

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2017年12月7日(07.12.2017)



(10) 国際公開番号

WO 2017/209102 A1

- (51) 国際特許分類:  
*C12P 7/44* (2006.01) *C12N 1/21* (2006.01)  
*C12N 1/20* (2006.01) 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).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2017/020018
- (22) 国際出願日: 2017年5月30日(30.05.2017)
- (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 2016-108639 2016年5月31日(31.05.2016) JP
- (71) 出願人: 東レ株式会社 (TORAY INDUSTRIES, INC.) [JP/JP]; 〒1038666 東京都中央区日本橋室町2丁目1番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 磯部 匡平 (ISOBE, Kyohei); 〒2488555 神奈川県鎌倉市手広6丁目10番1号 東レ株式会社 基礎研究センター内 Kanagawa (JP). 河村 健司 (KAWAMURA, Kenji); 〒2488555 神奈川県鎌倉市手広6丁目10番1号 東レ株式会社 基礎研究センター内 Kanagawa (JP). 伊藤 正照 (ITO, Masateru); 〒2488555 神奈川県鎌倉市手広6丁目10番1号 東レ株式会社 基礎研究センター内 Kanagawa (JP). 山田 勝成 (YAMADA, Katsushige); 〒2488555 神奈川県鎌倉市手広6丁目10番1号 東レ株式会社 基礎研究センター内 Kanagawa (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, 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, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS,

添付公開書類:

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



WO 2017/209102 A1

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING 3-HYDROXYADIPIC ACID

(54) 発明の名称: 3-ヒドロキシアジピンの製造方法

(57) Abstract: This method for producing 3-hydroxyadipic acid includes a step in which microorganisms of the genus *Serratia* which have the ability to produce 3-hydroxyadipic acid are cultured.

(57) 要約: 3-ヒドロキシアジピンの生産能を有する *Serratia* 属微生物を培養する工程を含む、3-ヒドロキシアジピンの製造方法。

## 明 細 書

発明の名称： 3-ヒドロキシアジピン酸の製造方法

### 技術分野

[0001] 本発明は、*Serratia*属微生物を利用した3-ヒドロキシアジピン酸の製造方法に関する。

### 背景技術

[0002] 3-ヒドロキシアジピン酸（IUPAC名：3-hydroxyhexanedioic acid）は、炭素数6、分子量162.14のジカルボン酸である。3-ヒドロキシアジピン酸は多価アルコールと重合することでポリエステルとして、また多価アミンと重合することでポリアミドの原料として用いることができる。また、3-ヒドロキシアジピン酸の末端にアンモニアを付加してラクタム化することで、単独でもポリアミドの原料になり得る。

[0003] 微生物を利用した3-ヒドロキシアジピン酸の製造方法に関連する報告としては、スクシニルCoAとアセチルCoAを出発原料とした天然には存在しない微生物によるアジピン酸を製造する方法の過程で、アジピン酸生合成経路の中間体として3-オキソアジピン酸（3-オキソアジペート）が酵素反応によって還元され（3-オキソアジピン酸レダクターゼ）、3-ヒドロキシアジピン酸が生成しうるとの報告がある（特許文献1、図3）。また、*n*-デカンが*Pseudomonas X2*により代謝され、極微量の3-ヒドロキシアジピン酸（ $\beta$ -ヒドロキシアジピン酸）が生成されることが報告されている（非特許文献1）。

[0004] また、特許文献2には、生体触媒や微生物を用いたアジピン酸、アジピン酸エステル又はアジピン酸チオエステルの製造方法が記載されており、中間化合物として3-ヒドロキシアジピン酸エステルまたは3-ヒドロキシアジピン酸チオエステルが記載されている。3-ヒドロキシアジピン酸エステルまたは3-ヒドロキシアジピン酸チオエステルは、3-オキソアジピン酸エ

ステルまたは3-オキソアジピン酸チオエステル中の3-オキソ基の選択的水素化によって調製されると記載されている。

## 先行技術文献

### 特許文献

[0005] 特許文献1：国際公開第2009/151728号

特許文献2：国際公開第2009/113853号

### 非特許文献

[0006] 非特許文献1：Biochem. J., 1967, 104, 987-990

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0007] 特許文献1には、アジピン酸を製造できるように人為的に改良した微生物において、製造対象であるアジピン酸の中間体として3-オキソアジピン酸（3-オキソアジペート）が酵素反応によって還元され、3-ヒドロキシアジピン酸（3-ヒドロキシアジペート）が生成しうることについての記載はあるが、一方で、代謝を3-ヒドロキシアジピン酸で止め、培養液中に分泌させるという記載はない。また、3-オキソアジピン酸から3-ヒドロキシアジピン酸への3-オキソアジピン酸レダクターゼによる還元反応の直接的証拠は確認されておらず、実際に微生物の代謝経路を利用して3-ヒドロキシアジピン酸が製造できるかどうかの検証はなされていない。さらに、当業者にとって3-オキソアジピン酸レダクターゼなる酵素は周知のものではないため、特許文献1の記載に従ってスクシニルCoAとアセチルCoAを出発原料として3-ヒドロキシアジピン酸を製造することはできなかった。

[0008] また、非特許文献1にはPseudomonas X2によって3-ヒドロキシアジピン酸が生成することの報告はあるものの、その生産性はNMRによってわずかに検出できる程度のものであり、3-ヒドロキシアジピン酸の製造方法であるとは言えるものではない。

[0009] 特許文献2では3-ヒドロキシアジピン酸エステルまたは3-ヒドロキシ

アジピン酸チオエステルから3-ヒドロキシアジピン酸を得る方法は記載されておらず、3-ヒドロキシアジピン酸チオエステルの具体例としての3-ヒドロキシアジピル-CoAから3-ヒドロキシアジピン酸を得る方法も記載されていない。

[0010] このように、実際のところ微生物の代謝経路を利用して3-ヒドロキシアジピン酸を製造する方法は存在していなかった。そこで本発明では、*Serratia*属微生物の代謝経路を利用して3-ヒドロキシアジピン酸を製造する方法を提供することを課題とする。

### 課題を解決するための手段

[0011] 本発明者は、上記課題を解決するため鋭意研究を行った結果、代謝経路を利用して3-ヒドロキシアジピン酸を製造することができる*Serratia*属微生物が自然界に存在することを見出し、以下の本発明に到達した。

[0012] すなわち本発明は、次の(1)～(7)から構成される。

(1) 3-ヒドロキシアジピン酸の生産能を有する*Serratia*属微生物を培養する工程を含む、3-ヒドロキシアジピン酸の製造方法。

(2) 前記*Serratia*属微生物のスクシニルCoAおよびアセチルCoAから3-オキソアジピルCoAおよびCoAを生じる反応を触媒する酵素の活性が強化されていることを特徴とする(1)に記載の3-ヒドロキシアジピン酸の製造方法。

(3) 前記*Serratia*属微生物が、*Serratia grimesii*、*Serratia ficaria*、*Serratia fonticola*、*Serratia odorifera*、*Serratia plymuthica*、*Serratia entomophila*または*Serratia nematodiphila*である、(1)または(2)に記載の3-ヒドロキシアジピン酸の製造方法。

(4) 前記*Serratia*属微生物を培養する培地が、糖類、コハク酸、2-オキソグルタル酸およびグリセロールからなる群から選択される少なくとも1種または2種以上の炭素源を含む、(1)～(3)のいずれかに記載

の3-ヒドロキシアジピン酸の製造方法。

(5) 前記 *Serratia* 属微生物を、フェルラ酸、p-クマル酸、安息香酸、cis, cis-ムコン酸、プロトカテク酸およびカテコールからなる群から選択される少なくとも1種類または2種類以上の誘導物質を含む培地で培養する、(1)～(4)のいずれかに記載の3-ヒドロキシアジピン酸の製造方法。

(6) 3-ヒドロキシアジピン酸の生産能を有する *Serratia* 属微生物であって、スクシニルCoAおよびアセチルCoAから3-オキソアジピルCoAおよびCoAを生じる反応を触媒する酵素の活性が強化されていることを特徴とする、*Serratia* 属微生物。

(7) 前記 *Serratia* 属微生物が、*Serratia grimesii*、*Serratia ficaria*、*Serratia fonticola*、*Serratia odorifera*、*Serratia plymuthica*、*Serratia entomophila* または *Serratia nematodiphila* である、(6)に記載の *Serratia* 属微生物。

### 発明の効果

[0013] 本発明により、*Serratia* 属微生物の代謝経路を利用して3-ヒドロキシアジピン酸を得ることができる。

### 発明を実施するための形態

[0014] 本発明の3-ヒドロキシアジピン酸の製造方法は、3-ヒドロキシアジピン酸の生産能を有する *Serratia* 属微生物を培養する工程を含むことを特徴とする。より詳しくは、3-ヒドロキシアジピン酸の生産能を有する *Serratia* 属微生物を培養することによって、該微生物の代謝経路を利用して3-ヒドロキシアジピン酸を製造することを特徴とする。

[0015] 3-ヒドロキシアジピン酸の生産能を有する *Serratia* 属微生物の具体例としては、*Serratia grimesii*、*Serratia ficaria*、*Serratia fonticola*、*Serrat*

