

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02018/199112

発行日 令和2年4月23日(2020.4.23)

(43) 国際公開日 平成30年11月1日(2018.11.1)

(51) Int.Cl.			F I	テーマコード(参考)		
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/09	Z N A Z	4 B O 6 4
C 1 2 P	7/46	(2006.01)	C 1 2 P	7/46		4 B O 6 5
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21		

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 41 頁)

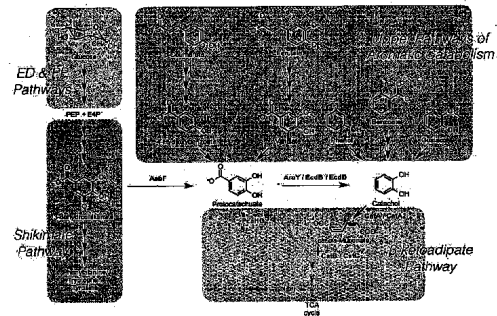
出願番号	特願2019-514547 (P2019-514547)	(71) 出願人	304021288 国立大学法人長岡技術科学大学 新潟県長岡市上富岡町1603-1
(21) 国際出願番号	PCT/JP2018/016675	(71) 出願人	504229284 国立大学法人弘前大学 青森県弘前市文京町1番地
(22) 国際出願日	平成30年4月24日(2018.4.24)	(74) 代理人	100149032 弁理士 森本 敏明
(31) 優先権主張番号	特願2017-86595 (P2017-86595)	(72) 発明者	政井 英司 新潟県長岡市上富岡町1603-1 国立 大学法人長岡技術科学大学内
(32) 優先日	平成29年4月25日(2017.4.25)	(72) 発明者	上村 直史 新潟県長岡市上富岡町1603-1 国立 大学法人長岡技術科学大学内
(33) 優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 形質転換微生物及びその利用

(57) 【要約】

本発明の目的は、シリングルリゲニンを多く含むバイオマスを原材料とすることができ、経済性が良好であり、かつ、収率が高いムコン酸の製造を可能にする微生物及び該微生物を利用したムコン酸の製造方法を提供することにある。上記目的は、宿主微生物が染色体上にプロトカテク酸分解酵素遺伝子を有し、かつ、シリングルリゲニン由来の芳香族化合物を資化するスフィンゴモナド(Sphingomonad)科微生物であり、染色体上にある該プロトカテク酸分解酵素遺伝子が欠失しており、挿入されたcatA遺伝子を発現し、かつ、挿入されたaroY遺伝子又はaroY遺伝子及びkpdB遺伝子を発現する、形質転換微生物及び該形質転換微生物を用いたムコン酸の製造方法などにより解決される。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

宿主微生物が染色体上にプロトカテク酸分解酵素遺伝子を有し、かつ、シリリングリグニン由来の芳香族化合物を資化するスフィンゴモナド (Sphingomonad) 科微生物であり、

染色体上にある該プロトカテク酸分解酵素遺伝子が欠失しており、

挿入された *catA* 遺伝子を発現し、かつ、

挿入された *aroY* 遺伝子又は *aroY* 遺伝子及び *kpdB* 遺伝子を発現する、
形質転換微生物。

【請求項 2】

挿入された前記 *aroY* 遺伝子、前記 *kpdB* 遺伝子及び前記 *catA* 遺伝子は、同一プロモーターの制御下にある、請求項 1 に記載の形質転換微生物。

【請求項 3】

前記形質転換微生物は、挿入された *vanA* 遺伝子及び *vanB* 遺伝子をさらに発現する、請求項 1 に記載の形質転換微生物。

【請求項 4】

挿入された前記 *aroY* 遺伝子、前記 *kpdB* 遺伝子、前記 *catA* 遺伝子、前記 *vanA* 遺伝子及び前記 *vanB* 遺伝子は、同一プロモーターの制御下にある、請求項 3 に記載の形質転換微生物。

【請求項 5】

前記プロトカテク酸分解酵素遺伝子が、*ligA* 遺伝子、*ligB* 遺伝子、*pcaG* 遺伝子、*pcaH* 遺伝子及び *praA* 遺伝子からなる群から選ばれる遺伝子である、請求項 1 に記載の形質転換微生物。

【請求項 6】

前記宿主微生物が、スフィンゴビウム・スピーシーズ (Sphingobium species) SYK-6 株である、請求項 1 に記載の形質転換微生物。

【請求項 7】

p-ヒドロキシフェニルリグニン由来の芳香族化合物及び/又はグアイアシルリグニン由来の芳香族化合物と、シリリングリグニン由来の芳香族化合物とを、請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載の形質転換微生物に作用させることにより、ムコン酸を得る工程を含む、
ムコン酸の製造方法。

【請求項 8】

宿主微生物が染色体上にプロトカテク酸分解酵素遺伝子を有し、かつ、シリリングリグニン由来の芳香族化合物を資化するスフィンゴモナド科微生物であり、かつ、

染色体上にある該プロトカテク酸分解酵素遺伝子が欠失している、

形質転換微生物。

【請求項 9】

p-ヒドロキシフェニルリグニン由来の芳香族化合物及び/又はグアイアシルリグニン由来の芳香族化合物と、シリリングリグニン由来の芳香族化合物とを、請求項 8 に記載の形質転換微生物に作用させることにより、プロトカテク酸を得る工程を含む、プロトカテク酸の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【関連出願の相互参照】

【0001】

本出願は、2017年4月25日出願の日本特願2017-86595号の優先権を主張し、その全記載は、ここに開示として援用される。

10

20

30

40

50

【技術分野】

【0002】

本発明は、ムコン酸又はプロトカテク酸が生産可能な形質転換微生物及び該形質転換微生物を利用したムコン酸又はプロトカテク酸の製造方法に関する。特に、本発明は、シリギルリグニン由来の芳香族化合物と、グアイアシルリグニン由来の芳香族化合物及び/又はp-ヒドロキシフェニルリグニン由来の芳香族化合物とを含むバイオマスを炭素源として増殖及びムコン酸又はプロトカテク酸の生産が可能な形質転換微生物に関する。

【背景技術】

【0003】

リグニンは植物の維管束細胞壁成分として存在する無定形高分子物質であって、フェニルプロパン系の構成単位が複雑に縮合したものであり、メトキシ基を含有することが化学構造上の大きな特徴になっている。リグニンは木質化した植物細胞を相互に膠着し、組織を強化する働きをしており、木材中に約18～36%、草本中には約15～25%存在する。そこで、木材を有効利用するために、リグニンを分解し、有用化合物を得ようとする試みが種々なされている。

10

【0004】

一方、cis, cis-ムコン酸(以下、単にムコン酸とよぶ場合がある。)は、分子内に二重結合及びカルボキシ基が2個あることにより、反応性が高い化合物である。ムコン酸を出発物質とする種々のムコン酸誘導体が知られており、例えば、ラクトン、スルホン、ポリアミド、ポリエステル、チオエステル、付加ポリマーなどが挙げられる。このようなムコン酸誘導体は、様々な用途を有するものとして知られており、例えば、界面活性剤、難燃剤、UV光安定化剤、熱硬化性プラスチック、コーティング剤などとして使用され得る。

20

【0005】

このように、ムコン酸は、種々の用途に供されるところ、リグニンからムコン酸を製造することができれば、資源の再生が達成され、非常に有用である。そこで、リグニン又はリグニンに由来する物質から、ムコン酸を製造する方法が試みられている。特にこのような方法として、微生物を用いたバイオコンバージョンが研究されている。

【0006】

例えば、下記非特許文献1(該文献の全記載はここに開示として援用される。)には、シュードモナス・プチダ(Pseudomonas putida)を宿主微生物として、染色体上のpcaH遺伝子及びpcaG遺伝子(以下、合わせてpcaHG遺伝子とよぶ場合がある。)並びにcatR遺伝子、catB遺伝子、catC遺伝子及びcatA遺伝子を破壊し、かつ、挿入したcatA遺伝子とaroY遺伝子とを、又はcatA遺伝子とaroY遺伝子とecdB遺伝子とを発現する形質転換微生物を作製し、該形質転換微生物をグルコースにより増殖させ、次いでp-クマル酸によりムコン酸を製造したことが記載されている。また、下記非特許文献2(該文献の全記載はここに開示として援用される。)には、スフィンゴビウム・スピーシーズ(Sphingobium species) SYK-6株がバニリン酸及びシリギ酸を炭素源として増殖し得ることが記載されている。

30

40

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】C.W. Johnson et al., Metabolic Engineering Communications, 3, 111-119, 2016.

【非特許文献2】T. Abe et al., Journal of Bacteriology, 187, 2030-2037, 2005.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

確かに、非特許文献1に記載の形質転換微生物は、p-クマル酸などのp-ヒドロキシフ

50

ェニルリグニンに由来する芳香族化合物や、フェルラ酸などのグアイアシルリグニンに由来する芳香族化合物を代謝することができる。しかし、非特許文献1に記載の形質転換微生物は、シリギルリグニンに由来する芳香族化合物、例えば、シリンガ酸を代謝することができない。したがって、非特許文献1に記載の形質転換微生物を用いては、シリギルリグニンを多く含むバイオマスを原材料としてムコン酸を製造することが実質的にできないという問題がある。

【0009】

また、非特許文献1に記載の形質転換微生物は、増殖のための炭素源として高価なグルコースを要求することから、非特許文献1に記載の形質転換微生物を用いるムコン酸の製造方法は経済性が悪いという問題がある。さらに、菌体増殖のためのグルコースと、ムコン酸生産の基質としてのp-クマル酸というように2種以上の炭素源が求められることから、これらの炭素源の総量を基準にして考えれば、非特許文献1に記載の形質転換微生物を用いるムコン酸の製造方法はムコン酸の収率が悪いという問題がある。

10

【0010】

一方、非特許文献2に記載のスフィンゴビウム・スピーシーズ SYK-6株によっては、パニリン酸及びシリンガ酸を炭素源としてムコン酸を製造することができない。

【0011】

そこで、本発明は、シリギルリグニンを多く含むバイオマスを原材料とすることができ、経済性が良好であり、かつ、収率が高いムコン酸の製造を可能にする微生物及び該微生物を利用したムコン酸の製造方法を提供することを、発明が解決しようとする課題とする。

20

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明者らは、上記課題の解決を試みようとして、まずはシリギルリグニンを多く含むバイオマスからムコン酸を製造することができる微生物について鋭意検討した。

【0013】

図1に、非特許文献1に記載の形質転換微生物の代謝経路を示す。図1に示すように、非特許文献1に記載の形質転換微生物は、宿主微生物がプロトカテク酸・3,4-開裂経路を経た分解を行うシュードモナス・プチダである。このことより、非特許文献1に記載の形質転換微生物によって効率よくムコン酸を製造しようとした場合、宿主微生物の染色体上のpcaHG遺伝子及びcatB遺伝子を欠失させ、さらに挿入したaroY遺伝子を発現させなければならない。こうすることによってはじめて、p-クマル酸などのp-ヒドロキシフェニルリグニン由来の芳香族化合物やフェルラ酸などのグアイアシルリグニン由来の芳香族化合物をプロトカテク酸に一旦は収束して、ムコン酸へと変換することができるようになる。

30

【0014】

しかし、図1に示されていないように、非特許文献1に記載の形質転換微生物は、シリンガ酸などのシリギルリグニンに由来する芳香族化合物をプロトカテク酸やムコン酸へと代謝することができず、さらにこれらを利用して増殖することもできない。また、非特許文献1に記載の形質転換微生物は、染色体上のpcaHG遺伝子を欠失していることから、微生物の増殖のために、グルコースなどのリグニン由来の芳香族化合物以外の基質を必要とする。

40

【0015】

そこで、本発明者らは、鋭意検討を重ねたところ、シリンガ酸などのシリギルリグニンに由来する芳香族化合物を代謝することができるスフィンゴモナド(Sphingomonad)科微生物に着眼するに至った。そして、本発明者らは、スフィンゴモナド科微生物の染色体上のプロトカテク酸・4,5-ジオキシゲナーゼ遺伝子を破壊した後、別途、外来遺伝子として挿入したaroY遺伝子、kpdB遺伝子、catA遺伝子などを発現する形質転換微生物を創作することに成功した。そして、驚くべきことに、本発明者らが作製した形質転換微生物は、シリンガ酸などのシリギルリグニンに由来する芳香族化合

50

物を利用して増殖する、すなわち、シリングルリグニンに由来する芳香族化合物を資化することができつつも、グアイアシルリグニンや p - ヒドロキシフェニルリグニンに由来する芳香族化合物を利用してムコン酸を製造し得ることを見出した。このようにして、本発明者らは、本発明者らが作製した形質転換微生物を用いて、シリングルリグニン、グアイアシルリグニン、p - ヒドロキシフェニルリグニンといった様々なタイプのリグニンに由来する芳香族化合物からムコン酸を製造する方法を創作することに成功した。

【0016】

さらに驚くべきことに、本発明者らが作製した形質転換微生物を用いる方法は、これらのリグニン由来の芳香族化合物を炭素源として用いながらも、グルコース及びリグニン由来の芳香族化合物を基質として必要とする非特許文献1などに記載の形質転換微生物を用いる方法と比べて、ムコン酸の収率について同程度又はそれ以上であることを見出した。

10

【0017】

本発明者らは、ムコン酸を製造し得る形質転換微生物を応用して、ムコン酸の中間体であるプロトカテク酸を製造し得る形質転換微生物を作製し、さらに該形質転換微生物を用いて、シリングルリグニン、グアイアシルリグニン、p - ヒドロキシフェニルリグニンといった様々なタイプのリグニンに由来する芳香族化合物からプロトカテク酸を製造する方法を創作することに成功した。

【0018】

リグニン由来の芳香族化合物は、廃資材などのバイオマスから得ることができる。特に、広葉樹にはシリングルリグニンが多く含まれている。そこで、我が国に多く繁茂する広葉樹に由来するバイオマスは非常に安価に入手できることから、本発明者らが作製した形質転換微生物を用いるムコン酸やプロトカテク酸の製造方法は、非特許文献1に記載の形質転換微生物を用いる方法などと比べて経済的に有利な方法である。本発明は、これらの知見及び成功例に基づき完成された発明である。

20

【0019】

したがって、本発明の一態様によれば、以下の(1)～(6)の形質転換微生物が提供される。

(1) 宿主微生物が染色体上にプロトカテク酸分解酵素遺伝子を有し、かつ、シリングルリグニン由来の芳香族化合物を資化するスフィンゴモナド (Sphingomonad) 科微生物であり、

30

染色体上にある該プロトカテク酸分解酵素遺伝子が欠失しており、

挿入された cat A 遺伝子を発現し、かつ、

挿入された aro Y 遺伝子又は aro Y 遺伝子及び k p d B 遺伝子を発現する、
形質転換微生物。

(2) 挿入された前記 aro Y 遺伝子、前記 k p d B 遺伝子及び前記 cat A 遺伝子は、同一プロモーターの制御下にある、(1)に記載の形質転換微生物。

(3) 前記形質転換微生物は、挿入された van A 遺伝子及び van B 遺伝子をさらに発現する、(1)～(2)のいずれか1項に記載の形質転換微生物。

(4) 挿入された前記 aro Y 遺伝子、前記 k p d B 遺伝子、前記 cat A 遺伝子、前記 van A 遺伝子及び前記 van B 遺伝子は、同一プロモーターの制御下にある、(3)に記載の形質転換微生物。

40

(5) 前記プロトカテク酸分解酵素遺伝子が、lig A 遺伝子、lig B 遺伝子、pc a G 遺伝子、pc a H 遺伝子及び pra A 遺伝子からなる群から選ばれる遺伝子である、(1)～(4)のいずれか1項に記載の形質転換微生物。

(6) 前記宿主微生物が、スフィンゴビウム・スピーシーズ (Sphingobium species) SYK - 6 株である、(1)～(5)のいずれか1項に記載の形質転換微生物。

【0020】

本発明の別の一態様によれば、以下(7)のムコン酸の製造方法が提供される。

(7) p - ヒドロキシフェニルリグニン由来の芳香族化合物及び / 又はグアイアシルリグ

50

ニン由来の芳香族化合物と、シリングリグニン由来の芳香族化合物とを、(1)~(6)のいずれか1項に記載の形質転換微生物に作用させることにより、ムコン酸を得る工程を含む、ムコン酸の製造方法。

【0021】

本発明の別の態様によれば、以下(8)の形質転換微生物が提供される。

(8) 宿主微生物が染色体上にプロトカテク酸分解酵素遺伝子を有し、かつ、シリングリグニン由来の芳香族化合物を資化するスフィンゴモナド科微生物であり、かつ、染色体上にある該プロトカテク酸分解酵素遺伝子が欠失している、形質転換微生物。

【0022】

本発明の別の態様によれば、以下(9)のプロトカテク酸の製造方法が提供される。

(9) p-ヒドロキシフェニルリグニン由来の芳香族化合物及び/又はグアイアシルリグニン由来の芳香族化合物と、シリングリグニン由来の芳香族化合物とを、(8)に記載の形質転換微生物に作用させることにより、プロトカテク酸を得る工程を含む、プロトカテク酸の製造方法。

【発明の効果】

【0023】

本発明の一態様の形質転換微生物及び本発明の一態様の製造方法によれば、従前の微生物を用いる方法では困難又は不可能であったシリングリグニンを多く含むバイオマスを原材料として、安価かつ収率を維持又は改善して、ムコン酸やプロトカテク酸を製造することができる。したがって、本発明の一態様の形質転換微生物及び本発明の一態様の製造方法によれば、様々なタイプのリグニンを含むバイオマスや我が国で比較的入手が容易なバイオマスの有効利用の一環として、工業的規模でのムコン酸やプロトカテク酸の製造が期待できる。

【図面の簡単な説明】

【0024】

【図1】図1は、非特許文献1のFig. 1に記載のシュードモナス・プチダの代謝経路の概要図である。

【発明を実施するための形態】

【0025】

以下、本発明の一態様である形質転換微生物及び製造方法の詳細について説明するが、本発明の技術的範囲は本項目の事項によってのみに限定されるものではなく、本発明はその目的を達成する限りにおいて種々の態様をとり得る。

【0026】

(形質転換微生物の概要)

