Ec)	paeh(Ec)	prm234	paaf(Ec)	mmgC(L3)	prm92	tesB(Ab)
ADA496	発明株	ASL000	prm69	paal(Ec)	paah(Ec)	prm166	paaf(L3)	mmgC(L3)	prm92	tesB(Ab)

[0250] <取得酵素遺伝子を発現する組換え大腸菌によるアジピン酸生産試験>

表 B-5 に示す菌株を、アンピシリンナトリウム 50 mg/L、カナマイシン硫酸塩 30 mg/L、およびストレプトマイシン硫酸塩 50 mg/L を含む LB 液体培地（トリプトン 10 g/L、酵母エキス 5 g/L、塩化ナトリウム 5 g/L）2 mL（14 mL 容ラウンドボトムチューブ）に一白金耳植菌し、37℃で24時間振盪培養を行い、前培養液を得た。前得られた前培養液 10 μL を、アンピシリンナトリウム 50 mg/L、カナマイシン硫酸塩 30 mg/L、およびストレプトマイシン硫酸塩 50 mg/L を含む MM 培地 1 mL（96 穴ディープウェルプレート）に植菌し、37℃で48時間振盪培養を行った。

MM 培地の組成を表 B-6 に示す。

[0251]

[表B-6]

MM培地	
KH ₂ PO ₄	3 g/L
K ₂ HPO ₄	6 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.5 g/L
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.3 g/L
CaCl ₂ · 2H ₂ O	1 mg/L
FeSO ₄ · 7H ₂ O	6 mg/L
MnSO ₄ · H ₂ O	1.5 mg/L
AlCl ₃ · 6H ₂ O	1.5 mg/L
CoCl ₂	0.6 mg/L
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.3 mg/L
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.3 mg/L
CuCl ₂ · 2H ₂ O	0.15 mg/L
H ₃ BO ₃	0.075 mg/L
MOPS	125 mM
グリセロール	20 g/L

[0252] 培養終了後、培養液中のアジピン酸およびアジピン酸類縁体の濃度を分析した。分析は、トリメチルシリル誘導体化を用いたGC/MS分析によって行った。培養液遠心上清40 μ L（内部標準としてセバシン酸二ナトリウムを終濃度10 mMとなるように添加）に水：メタノール：クロロホルム＝5：2：2（v/v/v）で混合した抽出液を360 μ L添加し、よく混合した。遠心分離（16,000 $\times$ g、5分）後、上清100 μ Lを別のマイクロチューブに採取し、遠心エバポレータで1時間遠心濃縮した。得られた乾固物にメトキシアミン塩酸塩20 mg/mLピリジン溶液100 μ Lを添加し、30℃で90分振盪した。N-メチル-N-トリメチルシリルトリフルオロアセトアミド50 μ Lを添加し、37℃で30分振盪した。反応溶液をGC/MS測定試料とし、下記の条件で分析を行った。

[0253] GC/MS分析条件

装置：GCMS-QP-2020NX（島津製作所製）

カラム：フューズドシリカキャピラリーチューブ 不活性処理チューブ（長さ1 m、外径0.35 mm、内径0.25 mm、GLサイエンス社製）、I

ner tCap 5MS／NP（長さ30m、内径0.25mm、膜厚0.25μm、GLサイエンス社製）

試料注入量：1μL

試料導入法：スプリット（スプリット比25：1）

気化室温度：230℃

キャリアガス：ヘリウム

キャリアガス線速度：39.0cm／秒

オープン温度：80℃、2分保持→15℃／分昇温→325℃、13分保持

イオン化法：電子イオン化法（EI）

イオン化エネルギー：70eV

イオン源温度：230℃

スキャン範囲：m／z = 50～500

注入量：1μL

[0254] 結果を表B-7に示す。表中、「3OA」は3-オキソアジピン酸を、「LEV」はレブリン酸を、「3HA」は3-ヒドロキシアジピン酸を、「23DA」は2,3-デヒドロアジピン酸を、「ADA」はアジピン酸を示す。

[0255] [表B-7]

菌株名		培養液中の濃度(mg/L)					
		3OA	LEV	3HA	23DA	ADA	計
ADA197	対照株	0	0	83	0	105	188
ADA500	発明株	112	21	113	40	69	355
ADA496	発明株	295	41	154	38	84	613

[0256] L3株由来のPaaf(L3)およびmmgC(L3)の双方を発現させた発明株、すなわち、ADA500株およびADA496株では、3-オキソアジピン酸(3OA)、レブリン酸(LEV)、3-ヒドロキシアジピン酸(3HA)、2,3-デヒドロアジピン酸(23DA)、およびアジピン酸(ADA)が対照株に比べ多く生成し、これらの合算値としてそれぞれ、355mg／Lおよび613mg／L生成した。以上の結果より、これらの

遺伝子にコードされる酵素はアジピン酸経路反応を進行させる高い活性を有しており、アジピン酸およびアジピン酸誘導体の生成量を向上させることが示された。

産業上の利用可能性

[0257] 本発明は、例えば、C 6 化合物の効率的な製造プロセスを提供することができ、工業的規模での生産への応用が期待される。

[0258] 本発明はまた、バイオマス原料からの直接的なアジピン酸類の発酵生産において好適に利用できる。

請求の範囲

[請求項1]

2, 3-デヒドロアジピル- CoA を還元してアジピル CoA に変換する酵素活性を有するタンパク質をコードする外来性遺伝子を含む組換え微生物であって、

前記外来性遺伝子が、

(i) 配列番号8、9、10、11、12、13、14、15または16に示すアミノ酸配列と80%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA、

(ii) 配列番号8、9、10、11、12、13、14、15または16に示すアミノ酸配列に対して1～10個のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA、

(iii) 配列番号57、58、59、60、61、62、63、64または65に示すポリヌクレオチド配列と80%以上の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列からなるDNA、

(iv) 配列番号57、58、59、60、61、62、63、64または65に示すポリヌクレオチド配列によりコードされるタンパク質のアミノ酸配列に対して1～10個のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA、

(v) 配列番号57、58、59、60、61、62、63、64または65に示すポリヌクレオチド配列に相補的なポリヌクレオチド配列からなるDNAと緊縮条件下でハイブリダイズするDNA、または

(vi) 配列番号57、58、59、60、61、62、63、64または65に示すポリヌクレオチド配列の縮重異性体からなるDNA

である、組換え微生物。

[請求項2] 前記外来性遺伝子が、

(x i) 配列番号 8、9、10、11、12、13、14、15 または 16 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする DNA、または、

(x i i i) 配列番号 57、58、59、60、61、62、63、64 または 65 に示すポリヌクレオチド配列からなる DNA である、請求項 1 に記載の組換え微生物。

[請求項3] 前記外来性遺伝子が、*Candida auris*、*Kluyveromyces marxianus*、*Pichia kudriavzevii*、*Thermothelomyces thermophilus*、*Thermothielavioides terrestris*、*Chaetomium thermophilum*、*Podospira anserina*、*Purpureocillium lilacinum* および *Pyrenophora teres* から選択される少なくとも 1 つに由来する、請求項 1 または 2 に記載の組換え微生物。

[請求項4] 前記組換え微生物が、C6 化合物の生産経路を有し、

前記 C6 化合物が、アジピン酸、ヘキサメチレンジアミン、1, 6-ヘキサンジオール、6-アミノヘキサン酸、6-アミノ-1-ヘキサノールおよび 6-ヒドロキシヘキサン酸からなる群から選択される少なくとも一つである、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] 前記組換え微生物が、エスキリキア (*Escherichia*) 属、バチルス (*Bacillus*) 属、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属、アルスロバクター (*Arthrobacter*) 属、ブレビバクテリウム (*Brevibacterium*) 属、クロストリジウム (*Clostridium*) 属、ザイモモナス (*Zymomonas*) 属、シュードモナス (*Pseudomon*

as) 属、バークホルデリア (*Burkholderia*) 属、ストレプトマイセス (*Streptomyces*) 属、ロドコッカス (*Rhodococcus*) 属、シネコシスティス (*Synechocystis*) 属、アルカリハロバチルス (*Alkalihalobacillus*) 属、サッカロマイセス (*Saccharomyces*) 属、シゾサッカロマイセス (*Schizosaccharomyces*) 属、ヤロウシア (*Yarrowia*) 属、カンジタ (*Candida*) 属、ピキア (*Pichia*) 属、またはアスペルギルス (*Aspergillus*) 属に属する、請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の組換え微生物。

[請求項6] 前記組換え微生物が、大腸菌 (*Escherichia coli*) である、請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の組換え微生物。

[請求項7] ・ 3-オキソアジピル CoA チオラーゼをコードする遺伝子、
 ・ 3-ヒドロキシアジピル CoA デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子、
 ・ 3-ヒドロキシアジピル CoA デヒドラターゼをコードする遺伝子、
 ・ カルボン酸レダクターゼをコードする遺伝子、
 ・ アルコールデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子、および
 ・ トランスアミナーゼ (アミノトランスフェラーゼ) をコードする遺伝子
 からなる群より選択される少なくとも 1 つをさらに含む、請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載の組換え微生物。

[請求項8] 請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の組換え微生物を培養する培養工程を含む、C6 化合物の製造方法であって、

前記 C6 化合物が、アジピン酸、ヘキサメチレンジアミン、1, 6-ヘキサンジオール、6-アミノヘキサン酸、6-アミノ-1-ヘキサノールおよび 6-ヒドロキシヘキサン酸からなる群から選択される

少なくとも一つである、製造方法。

[請求項9]

(a) 2, 3-デヒドロアジピルーC o Aを還元してアジピルC o Aに変換する酵素活性を有し、

(b) 以下：

(i) 配列番号8、9、10、11、12、13、14、15または16に示すアミノ酸配列と80%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる、

(ii) 配列番号8、9、10、11、12、13、14、15または16に示すアミノ酸配列に対して1～10個のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなる、

(iii) 配列番号57、58、59、60、61、62、63、64または65に示すポリヌクレオチド配列と80%以上の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列からなるDNAによってコードされる、

(iv) 配列番号57、58、59、60、61、62、63、64または65に示すポリヌクレオチド配列によりコードされるタンパク質のアミノ酸配列に対して1～10個のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなる、

(v) 配列番号57、58、59、60、61、62、63、64または65に示すポリヌクレオチド配列に相補的なポリヌクレオチド配列からなるDNAと緊縮条件下でハイブリダイズするDNAによってコードされる、および

(vi) 配列番号57、58、59、60、61、62、63、64または65に示すポリヌクレオチド配列の縮重異性体からなるDNAによってコードされる

のいずれかである、組換えタンパク質。

[請求項10]

(xi) 配列番号8、9、10、11、12、13、14、15または16に示すアミノ酸配列からなるか、または、

(x i i i) 配列番号 57、58、59、60、61、62、63、64 または 65 に示すポリヌクレオチド配列からなる DNA によってコードされる、組換えタンパク質。

[請求項11] 請求項9または10に記載の組換えタンパク質を用いることを含む、C6化合物の製造方法。

[請求項12] 3-ヒドロキシアジピルCoAデヒドラターゼをコードする外来性遺伝子および2, 3-デヒドロアジピルCoAレダクターゼをコードする外来性遺伝子のうちの少なくとも1つを含む、組換え微生物。

[請求項13] 前記3-ヒドロキシアジピルCoAデヒドラターゼおよび2, 3-デヒドロアジピルCoAレダクターゼの少なくとも1つが、バークホルデリア属 (*Burkholderia* sp.) LEBP-3株 (受託番号: NITE BP-03334) に由来する、請求項12に記載の組換え微生物。

[請求項14] 前記3-ヒドロキシアジピルCoAデヒドラターゼが、バークホルデリア属 (*Burkholderia* sp.) LEBP-3株の染色体DNAを鋳型とし、

(1a) 配列番号168に示す塩基配列からなるヌクレオチドおよび配列番号169に示す塩基配列からなるヌクレオチド、または

(1b) 配列番号168に示す塩基配列を含むヌクレオチドおよび配列番号169に示す塩基配列を含むヌクレオチド

をプライマーとして使用したPCR増幅物と配列同一性が80%以上、85%以上、88%以上、90%以上、93%以上、95%以上、97%以上、98%以上または99%以上であるDNAにコードされ、

当該DNAは、626～940bpを有する、請求項12または13に記載の組換え微生物。

[請求項15] 前記2, 3-デヒドロアジピルCoAレダクターゼが、バークホルデリア属 (*Burkholderia* sp.) LEBP-3株の染

色体DNAを鋳型とし、

(2a) 配列番号170に示す塩基配列からなるヌクレオチドおよび配列番号171に示す塩基配列からなるヌクレオチド、または

(2b) 配列番号170に示す塩基配列を含むヌクレオチドおよび配列番号171に示す塩基配列を含むヌクレオチド

をプライマーとして使用したPCR増幅物と配列同一性が80%以上、85%以上、88%以上、90%以上、93%以上、95%以上、97%以上、98%以上または99%以上であるDNAにコードされ、

当該DNAは、924～1386bpを有する、請求項12～14のいずれか1項に記載の組換え微生物。

[請求項16]

前記3-ヒドロキシアジピルCoAデヒドラターゼが、バークホルデリア属 (*Burkholderia* sp.) LEBP-3株の染色体DNAを鋳型とし、

(1a) 配列番号168に示す塩基配列からなるヌクレオチドおよび配列番号169に示す塩基配列からなるヌクレオチド、または

(1b) 配列番号168に示す塩基配列を含むヌクレオチドおよび配列番号169に示す塩基配列を含むヌクレオチド

をプライマーとして使用したPCR増幅物であるDNAにコードされ、

当該DNAは、783または784bpを有する、請求項12または13に記載の組換え微生物。

[請求項17]

前記2, 3-デヒドロアジピルCoAレダクターゼが、バークホルデリア属 (*Burkholderia* sp.) LEBP-3株の染色体DNAを鋳型とし、

(2a) 配列番号170に示す塩基配列からなるヌクレオチドおよび配列番号171に示す塩基配列からなるヌクレオチド、または

(2b) 配列番号170に示す塩基配列を含むヌクレオチドおよび

配列番号 1 7 1 に示す塩基配列を含むヌクレオチド

をプライマーとして使用した P C R 増幅物である D N A にコードされ、

当該 D N A は、 1 1 5 5 または 1 1 5 6 b p を有する、請求項 1 2 ～ 1 4 のいずれか 1 項に記載の組換え微生物。

[請求項18] 上記組換え微生物が、エッセリシア属、コリネバクテリウム属、バチルス属、アシネトバクター属、バークホルデリア属、シュードモナス属、クロストリジウム属、サッカロマイセス属、シゾサッカロマイセス属、ヤロウィア属、カンジタ属、ピキア属およびアスペルギルス属からなる群より選択される属に属する、請求項 1 2 ～ 1 7 のいずれか 1 項に記載の組換え微生物。

[請求項19] アジピン酸生産経路を有する、請求項 1 2 ～ 1 8 のいずれか一項に記載の組換え微生物。

[請求項20] ヘキサメチレンジアミン生産経路を有する、請求項 1 2 ～ 1 9 のいずれか一項に記載の組換え微生物。

[請求項21] 1, 6-ヘキサンジオール生産経路を有する、請求項 1 2 ～ 1 9 のいずれか一項に記載の組換え微生物。

[請求項22] 6-アミノ-1-ヘキサノール生産経路を有する、請求項 1 2 ～ 1 9 のいずれか一項に記載の組換え微生物。

[請求項23] 請求項 1 2 ～ 1 8 のいずれか 1 項に記載の組換え微生物を培養する培養工程を含む、目的化合物の製造方法であって、

前記目的化合物が、アジピン酸、アジピン酸誘導体、ヘキサメチレンジアミン、1, 6-ヘキサンジオールおよび6-アミノ-1-ヘキサノールからなる群より選択され、

前記アジピン酸誘導体が、オキソアジピン酸、レブリン酸、3-ヒドロキシアジピン酸および2, 3-デヒドロアジピン酸からなる群より選択される、製造方法。

[請求項24] 請求項 1 9 に記載の組換え微生物を培養する培養工程を含む、アジ

ピン酸の製造方法。

[請求項25] 請求項20に記載の組換え微生物を培養する培養工程を含む、ヘキサメチレンジアミンの製造方法。

[請求項26] 請求項21に記載の組換え微生物を培養する培養工程を含む、1,6-ヘキサンジオール製造方法。

[請求項27] 請求項22に記載の組換え微生物を培養する培養工程を含む、6-アミノ-1-ヘキサノールの製造方法。

[請求項28] (A-1) バークホルデリア属 (*Burkholderia* sp.) LEBP-3株の染色体DNAを鋳型とし、

(a1) 配列番号168に示す塩基配列からなるヌクレオチドおよび配列番号169に示す塩基配列からなるヌクレオチド、または

(a2) 配列番号168に示す塩基配列を含むヌクレオチドおよび配列番号169に示す塩基配列を含むヌクレオチド

をプライマーとして使用したPCR増幅物と配列同一性が80%以上、85%以上、88%以上、90%以上、93%以上、95%以上、97%以上、98%以上または99%以上であるDNAにコードされる組換えポリペプチドであって、

3-ヒドロキシアジピルCoAデヒドラターゼ活性を有し、

前記DNAは、626～940bpを有する、組換えポリペプチド；

(A-2) バークホルデリア属 (*Burkholderia* sp.) LEBP-3株の染色体DNAを鋳型とし、

(a1) 配列番号168に示す塩基配列からなるヌクレオチドおよび配列番号169に示す塩基配列からなるヌクレオチド、または

(a2) 配列番号168に示す塩基配列を含むヌクレオチドおよび配列番号169に示す塩基配列を含むヌクレオチド

をプライマーとして使用したPCR増幅物であるDNAによりコードされるポリペプチドのアミノ酸配列に対して1～10個のアミノ酸が

欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなる組換えポリペプチドであって、

3-ヒドロキシアジピルC o Aデヒドラターゼ活性を有し、

前記DNAは、626～940bpを有する、組換えポリペプチド；

または

(A-3) バークホルデリア属 (*Burkholderia* sp.) LEBP-3株の染色体DNAを鋳型とし、

(a1) 配列番号168に示す塩基配列からなるヌクレオチドおよび配列番号169に示す塩基配列からなるヌクレオチド、または

(a2) 配列番号168に示す塩基配列を含むヌクレオチドおよび配列番号169に示す塩基配列を含むヌクレオチド

をプライマーとして使用したPCR増幅物の縮重異性体からなるDNAにコードされる組換えポリペプチドであって、

3-ヒドロキシアジピルC o Aデヒドラターゼ活性を有し、

前記DNAは、626～940bpを有する、組換えポリペプチド。

[請求項29]

(B-1) バークホルデリア属 (*Burkholderia* sp.) LEBP-3株の染色体DNAを鋳型とし、

(b1) 配列番号170に示す塩基配列からなるヌクレオチドおよび配列番号171に示す塩基配列からなるヌクレオチド、または

(b2) 配列番号170に示す塩基配列を含むヌクレオチドおよび配列番号171に示す塩基配列を含むヌクレオチド

をプライマーとして使用したPCR増幅物と配列同一性が80%以上、85%以上、88%以上、90%以上、93%以上、95%以上、97%以上、98%以上または99%以上であるDNAにコードされる組換えポリペプチドであって、

