(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
2020年3月19日(19.03.2020)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2020/054598 A1

(51) 国際特許分類:
C12P 13/00 (2006.01)　*C12N 15/09* (2006.01)

(21) 国際出願番号：　PCT/JP2019/035142

(22) 国際出願日：　2019年9月6日(06.09.2019)

(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 2018-171849　2018年9月13日(13.09.2018)　JP

(71) 出願人: 花王株式会社(**KAO CORPORATION**) [JP/JP]; 〒1038210 東京都中央区日本橋茅場町一丁目１４番１０号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 野中　鏡士朗 (**NONAKA, Kyoshiro**); 〒6408580 和歌山県和歌山市湊１３３４ 花王株式会社研究所内 Wakayama (JP). 高橋　史員 (**TAKAHASHI, Fumikazu**); 〒6408580 和歌山県和歌山市湊１３３４ 花王株式会社研究所内 Wakayama (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人アルガ特許事務所(**THE PATENT CORPORATE BODY ARUGA PATENT OFFICE**); 〒1030013 東京都中央区日本橋人形町１丁目３番８号 沢の鶴人形町ビル Tokyo (JP).

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

(54) **Title:** METHOD FOR PRODUCING 3-HYDROXY-4-AMINOBENZOIC ACID COMPOUND

(54) 発明の名称：　３－ヒドロキシ－４－アミノ安息香酸類の製造方法

(57) **Abstract:** Provided is a method for producing a 3-hydroxy-4-aminobenzoic acid compound using a microorganism. A method for producing a 3-hydroxy-4-aminobenzoic acid compound, comprising the step of bringing a 4-aminobenzoic acid compound into contact with a microorganism capable of producing a polypeptide (A) or (B): (A) a polypeptide which comprises the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 2, or a polypeptide which comprises an amino acid sequence having at least 90% or higher identity to the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 2 and has a 4-hydroxybenzoate hydroxylase activity; and (B) a polypeptide which comprises the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 6, or a polypeptide which comprises an amino acid sequence having at least 90% or higher identity to the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 2 and has a 4-hydroxybenzoate hydroxylase activity.

(57) 要約：微生物を用いた３－ヒドロキシ－４－アミノ安息香酸類の製造方法を提供する。４－アミノ安息香酸類を、下記の（Ａ）又は（Ｂ）のポリペプチドを産生する微生物と接触させる工程を含む、３－ヒドロキシ－４－アミノ安息香酸類の製造方法。（Ａ）配列番号２で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、又は配列番号２で示されるアミノ酸配列と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つ４－ヒドロキシ安息香酸水酸化酵素活性を有するポリペプチド （Ｂ）配列番号６で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、又は配列番号２で示されるアミノ酸配列と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つ４－ヒドロキシ安息香酸水酸化酵素活性を有するポリペプチド

WO 2020/054598 A1

［続葉有］

添付公開書類：

一　国際調査報告（条約第21条(3)）

一　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)）

明　細　書

発明の名称 ： ３－ヒドロキシ－４－アミノ安息香酸類の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は微生物を用いた３－ヒドロキシ－４－アミノ安息香酸類の製造方法に関する。

背景技術

[0002] ポリベンズオキサゾール（ＰＢＯ）は耐熱性や力学強度に優れたエンジニアリングプラスチックとして知られており、繊維材料及び半導体素子の絶縁膜等に利用される（非特許文献１）。

[0003] ベンズオキサゾール骨格はｏ－アミノフェノール骨格とカルボン酸との縮合により生成される。そのため、これらの官能基を分子内に有する３－ヒドロキシ－４－アミノ安息香酸（ＨＡＢＡ）類はＰＢＯモノマーとして有用であると期待される。実際に、ＨＡＢＡを用いたポリベンズオキサゾールの合成と物性評価が検討されている（非特許文献２）。

[0004] 近年、地球環境負荷軽減等に向けて再生可能資源を原料とした微生物発酵による化合物の製造方法が注目されている。例えば、ＨＡＢＡと類似した構造を有する３－アミノ－４－ヒドロキシ安息香酸（ＡＨＢＡ）の微生物による生産とポリマー化の検討が行われている（特許文献１）。

[0005] ＨＡＢＡの製造に関してはこれまで化学的にニトロ芳香族を還元し合成する方法等が知られている(特許文献２)。微生物法によるＨＡＢＡ発酵生産を可能にする方策としては、微生物内での生合成が可能な４－アミノ安息香酸（ＡＢＡ）の３位を水酸化することが考えられるが、このような反応に関しては、一部の４－ヒドロキシ安息香酸水酸化酵素がわずかに活性を有することが報告されているのみであった（非特許文献３，４）。