本発明の一態様である形質転換微生物は、宿主微生物の染色体上にある特定の遺伝子が欠失するように、宿主微生物を形質転換した微生物である。また、本発明の一態様である形質転換微生物は、さらに外来遺伝子として挿入したプロトカテク酸からのムコン酸の合成経路に關与する特定の遺伝子を発現するように、宿主微生物を形質転換しているか否かによって、2種類の態様がある。

【0027】

本明細書における「遺伝子の欠失」は、遺伝子が正常に転写されないこと、遺伝子の発現によって産生されるべきタンパク質が正常に翻訳されないことなどのように、遺伝子が正常に機能せずに遺伝子の発現が妨げられていることを意味する。遺伝子の欠失は、例えば、遺伝子の全部又は一部が破壊、欠損、置換、挿入などにより遺伝子の構造が変化することによって生じ得る。ただし、遺伝子の欠失は、遺伝子の構造に変化が生じずに、例えば、遺伝子の制御領域をブロックするなどの手段によって遺伝子の発現が抑えられることによっても生じ得る。

【0028】

本明細書における「遺伝子の発現」とは、転写や翻訳などを介して、遺伝子によってコー

10

20

30

40

50

ドされるタンパク質が本来の構造や活性を有する態様で生産されることを意味する。また、本明細書における「遺伝子の過剰発現」とは、遺伝子が挿入されたことにより、宿主微生物が本来発現する量を超えて、該遺伝子によってコードされるタンパク質が生産されることを意味する。

【0029】

(欠失又は挿入する遺伝子)

形質転換微生物について、宿主微生物は染色体上にプロトカテク酸分解酵素遺伝子を有する。プロトカテク酸分解酵素遺伝子は、プロトカテク酸を分解する活性を有する酵素を発現する遺伝子であれば特に限定されないが、例えば、*l i g A* 遺伝子、*l i g B* 遺伝子、*p c a G* 遺伝子、*p c a H* 遺伝子及び *p r a A* 遺伝子などが挙げられる。これらの遺伝子のうち、形質転換微生物は、宿主微生物の染色体上にあるプロトカテク酸分解酵素遺伝子の一部又は全部が欠失している。

10

【0030】

l i g A 遺伝子及び *l i g B* 遺伝子は、それぞれプロトカテク酸・4, 5 - ジオキシゲナーゼの小サブユニット及び大サブユニットを発現する遺伝子、又は一つのポリペプチドからなるプロトカテク酸・4, 5 - ジオキシゲナーゼを発現する遺伝子であれば特に限定されないが、例えば、それぞれ配列番号19及び20の塩基配列を有する遺伝子などが挙げられる。プロトカテク酸・4, 5 - ジオキシゲナーゼは、例えば、*Sphingobium species* SYK-6株などが保有し、プロトカテク酸から4 - カルボキシ - 2 - ヒドロキシムコン酸 - 6 - セミアルデヒドを生成する反応を触媒する活性を有し、 Fe^{2+} を補因子として要求する。

20

【0031】

p c a H 遺伝子及び *p c a G* 遺伝子は、それぞれプロトカテク酸・3, 4 - ジオキシゲナーゼのサブユニット及びサブユニットを発現する遺伝子であれば特に限定されないが、例えば、それぞれ配列番号35及び36の塩基配列を有する遺伝子などが挙げられる。プロトカテク酸・3, 4 - ジオキシゲナーゼは、例えば、*Pseudomonas putida* KT2440株などが保有し、プロトカテク酸から3 - カルボキシムコン酸を生成する反応を触媒する活性を有し、 Fe^{3+} を補因子として要求する。

【0032】

p r a A 遺伝子は、プロトカテク酸・2, 3 - ジオキシゲナーゼを発現する遺伝子であれば特に限定されないが、例えば、配列番号37の塩基配列を有する遺伝子などが挙げられる。プロトカテク酸・2, 3 - ジオキシゲナーゼは、例えば、*Paenibacillus species* JJ-1b株などが保有し、プロトカテク酸から5 - カルボキシ - 2 - ヒドロキシムコン酸 - 6 - セミアルデヒドを生成する反応を触媒する活性を有する。

30

【0033】

本発明の一態様の形質転換微生物(以下、形質転換微生物(1)とよぶ。)は、挿入された *c a t A* 遺伝子を発現する。形質転換微生物(1)は、さらに挿入された *a r o Y* 遺伝子又は *a r o Y* 遺伝子及び *k p d B* 遺伝子を発現する。一方で、本発明の別の態様の形質転換微生物(以下、形質転換微生物(2)とよぶ。)は、*c a t A* 遺伝子、*a r o Y* 遺伝子及び *k p d B* 遺伝子のいずれも挿入されていない。すなわち、形質転換微生物(2)は、プロトカテク酸からムコン酸を製造することが実質的にできない。本明細書では、形質転換微生物(1)及び(2)をまとめて指すときには、単に「形質転換微生物」とよぶ。

40

【0034】

c a t A 遺伝子は、カテコール・1, 2 - ジオキシゲナーゼ(*Catechol 1, 2 - dioxygenase*)を発現する遺伝子であれば特に限定されないが、例えば、配列番号21の塩基配列を有する遺伝子などが挙げられる。カテコール・1, 2 - ジオキシゲナーゼ(*EC 1.13.11.1*)は、1, 2 - ジヒドロキシベンゼン・1, 2 - ジオ

50

キシゲナーゼなどともよばれる。カテコール・1, 2 - ジオキシゲナーゼは、例えば、シユードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*) KT2440株が保有し、カテコールから *cis, cis* - ムコン酸を生成する反応を触媒する活性を有し、 Fe^{3+} を補因子として要求する。

【0035】

カテコール・1, 2 - ジオキシゲナーゼのアミノ酸配列 (accession no. Q88I35) 中に *Intradiol dioxygenase* ドメインを有する。該ドメインは [LIVMF] - x - G - x - [LIVM] - x (4) - [GS] - x (2) - [LIVMA] - x (4) - [LIVM] - [DE] - [LIVMFYC] - x (6) - G - x - [FY] (Prosites entry no. P00083) からなり、配列中の Y が補因子である Fe^{3+} の結合に関わる。カテコール・1, 2 - ジオキシゲナーゼのアミノ酸配列中の L137 から Y165 が上記ドメインに相当する。

10

【0036】

aroY 遺伝子は、プロトカテク酸・デカルボキシラーゼを発現する遺伝子であれば特に限定されないが、例えば、配列番号 22 の塩基配列を有する遺伝子などが挙げられる。プロトカテク酸・デカルボキシラーゼ (EC 4.1.1.63) は、3, 4 - ジヒドロキシ安息香酸・カルボキシラーゼ (3, 4 - dihydroxybenzoate carboxylase) ともよばれる。プロトカテク酸・デカルボキシラーゼは、プロトカテク酸からカテコールを生成する反応を触媒する酵素であれば、特に限定されない。なお、3 - O - メチルガリック酸から 3 - メトキシカテコールを生成する反応やガリック酸からピロガロールを生成する反応を触媒する活性を有する酵素についても、プロトカテク酸・デカルボキシラーゼとして使用できる可能性がある。また、バニリン酸脱炭酸酵素や 4 - ヒドロキシ安息香酸の脱炭酸酵素についても、プロトカテク酸を脱炭酸する可能性があることから、プロトカテク酸・デカルボキシラーゼとして使用できる可能性がある。プロトカテク酸・デカルボキシラーゼは、構造上は、UbiD ドメイン (Domain architecture ID 10487953) を含むタンパク質群 (UbiD スーパーファミリー) に分類される。

20

【0037】

プロトカテク酸・デカルボキシラーゼの具体例としては、クレブシエラ・ニューモニエ・サブスピーシーズ・ニューモニエ (*Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*) A170-40株 (ATCC 25597株) に由来するタンパク質 (accession no. AB479384; AB479384 タンパク質) などが挙げられる。AB479384 タンパク質のアミノ酸配列と配列同一性の高いアミノ酸配列を有するタンパク質としては、*Enterobacter cloacae* MBRL1077株由来の *protocatechuate decarboxylase* (accession no. AMJ70686; 配列同一性 87.2%)、*E. cloacae* e1026株由来の *protocatechuate decarboxylase* (accession no. CZU76022; 配列同一性 85.7%) などの *protocatechuate decarboxylase* として登録されているタンパク質などが挙げられるが、これらに限定されない。これらの酵素は、補因子として Mn^{2+} 、プレニル化フラビンモノヌクレオチド (prenylated flavin mononucleotide; prenyl-FMN) を要求する一連の酵素群として特徴付けられる。

30

40

【0038】

kpdB 遺伝子は、フラビン・プレニルトランスフェラーゼを発現する遺伝子であれば特に限定されないが、例えば、4 - ヒドロキシ安息香酸・デカルボキシラーゼ・サブユニット B を発現する遺伝子などが挙げられ、具体的には配列番号 23 の塩基配列を有する遺伝子などが挙げられる。UbiX ファミリーの中に *Phenolic acid (hydroxyarylic acid) decarboxylase subunit B* があり、その一つが 4 - ヒドロキシ安息香酸・デカルボキシラーゼ・サブユニット B である。な

50

お、Phenolic acid decarboxylaseの中には、AroYやFdc(酵母由来のFerulic acid decarboxylase)のようにホモオリゴマーの酵素もあれば、4-ヒドロキシ安息香酸・デカルボキシラーゼやバニリン酸・デカルボキシラーゼのようにBCDサブユニットからなるヘテロオリゴマーの酵素がある。

【0039】

フラビン・プレニルトランスフェラーゼは、ジメチルアリルリン酸(DMAP)からジメチルアリル構造をフラビンモノヌクレオチド(FMN)のフラビン骨格へと結合し、prenyl-FMNを合成する反応を触媒する。

【0040】

4-ヒドロキシ安息香酸・デカルボキシラーゼ・サブユニットBは、フラボプロテイン、UbiX/Pad1ファミリーに分類される酵素であることから、そのアミノ酸配列は、例えば、E. coli K-12株由来のFlavin prenyltransferase(UbiX)のアミノ酸配列(accession no. P0AG03)と配列同一性が50%であり; S. cerevisiae S288c由来のFlavin prenyltransferase(Pad1)のアミノ酸配列(accession no. P33751)と配列同一性が39.8%であり; B. subtilis 168株由来のPhenolic acid decarboxylase subunit B(BcdB)のアミノ酸配列(accession no. P94404)と配列同一性が54.5%である。White MDらの文献(Nature, 522:502-506, 2015; 該文献の全記載はここに開示として援用される。)により、UbiXのアミノ酸配列中にFMNの結合に関わるS37及びR123、DMAPの結合に関わるY153及びR169が同定され、KpdBなどのUbiX/Pad1ファミリーに分類されるタンパク質のアミノ酸配列にもこれらFMN及びDMAPの結合に関わるアミノ酸残基が保存されている。

【0041】

形質転換微生物(1)について、宿主微生物はシリング酸やシリングアルデヒドなどのシリングルリグニン由来の芳香族化合物を炭素源として増殖する(資化する)能力を有する。宿主微生物がシリング酸やシリングアルデヒドなどのシリングル核を有する芳香族化合物を唯一の炭素源として利用して増殖する能力を有するためには、宿主微生物は染色体上にシリング酸・デメチラーゼ遺伝子(例えばdesA)、3-O-メチルガリク酸・3,4-ジオキシゲナーゼ遺伝子(例えばdesZ)、3-O-メチルガリク酸・デメチラーゼ遺伝子(例えばvanAB、ligM)、2-ピロン 4,6-ジカルボン酸・ヒドロラーゼ遺伝子(例えばligI)、ガリク酸・ジオキシゲナーゼ遺伝子(例えばdesB)、4-オキサロメサコン酸・トートメラーゼ(例えばligU)、4-オキサロメサコン酸・ヒドラターゼ遺伝子(例えばligJ)、4-カルボキシ-4-ヒドロキシ-2-オキサジピン酸・アルドラーゼ遺伝子(例えばligK)、オキサロ酢酸・デカルボキシラーゼ遺伝子(例えばligK)など、シリング酸をビルビン酸へと代謝するための酵素を生産する遺伝子を有することが好ましい。

【0042】

上記遺伝子のうち、例えば、desA遺伝子は、シリング酸・デメチラーゼ(Syringate O-demethylase)を発現する遺伝子であれば特に限定されないが、例えば、配列番号38の塩基配列を有する遺伝子などが挙げられる。シリング酸・デメチラーゼは、例えば、スフィンゴビウム・スピーシーズ SYK-6株などが保有し、シリング酸から3-O-メチルガリク酸を生成する反応を触媒する活性を有する。

【0043】

また、前記VanABは、シリング酸を3-O-メチルガリク酸に変換することができるので、シリング酸・デメチラーゼとしても使用することができる。

【0044】

また、宿主微生物は、染色体上に、プロトカテク酸分解酵素遺伝子に加えて、バニリン酸

10

20

30

40

50

脱メチル化酵素を発現する遺伝子を有することが好ましい。宿主微生物がバニリン酸脱メチル化酵素を発現する遺伝子を染色体上に有していない場合は、バニリン酸脱メチル化酵素を発現する遺伝子を形質転換微生物(1)に挿入することが好ましい。バニリン酸脱メチル化酵素を発現する遺伝子は特に限定されないが、例えば、*ligM* 遺伝子、*vanA* 遺伝子及び *vanB* 遺伝子などが挙げられる。

【0045】

ligM 遺伝子は、テトラヒドロ葉酸依存型バニリン酸 / 3-O-メチルガリック酸・O-デメチラーゼ (*tetrahydrofolate-dependent vanillate / 3-O-methylgallate O-demethylase*) を発現する遺伝子であれば特に限定されないが、例えば、配列番号24の塩基配列を有する遺伝子などが挙げられる。

10

【0046】

vanA 遺伝子は、バニリン酸・デメチラーゼ・オキシゲナーゼ成分 (*vanillate demethylase oxygenase component*) を発現する遺伝子であれば特に限定されないが、例えば、配列番号25の塩基配列を有する遺伝子などが挙げられる。

【0047】

バニリン酸・デメチラーゼ・オキシゲナーゼ成分 (EC 1.14.13.82) としては、例えば、シュドモナス・プチダ KT2440株由来の *VanA* (*accession no. Q88GI6*) などが挙げられる。バニリン酸・デメチラーゼ・オキシゲナーゼ成分は、*Oxidoreductase component* を介して供給される NADH 又は NADPH 由来の電子と、分子状酸素から供給される酸素原子とを利用して、バニリン酸のメチルエーテル結合を開裂し、プロトカテク酸、ホルムアルデヒド及び水を生成する。

20

【0048】

バニリン酸・デメチラーゼ・オキシゲナーゼ成分は、そのアミノ酸配列中に *Rieske [2Fe-2S] iron-sulfur domain* (W7-V107, *PROSITE entry no. PS51296*) を有し、該ドメイン中の C 及び H (C47, H49, C66, H69) が Fe-S の結合に関わる。

【0049】

vanB 遺伝子は、バニリン酸・デメチラーゼ・オキドレダクターゼ成分 (*vanillate demethylase oxidoreductase component*) を発現する遺伝子であれば特に限定されないが、例えば、配列番号26の塩基配列を有する遺伝子などが挙げられる。

30

【0050】

バニリン酸・デメチラーゼ・オキドレダクターゼ成分 (EC 1.14.13.82) としては、例えば、シュドモナス・プチダ KT2440株由来の *VanB* (*accession no. Q88GI5*) などが挙げられる。バニリン酸・デメチラーゼ・オキドレダクターゼ成分は、NADH 又は NADPH から電子を抜き取り、酸素添加酵素 (オキシゲナーゼ) へと伝達する酸化還元酵素の一つとして知られている。バニリン酸・デメチラーゼ・オキドレダクターゼ成分はバニリン酸・デメチラーゼ・オキシゲナーゼ成分である *VanA* に NADH 又は NADPH 由来の電子を伝達する。

40

【0051】

バニリン酸・デメチラーゼ・オキドレダクターゼ成分は、そのアミノ酸配列中に、*2Fe-2S Ferredoxin type iron-sulfur binding domain* (G229-I316, *PROSITE entry no. PS51085*) を有し、該アミノ酸配列中の C (C265, C270, C273, C303) が Fe-S の結合に関わる。また、バニリン酸・デメチラーゼ・オキドレダクターゼ成分は、そのアミノ酸配列中に、*NAD-binding domain* (L109-D201, *Pfam entry no. PF00175*) 及び *Ferredoxin reduct*

50

ase type FAD-binding domain (M1-A101、PROSITE entry no. PS51384) を有する。

【0052】

形質転換微生物について、宿主微生物が染色体上に desA 遺伝子と ligM 遺伝子を有することが好ましい。また、宿主微生物が desA 遺伝子と ligM 遺伝子を染色体上に有していない場合は、desA 遺伝子と ligM 遺伝子を形質転換微生物に挿入することが好ましい。

【0053】

挿入する遺伝子は、遺伝子を有する由来生物が本来保有する遺伝子（すなわち、野生型遺伝子）と完全に同一でなくともよく、少なくとも野生型遺伝子が発現するタンパク質（すなわち、野生型タンパク質）と同一の、又は近似する酵素学的性質を有するタンパク質を発現する遺伝子である限り、野生型遺伝子の塩基配列に相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有する DNA などであってもよい。

10

【0054】

本明細書における「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列」とは、野生型遺伝子の塩基配列を有する DNA をプローブとして使用し、コロニーハイブリダイゼーション法、ブランクハイブリダイゼーション法、サザンブロットハイブリダイゼーション法などを用いることにより得られる DNA の塩基配列を意味する。

【0055】

本明細書における「ストリンジェントな条件」とは、特異的なハイブリッドのシグナルが非特異的なハイブリッドのシグナルと明確に識別される条件であり、使用するハイブリダイゼーションの系と、プローブの種類、配列及び長さによって異なる。そのような条件は、ハイブリダイゼーションの温度を変えること、洗浄の温度及び塩濃度を変えることにより決定可能である。例えば、非特異的なハイブリッドのシグナルまで強く検出されてしまう場合には、ハイブリダイゼーション及び洗浄の温度を上げるとともに、必要により洗浄の塩濃度を下げることにより特異性を上げることができる。また、特異的なハイブリッドのシグナルも検出されない場合には、ハイブリダイゼーション及び洗浄の温度を下げるるとともに、必要により洗浄の塩濃度を上げることにより、ハイブリッドを安定化させることができる。