2, 3-デヒドロアジピルC o Aレダクターゼ活性を有し、

前記DNAは、924～1386bpを有する、組換えポリペプチド；

(B-2) バークホルデリア属 (*Burkholderia* sp.) LEBP-3株の染色体DNAを鋳型とし、

(b1) 配列番号170に示す塩基配列からなるヌクレオチドおよび配列番号171に示す塩基配列からなるヌクレオチド、または

(b2) 配列番号170に示す塩基配列を含むヌクレオチドおよび配列番号171に示す塩基配列を含むヌクレオチドをプライマーとして使用したPCR増幅物であるDNAによりコードされるポリペプチドのアミノ酸配列に対して1～10個のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなる組換えポリペプチドであって、

2, 3-デヒドロアジピルCoAレダクターゼ活性を有し、

前記DNAは、924～1386bpを有する、組換えポリペプチド；

または

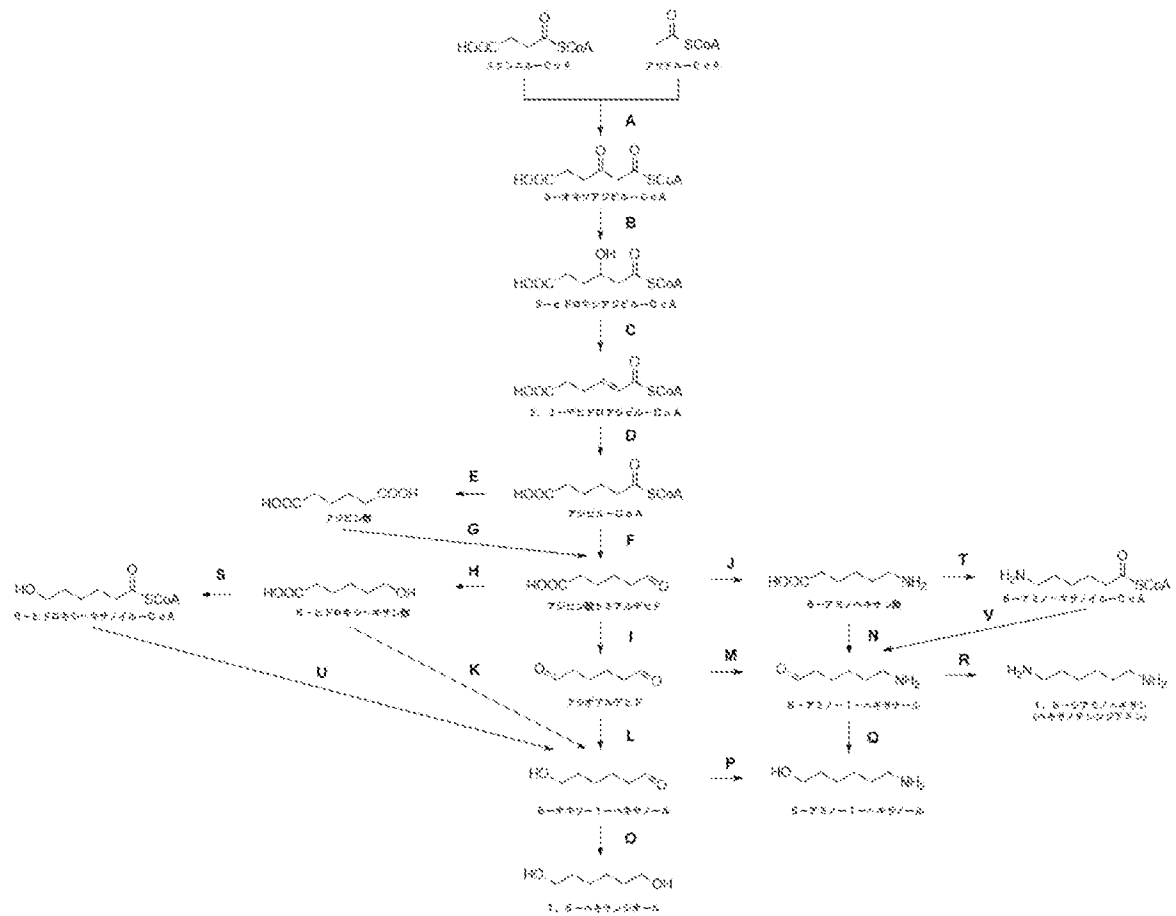
(B-3) バークホルデリア属 (*Burkholderia* sp.) LEBP-3株の染色体DNAを鋳型とし、

(b1) 配列番号170に示す塩基配列からなるヌクレオチドおよび配列番号171に示す塩基配列からなるヌクレオチド、または

(b2) 配列番号170に示す塩基配列を含むヌクレオチドおよび配列番号171に示す塩基配列を含むヌクレオチドをプライマーとして使用したPCR増幅物の縮重異性体からなるDNAにコードされる組換えポリペプチドであって、

2, 3-デヒドロアジピルCoAレダクターゼ活性を有し、

前記DNAは、924～1386bpを有する、組換えポリペプチド。



[図2]

配列番号	配列
1	MREAFICDGIRTPIGRYGGALSSVRADDLAAIPLRELLVRNPRLDAECIDDDVILGCANQAGEDNNRNVARMATLLAGLPQSVSGTTINRLCGSGLDALGFAARAIAKAGDGLL IAGGVESMSRAPFVVGKAASAFSRQAEMFDTTIGWRFVNPLMAQQFGTDSMPETAENVAELLKISR EDQDSFALRSQQRTAKAQSSGILAEIIPVVLKNNKGVVTEIQHDEHLRPETTLEQLRGLKAPFRANGVITAGNASGVNDGAAAL I IAS EQMAAAQGLTPRARIVAMATAGVEPRLMGLGPVPATRRVLERAGLSIHMDVIELNEAFAAQALGVLRELGLPDDAPHVNPNGGAIALG HPLGMSGARLALAASHELHRRNGRYALCTMCIGVGQGIAMILERV
2	MMINVQTVAVIGSGTMGAGIAEVAASHGHQVLLYDISAEALTRAIDGIIHARLNSRVTRGKLTAE TCERTLKRLIPVTDIHALAAADLV I EAASERLEVKKALFAQLAEVCPPTLLTTNTSSISITAI AAEIKNPERVAGLHFFNPAPVMKLVEVVSGLATAAEVVEQLCELTL SWGK QPVRCHSTPGFIVNRVARPYSEAWRALEEQAAP EVIDAALRDGAGFPMGPLEL TDLIGQDVNFAVTCVFNFAWQERRFLPSLVQGE LVIGGRLGKKSGLVYDWRAREAVVGLEAVSDSFSPMKVEKKS DGVTEIDDVLLIETQGETAQALAIRLARPVVVIDKMAGKVVTIAA AAVNPD SATRKA IYYLQQQGTVLQIADYPGMLIWRVTAMIINEALDALQKGVASEQDIDTAMRLGVNYPYGPLAWGAQLGWGRILRL ENLQHHYGEERYRPSLLRQRALLES GYES
3	MSELIVSRQQRVLLLTLNRPAARNALNNALLMQLVNELEAAATDTSISVCVITGNARFFAAGADLNEMAEKDLAATLNDTRPQLWARLQ AFNKPLIAAVNGYALGAGCELALLCDVVVAGENARFGLPEITLGIMPAGAGGTQRLIRSVGKSLASKMVLSGESITAAQQAQAGLVSDVF PSDLTLEYALQLASKMARHSPLALQAAKQALRQSQEVALQAGLAQERQLFTLLAATEDRHEGISAFLOKRTPDFKGR
4	ATGCAAACCATCGAAAACGAAG
5	MIRDEGMLQQLLSTIRDFVKNELIPREHEVAEKDCIPEDI IQQMRELGLFGLTIPEEYGGLGITMEEEVNVAFELGQTSPAFRSLIGTN NGIGSSGLIIDGTEEKQKYLPRYASGEIIGSFCLTEPEAGSDAASLKTAVKDGDFYILNGTKRFITNAPHAATFTVMARTNPAIKGA GGISAFLEANTPGITLGIQDKMGQKGSHTCDVIFENCVPASALIGGVEGVGFKTAMKVLDKGRHLIGAYSVGVAERMLNDALHYAV ERKQFGQPIANFQLIQAMLADSKAEIYAAKCMVLDAAARRRDEGQNI STEASCAMFATEMCGRVADRCVQIHGGAGYISEYSIERFYRD VRLFRLYEGTTQVQIIIAKNMIKEVTS
6	MYSVLKQSI RPRLLATHNQFRMTITAAVLYTQHGE PKDVLFTQSFEIDDDNLAPNEIVKTLGSPVNPSDINQIQGVYPSKPAKTTGF GTTEPAAPCGNEGLFEVIKVGSNVSSLEAGDWVIPS HVNFGTWRT HALGNDDDFIKLPNPAQSKANGKPNGLTINQGATISVNPLTAYL MLTHYVKLTPGKDFIQNGGTS AVGKYASQIGKLLNFNSISVIRDRPNLDEVVASL KELGATQVITEDQNN SREFGPTIKEWIKQSGGE AKLALNCVGGKSSTGIARKLNNGLMLTYGMSFQPV TIPTSLYIFKNFTSAGFWVTELLKNNKELKTSTLNQIIAWYEEGKLTDAKSI ETLYDGTKPLHELYQDGVANSKDGKQLITY
7	MITAAVLYTQHGE PKDVLFTQSFEIDDDNLAPNEIVKTLGSPVNPSDINQIQGVYPSKPAKTTGFGTTEPAAPCGNEGLFEVIKVG SNVSSLEAGDWVIPS HVNFGTWRT HALGNDDDFIKLPNPAQSKANGKPNGLTINQGATISVNPLTAYLMLTHYVKLTPGKDFIQNGGTS AVGKYASQIGKLLNFNSISVIRDRPNLDEVVASL KELGATQVITEDQNN SREFGPTIKEWIKQSGGEAKLALNCVGGKSSTGIARKLNN NGLMLTYGMSFQPV TIPTSLYIFKNFTSAGFWVTELLKNNKELKTSTLNQIIAWYEEGKLTDAKSIETLYDGTKPLHELYQDGVANSK DGKQLITY

[図3]

配列 番号	配列
8	MFVPTVAGKRFLTNQLRKSPQFTRMLTSHAVIFSSHGEPKDLKTHTYEIDENNIKPNELVLKTLGAPVNPSPDINQVQGVYPSQPEKTT QLGTSEPSAVGGNEGLFEI IKIGSDVKGFQVGDWA IPTSVNFGTWRSALCEEGKMMKVPNPEQSKQAGKKQGLTINQAGTSLVNPLTA YLMMLTHYVKLTPGKDFWIONGGNSAVGKFASQIGKLLGIHSISVVRDRPEIEELKKELKEVCGATQVITEEQNNSKDFGPQVKQWVKET GGEIKLALNCVGGKSSAGVARKLAPNGLMLTYGMSFQPVTLPTSLHIFKNVTSAGFWVTELLKSDPNLKRETVDKIVEWYTSGELLDA PSKENQWGDQDLAQVFI DAVANSKSGKQLVKF
9	MSSFLSKRFISTTQRAMSQLPKAKSLIYSSHDQDVSKILKVHTYQPKGSAESSILLKTLAFPINPSDINQLEGVYPSKPEKVL DYSTEE PSAIAAGNEGLFEVSVSPSGVKNLKAGDRVIPLQANFGTWSTYRTCESENDLIKIEGVDLYTAATIAVNGCTAYQMVNDYIEWDPSGNDW LVQNACTSSVSKI VTIQIAKDKGIKTL SVVRDRDNFDEVAEKLEKKYGATKVISSEONGEREFGNEVL PKILGPNAQVKLALNSVGGKSC TNIARKLSPNGLMLTYGMSKQPVTLPTGLFIFNSIRSHGFVWTANSKRDPENKRKTVDVVLYRDKGII SPKEDIRTELDVNNLS EGVLDLVNRGIATKGAKNMVVLKW
10	MSLRVSFVSSSI RRMSSITARAIVYNAHGEPKDTLKCHSYKIDLQNLQPNVVTOLAAPLNPSDINQIQGVYPSKPPLSIDSLPELKE PAAVTGNEGVFKVIAKGSNVGELETGDWCIPSGVNFGTWCTHRLTTDNLLKMPKTI SLNQAATIAVNPSAYQMLTHFVKLQPGDWFI QNGANSQVGRAAIQIGHKLGYKSLNIVNRDNDELVDLESIGATKVI TEDESASKEFGATVKEWLEGKEIKLGLNCIGGPSASNLAR KLGHDAITLTYGAMSKPLSLPTGNFIFKNLTAKGFWITGNIKRHPELRIETINAVLKFMEDGTLKEPKVNEPKVLSTTTNESFLET LAAEDSQKGKQLLKE
11	MASVLSNAAARHLLRPATRSTPPRLPSAILHQSGNNSTRNPRISDPQSI AORLGRRYKSGPYGYTQAKTLVFSRFGEPSDVLRLHHTH SISPTLPDGAIVLRLAAPVNPADVNTIQGTYGARPAFSPLLGTPEPSAVPGNEGCFEVAVGPRVGGGLRKGDWVIPAQTGFGTFRTH ALVENADRALLRVGGDKGTAGLTAKQVATVSVNPCSAYRMLKDYVDLVLSVKSFARGDGATGGAWFLQNGANSVGRAAIQLGRLWGL RSINVVRERATAEETEALKSELRELGATVVVTEAEFLDRSFARLKEEWTRGDREPVMGLNCVGGKSASAMIKALSPKGCMTVYGGMS RQSFPPFTGPQIFKRLRFEGFWLSEWAKENPAEKRNITINEILELMREGKFKEAPVQEI RWDWETEEKVLKEAVQGTLEGFRSGKGVIFGDT
12	MASALNPRHLPLRLALRPRLPLLPSTSTTTTTTPPSCLPIPTSI RLPRRHKSGPYGYTLAKTLVFSRFGEPRDVL SLHHTHISPALP DGAALLRALAAPVNPADVNTVQGTYGAKPAFERLLGTPEPAAPVPGNEGCFEVVAIGGGAGGGGLKKGDWVIPAQSGFGTFRTHALVEG AERKLIRVGGAKGREGLRAAQVATVSVNPCSAYRMLRDYVDLVLSVQSFARGDGATGGAWFVQNGANSVGRAAIQLGRLWGLRSINV VRERATPEETAALKRELAELGATVVVTESEFLDRSFADRLDEWTRGGREPVMGLNCVGGKSAAAMVKALSPRGCMVTYGGMSRQSF FPTGQQIFKRLRFEGFWLSEWAKENPAEKRDITINEILELMREGKFKEAPVQEI RWDWETEEKVLKEAVQGTLEGFRSGKGVIFGDT
13	MASILSPHSALRLGGISTLSRQTLLRSTRVTLTQLPKTAPQLPQRHKSAPYGYTQSKTLVFPFGEPI DVL SLHHTHISPTLPDPAVL LRTLAAPINPADVNTIQGTYGAKPTFNNLLGTAEPAAVPGNEGCFEVVSVGSEIAKRGVFKKGDWVIPSSSGFGTFRTHVLEAEQKL WRIGGEKGTGLTPVQVATVSVNPCSAYRMLRDYVDLVGVSVRMYQEGGSDVRGGAWFLQNGANSVGRAAIQLGRLWGLRSINVVRER ATAEETEALKKELYDLGATVVVTESEFLDRSFTQRLNEEWTRGKPELLLALNCVGGKSAQQIVRALSPKGMTVYGGMSRQSFPPFTG PQIFKRLRFEGFWLSEWAKENPAEKKCVDEI IELMREGKFKEAPVQEI RWDWETEEKVLKEAVQGTLEGFRSGKGVIFGDT
14	MAAPRLTSKALRLPTSLLRPALTATPRAAPTLTQKRHLTGPGYGHQSKALTFSSFGEPIDVL SLHHTHISPTLPSSGVLVRLAAPV NPADVNTIQGTYGSKPPFTTLLGTAQPSAVPGNEACFEVL SVGGGVKLEKGDWVIPAQTGFGTFRTHALVEEAGKLMRVEREGLTPV QVATVSVNPCSAYRMLKDYVDLVGLSMRWYREGKDVSGGAWFLQNGANSVGRAAVQFGRWLGLRSINVVRERETPEETEKLEELTGL GANVVLTEQFELDRSFRDLGELTKRGKEPLLLGMNCVGGKSASAVVKALSPKGCMTVYGGMSRQSFPPFTGPQIFKRLRFEGFWLSEW GKENPEGKKMIEDILNLMREGKFKEAPVQEVNWEETELKEAVQGTLEGFRSGKGVIFGDT
15	MASSRLGPPLRLPSSGFSRPVAALNCRAAALPLHLPRTA VYRSGPYGYTQAKALVYSKNGEPADVLLKHTHISPSIPSTSVLVRCL AAPINPADVNTIQGTYGSKQPLTSLIGTSEPSAVPGNEGCFEVL SAGSPSELKKGDWVIPAASQIGTWTHAVFGADELLKVDKEGLT PTQVSLVSVNPCTAYRILRSYGPSAGVKAALGMRPLEVSGGQWFI QNGANSVGRAAI QFGKLWGLRSINVIRDRDTVEATDALQOELR DLGADVVAESEFLSRGWDQLAEITRKGREQVGLGLNCVGGKSATALARSLGEGATLVSYGGMAKQPVLPVGLLIFKDIRFVGFWLS KWNQDDVVGRRHMVADILGLMRDGKFRDAPVDEKWDWDTDEATLRGAAGRGLEGFRQGGKGVYVFGDT
16	MASKLISPSPLAQSLRRTRNLAPVTARFPQRRYISAYGYEQAKALTFTEYGDPSAVLSLHSHSISPPHSNYMTRLFLASPINPADIN QIQGVYPSKPTFTTSLGTPNPIAVAGNEGVAEIALGEGVKKEGFKKGDWVFMKGPFGTWRTHASATTNDVVKLNDQMRGITATQAG TVSINPCTAYRMLRDFTTLESGDWFI QNGANSVGRAAIQLGRKWGYKSI INIRSREDKNKEEAMKELHNLGADVITDAELQAQGIK DOAKEWTNGGRSPIRLALNCVNGKAATAMAKLLSSAHFVTYGAMSKQPLTIPASMLIFKDIHFHGFVWSRWAEHPKQKTVADVLD MTRKGEFKDMPVDEIKWEWETKGEELVAKVKDTLEGYRDGKGI FVFGKT

[図4]