*ia odorifera*、*Serratia plymuthica*、*Serratia entomophila*あるいは*Serratia nematodiphila*が挙げられる。*Serratia*属微生物が代謝経路を利用して3-ヒドロキシアジピン酸を製造しうるメカニズムについては明らかではないが、*Serratia*属微生物は排出する余剰汚泥を低減させた排水処理方法に利用されていることもあり（特開2002-18469号公報参照）、物質生産に一般的に利用される微生物とは異なった複雑な代謝経路を有し、該代謝経路に基づき3-ヒドロキシアジピン酸を生成することが推定される。

[0016] 上記の*Serratia*属微生物は、いずれも自然界に存在する*Serratia*属微生物として公知のものであり、土壌等の自然環境から単離することができる。また、NBRC等の微生物分与機関から購入することもできる。

[0017] *Serratia*属微生物は、3-ヒドロキシアジピン酸の生産性が増大するように公知の手法にしたがって遺伝子を組換えたものであってもよく、また、人為的変異手段により変異させたものであってもよい。

[0018] 本発明では、*Serratia*属微生物培養した際、48時間以内に培養液上清中に1.0mg/L以上の3-ヒドロキシアジピン酸を生産できる*Serratia*属微生物を、3-ヒドロキシアジピン酸の生産能を有する*Serratia*属微生物として使用することが好ましい。より好ましくは、遺伝子変異処理や、遺伝子組換えが施されていない野生型の状態で、培養液上清中に1.0mg/L以上の3-ヒドロキシアジピン酸の生産能を有する*Serratia*属微生物である。

[0019] *Serratia*属微生物が、48時間以内に培養液上清中に1.0mg/L以上の3-ヒドロキシアジピン酸を生産できるかどうかについては、以下の方法により判断する。

[0020] 対象となる*Serratia*属微生物をpH7に調整した前培養培地（培地組成：トリプトン10g/L、酵母エキス5g/L、塩化ナトリウム5g

／L) 5 mLに対象となる*Serratia*属微生物を一白金耳植菌し、十分懸濁するまで30℃で振とう培養する。得られた前培養液に10 mLの0.9%塩化ナトリウムを加え、菌体を遠心分離して上清を取り除く操作を3回行い、菌体を洗浄する。洗浄した菌体を1 mLの0.9%塩化ナトリウムに懸濁し、懸濁液0.5 mLをpH 6.5に調整した本培養液(培地組成: コハク酸 10 g/L、グルコース 10 g/L、硫酸アンモニウム 1 g/L、リン酸カリウム 50 mM、硫酸マグネシウム 0.025 g/L、硫酸鉄 0.0625 mg/L、硫酸マンガン 2.7 mg/L、塩化カルシウム 0.33 mg/L、塩化ナトリウム 1.25 g/L、Bacto トリプトン 2.5 g/L、酵母エキス 1.25 g/L) 5 mLに添加して30℃で48時間培養し、48時間までの本培養液を経時的に分取する。

[0021] 本培養液より菌体を遠心分離し、上清をLC-MS/MSにて分析する。LC-MS/MSによる分析条件は以下のとおりである。HPLCには、1290 Infinity (Agilent Technologies社製)、MS/MSには、Triple-Quad LC/MS (Agilent Technologies社製)等を用いることができる。また、カラムには、Synergi hydro-RP (Phenomenex社製)を用いることができる。

HPLC分析条件:

カラム: 長さ100 mm、内径3 mm、粒径2.5 μm

移動相: 0.1%ギ酸水溶液/メタノール=70/30

流速: 0.3 mL/分

カラム温度: 40℃

LC検出器: DAD (210 nm)

MS/MS分析条件:

イオン化法: ESI ネガティブモード。

[0022] 本発明では、*Serratia*属微生物を、通常の微生物が代謝し得る炭素源を含有する培地、好ましくは液体培地中において培養する。ここで、本

発明における「代謝」とは、*Serratia*属微生物が細胞外から取り入れた、あるいは細胞内で別の化学物質より生じたある化学物質が、酵素反応により別の化学物質へと変換されることを指す。*Serratia*属微生物が代謝しうる炭素源の他には、窒素源、無機塩および必要に応じてアミノ酸やビタミンなどの有機微量栄養素を程よく含有した培地を用いる。上記栄養源を含有していれば天然培地、合成培地のいずれでも利用できる。

[0023] *Serratia*属微生物が代謝し得る炭素源としては、糖類を好ましく用いることができる。糖類の具体例としては、グルコース、シュクロース、フルクトース、ガラクトース、マンノース、キシロース、アラビノース等の単糖類、これら単糖類が結合した二糖類、多糖類、およびこれらを含む澱粉糖化液、糖蜜、セルロース含有バイオマス糖化液などが挙げられる。

[0024] また、上記に挙げた糖類以外にも、*Serratia*属微生物が生育に利用可能な炭素源であれば好ましく用いることができる。例えば、酢酸、コハク酸、乳酸、フマル酸、クエン酸、プロピオン酸、リンゴ酸、マロン酸、2-オキシグルタル酸、ピルビン酸等のカルボン酸、メタノール、エタノール、プロパノールなどの一価アルコール類、グリセリン、エチレングリコール、プロパンジオールなどの多価アルコール類、炭化水素、脂肪酸、油脂などが挙げられ、好ましくは、コハク酸、2-オキシグルタル酸、グリセロールである。

[0025] 上記に挙げた炭素源は、一種類のみ用いてもよいし、組み合わせて用いてもよい。具体的には、これら炭素源の中でも糖類、コハク酸、2-オキシグルタル酸、グリセロールからなる群より選択される1種または2種以上を代謝することで効率よく3-ヒドロキシアジピン酸を製造することができる。培地中の炭素源の濃度は、特に限定されず、炭素源の種類などに応じて適宜設定することができ、好ましくは5 g/L~300 g/Lである。

[0026] *Serratia*属微生物の培養に用いる窒素源としては、例えば、アンモニアガス、アンモニア水、アンモニウム塩類、尿素、硝酸塩類、その他補助的に使用される有機窒素源、例えば、油粕類、大豆加水分解液、カゼイン

分解物、その他のアミノ酸、ビタミン類、コーンステープリカー、酵母または酵母エキス、肉エキス、ペプトン等のペプチド類、各種発酵菌体およびその加水分解物などが使用できる。培地中の窒素源の濃度は、特に限定されないが、好ましくは、0.1 g/L ~ 50 g/Lである。

[0027] *Serratia*属微生物の培養に用いる無機塩類としては、例えば、リン酸塩、マグネシウム塩、カルシウム塩、鉄塩およびマンガン塩等を適宜添加使用することができる。

[0028] 3-ヒドロキシアジピン酸を製造するための*Serratia*属微生物の培養条件は、前記成分組成の培地、培養温度、攪拌速度、pH、通気量、植菌量などを、使用する*Serratia*属の種類および外部条件などに応じて、適宜調節あるいは選択して設定する。液体培養において発泡がある場合には、鉱油、シリコン油および界面活性剤などの消泡剤を適宜培地に配合することができる。

[0029] 上記に示した培地および培養条件で、本発明で用いる*Serratia*属微生物を用いた培養により3-ヒドロキシアジピン酸を製造することができるが、3-ヒドロキシアジピン酸を製造するために必要な代謝経路を活性化した状態で前記*Serratia*属微生物を培養することで、より効率的に3-ヒドロキシアジピン酸を製造することができる。

[0030] 前記代謝経路を活性化する方法は特に限定されないが、例えば、3-ヒドロキシアジピン酸を製造するための代謝経路中の酵素遺伝子（群）の発現量を増大させる方法、3-ヒドロキシアジピン酸を製造するための代謝経路を活性化する物質（以下、誘導物質ともいう。）を含む培地で前記微生物を培養することで前記酵素遺伝子（群）の発現を誘導する方法、および公知の手法に従って遺伝子を組換えたり、遺伝子変異処理などの育種技術によって、前記酵素遺伝子（群）を改変したりして、前記酵素遺伝子（群）がコードする酵素（群）の活性を増大させる方法などが挙げられる。これらの方法は単独で行っても良いし、組み合わせてもよい。

[0031] 前記酵素遺伝子（群）の発現量を増大させる方法としては、例えば、遺伝

子改変技術により、本発明に用いる *Serratia* 属微生物内において細胞内に存在する前記酵素遺伝子（群）のコピー数を増加させる方法、前記遺伝子（群）のコーディング領域周辺の機能性領域を改変する方法などが挙げられ、前記遺伝子（群）のコピー数を増加させる方法が好ましい。

[0032] 誘導物質を含む培地で、本発明に用いる *Serratia* 属微生物を培養して、前記酵素遺伝子（群）の発現を誘導する方法に用いる誘導物質としては、3-ヒドロキシアジピン酸の製造に必要な代謝経路が活性化される物質であれば特に限定されないが、例えば、3-オキソアジピル CoA を中間体としてより炭素数の少ない化合物へと代謝される芳香族化合物、炭素数6以上の脂肪族化合物、およびそれらと構造が類似した化合物を用いることができる。このような化合物の例は、例えば KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) などのデータベースを用いて知ることができ、具体的には、安息香酸、cis, cis-ムコン酸、テレフタル酸、プロトカテク酸、カテコール、バニリン、クマル酸、フェルラ酸などが挙げられ、フェルラ酸、p-クマル酸、安息香酸が好ましい。