20

【0056】

ストリンジェントな条件の具体例としては、例えば、プローブとして DNA プローブを用い、ハイブリダイゼーションは、 $5 \times \text{SSC}$ 、 $1.0\% (w/v)$ 核酸ハイブリダイゼーション用ブロッキング試薬（ロシュ・ダイアグノスティクス社）、 $0.1\% (w/v)$ N-ラウロイルサルコシン、 $0.02\% (w/v)$ SDS を用い、一晚（8～16時間程度）で行う。洗浄は、 $0.1 \sim 0.5 \times \text{SSC}$ 、 $0.1\% (w/v)$ SDS、好ましくは $0.1 \times \text{SSC}$ 、 $0.1\% (w/v)$ SDS を用い、15分間、2回行う。ハイブリダイゼーション及び洗浄を行う温度は 65 以上、好ましくは 68 以上である。

30

【0057】

また、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有する DNA としては、例えば、コロニー若しくはブランク由来の野生型遺伝子の塩基配列を有する DNA 又は該 DNA の断片を固定化したフィルターを用いて、上記したストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションすることによって得られる DNA や $0.5 \text{ M} \sim 2.0 \text{ M}$ の NaCl 存在下にて、 $40 \sim 75$ でハイブリダイゼーションを実施した後、好ましくは $0.7 \sim 1.0 \text{ M}$ の NaCl 存在下にて、65 でハイブリダイゼーションを実施した後、 $0.1 \sim 1 \times \text{SSC}$ 溶液（ $1 \times \text{SSC}$ 溶液は、 150 mM 塩化ナトリウム、 15 mM クエン酸ナトリウム）を用い、65 条件下でフィルターを洗浄することにより同定できる DNA などを挙げるができる。プローブの調製やハイブリダイゼーションの方法は、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd-Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY., 1989、Current Protocol

40

50

s in Molecular Biology, Supplement 1-38, John Wiley & Sons, 1987-1997 (以下、これらの文献を参考技術文献とよぶ場合がある。該文献の全記載はここに開示として援用される。)などに記載されている方法に準じて実施することができる。なお、当業者であれば、このようなバッファの塩濃度や温度などの条件に加えて、その他のプローブ濃度、プローブ長さ、反応時間などの諸条件を加味して、野生型遺伝子の塩基配列に相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有するDNAを得るための条件を適宜設定することができる。

【0058】

ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含むDNAとしては、プローブとして使用する野生型遺伝子の塩基配列を有するDNAの塩基配列と一定以上の配列同一性を有するDNAが挙げられ、例えば、野生型遺伝子の塩基配列と80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上又は99%以上、さらに好ましくは99.5%以上の配列同一性を有するDNAが挙げられる。該配列同一性の上限は特に限定されず、典型的には100%である。

10

【0059】

野生型遺伝子の塩基配列に相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列としては、例えば、野生型遺伝子の塩基配列において1から数個、好ましくは1から50個、より好ましくは1から30個、さらに好ましくは1から20個、なおさらに好ましくは1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10個程度の塩基の欠失、置換、付加などを有する塩基配列を含む。ここで、「塩基の欠失」とは配列中の塩基に欠落又は消失があることを意味し、「塩基の置換」は配列中の塩基が別の塩基に置き換えられていることを意味し、「塩基の付加」とは新たな塩基が挿入するように付け加えられていることを意味する。

20

【0060】

野生型遺伝子の塩基配列に相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列によってコードされるタンパク質は、野生型遺伝子の塩基配列によってコードされるタンパク質が有するアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換、付加などを有するアミノ酸配列を有するタンパク質である蓋然性があるが、野生型遺伝子の塩基配列によってコードされるタンパク質と同じ酵素活性を有するものである。

30

【0061】

野生型タンパク質と同一の、又は近似する酵素学的性質を有するタンパク質は、そのアミノ酸配列が、野生型タンパク質が有するアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換、付加などを有するアミノ酸配列からなるものであってもよい。ここで、アミノ酸配列の「1から数個のアミノ酸の欠失、置換、付加」における「1から数個」の範囲は特に限定されないが、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は20個、好ましくは1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10個程度、より好ましくは1、2、3、4又は5個程度を意味する。また、「アミノ酸の欠失」とは配列中のアミノ酸残基の欠落又は消失を意味し、「アミノ酸の置換」は配列中のアミノ酸残基が別のアミノ酸残基に置き換えられていることを意味し、「アミノ酸の付加」とは配列中に新たなアミノ酸残基が挿入するように付け加えられていることを意味する。

40

【0062】

「1から数個のアミノ酸の欠失、置換、付加」の具体的な態様としては、1から数個のアミノ酸が別の化学的に類似したアミノ酸で置き換えられた態様がある。例えば、ある疎水性アミノ酸を別の疎水性アミノ酸に置換する場合、ある極性アミノ酸を同じ電荷を有する別の極性アミノ酸に置換する場合などを挙げることができる。このような化学的に類似したアミノ酸は、アミノ酸毎に当該技術分野において知られている。具体例を挙げると、非極性(疎水性)アミノ酸としては、アラニン、バリン、イソロイシン、ロイシン、プロリ

50

ン、トリプトファン、フェニルアラニン、メチオニンなどが挙げられる。極性（中性）アミノ酸としては、グリシン、セリン、スレオニン、チロシン、グルタミン、アスパラギン、システインなどが挙げられる。陽電荷をもつ塩基性アミノ酸としては、アルギニン、ヒスチジン、リジンなどが挙げられる。また、負電荷をもつ酸性アミノ酸としては、アスパラギン酸、グルタミン酸などが挙げられる。

【0063】

野生型タンパク質が有するアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換、付加などを有するアミノ酸配列としては、野生型タンパク質が有するアミノ酸配列と一定以上の配列同一性を有するアミノ酸配列が挙げられ、例えば、野生型タンパク質が有するアミノ酸配列と80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上又は99%以上、さらに好ましくは99.5%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。該配列同一性の上限は特に限定されず、典型的には100%である。

10

【0064】

（配列同一性を算出するための手段）

塩基配列やアミノ酸配列の配列同一性を求める方法は特に限定されないが、例えば、通常知られる方法を利用して、野生型遺伝子や野生型遺伝子が発現する野生型タンパク質のアミノ酸配列と対象となる塩基配列やアミノ酸配列とをアラインメントし、両者の配列の一致率を算出するためのプログラムを用いることにより求められる。

20

【0065】

2つの塩基配列やアミノ酸配列における一致率を算出するためのプログラムとしては、例えば、Karlin及びAltschulのアルゴリズム（Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268、1990；Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877、1993；該文献の全記載はここに開示として援用される。）が知られており、このアルゴリズムを用いたBLASTプログラムがAltschulなどによって開発されている（J. Mol. Biol. 215:403-410、1990；該文献の全記載はここに開示として援用される。）。さらに、BLASTより感度よく配列同一性を決定するプログラムであるGapped BLASTも知られている（Nucleic Acids Res. 25:3389-3402、1997；該文献の全記載はここに開示として援用される。）。したがって、当業者は例えば上記のプログラムを利用して、与えられた配列に対し、高い配列同一性を示す配列をデータベース中から検索することができる。これらは、例えば、米国National Center for Biotechnology Informationのインターネット上のウェブサイト（<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>）において利用可能である。

30

【0066】

上記の各方法は、データベース中から配列同一性を示す配列を検索するために通常的に用いられ得るが、個別の配列の配列同一性を決定する手段としては、Genetyxネットワーク版 version 12.0.1（ジェネティクス社）のホモロジー解析を用いることもできる。この方法は、Lipman-Pearson法（Science 227:1435-1441、1985；該文献の全記載はここに開示として援用される。）に基づくものである。塩基配列の配列同一性を解析する際は、可能であればタンパク質をコードしている領域（CDS又はORF）を用いる。

40

【0067】

（挿入する遺伝子の由来）

挿入する遺伝子は、挿入する遺伝子を保有する微生物などに由来する。挿入する遺伝子の由来生物としては、例えば、プロトカテク酸からムコン酸を製造することができる微生物やプロトカテク酸を資化することによって増殖可能な微生物などが挙げられる。

【0068】

50

挿入する遺伝子の由来生物の具体例としては、l i g M 遺伝子及び d e s A 遺伝子についてはスフィンゴビウム・スピーシーズ、スフィンゴモナス・スピーシーズ、ノボスフィンゴビウム・アロマティシボランス、オルターエリスロバクター・スピーシーズ、エリスロバクターといったスフィンゴモナド目微生物やアルスロバクター・カステリ、アルスロバクター・スピーシーズといったアルスロバクター属微生物、レイフソニア・スピーシーズといったマイクロバクテリ科微生物、コクリア・ポラリス、コクリア・スピーシーズ、ネオマイクロコッカス・エスツアリ、ペニグルタミシバクター・ガンゴトリエンシス、シトロコッカス・スピーシーズ、テルシコッカス・スピーシーズといったマイクロコッカス科微生物、マイクロバクテリウム・スピーシーズといったマイクロバクテリア科微生物など；c a t A 遺伝子についてはシュードモナス・ブチダ、シュードモナス・エルギノーサ、シュードモナス・フルオレッセンス、シュードモナス・レイネケイといったシュードモナス属微生物やアシネトバクター・カルコアセチカス、アシネトバクター・ラジオレシステンスといったアシネトバクター属微生物、ロドコッカス・オパカス、ロドコッカス・ピリジニボラス、ロドコッカス・ロドクロウスなどロドコッカス属微生物など；a r o Y 遺伝子及びk p d B 遺伝子についてはクレブシエラ・ニューモニエ、クレブシエラ・オキシトカ、クレブシエラ・クアシニューモニエといったクレブシエラ属微生物やエンテロバクター・クロアカ、エンテロバクター・アエロゲネスといったエンテロバクター属微生物、セディメントバクター・ヒドロキシベンゾイカスなど；v a n A 遺伝子及びv a n B 遺伝子についてはシュードモナス・ブチダ、シュードモナス・フルオレッセンス、シュードモナス・レジノボランス、シュードモナス・エルギノーサといったシュードモナス属微生物やコマモナス・テストステロニ、コマモナス・チオオキシダンスといったコマモナス属微生物、アセトバクター・パツツリアヌス、アセトバクター・アセチ、アセトバクター・トロピカリスといったアセトバクター属微生物などが挙げられるが、これらに限定されない。

10

20

【0069】

上記のとおり、挿入する遺伝子の由来生物は特に限定されないが、形質転換微生物において発現される遺伝子が宿主微生物の生育条件によって不活化せず、又は活性を示すために、遺伝子を挿入することによって形質転換すべき宿主微生物や宿主微生物と生育条件が近似する微生物であることが好ましい。

【0070】

(遺伝子工学的手法による遺伝子のクローニング)

欠失及び挿入する遺伝子は、適当な公知の各種ベクター中に挿入することができる。さらに、このベクターを適当な公知の宿主微生物に導入して、遺伝子を欠失した、又は遺伝子を挿入した形質転換体(形質転換微生物)を作製できる。欠失する遺伝子は野生型遺伝子の全部又は一部が破壊、欠損、置換、挿入などにより遺伝子の構造が変化したものであることが好ましい。挿入する遺伝子は、野生型遺伝子と同一又は近似するタンパク質を発現する遺伝子であることが好ましい。

30

【0071】

欠失及び挿入する遺伝子の取得方法、これらの遺伝子の塩基配列やこれらの遺伝子が発現するタンパク質のアミノ酸配列に関する情報の取得方法、各種ベクターの製造方法や形質転換微生物の作製方法などは、当業者にとって適宜選択することができる。また、本明細書では、形質転換や形質転換体にはそれぞれ形質導入や形質導入体を包含する。欠失及び挿入する遺伝子のクローニングの一例を非限定的に後述する。

40

【0072】

例えば、欠失又は挿入する遺伝子に関連する野生型遺伝子を有する由来生物や種々の微生物から、常法、例えば、参考技術文献に記載の方法により、染色体DNAやmRNAを抽出することができる。抽出したmRNAを鋳型としてcDNAを合成することができる。このようにして得られた染色体DNAやcDNAを用いて、染色体DNAやcDNAのライブラリーを作製することができる。

【0073】

例えば、挿入する遺伝子は、該遺伝子に関連する野生型遺伝子を有する由来生物の染色体

50

DNAやcDNAを鋳型としたクローニングにより得ることができる。野生型遺伝子の由来生物は上記したとおりのものであり、具体的な例としては、遺伝子の種類によって、スフィンゴビウム・スピーシーズ SYK-6株、シュードモナス・ブチダ KT2440株及びクレブシエラ・ニューモニエ・サブスピーシーズ・ニューモニエ A170-40株などを挙げるができるが、これらに限定されない。例えば、シュードモナス・ブチダ KT2440株を培養し、得られた菌体から水分を取り除き、液体窒素中で冷却しながら乳鉢などを用いて物理的に磨砕することにより細かい粉末状の菌体片とし、該菌体片から通常の方法により染色体DNA画分を抽出する。染色体DNA抽出操作には、DNAeasy Blood & Tissue Kit (キアゲン社)などの市販の染色体DNA抽出キットなどが利用できる。本明細書において、染色体DNAとゲノムDNAとは同義である。

10

【0074】

次いで、染色体DNAを鋳型として、5'末端配列及び3'末端配列に相補的な合成プライマーを用いてポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction; PCR) を行うことにより、DNAを増幅する。プライマーとしては、挿入する遺伝子を含むDNA断片の増幅が可能であれば特に限定されない。その例としては、catA遺伝子を増幅するものとして、シュードモナス・ブチダ KT2440株のゲノム配列を参考として設計した配列番号11及び12で表されるプライマーなどが挙げられる。なお、このようなプライマーを用いると、目的遺伝子全長が増幅できる。別の方法として、ショットガンライブラリーからの目的遺伝子クローンのスクリーニングや、Inverse PCR、Nested PCR、5'RACE法、3'RACE法などの適当なPCRにより、目的の遺伝子断片を含むDNAを増幅させ、これらを連結させて全長の目的遺伝子を含むDNAを得ることなどができる。

20

【0075】

また、欠失又は挿入する遺伝子を取得する方法は、上記したとおりに特に限定されず、遺伝子工学的手法によらなくとも、例えば、化学合成法を用いて遺伝子を構築することが可能である。

【0076】

PCRにより増幅された増幅産物や化学合成した遺伝子における塩基配列の確認は、例えば、次のように行うことができる。まず、配列を確認したいDNAを通常の方法に準じて適当なベクターに挿入して組換え体DNAを作製する。ベクターへのクローニングには、In-Fusion HD Cloning Kit (タカラバイオ社)、TA Cloning Kit (インビトロジェン社)などの公知又は市販のキット; pAK405 (Andreas Kaczmarczykら、Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(10)3774-3777; 該文献の全記載はここに開示として援用される。)、pMCL200 (Gene, vol. 162, p157-158, 1995を参照; 該文献の全記載はここに開示として援用される。)、pJB866 (Plasmid, vol. 38, p35-51, 1997を参照; 該文献の全記載はここに開示として援用される。)、pUC118 (タカラバイオ社)、pQE30 (キアゲン社)、pUC4K (Gene, vol. 19, p259-268, 1982を参照; 該文献の全記載はここに開示として援用される。)、pEX18Amp (Gene, vol. 212, p77-86, 1998を参照; 該文献の全記載はここに開示として援用される。)、pPS858 (Gene, vol. 212, p77-86, 1998を参照; 該文献の全記載はここに開示として援用される。)、pUC119 (タカラバイオ社)、pUC18 (タカラバイオ社)、pBR322 (タカラバイオ社)などの公知又は市販のプラスミドベクター; EMBL3 (ストラタジーン社)などの公知又は市販のバクテリオファージベクターなどが使用できる。

30

40

【0077】

構築した組換え体DNAを大量に得たい場合は、組換え体DNAを、例えば、大腸菌 (*Escherichia coli*)、好ましくは大腸菌 JM109株 (タカラバイオ社

50

)や大腸菌 DH5 株(タカラバイオ社)などに導入して形質転換し、次いで得られた形質転換体に含まれる組換え体DNAを、QIAGEN Plasmid Mini Kit(キアゲン社)などを用いて精製することができる。

【0078】

組換え体DNAに挿入されている各遺伝子の塩基配列の決定は、ジデオキシ法(Methods in Enzymology、101、20-78、1983などを参照;該文献の全記載はここに開示として援用される。)などにより行う。塩基配列の決定の際に使用する配列解析装置は特に限定されないが、例えば、Li-COR MODEL 4200Lシーケンサー(アロカ社)、370DNAシーケンスシステム(パーキンエルマー社)、CEQ2000XL DNAアナリシスシステム(ベックマン社)などが挙げられる。そして、決定された塩基配列を元に、翻訳されるタンパク質のアミノ酸配列を知り得る。

10

【0079】

(遺伝子を含む組換えベクターの構築)

欠失又は挿入する遺伝子を含む組換えベクター(組換え体DNA)は、欠失又は挿入する遺伝子を含むPCR増幅産物と各種ベクターとを、遺伝子の欠失又は発現が可能な形で結合することにより構築することができる。なお、欠失する遺伝子の場合、組換えベクターを宿主微生物に導入して、相同組換えによって、組換えベクター中の遺伝子が宿主微生物中の遺伝子に置き換わるために、組換えベクターは欠失する遺伝子の上流及び下流の領域を含むことが好ましい。

20

【0080】

非限定的な例として挿入する遺伝子を含む組換えベクターを作製する方法は、例えば、適当な制限酵素で挿入する遺伝子のいずれかを含むDNA断片を切り出し、該DNA断片を適当な制限酵素で切断したプラスミドベクターとを、In-Fusion HD Cloning Kit(タカラバイオ社)などの市販の組換えベクター作製キットなどを用いて連結することにより構築することができる。または、プラスミドベクターと相同的な配列を両末端に付加した遺伝子を含むDNA断片と、インバースPCRにより増幅したプラスミド由来のDNA断片とを、In-Fusion HD Cloning Kit(タカラバイオ社)などの市販の組換えベクター作製キットを用いて連結させることにより得ることができる。