配列番号	配列
17	MSNEYSIKELIEKAKYQKKELEAYSEQOVDVLVKALGKVVDNAEMFAKEAVEETEMGVYEDKAKCHLKSGAIWNHIKDKKTGVIKE EPERALVYAKPKGVAAATTPINPVTPMNCNMAAIKGRNTIIVAPHPKAKKVSHTVELNNAELKKLGAPENI IQIVEAPSREA LMEADVYIATGGAGRVKAAAYSSGRPAYGVGPGNSQVIVDKGYDNKAAODIITGRKYDNGIICSSEQSVIAPAEDYDKVIAAFVENG FYVEDEETVEKFRSTLFKDGKINSKIIGKSVQIADLAGVKVPEGTKVIVLKGKGAGEKDVLCHEKMCPLVALKYDTFEEAVEIAMAN YMYEGAGHTAGIHSNDENIRYAGTVLPISRLVYNQATTAGGSFNNGFNPTTLGCGSWGRNSISENLTYEHLINVSRIIGYFNKEAKV PSYEEIWG*
18	MAVDSPPERLQRRIAQLFAEDEQVKAARPLEAVSAVSAAPGMRLAQIAATVMAGYADRPAAQORAFELNTDDATGRTSLRLLPRFETIT YRELWQVGEVAAWHDHDPENPLRAQDFVALLGFTSIDYATLDLADLHLAGVTVPLOASAAVSQIAIILTETSPRLLASTPEHLDAAVE CLLAGTTPERLVFVDYHPEDDDQRAAFESARRRLADAGSSVIVETLDVAVRARGRDLPAAPLFVPDTPDDPLALLIYTSGSTGTPKGAMY NRLAATMWQGNMSLQGNRSQVRGINLNYMPMSHIAGRISLFGVLARGGTAYFAAKSDMSTLFEDIGLVRPTEIFFVPRVCDMVFORYQS ELDRRSVAGADLDTLDREVYKADLRQNYLGGREFLVAVVGSAPLAAEMKTFMESVLDLPLHDGYGSTAGASVLLDNQIQRPVLDYKLV VPGLGYFRDRPHRPGELLKAETIIPGYKRPEVTAEIFDEDEGYKTGDIVAELEHDLVYVDRNNVCLKSGGEFVTVAHLEAVFAS SPLIRQIFIVGSSERSYLLAVIVPTDDALRGRTATLKSALAESIQRIKADANLQPYEIPRDFLIJTEPFTIANGLLSGIAKLLRPNLK ERYGAQLEQMYTDLATGQADELLARREAADLPVLETVSRAAKMLGVASADMPPDAHFTDLGGDSLALSFSNLLHEIFGVEVPVGVV VSPANELRDLNAYIEAERNSSAKRPTFTSVHGGSEIRAADLTLDKFIIDARTLAAADSIHPAPVPAOTVLLTGANGYLGRFLCLEWLER LDKTGGTLICVVRGSDAAAARKRLDSAFDSGDPGLLEHYQGLAARTLEVLAGDIGPNLGLDDATWORLAETVDLIVHFAALVNHVLPY TQLFGPNVVGTAELIVRLAIITARRKPVYTLSTYGVADQVDPACYOEDSDVREMSAVRVVRESYANGYGNKSWAGEVLLREAHDLGGLPVA VFRSDMLLAHSRYAGQLNVQDVFTRLILSLVATGIAPYSFYRTDADGNRQRAHYDGLPADFTAAAITALGQATEGFRTYDVLNYPYDDG ISLDEFVDWLVEGHPRIQRTIDYSWFRHFEATIRALPEKQROASVLPDLDAYRNPCPAVRGAILPAKEFOAAVQTAKIGPEQDIPHL APLIDKYVSDLELLGLL
19	MSPITREERLERRIQDLYANDPQFAAKPATATAAIERPGLLPQIIEVTMTGYADRPALQORSVEFVTDAGTGHITLRLPHFETIS YGLWDRISALADVLTSEQTVKPGDRVCLLGFNSVDYATIDMTLRLGAVAVPLQTSAAITQLQPIVAETQPTMIAASVDALADATELA LSGQTATRVLVFDHHRQVDHRAAYESARERLAGSAVETLAEAIARGDVPRGASAGSAPGTDVSDSLALLIYTSGSTGAPKGANYP RNVATFWRKRTWFGEGYPSITLNFMPMSHVMGRDILYGTLCNGGTAYFVAKSDSLTFEDLALVRPTELTFFVPRVDMVDFEDEFQ RRLVDGADRVALEAQVKAEIRNDVLGGRYTSALTGSAPISDEMKAWEELDMHLYEGYGSTEAGMILIDGAIIRPAVL DYKLVDPDL GYFLTRDRPHRPGELLKVTDSLFPGYYQRAEVTADVFADGDFYRTGDIMAEVGPQFYLDLRRNNVCLKSGGEFVTVSKLEAVFGDSP RQIYIYGN SARAYLLAVIVPTQALDAVPEELKARLGDLSQEVAKAAGLQSYEIPRDFIIEETTPWLTENGLLTGIRKLARPLKKHY ELLEQIYTDLAHGQADELRSLRQSGADAPVLVTVCRAAAALLGGASDVQPDHFTDLGGDSLALSFTNLLHEIFDIEVPVGVIVSPA NDLQALADYVEAARKPGSSRPTFASVHGASNGQVTEVHAGDLSLDFKFIIDAAITLAEAPRLPAANTQVRTVLLTGATGFLGRYLALEW MDLVGGLICLVRAKSDTEARARLDKTFDSGDPPELLAHYRALAGDHLVLEAGDKGEADLGLDRQTWORLADTVLDIVDPAALVNHVLPY SOLFGPNALGTAEILLRLALTSKIKPYSYSTIGVADQIPPSAFTEDADIRVISAATVADDSYANGYGNKSWAGEVLLREAHDLGGLPVA VFRSDMLADITWAGQLNVQDVFTRLILSLVATGIAPGSFYELAADGARQRAHYDGLPVEFIAEASITLGAQSDGFHYHVNPNYDDG IGLDEFVDWLNESGCPRIADIYDGLWLRQFETALRALPDRORHSSLLPLLNHYRORPERVRSIAPTDRFAAAVQEAIGPDKDIPHV APIIKYVSDLRLLGLL
20	MTETIATAVPTTDLLEEQVKRRIEQVVSNDPQLAALLPEDSVTEAVNEPDLPLVEVIRRLLEGYDRPALGQRAFEFVIGDDGATVIAL KPEYITTSYRELWERAETIAAAWHEGGIRDGDFVAGLQFTSTDFASLVDAGRLGTVSVPPLQTGASLQQRNAILLEETRPVFAASIEYL DAADVSVLATPSVRLSVFDYHAEVDSOREALEAVRARLESAGRTIIVVEALAEALARGRDLPAAPLPSADPDALRLIYTSGSTGTPKG AMYPQWLIVANLWQKKWLTDDVIPSIGVNFMPMSHLAGRLTLMGLTSGGGTAYIASSDLSTFFEDIALIRPSEVLFVPRVVENVFRQ AELDRSLAPGESNSEIAERIKVIRIREQDFGGRVL SAGSGSAPLSPMETEFMESLQVPLRDYGSSTEAGGVWRDGLQRPPVTDYKLV VPGLGYFTTDSPHRPGELRLKSETMFGPYKRPETTADVFDEEGYKTDGVVAELGPDHLKYLDRVKNVCLKAQGEFVAVSKLEAAYTG SPLVRQIFVYGNERSFLLAVVYPTPEVLERYADSPDALKPLIQDSLQVQAKDAELQSYEIPRDFIIVETVPFTVESGLLSDARKLLRPK LKDHYGERLEALYAELESQNERLRLQAREAATRPVLETVTDAAAALLGASSDLPADVRFDLGGDSLALSYSSELLRDIFEVDVPVG VINSVANDLAAIARHIEAORTGAATQPTFASVHGKDATVITAGELTLDKFLDESLLKAAKDVQPATADVKTVLVTGGNGLGRWLVDW LERLAPNGKGYALIRGADAEARARLDAYYESGDPKLSAHYRLAQQSLEVIAGDFGDDGLGSGEVWQKLAKDVLDIVHSGALVNHV LPYSQFGPNVAGTAELIKLAI SERLKPVYTLSTYGIADQIPVTEFEEDSDVRVMSAERGINDGYANGYGNKSWAGEVLLREAHDLG PVRVFRSDMILAHSDYHGLNVDVFTRSIQSLLLTGVAPASFYELDADGNRQRAHYDGVPGDFTAASITATGGVNVVDGYRSFVFN HHDGVSMDTFVDWLIDAGYKJARIDDYDQWLARFELALKGLEQQRQGSVLPPLKMYEKPQPAIDGSGALPTAEFSRAVHEAKVDSGSEI PHVTKEILKYASDIQLGLV
21	MHQLTVTGMNICEVQRLFRPNTSDVHDATDGYTETALDDEGSTRRIIAELYATDPEFAAAAPLPAVVDAAHKPLGLRAELIQLTFTGYGD RPALGYRARELATDEGGRITRLLPRFDLTLYAQVWSRVQAVAAALRHNFAQPIYPGDVATYIGFASPDYLTLDVCAYLGLVSVPLQH NAPVSRPLAPLAEVPEIRLITVSAYELDLAVESVRDVNSVSQLVFDHHPVEDDHRDALARAREQLAGKGIATVTLDAIADGAGLPAEP IYTADHDQRLAMILYTSGSTGAPKGANYTEAMVARLWTMSFITGDPITPVINVNFMPLNHLGGRIPISTAVONGGTSYFVPSDMSTLFE DLALVRPTELGVLPRVADWLQYHLLATVDRLYTGGADELTAEOGAAGELREQLVGGRIYIGFVSTAPLAAEMRAFLDITLGAHIVDGYG LITETGAVTRDGVVVRPPVIDYKLDVPELGYFTDQKPYPRGELLVRSQTLTPGYKRPEVTASFVDRDGYHYTGDMVMAETAPDHLVYD RRNNVCLKAQGEFVAVANLEAVFSGAALVRQIFVYGNERSFLLAVVYPTPEALEQYDPAALKAALADSLQRTARDAELQSYEVPADFJ VETEPFSAANGLLSGVGKLLRPNLKDRYQLEQYADIAATOANQLRELRRAAATQVVIDTLTQAAATILGTGSEVASDAHFIDLGGD LSALTLNLLSDFGFEVPVGTIVNPATNLQAQHIIEAGRTAGDRRPSFTTVHGADATEIRASELTLDKFIIDAEITLRAAPGLPKVTT EPRTVLLSGANGWLGRFLTLQWLERLAPVGGTLITIVRGRDAAARARLTQAYDTDPELSRRFAELADRLRVVAGDIGPNLGLTPEI WHRLAAEVDLVVHFAALVNHVLPYRQLFGPNVVGTAELIKLALTERIKPVYTLSTVSVAMGIPDFEEDGDIRTVSPVRPLDGGYANGY NSKSWAGEVLLREAHDLGGLPVATFRSDMILAHPRYRGQVNVPMFTRLLSLLITGVAPRSFYIGDGERPRAHYPLTVDFVAEAVTTL GAQQRGEGYVSVDVNMHDDGISLDVFDWLIRAGHIPIDRVDDYDWWRRFETALTALPEKRRAGTLPPLHLAFRAPQAPLRGAPEPTEV FHAAVRTAKVGPDIPLHDEALIDKYIIRDLREFGLI
22	MTETIATAVPTTDLLEEQVKRRIEQVVSNDPQLAALLPEDSVTEAVNEPDLPLVEVIRRLLEGYDRPALGQRAFEFVIGDDGATVIAL KPEYITTSYRELWERAETIAAAWHEGGIRDGDFVAGLQFTSTDFASLVDAGRLGTVSVPPLQTGASLQQRNAILLEETRPVFAASIEYL DAADVSVLATPSVRLSVFDYHAEVDSOREALEAVRARLESAGRTIIVVEALAEALARGRDLPAAPLPSADPDALRLIYTSGSTGTPKG AMYPQWLIVANLWQKKWLTDDVIPSIGVNFMPMSHLAGRLTLMGLTSGGGTAYIASSDLSTFFEDIALIRPSEVLFVPRVVENVFRQ AELDRSLAPGESNSEIAERIKVIRIREQDFGGRVL SAGSGSAPLSPMETEFMESLQVPLRDYGSSTEAGGVWRDGLQRPPVTDYKLV VPGLGYFTTDSPHRPGELRLKSETMFGPYKRPETTADVFDEEGYKTDGVVAELGPDHLKYLDRVKNVCLKAQGEFVAVSKLEAAYTG SPLVRQIFVYGNERSFLLAVVYPTPEVLERYADSPDALKPLIQDSLQVQAKDAELQSYEIPRDFIIVETVPFTVESGLLSDARKLLRPK LKDHYGERLEALYAELESQNERLRLQAREAATRPVLETVTDAAAALLGASSDLPADVRFDLGGDSLALSYSSELLRDIFEVDVPVG VINSVANDLAAIARHIEAORTGAATQPTFASVHGKDATVITAGELTLDKFLDESLLKAAKDVQPATADVKTVLVTGGNGLGRWLVDW LERLAPNGKGYALIRGADAEARARLDAYYESGDPKLSAHYRLAQQSLEVIAGDFGDDGLGSGEVWQKLAKDVLDIVHSGALVNHV LPYSQFGPNVAGTAELIKLAI SERLKPVYTLSTYGIADQIPVTEFEEDSDVRVMSAERGINDGYANGYGNKSWAGEVLLREAHDLG PVRVFRSDMILAHSDYHGLNVDVFTRSIQSLLLTGVAPASFYELDADGNRQRAHYDGVPGDFTAASITATGGVNVVDGYRSFVFN HHDGVSMDTFVDWLIDAGYKJARIDDYDQWLARFELALKGLEQQRQGSVLPPLKMYEKPQPAIDGSGALPTAEFSRAVHEAKVDSGSEI PHVTKEILKYASDIQLGLV

[図5]

配列番号	配列
23	MKIYGIYMDRPLSQEENERFMTFISPEKREKCRRFYHKEDAHRTLLGDVLRVSVISRQYQLDKSDIRFSTQEYGKPCIPDLPAHFNIS HSGRWVIGAFDSQPIGIDIEKTKPISLEIAKRFFSKTEYSDLLAKDKDEQTDYFYHLWSMKESFIKQEGKGLSLPLDSFVRLHQDQGV SIELPDSHSPCYIKTYEVDPGYKMAVCAHPDFPEDITMVSYEELL
24	MIETILPAGVESAELEYPEDLKAHPAEEHLIAKSVEKRRRDFIGARHCARLALAELEGPPVAIGKGERGAPIWPRGVVGS�THCDGYR AAVAHKMRFRSIGIDAEPHATLPEGVLDSVSLPPEREWLKTDSALHLDRLLFCAKEATYKAWWPLTARWLGFEAAHITFEIEDGSAD SGNGTFHSELLVPGQTNDGGTPLLSTFDGRWLADGFIŁTAIAYA
25	MVKTTEVVSEVSKVAGVRPWAGIFVVEIQEDILADEFTFEALMRTLPLASQARILNKKSFHDCRNLCSQLQLFGCSİVTGLNFQELK FDKGSFGKPFLLDNNRFLPFSMTIGEYVAMFLVKCVSTDEYQDVGIDIASPCNYGGREELFKFVFSEREFNGLLKASDPCTİFTYLW SLKESYTKFTGTGLNTDLSLİDFGALSFFPAEGASMCİTLDEVPLİFHSQWFNNEİVTİCMPKSİSDKİNTNRPKLYNISLSLİDYFI ENDGL
26	MVDMKTİHTSLPFAGHTLHFVEFDPANFCEQDLLWLPHYAQLQHAGRKRTKTEHLAGRIAAVYALREYGYKCPAİGELRQPVWPAEYVG SİSHCGTTALAVVSRQPIGİDİEEİFSVQTARELTDNİİTPAEHERLADCGLAFSLALTLAFSAKESAFKASEİQTDAGFLDYQİİSWN KQQVİİHRENEMFAVHWQİKEKİVİTLCQHD
27	MİREPPHİLNRLPSSASALACSAHALNİJEKRTLDEHEMKALNREVİEYFKEHVNPGFLEYRKSİVTAGGDYGAWEQAGSLNTLİVDTQ GQEFİDCLGGFGİFNVGHRNPVVSAVQNQLAKOPLHSQELLDPİRAMLAKTLAALTPGKLKYSFFCNİSGTESVEAALKAKAYQSPRG KFTFIATSGAFHGKSLGALSATAKSTFRKPFMPİLLPGFRHVPFGNİEAMRTALNECKKTGDVAAVİLEPIQEGGVİLPPPGYLTAVR KLDEFGALMİLDEVQTMGRİTGKMFACEHENVQPDİLCLAKALGGGVMPİGATİATEEVFSVLFDNPFİHTTTFGGNPLACAAALATİ NVİLEQNİLPAQAEQKGDMLİDGFRQLAREYPDİLQVEARGKGLMAİEFVDNEİGYNFASEMFRQRLVAGTLNNAKTİRİEPİLTİTİE QCELİKAARKALAAMRVSEEA
28	MNSQİTNAKTREWQALSİRDHİLPİFTDYKQİLNEKGARİİTKAEGVYİWDSİGNKİLDAMAGİWCVNİGYGREELVQAAİTRQMRİLPFYN İFFQTİHPPVVELAKAİADVAPEİGMNHVİFTGSGSEANDTVİRMVRHYWATKGQPKKVİİGRWNGYHGİSTVAGVSLGGMKALHEQGDİ PİPGİVHİAQPYWYİEGGDMSPDEFİGVAAEQLEKKİLEVGEENVAAFİAEPİQAGGVİVPPDTYWPKİREİLAKYDİLİADEVİCG FİRTGEWFGSQYİGNAPDİMPİAKGLTSGYİPMGGVVVRDEİVEVLNQGGEFYHGFTYSİGHPVAAVALENİRİİREKİİEKVKAETA PYLQKRWQELADHPLVGEARGVGMVALELVKNKİTRERİFTDKİGVGMLCREHCFRNGİIMRAVGDTMİİSPPLVİDPSQİDELİTLARK CLDQİAAAVLA
29	MNSNİELMQRİSQAİPRGVGQİHPİFADRAENCRVWDVEGREYİLDFAGGİAVİLNTGİLHPKVVAAVEAQİKKLSİHTCFQVİLAYEPYİEL CEİMNQKVPDİFAKİTİLLVTİGSEAVENAVKİARAATKRSİTİAFSGAYİHGRİTHYİTLALTİGKVNİYSAGMİLMPGHVYRİLYPCPLHİ SİDDAİASİHRİFKNDAAPEİAAİVİEPVQİEGGİFYASSPAMQRLRALCDEHİMLİADEVQSGAGRTİTLFAMEQMGVAPDİİTİFA KSİAGGİPLAGVTİGRAEVMDAVAPGİLGGTYAGNİACVAALEVLKVFEQENİLQKANDİGQİKİDGLİAİAEKHPEİGDVİRLGAMİA İELFİDGİHNKPDAKİTAEİVARARDKİLİLLSCİPPYİNVİRLİVPLİTİEDAQİRQİLEİİSQCFDEAKQ
30	MSNİEFHQRLİSATPRGVGMİCNİFFAQSAENATİKDVEİGNEYİDİFAAGİAVİLNTGİHRHPDİLVAVEQİLQQFİHTAYQİVPYİSYVİTLA EKİNALAPVSGQAKİAFFİTTGAEAVENAVKİARAİHTGRPGVİAFSGGFİHGRİTYMTMALİTGKVAPYKİİFGİPFGSVYİHPYPSDİLHİS TQDİSLDİAİERİLFKSDİEAKQVAAİİFEPVQİEGGFVAPKELVAAİRRLCDEHİGMİADEVQSGFARTİGKİLFAMDHADKPDİMTMAK SLAGGMPİLSGVVGNANİMDAPAPGİLGGTYAGNİPLAVAAAHAVİNİİDKESİCERANQİLQRLKNTİDİAKESVPAİAAVRİLGSMİAV EFNDPQTİGEPSAAİAQİİQRALAQİLİLLTCİGAYGNVİRFLYPLİTİDAQİDAAMKİLQDALSİD
31	MATİİTNHMPİAELQALDAHHİLPFSİNNALGEEİTRVİTRARGVİLNDSEİGEEİLDAMAGİWCVNİGYGRDEİAEVAARQMRİLPYİN TFFKİTHVPAİAİAQİLAELAPDİLNHVFİAGGİSEANDTİRMVRYİWQNKQİPEKTİİSRKNAYHGİSTVASSALGGMAGMHAQSGİ İPDVHİİNQPNWAEİGDMİPEEİFLARAREİEAİLEİGENRVAAFİAEPVQİAGGVİVAPDSYWPİQRİCDKYDİLİADEVİCGİ GRİGNWFİGTİMGİRPHİMTİAKGLSSGİYAPİGGSİVCDEVAHVİGKDEFNHGİTYSGHPVAAVALENİRİLEENİLDHVNRVAAPY İKEKWEALTDHPLVGEAKİVGMMASİALTPNKASRAKİASEPGİGYİCRERCİFANNİMRHVGDİRMİİSPPLVİTPAEİDEMİVRİRK SLDEAQAEİEKQİGLMKSAA
32	MSMİKSİYAAKEAGGEİLEVYİEYDPİELRPQDVEVQVDYCGİCHSDLSMİDNEWİFSQYPLVAGHEVİGRVVALGSAAQDKİLQVQİRVGİ GWTARSCİGHİDACİSGNQİNCEQİGAVPTİMNİRGİFAEKİLRADQWVİPLPENİDİESAGİLLCGİTİVFKİPLLMHİİTATSRVİGİGİ GLGHİAİKİLLHAMGEVİTAFSSNPAKEQEVİLAMGADKVVNSRDPQALKALAGQFDİİINTVNVSLDWQPYFEALTYGGNFHTVİGAVİTP LSVPAFTİLİAGDRSVSGSATİTPYELRKLMRFAARSKVAPTİELFPMSKİNDİAQHVİRDGİKARYRVVLKADF