[0006] 〔特許文献１〕特許第５４４５４５３号公報

〔特許文献２〕特許第３８２１３５０号公報

〔非特許文献１〕村瀬浩貴,SENI GAKKAISHI（繊維と工業）, Vol.66, No

.6 (2010)

〔非特許文献２〕Lon J. Mathias et al., Macromolecules, Vol.18, No.4, pp.616-622 (1985)

〔非特許文献３〕Barrie Entsch et al., The Journal of Biological Chemistry, Vol.262, No.13, pp.6060-6068 (1987)

〔非特許文献４〕Domenico L. Gatti et al., Biochemistry, Vol.35, No.2, pp.567-578 (1996)

発明の概要

[0007] 本発明は以下に係るものである。

４－アミノ安息香酸類を、下記の（Ａ）又は（Ｂ）のポリペプチドを産生する微生物と接触させる工程を含む、３－ヒドロキシ－４－アミノ安息香酸類の製造方法。

（Ａ）配列番号２で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、又は配列番号２で示されるアミノ酸配列と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つ４－ヒドロキシ安息香酸水酸化酵素活性を有するポリペプチド

（Ｂ）配列番号６で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、又は配列番号２で示されるアミノ酸配列と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つ４－ヒドロキシ安息香酸水酸化酵素活性を有するポリペプチド

発明の詳細な説明

[0008] 本発明は、微生物を用いた３－ヒドロキシ－４－アミノ安息香酸類の製造方法を提供することに関する。

[0009] 本発明者らは、特定の４－ヒドロキシ安息香酸水酸化酵素を産生する微生物を用いることにより、４－アミノ安息香酸（ＡＢＡ）類の３位を効率よく水酸化できることを見出した。

[0010] 本発明によれば、３－ヒドロキシ－４－アミノ安息香酸類を効率よく製造することができる。

[0011] （１）定義

本明細書において、アミノ酸配列又はヌクレオチド配列の同一性は、Ｌｉｐｍａｎ－Ｐｅａｒｓｏｎ法（Ｓｃｉｅｎｃｅ，１９８５，２２７：１４３５－１４４１）によって計算される。具体的には、遺伝情報処理ソフトウェアＧＥＮＥＴＹＸ　Ｖｅｒ．１２のホモロジー解析（Ｓｅａｒｃｈ　ｈｏｍｏｌｏｇｙ）プログラムを用いて、Ｕｎｉｔ　ｓｉｚｅ　ｔｏ　ｃｏｍｐａｒｅ（ｋｔｕｐ）を２として解析を行うことにより算出される。

[0012] 本明細書において、アミノ酸配列又はヌクレオチド配列に関する「少なくとも９０％の同一性」とは、９０％以上、好ましくは９５％以上、より好ましくは９６％以上、さらに好ましくは９７％以上、さらにより好ましくは９８％以上、なお好ましくは９９％以上の同一性をいう。

[0013] 本明細書における「１又は複数個のアミノ酸が欠失、置換、付加、又は挿入されたアミノ酸配列」とは、１個以上１０個以下、好ましくは１個以上８個以下、より好ましくは１個以上５個以下、さらに好ましくは１個以上３個以下のアミノ酸が欠失、置換、付加、又は挿入されたアミノ酸配列をいう。また本明細書における「１又は複数個のヌクレオチドが欠失、置換、付加、又は挿入されたヌクレオチド配列」とは、１個以上３０個以下、好ましくは１個以上２４個以下、より好ましくは１個以上１５個以下、さらにより好ましくは１個以上９個以下のヌクレオチドが欠失、置換、付加、又は挿入されたヌクレオチド配列をいう。本明細書において、アミノ酸又はヌクレオチドの「付加」には、配列の一末端及び両末端へのアミノ酸又はヌクレオチドの付加が含まれる。

[0014] 本明細書において、制御領域と遺伝子との「作動可能な連結」とは、遺伝子と制御領域とが、該遺伝子が該制御領域の制御の下で発現し得るように連結されていることをいう。遺伝子と制御領域との「作動可能な連結」の手順は当業者に周知である。