30

【0081】

欠失又は挿入する遺伝子を含む組換えベクターは、欠失又は挿入する遺伝子とプラスミドベクター由来の遺伝子(塩基配列)とを少なくとも含む。組換えベクターの一例としては、catA遺伝子及びaroY遺伝子を含む組換えベクター; catA遺伝子、aroY遺伝子及びkpdB遺伝子を含む組換えベクターなどが挙げられる。組換えベクターは、catA遺伝子、aroY遺伝子及びkpdB遺伝子に加えて、vanA遺伝子及びvanB遺伝子を含むことができる。また、組換えベクターは、上記した遺伝子以外の遺伝子を、本発明の課題解決を妨げない限りに含むものであってもよい。

【0082】

組換えベクターは、異種遺伝子又は異種核酸配列を含むことが好ましい。異種遺伝子は宿主微生物に本来的に存在しない(not naturally occurring)遺伝子であれば特に限定されず、例えば、宿主微生物由来の核酸配列に依拠しない合成遺伝子、挿入する遺伝子と由来生物が相違する生物に由来する遺伝子、宿主微生物と相違する他の微生物、植物、動物、ウイルスなどの生物に由来する遺伝子などが挙げられる。宿主微生物がシュードモナス属微生物である場合の異種遺伝子の具体例としては、pUC118由来のDNA断片、例えば、ラクトースプロモーター領域(Plac)などが挙げられるが、これに限定されない。

40

【0083】

(形質転換微生物の作製方法)

形質転換微生物の作製方法は特に限定されず、例えば、常法に従って、遺伝子の欠失又は

50

挿入が実現する態様で宿主微生物に挿入する方法などが挙げられる。具体的には、挿入する遺伝子のいずれかを発現誘導プロモーター及びターミネーターの間に挿入したDNAコンストラクトを作製し、次いで該DNAコンストラクトによって宿主微生物を形質転換することなどにより、挿入する遺伝子を発現する形質転換微生物が得られる。又は、欠失する遺伝子並びに該遺伝子の上流及び下流の領域を含むDNAコンストラクトを作製し、次いで該DNAコンストラクトによって宿主微生物を形質転換することなどにより、遺伝子を欠失する形質転換微生物が得られる。本明細書では、宿主微生物を形質転換するために作製された組換えベクターをDNAコンストラクトと総称してよぶ。

【0084】

DNAコンストラクトを宿主微生物に導入する方法は特に限定されないが、例えば、当業者に知られているとおりである、導入したDNAコンストラクトが自律的に増殖して遺伝子を発現するように宿主微生物に導入する方法；相同組換えを利用することによりDNAコンストラクトを宿主微生物の染色体上に直接的に挿入する方法などが挙げられる。

10

【0085】

挿入する遺伝子を含むDNAコンストラクトを宿主微生物に導入する方法として、相同組換えを利用する方法では、染色体上の組換え部位の上流領域及び下流領域と相同な配列の間に、DNAコンストラクトを連結し、宿主微生物のゲノム中に挿入することができる。

【0086】

形質転換微生物の作製に用いられるベクター-宿主系は、宿主微生物中において、挿入する遺伝子が発現し得る系又は染色体上の遺伝子が欠失し得る系であれば特に限定されないが、例えば、pJB866-スフィンゴモナド科微生物の系、pKT230(Gene, vol. 16, p237-247, 1981; 該文献の全記載はここに開示として援用される。)-スフィンゴモナド科微生物の系などが挙げられる。

20

【0087】

挿入する遺伝子を含むDNAコンストラクトは、宿主微生物の染色体に導入しない形で、自律的に増幅して、挿入する遺伝子を発現しても、宿主微生物の染色体に導入した形で挿入する遺伝子を発現しても、どちらでもよい。

【0088】

DNAコンストラクトには、形質転換された細胞を選択することを可能にするためのマーカー遺伝子が含まれていてもよい。マーカー遺伝子は特に限定されず、例えば、カナマイシン、テトラサイクリン、アンピシリン、カルベニシリンなどの薬剤に対する薬剤耐性遺伝子などが挙げられる。マーカー遺伝子は、欠失する遺伝子の途中に、又は欠失する遺伝子に置換するように含まれていてもよい。

30

【0089】

挿入する遺伝子を含むDNAコンストラクトは、遺伝子の種類によっては、宿主微生物中で遺伝子を発現することを可能にするプロモーター及びターミネーターに加えて、その他の制御配列(例えば、オペレーターなどの転写制御に関わるシス配列など)を含むことができる。

【0090】

DNAコンストラクトの一実施態様は、例えば、後述する実施例に記載があるpTS082プラスミドベクター、pTS084プラスミドベクター及びpTS079プラスミドベクターなどが挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0091】

スフィンゴモナド科微生物への形質転換方法としては、当業者に知られる方法を適宜選択することができるが、例えば、エレクトロポレーション(電気穿孔)法、接合伝達法などによって実施できる。

【0092】

形質転換微生物を選択及び増殖させるための培地は、用いる宿主微生物とマーカー遺伝子とに応じて適切なものを用いる。例えば、宿主微生物としてスフィンゴビウム・スピーシーズ SYK-6株を用い、マーカー遺伝子としてカナマイシン及びテトラサイクリンの

50

耐性遺伝子を用いた場合は、形質転換微生物の選択及び増殖は、例えば、形質転換微生物をこれらの薬剤を含むLB培地で培養することなどによって実施できる。

【0093】

形質転換微生物が作製されたことの確認は、例えば、遺伝子の欠失した形質転換微生物のみが生存し得る条件や挿入する遺伝子を発現する形質転換微生物のみが生存し得る条件下で形質転換微生物を培養することなどにより達成し得る。また、形質転換微生物を培養し、次いで培養後に得られた培養物におけるムコン酸の量が、同じ条件下で培養した宿主微生物の培養物におけるムコン酸の量よりも大きいことを確認することなどにより、形質転換微生物が作製されたことを確認することができる。

【0094】

形質転換微生物が作製されたことの確認は、形質転換微生物から染色体DNAを抽出し、これを鋳型としてPCRを行い、形質転換が起きた場合に増幅が可能なPCR産物が生じることやPCR産物の特性や塩基配列を確認することなどにより行ってもよい。

【0095】

例えば、欠失又は挿入する遺伝子のプロモーターの塩基配列に対するフォワードプライマーと、マーカー遺伝子の塩基配列に対するリバースプライマーとの組み合わせでPCRを行い、想定の長さの産物が生じることを確認する。

【0096】

相同組換えにより形質転換を行う場合には、用いた上流側の相同領域より上流に位置するフォワードプライマーと、用いた下流側の相同領域より下流に位置するリバースプライマーとの組み合わせでPCRを行い、相同組換えが起きた場合に想定される長さの産物が生じることを確認することが好ましい。

【0097】

(宿主微生物)

宿主微生物は、染色体上にプロトカテク酸分解酵素遺伝子を有し、かつ、シリリングリゲニン由来の芳香族化合物を資化するスフィンゴモナド科微生物であれば特に限定されず、例えば、染色体上にプロトカテク酸分解酵素遺伝子を有し、かつ、シリンガ酸及びシリンガアルデヒドを利用して増殖するスフィンゴモナド科微生物である。このようなスフィンゴモナド科微生物としては、プロトカテク酸を分解することができるスフィンゴモナド科微生物であることが好ましく、プロトカテク酸分解酵素を欠失してもシリンガ酸又はシリンガアルデヒドを資化するスフィンゴモナド科微生物であることがより好ましく、染色体上に*lig A* 遺伝子及び*lig B* 遺伝子を有するスフィンゴモナド科微生物がさらに好ましい。宿主微生物の具体的な好ましい態様は、スフィンゴビウム・スピーシーズ SYK-6 株、スフィンゴビウム・スピーシーズ 66-54 株、スフィンゴモナス・ヘングシュイエンシス (*Sphingomonas hengshuiensis*) WHSC-8 株、ノボスフィンゴビウム・スピーシーズ (*Novosphingobium* sp.) PP1Y 株、ノボスフィンゴビウム・スピーシーズ AAP93 株といったスフィンゴモナド科微生物であり、より好ましくは染色体上に*lig A* 遺伝子及び*lig B* 遺伝子を有し、かつ、シリンガ酸及びシリンガアルデヒドを資化するスフィンゴビウム・スピーシーズ SYK-6 株である。

【0098】

(欠失又は挿入する遺伝子の具体例)

欠失又は挿入する遺伝子として、*lig A* 遺伝子、*lig B* 遺伝子及び*lig M* 遺伝子の具体例は、スフィンゴビウム・スピーシーズ SYK-6 株が保有する*lig A* 遺伝子、*lig B* 遺伝子及び*lig M* 遺伝子であり、それぞれの塩基配列は配列番号19~20及び24に記載のものである。*cat A* 遺伝子、*van A* 遺伝子及び*van B* 遺伝子の具体例は、シュードモナス・プチダ KT2440 株が保有する*cat A* 遺伝子、*van A* 遺伝子及び*van B* 遺伝子であり、それぞれの塩基配列は配列番号21及び25~26に記載のものである。*aro Y* 遺伝子の具体例は、クレブシエラ・ニューモニエ・サブスピーシーズ・ニューモニエ A170-40 株が保有する*aro Y* 遺伝子であり、塩基配列は

10

20

30

40

50

配列番号 22 に記載のものである。k p d B 遺伝子の具体例は、クレブシエラ・ニューモニエ・サブスピーズ・ニューモニエ NBRC 14940 株が保有する k p d B 遺伝子であり、塩基配列は配列番号 23 に記載のものである。また、これらの遺伝子が発現するタンパク質のアミノ酸配列は、それぞれ配列番号 27 ~ 34 に記載のものである。

【0099】

スフィンゴビウム・スピーシーズ、シュードモナス・ブチダ、クレブシエラ・ニューモニエ以外の微生物から欠失又は挿入する遺伝子を得る方法は特に限定されないが、例えば、スフィンゴビウム・スピーシーズ SYK-6 株が保有する l i g A 遺伝子、l i g B 遺伝子及び l i g M 遺伝子の塩基配列（配列番号 19 ~ 20 及び 24）；シュードモナス・ブチダ KT2440 株が保有する c a t A 遺伝子、v a n A 遺伝子及び v a n B 遺伝子の塩基配列（配列番号 21 及び 25 ~ 26）；クレブシエラ・ニューモニエ・サブスピーズ・ニューモニエ A170-40 株が保有する a r o Y 遺伝子の塩基配列（配列番号 22）；クレブシエラ・ニューモニエ・サブスピーズ・ニューモニエ NBRC 14940 株が保有する k p d B 遺伝子の塩基配列（配列番号 23）に基づいて、その他の微生物のゲノム DNA 配列に対して B L A S T 相同性検索を行って、上記塩基配列と配列同一性の高い塩基配列を有する遺伝子を特定することにより得ることができる。また、その他の微生物の総タンパク質を基に、上記遺伝子が発現するタンパク質のアミノ酸配列（配列番号 27 ~ 34）と配列同一性の高いアミノ酸配列を有するタンパク質を特定し、該タンパク質を発現する遺伝子を特定することにより得ることができる。得られた遺伝子が欠失又は挿入する遺伝子に相当することは、得られた遺伝子により由来生物を宿主微生物として形質転換し、宿主微生物に比してムコン酸の生産量が增強されていることで確認できる。

10

20

【0100】

スフィンゴビウム・スピーシーズ SYK-6 株、スフィンゴビウム・スピーシーズ 66-54 株、スフィンゴモナス・ヘングシュイエンシス WHSC-8 株、ノボスフィンゴビウム・スピーシーズ PP1Y 株及びノボスフィンゴビウム・スピーシーズ AAP93 株はゲノム構成が近似していることから、これらそれぞれが有する遺伝子を挿入することにより、相互に形質転換できる蓋然性がある。例えば、スフィンゴビウム・スピーシーズ SYK-6 株から得られた遺伝子を、宿主微生物としてスフィンゴビウム・スピーシーズ 66-54 株、スフィンゴモナス・ヘングシュイエンシス WHSC-8 株、ノボスフィンゴビウム・スピーシーズ PP1Y 株及びノボスフィンゴビウム・スピーシーズ AAP93 株に導入して形質転換することができる。また、スフィンゴビウム・スピーシーズ SYK-6 株から得られた遺伝子を、宿主微生物としてシュードモナス属微生物、クレブシエラ属微生物、エンテロバクター属微生物、大腸菌などに導入して、発現させることも可能である。なお、挿入する遺伝子は、宿主微生物に発現させるために、コドン、二次構造、GC 含量などを最適化した遺伝子であってもよい。

30

【0101】

（形質転換微生物の一実施態様）

形質転換微生物（1）の具体的態様は、宿主微生物がスフィンゴビウム・スピーシーズ SYK-6 株、スフィンゴビウム・スピーシーズ 66-54 株、スフィンゴモナス・ヘングシュイエンシス WHSC-8 株、ノボスフィンゴビウム・スピーシーズ PP1Y 株及びノボスフィンゴビウム・スピーシーズ AAP93 株からなる群から選ばれるスフィンゴモナド科微生物であって、染色体上にある l i g A 遺伝子及び l i g B 遺伝子からなる群から選ばれる少なくとも 1 種の遺伝子が欠失し、挿入された c a t A 遺伝子が発現し、かつ、挿入された a r o Y 遺伝子又は a r o Y 遺伝子及び k p d B 遺伝子が発現する、形質転換スフィンゴモナド科微生物である。また、形質転換微生物（1）の別の具体的態様は、該形質転換スフィンゴモナド科微生物において、挿入された v a n A 遺伝子及び v a n B 遺伝子が発現する、形質転換スフィンゴモナド科微生物である。なお、これらの形質転換スフィンゴモナド科微生物は、染色体上に l i g M 遺伝子を有する場合、l i g M 遺伝子が発現するものであってもよい。

40

50

【0102】

このような形質転換微生物(1)は、染色体上にある*lig A*遺伝子及び/又は*lig B*遺伝子が欠失し、挿入された*cat A*遺伝子を発現し、かつ、挿入された*aro Y*遺伝子又は*aro Y*遺伝子及び*kpd B*遺伝子が発現するという態様を少なくともとることにより、非特許文献1に記載の形質転換微生物では不可能である、バニリン酸などのグアイアシルリグニン由来の芳香族化合物や4-ヒドロキシ安息香酸などの*p*-ヒドロキシフェニルリグニン由来の芳香族化合物と、シリンガ酸などのシリングリグニン由来の芳香族化合物とを炭素源として、増殖及びムコン酸の製造が可能である。後述する実施例に記載があるとおり、形質転換微生物のより好ましい態様は、さらに挿入された*van A*遺伝子及び*van B*遺伝子を発現する形質転換微生物である。

10

【0103】

形質転換微生物(1)の具体的態様は、後述する実施例に記載があるSME257/pTS084株などであるが、これらに限定されない。

【0104】

形質転換微生物(2)の具体的態様は、宿主微生物がスフィンゴビウム・スピーシーズSYK-6株、スフィンゴビウム・スピーシーズ66-54株、スフィンゴモナス・ヘングシュイエンシスWHSC-8株、ノボスフィンゴビウム・スピーシーズPP1Y株及びノボスフィンゴビウム・スピーシーズAAP93株からなる群から選ばれるスフィンゴモナド科微生物であって、染色体上にある*lig A*遺伝子及び*lig B*遺伝子からなる群から選ばれる少なくとも1種の遺伝子が欠失した、前記形質転換スフィンゴモナド科微生物である。

20

【0105】

このような形質転換微生物(2)は、染色体上にある*lig A*遺伝子及び/又は*lig B*遺伝子が欠失したという態様を少なくともとることにより、バニリン酸などのグアイアシルリグニン由来の芳香族化合物や4-ヒドロキシ安息香酸などの*p*-ヒドロキシフェニルリグニン由来の芳香族化合物と、シリンガ酸などのシリングリグニン由来の芳香族化合物とを炭素源として、増殖及びプロトカテク酸の製造が可能である。

【0106】

形質転換微生物(2)の具体的態様は、後述する実施例に記載があるSME257株などであるが、これらに限定されない。

30

【0107】

プロトカテク酸はムコン酸の前駆体であるとともに、プロトカテク酸・2,3-,3,4-,4,5-環開裂代謝産物の前駆体でもあり、該代謝産物の中には、例えば2-ピロン-4,6-ジカルボン酸(例えば、特許第4658244号;該文献の全記載はここに開示として援用される。)などの合成樹脂原料としての用途を有するものもある。また、プロトカテク酸は、医薬、農薬、香料などに対する合成原料としての用途もある。

【0108】

なお、特開2010-207094号公報(該文献の全記載はここに開示として援用される。)には、シュドモナス・プチダを宿主微生物として、染色体上の*pc aHG*遺伝子並びにプロトカテク酸5位酸化酵素遺伝子を破壊又は変異させ、かつ、挿入した*tp aK*遺伝子と*tp aAa*遺伝子と*tp aAb*遺伝子と*tp aB*遺伝子と*tp aC*遺伝子とを発現する形質転換微生物を作製し、該形質転換微生物をグルコースにより増殖させ、次いでテレフタル酸によりプロトカテク酸を製造したことが記載されている。しかし、特開2010-207094号公報には、リグニン又はリグニン由来の芳香族化合物によりプロトカテク酸を製造していない。実際、特開2010-207094号公報に記載の形質転換微生物は、シリングリグニンに由来する芳香族化合物、例えば、シリンガ酸を代謝することはできない。

40

【0109】

(製造方法)

本発明の一態様の製造方法(以下、製造方法(1)とよぶ。)は、バニリン酸といったグ

50

アイアシルリグニン由来の芳香族化合物とシリング酸やシリングアルデヒドといったシリギルリグニン由来の芳香族化合物とを、形質転換微生物(1)に作用させることにより、ムコン酸を得る工程を少なくとも含む。この際、グアイアシルリグニン由来の芳香族化合物とともに、又はグアイアシルリグニン由来の芳香族化合物に代えて、4-ヒドロキシ安息香酸といったp-ヒドロキシフェニルリグニン由来の芳香族化合物を形質転換微生物(1)に作用させてもよい。