[図6]

配列 番号	配列
33	ATGCGTGAAGCCTTTATTTGTGACGGAATTCGTACGCCAATTGGTCGCTACGGCGGGGCATTATCAAGTGTTGCGGCTGATGATCTGGC TGCATCCCTTTGCGGGAAGTCTGGTGGGAAACCCGCGTCTCGATGCGGAGTGATCGATGATGTGATCCTCGGCTGTGCTAATCAGG CGGGAGAAGATAACCGTAACGTAGCCCGGATGGCGACTTTACTGGCGGGGCTGCCGAGAGTGTTCCGGCACAACCATTAAACCGCTTG TGTGGTTCGGGGCTGGACGCACTGGGGTTTCCGCGACGGCGGATTAAAGCGGGCGATGGCGATTGCTGATCGCCGGTGGCGTGGAGTC AATGTCACGGGACCGTTTGTATGGGCAAGGCAGCCAGTGCATTTCTCGTCAAGGTGAGATGTTGATACCACTATTGGCTGGCGAT TTGTGAACCCGCTCATGGCTCAGCAATTTGGAAGTACAGCATGCCGAAACGGCAGAGAATGTAGCTGAAGTGTAAAAATCTCACGA GAAGATCAAGATAGTTTTCGCTACGCAGTCAGCAACGTACGGCAAAAGCGCAATCCTCAGGCATTCTGGCTGAGGAGATTGTTCCGGT TGTGTTAAAAACAAGAAAGTGTGTAAACAGAAATACAACATGATGAGCATCTCGCCCGGAAACGACGCTGGAACAGTTACGTGGGT TAAAGCACCATTTCGTGCCAATGGGGTGATTACCGCAGGCAATGCTTCGGGGTGAAATGACGGAGCCGCTGCGTTGATTATTGCCAGT GAACAGATGGCAGCAGCGCAAGGACTGACACCGCGGGCGGTATCGTAGCCATGGCAACCGCGGGGTGGAACCGCGCCTGATGGGGCT TGGTCCGGTGCCTGCAACTCGCCGGTGTGGAACGCGCAGGGCTGAGTATTCAGGATATGGACGTGATTGAAGTGAACGAAGCGTTTCG CGGCCAGGGCGTTGGGTGTACTACGCGAATTGGGGTGCCTGATGATGCCCCACATGTTAACCCCAACGGAGGGCGCTATCGCCTTAGCG CATCCGTTGGGAATGAGTGGTCCCGCCTGGCACTGGCTGCCAGCCATGAGCTGCATCGGCGTAACGGTCGTTACGCATTGTGCACCAT GTGCATCGGTGTCGGTCAGGGCATGCCATGATTCTGGAGCGTGTTGA
34	ATAAGGAGATATACCATGCGTGAAGCCTTTATTTG
35	TGCGGCCGCAAGCTTTCAAACACGCTCCAGAATCA
36	AAGCTTGCGGCCGCATAATGCTTAA
37	CATGGTATATCTCCTTATTA
38	ATGATGATAAATGTGCAAACTGTGGCAGTGATTGGGAGCGGCACCATGGGGGCAGGCATTGCTGAAGTTGCTGCCAGTCATGGACACCA GGTTTTACTGTATGACATTTCTGCTGAAGCGCTGACCCGCGCAATCGACGGGATACAGCGCGGGCTAAATTCACGCGTGACGCGGGGAA AACTGACTGCTGAAACCTGTGAACGCACATTGAAACGCCTGATCCCGGTGACCGATATTCACGCGCTGGCAGCTCGGACCTGGTCATT GAAGCGGCTGTGAACGTCTGGAAGTCAAAAAAGCGCTCTTTGCACAGCTGGCGGAAGTTTGCCCGCCACAACGCTATTGACCACTAA CACTTCGTCAATCTCTATAACCGCGATTGCTGCGGAGATAAAAAATCCTGAACGTGTTGCGGGGCTGCATTTTTTTAACCCGGCACCGG TGATGAAGTTGGTGGAGGTGGTCAGTGGGCTGGCAACGGCGCGGAAGTTGTTGAGCAGTTGTGTAACCTAACGTTGAGTTGGGGTAAG CAGCCTGTGCGCTGTCACTCGACTCCTGGATTATCGTTAACCGTGTTCGCGCTCCTTATTATTCCGAGGCTTGCGGGCACTGGAAGA GCAGGTTGCTGCACCAAGTGAATTGACGCTGCACTTCGCGATGGCGCTGGTTCCCGATGGGGCCGCTGGAATTAACCGATCTGATTG GTCAGGACGTCAATTTTGTGTACCTGTTCCGTGTTTAAACGCTTTCTGGCAGGAGCGTCGTTTTTACCTTCGCTGGTGCAACAGGAA CTGGTGATTGGTGGACGGTTGGGCAAGAAAAGTGGGCTGGGCGTGTACGACTGGCGCGCGGAACGTGAGGAGTTGTTGGCCTGGAAGC GGTAAGCGCAGTTTTAGCCCAATGAAAGTAGAAAAGAAAAGTGACGGTGTACGGAAATTGACGATGTTTTATTGATTGAGACACAAG GCGAGACGGCACAGGCGCTGGCAATACGACTGGCAGCGCCGGTGGTAGTGATCGATAAAATGGCGGGCAAGGTGGTGACCATTTGCTGCT GCAGCGGTGAACCCGGAAGTCAAGCAGCCGCAAGGCCATTTATTACCTGCAACAGCAGGGCAAAACAGTGTGCAATTTGAGATTACCG AGGAATGCTGATTTGGCGAACGGTAGCAATGATCATCAATGAAGCCCTTGATGCGCTTCAAAAAGGCGTGGCCTGTGAACAGGATATCG ATACCGCATGCGTCTTGGGGTGAATTATCCATATGGCCCACTTGCTGGGGAGCGCAACTGGCTGGCAGCGAATATTAAGGCTCCTT GAAAATCTACAGCATCACTATGGCGAAGAACGCTATCGCCATGTTTCATTGCTGCGCCAACGGGCGCTTCTGGAGAGCGGTTATGAGTC ATAA
39	GGAGATATACATATGATGATAAATGTGCAAACTGT
40	AGACTCGAGGGTACCTTATGACTCATAACCGCTCT
41	GGTACCCTCGAGTCTGGTAAAGAAA
42	CATATGTATATCTCCTTCTT

[図7]

配列 番号	配列
43	ATGAGCGAACTGATCGTCAGCCGTCAGCAACGAGTATTGTTGCTGACCGTTAACCGTCCGCGGCACGTAATGCGCTAAATAATGCCCT GCTGATGCAACTGGTAAATGAACTGGAAGCTGCGGTACCGATACCAGCATTTCCGTCTGTGTGATTACCGGTAATGCACGCTTTTTG CCGCTGGGGCCGATCTCAACGAAATGGCAGAAAAAGATCTCGCGGCCACCTTAAACGATACACGTCCGCAGCTATGGGCGCGATTGCAG GCCTTTAATAAACCACTTATCGCAGCCGTCAATGGTTACGCGCTTGGGCGGGTTGCGAACTGGCATTGTTGTGCGATGTGGTGGTTGC CGGAGAGAACGCGCGTTTTGGGTTGCCGGAAATCACTCTCGGCATCATGCCTGGCGCAGGCGGAACGCAACGTTAATCCGTAGTGTG GTAAATCGTTAGCCAGCAAAATGGTGCTGAGCGGAGAAAGTATACCGCTCAGCAAGCACAGCAGGCCGGGCTGGTTAGCGACGTCTT CCCAGCGATTTAACCTCGAATACGCTTACAGCTGGCATGAAAATGGCACGTCACCTGCGCGTGGCCTTACAAGCGGCAAGCAAGC GCTGCGCCAGTCGCAGGAAGTGCTTTTGAAGCCGGACTTGCCAGGAGCGACAGTTATCACCTTGCTGGCGGCAACAGAAGATCGTC ATGAAGGCATCTCCGCTTTCTTACAAAACGCACGCCGACTTTAAAGGACGCTAA
44	AGGAGATATACCATGAGCGAACTGATCGTCAGCCG
45	TGCGGCCGCAAGCTTTTAGCGTCCTTTAAAGTCGG
46	TTAACGTCCTGCATAGGTGGGTTT
47	AGAAGGAGATATACCATGCAGACCATTTGAAAATGA
48	TGCGGCCGCAAGCTTTTAACGACCGGCATAGGTG
49	AAGCTTGCGGCCGCATAATGCTTAA
50	CATGGTATATCTCCTTCTTAAAGTT

[図8]

配列 番号	配列
51	ATGATTCGTGATGAAGGTATGCTGCAACAGCTGCTGAGCACCATTGCTGATTTTGTAAAAATGAACTGATTCGCGTGAACATGAAGT GGCAGAAAAAGATTGTATTCGGAAGATATTATTCAGCAGATGCGTGAACCTGGGCTGTTTGGTCTGACCATTCCGGAAGAATATGGTG GTCTGGGTATTACCATGGAAGAAGAAGTTAACGTTGCATTGAACTGGGCCAGACCAGTCCGGCATTTCGTAGCCTGATTGGCACC AATGATGTTGGTAGCAGCGGTCTGATTATTGATGGCACCAGGAAGACAGAAACAGAAATATCTGCCTCGTTATGCAAGCGGTGAAATTAT TGGTAGTTTTTGTCTGACCGAACCGGAAGCAGGTAGTGATGCAGCAAGCCTGAAACCACCGCAGTTAAAGATGGTGATTCTATATTC TGAACGGCACCACGCTTTATTACCAATGCACCGCATGCAGCAACCTTACCCTTATGGCAGTACCAATCCGGCAATTAAAGGTGCC GGTGGTATTAGCGCATTTCTGGTTGAAGCAAATACACCGGTATTACGCTGGGTAAATTTGATCAGAAAAATGGGTCAGAAAGGTAGCCA TACCTGTGATGTGATTTTTGAAATTGTCGTGTTCCGGCAAGCGCACTGATTGGTGGTGTGAAGGTGTTGGCTTTAAACCGCAATGA AAGTTCTGGATAAAGGTGCTGTCATATTGGTGCATATAGCGTTGGTGTGCAGAACGTATGCTGAATGATGCACTGCATTATGCCGTT GAACGTAACACGTTTGGTCAGCGATTGCAAATTTTCACTGATTGAGGCAATGCTGGCAGATAGCAAAGCAGAAATTTATGCAGCCAA ATGCATGGTTCTGGATGCAGCACGTCGTGATGAGGGTCAGAATATTAGCAGCAAGCAGCTGTGCAAAAAATGTTTGAACCGGAAA TGTGTGGTCGTGTTGCCGATCGTTGTGTTGAGATTGATGGTGGTGCAGGTTATATTAGCGAATACAGCATTGAACGCTTCTATCGTGAT GTGCGTCTGTTTGCCTGTATGAAGGTACAACCCAGGTGCAGCAGATTATTATCGCCAAAAACATGATCAAGAGGTGACCAGCTAA
52	GAAGGAGATATACATATGATTGCTGATGAAGGTAT
53	TGGCAGCAGCCTAGGTTAGCTGGTCACCTCTTTGA
54	ATGATTACCGCACAGGCAGTTCTGTATACCCAGCATGGTGAACCGAAAGATGTGCTGTTTACCCAGAGCTTTGAAATCGATGATATAA TCTGGCACCGAACGAAAGTTATTGTTAAACCCCTGGGTAGTCCGGTTAATCCGAGCGATATTAAATCAGATTACAGGGTGTATATCCGAGCA AACCGGCAAAAACACCGGTTTTGGCACCACCGAACCGGCAGCACCGGTGTTGTAATGAAGGTCTGTTTGAAGTTATTAAGTGGGCAGC AATGTTAGCAGCCTGGAAGCCGGTATTGGGTTATTCGAGCCATGTGAATTTTGGTACATGGCGTACCCATGCACTGGGCAATGATGA TGATTTTATCAAATGCCGAATCCGGCAGAGCAAGCAATGGTAAACCGAATGGCCTGACCATTAATCAGGGTGCAACCATTAGCG TTAATCCGCTGACCGCATATCTGATGCTGACCCATTATGTTAACTGACACCGGGTAAAGATTGGTTTATTCAGAATGGTGGCACCAGC GCAGTTGGTAAATATGCAAGCCAGATTGGTAACTGCTGAACCTTAATAGCATTAGCGTGATTGCTGATCGTCCGAATCTGGATGAAGT TGTGCAAGCCTGAAAGAACTGGGTGCGACCCAGGTTATTACCGAAGATCAGAATAATAGCCGTGAATTTGGTCCGACCATTAAGAAT GGATTAACAGAGCGGTGGTGAAGCAAACTGGCACTGAATTGTGTTGGTGGTAAAGCAGCACCGGTATTGCAGTAAACTGAATAAT AACGGTCTGATGTTAACCTATGGTGGCATGAGCTTTCAGCCGGTTACCATTCGACCGCCTGTATATCTTTAAAACTTTACCAAGTGC CGGTTTTTGGGTTACCGAGCTGCTGAAAAATAACAAAGAACTGAAACCAGCACGCTGAACCAGATTATTGCATGGTATGAAGAGGGTA AACTGACCGATGCAAAAAGCATTGAAACGCTGTATGATGGCACCACCGCTGCATGAACTGTATCAGGATGGTGTGCAAAATAGCAAA GATGGCAACACAGCTGATCAGCTACTAA
55	GAAGGAGATATACATATGATTACCGCACAGGCAGT
56	TGGCAGCAGCCTAGGTTAGTAGGTGATCAGCTGTT

[図9]