[0033] 上記の誘導物質は3-ヒドロキシアジピン酸製造に用いる *Serratia* 属微生物に応じて単独で使用してもよいし、2種以上を組み合わせで使用してもよい。また、上記誘導物質は3-ヒドロキシアジピン酸製造の前段階として *Serratia* 属微生物を増殖させるために行う培養（前培養）に用いる培地に含まれていてもよいし、3-ヒドロキシアジピン酸製造に用いる培地に含まれていてもよい。1種または2種以上の誘導物質が培地中に含まれる場合、誘導物質の濃度（複数の誘導物質が含まれる場合には、それらの合計濃度）は、特に限定されないが、好ましくは、1 mg/L ~ 10 g/L、より好ましくは 5 mg/L ~ 1 g/L である。

[0034] 公知の手法に従って遺伝子を組換えたり、遺伝子変異処理などの育種技術によって、前記酵素遺伝子（群）を改変したりして、前記酵素遺伝子（群）がコードする酵素（群）の活性を増大させる方法としては、遺伝子組換えの

手法を用いて前期酵素遺伝子（群）を本発明で用いる *Serratia* 属微生物に導入する方法が好ましい。

[0035] 前記酵素遺伝子（群）に該当する遺伝子の具体例としては、スクシニルCoAおよびアセチルCoAから3-オキソアジピルCoAおよびCoAを生じる反応を触媒する活性を有する酵素をコードする遺伝子が挙げられる。本発明では、3-ヒドロキシアジピン酸の生産能を有する *Serratia* 属微生物のスクシニルCoAおよびアセチルCoAから3-オキソアジピルCoAおよびCoAを生じる反応を触媒する活性を有する酵素の活性を強化することによって、より効率的に3-ヒドロキシアジピン酸を製造することができる。

[0036] 上記活性を有する酵素であれば特に限定されないが、具体的には、acetyl-CoA acetyltransferase、 $\beta$ -ketoacyl-CoA acyltransferase、3-oxoadipyl-CoA acyltransferase、 $\beta$ -ketoacyl-CoA acyltransferase、acetyl-CoA C-acetyltransferase、acetoacetyl-CoA thiolase、beta-acetoacetyl coenzyme A thiolase、2-methylacetoacetyl-CoA thiolase、3-oxothiolase、acetyl coenzyme A thiolase、acetyl-CoA acetyltransferase、acetyl-CoA:N-acetyltransferase、acetyl-CoA C-acyltransferase、beta-ketothiolase、3-ketoacyl-CoA thiolase、beta-ketoacyl coenzyme A thiolase、beta-ketoacyl-CoA thiolase、beta-ketoadipyl coenzyme A thiolase、beta-ketoadipyl-CoA thiolase、3-ketoacyl coenzyme A thiolase、3-

ketoacyl thiolase、3-ketothiolase、3-oxoacyl-CoA thiolase、3-oxoacyl-coenzyme A thiolase、6-oxoacyl-CoA thiolase、acetoacetyl-CoA beta-ketothiolase、acetyl-CoA acyltransferase、ketoacyl-CoA acyltransferase、ketoacyl-coenzyme A thiolase、long-chain 3-oxoacyl-CoA thiolase、oxoacyl-coenzyme A thiolase、pro-3-ketoacyl-CoA thiolase、3-oxoadipyl-CoA thiolase、3-oxo-5,6-didehydrosuberyl-CoA thiolaseなどを好ましく用いることができる。また、EC番号による分類上の限定は特にないが、EC 2.3.1.-に分類されるアシルトランスフェラーゼが好ましく、具体例としては、EC 2.3.1.174、EC 2.3.1.9、EC 2.3.1.16、EC 2.3.1.223に分類される酵素が挙げられる。

[0037] また、機能未知の遺伝子配列によってコードされるタンパク質が、上記の酵素に該当するかどうかについては、NCBI (National Center for Biotechnology Information) などのサイトでBLAST検索を行い、当該酵素に該当するかどうかを推定することができる。

[0038] 遺伝子組換えの手法を用いて、スクシニルCoAおよびアセチルCoAから3-オキソアジピルCoAおよびCoAを生じる反応を触媒する活性を有する酵素をコードする遺伝子を*Serratia*属微生物へ導入し、本発明で用いる*Serratia*属微生物のスクシニルCoAおよびアセチルCoAから3-オキソアジピルCoAおよびCoAを生じる反応を触媒する酵素の活性を強化する場合、当該酵素をコードする遺伝子の遺伝子源となる生物は特に限定されず、天然に存在する微生物から採取した遺伝子、人工的に合

成された遺伝子、微生物から採取した遺伝子を本発明の *Serratia* 属微生物で発現しやすいようコドンの使用頻度を最適化させた遺伝子などを用いることができる。

[0039] スクシニルCoAおよびアセチルCoAから3-オキソアジピルCoAおよびCoAを生じる反応を触媒する酵素をコードする遺伝子の遺伝子源となる微生物は、特に限定されないが、例えば、*Acinetobacter baylyi*、*Acinetobacter radioresistens*などの*Acinetobacter*属微生物、*Aerobacter cloacae*などの*Aerobacter*属微生物、*Alcaligenes faecalis*などの*Alcaligenes*属微生物、*Bacillus badius*、*Bacillus magaterium*、*Bacillus roseus*などの*Bacillus*属微生物、*Brevibacterium iodinum*などの*Brevibacterium*属微生物、*Corynebacterium acetoacidophilum*、*Corynebacterium acetoglutamicum*、*Corynebacterium ammoniagenes*、*Corynebacterium glutamicum*などの*Corynebacterium*属微生物、*Cupriavidus metallidurans*、*Cupriavidus necator*、*Cupriavidus numazuensis*、*Cupriavidus oxalaticus*などの*Cupriavidus*属微生物、*Delftia acidovorans*などの*Delftia*属微生物、*Escherichia coli*、*Escherichia fergusonii*などの*Escherichia*属微生物、*Hafnia alvei*などの*Hafnia*属微生物、*Microbacterium ammoniaphilum*などの*Microbacterium*属微生物、*Nocardioides albus*などの*Nocardioides*属微生物、*Planomicrobium okeanokoites*などの*Planomicrobium*属微

生物、*Pseudomonas azotoformans*、*Pseudomonas chlororaphis*、*Pseudomonas fluorescens*、*Pseudomonas fragi*、*Pseudomonas putida*、*Pseudomonas reptilivora*、*Pseudomonas taetrolens*などの*Pseudomonas*属微生物、*Rhizobium radiobacter*などの*Rhizobium*属微生物、*Rhodospiridium toruloides*などの*Rhodospiridium*属微生物、*Saccharomyces cerevisiae*などの*Saccharomyces*属微生物、*Serratia entomophila*、*Serratia ficaria*、*Serratia fonticola*、*Serratia grimesii*、*Serratia nematodiphila*、*Serratia odorifera*、*Serratia plymuthica*などの*Serratia*属微生物、*Shimwellia blattae*などの*Shimwellia*属微生物、*Sterptomyces vinaceus*、*Streptomyces karnatakensis*、*Streptomyces olivaceus*、*Streptomyces vinaceus*などの*Sterptomyces*属微生物、*Yarrowia lipolytica*などの*Yarrowia*属微生物、*Yersinia ruckeri*などの*Yersinia*属微生物が挙げられ、好ましくは、*Serratia*属微生物または*Corynebacterium*属微生物であり、さらに好ましくは、*Serratia plymuthica*、または*Corynebacterium glutamicum*である。

[0040] 本発明において、スクシニルCoAおよびアセチルCoAから3-オキソアジピルCoAおよびCoAを生じる反応を触媒する酵素の活性を強化した*Serratia*属微生物とは、スクシニルCoAおよびアセチルCoAから3-オキソアジピルCoAおよびCoAを生じる反応を触媒する酵素の比

活性 (Unit/mg) が、当該酵素の活性を強化していないコントロールと比較して増大している *Serratia* 属微生物を指す。コントロールには、スクシニル CoA およびアセチル CoA から 3-オキソアジピル CoA および CoA を生じる反応を触媒する酵素の発現系が、遺伝的に改変されていない状態である *Serratia* 属微生物を用いる。

[0041] *Serratia* 属微生物のスクシニル CoA およびアセチル CoA から 3-オキソアジピル CoA および CoA を生じる反応を触媒する酵素の比活性は、*Serratia* 属微生物を培養し、無細胞抽出液 (CFE) を調製して、CFE を酵素溶液として用いて測定する。酵素溶液の調製方法は以下のとおりである。

[0042] pH 7 に調整した前培養培地 (培地組成: 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) 5 mL に活性測定の対象となる *Serratia* 属微生物を一白金耳植菌し、十分懸濁するまで 30°C で振とう培養する。得られた前培養液に 10 mL の 0.9% 塩化ナトリウムを加え、菌体を遠心分離して上清を取り除く操作を 3 回行い、菌体を洗浄する。洗浄した菌体を 1 mL の 0.9% 塩化ナトリウムに懸濁し、懸濁液 0.5 mL を pH 6.5 に調整した本培養液 (培地組成: コハク酸 10 g/L、グルコース 10 g/L、硫酸アンモニウム 1 g/L、リン酸カリウム 50 mM、硫酸マグネシウム 0.025 g/L、硫酸鉄 0.0625 mg/L、硫酸マンガン 2.7 mg/L、塩化カルシウム 0.33 mg/L、塩化ナトリウム 1.25 g/L、Bacto トリプトン 2.5 g/L、酵母エキス 1.25 g/L) 5 mL に添加し、30°C で 3 時間振とう培養する。