【0110】

本発明の別の態様のムコン酸の製造方法(以下、製造方法(2)とよぶ。)は、バニリン酸といったグアイアシルリグニン由来の芳香族化合物とシリング酸といったシリギルリグニン由来の芳香族化合物とを、形質転換微生物(2)に作用させることにより、プロトカテク酸を得る工程を少なくとも含む。この際、グアイアシルリグニン由来の芳香族化合物とともに、又はグアイアシルリグニン由来の芳香族化合物に代えて、4-ヒドロキシ安息香酸といったp-ヒドロキシフェニルリグニン由来の芳香族化合物を形質転換微生物(2)に作用させてもよい。

10

【0111】

本明細書では、製造方法(1)及び(2)をまとめて指すときには、単に「製造方法」とよぶ。

【0112】

リグニン由来の芳香族化合物を形質転換微生物に作用させる方法は、リグニン由来の芳香族化合物と形質転換微生物とが接触して、形質転換微生物が有する酵素によってムコン酸又はプロトカテク酸が生産できる方法であれば特に限定されないが、例えば、リグニン由来の芳香族化合物を含有し、かつ、形質転換微生物の生育に適した培地を用いて、形質転換微生物に適した各種培養条件下で形質転換微生物を培養することによって、ムコン酸又はプロトカテク酸を製造する方法などが挙げられる。培養方法は特に限定されず、例えば、通気条件下で行う固体培養法や液体培養法などが挙げられる。なお、グアイアシルリグニン由来の芳香族化合物、p-ヒドロキシフェニルリグニン由来の芳香族化合物及びシリギルリグニン由来の芳香族化合物と形質転換微生物との接触の順序は特に限定されないが、シリギルリグニン由来の芳香族化合物に次いでグアイアシルリグニン由来の芳香族化合物及び/又はp-ヒドロキシフェニルリグニン由来の芳香族化合物を形質転換微生物に接触させること、シリギルリグニン由来の芳香族化合物とグアイアシルリグニン由来の芳香族化合物及び/又はp-ヒドロキシフェニルリグニン由来の芳香族化合物とを同時に形質転換微生物に作用させることのいずれかが好ましい。

20

30

【0113】

培地は、宿主微生物を培養する通常の培地、すなわち、炭素源、窒素源、無機物、その他の栄養素を適切な割合で含有するものであれば、合成培地及び天然培地のいずれでも使用できる。宿主微生物はスフィンゴモナド科微生物であることから、後述する実施例に記載があるようなW×最少培地などを利用することができるが、特に限定されない。炭素源は、リグニン由来の芳香族化合物、糖や有機酸などのその他の炭素源又はこれらの組み合わせを用いることができる。ただし、培地成分には、ムコン酸又はプロトカテク酸の製造に關与する酵素の活性化に必要な成分、例えば、 Fe^{2+} が含まれることが好ましい。鉄イオン、マグネシウムイオンなどを化合物として培地に添加することができるが、ミネラル含有物として添加してもよい。

40

【0114】

リグニン由来の芳香族化合物は、グアイアシルリグニン、シリギルリグニン及びp-ヒドロキシフェニルリグニンのいずれかのリグニン並びにこれらのリグニンから誘導し得る芳香族化合物であれば特に限定されないが、例えば、グアイアシルリグニン、シリギルリグニン及びp-ヒドロキシフェニルリグニンの分解物に相当する化合物などが挙げられ、具体的には、p-クマル酸、フェルラ酸、シリング酸、p-ヒドロキシ安息香酸、バニリン酸、プロトカテク酸などが挙げられる。リグニン由来の芳香族化合物は、リグニンのモデル化合物とされている化合物、例えば、グアイアシルグリセロール - - グアイアシ

50

ルエーテルなどを含む。リグニン由来の芳香族化合物は、リグニンを含むバイオマスや該バイオマスを前処理に供して抽出したものであることが好ましいが、該バイオマスとは関係なく化学的に合成及び精製したものであってもよい。リグニン由来の芳香族化合物は、上記したものの1種を単独で、又は2種以上を組み合わせ使用できる。

【0115】

リグニンを含むバイオマス(以下、リグノセルロースとよぶ場合がある。)は特に限定されないが、例えば、草や木などの天然物、これら天然物に処理を加えて得られるもの、農業廃棄物などが挙げられるが、具体的には針葉樹や広葉樹などの木質系のバイオマスなどが挙げられる。例えば、広葉樹は、シリングルリグニンを多く含むことが知られている。

【0116】

リグノセルロースは、前処理の有無などによって、例えば、固体状、懸濁状、液体状などであり得る。例えば、リグノセルロースを粉碎したものを液体に加えて得られる懸濁液とすることもできる。

【0117】

リグノセルロースは、リグニン抽出物であってもよい。リグニン抽出物としては、例えば、リグノセルロースの粉末化したものを、0.1%W/V~50%W/V、好ましくは1%W/V~20%W/Vとなるように、リグニンの抽出に適した溶媒中に懸濁した懸濁液などが挙げられる。また、リグニン抽出物は、該懸濁液を10~150、好ましくは20~130、より好ましくは20~80で、数時間~数日間、好ましくは1時間~6日間の抽出処理に供し、次いで抽出処理液から固形分を除いた液体状のリグニン抽出物、又は液体状のリグニン抽出物から溶媒を留去し、乾固することにより得られる、固体状のリグニン抽出物などであってもよい。

【0118】

リグニン抽出物の調製方法は特に限定されないが、例えば、以下の方法などが挙げられる。すなわち、小型オートクレーブ装置(耐圧硝子工業株式会社、ポータブルリアクターTVS-1)のステンレスベッセルに2M NaOH 50mL、脱脂シラカバ木粉 1.5g、ニトロベンゼン 3mLを入れ、500rpmで攪拌しながら170で2.5時間処理する。60以下まで放冷し、遠心分離(6,000g、10min)により上清を回収する。得られた上清を、ジエチルエーテル抽出を3回繰り返す(水層を回収)。水層を塩酸で酸性化した後、ジエチルエーテル抽出を3回繰り返す(エーテル層を回収)。エーテル層に硫酸ナトリウムを加え、冷蔵庫内で一晚脱水処理する。エーテル層を回収し、抽出物を減圧乾固する。エーテル抽出物を、水酸化ナトリウムを加えながらイオン交換水に溶解し(pH 9)、シラカバリグニン由来の芳香族化合物溶液とする。

【0119】

リグニンの抽出や処理に適した溶媒は特に限定されず、例えば、水、ジオキサン、メタノール、イソプロパノールなどの低分子アルコール、ニトロベンゼン、ジエチルエーテル、ジメチルホルムアミドなどが挙げられる。

【0120】

培養条件は、当業者により通常知られるスフィンゴモナド科微生物の培養条件を採用すればよく、例えば、培地の初発pHは5~10に調整し、培養温度は20~40、培養時間は数時間~数日間、好ましくは1~7日間、より好ましくは2~5日間など、適宜設定することができる。培養手段は特に限定されず、通気攪拌深部培養、振盪培養、静置培養などを採用することができる。ただし、desA遺伝子が発現するDesAの酵素活性及びligM遺伝子が発現するLigMの酵素活性を利用する場合、溶存酸素濃度は特に限定されないが、vanA遺伝子及びvanB遺伝子が発現するVanA及びVanBの酵素活性を利用する場合は溶存酸素が十分になるような条件下で培養することが好ましい。例えば、培地及び培養条件の一例として、後述する実施例に記載があるとおりの、炭素源としてシリング酸及びパニリン酸を含有するWx最少培地を用いた、30、180rpmでの1~5日間の振盪培養や攪拌培養などが挙げられる。なお、炭素源その他の成分は、培養開始後に適宜追加することができる。

10

20

30

40

50

【0121】

培養終了後に培養物からムコン酸又はプロトカテク酸を取得する方法は特に限定されない。ムコン酸又はプロトカテク酸は培養液中に蓄積することから、培養物から濾過、遠心分離などの通常の固液分離操作により菌体と培養上清とを分離し、回収した培養上清からカラムを用いた固相抽出やムコン酸又はプロトカテク酸が可溶性のある溶媒を用いた溶媒抽出などによりムコン酸又はプロトカテク酸を抽出する。

【0122】

抽出溶媒はムコン酸又はプロトカテク酸が溶解するものであれば特に限定されず、例えば、メタノール、エタノール、イソプロパノール、アセトンなどの有機溶媒；これらの有機溶媒と水とを混合させた含水有機溶媒などが挙げられる。抽出温度は特に限定されないが、例えば、室温から100℃に設定することができる。

10

【0123】

ムコン酸の抽出方法の具体的一態様としては、例えば、Vardonらの方法(Green chemistry, vol. 18, p3397-3413, 2016; 該文献の全記載はここに開示として援用される。)や該方法を一部変更した方法などが挙げられる。具体的には、培養上清に活性炭(12.5%(w/v)、100メッシュ)を添加し、1時間攪拌する。吸引ろ過により活性炭を除去し、ろ液を回収する。回収したろ液に塩酸を加え、pH 2に調製した後、4℃で一晩静置する。吸引ろ過により沈殿物を回収し、沈殿物はイオン交換水で洗浄した後、吸引ろ過により回収し、減圧乾燥する。乾燥した固体をエタノールに懸濁し、吸引ろ過により不要物を除去し、ろ液を回収する。ろ液をエバポレーターで減圧乾固して、精製ムコン酸を得る。

20

【0124】

プロトカテク酸の抽出方法の一態様としては、例えば、培養上清に塩酸を加え、pH 2に調製した後、酢酸エチル等の有機溶媒によって抽出することが出来る。得られた抽出物を再結晶化またはイオン交換樹脂を用いることによってプロトカテク酸を得る方法が挙げられる。

【0125】

ムコン酸若しくはプロトカテク酸の定性的又は定量的分析は特に限定されず、例えば、HPLCなどにより行うことができる。HPLC分離条件は当業者であれば適宜選択することができ、例えば、後述する実施例に記載がある条件で実施できる。

30

【0126】

形質転換微生物を用いれば、ムコン酸又はプロトカテク酸を高収率で得ることができる。例えば、5 mM バニリン酸及び5 mM シリンガ酸を炭素源とした場合は35時間の培養で93%の収率(対理論収量)でムコン酸を得ることができ；5 mM p-ヒドロキシ安息香酸及び5 mM シリンガ酸を炭素源とした場合は35時間の培養で75%の収率(対理論収量)でムコン酸を得ることができ；シラカバリグニン由来芳香族化合物水溶液を炭素源とした場合は48時間の培養で16.5 mg/Lのムコン酸を得ることができ；5 mM バニリン酸及び5 mM シリンガ酸を炭素源とした場合は42時間の培養で83%の収率(対理論収量)でプロトカテク酸を得ることができ；5 mM p-ヒドロキシ安息香酸及び5 mM シリンガ酸を炭素源とした場合は30時間の培養で75%の収率(対理論収量)でプロトカテク酸を得ることができる。

40

【0127】

本発明の製造方法では、本発明の目的を達成し得る限り、上記した工程の前段若しくは後段又は工程中に、種々の工程や操作を加入することができる。

【0128】

(ムコン酸及びプロトカテク酸の用途)

本発明の一態様の形質転換微生物や製造方法を利用して得られたムコン酸及びプロトカテク酸は、種々の産業上有用な化合物に変換することができ、例えば、界面活性剤、難燃剤、UV光安定化剤、熱硬化性プラスチック、コーティング剤などとしての利用が期待できるムコン酸誘導体の原料として利用することができる。具体的には、ムコン酸誘導体の一

50

つであるアジピン酸は、ナイロン66（ポリアミドの一つ）として現実に利用されている。プロトカテク酸は、ムコン酸を製造するための原材料となり得るとともに、医薬、農薬、香料等の合成原料としての用途もある。また、プロトカテク酸は、プロトカテク酸・2,3-、3,4-、4,5-環開裂代謝産物の前駆体でもあり、該代謝産物の中には、例えば2-ピロン 4,6-ジカルボン酸（例えば、特許第4658244号；該文献の全記載はここに開示として援用される。）など合成樹脂原料としての用途を有するものもある。

【0129】

以下、本発明を実施例によってさらに具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではなく、本発明の課題を解決し得る限り、本発明は種々の態様をとることができる。

10

【実施例】

【0130】

[1. Sphingobium sp. SME257株の作製]

以下の手順により、スフィンゴビウム・スピーシーズ (Sphingobium species) SYK-6株からプロトカテク酸 4,5-ジオキシゲナーゼ遺伝子 (ligAB 遺伝子) を破壊した変異株である、スフィンゴビウム・スピーシーズ SME257株を作製した。

【0131】

スフィンゴビウム・スピーシーズ SYK-6株のゲノムDNAを鋳型として、配列番号1及び2のプライマー1及び2からなるプライマーセット並びに配列番号3及び4のプライマー3及び4からなるプライマーセットを用いたPCR法によって、プロトカテク酸・4,5-ジオキシゲナーゼ・小サブユニット (protocatechuate 4,5-dioxygenase; ligA) 遺伝子上流領域及びプロトカテク酸・4,5-ジオキシゲナーゼ・大サブユニット (protocatechuate 4,5-dioxygenase; ligB) 遺伝子下流領域を得た。

20

【0132】

得られたDNA断片と、予めBamHIで消化したpAK405プラスミドDNAとを、In-Fusion HD Cloning Kit (タカラバイオ株式会社) を用いて連結することによって、pAKDligABプラスミドDNAを得た。

30

【0133】

pAKDligABプラスミドDNAを用いて、三親接合法により、スフィンゴビウム・スピーシーズ SYK-6株を形質転換した。形質転換体は、ナリジクス酸 (Na1) 12.5 mg/L及びカナマイシン (Km) 50 mg/Lを含むLB寒天培地上で生育可能であるNa1-Km耐性株として選抜した。得られたNa1-Km耐性株を、Na1 12.5 mg/L及びストレプトマイシン (Sm) 100 mg/Lを含むLB液体培地に接種し、30 で48時間振盪培養した。

【0134】

得られた培養液をSm 100 mg/Lを含むLB寒天培地上に塗抹し、30 で72時間静置培養した。生育した複数のコロニーから、ゲノムDNAをそれぞれ抽出し、次いでPCR法によって、ゲノムDNA上のligAB遺伝子が欠失している形質転換体を、スフィンゴビウム・スピーシーズ SME257株としてスクリーニングした。

40

【0135】

[2. シリンガ酸 (SA) 及びバニリン酸 (VA) を炭素源としたプロトカテク酸 (PCA) 生産]

SME257株をLB液体培地 10 mLに接種し、30 で36時間振盪培養した。得られた培養液をWx緩衝液 (KH₂PO₄ 1.7 g/L、Na₂HPO₄・12H₂O 9.8 g/L及び(NH₄)₂SO₄ 1 g/L) で洗浄した後、5 mM VA、5 mM SA及び1 g/L Tryptoneを含むWx最少培地 (KH₂PO₄ 1.7 g/L、Na₂HPO₄・12H₂O 9.8 g/L、(NH₄)₂SO₄ 1 g/L、M

50

$\text{g SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g/L、 $\text{Fe SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 9.5 mg/L、 Mg O 10.75 mg/L、 Ca CO_3 2 mg/L、 $\text{Zn SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.44 mg/L、 $\text{Mn SO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.12 mg/L、 $\text{Cu SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.25 mg/L、 $\text{Co SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.28 mg/L、 H_3BO_3 0.06 mg/L及び12 N HCl 51.3 $\mu\text{L/L}$) 10 mLに接種し、30 で振盪培養した。

【0136】

培養開始後、一定時間毎に、培養液の光学密度(optical density; OD)を測定し、さらに培養液を遠心分離して得た培養上清について、SA、VA及びPCAの濃度を測定した。

【0137】

OD測定には600 nmの波長を使用し、Gene Quant 100 (GEヘルスケア・ジャパン株式会社)を用いてOD600値を測定した。SA、VA及びPCAの濃度は、高速液体クロマトグラフ(Acquity ultraperformance liquid chromatography system; 日本ウォーターズ株式会社)を用いて測定した。カラムはTSK gel ODS-140 HTP column (径2.1 mm、長さ100 mm、粒径2.3 μm ; 東ソー株式会社)を使用し、30 で保温した。勾配(グラジエント)溶離モード(溶媒A: 99.9% (v/v) H_2O 、0.1% (v/v) HCOOH 、溶媒B: 99.9% (v/v) CH_3CN 、0.1% (v/v) HCOOH)を使用し、溶媒Aを99%、溶媒Bを1%で平衡化した後、分析を開始して3分後から6分後にかけて溶媒Bの割合を25%まで上昇させ、次いで1分かけて溶媒Bの割合を1%まで低下させた。移動相の流速は0.5 mL/minとし、測定波長はSAについて270 nmとし、VA及びPCAについて260 nmとした。

【0138】

培養時間0、6、18、30及び42時間後のOD600値、SA濃度、VA濃度及びPCA濃度の測定結果をまとめたものを表1に示す。

【0139】

【表1】

培養時間 (h)	0	6	18	30	42
OD600	0.21	0.91	1.93	2.04	2.12
SA (g/L)	1.09	0.99	0.29	0.03	0.01
VA (g/L)	0.79	0.74	0.35	0.11	0.01
PCA (g/L)	0	0.05	0.39	0.56	0.60

【0140】

表1が示すとおり、SME257株は、SAを利用して増殖し、かつ、VAからPCAを経時的に生産した(理論収量に対する収率は83%)。

【0141】

[3. SA及び4-ヒドロキシ安息香酸(HBA)を炭素源としたPCA生産]
SME257株を、LB液体培地10 mLに接種し、30 で36時間振盪培養した。得られた培養液をWx緩衝液で洗浄した後、5 mM HBA、5 mM SA及び1 g/L Tryptoneを含むWx最少培地10 mLに接種し、30 で振盪培養した。

【0142】

培養開始後、一定時間毎に、培養液のOD600を測定し、さらに培養液を遠心分離して得た培養上清について、SA、HBA及びPCAの濃度を測定した。OD600測定並びにSA、HBA及びc c MAの濃度測定は上記2に記載の方法と同様に行った。