配列番号	配列
57	ATGTTTGTCCAACCGTTGCTGGGAAACGCTTTCTGACCAATCAGCTGCGCAAAAGTCCGCAGTTACCCCGTATGCTGACTTCACACGC GGTGATTTTCAGCTCTCATGGGGAACCCAAAGACGTTCTGAAAACGCATACGTACGAAATCGATGAGAACACATCAAACCCAAACGAGA TTGTCCTGAAAACCTTGGGTGCTCCGGTCAATCCATCGGACATTAACGAGTGCAGGGTGTATATCTAGCCAACCGGAGAAAACGACC CAACTGGGAAGTTCCGGAACCGTCAGCCGTTGGTGGCAATGAAGGGCTCTTTGAGATCATCAAATTTGGCAGTGATGTGAAGGGCTTTCA AGTTGGTGATTGGGCCATTCCGACCTCGGTCAACTTTGGTACGTGGCGTAGTCATGCGCTGTGCGAAGAAGGCCAAATGATGAAAGTCC CGAACCCGGAACAGTCTAAACAGGCCGGTAAGAAACAGGGCTTAACCATCAATCAAGGTGCGACCTTAAGCGTGAATCCGCTTACAGCC TACCTTATGCTCACACACTACGTGAAACTCACACCGGGTAAGGACTGGTTATCCAGAACGGTGCCAATAGCGCAGTCGGAAAAATTTGC GAGCCAAATTTGGGAAATTACTGGGGATTATAGCATTTCCGTGGTTCGCGATCGTCTGAAATTGAAGAAGTGAAGAAGAGCTGAAGG AAGTATGTTGGTGGGACTCAGGTAAATCACCAGAGCAGAACAACTCCAAGGACTTCGGCCCTCAGGTGAAGCAGTGGGTGAAAGAACT GGCAGCGAGATCAAACCTGGCGCTGAATTGCGTAGGTGGCAAAAGCAGTGCAAGGCGTTGCACGGAACTCGCTCCCAACGAGCTGATGCT GACATATGGCGGCATGTCTTTCAACCGGTAACCTTGCCAACGAGCTTGACATTTTCAAGAATGTGACGCTGCGGGCTTCTGGGTGA CGGAAGTCTGAAATCTGATCCGAACCTGAAACGCGAAACCGTTGACAAAATTGTCGAGTGGTATACCTCAGGCGAATTACTTGATGCG CCATCGAAAGAAAATCAGTGGGGTGATCAAGATCTGGCACAAGTGTTTATTGATGCCGTGCGCAACTCCAATCCGGAACAGTTGGT GAAGTTTTAA
58	ATGAGTTCATTTCTCAGCAAACGCTTCATTAGCAGCAGCAACGTGCCATGAGCCAATTGCCGAAAGCCAAATCGCTGATCTACTCATC CCATGATCAGGACGTCAGTAAAATCCTGAAAGTGCATCTTACCAGCCGAAAGGGTCAGCGGAAAGCTCGATCCTGCTCAAAACGTTAG CCTTCCGATCAATCCTTCGACATCAACCACTGGAAGGGGTATATCCGAGTAAGCCGGAAGAGGTGTTGGATTACTCAACGGAAGAA CCGAGCGCTATTGCTGGCAATGAGGGTCTGTTGAGGTTGTATCGGTACCTAGCGGTGTCAAGAATCTGAAAGCTGGTACCGTGTGAT TCACATTCAGGCGAATTTTGGCAGCTGGTCTACGTATCGCAGATGCGAAAGCGAGAATGACTTGATCAAATCGAAGGCGTAGATCTCT ATACCGCAGCAACCATTTGCGGTGAATGGCTGTACCGGTACCAATGGTGAATGACTACATTGAGTGGGATCCTAGTGGCAACGATTGG CTGGTTGAGAACGCGGGTACAAGTTCTGTATCCAAATTTGTACCCAGATCGCTAAAGACAAGGGCATCAAACCTGTGGTGGTTGCG TGATCGCGATAACTTTGACGAAGTTGCGGAGAACTGGAAAGAAATATGGTGGCAGCAAAAGTGATTTCTGAAAGCCGAGAACGGAGAAC GTGAGTTGCGGAATGAAGTCTTACGAAGATTCTTGGTCCCAATGCCAGGTTAACTCGCGTTAACTCTGTGGGCGGTAAAGCTGC ACTAACATTGCCGCAAACTGAGTCCAACCGGATTAATGCTGACCTATGGCGGATGTCCAACAGCCGTTTACTGCAACTGGCCT GTTTATCTTCAATAGCATTGGTGGCAGGTTTCTGGGTTACCGCAAAATTCGAAACGCGATCCGAAAACAAACGGAAGAACTGTGGATG CCGTGGTCAAACCTGTATCGCGATGGCAAGATTATTTCCCGAAAGAGGACATTGCTACCTGGAATGGGATGTCAACAATCTGTCTGAT GAAGGTGCTTGTATTGGTCAACCGCGGAATTGCAACGAAAGGGGCAAGAACATGGTGTGCTGAAATGGTAA
59	ATGAGTCTCGGTTCCGTTAGCGTGAGTTCATTGCTCGGATGTCTCTATCACGGCTCGCGCAATCGTCTATAACCGCGATGGCGA ACCGAAAGATACCTGAAATGCCACAGCTACAAGATCGACCTTCAGAAATTTACAGCCTAACGAGGTTGTCGTACAAACTCTCGCAGCGC CACTGAACCCGAGTGATATCAACCAGATTCAAGGTTTACCCTGCTAAGCCTCCGCTGAGCATTGACTCACTGCCAGAACTGAAAGAA CCGGCCGCTGTTACTGGCAATGAGGGTGTGTTCAAGTGATTGCCAAAGGGTCAATGTAGGAGAAGTGGAAACGGGAGACTGGTGAT TCCGCTGCGGTAACTTTGGTACCTGGTGTACGCACCGCTTAACCAAGGATAAGAATCTGCTGAAATGCGGAAACCATCTCGTTAA ACCAGGCAGCAACCATTTGCCGTCAACCCCTCATCGGCATATCAGATGCTGACGCACTTTGTGAACTGCAACAGGTGATTGGTTATC CAGAATGCGCCAAATCCCAAGTTGGTGGTGCAGCGATTGAGATTGGCCATAAACTGGGGTACAAATCGTTGAACATTGTTCCGAACCG TGACAACCTGGATGAGCTGGTGAAGGACCTGGAATCGATTGGGGCGACTAAAGTGATTACAGAAGATGAAAGCGCGAGCAAGAGTTTG GCGCTACGGTTAAAGAGTGGCTTGAGGGCAAGAGATCAAACCTGGTCTGAATTGCATTGGTGGTCCGCTGCGCTCAAACCTTAGCCCGC AATTGGGCCATGATGCTACCATCTGACGTATGGCGGATGAGCAAGAAACCGCTCTCATTGCCGACTGGGAATTTTCATCTTTAAGAA TCTCACCGCCAAAGGATTTTGGATTACAGGTAACATCAAACGCCATCCAGAAGTGGCATCGAAACCATTAATGCGGTCTGAAATTC TGAAGATGGCACCTTAAGGAACCTAAAGTGAACGAACCCAAAGTCAAACCTGAGTACCACAACAATGAAAGCTTCTTGAACCGTG CTGGCCGCTTGAAGATAGCCAAAGGGCAACAACCTGTTAAATTCGAATAA
60	ATGGCGTCAGTCTTATCACCAACGCGAGCAGCAGTCTGCTGCGTCTGCTACCCGGTCTACACCGCTCGTTTACTGCCGTCGCG AATCTTACACCAAGCGGCAATAACTCCACGCGCAATCCGCGCATTAGCGATCGCGAGTCAATTGCTCAACGGTTAGGTGCTGCTACA AATCGGGCCCGTACGGCTATACGCGAGGCCAAACGCTGGTGTTCGCGTTTCGGGAGAACCTCCGATGTTCTGCGCCTGCATACGCAT AGCATCAGTCCGACACTGCCGATGGTGGGTTCTGGTGGGGGCACTGGCAGTCCAGTAAACCCGGCGGATGTCAACACTATCCAAGG CACCTATGGTGGCGGTCAGCTTTTCAAGCCCTTACTCGGCACTCCGCAACCTAGTGGGTTCCAGGCAACGAAGGTTGCTTTGAAGTTG TCGCAGTTGGTCCACGTGTGGCGGGGCTGCGGTAAGGGGATTGGGTGATTCCGGCCACCACCGGCTTTGGCACCTTTGCGACACAC GCGTTGGTGGAGATGCCGATCGCGCTCTGCTTGGCTAGGAGGTGACAAAGTACCAGGGTCTGACCGCCAAACAGGTGGCCACGGT AAGCGTCAATCCGTGTTCCGCCATCTGATGCTCAAGGACTACGTGATCTGGTGGACTTGAAGTGAAGTCTTTGCTGCGGGTATG GGGCCACTGGCGGGGCGTGGTTTCTCCAGAATGGCGCAATAGCGGAGTTGGTGGCGCGGCGATTGAGCTGGGCGGCTCTGGGGTCTG CGCTCGATTAAAGTGGTTCGTGAACGGCTACCGCGAAGAAACCGAAGCATTGAAAGCGAACTGCGTGAGCTTGGTGGACGGTTGT TGTGACCGAAGCGGAATTCCTTGATCGCTCTTTCTCGGCCGCTTGAAGAAGAGTGGACAGCGCGGATCGGAACCGGTGATGCTGG GTTTGAAGTGTGAGCGGGAAAGCGCGAGCGCCATGATCAAGGCCCTGTCTCGAAAGGTTGATGGTGACTTATGGCGGGATGATG CGTCAGTCATTCCCTTTCCGACTGGTCTCAGATCTTTAAACGCTGCGTTTTGAGGGATTCTGGTGGTGAATGGGCCAAAGAGAA TCCGGCGGAGAAACGCAACACCATTAATGAGATTCTGGAGTGTGCGGGAAGGCAATTCAGAGAGTCTCGTTCAAAGAGTGGAAAT GGAAGTGGGACAGGAAGAAAAGGTAAGTGAAGACGCAATTCAGGCAACCTTGAAGGTTCAAGTCCGGGAAAGGATTTTGTCTTT GCGGACAGTAA

[illegible]

[図11]

配列 番号	配列
66	GAAGGAGATATACATATGTTTGTCCAACCGTTGC
67	TGGCAGCAGCCTAGGTTAAACTTCACCAACTGTT
68	GAAGGAGATATACATATGAGTTCATTTCTCAGCAA
69	TGGCAGCAGCCTAGGTTACCATTTCAGCACAACCA
70	GAAGGAGATATACATATGAGTCTGCGTTCGGTGTT
71	TGGCAGCAGCCTAGGTTATTCGAATTTTAACAGTT
72	GAAGGAGATATACATATGGCGTCAGTCTTATCACC
73	TGGCAGCAGCCTAGGTTACGTGTCCGCAAAGACAA
74	GAAGGAGATATACATATGGCCAGCGCCTTGAATCC
75	TGGCAGCAGCCTAGGTTACGTATCCTTAAAGACGA
76	GAAGGAGATATACATATGGCTAGCATCCTGTCCCC
77	TGGCAGCAGCCTAGGTTAGGTGTCACCGAAGATAA
78	GAAGGAGATATACATATGGCAGCTCCGCGTCTGAC
79	TGGCAGCAGCCTAGGTTAGGTTTCTCAAACACAA
80	GAAGGAGATATACATATGGCGAGTAGTCGCCTGCT
81	TGGCAGCAGCCTAGGTTAGGTATCGCCAAACACGT
82	GAAGGAGATATACATATGGCGTCTAACTGATCTC
83	TGGCAGCAGCCTAGGTTAGGTTTTGCCAAATACGA
84	CCTAGGCTGCTGCCACCGCTGAGCA
85	CATATGTATATCTCCTTCTTATACT

[illegible]

[図13]

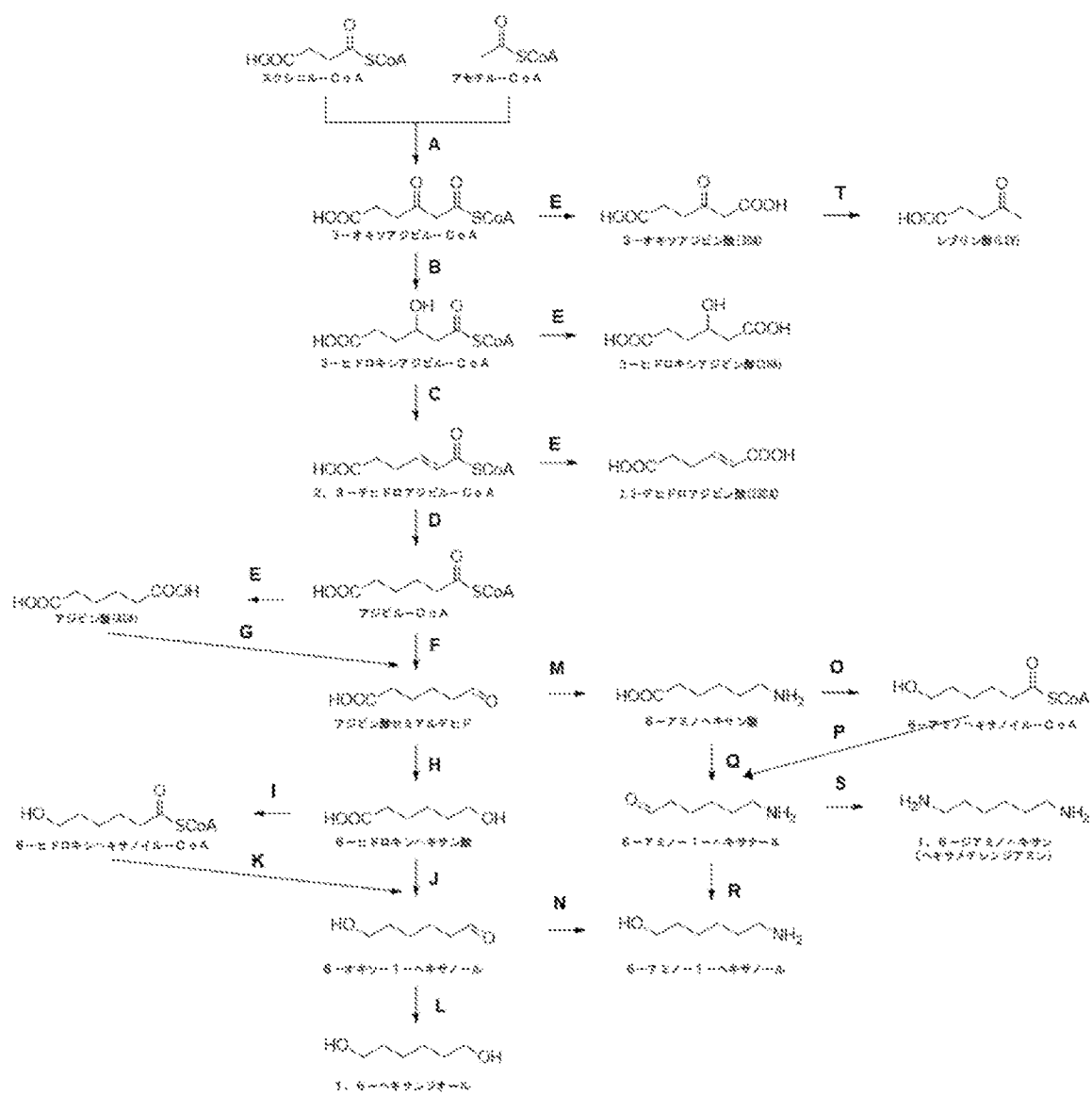
配列 番号	配列
99	TTGTTGAATAAATCGGCACTCGGTATCGCTTACCT
100	TATCGCATGCAGATCGGCTGGTGGTCAACGGTGCC
101	TTGTTGAATAAATCGGAGCGCGACCTGGCGTTGAT
102	TATCGCATGCAGATCACGATATTTTTCAGTTAACC
103	TTGTTGAATAAATCGTTTATCGATATTGATCCAGG
104	TATCGCATGCAGATCTGTGTGCATTACCCAACGGC
105	TTGTTGAATAAATCGCTGCCGCTGTCTGATAACTG
106	TATCGCATGCAGATCTCGATATACCCGTACTTTGT
107	TTGTTGAATAAATCGTCTGTTTGCCGAGAATACGC
108	TATCGCATGCAGATCCGACCATTTTCCGCCACCAT
109	TTGTTGAATAAATCGATATTCGTCCTAACGAACAG
110	TATCGCATGCAGATCTTTTGTATTTCAAGTATGT
111	TTGTTGAATAAATCGCTCATAACGGTACTGCAAAC
112	TATCGCATGCAGATCTCGCAGCAGGTAAGATGATT
113	TTGTTGAATAAATCGATCACCTGGGGTCAGTTGGC
114	TATCGCATGCAGATCCGTCGTTTCATCTGTTTGAGA
115	GATCTGCATGCGATATCTCTAGAACGCGTAAGC
116	CGATTTATTCAACAAAGCCGCCGTCCCG
117	CGATGGTGATTGAACGGTTG
118	GCACTGACGATGACACAATT
119	GAAATTCGCTGCTCTGGAAG
120	CCTGGCAGATAACCTTGGTGTTT
121	TGGTTTAATCTTGCCGCTCC
122	GTGCTATAAACGGCGAGTTTCA
123	TCAGTAGCGCTGTCTGGCAATATAAA
124	AATGCTCTCCTGATAATGTTAAACTTTTTT
125	CATGCAAATTCTCCCGGTGGCGGTA
126	CCAATATGAGGGCAGAGAACGATC
127	TCGCACACTAACAGACTGAA
128	TGTGTTTACTCCTGATTAGC
129	CGTGGTGTTGAAAGCCGATTATTG
130	CATAAACTTCCAGTTCTCCGCC
131	TTAGATTTGACTGAAATCGTACAGTAAAAAGC
132	GTAACACCTACCTTCTTAAGTGGATTT

[図14]

配列番号	配列
133	GCAGCTGCTGCAGCTCGAGAGATCTCTCAAGCCCAAAGGAAGAGTGAGGCGAGTCAG TCGCGTAATGCTTAGGCACAGGATTGATTTGTCGCAATGATTGACACGATTCCGCTTGA CGCTGCGTAAGGTTTGTGTATAATTACAGGCAACCTTTTATTCACTAACAAATAGCTGG TGGAAGATATC
134	AGAAGGAGATATACAT
135	GGTACCCTCGAGTCTGGTAAAGAAACCGCTGCTGCGAAATTTGAACGCCAGCACATGG ACTCGTCTACTAGCGCAGCTTAATTAACCTAGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTA GCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTG
136	GCAGCTGCTGCAGCTCGAGAGATCTCTCAAGCCCAAAGGAAGAGTGAGGCGAGTCAG TCGCGTAATGCTTAGGCACAGGATTGATTTGTCGCAATGATTGACACGATTCCGCTTGA CGCTGCGTAAGGTTTGTGTATAATTACAGGCAACCTTTTATTCACTAACAAATAGCTGG TGGAAGATATC
137	AAGCTTGC GGCCG CAGAAGGAGATATACAT
138	CTAGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGG GTCTTGAGGGGTTTTTTG
139	GCAGCTGCTGCAGCTCGAGAGATCTCTCAAGCCCAAAGGAAGAGTGAGGCGAGTCAG TCGCGTAATGCTTAGGCACAGGATTGATTTGTCGCAATGATTGACACGATTCCGCTTGA CGCTGCGTAAGGTTTGTGTATAATTACAGGCAACCTTTTATTCACTAACAAATAGCTGG TGGAAGATATC
140	ATAAATTTAAGGAGTTCGAT
141	CTAGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGG GTCTTGAGGGGTTTTTTG
142	AAGCAGCTACCGAAAGATGCCCC
143	GGCAGATGATCAAAATATCTCAGCGCAGAT
144	GGGTCTGGAAGGTAAACTGG
145	CGTCAAAGAAGAGCGGGTCAATT
146	AGAGGTTAATGCGAGAGAGAG
147	CTGGATGGTACGGCGATTGG
148	TCGACATCGCTATCGTCACCACCAGG
149	CGCGTATAGGTTTGTATCGCCTGCA
150	TATTCTCAATCCGTTTCAGCACGCG
151	GGATTATTGGCCGTCTTGAAGGTG
152	AGCTGACCATCAGTCACGCCTTTGC
153	CGTCCAGAACAGAGAGCAATAACATCAC
154	TCCGCTAGTGTGATTTTCAGG
155	GAAATTATTATGCCGCCAGGCGT
156	CTGATTCTTTGTGTTGTCTGCGGAG
157	CAGATATTTAGCGAACTCCAGCGTG

[図15]