[0043] 得られた本培養液 5 mL を遠心により集菌後、Tris-HCl (pH 8.0) 100 mM、dithiothreitol 1 mM からなる Tris-HCl バッファー 1 mL に懸濁し、得られた懸濁液にガラスビーズ ( $\phi$  0.1 mm) を加え、超音波破碎機を用い 4°C で菌体を破碎する。得られた菌体破碎液を遠心して、上清として回収した無細胞抽出液 (CFE) を酵

素液とする。

[0044] 比活性は、上記の方法により調製した酵素液を用いて、スクシニルC o A およびアセチルC o Aの縮合反応により生じる3-オキソアジピルC o Aに対して基質特異性を有するN A D H依存型3-ヒドロキシアシルC o Aデヒドロゲナーゼを反応系内に過剰量存在させたときに、3-オキソアジピルC o Aの還元に伴うN A D Hの消費速度を測定し、式1に従って算出する。式1において、酵素液濃度 (mg/ml) は、酵素液中のタンパク質濃度である。

[0045] [数1]

$$\text{比活性 (Unit/mg)} = \frac{\Delta 340\text{nm} \times \text{全反応液量 (ml)}}{\{\text{酵素液濃度(mg/ml)} \times \text{酵素液量(ml)} \times 6.22 \times \text{光路長(cm)}\}} \dots (\text{式1})$$

[0046] 具体的な算出方法は以下のとおりである。酵素反応溶液A (組成: T r i s - H C l (p H 8. 0) 2 0 0 m M、M g C l 2 4 0 m M、N A D H 0. 8 m M、D T T 2 m M、E s c h e r i c h i a c o l i由来の3-ヒドロキシアシルC o Aデヒドロゲナーゼ (P a a H) 4. 4 μ g) 2 5 μ Lに酵素液5 0 μ Lを混合し、3 0 ° Cで2 m i nインキュベートする。その後、酵素反応溶液B (組成: アセチルC o A 2 m M、スクシニルC o A 0. 4 m M) 2 5 μ Lを入れた状態で予め3 0 ° Cでプレインキュベートした石英セルに上記の酵素反応溶液Aと酵素液の混合液を全量添加し、すばやく混合し反応液とする。調製した反応液の3 0 ° Cでの3 4 0 n mにおける吸光度の減少の値を分光光度計で測定し、得られたΔ 3 4 0の値を、式(1)に従って計算し、比活性 (U n i t / m g) を算出する。酵素液中のタンパク質濃度は、Q u i c k S t a r t B r a d f o r dプロテインアッセイ (B I O - R A D社製) などを用いて測定することができる。分光光度計は、U l t r o s p e c 3 3 0 0 P r o (G Eヘルスケア社製) を用いることができる。

[0047] 上記の方法以外にも、より効率的に3-ヒドロキシアジピン酸を製造する

ためには、本発明で用いる *Serratia* 属微生物の代謝経路のうち、3-ヒドロキシアジピン酸の副生成物の生合成経路中の酵素遺伝子機能を破壊する方法なども用いることができる。

[0048] *Serratia* 属微生物の培養物中に、3-ヒドロキシアジピン酸が回収可能な量まで生産された後、生産された3-ヒドロキシアジピン酸を回収することができる。生産された3-ヒドロキシアジピン酸の回収、例えば単離は、蓄積量が適度に高まった時点で培養を停止し、その培養物から、発酵生産物を採取する一般的な方法に準じて行うことができる。具体的には、遠心分離、ろ過などにより菌体を分離したのち、カラムクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、活性炭処理、結晶化、膜分離、蒸留などにより、3-ヒドロキシアジピン酸を培養物から単離することができる。より具体的には、好ましい回収方法として、培養物を逆浸透膜やエバポレーターなどを用いた濃縮操作により水を除去して3-ヒドロキシアジピン酸の濃度を高めた後、冷却結晶化や断熱結晶化により3-ヒドロキシアジピン酸および／または3-ヒドロキシアジピン酸の塩の結晶を析出させ、遠心分離やろ過などにより3-ヒドロキシアジピン酸および／または3-ヒドロキシアジピン酸の塩の結晶を得る方法、培養物にアルコールを添加して3-ヒドロキシアジピン酸エステルとした後、蒸留操作により3-ヒドロキシアジピン酸エステルを回収後、加水分解により3-ヒドロキシアジピン酸を得る方法等を挙げることができるがこれらに限定されるものではない。

## 実施例

[0049] 以下、実施例を挙げて本発明を具体的に説明する。

[0050] (参考例1) 3-ヒドロキシアジピン酸の調製

後述の実施例の分析に用いた3-ヒドロキシアジピン酸は化学合成により準備した。まず、コハク酸モノメチルエステル13.2g (0.1mol) (和光純薬株式会社製) に超脱水テトラヒドロフラン1.5L (和光純薬株式会社製) を加え、攪拌しながらカルボニルジイミダゾール16.2g (0.1mol) (和光純薬株式会社製) を添加し、窒素雰囲気下1時間室温で攪

拌した。この懸濁液にマロン酸モノメチルエステルカリウム塩 15.6 g (0.1 mol) および塩化マグネシウム 9.5 g (0.1 mol) を添加し、窒素雰囲気下 1 時間室温で攪拌した後、40°C で 12 時間攪拌した。反応終了後、1 mol/L 塩酸を 0.05 L 加え、酢酸エチルにより抽出し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン：酢酸エチル = 1 : 5）で分離精製することで、純粋な 3-オキソヘキサシカルボン酸ジメチルエステル 13.1 g を得た。収率 70%。

[0051] 得られた 3-オキソヘキサシカルボン酸ジメチルエステル 10 g (0.05 mol) にメタノール 0.1 L（国産化学株式会社製）を加え、攪拌しながら 5 mol/L の水酸化ナトリウム水溶液 0.02 L を添加し、室温で 2 時間攪拌した。反応終了後、5 mol/L の塩酸で pH 1 に調整し、次いで、水素化ホウ素ナトリウム 2.0 g (0.05 mol)（和光純薬株式会社製）を添加し、室温で 2 時間攪拌した。反応終了後、ロータリーエバポレーターで濃縮後、水で再結晶することで、純粋な 3-ヒドロキシアジピン酸 7.2 g を得た。収率 95%。

[0052] 3-ヒドロキシアジピン酸の  $^1\text{H-NMR}$  スペクトル：

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  1.70 (m, 1H)、 $\delta$  1.83 (m, 1H)、 $\delta$  2.42 (m, 4H)、 $\delta$  4.01 (m, 1H)。

[0053] （実施例 1）3-ヒドロキシアジピン酸生産試験

表 1 に示した *Serratia* 属微生物（いずれも微生物分与機関より購入。購入先は株名に記載。）の 3-ヒドロキシアジピン酸の生産能を調べた。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 を含み、pH 7 に調整した培地 5 mL に、それぞれの *Serratia* 属微生物を一白金耳植菌し、十分懸濁するまで 30°C で振とう培養した（前培養）。その培養液に 10 mL の 0.9% 塩化ナトリウムを加え、菌体を遠心分離したのち上清を完全に取り除くことで菌体を洗浄する操作を 3 回行ったのち、菌体を 1 mL の 0.9% 塩化ナトリウムに懸濁した。懸濁液 0.5 mL を

以下に示した組成の培地 5 mL に添加し、30°C で 48 時間振とう培養した。

コハク酸 10 g/L

グルコース 10 g/L

硫酸アンモニウム 1 g/L

リン酸カリウム 50 mM

硫酸マグネシウム 0.025 g/L

硫酸鉄 0.0625 mg/L

硫酸マンガン 2.7 mg/L

塩化カルシウム 0.33 mg/L

塩化ナトリウム 1.25 g/L

Bactoトリプトン 2.5 g/L

酵母エキス 1.25 g/L

pH 6.5。

[0054] (3-ヒドロキシアジピン酸の定量分析)

本培養液より菌体を遠心分離した上清を、LC-MS/MSにて分析した。LC-MS/MSによる3-ヒドロキシアジピン酸の定量分析は以下の条件で行った。

HPLC: 1290 Infinity (Agilent Technologies社製)

カラム: Synergi hydro-RP (Phenomenex社製)  
、長さ100mm、内径3mm、粒径2.5μm

移動相: 0.1%ギ酸水溶液/メタノール=70/30

流速: 0.3 mL/分

カラム温度: 40°C

LC検出器: DAD (210nm)

MS/MS: Triple-Quad LC/MS (Agilent Technologies社製)

イオン化法：ESI ネガティブモード。

[0055] 培養上清中に蓄積した3-ヒドロキシアジピン酸の定量分析を行った結果をそれぞれ表1に示す。これらの結果から、いずれの*Serratia*属微生物も3-ヒドロキシアジピン酸の生産能を有することを確認することができた。

[0056] [表1]

【表1】

供試微生物	3-ヒドロキシアジピン酸 生産量 (mg/L)
<i>Serratia grimesii</i> NBRC13537	3.8
<i>Serratia ficaria</i> NBRC102596	6.0
<i>Serratia plymuthica</i> NBRC102599	3.1
<i>Serratia fonticola</i> NBRC102597	1.5
<i>Serratia odorifera</i> NBRC102598	2.2
<i>Serratia entomophila</i> DSM12358	1.8
<i>Serratia nematodiphila</i> DSM21420	1.1