【0143】

培養時間0、6、18及び30時間後のOD600値、SA濃度、HBA濃度及びPCA濃度の測定結果をまとめたものを表2に示す。

【表 2】

培養時間 (h)	0	6	18	30
OD600	0.20	0.79	1.34	1.57
SA (g/L)	1.07	1.00	0.66	0.29
HBA (g/L)	0.82	0.73	0.10	0
PCA (g/L)	0	0.08	0.63	0.68

【0144】

10

表 2 が示すとおり、SME257 株は、SA を利用して増殖し、かつ、HBA から PCA を経時的に生産した（理論収量に対する収率は 75%）。

【0145】

[4. SME257 / pTS084 株の作製]

以下の手順により、aroY 遺伝子、kpdB 遺伝子、catA 遺伝子、vanA 遺伝子及び vanB 遺伝子を発現するプラスミドである pTS084 プラスミド DNA を用いて、スフィンゴビウム・スピーシーズ SME257 株を形質転換し、SME257 / pTS084 株を作製した。

【0146】

20

クレブシエラ・ニューモニエ・サブスピーシーズ・ニューモニエ (*Klebsiella pneumoniae subspecies pneumoniae*) A170-40 株のゲノム DNA の部分断片を鋳型として、配列番号 5 及び 6 のプライマー 5 及び 6 からなるプライマーセットを用いた PCR 法によって、プロトカテク酸・デカルボキシラーゼ (protocatechuate decarboxylase; aroY) 遺伝子を含む約 1.5 kbp の DNA 断片を得た。得られた DNA 断片を KpnI で消化し、予め KpnI で消化した pMCL200 プラスミド DNA にクローニングすることにより、pTS036 プラスミド DNA を得た。

【0147】

30

クレブシエラ・ニューモニエ・サブスピーシーズ・ニューモニエ NBRC14190 株の DNA を鋳型として、配列番号 7 及び 8 のプライマー 7 及び 8 のプライマーセットを用いた PCR 法によって、4-ヒドロキシ安息香酸・デカルボキシラーゼ・サブユニット B (4-hydroxybenzoate decarboxylase subunit B; kpdB) 遺伝子を含む約 0.6 kbp の DNA 断片を増幅した。増幅した DNA 断片の両末端を平滑化処理に供し、次いで XbaI で消化した後、予め平滑化処理した pTS036 プラスミド DNA に連結することにより、pTS052 プラスミド DNA を得た。pTS052 プラスミド DNA としては、pTS036 プラスミド DNA に含まれる aroY 遺伝子と順方向に kpdB 遺伝子が連結されたクローンとして選択して得た。

【0148】

40

pTS052 プラスミド DNA を鋳型として、配列番号 9 及び 10 のプライマー 9 及び 10 からなるプライマーセットを用いた PCR 法により、aroY 遺伝子及び kpdB 遺伝子を含む約 2.2 kbp の DNA 断片を増幅した。増幅した DNA 断片を、予め BamHI 及び EcoRI で消化した pJB866 プラスミド DNA に Infusion HD Cloning Kit を用いて連結することにより、pTS074 プラスミド DNA を得た。

【0149】

50

シュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*) KT2440 株のゲノム DNA を鋳型として、配列番号 11 及び 12 のプライマー 11 及び 12 からなるプライマーセットを用いた PCR 法により、カテコール・1, 2-ジオキシゲナーゼ (catechol 1, 2-dioxygenase; catA) 遺伝子を含む約 1.0 kbp の DNA 断片を得た。得られた DNA 断片を、予め SacI で消化した pTS074 プ

ラスミドDNAにInfusion HD Cloning Kitを用いて連結することにより、pTS079プラスミドDNAを得た。

【0150】

pUC118プラスミドDNAを鋳型として、配列番号13及び14のプライマー13及び14からなるプライマーセットを用いたPCR法によって、ラクトースプロモーター領域(Plac)を含む約200bpのDNA断片を得た。得られたDNA断片を、pTS079プラスミドDNAのNotIサイトにInfusion HD Cloning Kitを用いてクローニングすることにより、pTS082プラスミドDNAを得た。

【0151】

シュードモナス・ブチダ KT2440株のゲノムDNAを鋳型として、配列番号15及び16のプライマー15及び16からなるプライマーセットを用いたPCR法によって、バニレート・デメチラーゼ・オキシゲナーゼ成分(vanillate demethylase oxygenase component; vanA)遺伝子及びバニレート・デメチラーゼ・オキシドレダクターゼ成分(vanillate demethylase oxidoreductase component; vanB)遺伝子を含む約2.0kbpのDNA断片を得た。得られたDNA断片を、SacI及びSmaIで消化し、予めSacI及びSmaIで消化したpQE30プラスミドDNAと連結することにより、pKY001プラスミドDNAを得た。

10

【0152】

pKY001プラスミドDNAを鋳型として、配列番号17及び18のプライマー17及び18からなるプライマーセットを用いたPCR法により、vanA遺伝子及びvanB遺伝子を含む約2.0kbpのDNA断片を増幅した。増幅したDNA断片を、予めNotIで消化したpTS082プラスミドDNAとInfusion HD Cloning Kitを用いて連結することにより、pTS084プラスミドDNAを得た。

20

【0153】

得られたpTS084プラスミドDNAを用いて、スフィンゴビウム・スピーシーズ SME257株を形質転換することにより、SME257/pTS084株を作製した。

【0154】

[5.SA及びVAを炭素源としたcis,cis- μ コン酸(ccMA)生産]
SME257/pTS084株を、テトラサイクリン(Tc) 12.5mg/Lを含むLB液体培地 10mLに接種し、30で36時間振盪培養した。得られた培養液をWx緩衝液(KH₂PO₄ 1.7g/L、Na₂HPO₄·12H₂O 9.8g/L及び(NH₄)₂SO₄ 1g/L)で洗浄した後、Tc 12.5mg/L、5mM VA、5mM SA及び1g/L Tryptoneを含むWx最少培地(KH₂PO₄ 1.7g/L、Na₂HPO₄·12H₂O 9.8g/L、(NH₄)₂SO₄ 1g/L、MgSO₄·7H₂O 0.1g/L、FeSO₄·7H₂O 9.5mg/L、MgO 10.75mg/L、CaCO₃ 2mg/L、ZnSO₄·7H₂O 1.44mg/L、MnSO₄·4H₂O 1.12mg/L、CuSO₄·5H₂O 0.25mg/L、CoSO₄·7H₂O 0.28mg/L、H₃BO₃ 0.06mg/L及び12N HCl 51.3 μ L/L) 10mLに接種し、30で振盪培養した。

30

40

【0155】

培養開始後、一定時間毎に、培養液のOD600を測定し、さらに培養液を遠心分離して得た培養上清について、SA、VA及びccMAの濃度を測定した。OD600測定並びにSA、VA及びccMAの濃度測定は上記2に記載の方法と同様に行った。

【0156】

培養時間0、5、10、20及び35時間後のOD600値、SA濃度、VA濃度及びccMA濃度の測定結果をまとめたものを表3に示す。

【0157】

【表 3】

培養時間 (h)	0	5	10	20	35
OD600	0.24	0.58	1.18	2.07	2.12
SA (g/L)	0.99	0.94	0.82	0.03	0
VA (g/L)	0.77	0.67	0.40	0	0
ccMA (g/L)	0	0.02	0.07	0.54	0.61

【0158】

10

表 3 が示すとおり、SME257/pTS084 株は、SA を利用して増殖し、かつ、VA から ccMA を経時的に生産した（理論収量に対する収率は 93%）。

【0159】

[6. SA 及び HBA を炭素源とした ccMA 生産]

SME257/pTS084 株を、Tc 12.5 mg/L を含む LB 液体培地 10 mL に接種し、30 で 36 時間振盪培養した。得られた培養液を Wx 緩衝液で洗浄した後、Tc 12.5 mg/L、5 mM HBA、5 mM SA 及び 1 g/L Tryptone を含む Wx 最少培地 10 mL に接種し、30 で振盪培養した。

【0160】

20

培養開始後、一定時間毎に、培養液の OD600 を測定し、さらに培養液を遠心分離して得た培養上清について、SA、HBA 及び ccMA の濃度を測定した。OD600 測定並びに SA、HBA 及び ccMA の濃度測定は上記 2 に記載の方法と同様に行った。

【0161】

培養時間 0、5、10、20 及び 35 時間後の OD600 値、SA 濃度、HBA 濃度及び ccMA 濃度の測定結果をまとめたものを表 4 に示す。

【表 4】

培養時間 (h)	0	5	10	20	35
OD600	0.23	0.59	1.19	1.90	2.00
SA (g/L)	0.97	0.87	0.57	0.04	0
HBA (g/L)	0.80	0.76	0.62	0	0
ccMA (g/L)	0	0.004	0.03	0.51	0.62

30

【0162】

表 4 が示すとおり、SME257/pTS084 株は、SA を利用して増殖し、かつ、HBA から ccMA を経時的に生産した（理論収量に対する収率は 75%）。

【0163】

[7. シラカバリグニン由来芳香族化合物を炭素源とした ccMA 生産]

40

常法に従い、シラカバ木粉をアルコール-ベンゼン抽出処理に供し、次いで処理後のシラカバ木粉 1.5 g をアルカリニトロベンゼン酸化分解処理及びジエチルエーテル抽出処理に供した（木質科学実験マニュアル、日本木材学会編、文永堂出版を参照；該文献の全記載はここに開示として援用される。）。ニトロベンゼン酸化分解後のアルカリ溶液をジエチルエーテル抽出処理し、得られた水層を酸性化処理に供し、さらにジエチルエーテル抽出処理に供した。エーテル層として得られたジエチルエーテル抽出物をシラカバリグニン由来芳香族化合物とし、シラカバリグニン由来芳香族化合物水溶液（pH 9）を炭素源として添加した Wx 培地における ccMA 生産を評価した。

【0164】

SME257/pTS084 株を、Tc 12.5 mg/L を含む LB 液体培地 10 mL に接種し、30 で 36 時間振盪培養した。得られた培養液を Wx 緩衝液で洗浄した後

50

、Tc 12.5 mg/L及び0.1 g/L Tryptoneを含むWx最少培地10 mLに接種し、炭素源としてシラカバリグニン由来芳香族化合物水溶液 5 µLを添加し、30 で振盪培養した。培養4時間毎にシラカバリグニン由来芳香族化合物水溶液 5 µLを追添加した。

【0165】

培養開始後、一定時間毎に、培養液のOD600を測定し、さらに培養液を遠心分離して得た培養上清について、ccMA濃度を測定した。ccMAの濃度測定は上記2に記載の方法と同様に行い、高速液体クロマトグラフでの分離条件は溶媒Aを99%、溶媒Bを1%で平衡化した後、分析を開始して3分後から6分後にかけて溶媒Bの割合を25%まで上昇させ、次いで1分かけて溶媒Bの割合を99%まで上昇させて1分間保持し、その後、1分かけて溶媒Bの割合を1%まで低下させた。移動相の流速は0.5 mL/minとし、測定波長はccMAについて260 nmとした。