配列番号	配列
158	MIREPPEHILNRLPSSASALACSAHALNLIKRTLDHKEMKALNREVIEYYKEHVNPGFLEYRKSVTAGGDYGAV EWQAGSLNTLVDTQGGQEFIDCLGGFGIFNVGHRNPVVVSAVQNQLAKQPLHSQELLDPLRAMLAKTAAALTPG KLKYSFFCNSGTESVEAALKLAKAYQSPRGKFTFIATSGAFHGKSLGALSATAKSTFRKPFMPLLPGRHVPFG NIEAMRRALNECKKTGDDVAAVILEPIQEGGVILPPPGYLTA VRKLCDEFGALMILDEVQTMGRTGKMFACE HENVQPDILCLAKALGGGVMPIGATIEEVFSVLFDNPFLHTTTFGGNPLACAAALATINVLLEQNLPQAEQK GDMLLDGRQLAREYPDLVQEARGKGMMLMAIEFVDNEIGYNFASEMFRQRLVAGTLNNAKTIRIEPPLTLTIE QCELVIKAARKALAAMRVSVEEA
159	ATGATACGCGAGCCTCCGGAGCATATTTTGAACAGGTTACCTTCGAGCGCATCGGCTTTAGCGTGACGCGCC CACGCCCTGAATCTCATTGAGAAGCGAACGCTGGATCATAAGGAGATGAAAGCACTTAACCGAGAGGTGATT GAATACTACAAAGAGCATGTCAATCCGGGGTTTTAGAGTATCGCAAATCTGTTACCGCCGGCGGGGATTAC GGAGCCGTAGAGTGGAAGCGGGAAGTTAAATACGCTTGTCGACACCCAGGGCCAGGAGTTTATCGACTG CCTGGGAGGTTTTGAATTTTCAACGTGGGGCACCGTAATCCAGTTGTGGTTCCGCCGTACAGAATCAACT TGCGAAACAACCGCTGCACAGCCAGGAAGTCTCGATCCGTTACGGGCGATGTTGGCGAAAAACCTTGCTG CGCTAACGCCCGGTAAACTGAAATACAGCTTCTTCTGTAATAGCGGCACCGAGTCCGTTGAAGCAGCGCTGA AGCTGGCGAAAGCTTACCAAGTCACCGCGCGGCAAGTTTACTTTTATTGCCACCAGCGGCGCGTTCACCGGTA AATCACTTGGCGCGCTGTGCGCCACGGCGAAATCGACCTTCCGCAAACCGTTTATGCCGTTACTGCCGGGCT TCCGTCAATGTGCCGTTTGGCAATATCGAAGCCATGCGCAGGGCTCTTAACGAGTGCAAAAAAACCGGTGATG ATGTGGCTGCGGTGATCCTCGAACCATTGAGGGTGAAGGTGGCGTAATTCTGCCGCCGCCGGGCTATCTC ACCGCCGTACGTAAGCTATGCGATGAGTTGCGCGCACTGATGATCCTCGATGAAGTACAAACGGGCATGGG GCGCACGGGCAAGATGTTGCGCTGCGAGCATGAGAACGTACAGCCGGATATCCTCTGCCTTGCCAAAGCGC TCGGCGGGCGGTGATGCCGATTGGCGCGACCATCGCCACTGAAGAGGTGTTTTAGTTCTGTTGACAAC CCATTCTGCATACCACCACCTTTGGCGGCAACCCGCTGGCCTGTGCGGCGGCGCTGGCGACCATCAATGT GTTGCTGGAGCAGAACTTACCGGCTCAGGCTGAGCAAAAAGGCGATATGTTGCTGGACGGTTTCCGTCAACT GGCGCGGGAATATCCCGATCTGGTACAGGAAGCGCGTGGTAAAGGGATGTTGATGGCGATTGAGTTTGTG ATAACGAAATCGGCTATAACTTTGCCAGCGAGATGTTCCGCCAGCGCGTACTGGTGGCCGGAACGCTCAATA ACGCCAAAACGATCCGCATTGAACCGCCACTGACACTGACCATTGAACAGTGTGAACTGGTGATCAAAGCGG CGCGTAAGGCGCTGGCGGCCATGCGAGTAAGTGTGAAGAAGCGTAA
160	ATAAGGAGATATACCATGATACGCGAGCCTCCGGA
161	ATGCGGCCGCAAGCTTTACGCTTCTTCGACACTTA
162	ATGATTCGCGACCAGGAAAC
163	TCAAACCTGGACGTCCCGAAT



[図17]

対象 遺伝子	プライマー 塩基配列	配列 番号
paaJ	ATGCTTGACGCCTATCTCTATGCTG	164
	TTACATGCGTTCGATGACTACGG	165
paaH	ATGAACACTGACATCCAGACCC	166
	TCAGTTGTCAGGGGTCAGC	167
paaF	ATGCAAACCATCGAAAACGAAG	168
	TTAACGTCCTGCATAGGTGGGTTT	169
mmgC	ATGATTCGCGACCAGGAAAC	170
	TCAAAC TTGGACGTCCCGAAT	171

[図18]

酵素	アミノ酸配列	配列番号
paaJ(Ec)	MREAFICDGIPTPIGRYGGALSSVRADDLAAIPLRELLVRNPRLDAECIDDVILGCANQAGEDNRN VARMATLLAGLPQSVSGTTINRLCGSLDALGFAARAIKAGDGDLLIAGGVESMSRAPFVMGKA ASAFSRQAEMFDDTTIGWRFVNPLMAQQFGTDSMPETAENVAECLKISREDQDSFALRSQQRRTAK AQSSGILAEIIPVVLKNKKGVVTEIQHDEHLRPETTLEQLRGLKAPFRANGVITAGNASGVNDGA AALIASEQMAAAQGLTPRARIVAMATAGVEPRMLMGLGPVPATRRVLERAGLSIHDMDVIELNEA FAAQALGVRELGLPDDAPHVNPNGGAIALGHPLGMSGARLALAASHELHRRNGRYALCTMCI GVGQGIAMILERV*	172
paaH(Ec)	MMINVQTVAVIGSGTMGAGIAEVAASHGHQVLLYDISAEALTRAIDGIHARLNSRVTRGKLTATC ERTLKRIPVTDIHALAAADLVIEAASERLEVKKALFAQLAEVCPPTLLTTNTSSISITAAIEIKNPE RVAGLHFFNPAPVMKLVVVSGLATAAEVVEQLCELTLSWGKQPVRCSTPGFIVNRVARPYYS EAWRALEEQAAPVIDAALRDGAGFPMGPLELTDLIGQDVNFVTCVFNFWQERRFLPSLV QQELVIGGRLGKKSGLVYDWRAREAVVGLEAVSDSFSPMKVEKKSDGVTEIDVLLIETQGET AQALAIRLARPVVIDKMAGKVVTIAAAVNPD SATRKAIYYLQQQGKTVLQIADYPGMLIWRTVA MIINEALDALQKGVASEQDIDTAMRLGVNYPYGPLVWGAQLGWQRILRLLENLQHHYGEERYRP CSLLRQRALLESGYES*	173
paaF(Ec)	MSELIVSRQQRVLLLTNRPAARNALNNALLMQLVNELEAAATDTSISVCVITGNARFFAAGADL NEMAEKDLAATLNDTRPQLWARLQAFNKPLIAAVNGYALGAGCELALLCDVVVAGENARFGLPE ITLGIMPGAGGTQRLIRSVGKSLASKMVLSGESITAAQQAQAGLVSDVFPD LLEYALQLASKM ARHSPALQAAKQALRQSQEVALQAGLAQERQLFTLLAATEDRHEGISAFLQKRTPDFKGR*	174
crt(Ck)	MEFKNIILEKDGNVASITLNRPKALNALNAATLKEIDAAINDIAEDDNVYAVIITGSGKAFVAGADIA EMKDLTAVEGRKFSVLGNKIFRKLENLEKPVIAAINGFALGGGCELSLSCDIRIASSKAKFGQPEVG LGITPGFGGTQRLARAIGVGMAKELIYTGKVINAEALRIGLVNKVVEPD KLL EAKALVD AIIVNAP IAVRMCKAAINQGLQCDIDTGVAYEAEVFGCFATEDRVEGMTAFVEKRD KAFKNK*	175
ech(Pp)	MSKYEGRWTTVKVELEAGIAWVTLNRPEKRNAMSP TLNREMVDVLETL EQDADAGVLVLTGAG ESWTAGMDLKEYFREVDAGPEILQEIRREASQWQWKLRLRYAKPTIAMVNGWCFGGGFSPLVA CDLAICANEATFGLSEINWGIPGNLVSKAMADTVGHRQSLYYIMTGKTFDGRKAAEMGLVND VPLAELRETTRELALNLEKNPVVLR AAKNGFKRCREL TWEQNEDYLYAKLDQSRLLDTTGGRE QGMKQFLDDKSIKPLQAYKR*	176
dcaA(Ab)	MIRDEGMLQQLLSTIRDFVKNELIPREHEVAEKDCIPEDIIQQMRELGLFGLTIPEEYGG LGITMEEF VNVAFELGQTSPAFRSLIGTNNGIGSSGLIIDGTEEKQKYLPRYASGEIIGSFCLTEPEAGSDAASL KTTAVKDGDFYILNGTKRFITNAPHAATFTVMARTNPAIKGAGGISAFLEANTPGITLGKIDQKM GQKGSHTCDVIFENCRVPASALIGGVEGVGFKTAMKVL DKGRLHIGAYSVGVAERMLNDALHYA VERKQFGQPIANFQLIQAMLADSKAEIYAAKCMVLD AARRRDEGQNISTEASCAKMFATEMCGR VADRCVQIHGGAGYISEYSIERFYRDVRLFRLYEGTTQVQIII AKNMIKEVTS*	177
Tfu1647	MSDFDLRYRPTTEEHEALREAIRSVAEDKIAPHAADVDEQSRFPQEAYEALRASDFHAPHVAEEYGG VGADALATCIVIEIARVCASSSLIPAVNKLGSMP LILSGSDEVKQRYLPELASGEAMFSYGLSERE AGSDTASMRTRAVRDGDWILNGQKSWITNAGISKYYTVM AVTDPDGPRGRNISAFVHHDDPG FSFGEPERKLGIKGSPTRELIFDNVRIPGDRLVGKVGEGRLRTALRTL DHTRTVIGA QAVGIAQGALD YALGYVKERKQFGKAIADFQGIQFMLADMAMKLEAARQM VYVAAKSERDDADLSFYGAAAKC FASDVAMEITTDVQLLGGYGYTRDYPVERMMRDAKITQIYEGTNQIQRVVMARQLLKK*	178
tesB(Ab)	MNTLTQELVELLSLEKLEENLYRGM SRNLVGKRVFGGQVLGQALRAASYTTDRPAHSLHAYFLY GGDVNAPIIYEVDPLRDGKSFVSRQVRAIQHGR TIFSAMVSFASPEEGLNYQNDMPDYPAPEQLK SEAELKGLIDFVPENVRASFMRRERHIEIRPVEPVNPFQPPQAPTNAHYIRTHDKIGKAFDQIALH QSIVAFYSDFTLMTTALKPHGLSYLSPSLQCASIDHTIYFHRPLRADEWMLYDMDATVSAGSRGL NFGRMWQNGLLVCSTVQEGLMRLREIETQ*	179

[図19A]

酵素	塩基配列	配列番号
paaJ(Ec)	ATGCGTGAAGCCTTTATTTGTGACGGAATTCGTACGCCAATTGGTCGTACGGCGGGGCATTATCAAGTGTTCGGGCTGATGATCTGGCTGCTATCCCTTT GCGGGAACTGCTGGTGCAGAAACCCGCTCTCGATGCGGAGTGTATCGATGATGTGATCCTCGGCTGTGCTAATCAGGCGGGAGAGATAACCGTAACGT AGCCCGGATGCGCAGCTTTACTGGCGGGGCTGCCGACAGAGTGTTCGCGCACAAACCTTAACCGCTTGTGTGGTTCGGGCTGGACGCACTGGGGTTTGC CGCACGGGGCATTAAAGCGGGCGATGGCGATTTGCTGATCGCCGCTGGCGTGGAGTCAATGTACCGGGCACCGTTTGTATGGGCAAGGCAGCCAGTGC ATTTTCTCGTCAGGCTGAGATGTTGATACCACTATTGGCTGGCGATTGTGAACCCGCTCATGGCTCAGCAATTTGGAAGTACAGCATGCCGGAACG GCAGAGAATGTAGCTGAAGTGTAAAAATCTCAGGAGAAGATCAAGATAGCTTTTGGCTACGCAGTCAGCAACGTACGGCAAAAGCGCAATCCTCAGGCA TTCTGGCTGAGGAGATTGTTCCGTTGTGTTGAAAAACAAGAAAGGTGTTGTAACAGAAATACAACATGATGAGCATCTGCGCCCGGAAACGACGCTGGA ACAGTTACCTGCGTTAAACACCACTTCGTGCCAATGCGGTGATTACCCGACGCCAATGCTTCCGGGCTCAATGACCGAGCCGCTCGCTTCAATTATCCG AGTGAACAGATGGCAGCAGCGCAAGGACTGACACCGCGGGCGGTATCGTAGCCATGGCAACCGCCGGGGTGGAACCGCGCTGATGGGGCTTGGTCC GGTGCTGCAACTCGCCGGTGTGGAACGCGCAGGGCTGAGTATTACAGATATGGACGTGATTGAAGTGAACGAAGCGTTCGCGGCCAGGCGTTGGG TGTACTACGCAATTGGGGCTGCCTGATGATGCCCCACATGTTAACCCCAACGGAAGCGCTATCGCTTAGGCCATCCGTTGGGAATGAGTGGTCCCGC CTGGCACTGGCTGCCAGCCATGAGCTGCATCGGCGTAACGGTCGTTACGCATTGTGCACCATGTGCATCGGTGTCGGTCAGGGCATCGCCATGATTCTGG AGCGTGTGTA	180
paaH(Ec)	ATGATGATAAATGTGCAAACTGTGGCAGTGATTGGGACGGGCACCATGGGGCAGGCATTGCTGAAGTTGCTGCCAGTCATGGACACCAGGTTTACTGT ATGACATTTCTGCTGAAGCGCTGACCCGCGCAATCGACGGGATACACGCGCGGCTAAATTCACGCGTGACGCGGGGAAAACCTGACTGCTGAAACCTGTG AACGCACATTGAAACGCGCTGATCCGGTGACCGATATTCACGCGCTGGCAGCTGCGGACCTGGTCATTGAAGCGCGCTGTAACGCTGGAAGTCAAAAA AGCGCICIIIGCACAGCIGCGGAAGIIIGCCCGCCACAAACGCIAGIIGACCACIAACACIICGICAAICICIAIAACCGCGAIIGCIGCGGAGIAAAAA ATCCTGAACCGTGTTCGCGGGCTGCATTTTTTAACCCGCGCACCGCTCATGAAGTTGCTGAGCTGCTCACTGGGCTGGCAACCGCGCGCGCAACTTCTTG AGCAGTTGTGTGAAGTAAAGTTGAGTTGGGTAAAGCAGCTGTGCGCTGTCTTACGACTCCTGGATTATCGTTAAACCGTGTTCGCGCTCCTTATTATTC GAGGCTGGCGGCACTGGAAGAGCAGGTTGCTGCACCGAAGTGATTACGCTGCACTTCGCGATGGCGCTGGTTTCCCGATGGGCGCTGGAAATTA ACCGATCTGATTGGTCAGGACGTAATTTTCTGTACCTGTTCCGGTGTAAACGCTTCTGGCAGGAGCGTCTGTTTTTACCTTCGCTGGTGCAACAGGA ACTGCTGATTGGTGACGCTTGGGCAAGAAAAGTGGGCTGGCGGTGACGACTGGCGCGCGAAGCTGAGGCAAGTTTGGCTGGAAGCGGTAAAGCG ACAGTTTTAGCCCAATGAAGTAGAAAAGAAAAGTAGCGGTGTACGGAATTCAGCATGTTTTATTGATTGAGACACAAGCGAGACGGCACAGGCGCT GGCATATCAGATGGCAGCGCGGTGGTAGTGTATGATGATAAAATGGCGGGCAAGGTGGTGACCATTTGCTGCTGACGCGGTGAACCGGACTCAGCGACCG CAAGGCCATTTATTACCTGCAACAGCAGGGCAAAACAGTGTGCAAAATTCAGATTAACCGAATGCTGATTGGCGAACGGTAGCAATGATCATCAAT GAAGCCCTTGATGCGCTTCAAAAAGGCGTGGCTCTGAACAGGATATCGATACCGCCATGCGTCTTGGGGTGAATATCCATATGGCCCACTGTCTGGG GAGCGCAACTTGGCTGGCAGCGAATTTAAGGCTCCTGAAAATCTACAGCATCACTATGGCGAAGAACGCTATCGCCCATGTTGATTGCTGCGCAACG GCGCTTCTGGAGAGCGGTTATGAGTCATA	181
paaF(Ec)	ATGAGCGAACTGATGTCAGCGCTCAGCAACGAGTATTGTTGCTGACCCCTTAACCGTCCCGCGCACGTAATGCGCTAAATAATGCCCTGCTGATGCAAC TGGTAAATGAAGTGAAGCTGCGGCTACCGATACCAAGCATTTCCGGTCTGTGTGATTACCGGTAATGCACGCTTTTTCGCGCTGGGGCGGATCTCAACGA AATGGCAGAAAAAGATCTCGCGGCCACCTTAAACGATACAGTCCGACGATGCGCGCGATTGCGAGGCTTTAATAAACCCATTATCGCAGCCGTAAT GGTACGCGCTTGGGGCGGGTTGCGAACTGGCATTGTTGTGCGATGTGGTGGTTGCCGGAGAGAACGCGCTTTTGGGTTGCCGGAATCACTCTCGGC ATCATGCCCTGGCGCAGCGGAAACGCAACGTTAATCCGTAGTGTGCGTAAATCGTTAGCCAGCAAAATGGTGTGAGCGGAGAAAGTATCAGCGCTCAGC AAGCAGCAGCGCCGGCTGGTTAGCGAGCTTTCCCGAGCGATTTAACCCCTCAATACGCTTACAGCTGGCATCGAAAATGGCACGCTCACTCGCGCT GGCTTACAAGCGGCAAGCAAGCGCTGCGCCAGTGCAGGAAGTGGCTTTGCAAGCCGACTTGGCCAGGAGCGACAGTTATCACCTTGTGTGGCGC AACAGAAGATCGTCATGAAGGCATCTCCGCTTTCTTACAAAAACGACGCGCGACTTTAAAGGACGCTAA	182
crt(Ec)	ATGGAAIICAGAACAICAICCGGAAAAAGAGIIGIAAIGIIGCCAGCAIACCCIGAAICGICCGAAAGCACIGAAIGCCCIGAAIGCAGCAACCCIGAA AACAAATTCATGCAAGCATTAAATGATATCCCGAAGATCATATGTCATACCCGCTCATTATACCCGTACCGGTAAAGCATTGTTCGCGCTGCACATATT GCAGAAATGAAGATCTGACCGCAGTTGAAGGTGCGCAATTTAGCGTTCTGGGCAATAAAATCTTTTCGAAACTGGAAATCTGGAAAAACCGTTATTG CCGCAATTAATGGTTTTGCAATTAGGTGGTGGTTGTGAAGTGAAGCCTGAGCTGTGATATTCGATTGCAAGCAGCAAAAGCAAAATTTGGTCAGCCGGAAGTT GGTCTGGGTATTACCCCTGGTTTTGGTGGCACCAGCGTCTGGCAGTGCAATTGGTGGTATGGCAAAAGAACTGATTATACCGGCAAGTGATTA ATGCAGAGAAGCACTGCGTATTGGTCTGTTAATAAAGTTGTTGAACCGGACAAACTGCTGGAAGAGCAAAAGCAAGCACTGGTTGATGCCATTATTGTTAAT GCACCGATTGCGAGTTCTGATGTGAAGAGCAAAATTAATCAGGGTCTGCGAGTGTGATATTGATACCGGTGTTGATATGAAGCCGAAGTTTTTGGTGAATG TTTTGCAACCGAAGATCGTTTGAAGGTATGACCGCTTTGTTGAAAAACGTGATAAAGCCTTTAAAAACAAATAA	183