[0015] 本明細書において、細胞の機能や性状、形質に対して使用する用語「本来」とは、当該機能や性状、形質が当該細胞の野生型に存在していることを表

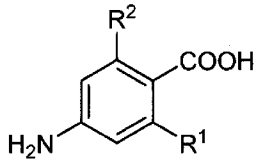
すために使用される。対照的に、用語「外来」とは、当該細胞に元から存在するのではなく、外部から導入された機能や性状、形質を表すために使用される。例えば、「外来」遺伝子又はポリヌクレオチドとは、細胞に外部から導入された遺伝子又はポリヌクレオチドである。外来遺伝子又はポリヌクレオチドは、それが導入された細胞と同種の生物由来であっても、異種の生物由来（すなわち異種遺伝子又はポリヌクレオチド）であってもよい。

[0016] （２）３－ヒドロキシ－４－アミノ安息香酸類の製造

本発明の方法は、微生物を用いて、４－アミノ安息香酸類から３－ヒドロキシ－４－アミノ安息香酸類を製造する方法である。

[0017] ４－アミノ安息香酸類としては、具体的には下記の一般式（１）：

[0018] [化1]

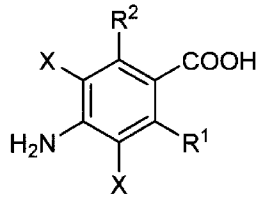


（１）

[0019] 〔式中、R^1は水素原子、ヒドロキシ基(-OH)、メトキシ基($-OCH_3$)、アミノ基($-NH_2$)、フッ素原子(-F)、塩素原子(-Cl)、臭素原子(-Br)、ヨウ素原子(-I)、カルボキシ基(-COOH)、メチル基($-CH_3$)、エチル基($-CH_2CH_3$)を示し、R^2は水素原子、ヒドロキシ基(-OH)、メトキシ基($-OCH_3$)、アミノ基($-NH_2$)、フッ素原子(-F)、塩素原子(-Cl)、臭素原子(-Br)、ヨウ素原子(-I)、カルボキシ基(-COOH)、メチル基($-CH_3$)又はエチル基($-CH_2CH_3$)を示す。〕

で示される４－アミノ安息香酸誘導体が挙げられ、３－ヒドロキシ－４－アミノ安息香酸類としては、下記の一般式（２）：

[0020] [化2]



（２）

[0021] 〔式中、R^1及びR^2は前記と同じものを示し、Ｘは、一方が水素原子で他方

がヒドロキシ基を示す。〕

で示される３－ヒドロキシ－４－アミノ安息香酸誘導体が挙げられる。

[0022] Ｒ[1]で示される官能基としては、水素原子、ヒドロキシ基(-OH)、メトキシ基(-OCH_3)、フッ素原子(-F)又はメチル基(-CH_3)が好ましい。

[0023] Ｒ[2]で示される官能基としては、水素原子、ヒドロキシ基(-OH)、メトキシ基(-OCH_3)、フッ素原子(-F)又はメチル基(-CH_3)が好ましい。

[0024] Ｒ[1]及びＲ[2]は、共に水素原子であるのがより好ましい。

[0025] 本発明において用いられる微生物は、下記の（Ａ）又は（Ｂ）のポリペプチド（以下、「本発明のポリペプチド」とも称する）を産生する微生物である。

（Ａ）配列番号２で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、又は配列番号２で示されるアミノ酸配列と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つ４－ヒドロキシ安息香酸水酸化酵素活性を有するポリペプチド

（Ｂ）配列番号６で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、又は配列番号２で示されるアミノ酸配列と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つ４－ヒドロキシ安息香酸水酸化酵素活性を有するポリペプチド

[0026] ここで、配列番号２で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド（「ＨＦＭ１２２」とも称する）、配列番号６で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド（「ＨＦＭ６８９」とも称する）は、４－ヒドロキシ安息香酸－３－モノオキシゲナーゼ（ＥＣ１．１４．１３．２）として知られている。

配列番号２又は６で示されるアミノ酸配列と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列の例としては、配列番号２又は６で示されるアミノ酸配列に対して１又は複数個のアミノ酸が欠失、置換、付加、又は挿入されたアミノ酸配列が挙げられる。

[0027] 「４－ヒドロキシ安息香酸水酸化酵素活性」とは、４－ヒドロキシ安息香酸水酸化酵素が示す触媒活性を意味し、４－ヒドロキシ安息香酸水酸化酵素

とは４－ヒドロキシ安息香酸の水酸化を触媒する酵素、好ましくは４－ヒドロキシ安息香酸の３位を水酸化して、プロトカテク酸を生成する反応とその逆反応のいずれかまたは両方を促進する触媒活性を有する４－ヒドロキシ安息香酸－３－モノオキシゲナーゼを意味する。