[0057] (実施例2) 誘導物質を用いた3-ヒドロキシアジピン酸生産試験

表2に示した*Serratia*属微生物を対象に、誘導物質として、前培養培地にフェルラ酸、p-クマル酸、安息香酸、cis, cis-ムコン酸、プロトカテク酸およびカテコールをそれぞれ2.5mMとなるように添加した以外は実施例1と同様条件で前培養、本培養を行い、培養上清中の3-ヒドロキシアジピン酸の定量分析をした。結果をそれぞれ表2に示す。これらの結果から、前培養培地に誘導物質を添加することによって、3-ヒドロキシアジピン酸の生産量が向上することがわかった。

[0058] [表2]

【表2】

供試微生物	3-ヒドロキシアジピン酸生産量 (mg/L)	
	誘導物質添加なし	誘導物質添加あり
<i>Serratia grimesii</i> NBRC13537	3.8	8.1
<i>Serratia ficaria</i> NBRC102596	6.0	13.4
<i>Serratia plymuthica</i> NBRC102599	3.1	4.3
<i>Serratia fonticola</i> NBRC102597	1.5	3.6
<i>Serratia odorifera</i> NBRC102598	2.2	5.2
<i>Serratia entomophila</i> DSM12358	1.8	3.0
<i>Serratia nematodiphila</i> DSM21420	1.1	2.4

[0059] (実施例3) 2種類の炭素源を用いた3-ヒドロキシアジピン酸生産試験  
表3に示した*Serratia*属微生物を対象に、実施例2と同様の培地を用いて前培養を行ったのち、炭素源として表3に示した化合物をそれぞれ10g/L含む培地にて実施例2と同様の条件にて培養し、培養上清中の3-ヒドロキシアジピン酸の定量分析をした。結果をそれぞれ表3に示す。これらの結果から、グルコースとコハク酸以外を炭素原として培養しても、3-ヒドロキシアジピン酸を効率よく生産できることがわかった。

[0060]

[表3]

供試微生物	3-ヒドロキシアジピン酸生産量 (mg/L) (誘導物質添加あり)											
	炭素源											
	グルコース	グリセロール	キシロース	アラビノース	グルコース	グリセロール	キシロース	アラビノース	グリセロール	キシロース		
<i>S. grimesii</i> NBRC13537	7.5	12.0	15.4	8.3	3.1	8.1	9.1	8.3	2-オキソ グルタル酸	2-オキソ グルタル酸	2-オキソ グルタル酸	8.3
<i>S. ficaria</i> NBRC102596	8.9	9.6	11.8	5.3	3.3	4.6	4.7	4.1	2-オキソ グルタル酸	2-オキソ グルタル酸	2-オキソ グルタル酸	4.1
<i>S. plymuthi</i> NBRC102599	5.0	4.1	6.3	4.6	2.1	2.9	2.7	2.0	2-オキソ グルタル酸	2-オキソ グルタル酸	2-オキソ グルタル酸	2.0

[0061] (実施例4) 様々な濃度の2種類の炭素源を用いた3-ヒドロキシアジピン酸生産試験

表4に示した*Serratia*属微生物を対象に、実施例2と同様の培地を用いて前培養を行ったのち、炭素源として表4に示した濃度の化合物をそれぞれ含む培地にて実施例2と同様の条件にて48~120時間培養し、培養上清中の3-ヒドロキシアジピン酸の定量分析をした。結果をそれぞれ表4に示す。これらの結果から、炭素源の添加割合を変更しても、3-ヒドロキシアジピン酸を生産できることがわかった。

[0062]

[表4]

【表4】	3-ヒドロキシアジピン酸の生産量 (mg/L) (誘導物質添加あり)									
	炭素源									
	グルコース 25g/L コハク酸 10g/L	グルコース 50g/L コハク酸 10g/L	キシロース 25g/L コハク酸 10g/L	キシロース 50g/L コハク酸 10g/L	グルコース 10g/L コハク酸 20g/L	グルコース 100g/L コハク酸 20g/L	キシロース 50g/L コハク酸 10g/L	キシロース 25g/L コハク酸 10g/L	グルコース 50g/L コハク酸 10g/L	グルコース 10g/L コハク酸 20g/L
<i>S. grimesii</i> NBRC13537	9.7	11.2	19.0	26.1	13.9	28.2	60.9	19.0	11.2	26.1
<i>S. ficaria</i> NBRC102596	14.8	19.1	15.6	19.1	20.2	34.2	33.3	15.6	19.1	19.1
<i>S. plymuthica</i> NBRC102599	5.6	6.3	7.2	10.3	6.0	8.5	13.3	7.2	6.0	10.3

[0063] (実施例5) 単一の炭素源を用いた3-ヒドロキシアジピン酸生産試験

表5に示した*Serratia*属微生物を対象に、実施例1と同様の培地を用いて前培養を行ったのち、炭素源としてコハク酸、グルコース、グリセロールのいずれか1種類を10g/L含む培地にて実施例1と同様の条件にて培養し、培養上清中の3-ヒドロキシアジピン酸の定量分析をした。結果をそれぞれ表5に示す。さらに、同様の実験について、前培養培地のみ実施例2に変更して行い、前培養培地に誘導物質を添加した場合の3-ヒドロキシアジピン酸の生産量について、表6に示す。これらの結果から、単一の炭素源を用いた場合でも、3-ヒドロキシアジピン酸を生産できること、また、単一の炭素源を用いた場合も、誘導物質を前培養培地に添加することで、3-ヒドロキシアジピン酸の生産量が向上することがわかった。

[0064]

[表5]

供試微生物	3-ヒドロキシアジピン酸の生産量 (mg/L) (誘導物質添加なし)						
	炭素原						
	コハク酸	グルコース	グリセロール	キシロース	アラビノース	2-オキソグルタル酸	
<i>S. grimesii</i> NBRC 13537	1.2	1.5	2.4	1.3	1.7	1.1	
<i>S. ficaria</i> NBRC 102596	1.0	1.5	3.1	1.1	1.1	1.0	
<i>S. plymuthica</i> NBRC 102599	2.0	1.3	1.5	1.4	1.4	1.3	

[表6]

供試微生物	3-ヒドロキシアジピン酸の生産量 (mg/L) (誘導物質添加あり)						
	炭素源						
	コハク酸	グルコース	グリセロール	キシロース	アラビノース	2-オキソグルタル酸	
<i>S. grimesii</i> NBRC 13537	2.5	3.0	6.7	4.1	3.8	2.3	
<i>S. ficaria</i> NBRC 102596	2.4	3.1	7.2	3.9	3.7	2.2	
<i>S. plymuthica</i> NBRC 102599	4.0	2.2	2.5	3.2	3.0	2.6	

[0066] (実施例6) 様々な濃度のフェルラ酸を誘導物質として用いた3-ヒドロ

### キシアジピン酸生産試験

表7に示した*Serratia*属微生物を対象に、実施例2から5で誘導物質として前培養培地に添加した物質の中から、フェルラ酸を表7に示した濃度になるよう実施例1の前培養培地に添加し、前培養を行った。それ以外は実施例1と同様の条件で前培養、本培養を行い、培養上清中の3-ヒドロキシアジピン酸の定量分析をした。結果をそれぞれ表7に示す。これらの結果から、フェルラ酸のみを誘導物質として前培養培地に添加した場合でも、3-ヒドロキシアジピン酸の生産量が向上することがわかった。

[0067]

[表7]

供試微生物	3-ヒドロキシアジピン酸生産量 (mg/L)							
	フェルラ酸添加濃度 (mM)							
	0.00	0.05	0.10	0.25	0.50	1.00	2.50	5.00
<i>S. grimesii</i> NBRC13537	3.8	4.2	4.3	4.4	4.4	4.6	4.8	4.8
<i>S. ficaria</i> NBRC102596	6.0	6.5	6.5	6.6	6.9	7.0	7.3	7.3
<i>S. plymuthica</i> NBRC102599	3.1	3.5	3.6	3.6	3.6	3.8	4.0	4.0

[0068] (実施例7) 様々な濃度のp-クマル酸を誘導物質として用いた3-ヒドロキシアジピン酸生産試験

表8に示した*Serratia*属微生物を対象に、実施例2から5で誘導

物質として前培養培地に添加した物質の中から、*p*-クマル酸を表7に示した濃度になるよう実施例1の前培養培地に添加し、前培養を行った。それ以外は、実施例1と同様の条件で前培養、本培養を行い、培養上清中の3-ヒドロキシアジピン酸の定量分析をした。結果をそれぞれ表8に示す。これらの結果から、*p*-クマル酸のみを誘導物質として前培養培地に添加した場合も、3-ヒドロキシアジピン酸の生産量が向上することがわかった。

[0069]

【表8】

供試微生物	3-ヒドロキシアジピン酸生産量 (mg/L)						
	p-クマル酸添加濃度 (mM)						
S. grimesii NBRC13537	0.00	0.05	0.10	0.25	0.50	1.00	2.50
	3.8	4.5	4.7	5.1	6.3	6.1	8.1