[図19B]

[illegible]

[図20A]

対象 遺伝子	プライマー 塩基配列	配列 番号
paaJ(Ec) IF	ATAAGGAGATATACCATGCGTGAAGCCTTTATTTG	188
	TGCGGCCGCAAGCTTTCAAACACGCTCCAGAATCA	189
pRSFDuet-P1	AAGCTTGCGGCCGCGCATAATGCTTAA	190
	CATGGTATATCTCCTTATTA	191
paaH(Ec) IF	GGAGATATACATATGATGATAAATGTGCAAACTGT	192
	AGACTCGAGGGTACCTTATGACTCATAACCGCTCT	193
pRSFDuet-P2	GGTACCCTCGAGTCTGGTAAAGAAA	194
	CATATGTATATCTCCTTCTT	195
paaF(Ec) IF	AGGAGATATACCATGAGCGAACTGATCGTCAGCCG	196
	TGCGGCCGCAAGCTTTTAGCGTCCTTTAAAGTCGG	197
paaF(L3)opt	AGAAGGAGATATACCATGCAGACCATTGAAAATGA	198
	TGCGGCCGCAAGCTTTTAACGACCGGCATAGGTCTG	199
crt1(Ck)opt	AGAAGGAGATATACCATGGAATTCAAGAACATCAT	200
	TGCGGCCGCAAGCTTTTATTTGTTTTTAAAGGCTT	201
ech(Pp)opt	AGAAGGAGATATACCATGAGCAAATATGAAGGTCG	202
	TGCGGCCGCAAGCTTTTAACGTTTATATGCCTGCA	203
pETDuet-P1	AAGCTTGCGGCCGCGCATAATGCTTAA	204
	CATGGTATATCTCCTTCTTAAAGTT	205
dcaA(Ab)	GAAGGAGATATACATATGATTCTGTGATGAAGGTAT	206
	TGGCAGCAGCCTAGGTTAGCTGGTCACCTCTTTGA	207
Tfu1647	GAAGGAGATATACATATGAGTGACTTCGACCTCTA	208
	TGGCAGCAGCCTAGGTCACCTTCTTCAAGAGCTGCC	209
mmgC(L3)opt	GAAGGAGATATACATATGATCCGTGATCAAGAAAC	210
	TGGCAGCAGCCTAGGTTACACCTGGACATCACGAA	211
pETDuet-P2	CCTAGGCTGCTGCCACCGCTGAGCA	212
	CATATGTATATCTCCTTCTTATACT	213
tesB(Ab)	ATAAGGAGATATACCATGAATACACTAACCCAAGA	214
	TGCGGCCGCAAGCTTTTACTGTGTTTCAATTTTAC	215
pCDFDuet	AAGCTTGCGGCCGCGCATAATGCTTAA	216
	CATGGTATATCTCCTTATTA	217

[図20B]

対象 遺伝子	プライマー 塩基配列	配列 番号
ldh	TTGTTGAATAAATCGTTTATCGATATTGATCCAGG	218
	TATCGCATGCAGATCTGTGTGCATTACCCAACGGC	219
atoB	TTGTTGAATAAATCGGCACTCGGTATCGCTTACCT	220
	TATCGCATGCAGATCGGCTGGTGGTCAACGGTGCC	221
sucD	TTGTTGAATAAATCGGAGCGCGACCTGGCGTTGAT	222
	TATCGCATGCAGATCACGATATTTTTCAGTTAACC	223
pHAK1	GATCTGCATGCGATATCTCTAGAACGCGTAAGCTT	224
	TCTCGAGCCGATTTATTCAACAAAGCCGC	225
del-ldh	TGGTTTAATCTTGCCGCTCC	226
	GTGCTATAAACGGCGAGTTTCA	227
del-atoB	CGATGGTGATTGAACGGTTG	228
	GCACTGACGATGACACAATT	229
del-sucD	GAAATTCGCTGCTCTGGAAG	230
	CCTGGCAGATAACCTTGGTGTTT	231
paaJ(L3)opt	ATAAGGAGATATACCATGCTGGATGCATATCTGTA	232
	TGCGGCCGCAAGCTTTTACATACGTTCAATAACAA	233
paaH(L3)opt	GAAGGAGATATACATATGAACACCGATATTCAGAC	234
	AGACTCGAGGGTACCTTAATTATCCGGTGTCAGCA	235

[図21]

(配列番号 236)

MSNEVSIKELIEKAKVAQKKLEAYSQEQVDLVKALGKVVDNAEMFAKEAVEETEMGVYEDKVAKCHLKSGAIWNHDKKTVGI
 IKEEPERALVYVAKPKGVVAATTPITNPVVTMCNAMAIIKGRNTIIIVAPHPKAKKVSHTVELMNAELKKLGAPENIIQIVEAPS
 REAAKELMESADVVIATGGAGRVKAAAYSSGRPAYGVGPNSQIVDKGYDYNKAAQDIITGRKYDNGIICSSEQSVIAPAEDYDKV
 IAAFVENGAFYVEDEETVEKFRSTLFKDGKINSKIIIGKSVQIIADLAGVKVPEGTKVIVLKGGGAGEKDVLCCEKMCPVLVALKYD
 TFEEAVEIAMANYMYEGAGHTAGIHSNDNENIRYAGTVLPISRLVVNQPATAGGSFNNGFNPTTTLGCGSWGRNSISENLTYEHL
 INVSRIGYFNKEAKVPSYEEIWG*

[図22A]

(配列番号 2 3 7)

MAVDSPDERLQRRIAQLFAEDEQVKAARPLEAVSAVSAAGMRLAQIAATVMAGYADRPAAAGQRAFELNTDDATGRTSLRLLPRFE
 TITYRELWQRVGEVAAAWHDPENPLRAGDFVALLGFTSIDYATLDLADIHLGAVTVPLQASAAVSQLIAILTETSPRLLASTPEH
 LDAAVECLLAGTTPERLVVFDYHPEDDDQRAAFESARRRLADAGSSVIVETLDAVRARGRDLPAAPLFVPDTPDDPLALLIYTSGS
 TGTPKGAMYTNRLAATMWQGNMLOGNSQRVGINLNYMPMSHIAGRISLFGVLARGGTAYFAAKSDMSTLFEDIGLVRPTEIFFVP
 RVCDMVFQRYQSELDRRSVAGADLDTLDREVKADLRQNYLGGRFLVAVVGSAPLAAEMKTFMESVLDLPLHDGYGSTEAGASVLLD
 NQIQRPVLDYKLVDPPELGYFRTDRPHPRGELLKKAETTIPGYKRPEVTAEIFDEDGFYKTGDIVAELEHDLVYVDRNNVLK
 LSQGEFVTVAHLEAVFASSPLIRQIFIYGSSERSYLLAVIPTDDALGRDSTATLSALAESIQRIAKDANLQPYEIPRDFLIETE
 PFTIANGLLSGIAKLLRPNLKERYGAQLEQMYTDLATGQADELLALRREAADLPVLETVSRAAKAMLGVASADMRPDHFTDLGGD
 SLSALSFSNLLHEIFGVEVPVGVVSPANELRDLANYIEAERNNGAKRPTFTSVHGGGSEIRAADLTLDKFI DARTLAAADSIPHA
 PVPAGTVLLTGANGYLGRFLCLEWLERLDKTGGTLCVVRGSDAAAARKRLDSAFDSGDPGLLEHYQQLAARTLEVLAGDIGDPNL
 GLDDATWQRLAETVDLIVHPAALVNHVLPYTQLFGPNVGTAEIVRLAITARRKPVTYLSTVGADQVDPAEYQEDSDVREMSAVR
 VVRESYANGYNSKWAGEVLLREAHDLGGLPVAVFRSDMILAHRYAGQLNVQDVFTRLILSLVATGIAPYSFYRTDADGNRQRAH
 YDGLPADFTAAAITALGIQATEGFRTYDVLNPYDDGISLDEFVDWLVEGHPHQRIIDYSDWFHRFETAIRALPEKQRQASVLPPL
 DAYRNPCPAVRGAILPAKEFQAAVQTAKIGPEQDIPHLAPLIDKYVSDLELLQLL

[図22B]

(配列番号 2 3 8)

MSPITREERLERRIQDLYANDPQFAAAKPATAITAAIERPGLPLPQIIETVMTGYADRPALAQRSVEFVTDAGTGHTTLRLLPHFE
 TISYGELWDRISALADVLSTEQTVKPGDRVCLLGFNSVDYATIDMTLARLGAVAVPLQTSAAITQLQPIVAETQPTMIAASVDALA
 DATELALSGQTATRVLVFDHHRQVDAHRAAVESARERLAGSAVETLAEIARGDVPRGASAGSAPGTDVSDSLALLIYTSGSTG
 APKGAMYPRRNVATFWRKRTWFEGGYEPSITLNFMPMSHVMGRQILYGTLCNGGTAYFVAKSDLSTLFEDLALVRPTLTFVPRVW
 DMVFDEFQSEVDRRLVDGADRVALEAQVKAERNDVLGGRYTSALTGSAPISDEMKAWEELDMHLVEGYGSTEAGMILIDGAIR
 RPAVL DYKLVDPDLGYFLTDRPHPRGELLVKTDLSLFGGYQRAEVTADVFADGFYRTGDIMAEVGPEQFVYLDRRNNVLKLSQG
 EFVTVSKLEAVFGDSPLVRQIYIYGNSARAYLLAVIPTQEALDAVPVEELKARLGDSLQEVAKAAGLQSYEIPRDFI IETTPWTL
 ENGLLTGIRKLARPQLKKHYGELLEQIYTDLAHQADELRSLRQSGADAPVLVTVCRAAAALLGGSASDVQPDHFTDLGGDSL
 LSFTNLLHEIFDIEVPVGVIVSPANDLQALADYVEAARKPGSSRPTFASVHGASNGQVTEVHAGDLSLDKFI DAATLAEAPRLPAA
 NTQVRTVLLTGATGFLGRYLALEWLERMDLVDGKLICLVRAKSDTEARARLDKTFDSGDPPELLAHYRALAGDHLEVLADGKGEADL
 GLDRGTWQRLADTVDLIVDPAALVNHVLPYSQFLGPNALGTAELLRLALTSKIKPYSYSTIGVADQIPPSAFTEDADIRVISATR
 AVDDSYANGYNSKWAGEVLLREAHDLGGLPVAVFRCDMILADTTWAGQLNVPDMFTRMILSLAATGIAPGSFYELAADGARQRAH
 YDGLPVEFIAEAI STLGAQSQDGFHTYHVMNPYDDGIGLDEFVDWLNESGCPHQRIADYGDWLQRFETALRALPDRQRHSSLLPLL
 HNYRQPERPVRGSIAPTDRFRAAVQEAKIGPDKDIPHVGAPIIVKYVSDLRLLGLL

[図22C]

(配列番号 2 3 9)

MTETISTAAPTDLLEEQVKRRIEQVVSNDPQLAALLPEDSVTEAVNEPDLPLVEVIRRLLEGYGDRPALGQRAFEFVTGDDGATV
IALKPEYTTVSYRELWERAETIAAAWHEQGIRDGDFVAQLGFTSTDFASLDVAGLRRLGTVSVPLQTGASLQQRNAILLETRPAVFA
ASIEYLDAAVDSVLATPSVRLLSVFDYHAEVDSQREALEAVRARLESAGRTIVVEALAEALARGRDLPAAPLPSADPDALRLLIYT
SGSTGTPKGAMYPQWL VANLWQKKWLTDDVIPSIGVNFMPMSHLAAGRLTLMGTLSGGGTAYYIASSDLSTFFEDIALIRPSEVLV
PRVEMVFQRFQAEldrslapGESNSEIAERIKVRIREQDFGGRVL SAGSGSAPLSPEMTEFMESLLQVPLRDGYGSTEAGGVWRD
GVLQRPPVTDYKLVDVPELGYFTTDSHPRGLRLKSETMFPGYKRPETTADVFDDEGYKTDGVVAELGPDHLKYLDVKNVVK
LAQGEFVAVSKLEAAYTGSPVLRQIFVYGNRSERSFLLAVVPTPEVLERYADSPDALKPLIQDSLQQVAKDAELQSYEIPRDFIVE
TVPFTVESGLLSDARKLLRPKLKDYGERLEALYAEAESQNERLRQLAREAAATRPVLETVTDAALLGASSDLAPDVRFIDL
GDSLSALSYSELLRDI FEVDVPVGVINSVANDLAAIARHIEAQTGAATQPTFASVHGKDATVITAGELTDKFLDESLLKAAKDV
QPATADVKTVLVTGGNGWLGRWLVLDWLERLAPNGGKYALIRGADAEAAARLDAVYESGDPKLSAHYRQLAQQSLEVIAGDFGD
QDLGLSQEVWQKLAKVDLIVHSGALVNHVLPYSQLFGNVAGTAEIKLAI SERLKPVTYLSTVGIDQIPVTEFEEDSDVRVMS
AERQINDGYANGYGNKWAGEVLLREAHDLAGLPVRVFRSDMILAHSDYHGQLNVTDFVTRISQLLLTGVPASFYELDADGNRQ
RAHYDGVPGDFTAASITAI GGNNVVDGYRSFDFVFNPHHDGVSMDFVDWLIDAGYKIARIDDYQWLARFELALKGLPEQQRQSV
LPLLKMYEKPQPAIDGSALPTAEFSRAVHEAKVGSGEIPHVTKELILKYASDIQLLGLV

[図22D]

(配列番号 2 4 0)

MHQLTVTGMNICEVQRLFPRMTSDVHDATDGVETETALDDEQSTRRIAELYATDPEFAAAAPLPAVVDAAHKPLRLAEILQTLFTG
YGDRPALGYRARELATDEGGRTVTRLLPRFDTLTYAQVWSRVQAVAAALRHNFAQPIYPGDAVATIGFASPDYLTDLVCAYLGLV
SVPLQHNAPVSRLAPILAEVEPRILTVSAEYLDLAVESVRDVNSVSQLVVFDDHHEVDDHRDALARAREQLAGKGI AVTTLDIAID
EGAGLPAEPIYTADHDQRLAMILYTSGTGAPKGAMYTEAMVARLWTMSFITGDPTVINNVFMPLNHLGGRIPISTAVQNGGTSY
FVPESDMSTLFEDLALVRPTLGLVPRVADMLYQHHLATVDRLVTQGADELTAEKQAGAELEQVLGGRVITGFVSTAPLAAEMRA
FLDITLGAHIVDGYGLTETGAVTRDGVIVRPPVIDYKLIDVPELGYFSTDKPYPRGELLVRSQTLTPGYKRPVETASVFRDGY
HTGDVMAETAPDHLVYVDRNNVLKLAQGEFVAVANLEAVFSGAALVRQIFVYGNRSERSFLLAVVPTPEALEQYDPAALKAALAD
SLQRTARDAELQSYEVPADFIVETEPFSAANGLLSGVGKLLRPNLKDRYGGRLQMYADIAATQANQLRELRRAAATQPVIDTLTQ
AAATILGTGSEVASDAHFTDLGGDSLSALTLSNLLSDFFGFEVPVGTIVNPATNLAQLAQHIEAQTAGDRRSFTTVHGADATEI
RASELTDLKFI DAETLRAAPGLPKVTTEPRTVLLSGANGWLGRFLTQWLERLAPVGGTLITIVRGRDDAAARLTQAYDTPDEL
SRRFAELADRHLRVVAGDIGDPNLGLTPEIWHRLAAEVDLVVHPAALVNHVLPYRQLFGPNVVGTAEVIKLALTERIKPVTYLSTV
SVAMGIPDFEEDGDIRTVSPVRPLDGGYANGYGNKWAGEVLLREAHDLGLPVATFRSDMILAHPRYRGQVNVPMFTRLLLSLL
ITGVAPRSFYIGDGERPRAHYGLTVDFVAEAVTTLGAQQREGYVSVDVMPHDDGISLDVFDWLIRAGHPIDRVDDYDDWVRRF
ETALTALPEKRRQTVLPLLHAFRAPQAPLRGAPEPTEVFHAAVRTAKVGPDI PHLDEALIDKYIRDLREFGLI

[図22E]

(配列番号 2 4 1)

MTETISTAAPTDLLEEQVKRRIEQVVSNDPQLAALLPEDSVTEAVNEPDLPLVEVIRRLLEGYGDRPALGQRAFEFVTGDDGATV
IALKPEYTTVSRELWERAETIAAAWHEQGIRDGDFVAQLGFTSTDFASLDVAGRLGTVSVPLQTGASLQQRNAILLETRPAVFA
ASIEYLDAAVDSVLATPSVRLLSVFDYHAEVDSQREALEAVRARLESAGRTIVVEALAEALARGRDLPAAPLPSADPDALRLIYT
SGSTGTPKGAMYPQWL VANLWQKKRLTDDVIPSIGVNFMPMSHLMGRLTLMGTLSSGGTAYYIASSDLSTFFEDIALIRPSEVLV
PRVVMVFQRFQAEldrslAPGESNSEIAERIKVRIREQDFGGVLSAGSGSAPLSPEMTEFMESLLQVPLRDGYGSTEAGGVWRD
GVLQRPPVTYKLVDPVELGYFTTDSHPRGELRLKSETMFPGYKRPETTADVFDDEGYKTDGVVAELGPDHLKYLDVKNVLK
LAQGEFVAVSKLEAAYTGSPLVRQIFVYGNSESRFLLAVVPTPEVLERYADSPDALKPLIQDSLQQVAKDAELQSYEIPRDFIVE
TVPFTVESGLLSDARKLLRPKLKDHYGERLEALYAEASQNERLRQLAREAATRPVLETVTDAAAALLGASSDLAPDVRFDLGG
GDSLSALSYSELLRDI FEVDVPVGVINSVANDLAAIARHIEAQTGAATQPTFASVHGKDATVITAGELTLDKFLDESLLKAAKDV
QPATADVKTVLVTGGNGWLGRWLVDWLERLAPNGGKYALIRGADAEARARLDAYYESGDPKLSAHYRQLAQOSLEVIAGDFGD
QDLGLSQEVWQKLAKDVDLIVHSGALVNHVLPYSQLFPGPNVAGTAEIKLAISERLKPVTYLSTVGIADQIPVTEFEEDSDVRVMS
AERQINDGYANGYGNKSWAGEVLLREAHDLAGLPVRVFRSDMILAHSDYHGQLNVDVFTRSIQSLLLTGVAPASFYELDADGNRQ
RAHYDGVPGDFTAASITAIGGVNVVDGYRSFDFVFNPHHDGVSMDFVDWLIDAGYKIARIDYDQWLARFELALKGLPEQQRQGSV
LPLLKMYEKPQPAIDGSALPTAEFSRAVHEAKVGDSEIPHVTKEILKYASDIQLLGLV

[図23A]

(配列番号 2 4 2)