４－ヒドロキシ安息香酸水酸化酵素活性は、たとえば公知の方法（Ｙａｎ Ｈｕａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ａｐｐｌ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．，７８，７５-８３（２００８）．）等により決定することができる。

[0028] アミノ酸配列に対してアミノ酸の欠失、置換、付加、又は挿入等の変異を導入する方法としては、例えば、該アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列に対してヌクレオチドの欠失、置換、付加、又は挿入等の変異を導入する方法が挙げられる。ヌクレオチド配列への変異導入の手法としては、例えば、エチルメタンスルホネート、Ｎ－メチル－Ｎ－ニトロソグアニジン、亜硝酸等の化学的変異原又は紫外線、Ｘ線、ガンマ線、イオンビーム等の物理的変異原による突然変異誘発、部位特異的変異導入法、Ｄｉｅｆｆｅｎｂａｃｈら（Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂａｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，５８１－６２１，１９９５）に記載の方法、等が挙げられる。部位特異的変異導入の手法としては、Ｓｐｌｉｃｉｎｇ ｏｖｅｒｌａｐ ｅｘｔｅｎｓｉｏｎ（ＳＯＥ）ＰＣＲ（Ｈｏｒｔｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ ７７，６１－６８，１９８９）を利用した方法、ＯＤＡ法（Ｈａｓｈｉｍｏｔｏ－Ｇｏｔｏｈ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ，１５２，２７１－２７６，１９９５）、Ｋｕｎｋｅｌ法（Ｋｕｎｋｅｌ，Ｔ．Ａ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，１９８５，８２，４８８）等が挙げられる。あるいは、Ｓｉｔｅ－Ｄｉｒｅｃｔｅｄ Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ Ｓｙｓｔｅｍ Ｍｕｔａｎ－ＳｕｐｅｒＥｘｐｒｅｓｓ Ｋｍキット（タカラバイオ社）、Ｔｒａｎｓｆｏｒｍｅｒ™ Ｓｉｔｅ－Ｄｉｒｅｃｔｅｄ Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓキット（Ｃｌｏｎｅｔｅｃｈ社）、ＫＯＤ－Ｐｌｕｓ－Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ Ｋｉｔ（東洋紡社）等の

市販の部位特異的変異導入用キットを利用することもできる。

[0029] 本発明の「ポリペプチドを産生する微生物」において、そのポリペプチドは外来のものに限られず、当該微生物が本来有しているものも含むが、当該ポリペプチドの発現に必要なポリヌクレオチドを発現可能な状態で含むものであればよく、好ましくは、当該ポリヌクレオチドが発現可能なように導入された微生物、当該ポリヌクレオチドの発現が強化された微生物、すなわち遺伝子組換え微生物である。

ここで、ポリヌクレオチドとしては、下記の（ａ）又は（ｂ）のポリヌクレオチド（以下、「本発明のポリヌクレオチド」とも称する）が挙げられる。

（ａ）配列番号１で示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、又は配列番号１で示されるヌクレオチド配列と少なくとも９０％の同一性を有するヌクレオチド配列からなり、４－ヒドロキシ安息香酸水酸化酵素活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

（ｂ）配列番号５で示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、又は配列番号５で示されるヌクレオチド配列と少なくとも９０％の同一性を有するヌクレオチド配列からなり、４－ヒドロキシ安息香酸水酸化酵素活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

[0030] 配列番号１又は５で示されるヌクレオチド配列と少なくとも９０％の同一性を有するヌクレオチド配列の例としては、配列番号１又は５で示されるヌクレオチド配列に対して１又は複数個のヌクレオチドが欠失、置換、付加、又は挿入されたヌクレオチド配列が挙げられる。ヌクレオチド配列にヌクレオチドの欠失、置換、付加、又は挿入等の変異を導入する方法は、上述したとおりである。上記ポリヌクレオチドは、１本鎖若しくは２本鎖の形態であり得、又はＤＮＡであってもＲＮＡであってもよい。該ＤＮＡは、ｃＤＮＡ、化学合成ＤＮＡ等の人工ＤＮＡであり得る。