[0070] (実施例8) 安息香酸を誘導物質として用いた3-ヒドロキシアジピン酸生産試験

表9に示した*Serratia*属微生物を対象に、実施例2から5で誘導

物質として前培養培地に添加した物質の中から、安息香酸を2.5 mMとなるように実施例1の前培養培地に添加し、前培養を行った。それ以外は、実施例1と同様の条件で前培養、本培養を行い、培養上清中の3-ヒドロキシアジピン酸の定量分析をした。結果をそれぞれ表9に示す。これらの結果から、安息香酸のみを誘導物質として前培養培地に添加した場合も、3-ヒドロキシアジピン酸の生産量が向上することがわかった。

[0071] [表9]

【表9】

供試微生物	3-ヒドロキシアジピン酸生産量 (mg/L)	
	誘導物質添加なし	安息香酸2.5 mM添加
<i>S. grimesii</i> NBRC13537	3.8	7.0
<i>S. ficaria</i> NBRC102596	6.0	6.6
<i>S. plymuthica</i> NBRC102599	3.1	4.1

[0072] (実施例9) 3-ヒドロキシアジピン酸の製造例

実施例1で3-ヒドロキシアジピン酸の生産能を有する *Serratia* 属微生物であることが確認できた *S. grimesii* NBRC13537 を、LB培地5 mLに一白金耳植菌し、十分懸濁するまで30°Cで振とう培養した。該培養液2 mLをトリプトン10 g/L、酵母エキス5 g/L、塩化ナトリウム5 g/L、フェルラ酸0.5 mMを含む培地100 mLに添加し、十分懸濁するまで30°Cで振とう培養した（前培養）。前培養液を200 mLの0.9%塩化ナトリウムで実施例1と同様に3回洗浄したのち、菌体を10 mLの0.9%塩化ナトリウムに懸濁した。懸濁液10 mLをグルコース100 g/Lおよびコハク酸20 g/Lを炭素源とする実施例1記載の培地100 mLに添加し、30°Cで120時間振とう培養した。該培養液より菌体を遠心分離した上清を、実施例1と同様にLC-MS/MSにて分析した結果、培養上清中に蓄積した3-ヒドロキシアジピン酸の濃度は26 mg/Lであった。

[0073] 次に培養上清を減圧濃縮し、3-ヒドロキシアジピン酸の濃度が230 m

g/Lの濃縮液を11mL得た。この濃縮液を、分取装置を連結したHPLCに注入し、3-ヒドロキシアジピン酸の標品と一致する溶出時間の画分を採取した。この作業を10回繰り返して、培養液中の不純物が除去された3-ヒドロキシアジピン酸水溶液を得た。なお、3-ヒドロキシアジピン酸の採取に用いた分取HPLCは以下の条件にて行った。

HPLC：SHIMADZU 20A（株式会社島津製作所製）

カラム：Synergi hydro-RP（Phenomenex社製）、長さ250mm、内径10mm、粒径4 $\mu$ m

移動相：5mM ギ酸水溶液/アセトニトリル=98/2

流速：4mL/分

注入量：1mL

カラム温度：45 $^{\circ}$ C

検出器：UV-VIS（210nm）

分取装置：FC204（Gilson社製）。

[0074] 続いて3-ヒドロキシアジピン酸水溶液を減圧濃縮し、2.2mgの結晶を得た。結晶を $^1$ H-NMRで分析した結果、得られた結晶が3-ヒドロキシアジピン酸であることを確認できた。

[0075] （参考例2）炭素源を添加しない培養

表2に示した*Serratia*属微生物を用いて、グルコースおよびコハク酸を添加しない組成の培地を用いた他は実施例1と同様の条件で培養し、3-ヒドロキシアジピン酸の定量分析をした結果、培養上清中に3-ヒドロキシアジピン酸は検出されなかった。これらの結果から、実施例1～8で*Serratia*属微生物が生産した3-ヒドロキシアジピン酸は、グルコース、コハク酸、アラビノース、2-オキソグルタル酸、キシロースまたはグリセロールを炭素源とする代謝により得られたものであることがわかった。

[0076] （参考例3）3-ヒドロキシアジピン酸の生産能を有さない微生物

表10に示した微生物の3-ヒドロキシアジピン酸の生産能を確認するべく、実施例1と同様の条件で培養し、3-ヒドロキシアジピン酸の定量分析

をした結果、いずれも検出限界以下となり、培養上清中に3-ヒドロキシアジピン酸は検出されなかった。なお、検出限界は0.1 mg/Lである。

[0077] [表10]

【表10】

供試微生物	3-ヒドロキシアジピン酸 (mg/L)
<i>Zymomonas mobilis</i> NBRC13756	N. D.
<i>Microbacterium ammoniaphilum</i> ATCC15354	N. D.
<i>Planomicrobium okeanokoites</i> NBRC12536	N. D.
<i>Yersinia ruckeri</i> NBRC102019	N. D.

[0078] (実施例10) *S. plymuthica*由来のスクシニルCoAおよびアセチルCoAから3-オキソアジピルCoAおよびCoAを生じる反応を触媒する酵素遺伝子発現用プラスミドの構築

BLAST検索の結果により、*S. plymuthica* NBRC102599が有する配列番号4の遺伝子配列がスクシニルCoAおよびアセチルCoAから3-オキソアジピルCoAおよびCoAを生じる反応を触媒する酵素である3-oxoadipyl CoA thiolase (PcaF)をコードしていることが推定された。上記遺伝子の発現のためにプラスミドpBBR1MCS-2::SppcaFを構築した。*Serratia*属で自立複製可能なベクターpBBR1MCS-2 (ME Kovach, (1995), Gene 166: 175-176)をXhoIで切断し、pBBR1MCS-2/XhoIを得た。*Escherichia coli* K-12 MG1655のゲノムを鋳型としてgapA遺伝子のORF上流域200b (配列番号1)をPCR増幅するためのプライマーを設計し (配列番号2, 3)、常法に従ってPCR反応を行った。得られた断片およびpBBR1MCS-2/XhoIを、In-Fusion HD Cloning Kit (Clontech社製)を用いて連結し、常法

により塩基配列を確認したプラスミドを pBBR1MCS-2::PgapA とした。続いて pBBR1MCS-2::PgapA を ScaI で切断し、pBBR1MCS-2::PgapA/ScaI を得た。S. plymuthica NBRC102599 のゲノムを鋳型としてスクシニルCoA およびアセチルCoA から 3-オキソアジピルCoA および CoA を生じる反応を触媒する酵素遺伝子の ORF (配列番号 4) を PCR 増幅するためのプライマーを設計し (配列番号 5, 6)、常法に従って PCR 反応を行った。得られた断片および pBBR1MCS-2::PgapA/ScaI を、In-Fusion HD Cloning Kit を用いて連結し、常法により塩基配列を確認したプラスミドを pBBR1MCS-2::SpcaF とした。

[0079] (実施例 11) C. glutamicum 由来スクシニルCoA およびアセチルCoA から 3-オキソアジピルCoA および CoA を生じる反応を触媒する酵素遺伝子発現用プラスミドの構築

Corynebacterium glutamicum ATCC13032 のスクシニルCoA およびアセチルCoA から 3-オキソアジピルCoA および CoA を生じる反応を触媒する酵素を発現させるために、Corynebacterium glutamicum ATCC13032 のゲノムを鋳型として acetyl-CoA acetyltransferase 遺伝子 (pcaF) の ORF (GenBank アクセッション番号 NC\_003450、GI 番号 19553591) を PCR 増幅するためのプライマーを設計し (配列番号 7, 8)、常法に従って PCR 反応を行った。得られた断片および pBBR1MCS-2::PgapA/ScaI を、In-Fusion HD Cloning Kit を用いて連結し、常法により塩基配列を確認したプラスミドを pBBR1MCS-2::CgpcaF とした。

[0080] (実施例 12) Serratia 属微生物へのプラスミド導入

実施例 10 および 11 で構築したプラスミド pBBR1MCS-2::S

p p c a F、p B B R 1 M C S - 2 : : C g p c a F およびコントロールとしてベクター p B B R 1 M C S - 2 を表 1 1 に示す *S e r r a t i a* 属微生物にエレクトロポレーション (N M C a l v i n, P C H a n a w a l t. J. B a c t e r i o l, 1 7 0 (1 9 8 8), p p. 2 7 9 6 - 2 8 0 1) で導入した。形質転換したセラチア属微生物は、カナマイシン  $25 \mu\text{g}/\text{mL}$  を含有する LB 寒天培地上で  $30^\circ\text{C}$  に保温し、1~2 日間生育させた。

[0081] (実施例 13) スクシニル CoA およびアセチル CoA から 3-オキソアジピル CoA および CoA を生じる反応を触媒する酵素の活性測定

実施例 12 で得られたセラチア属微生物の形質転換体を用いて、スクシニル CoA およびアセチル CoA から 3-オキソアジピル CoA および CoA を生じる反応を触媒する酵素の比活性を比較した。