10

【0166】

培養時間0、12、24及び48時間後のccMA濃度の測定結果をまとめたものを表5に示す。

【0167】

【表5】

培養時間 (h)	0	12	24	48
OD600	0.23	0.44	0.45	0.47
ccMA (mg/L)	0	3.0	8.4	16.5

20

【0168】

表5が示すとおり、SME257/pTS084株は、シラカバリグニン由来芳香族化合物を利用して増殖し、かつ、ccMAを経時的に生産した。

【0169】

配列表に記載の配列は以下のとおりである：

[配列番号1] プライマー1

ATCCGCCCTAGTGGACGAATGGTCCCTCTTTAGTGATTTTCG

[配列番号2] プライマー2

CGACTCTAGAGGATCAGATTTTCGACGACGAGATCC

[配列番号3] プライマー3

TCGTCCACTAGGGCGGATCGACATTC

[配列番号4] プライマー4

CGGTACCCGGGGATCAGGTGCCGAGCGGCCCG

[配列番号5] プライマー5

AGCTGGTACCATTAAAGAGGAGAAAATTA ACTATGACCCGACCGATT CAG

[配列番号6] プライマー6

AGCTGGTACCTTATTTTGCCTACCCTGGTT

[配列番号7] プライマー7

AGCTGAATTCATTAAAGAGGAGAAAATTA ACTATGAACTGATTATTGGGATGACG

[配列番号8] プライマー8

AGCTTCTAGATTATTCGATCTCCTGTGCAAAT

[配列番号9] プライマー9

GAAGCTTCGTGGATCATTAAAGAGGAGAAAATTA ACTATGACCCGACCGATT

[配列番号10] プライマー10

ACGTCTCGAGGAATTCATTATTCGATCTCCTGTGCAAAT

[配列番号11] プライマー11

CGGCCGCGTACCAGTTAAAGAGGAGAAAATTA ACTATGACCGTGA

[配列番号12] プライマー12

30

40

50

CTAGATACCTAGGTGTCAGCCCTCCTGCAACGCC

[配列番号 1 3] プライマー 1 3

ATGTGAATTGCGGCCAGCGCCAATACGCAAACC

[配列番号 1 4] プライマー 1 4

ACTGGTACCGCGCCGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTC

[配列番号 1 5] プライマー 1 5

ATGCGAGCTCATGTACCCCAAAAACACCT

[配列番号 1 6] プライマー 1 6

ATGCCCGGGTCAGATGTCCAGCACCCAGCA

[配列番号 1 7] プライマー 1 7

CATGATTACGCGCCATTAAGAGGAGAAATTAAC

[配列番号 1 8] プライマー 1 8

ACTGGTACCGCGCCTCAGATGTCCAGCACCCAGCA

[配列番号 1 9] l i g A 遺伝子

ATGACCGAGAAGAAAAGAGAGAATCGACGTTTCACGCCTATCTCGCCGAGTTTGACGACATTCGCGCACCCGCGTGTTCAC

CGCCAGCGCGCGCAAGGGCTATAATCTCAACCAGTTCGCGATGAGCCTGATGAAGGCCGAGAACCAGCGAGCGTTTCA

AGGCCGACGAGAGCGCCTATCTGGACGAGTGGAACTCACGCCCGCCGCAAGGCCGCGTGTGGCCCGGACTACAAT

GCGATGATCGACGAGGGCGGGAATGTCTATTTCTGTCCAAGCTGTTCTCGACCGACGGCAAGAGCTTCCAGTTCCGCCG

CGGCTCGATGACCGCATGACTCAGGAAGAATATGCACAGATGATGATCGATGGCGGCCGTTCCGCCCGGGTGTGCGCT

CGATCAAGGGAGGCTACTGA

[配列番号 2 0] l i g B 遺伝子

ATGGCACGCGTTACCACGGGCATCACGTCCAGCCACATTCCCGCGCTCGGCGCGGCCATCCAGACCGGCACCAGCGACAA

TGATTACTGGGGCCCGTGTTCAGGGCTACCAGCCGATCCGCGACTGGATCAAGCAGCCCGGCAACATGCCGGACGTGCG

TGATCCTGGTCTATAACGACCATGCCTCGGCCTTCGACATGAACATCATCCCGACCTTCGCGATCGGCTGCGCGGAAACG

TTCAAGCCCGCCGACGAGGGATGGGGCCCGCGCCCGGTGCCCGACGTGAAGGGCCATCCGGACCTTGCTGGCACATCGC

CCAGAGCCTGATCCTCGACGAGTTCGACATGACCATCATGAACCAGATGGACGTGATCATGGCTGCACCGTGCCGCTCT

CGATGATCTTCGCGAGCCCGAGGAATGGCCGTGCAAGGTCATCCCTTCCCGGTCAATGTCGTCACCTTATCCGCCGCCG

TCGGGCAAGCGCTGCTTCGCGCTCGGTGACAGCATCCGCGCCGCGGTGCGAGAGCTTCCCGGAAGACCTCAACGTCCATGT

CTGGGGCACCGGCGGCATGAGCCACCAGCTTCAGGGCCCGCGCGCCGCTCATCAACAAGGAGTTGACCTGAACTTCA

TCGACAAGCTGATCAGCGACCCCGAGGAGCTGAGCAAGATGCCGCACATCCAGTATCTGCGCGAAAGCGGATCGGAAGGC

ATCGAGCTGGTCAATGTGGCTCATCATGCGCGGCGGCTGCCGGAGAAGGTGCGGGATCTCTACACCTTCTATCACATCCC

GGCCTCCAACACCGCGCTCGGCGCGATGATCCTGCAGCCGAGGAGACCCGAGGTACACCGCTCGAACCGCGCAAGGTGA

TGAGCGGACACAGCCTGGCCCAGGCCTGA

[配列番号 2 1] c a t A 遺伝子

ATGACCGTGAAAATTTCCACACTGCCGACATTCAGCCCTTCTTCAACCGGGTAGCTGGCCTGGACCATGCCGAAGGAAA

CCCGCGCTTCAAGCAGATCATTCTGCGCGTGTGCAAGACACCGCCCGCCTGATCGAAGACCTGGAGATTACCGAGGACG

AGTTCTGGCACGCCGTGACTACCTCAACCAGCCTGGGCGGCCGTAACGAGGCAGGCCTGCTGGCTGCTGGCCTGGGTATC

GAGCACTTCTCGACCTGCTGCAGGATGCCAAGGATGCCGAAGCCGGCCTTGGCGGCGGCACCCCGCGCACCATCGAAGG

CCCGTTGTACGTTGCCGGGGCGCCGCTGGCCAGGGCGAAGCGCGCATGGACGACGGCACTGACCCAGGCGTGGTGTATG

TCCTTCAGGGCCAGGTGTTTCGATGCCGACGGCAAGCCGTTGGCCGGTGCCACCGTCGACCTGTGGCACGCCAATACCCAG

GGCACCTATTTCGACTTCGATTTCGACCCAGTCCGAGTTCAACCTGCGTCGGCGTATCATCACCGATGCCGAGGGCCGCTA

CCGCGCGCGCTCGATCGTGCCGTCCGGGTATGGCTGCGACCCCGAGGGCCCAACCCAGGAATGCCTGGACCTGCTCGGCC

GCCACGGCCAGCGCCCGCGCACGTGCACTTCTTCATCTCGGCACCGGGCACCGCCACCTGACCACGCAGATCAACTTT

GCTGGCGACAAGTACCTGTGGGACGACTTTGCCATATGCCACCCGCGACGGGCTGATCGGCGAACTGCGTTTTGTGCGAGGA

TGCGGCGGCGGCGCGACCCGCGGTGTGCAAGGCGAGCGCTTTGCCGAGCTGTCAATTCGACTTCCGCTTGCAGGGTGCCA

AGTCGCTGACCCGAGGCGCAAGCCATCGGCCGCGGGCGTTGCAGGAGGGCTGA

[配列番号 2 2] a r o Y 遺伝子

ATGACCGCACCGATTTCAGGATCTGCGCGACGCCATCGCGCTGCTGCAACAGCATGACAATCAGTATCTCGAAAACCGATCA

TCCGGTTGACCCTAACGCCGAGCTGGCCGGTGTATTCGCCATATCGGCGCGGGCGGCACCGTGAAGCGCCCCACCCGCA

TCGGGCCGCGATGATGTTTAAACAATATTAAGGGTTATCCACACTCGCGCATTCTGGTGGGTATGCACGCCAGCCGCCAG

CGGCGCGGCGATGATGTTTAAACAATATTAAGGGTTATCCACACTCGCGCATTCTGGTGGGTATGCACGCCAGCCGCCAG

CGGCGCGGCGATGATGTTTAAACAATATTAAGGGTTATCCACACTCGCGCATTCTGGTGGGTATGCACGCCAGCCGCCAG

CGGCGCGGCGATGATGTTTAAACAATATTAAGGGTTATCCACACTCGCGCATTCTGGTGGGTATGCACGCCAGCCGCCAG

CGGCGCGGCGATGATGTTTAAACAATATTAAGGGTTATCCACACTCGCGCATTCTGGTGGGTATGCACGCCAGCCGCCAG

10

20

30

40

50

CGGGCCGCGCTGCTGCTGGGCTGCGAAGCCTCGCAGCTGGCCCTTGAAGTGGGTAAGGCGGTGAAAAAACCGGTCGCGCC
 GGTGGTTCGTCGCCGGCCAGCAGCGCCCTTCCAGGAAACAGATCTTTCTGGCCGACGATCCGGATTTTTGATTTGCGCACCC
 TGCTTCCGGCGCCACCAACACCCCTATCGACGCCGGCCCTTCTTCTGCTGGGCTGGCGCTGGCCAGCGATCCCGTC
 GACGCCTCGCTGACCGACGTCACCATCCACCCTTGTGCGTCCAGGGCCGGGATGAGCTGTGATGTTTTCTTGCCGCCGG
 CCGCCATATCGAAGTGTTCGCCAAAAGGCCGAGGCCCGGCCAAACCGCTGCCGATAACCATCAATATGGGTCTCGATC
 CGGCCATCTATATTGGCGCCTGCTTCGAAGCCCTACCACGCCGTTTCGGCTATAATGAGCTGGGCGTCGCCGGCGCGCTG
 CGTCAACGTCCGGTGGAGCTGGTTCAGGGCGTCAGCGTCCCGGAGAAAAGCCATCGCCCGCGCCGAGATCGTTATCGAAGG
 TGAGCTGTTGCCTGGCGTGCAGGATCAGACACCAATAGCGGCCACGCGATGCCGAATTTCTGGCTACT
 GCGGGCGGCTAATCCGTGCTGCCGTAATCAAAGTCAAAGCAGTGACCATGCGAAAACATGCGATTCTGCAGACCCTG
 GTGGGACCGGGGAAGAGCATAACCCTCGCCGGCTGCCAACGGAAGCCAGTATCTGGAATGCCGTGAGGGCCGCAT 10
 TCCGGGCTTTTTACAAAATGTCTACGCCACACCGGGTGGCGTAAGTTCCTCGGGATCCTGCAGGTGAAAAAACGTC
 AACCCGCCGATGAAGGCCGCGAGGGCAGGCCGCGCTGCTGGCGTGGCGACCTATTCCGAGCTAAAAAATATTATTCTG
 GTTGATGAAGATGTGCACATCTTTGACAGCGACGATATCCTGTGGGCGATGACCACCCGCATGCAGGGGGACGTCAGCAT
 TACGACAATCCCCGGCATTTCGCGTACCAGCTGGATCCGTCCAGACGCCGAATACAGCCCGTCGATCCGTGGAATG
 GCATCAGCTGCAAGACATTTTTGACTGCACGGTCCCCTGGGCGTGAAATCGCACTTTGAGCGCGCGCGTTTGCCGAC
 GTCGATCCGCGTCCGTTTGCACCGGAGTATTTGCCCGGCTGGAAAAAACAGGGTAGCGCAAAATAA

10

[配列番号 2 3] k p d B 遺伝子

ATGAAACTGATTATTGGGATGACGGGGCCACCGGGCACCCTTGGGGTGGCATTGCTGCAGGCGCTGCGGATATGCC
 GGAGGTGAAAACCATCTGGTGTGTCGAAATGGGCCAAAACACCATCGAGCTGAAAACGCCCTGGACGGCGCGGAAG
 TGCCCGCGCTGGCGGACTTTTCCACAGCCCGCAGACCAGGCCGCCACCATCTCATCCGGTTCATTTCTGACCGACGGC 20
 ATGATCGTTATCCCTGCAGTATGAAAACGCTTGCAGGCATTCGCGCGGGTTATGCCGAAGGACTGGTGGGCCGCGCGC
 GGACGTGGTGTCAAAGAGGGGCGCAAGCTGGTGTGGTCCCGCGGAAATGCCGCTCAGCACGATCCATCTGGAGAACA
 TGCTGGCGCTGTCCCGCATGGGCGTGGCGATGGTCCCGCGATGTCAGCTTACTACAACCACCCGGAGACGGTTGACGAT
 ATCACCAATCATATCGTACCCGGGTGCTGGATCAGTTTGGCTCGACTATCACAAGCGCGCCGCTGGAACGGCTTGGC
 CACGGCAGAACAATTTGCACAGGAGATCGAATAA

20

[配列番号 2 4] l i g M 遺伝子

ATGTCGGCACCTACCAATCTTGAACAAGTGTTCGCCCGCGGCAACACCGTCGAAATGCTGCGCAACAGCCAGATCGG
 TGCCTATGTGTATCCGGTGGTGGCGCCGGAATTCCTCAACTGGCGCACCGAGCAGTGGGCATGGCGCAATTCGGCAGTGC
 TCTTCGACCAGACCACCATGGTGCACCTCTACATCCGTGGCAAGGACGCGCTGAAGCTGCTCTCCGACAGCATGATC
 AACTCGCCCAAGGGCTGGGAGCCCAACAAGGCGAAGCAGTACGTGCCCGTACGCCTTATGGCCATGTCATCGGGCAGCG 30
 CATCATCTTCTACCTCGCCGAGGAAGAGTTCGTGTATGTCGGCCGCGCGCCGGCCCAACTGGCTGATGTATCATGCGC
 AGACCGGCGGTTATAACGTGACATCGTGCATGACGACCGCTCGCCGAGCCCGCCGATGGGCAAGCCGGTGCAGCGCATC
 TCCTGGCGCTTCCAGATCCAGGGCCGAAGGCTGGGACGTGATCGAGAAGCTGCACGGCGGCACGCTCGAGAAGCTCAA
 ATTCTTCAACATGGCCGAGATGAACATCGCCGGTATGAAGATCCGCACCCTGCGTCACGGCATGGCCGGCGCGCCGGGTC
 TCGAGATCTGGGGTCCCTACGAAACCCAGGAGAAGGCCCGCAACGCGATCCTCGAGGCAGGCAAGGAATTCGGCCTCATC
 CCGTTCGGTTCGCGCGCCTATCCGTCCAACACGCTGGAATCCGGCTGGATCCCGAGCCCGCTGCCGGCCATCTACACCGG
 CGACAAGCTCAAGGCCTATCGCGAGTGGCTGCCGGCAACAGCTATGAGGCGAGCGGCCATCGGGCGTTCTGTTCTGTG
 CCAGCAACATCGAGGACTATTACGTCAATCCCTACGAGATCGGCTATGGTCCCTTCGTGAAGTTTCGACCACGACTTCATC
 GGCCGCGACGCTCTCGAGGCGATCGACCCGGCCACGCAGCGCAAGAAGGTCACGCTGGCCTGGAACGGCGACGACATGGC
 GAAGATCTACGCTTCGCTGTTTCGACACCGAGGCCGACGCGCACTACAAGTTCTTCGACCTGCCGCTGGCCAATTATGCCA 40
 ACACCAACGCCGACGCCGTGCTGACGCGGCCGCAACGTGGTTCGGCATGTCGATGTTACCGGCTATTCTACAACGAG
 AAGCGCGCGCTTTGCTCGCGACGATCGACCACGAGATCCCGTCCGACCCGAGCTGACGGTCTGTGGGGCGAGAAAA
 TGCGGTTACGCGCAAGACCACGGTTCGAGCCGCAAGCAGATGGCCGTGCGCGCGTCTGTGAGCCCGTCCCTATTCCG
 TGACCGCGCGGAGACGTACGAAGGCGGCTGGCGCAAGGCTGCCGTACGGCCTGA

30

40

[配列番号 2 5] v a n A 遺伝子

ATGTACCCCAAAAACACCTGGTACGTGCCTGCACCCCGATGAGATCGCCACCAAAACCCCTGGGCCGGCAGATCTGCGG
 GAAAAAATCGTGTCTACCGCGCCCGGAGAACCAAGTAGCCCGCTCGAGGACTTCTGCCCGCACCGCGGCCACCGT
 TGTCGTTGGGCTATGTCGAGGACGGCAACCTGGTGTGCGGCTACCACGGCTGGTGTGGGTTGCGACGGCAAGACCGTG
 TCGATGCCGGGCCAACGGGTGCGTGGCTTCCCTGCAACAAGACCTTTGCGGCCGTGAGCGCTATGGCTTCATCTGGGT
 CTGGCCCGTGACCAGGCGCAGGCCACCCGGCGCTGATTCGCATCTGGAATGGGCGGTGAGTGTGAGTGGGCCTACG 50

50

GCGGCGGGCTGTTCCACATCGGTTGCGACTACCGCCTGATGATCGACAACCTCATGGACCTACCCATGAAACCTATGTG
 CACGCCTCCAGCATCGGCCAGAAGGAGATCGACGAGGCACCGCCGGTACCACCGTCACCGGCGACGAAGTGGTCACCGC
 CCGGCACATGGAAAACATCATGGCGCCACCGTTCTGGCGCATGGCCTTTCGTGGCAATGGCCTGGCCGACGATGTACCAG
 TGGACCGCTGGCAGATCTGCCGTTTACCCCCACCTAGCCATGTGCTGATCGAAGTGGGTGTAGCGCATGCCGGCAAGGGC
 GGCTACCACGCCGAGGCACAGCATAAGGCGTCGAGCATCGTGGTGCAGTTCATCACCCCTGAGAGCGATACTCTATCTG
 GTACTTCTGGGGCATGGCGCGCAACTTCGCTGCGCACGACCAGACCCTGACCGACAACATTCGTGAGGGCCAGGGCAAGA
 TTTTCAGCGAAGACCTGGAAATGCTCGAACGCCAGCAGCAGAACCTGCTGGCCCACCCCGAGCGCAACTTGTGAAGCTG
 AATATCGACGCCGGCGGCGTGCAGTCACGCAAAAGTGTGGAGCGGATCATCGCCCAAGAGCGTGCGCCGAGCCGCAACT
 GATCGCCACCAGCGCAACCCCTGCCTGA

[配列番号 26] v a n B 遺伝子

ATGATCGATGCCGTAGTGGTATCCCCTAACGATGAAGCGCAGGGTATCTGCAGCTTCGAGCTGGCCGCGGCAGATGGCAG
 CCTGCTGCCGGCGTTCAGCGCCGGCGCCCATATCGACGTGCACCTGCCCGACGGGCTGGTGCGCCAGTATTCGCTGTGCA
 ACCACCCCGAAGAACGCCATCGCTATCTGATTGGCGTACTCAACGACCCGGCTTCGCGGGGGCGTTTCTCGTAGCCTGCAC
 GAACAGGTGCAAGCCGGTGCCGGCTGCGTATCAGTGCGCCCGCAACCTGTTCCCGCTGGCCGAGGGTGCAGCAGCGCAG
 TTTGCTGTTTGTGGCGGTATCGGCATTACCCCAATCCTGTGCATGGCCGAGCAGCTGTCCGACAGCGGCCAGGCCTTCG
 AGCTGCACTACTGTGCCGCTCCAGCGAGCGTGCAGCGTTCGAGCGGATCCGCGAGCGCCGTTTCGCTGATCGGCTG
 TTCGTGCATTTTACGAGCAGCCGAAACGGCGCTGGACATCGCCAGGTGCTGGGCAACCCGCAAGATGATGTGCACCT
 GTATGTATGCGGGCCCGCGGGTTCATGCAGCATGTGCTGGACAGCGCAAGGGGCTGGGCTGGCAGGAGGCCAACCTGC
 ACCGCGAGTACTTCGCCGACGACCCGGTGGATGCCAGCAACGATGGCAGTTTCGCGGTGCAGGTGGGCAGCAGCGGGACAG
 GTGTTTCGAGGTGCCAGCCGACCGGACCGTGGTGCAGGTGCTGGAAGAGAATGGTATCGAGATCGCCATGTGCTGCAGCA
 GGGTATTTGCGGCACCTGCCTGACACGCGTGTGTCAGGGCACACCCGACCATCGCGATCTGTTTCTCACCGAAGAGGAAC
 AGGCCCTGAACGATCAGTTCACGCCCTGCTGCTCGCGCTCGAAGACGCCGCTGCTGGTGTGCTGGACATCTGA

[配列番号 27] L i g A

MTEKKERIDVHAYLAEFDDIPGTRVFTAQRARKGYNLNQFAMSLMKAENRERFKADESAYLDEWNLTPAAKAAVLARDYN
 AMIDEGGNVYFLSKLFDSTGKSFQFAAGSMTGMTQEEYAQMMIDGGRSPAGVRSIKGG

[配列番号 28] L i g B

MARVTTGITSSHIPALGAAIQGTSDNDYWGPVFKGYQPIRDWIKQPGNMPDVVILVYNDHASAFDMNIPPTFAIGCAET
 FKPADEGWGPRPVPDVKGHPDLAWHI AQSLILDEFDMTIMNQMDVDHGC TVPLSMIFGEPEEWPKVIFPFVNVVYTPPP
 SGKRCFALGDSIRAAVESFPEDLNHVHWGTGGMSHQLQGPRAGLINKEFDLNFIDKILSDPEELSKMPHIQYLRESGSEG
 VELVMWILMRGALPEKVRDLYTFYHIPASNTALGAMILQPEETAGTPLEPRKVMSGHSLAQA

[配列番号 29] C a t A

MTVKISHTADIQAFFNRVAGLDHAEGNPRFKQILLRVLQDTARLIEDLEITEDEFWHAVDYLNRLGGRNEAGLLAAGLGI
 EHFLDLLQDAKDAEAGLGGTTPRTIEGPLYVAGAPLAQGEARMDDGTDPGVVMFLQGQVFDADGKPLAGATVDLWHANTQ
 GTYSYFDSTQSEFNLRRIITDAEGRYRARSIVPSGYGCDPQGPTQECLDLLGRHGQRPAHVHFFISAPGHRHLTTQINF
 AGDKYLWDDFAYATRDGLIGELRFVEDAAAARDRVQGERFAELSFDFRLQGAKSPDAEARSHRPRALQEG

[配列番号 30] A r o Y

MTAPIQLRDAIALLQQHDNQYLETDHPVDPNAELAGVYRHI GAGGTVKRPTRIGPAMMFNNIKGYPHSRILVGMHASRQ
 RAALLLGCEASQLALEVGKAVKPKVAPVVVPASSAPCQEQIFLADDPDFDLRLLPAPTNTPIDAGPFFCLGLALASDPV
 DASLTDVTIHRLCVQGRDELSMFLAAGRHI EVFRQKAEAAAGKPLPITINMGLDPAIYIGACFEAPTTTFFGYNELGVAGAL
 RQRPVVELVQGVSVPEKAIARAEIVIEGELLPGVRVREDQHTNSGHAMPEFFPGYCGGANPSLPVIVKVAVTMRNNAI LQTL
 VGPGEHHTTLAGLPTEASIWNAVEAAIPGFLQNVYAHTAGGGKFLGILQVKKRQPADEGRQGQAALLALATYSELKNIIL
 VDEDVDIFDSDDILWAMTTRMQGDVSI TTIPIGRGHQLDPSQTPEYSPSIRNGISCKTIFDCTVPWALKSHFERAPFAD
 VDPRPFAPEYFARLEKNQGSAK

[配列番号 31] K p d B

MKLIIGMTGATGAPLGVALLQALRDMPEVETHLVMSKWAKTTIELETPWTAREVAALADFSHSPADQAATISSGSFRTDG
 MIVIPCSMKTLAGIRAGYAEGLVGRAADVVLKEGRKLVLPREMP LSTIHLENMLALSRMGVAMVPPMPAYYNHPETVDD
 ITNHI VTRVLDQFGLDYHKARRWNGLRRTAEQFAQIE

[配列番号 32] L i g M

MSAPTNEQLVLAAGNTVEMLRNSQIGAYVYPVVAPEFSNWRTEQWAWRNSAVLFDQTHHMVDLYIRGKDALKLLSDTMI
 NSPKGWEPNKAKQYVPVTPYGHVIGDGIIFYLAEEEFVYVGRAPAAANWLMYHAQTGGYNVDIVHDDRSPSRPMGKPVQR I

10

20

30

40

50

SWRFQIQGPKAWDVIEKLGHTLEKLFNMAEMN IAGMK IRTL RHGMAGAPGLE I WGPYETQEKARNA I LEAGKEFGL I
PVGSRAYPSNTLESGW I PSPLPA I YTGDKLKAYREWLPANSYEASGA I GGSFVSSN I EDYVNPYE I GYGFVKFDHDF I
GRDALEA I DPATQRKKVTLAWNGDDMAK I YASLFDTEADAHYKFFDLPLANYANTNADAVLDAAGNVVGM SMFTGYSYNE
KRALSLAT I DHE I PVGTELT VLVWGEENGGTRKTTVEPHKQMAVRAV VSPVPYSVTARETYEGGW RKA AVTA