MKIYGIYMDRPLSQEENERFMTFISPEKREKRRFYHKEDAHRTLLGDVLVRSVISRQYQLDKSDIRFSTQEYGKPCIPDLPAHF
NISHSGRWVIGAFDSQPIGIDIEKTKPISLEIAKRFFSKTEYSDLLAKDKDEQTDYFYHLWSMKESFIKQEGKGLSLPLDSFSVRL
HQDQQVSIELPDSPCYIKTYEVDPGYKMAVCAHPDFPEDITMVSYEELL

[図23B]

(配列番号 2 4 3)

MIETILPAGVESAELEYPEDLKAHPAEHLIAKSVEKRRRDFIGARHCARLALAELEGPPVAIGKGERGAPIWPRGVVGSALTHCD
GYRAAAVAHKMRFRSIGIDAEPHATLPEGVLDSVSLPPEREWLKTDSALHLDRLLFCAKEATYKAWWPLTARWLGFEAAHITFEI
EDGSADSGNGTFHSELLVPGQTNDGGTPLLSDGRLIADGFILTAIAYA

[図23C]

(配列番号 2 4 4)

MVKTTEVVSEVSKVAGVRPWAGIFVVEIQEDILADEFTFEALMRTLPLASQARILNKKSFHDCSNLCSQLLQLFGCSIVTGLNFQ
ELKFDKGSFGKPFLLDNNRFLPFSMTIGEYVAMFLVKCVSTDEYQDVGIDIASPCNYGGREELELFKEVFSEREFNGLLKASDPCT
IFTYLSLKSesyTKFTGTGLNTDLSLIDFGATISFFPAEGASMCITLDEVPLIFHSQWFNNEIVTICMPKISDKINTNRPKLYNIS
LSTLIDYFIENDGL

[図23D]

(配列番号 2 4 5)

MVDMKTTHTSLPFAGHTLHFVEFDPANFCEQDLLWLPHYAQLQHAGRKRTTEHLAGRIAAYALREYGYKCVPAIGELRQPVWPAE
 VYGSISHCGTTALAVVSRQPIGIDIEEIFSQTARELTDNIITPAEHERLADCGLAFSLALTAFSAKESAFKASEIQTDAGFLDY
 QIISWNKQQVIHRENEMFAVHWQIKEKIVITLCQHD

[図24A]

(配列番号 2 4 6)

MIREPPEHILNRLPSSASALACSAHALNLEKRTLDHEEMKALNREVIEYFKEHVNPGFLEYRKSVTAGGDYGAVEWQAGSLNTLV
 DTQQGEFIDCLGGGIFNVGHRNPVVSAVGNQLAKQPLHSQELLDPLRAMLAKTLAALTPGKLKYSFFCNSGTESVEAALKLAKA
 YQSPRGKFTFIATSGAFHGKSLGALSATAKSTFRKPFMPLPGFRHVPFGNIEAMRTALNECKKTGDDVAIVILEPIQGGGGVILP
 PPGYLTA VRKLCDEFGALMILDEVQTMGRGTGKMFACEHENVQPDILCLAKALGGGVMPIGATIAATEEVSVLFDNPFLHTTTFGG
 NPLACAAALATINVLLLEQNLPAQAEQKGDMLLDGFRQLAREYPDLVQEARKGMLMAIEFVDNEIGYNFASEMFRQRVLVAGTLNN
 AKTIRIEPPLTLTIEQCELVIIKARKALAAMRVSVEEA

[図24B]

(配列番号 2 4 7)

MNSQITNAKTREWQALSRDHLPPTDYKQLNEKGARIITKAEGVYIWDSEGNKILDAMAGLWCNVVGYGREELVQAATRQMRELP
 FYNLFFQTAHPVVELAKAIADVAPEGMNHVFTGSGSEANDTVLRMVRHYWATKGQPKKVVIGRWNGYHGSTVAGVSLGGMKAL
 HEQGDFPIPGIVHIAQPYWYGGGDMSPDEFGVWAAEQLEKKILEVGEENVAAFIAEPIQGAGGVIVPPDTYWPKIREILAKYDIL
 FIADEVICGFGRTGEWFGSQYYGNAPDLMPJAKGLTSGYIPMGVVVRDEIVEVLNQGGEFYHGFTYSGHPVAAVALENIRILRE
 EKIIKVKAEATAPYLQKRWQELADHPLVGEARGVMVALELVKNKKTREERFTDKGVGMLCREHCFRNLIMRAVGDTMIISPLV
 IDPSQIDELITLARKCLDQTA AAVLA

[図24C]

(配列番号 2 4 8)

MNSNKELMQRSSQAIPRGVQGIHPIFADRAENCRVWDVEGREYLDFAGGIAVLNTGHLHPKVVA AVEAQLKKLSHTCFQVLAYEPY
 LELCEIMNQKVP GDFAKKTLVTGSEAVENAVKIIARAATKRSGTIAFSGAYHGRTHYTLALTGKVNYPYSAGMGLMPGHVYRALYP
 CPLHGISEDDAIASIHRIFKNDAAPEDIAAIVIEPVQGGEGFYASSPAFMQRLRALCDEHGIMLJADEVQSGAGRTGTLFAMEQMG
 VAPDLTTFAKSIAGGFPLAGVTGRAEVM DAVAPGGLGGTYAGNPIACVAALEVLKVFEQENLLQKANDLGQKLDGLLAIAEKHPE
 IGDVRGLGAMIAIELFEDGDHNPDAKLTAIEVARARDKGLILLSGGPYYNVLRIIVPLTIEDAQIRQGLEIISQCFDEAKQ

[図24D]

(配列番号 2 4 9)

MSNNEFHQRRLSATPRGVGVMCNFFAQAENATLKDVEGNEYIDFAAGIAVLNTGHRHPDLVAAVEQQLQQFTHTAYQIVPYESYV
TLAEKINALAPVSGQAKTAFFTTGAEAVENAVKIAHAHTGRPGVIAFSGGFHGRTYMTALTGKVAPYKIGFGPFGSVYHVYPYS
DLHGISTQDSLDAIERLFKSDIEAKQVAAIIFEPVQGEQGFNVAPKELVAAIRRLCDEHGI VMI ADEVQSGFARTGKLFAMDHYAD
KPDLMTMAKSLAGGMPLSGVVGNANIMDAPAPGGLGGTYAGNPLAVAAAHAHLNIIDKESLCERANQLGQRLKNTLIDAKESVPAI
AAVRGLGSMIAVEFNDPQTGEPSAAIAQKIQQRALAQGLLLLTCGAYGNVIRFLYPLTIPDAQFDAAMKILQDALSD

[図24E]

(配列番号 2 5 0)

MATITNHMPAELQALDAAHHLHPFSANNALGEEGTRVITRARGVWLNDSEGEELDAMAGLWCVNIGYGRDELAEVAARQMRELP
YYNTFFKTHVPAIALAQKLAELAPGDLNHVFFAGGGSEANDTNIRMVRTYWQNGQPEKTVIISRKNAYHGSTVASSALGGMAGM
HAQSGLIPDVHHINQPNWWAEGGMDPEEFGLARARELEEAILELGENRVAAFIAEPVQGGAGGVIVAPDSYWPEIQRICDKYDILL
IADEVICGFGRTGNWFGTQTMGIRPHIMTIAKGLSSGYAPIGGSIVCDEVAHVIGKDEFNHGYTYSGHPVAAAVALENLRILEEN
ILDHVRNVAAPYLKEKWEALTDHPLVGEAKIVGMMASIALTPNKASRAKFASEPGTIGYICRERCFANNLIMRHVGDRMIISPPLV
ITPAEIDEMFVRIRKSLDEAQAEIEKQGLMKSA

[図25]

(配列番号 2 5 1)

MSMIKSYAAKEAGGELEVVEYDPGELRPQDVEVQVDYCGICHSDLSMIDNEWGFSQYPLVAGHEVIGRVVALGSAQDKGLQVGQR
VGIGWTARSCGHCDACISGNQINCEQGAVPTIMNRGGFAEKL RADWQWV I PLPENIDIESAGPLLGGITVFKPLLMHHITATSRV
GVIGIGGLGHIAIKLLHAMGCEVTA FSSNPAKEQEV LAMGADKVVNSRDPQAL KALAGQFDL I INTVNVSLDWQPYFEALTYGGNF
HTVGAVLTPLSVPAFTLIAGDRSVSGSATGTPYELRKL MRFAARSKVAPTTELFPMSKINDAIQHVRD GKARYRVVLKADF

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/015439

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 1/21(2006.01)i; *C12N 1/14*(2006.01)i; *C12N 1/15*(2006.01)i; *C12N 1/19*(2006.01)i; *C12N 9/04*(2006.01)i; *C12N 9/10*(2006.01)i; *C12N 9/88*(2006.01)i; *C12N 15/53*(2006.01)i; *C12N 15/54*(2006.01)i; *C12N 15/60*(2006.01)i; *C12P 7/02*(2006.01)i; *C12P 7/42*(2006.01)i; *C12P 7/44*(2006.01)i; *C12P 13/00*(2006.01)i
 FI: C12N1/21; C12N1/15; C12P7/44; C12P13/00; C12N9/88; C12N15/60; C12N1/19; C12P7/02; C12P7/42; C12N9/04 E; C12N9/10; C12N15/54; C12N1/14 ZNA; C12N15/53 ZNA

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)

C12N1/21; C12N1/14; C12N1/15; C12N1/19; C12N9/04; C12N9/10; C12N9/88; C12N15/53; C12N15/54; C12N15/60; C12P7/02; C12P7/42; C12P7/44; C12P13/00

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); CAlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); SwissProt/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2018-500911 A (GENOMATICA, INC.) 18 January 2018 (2018-01-18)	12, 18-23, 25
A	claims, paragraph [0158]	13-17, 24, 26-29
X	JP 2016-533162 A (ZYMOCHEM INC.) 27 October 2016 (2016-10-27)	12, 18-26
A	claims, paragraphs [0076], [0211]	13-17, 27-29
X	LOCKHART, S. R. et al. 'hypothetical protein B9J08_005027 [[Candida] auris]'. GenBank [online], 15 November 2017, Accession No. PIS48337.1, [retrieved on 13 June 2022], Internet < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/PIS48337.1 > entire text	1-11

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

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

02 June 2022

Date of mailing of the international search report

21 June 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.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LERTWATTANASAKUL, N. et al. 'probable trans-2-enoyl-CoA reductase [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]'. GenBank [online], 14 December 2016, Accession No. BAO41562.1, [retrieved on 13 June 2022], Internet < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/574143772?sat=3&satkey=38737494 > entire text	1-11
X	VAN KIJSWIJCK, I. et al. 'Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase [NADPH, B-specific] 2, mitochondrial [Pichia kudriavzevii]'. GenBank [online], 2 February 2017, Accession No. ONH77302.1, [retrieved on 13 June 2022], Internet < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/ONH77302.1/ > entire text	1-11
X	JALAN, N. et al. 'two-component system sensor histidine kinase-response regulator hybrid protein [Xanthomonas axonopodis pv. citrumelo F1]'. GenBank [online], 25 July 2017, Accession No. AEO43815.1, [retrieved on 13 June 2022], Internet < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AEO43815.1/ > entire text	1-11
X	BERKA, R. M. et al. 'hypothetical protein THITE_2111907 [Thermothielavioides terrestris NRRL 8126]'. GenBank [online], 2 September 2014, Accession No. AEO65174.1, [retrieved on 13 June 2022], Internet < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AEO65174.1/ > entire text	1-11
X	AMLACHER, S. et al. 'NONE-like protein [Thermochaetoides thermophila DSM 1495]'. GenBank [online], 14 March 2015, Accession No. EGS22849.1, [retrieved on 13 June 2022], Internet < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/EGS22849.1/ > entire text	1-11
X	ESPAGNE, E. et al. 'unnamed protein product [Podospira anserina S mat+]'. GenBank [online], 21 August 2013, Accession No. CAP68139.1, [retrieved on 13 June 2022], Internet < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/CAP68139.1/ > entire text	1-11
X	WANG, G. et al. 'alcohol dehydrogenase superfamily, zinc-containing [Purpureocillium lilacinum]'. GenBank [online], 27 May 2016, Accession No. OAQ94168.1, [retrieved on 13 June 2022], Internet < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/OAQ94168.1/ > entire text	1-11
X	SYME, A. R. et al. 'Enoyl-acyl-carrier-protein reductase 1 [Pyrenophora teres f. teres]'. GenBank [online], 20 February 2020, Accession No. CAA9983373.1, [retrieved on 13 June 2022], Internet < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/CAA9983373.1?report=genpept > entire text	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/015439

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 13*ter*.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 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2022/015439

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
JP	2018-500911	A	18 January 2018	US	2017/0369913	A1	
				claims, paragraph [0290]			
				WO	2016/106367	A1	
JP	2016-533162	A	27 October 2016	US	2017/0044551	A1	
				claims, paragraphs [0082], [0234]			
				WO	2015/042201	A2	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12N 1/21(2006.01)i; C12N 1/14(2006.01)i; C12N 1/15(2006.01)i; C12N 1/19(2006.01)i; C12N 9/04(2006.01)i; C12N 9/10(2006.01)i; C12N 9/88(2006.01)i; C12N 15/53(2006.01)i; C12N 15/54(2006.01)i; C12N 15/60(2006.01)i; C12P 7/02(2006.01)i; C12P 7/42(2006.01)i; C12P 7/44(2006.01)i; C12P 13/00(2006.01)i FI: C12N1/21; C12N1/15; C12P7/44; C12P13/00; C12N9/88; C12N15/60; C12N1/19; C12P7/02; C12P7/42; C12N9/04 E; C12N9/10; C12N15/54; C12N1/14 ZNA; C12N15/53 ZNA																				
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） C12N1/21; C12N1/14; C12N1/15; C12N1/19; C12N9/04; C12N9/10; C12N9/88; C12N15/53; C12N15/54; C12N15/60; C12P7/02; C12P7/42; C12P7/44; C12P13/00 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 <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> 国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); SwissProt/GeneSeq			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																			
C. 関連すると認められる文献 <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>JP 2018-500911 A (ジェノマティカ, インコーポレイテッド) 18.01.2018 (2018 - 01 - 18) 特許請求の範囲、[0158]</td> <td>12, 18-23, 25</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td></td> <td>13-17, 24, 26-29</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>JP 2016-533162 A (ズィモケム インコーポレイテッド) 27.10.2016 (2016 - 10 - 27) 特許請求の範囲、[0076]、[0211]</td> <td>12, 18-26</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td></td> <td>13-17, 27-29</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>LOCKHART, S. R. et al., 'hypothetical protein B9J08_005027 [[Candida] auris]', GenBank [online], 2017年11月15日, Accession No.PIS48337.1, [2022年6月13日検索], インターネット< https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/PIS48337.1/> 全文</td> <td>1-11</td> </tr> </tbody> </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	JP 2018-500911 A (ジェノマティカ, インコーポレイテッド) 18.01.2018 (2018 - 01 - 18) 特許請求の範囲、[0158]	12, 18-23, 25	A		13-17, 24, 26-29	X	JP 2016-533162 A (ズィモケム インコーポレイテッド) 27.10.2016 (2016 - 10 - 27) 特許請求の範囲、[0076]、[0211]	12, 18-26	A		13-17, 27-29	X	LOCKHART, S. R. et al., 'hypothetical protein B9J08_005027 [[Candida] auris]', GenBank [online], 2017年11月15日, Accession No.PIS48337.1, [2022年6月13日検索], インターネット< https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/PIS48337.1/ > 全文	1-11
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	JP 2018-500911 A (ジェノマティカ, インコーポレイテッド) 18.01.2018 (2018 - 01 - 18) 特許請求の範囲、[0158]	12, 18-23, 25																		
A		13-17, 24, 26-29																		
X	JP 2016-533162 A (ズィモケム インコーポレイテッド) 27.10.2016 (2016 - 10 - 27) 特許請求の範囲、[0076]、[0211]	12, 18-26																		
A		13-17, 27-29																		
X	LOCKHART, S. R. et al., 'hypothetical protein B9J08_005027 [[Candida] auris]', GenBank [online], 2017年11月15日, Accession No.PIS48337.1, [2022年6月13日検索], インターネット< https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/PIS48337.1/ > 全文	1-11																		
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。																				
<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	"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	"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																				
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日																			
02.06.2022	21.06.2022																			
名称及びあて先	権限のある職員（特許庁審査官）																			
日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	松田 芳子 4B 3126 電話番号 03-3581-1101 内線 3448																			

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	LERTWATTANASAKUL, N. et al., 'probable trans-2-enoyl-CoA reductase [Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042]', GenBank [online], 2016年12月14日, Accession No. BA041562.1, [2022年6月13日検索], インターネット< https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/574143772?sat=3&satkey=38737494 > 全文	1-11
X	VAN RIJSWIJCK, I. et al., 'Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase [NADPH, B-specific] 2, mitochondrial [Pichia kudriavzevii]', GenBank [online], 2017年2月2日, Accession No. ONH77302.1, [2022年6月13日検索], インターネット< https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/ONH77302.1/ > 全文	1-11
X	JALAN, N. et al., 'two-component system sensor histidine kinase-response regulator hybrid protein [Xanthomonas axonopodis pv. citrumelo Fl]', GenBank [online], 2017年7月25日, Accession No. AE043815.1, [2022年6月13日検索], インターネット< https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AE043815.1/ > 全文	1-11
X	BERKA, R. M. et al., 'hypothetical protein THITE_2111907 [Thermothielavioides terrestris NRRL 8126]', GenBank [online], 2014年9月2日, Accession No. AE065174.1, [2022年6月13日検索], インターネット< https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AE065174.1/ > 全文	1-11
X	AMLACHER, S. et al., 'NONE-like protein [Thermochaetoides thermophila DSM 1495]', GenBank [online], 2015年3月14日, Accession No. EGS22849.1, [2022年6月13日検索], インターネット< https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/EGS22849.1/ > 全文	1-11
X	ESPAGNE, E. et al., 'unnamed protein product [Podospira anserina S mat+]', GenBank [online], 2013年8月21日, Accession No. CAP68139.1, [2022年6月13日検索], インターネット< https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/CAP68139.1/ > 全文	1-11
X	WANG, G. et al., 'alcohol dehydrogenase superfamily, zinc-containing [Purpureocillium lilacinum]', GenBank [online], 2016年5月27日, Accession No. OAQ94168.1, [2022年6月13日検索], インターネット< https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/OAQ94168.1/ > 全文	1-11
X	SYME, A. R. et al., 'Enoyl-acyl-carrier-protein reductase 1 [Pyrenophora teres f. teres]', GenBank [online], 2020年2月20日, Accession No. CAA9983373.1, [2022年6月13日検索], インターネット< https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/CAA9983373.1?report=genpept > 全文	1-11

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

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

- a. ☒ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
 ☒ 附属書C/ST.25テキストファイル形式
 ☐ 紙形式又はイメージファイル形式
- b. ☐ 国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c. ☐ 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
 ☐ 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))
 ☐ 紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)

2. ☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2022/015439

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
JP	2018-500911	A	18.01.2018	US	2017/0369913	A1	
				claims, [0290]			
				WO	2016/106367	A1	
JP	2016-533162	A	27.10.2016	US	2017/0044551	A1	
				claims, [0082], [0234]			
				WO	2015/042201	A2	