[0082] (a) *E. coli* 由来 *PaaH* の過剰発現および精製

スクシニル CoA およびアセチル CoA から 3-オキソアジピル CoA および CoA を生じる反応を触媒する酵素の活性測定に用いる *PaaH* の過剰発現および精製を行った。まず pCDF-1b を BamHI で切断し、pCDF-1b/BamHI を得た。*Escherichia coli* K-12 MG1655 のゲノムを鋳型として *paaH* 遺伝子 (GenBank アクセション番号 NC\_000913、GI 番号 945940) を PCR 増幅するためのプライマーを設計し (配列番号 9, 10)、常法に従って PCR 反応を行った。得られた断片および pCDF-1b/BamHI を、In-Fusion HD Cloning Kit を用いて連結し、常法により塩基配列を確認したプラスミドを pCDF-1b:Ec50 \mu\text{g}/\text{mL} を含む LB で好氣的に培養し ( $37^\circ\text{C}$ )、OD600 が 0.3 付近の時点でイソプロピルチオガラクトシドを終濃度が 1 mM となるよう添加し、*paaH* の発現を誘導した (好氣的、 $37^\circ\text{C}$ 、一晚)。遠心分離後の菌体を 20 mM Tris-HC

1 (pH 8.0) で懸濁し、氷冷しながら超音波ホモジナイザーで細胞を破碎したのち、遠心分離した上清を無細胞抽出液として回収した。得られた無細胞抽出液を His Bind Resin (Merck 社製) を用いて精製し、Amicon Ultra 3K (Merck 社製) で遠心した濃縮液を 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) で希釈し、PaaH 酵素溶液 (0.31 mg/mL) とした。酵素濃度は Quick Start Bradford プロテインアッセイ (BIO-RAD 社製) を用いて決定した。

[0083] (b) 酵素液の調製

下記に示した組成の前培養培地 5 mL に、スクシニル CoA およびアセチル CoA から 3-オキソアジピル CoA および CoA を生じる反応を触媒する酵素の活性が強化されていない *Serratia* 属微生物として、pBBR1MCS-2 が導入された表 11 に記載の *Serratia* 属微生物と、スクシニル CoA およびアセチル CoA から 3-オキソアジピル CoA および CoA を生じる反応を触媒する酵素の活性が強化された *Serratia* 属微生物として pBBR1MCS-2::CgpcA が導入された表 11 に記載の *Serratia* 属微生物を一白金耳植菌し、十分懸濁するまで 30°C で振とう培養した。その培養液に 10 mL の 0.9% 塩化ナトリウムを加え、菌体を遠心分離したのち上清を完全に取り除くことで菌体を洗浄する操作を 3 回行ったのち、菌体を 1 mL の 0.9% 塩化ナトリウムに懸濁した。懸濁液 0.5 mL を以下に示した組成の本培養培地 5 mL に添加し、30°C で 3 時間振とう培養した。

[0084] 上記培養液 5 mL を遠心により集菌後、下記の Tris-HCl バッファー 1 mL に懸濁した。上記菌体懸濁液にガラスビーズ ( $\phi$  0.1 mm) を加え、Micro Smash (TOMY 社製) を用い 4°C で菌体を破碎した。上記のようにして菌体を破碎した後、遠心して得られる上清の無細胞抽出液 (CFE) を酵素液として以下の実験に用いた。

[0085] (c) スクシニル CoA およびアセチル CoA から 3-オキソアジピル Co

○AおよびC○Aを生じる反応を触媒する酵素の活性測定

(b) で得られたCFE中のタンパク質濃度を、Quick Start Bradfordプロテインアッセイ (BIO-RAD社製) により測定した。次に、以下に示す組成の酵素反応溶液A 25  $\mu$ LおよびCFE 50  $\mu$ Lを混合し、インキュベートした (30°C、2 min)。その後、酵素反応溶液B 25  $\mu$ Lを入れた状態で予め30°Cでプレインキュベートした石英セルに酵素反応溶液AとCFEを含む上記の溶液を全量添加し、すばやく混合し活性測定を開始した (30°C)。340 nmにおける吸光度の減少を分光光度計 (Ultrospec 3300 Pro GEヘルスケア社製) で測定し、得られた $\Delta 340$ の値を式 (1) にあてはめ、それぞれ比活性を算出した。算出結果を表11に示す。

[0086] これらの結果から、スクシニルC○AおよびアセチルC○Aから3-オキソアジピルC○AおよびC○Aを生じる反応を触媒する酵素を導入した *Serratia* 属微生物株では、非導入株に比べて当該比活性が向上することがわかった。

[0087] 前培養培地：

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  
pH 7。

[0088] 本培養培地：

コハク酸 10 g/L  
グルコース 10 g/L  
硫酸アンモニウム 1 g/L  
リン酸カリウム 50 mM  
硫酸マグネシウム 0.025 g/L  
硫酸鉄 0.0625 mg/L  
硫酸マンガン 2.7 mg/L

塩化カルシウム 0.33 mg/L  
塩化ナトリウム 1.25 g/L  
Bactoトリプトン 2.5 g/L  
酵母エキス 1.25 g/L  
pH 6.5。

[0089] Tris-HClバッファー:

Tris-HCl (pH 8.0) 100 mM  
dithiothreitol 1 mM。

[0090] 酵素反応溶液 A:

Tris-HCl (pH 8.0) 200 mM  
MgCl<sub>2</sub> 40 mM  
NADH 0.8 mM  
DTT 2 mM  
PaaH 4.4 μg。

[0091] 酵素反応溶液 B:

アセチルCoA 2 mM  
スクシニルCoA 0.4 mM

[0092]

[表11]

供試微生物	比活性 (Unit/mg)	
	pBBR1MCS-2	pBBR1MCS-2 : CgppcaF
<i>Serratia grimesii</i> NBRC13537	0.0059	0.019
<i>Serratia ficaria</i> NBRC102596	0.0082	0.017
<i>Serratia fonticola</i> NBRC102597	0.0049	0.015
<i>Serratia odorifera</i> NBRC102598	0.0043	0.0072
<i>Serratia plymuthica</i> NBRC102599	0.013	0.018
<i>Serratia entomophila</i> DSM12358	0.0070	0.016
<i>Serratia nematodiphila</i> DSM21420	0.0092	0.015

[0093] (実施例14) 遺伝子組換えによりスクシニルCoAおよびアセチルCoAから3-オキソアジピルCoAおよびCoAを生じる反応を触媒する酵素を発現させた*Serratia*属微生物を用いた3-ヒドロキシアジピン酸生産試験

表12に示した、*Serratia*属微生物および、実施例12で作成し

た遺伝子組換えによりスクシニルC○AおよびアセチルC○Aから3-オキソアジピルC○AおよびC○Aを生じる反応を触媒する酵素を導入した*Serratia*属微生物の3-ヒドロキシアジピン酸の生産能を調べた。トリプトン10g/L、酵母エキス5g/L、塩化ナトリウム5g/L、カナマイシン25μg/mLを含み、pH7に調整した培地5mLに、それぞれの*Serratia*属微生物を一白金耳植菌し、十分懸濁するまで30℃で振とう培養した（前培養）。その培養液0.25mLを以下に示した組成の培地5mLに添加し、30℃で24時間振とう培養し、本培養を行った。

コハク酸10g/L

グルコース10g/L

硫酸アンモニウム1g/L

リン酸カリウム50mM

硫酸マグネシウム0.025g/L

硫酸鉄0.0625mg/L

硫酸マンガン2.7mg/L

塩化カルシウム0.33mg/L

塩化ナトリウム1.25g/L

Bactoトリプトン2.5g/L

酵母エキス1.25g/L

カナマイシン25μg/mL

pH6.5。

[0094] 本培養液より菌体を遠心分離した上清を、実施例1と同様にLC-MS/MSにて分析した。培養上清中に蓄積した3-ヒドロキシアジピン酸の定量分析を行った結果をそれぞれ表12に示す。

[0095] これらの結果から、スクシニルC○AおよびアセチルC○Aから3-オキソアジピルC○AおよびC○Aを生じる反応を触媒する酵素の導入株では非導入株と比べて3-ヒドロキシアジピン酸の蓄積濃度が向上することがわかった。したがって、本実施例と実施例12の結果よりスクシニルC○Aおよ

びアセチルC○Aから3-オキソアジピルC○AおよびC○Aを生じる反応を触媒する酵素活性の強化により3-ヒドロキシアジピン酸を効率よく製造することができることがわかった。

[0096]

[表12]

供試微生物	3-ヒドロキシアジピン酸生産量 (mg/L)		
	pBBR1MC S-2	pBBR1MCS-2 : : SppcaF	pBBR1MCS-2 : : CgpcaF
<i>Serratia grimesii</i> NBRC13537	2.7	28.5	41.9
<i>Serratia ficaria</i> NBRC102596	3.4	14.2	34.6
<i>Serratia fonticola</i> NBRC102597	1.3	17.6	24.0
<i>Serratia odorifera</i> NBRC102598	2.1	10.8	11.9
<i>Serratia plymuthica</i> NBRC102599	1.9	9.8	15.1
<i>Serratia entomophila</i> DSM12358	1.5	33.5	37.1
<i>Serratia nematodiphila</i> DSM21420	1.4	27.7	29.4

【表12】

[0097] (実施例15) *S. plymuthica* NBRC102599由来PcaFの酵素活性の確認

実施例10でクローニングした配列番号4の遺伝子配列がコードするPcaFが、スクシニルCoAおよびアセチルCoAから3-オキソアジピルCoAおよびCoAを生じる反応を触媒する活性を有していることを確認した。