[配列番号 3 3] V a n A

MYPKNTWYVACTPDE I ATKPLGRQ I CGEK I VFYRARENQVAAVEDFCPHRGAPLSLGYVEDGNLVCGYHGLVMGCDGKT V
SMPGQVRVRFPCNKTFAAVERYGF I WWWPGDQAQADPAL I PHLEWAVSDEWAYGGGLFH I GCDYRLM I DNLMDLTHE TYV
HASS I GQKE I DEAPPVTTVTGDEVVTARHMEN I MAPPFWRMALRGNGLADDVPVDRWQ I CRFTPPSHVL I EVGVAHAGKG
GYHAEAQHKASS I VVDF I TPESDTS I WYFWGMARNFAAHDQTLTDN I REGQGK I FSEDL EMLERQQQNLLAHPERNLLKL
N I DAGGVQSRKVLER I I AQERAPQPQL I ATSANPA

10

[配列番号 3 4] V a n B

M I DAVVVS RNDEA QG I CSFELAAADG SLLPAFSAGAH I DVHLPDGLVRQYSLCNHPEERHRYL I GVLNDPASRGGSRSLH
EQVQAGARLR I SAPRNLFPLAEGAQRSLLFAGG I G I TP I LCMAEQLSDSGQAFELHYCARSSERAAAFVER I RSAPFADRL
FVHFDEQPETALD I AQVLGNPQDDVHLYVCGPGFMQHVLDSAKGLGWQEANLHREYFAAAPVDASNDGSAVQVVGSTGQ
VFEVPADRTVVQVLEENG I E I AMSCEQG I CGTCLTRVLQGTDPHRDLFLTEEEQALNDQFTPCCSRKTPLLVD I

[配列番号 3 5] p c a H 遺伝子

ATGCCCGCCAGGACAACAGCCGCTTCGTGATCCGTGATCGCAACTGGCACCCCTAAAGCCCTTACGCCTGACTACAAGAC
CTCCGTTGCCCGCTCGCCGCGCCAGGCACTGGTCAGCATTCCGCGAGTCGATCAGCGAAACCACTGGTCCGGACTTTTCCC
ATCTGGGCTTCGCGGCCACGACCATGACCTGCTGCTGAACTTCAATAACGGTGGCCTGCCATTGGCGAGCGCATCATC
GTCGCCGGCCGTGTCGTCGACCAGTACGGCAAGCCTGTGCCGAACACTTTGGTGGAGATGTGGCAAGCCAACGCCGGCGG
CCGCTATCGCCACAAGAACGATCGCTACCTGGCGCCCTGGACCCGAACCTTCGGTGGTGTGGGCGGTGTCTGACCGACC
GTGACGGCTATTACAGCTTCCGCACCATCAAGCCGGGCCGTACCCATGGCGCAACGGCCCGAACGACTGGCGCCCGGGC
CATATCCACTTCGCCATCAGCGGCCCATCGATCGCCACCAAGCTGATCACCCAGTTGTACTTTCGAAGGTGACCCGCTGAT
CCCGATGTGCCGATCGTCAAGTCGATCGCCAACCCGCAAGCCGTGCAGCAGTTGATCGCCAAGCTCGACATGAGCAACG
CCAACCCGATGGACTGCCTGGCCTACCGCTTTGACATCGTGCTGCGCGGCCAGCGCAAGACCCACTTCGAAAACCTGCTGA

20

[配列番号 3 6] p c a G 遺伝子

ATGCCAATCGAACTGCTGCCGAAAACCCCTTCGCAGACTGCCGGCCCCTACGTGCACATCGGCCTGGCCCTGGAAGCCGC
CGGCAACCCGACCCGCGACCAGGAAATCTGGAACCTGCCTGGCCAAGCCAGACGCCCCCGGGCGAGCACATTCTGCTGATCG
GCCACGTATATGACGAAAACGGCCACCTGGTGC GCGACTCGTTCC TGAAAGTGTGGCAGGCCGACGCCAACGGTGAGTAC
CAGGATGCCTACAACCTGGAAAACGCCCTTCAACAGCTTTGGCCGACGGCTACCACCTTCGATGCCGGTGAGTGACGCT
GCAAACGGTCAAGCCGGGTGTGGTGAACAACGCTGCTGGCGTGCCGATGGCGCCGCACATCAACATCAGCCTGTTTGCCC
GTGGCATCAACATCCACCTGCACACGCGCCTGTATTTGATGATGAGGCCAGGCCAATGCCAAGTGCCCGGTGCTCAAC
CTGATCGAGCAGCCGACGCGCGTGAACCTTGATTGCCAAGCGTTGCGAAGTGATGGGAAGACGGCGTACCGCTTTGA
TATCCGCATTCAGGGGAAAGGGGAGACCGTCTTCTCGACTTCTGA

30

[配列番号 3 7] p r a A 遺伝子

ATGTCACTGGAATGGCTTTGTTAGCCGCGCATGTCCCAAGCATTTGTCATGAATCTAATGTGCCTGATTTCCAACAGGA
TTTGGTCAAGGGGCTGAAGCAGATGCGGGACCGCATCAACGAGCTT CAGACAGATGTGATTTTGTGATGTCTCTGCCACT
TTCCGGCAACCTTTCATCACTATGTGGATGCAACACCGCGGCATACCGGCATATTAACGGCGATGGAGTGTCCGGATCTG
ATCTCGGACGTACCGTATGACTATCCTGGGGATGAGGAGCTGGCGGTAAGCTGGTAACCGCGGGCCAAGAGGCAGGCCCT
TCCCATCGTGGAGATCAATGATCCGACTTACATTTGGGATTACGGTACCGTCGTTCCGCTGCGGTACTTGGTTCCGAACC
AAGACAAATCGGTCATCAGCTTGTGCGTATGCTGGGCTTCCAGCCTGGAGGAATCGTACCAGTGGGGCGTTCAAATCGGC
AAGGTGCTGAGGGAAAGCGAGAAGCGGGCGGTGTTTCATCAGCAGCGGCGCTTTATCTCACAACCTTGGTCCGGGGACGTCA
CCATATGCCGAGCCGCTCCGAGCAAGCCATGGATAACCAATTCATCGAATATTTACTGAACGGAGATTATAACGCTGCC
GTGAAATGCTAAACCAATATGCGCGTATTGCGGGTGTGGAATCCGGAGGACGCCATCTGGCCGCTTGTGGGTGTGCTG
GATGATAAGCAGCGCGCCGAGTTTTGGGGATACGGCCAATCTTCCGGCAGCGGCAACGCCATTATCTCGTTTGTATCATG
A

40

[配列番号 3 8] d e s A 遺伝子

ATGGCGAAAAGTCTTCAAGATGTGCTGGACAATGCCGAAAATGCAGTCGATTTCTGCGCAACCAGCAGACCGGCCCGAA
CGTCTATCCCGCGTCCCGCGGAATATTCCAACCTGGCGCAACGAGCAGCGCGCATGGGCCAAGACCGCCGTGCTCTTCA
ACCAGAGCTACCACATGGTCGAGCTGATGGTCGAAGGCCCGACGCCCTTCGCCTTCTCAACTATCTCGGCATCAACAGC

50

TTCAAGAACTTCGCGCCCGGCAAGGCCAAGCAGTGGGTTCCGGTGACGGCCGAGGGCTATGTCATCGGCGACGTGATCCT
 GTTCTATCTCGCCGAGAACCAGTTCAACCTCGTCGGCCGCGCGCCGGCCATCGAGTGGGCCGAGTTCCATGCCGCCACCG
 GCAAGTGGAACGTGACGCTCACCCGTGACGAGCGCACCCGCGCTGCGCACCGACGGCGTGCGTCGCCACTATCGCTTCCAG
 CTGCAGGGCCCCAACGCCATGGCGATCCTAACGGACGCGATGGGCCAGACCCCCGCCGGACCTCAAATTTCTTCAACATGGC
 GGACATCCAGATCGCCGGGAAGACCGTCGGCGCGCTGCGTCACGGCATGGCCGGTCAGCCGGGCTATGAGCTCTATGGTC
 CCTGGGCGGATTATGAGGCGGTTTCAATTCGGCGCTGGTTCGGCGCCGGCAAGAACCATGGGCTGGCGCTCGTCGGCGGCCGT
 GCCTATTCGTCCAACACGCTGGAATCCGGCTGGGTGCCCTCGCCGTTCCCGGGCTATCTCTTCGGCGAAGGCTCGGCCGA
 CTTCCGCAAGTGGGCCGGCGAGAACAGCTATGGCGCCAAGTGCTCCATCGGCGGTTTCTATGTGCCCGAGAGCCTGGAAG
 GCTATGGCCTGACGCCCTGGGACATCGGCTATGGCATCATCGTCAAGTTCGACCATGACTTCATCGGCAAGGAAGCGCTG
 GAGAAGATGGCGAACGAGCCGCACCTCGAGAAGGTGACGCTGGCGCTGGACGACGAGGACATGCTGCGCGTGATGAGCAG
 CTATTTCTCGGACTCCGGTCTGTGCGAAATATTTTCGAGTTCCCGAGCGCGGTCTACTCGATGCACCCCTATGACTCGGTGC
 TGGTCGACGGCAAGCATGTTCGGCGTCTCGACCTGGGTTCGGCTACTCGTCGAACGAGGGCAAGATGCTCACGCTCGCGATG
 ATCGATCCCAAATATGCCAAGCCCCGGCACGGAAGTCTCGCTGCTCTGGGGCGAGCCCAATGGCGGCACCTCCAAGCCGAC
 CGTCGAGCCGCACGAGCAGACGGAGATCAAGGCGGTCTGTCGGCGCCGGTGCCGTACTIONCGGCCGTGGCGCGCACGGGCTATG
 CCGACAGCTGGCGCACCAAGAAGGCCTGA

10

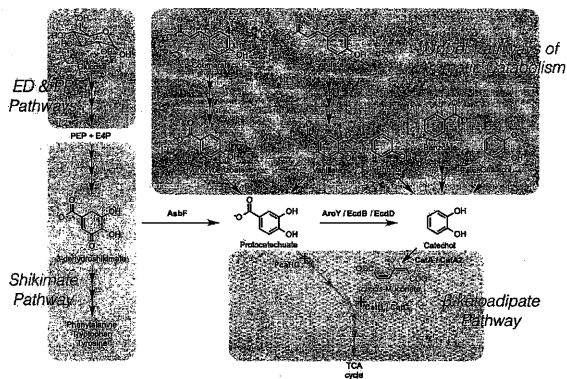
【産業上の利用可能性】

【0170】

本発明の一態様の形質転換微生物や製造方法によって、シリングリグニン由来の芳香族化合物や広葉樹由来のシリングリグニンを含むバイオマスなどから、ムコン酸やプロトカテク酸が得られる。ムコン酸やプロトカテク酸は、種々の産業上有用な化合物に変換することができ、例えば、界面活性剤、難燃剤、UV光安定化剤、熱硬化性プラスチック、コーティング剤、医薬品、農薬、香料などの原料として利用することができる。

20

【図1】



【配列表】

2018199112000001.app

【手続補正書】

【提出日】令和1年5月22日(2019.5.22)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

宿主微生物が染色体上にプロトカテク酸分解酵素遺伝子を有し、かつ、シリリングリグニン由来の芳香族化合物を資化するスフィンゴモナド(Sphingomonad)科微生物であり、

染色体上にある該プロトカテク酸分解酵素遺伝子が欠失しており、

挿入されたcatA遺伝子を発現し、かつ、

挿入されたaroY遺伝子又はaroY遺伝子及びkpdB遺伝子を発現する、形質転換微生物。

【請求項2】

挿入された前記aroY遺伝子、前記kpdB遺伝子及び前記catA遺伝子は、同一プロモーターの制御下にある、請求項1に記載の形質転換微生物。

【請求項3】

前記形質転換微生物は、挿入されたvanA遺伝子及びvanB遺伝子をさらに発現する、請求項1に記載の形質転換微生物。

【請求項4】

挿入された前記aroY遺伝子、前記kpdB遺伝子、前記catA遺伝子、前記vanA遺伝子及び前記vanB遺伝子は、同一プロモーターの制御下にある、請求項3に記載の形質転換微生物。

【請求項5】

前記プロトカテク酸分解酵素遺伝子が、ligA遺伝子、ligB遺伝子、pcaG遺伝子、pcaH遺伝子及びpraA遺伝子からなる群から選ばれる遺伝子である、請求項1に記載の形質転換微生物。

【請求項6】

前記宿主微生物が、スフィンゴビウム・スピーシーズ(Sphingobium species) SYK-6株である、請求項1に記載の形質転換微生物。

【請求項7】

p-ヒドロキシフェニルリグニン由来の芳香族化合物及び/又はグアイアシルリグニン由来の芳香族化合物と、シリリングリグニン由来の芳香族化合物とを、請求項1~6のいずれか1項に記載の形質転換微生物に作用させることにより、ムコン酸を得る工程を含む、ムコン酸の製造方法。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/016675

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER	
Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12P7/44(2006.01)i	
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) Intel. C12N15/09, C12N1/21, C12P7/44	
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	1971-2018
Registered utility model specifications of Japan	1996-2018
Published registered utility model applications of Japan	1994-2018
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAPus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages
Y	菊地晟弘, 他, リグニン由来フェノール類を原料としたムコン酸生産, 日本農芸化学会大会講演要旨集, 2016, announcement no. 2A028, entire text, non-official translation (KIKUCHI, Akihiro et al., "Production of muconic acid using lignin-derived phenols as raw materials", Lecture abstracts of the conference of Japan Society of Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry)
	1-9
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.	
* Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 23 July 2018 (23.07.2018)	Date of mailing of the international search report 31 July 2018 (31.07.2018)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/016675

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JOHNSON, C. W., et al., "Enhancing muconic acid production from glucose and lignin-derived aromatic compounds via increased protocatechuate decarboxylase activity", <i>Metabolic Engineering Communications</i> , 2016, vol. 3, pp. 111-119, abstract, page 113, left column, last paragraph, page 114, right column, paragraph [0002] to page 115, right column, paragraph [0001], fig. 1, 2, 3, table 1	1-9
Y	ABE, T., et al., <i>Journal of Bacteriology</i> , 2005, vol. 187, pp. 2030-2037, abstract, etc.	1-9
X	JP 2010-207094 A (GENARIS INC.) 24 September 2010, claims (Family: none)	8-9
Y		8-9
A	KAMINURA, N., et al., "A bacterial aromatic aldehyde dehydrogenase critical for the efficient catabolism of syringaldehyde", <i>SCIENTIFIC REPORTS</i> , 15 March 2017, vol. 7, 44422	1-9
P, X	SONOKI, T., et al., "Glucose-Free cis, cis-Muconic Acid Production via New Metabolic Design Corresponding to the Heterogeneity of lignin", <i>ACS Sustainable Chem. Eng.</i> , 04 December 2017, vol. 6, pp. 1256-1264	1-9
P, X	園木和典, 他, リグニンを炭素源としたムコン酸のバイオ生産, バイオサイエンスとインダストリー, 2018, vol. 76, pp. 139-141, (SONOKI, Tomonori et al., "Muconic acid production from lignin without glucose", <i>Bioscience & industry</i>)	1-9

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2018/016675									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12P7/44(2006.01)i											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/09, C12N1/21, C12P7/44											
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>1971-2018年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2018年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2018年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2018年	日本国実用新案登録公報	1996-2018年	日本国登録実用新案公報	1994-2018年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2018年										
日本国実用新案登録公報	1996-2018年										
日本国登録実用新案公報	1994-2018年										
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号									
Y	菊地晟弘, 他, リグニン由来フェノール類を原料としたムコン酸生産, 日本農芸化学会大会講演要旨集, 2016, 発表番号 2A028, 全文	1-9									
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。		<input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。									
* 引用文献のカテゴリ 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献											
国際調査を完了した日 23.07.2018		国際調査報告の発送日 31.07.2018									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 飯室 里美 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	4N 2936								

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2018/016675
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JOHNSON, C. W., et al., Enhancing muconic acid production from glucose and lignin-derived aromatic compounds via increased protocatechuate decarboxylase activity, <i>Metabolic Engineering Communications</i> , 2016, Vol. 3, p.111-119, 要約、113 ページ左欄最終段落、114 ページ右欄第 2 段落—115 ページ右欄第 1 段落、図 1、2、3、表 1	1-9
Y	ABE, T., et al., <i>Journal of Bacteriology</i> , 2005, Vol.187, p. 2030-2037, 要約等	1-9
X	JP 2010-207094 A (株式会社ジナリス) 2010.09.24,	8-9
Y	特許請求の範囲 (ファミリーなし)	8-9
A	KAMINURA, N., et al., A bacterial aromatic aldehyde dehydrogenase critical for the efficient catabolism of syringaldehyde, <i>SCIENTIFIC REPORTS</i> , 15 March 2017, Vol.7, 44422	1-9
P, X	SONOKI, T., et al., Glucose-Free cis, cis-Muconic Acid Production via New Metabolic Design Corresponding to the Heterogeneity of lignin, <i>ACS Sustainable Chem. Eng.</i> , December 4, 2017, Vol.6, p.1256-1264	1-9
P, X	園木和典, 他, リグニンを炭素源としたムコン酸のバイオ生産, <i>バイオサイエンスとインダストリー</i> , 2018, Vol.76, p.139-141	1-9

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 8 / 0 1 6 6 7 5

第1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：

フロントページの続き

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(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), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(出願人による申告)平成27年度、国立研究開発法人科学技術振興機構、戦略的創造研究推進事業ALCA「糖質に依存しないムコン酸のバイオ生産」委託研究、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願

(72)発明者 高橋 健司

新潟県長岡市上富岡町1603-1 国立大学法人長岡技術科学大学内

(72)発明者 園木 和典

青森県弘前市文京町1番地 国立大学法人弘前大学内

Fターム(参考) 4B064 AD15 CA02 CA19 CC24 DA01 DA20

4B065 AA01X AA29Y AB01 AC14 BA02 CA27 CA44 CA60

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。