[0031] 上記ポリヌクレオチドは、ベクターに組み込まれていてもよい。好ましくは、本発明のポリヌクレオチドを含有するベクターは、発現ベクターである

。また好ましくは、該ベクターは、本発明のポリヌクレオチドを宿主微生物に導入することができ、かつ宿主微生物内で該ポリヌクレオチドを発現することができる発現ベクターである。好ましくは、該ベクターは、本発明のポリヌクレオチド、及びこれと作動可能に連結された制御領域を含む。該ベクターは、プラスミド等の染色体外で自立増殖及び複製可能なベクターであってもよく、又は染色体内に組み込まれるベクターであってもよい。

[0032] 具体的なベクターの例としては、例えば、ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ ＩＩ ＳＫ（－）（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）、ｐＵＣ１８／１９、ｐＵＣ１１８／１１９等のｐＵＣ系ベクター（タカラバイオ）、ｐＥＴ系ベクター（タカラバイオ）、ｐＧＥＸ系ベクター（ＧＥヘルスケア）、ｐＣｏｌｄ系ベクター（タカラバイオ）、ｐＨＹ３００ＰＬＫ（タカラバイオ）、ｐＵＢ１１０（Ｍｃｋｅｎｚｉｅ，Ｔ．ｅｔ ａｌ．，１９８６，Ｐｌａｓｍｉｄ １５（２）：９３－１０３）、ｐＢＲ３２２（タカラバイオ）、ｐＲＳ４０３（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）、ｐＭＷ２１８／２１９（ニッポンジーン）、ｐＲＩ９０９／９１０等のｐＲＩ系ベクター（タカラバイオ）、ｐＢＩ系ベクター（クロンテック）、ＩＮ３系ベクター（インプランタイノベーションズ）、ｐＰＴＲ１／２（タカラバイオ）、ｐＤＪＢ２（Ｄ．Ｊ．Ｂａｌｌａｎｃｅ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ，３６，３２１－３３１，１９８５）、ｐＡＢ４－１（ｖａｎ Ｈａｒｔｉｎｇｓｖｅｌｄｔ Ｗ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｇｅｎ Ｇｅｎｅｔ，２０６，７１－７５，１９８７）、ｐＬｅｕ４（Ｍ．Ｉ．Ｇ．Ｒｏｎｃｅｒｏ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ，８４，３３５－３４３，１９８９）、ｐＰｙｒ２２５（Ｃ．Ｄ．Ｓｋｏｒｙ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ Ｇｅｎｅｔ Ｇｅｎｏｍｉｃｓ，２６８，３９７－４０６，２００２）、ｐＦＧ１（Ｇｒｕｂｅｒ，Ｆ．ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒ Ｇｅｎｅｔ，１８，４４７－４５１，１９９０）等が挙げられる。

[0033] また、上記ポリヌクレオチドは、これを含むＤＮＡ断片として構築されていてもよい。該ＤＮＡ断片としては、例えば、ＰＣＲ増幅ＤＮＡ断片及び制限酵素切断ＤＮＡ断片が挙げられる。好ましくは、該ＤＮＡ断片は、本発明

のポリヌクレオチド、及びこれと作動可能に連結された制御領域を含む発現カセットであり得る。

[0034] 上記ベクター又はＤＮＡ断片に含まれる制御領域は、該ベクター又はＤＮＡ断片が導入された宿主細胞内で本発明のポリヌクレオチドを発現させるための配列であり、例えばプロモーターやターミネーター等の発現調節領域、複製開始点等が挙げられる。該制御領域の種類は、ベクター又はＤＮＡ断片を導入する宿主微生物の種類に応じて適宜選択することができる。必要に応じて、該ベクター又はＤＮＡ断片はさらに、抗生物質耐性遺伝子、アミノ酸合成関連遺伝子等の選択マーカーを有していてもよい。

[0035] 宿主細胞に対して本発明のポリヌクレオチドを発現可能なように導入する、又は本発明のポリヌクレオチドの発現を強化する手段としては、例えば、制御領域、好ましくは強制御領域（野生型に比較し発現を強化できる制御領域）と作動可能に連結された本発明のポリヌクレオチドを含有するベクター又はＤＮＡ断片を宿主微生物に導入すること、或いは宿主微生物のゲノム上で、強制御領域と本発明のポリヌクレオチドとを作動可能に連結して配置すること（例えば、親細胞のゲノム上の本発明のポリヌクレオチドの制御領域配列を強制御領域に置換すること）、等が挙げられる。

[0036] 宿主細胞としては、真菌、酵母、放線菌、大腸菌、枯草菌等、いずれを用いてもよいが、大腸菌、放線菌が好ましい。放線菌としては、コリネバクテリウム属菌、マイコバクテリウム属菌、ロドコッカス属菌、ストレプトマイセス属菌、プロピオニバクテリウム属菌等が挙げられ、好ましくはコリネバクテリウム属菌であり、より好ましくはコリネバクテリウム・グルタミカムである。