(a) *S. plymuthica*由来PcaFの過剰発現および精製

pRSF-1bをSacIで切断し、pRSF-1b/SacIを得た。*S. plymuthica* NBRC102599のゲノムを鋳型としてpcaF遺伝子のORF(配列番号4)をPCR増幅するためのプライマーを設計し(配列番号11, 12)、常法に従ってPCR反応を行った。得られた断片およびpRSF-1b/SacIを、In-Fusion HD Cloning Kitを用いて連結し、常法により塩基配列を確認したプラスミドをpRSF-1b:SppcaFとした。大腸菌BL21(DE3)にpRSF-1b:SppcaFを導入し、得られた形質転換体をカナマイシン25 $\mu$ g/mLを含むLBで好氣的に培養し(37 $^{\circ}$ C)、OD600が0.3付近の時点でイソプロピルチオガラクトシドを終濃度が1mMとなるよう添加し、pcaFの発現を誘導した(好氣的、37 $^{\circ}$ C、一晚)。遠心分離後の菌体を20mM Tris-HCl(pH8.0)で懸濁し、氷冷しながら超音波ホモジナイザーで細胞を破碎したのち、遠心分離した上清を無細胞抽出液として回収した。得られた無細胞抽出液をHis Bind Resin(Merck社製)を用いて精製し、Amicon Ultra 3K(Merck社製)で遠心した濃縮液を20mM Tris-HCl(pH8.0)で希釈し、PcaF酵素溶液(0.52mg/mL)とした。酵素濃度はQuick Start Bradfordプロテインアッセイ(BIO-RAD社製)を用いて決定した。

[0098] (b) スクシニルCoAおよびアセチルCoAから3-オキソアジピルCoAおよびCoAを生じる反応を触媒する酵素の活性測定

P c a F 酵素溶液を酵素液として、実施例 1 3 と同様の手順にて酵素活性測定を行った。測定の結果、比活性は 0. 1 7 0 U n i t / m g であり、精製された酵素は、スクシニル C o A およびアセチル C o A から 3 - オキソアジピル C o A および C o A を生じる反応を触媒する活性を有していることが確認できた。

### 産業上の利用可能性

[0099] 本発明によれば、S e r r a t i a 属微生物を利用して 3 - ヒドロキシアジピン酸を製造することができる。得られた 3 - ヒドロキシアジピン酸は各種ポリマー原料として利用することができる。

## 請求の範囲

- [請求項1] 3-ヒドロキシアジピン酸の生産能を有する *Serratia* 属微生物を培養する工程を含む、3-ヒドロキシアジピン酸の製造方法。
- [請求項2] 前記 *Serratia* 属微生物のスクシニルCoAおよびアセチルCoAから3-オキソアジピルCoAおよびCoAを生じる反応を触媒する酵素の活性が強化されていることを特徴とする、請求項1に記載の3-ヒドロキシアジピン酸の製造方法。
- [請求項3] 前記 *Serratia* 属微生物が、*Serratia grimesii*、*Serratia ficaria*、*Serratia fonticola*、*Serratia odorifera*、*Serratia plymuthica*、*Serratia entomophila* または *Serratia nematodiphila* である、請求項1または2に記載の3-ヒドロキシアジピン酸の製造方法。
- [請求項4] 前記 *Serratia* 属微生物を培養する培地が、糖類、コハク酸、2-オキソグルタル酸およびグリセロールからなる群から選択される少なくとも1種または2種以上の炭素源を含む、請求項1～3のいずれかに記載の3-ヒドロキシアジピン酸の製造方法。
- [請求項5] 前記 *Serratia* 属微生物を、フェルラ酸、p-クマル酸、安息香酸、cis, cis-ムコン酸、プロトカテク酸およびカテコールからなる群から選択される少なくとも1種類または2種類以上の誘導物質を含む培地で培養する、請求項1～4のいずれかに記載の3-ヒドロキシアジピン酸の製造方法。
- [請求項6] 3-ヒドロキシアジピン酸の生産能を有する *Serratia* 属微生物であって、スクシニルCoAおよびアセチルCoAから3-オキソアジピルCoAおよびCoAを生じる反応を触媒する酵素の活性が強化されていることを特徴とする、*Serratia* 属微生物。
- [請求項7] 前記 *Serratia* 属微生物が、*Serratia grime*

sii、*Serratia ficaria*、*Serratia fonticola*、*Serratia odorifera*、*Serratia plymuthica*、*Serratia entomophila*または*Serratia nematodiphila*である、請求項6に記載の*Serratia*属微生物。

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/JP2017/020018

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
C12P7/44(2006.01)i, C12N1/20(2006.01)i, C12N1/21(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)  
C12P7/44, C12N1/20, C12N1/21

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2017
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2017	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2017

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII),  
CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN), GenBank/EMBL/DDBJ/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 6-319590 A (Daicel Chemical Industries, Ltd.), 22 November 1994 (22.11.1994), example 7 & US 5672504 A example 7 & EP 611826 A2	1, 3-4
X	JP 8-140670 A (Daicel Chemical Industries, Ltd.), 04 June 1996 (04.06.1996), example 4 (Family: none)	1, 3-4

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

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 19 July 2017 (19.07.17)	Date of mailing of the international search report 01 August 2017 (01.08.17)
--	---

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/JP2017/020018

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 48-67491 A (Meiji Seika Kaisha, Ltd.), 14 September 1973 (14.09.1973), page 2, upper left column, line 19 to upper right column, line 4; example 1 (Family: none)	1, 3-5
X	JP 2004-215586 A (Daicel Chemical Industries, Ltd.), 05 August 2004 (05.08.2004), example 1 (Family: none)	1, 3
A	WO 2016/068108 A1 (Toray Industries, Inc.), 06 May 2016 (06.05.2016), entire text & CA 2966147 A & TW 201620874 A	1-7
A	JP 2011-512868 A (DSM IP Assets B.V.), 28 April 2011 (28.04.2011), entire text & US 2011/0091944 A1 & US 2014/0178949 A1 & US 2017/0073708 A & WO 2009/113853 A2 & EP 2252698 A2	1-7
A	WO 2014/043182 A2 (BIOAMBER INC.), 20 March 2014 (20.03.2014), entire text & US 2015/0225329 A1 & EP 2895613 A2	1-7
A	HARWOOD, C. S. and PARALES R. E., THE beta- KETOADIPATE PATHWAY AND THE BIOLOGY OF SELF- IDENTITY, Annu. Rev. Microbiol., 1996, Vol. 50, pp. 553-590, fig. 2, 3	1-7
P,A	WO 2016/199856 A1 (Toray Industries, Inc.), 15 December 2016 (15.12.2016), entire text (Family: none)	1-7
P,A	WO 2016/199858 A1 (Toray Industries, Inc.), 15 December 2016 (15.12.2016), entire text (Family: none)	1-7

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
 Int.Cl. C12P7/44(2006.01)i, C12N1/20(2006.01)i, C12N1/21(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. C12P7/44, C12N1/20, C12N1/21

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの  
 日本国実用新案公報 1922-1996年  
 日本国公開実用新案公報 1971-2017年  
 日本国実用新案登録公報 1996-2017年  
 日本国登録実用新案公報 1994-2017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/WPIDS (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	JP 6-319590 A (ダイセル化学工業株式会社) 1994. 11. 22, 実施例 7 & US 5672504 A, example 7 & EP 611826 A2	1, 3-4
X	JP 8-140670 A (ダイセル化学工業株式会社) 1996. 06. 04, 実施例 4 (ファミリーなし)	1, 3-4
X	JP 48-67491 A (明治製菓株式会社) 1973. 09. 14, 第 2 頁左上欄第 1 9 行-同頁右上欄第 4 行、実施例 1 (ファミリーなし)	1, 3-5

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

* 引用文献のカテゴリー	の日の後に公表された文献
「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	「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
「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	「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
「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)	「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
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」同一パテントファミリー文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	

国際調査を完了した日 19.07.2017	国際調査報告の発送日 01.08.2017
--------------------------	--------------------------

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) 川合 理恵 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	4N	4046
--	--	----	------

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
X	JP 2004-215586 A (ダイセル化学工業株式会社) 2004. 08. 05, 実施例 1 (ファミリーなし)	1, 3
A	WO 2016/068108 A1 (東レ株式会社) 2016. 05. 06, 全文 & CA 2966147 A & TW 201620874 A	1-7
A	JP 2011-512868 A (ディーエスエム アイピー アセッツ ビー. ブイ. ) 2011. 04. 28, 全文 & US 2011/0091944 A1 & US 2014/0178949 A1 & US 2017/0073708 A & WO 2009/113853 A2 & EP 2252698 A2	1-7
A	WO 2014/043182 A2 (BIOAMBER INC.) 2014. 03. 20, 全文 & US 2015/0225329 A1 & EP 2895613 A2	1-7
A	HARWOOD, C. S. and PARALES R. E., THE beta-KETOADIPATE PATHWAY AND THE BIOLOGY OF SELF-IDENTITY, Annu. Rev. Microbiol., 1996, Vol. 50, pp. 553-590, 図 2、図 3 等	1-7
P, A	WO 2016/199856 A1 (東レ株式会社) 2016. 12. 15, 全文 (ファミリーなし)	1-7
P, A	WO 2016/199858 A1 (東レ株式会社) 2016. 12. 15, 全文 (ファミリーなし)	1-7