[0037] 上記微生物へのベクター又はＤＮＡ断片の導入には、一般的な形質転換法、例えばエレクトロポレーション法、トランスフォーメーション法、トランスフェクション法、接合法、プロトプラスト法、パーティクル・ガン法、アグロバクテリウム法等を用いることができる。

[0038] 目的のベクター又はＤＮＡ断片が導入された微生物は、選択マーカーを利

用して選択することができる。例えば、選択マーカーが抗生物質耐性遺伝子である場合、該抗生物質添加培地で培養することで、目的のベクター又はＤＮＡ断片が導入された微生物（形質転換体）を選択することができる。また例えば、選択マーカーがアミノ酸合成関連遺伝子である場合、該アミノ酸要求性の宿主微生物に遺伝子導入した後、該アミノ酸要求性の有無を指標に、目的のベクター又はＤＮＡ断片が導入された微生物を選択することができる。あるいは、ＰＣＲ等によって形質転換体のＤＮＡ配列を調べることで目的のベクター又はＤＮＡ断片の導入を確認することもできる。

[0039] また、強制御領域としては、公知の高発現プロモーターであるＴ７プロモーター、ｌａｃプロモーター、ｔａｃプロモーター、ｔｒｐプロモーター等が例示されるが、これらに特に限定されない。

[0040] 宿主微生物のゲノム上に存在する前記ポリヌクレオチドの制御領域を強制御領域に置換する方法としては、強制御領域と選択マーカーのポリヌクレオチド配列を含むＤＮＡ断片を宿主細胞に導入し、相同組換え又は非相同組換え等により形質転換された微生物を選択する方法等があげられる。

[0041] このようにして調製した本発明のポリペプチドを産生する微生物を培養し、３－ヒドロキシ－４－アミノ安息香酸類の生産性を評価し、適切な組換体を選択することにより、有用な３－ヒドロキシ－４－アミノ安息香酸類の生産株を得ることができる。生産物の測定方法は、後記参考例に記載の方法にしたがって行うことができる。

[0042] 本発明の３－ヒドロキシ－４－アミノ安息香酸類の製造方法は、４－アミノ安息香酸類を、上記のポリペプチドを産生する微生物と接触させることにより実施される。微生物と４－アミノ安息香酸類との接触条件は、用いる微生物に応じ、適宜設計することができる。

すなわち、本発明の微生物を培養する培地は、炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、当該微生物の培養を効率的に行うことができる培地であれば、天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。炭素源としては、例えば、グルコース等の糖類、グリセリン等のポリオール類、エタノール等のアルコー

ル類、またはピルビン酸、コハク酸もしくはクエン酸等の有機酸類を使用することができる。また、窒素源としては、例えば、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、カゼイン加水分解物、大豆粕アルカリ抽出物、メチルアミン等のアルキルアミン類、またはアンモニアもしくはその塩等を使用することができる。その他、リン酸塩、炭酸塩、硫酸塩、マグネシウム、カルシウム、カリウム、鉄、マンガン、亜鉛等の塩類、特定のアミノ酸、特定のビタミン、消泡剤等も必要に応じて使用してもよい。

[0043] 培養は、通常、１０℃～４０℃で、６時間～７２時間、好ましくは９時間～６０時間、より好ましくは１２時間～４８時間、必要に応じ撹拌又は振とうしながら行うことができる。また、培養中は必要に応じてアンピシリンやカナマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

[0044] 培養物（培養液、培養上清、培養菌体、菌体の破砕物等が包含される）と４－アミノ安息香酸類との接触方法は、特に制限されず、微生物の培養中に接触させてもよく、培養後に別途接触させても良い。また４－アミノ安息香酸類は、培養中に菌体内で生合成されたものであってもよく、外部から添加されたものであってもよい。接触条件は特に制限されないが、通常２０℃～５０℃で、５分～７２時間、好ましくは１時間～６０時間、より好ましくは１時間～２４時間、必要に応じ撹拌又は振とうしながら行うことができる。

培養物と４－アミノ安息香酸類との接触後、３－ヒドロキシ－４－アミノ安息香酸類が菌体内に生産される場合には、通常知られている方法、例えば、菌体を機械的方法、リゾチーム等を用いた酵素的方法または界面活性剤等を用いた化学的処理によって破壊することにより３－ヒドロキシ－４－アミノ安息香酸類を抽出できる。また、３－ヒドロキシ－４－アミノ安息香酸類が菌体外に生産される場合には、培養液をそのまま使用するか、遠心分離等により菌体が除去される。

[0045] 培養物からの３－ヒドロキシ－４－アミノ安息香酸類の採取及び単離方法は特に制限されない。すなわち、周知のイオン交換樹脂法、沈澱法、晶析法、再結晶法、濃縮法その他の方法を組み合わせることにより実施できる。例

えば、菌体を遠心分離等で除去した後、カチオン及びアニオン交換樹脂でイオン性の物質を除き、濃縮すれば３－ヒドロキシ－４－アミノ安息香酸類を取得することができる。培養物中に蓄積された３－ヒドロキシ－４－アミノ安息香酸類は、そのまま単離することなく用いてもよい。

[0046] 上述した実施形態に関し、本発明においては更に以下の態様が開示される。

＜１＞４－アミノ安息香酸類を、下記の（Ａ）又は（Ｂ）のポリペプチドを産生する微生物と接触させる工程を含む、３－ヒドロキシ－４－アミノ安息香酸類の製造方法。

（Ａ）配列番号２で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、又は配列番号２で示されるアミノ酸配列と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つ４－ヒドロキシ安息香酸水酸化酵素活性を有するポリペプチド

（Ｂ）配列番号６で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、又は配列番号２で示されるアミノ酸配列と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つ４－ヒドロキシ安息香酸水酸化酵素活性を有するポリペプチド

＜２＞微生物が、下記の（ａ）又は（ｂ）のポリヌクレオチドを発現可能な状態で含む、＜１＞に記載の方法。

（ａ）配列番号１で示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、又は配列番号１で示されるヌクレオチド配列と少なくとも９０％の同一性を有するヌクレオチド配列からなり、４－ヒドロキシ安息香酸水酸化酵素活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

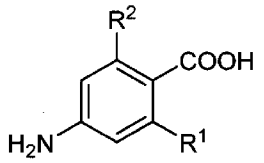
（ｂ）配列番号５で示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、又は配列番号５で示されるヌクレオチド配列と少なくとも９０％の同一性を有するヌクレオチド配列からなり、４－ヒドロキシ安息香酸水酸化酵素活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

＜３＞微生物が、大腸菌又はコリネバクテリウム属菌である＜１＞又は＜２

＞に記載の方法。

＜４＞４－アミノ安息香酸類が、下記の一般式（１）：

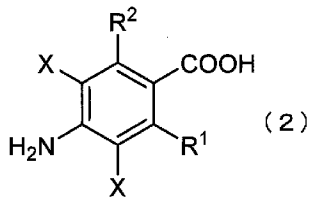
[0047] [化3]



（１）

[0048] 〔式中、Ｒ１は水素原子、ヒドロキシ基(-OH)、メトキシ基(-OCH_3)、アミノ基(-NH_2)、フッ素原子(-F)、塩素原子(-Cl)、臭素原子(-Br)、ヨウ素原子(-I)、カルボキシ基(-COOH)、メチル基(-CH_3)、エチル基(-CH_2CH_3)を示し、Ｒ２は水素原子、ヒドロキシ基(-OH)、メトキシ基(-OCH_3)、アミノ基(-NH_2)、フッ素原子(-F)、塩素原子(-Cl)、臭素原子(-Br)、ヨウ素原子(-I)、カルボキシ基(-COOH)、メチル基(-CH_3)、又はエチル基(-CH_2CH_3)を示す。〕で示される４－アミノ安息香酸誘導体であり、３－ヒドロキシ－４－アミノ安息香酸類が下記の一般式（２）：

[0049] [化4]



（２）

[0050] 〔式中、Ｒ１及びＲ２は前記と同じものを示し、Ｘは、一方が水素原子で他方がヒドロキシ基を示す。〕

で示される３－ヒドロキシ－４－アミノ安息香酸誘導体である＜１＞～＜３＞のいずれかに記載の方法。

＜５＞式（１）で示される４－アミノ安息香酸誘導体及び式（２）で示される３－ヒドロキシ－４－アミノ安息香酸誘導体において、Ｒ１が、好ましくは水素原子、ヒドロキシ基(-OH)、メトキシ基(-OCH_3)、フッ素原子(-F)又はメチル基(-CH_3)である＜４＞に記載の方法。

＜６＞式（１）で示される４－アミノ安息香酸誘導体及び式（２）で示され

る３－ヒドロキシ－４－アミノ安息香酸誘導体において、R^2が、好ましくは水素原子、ヒドロキシ基(-OH)、メトキシ基(-OCH_3)、フッ素原子(-F)、又はメチル基(-CH_3)である＜４＞又は＜５＞に記載の方法。

＜７＞式（１）で示される４－アミノ安息香酸誘導体及び式（２）で示される３－ヒドロキシ－４－アミノ安息香酸誘導体において、R^1及びR^2が、共に水素原子である＜４＞に記載の方法。

＜８＞４－アミノ安息香酸類と微生物の接触が、微生物の菌体破砕液と４－アミノ安息香酸類を２０℃～５０℃で、５分～７２時間、好ましくは１時間～６０時間、より好ましくは１時間～２４時間接触させる、＜１＞～＜７＞のいずれかに記載の方法。

実施例

[0051] 以下、実施例に基づき本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

実施例１　形質転換株の作製

本実施例で用いたＰＣＲプライマーを表１に示す。

[0052] [表1]

プライマー	配列（5'→3'）	配列番号
pET HFM122 F	GAAGGAGATATACATATGCGCACTCAGGTGGCTAT	7
pET HFM122 R	GTGGTGGTGGTGGTGTTATACGAGTGGCAGTCCTA	8
pET PHHYart_Pa F	GAAGGAGATATACATATGAAAACTCAGGTGGCTAT	9
pET PHHYart_Pa R	GTGGTGGTGGTGGTGTTACTCGATCTCCTCGTAAG	10
pET HFM689art F	GAAGGAGATATACATATGAAAACCCAGGTTGCCAT	11
pET HFM689art R	GTGGTGGTGGTGGTGTTAGACGGGCAGACCGACGT	12
pET21a vec R	ATGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAAC	13
pET21a vec F	CACCACCACCACCACCACTGAGATC	14
forCPCR pET21a F	CGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTG	15
forCPCR pET21a R	CCAAGGGGTTATGCTAGTTATTGCTCAG	16

[0053] ＜プラスミドベクターの作製＞

フラビンモノオキシゲナーゼの中から選択された３種の４－ヒドロキシ安息香酸水酸化酵素（ＨＦＭ１２２，ＨＦＭ３００及びＨＦＭ６８９）をコードする遺伝子（配列番号１，３，５）を含むプラスミドを人工遺伝子合成に

より作製し、これを鋳型としてプライマーｐＥＴ　ＨＦＭ１２２　Ｆ（配列番号７），ｐＥＴ　ＨＦＭ１２２　Ｒ（配列番号８），ｐＥＴ　ＰＨＨＹａｒｔ＿Ｐａ　Ｆ（配列番号９），ｐＥＴ　ＰＨＨＹａｒｔ＿Ｐａ　Ｒ（配列番号１０），ｐＥＴ　ＨＦＭ６８９ａｒｔ　Ｆ（配列番号１１），ｐＥＴ　ＨＦＭ６８９ａｒｔ　Ｒ（配列番号１２）を用いたＰＣＲにてインサート用ＤＮＡ断片を合成した。次に、プラスミドｐＥＴ２１ａを鋳型に、プライマーｐＥＴ２１ａ　ｖｅｃ　Ｒ（配列番号１３）及びｐＥＴ２１ａ　ｖｅｃ　Ｆ（配列番号１４）を用いたＰＣＲにてベクター用ＤＮＡ断片を増幅した。以上の断片をＩｎ－Ｆｕｓｉｏｎ　ＨＤ　Ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｋｉｔ（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）を用いてそれぞれ連結しプラスミドベクターｐＥＴ－ＨＦＭ１２２，ｐＥＴ－ＨＦＭ３００，ｐＥＴ－ＨＦＭ６８９を構築した。

[0054] ＜プラスミドベクターの増幅＞

上記で作製したプラスミドベクターｐＥＴ－ＨＦＭ１２２，ｐＥＴ－ＨＦＭ３００，ｐＥＴ－ＨＦＭ６８９を用いて、大腸菌ＤＨ５α株（ニッポンジーン）をコンピテントセル形質転換法により形質転換した。得られた形質転換細胞液をＬＢａｍｐ寒天培地（Ｂａｃｔｏ　Ｔｒｙｐｔｏｎ　１％、Ｙｅａｓｔ　Ｅｘｔｒａｃｔ　０．５％、ＮａＣｌ　１％，アンピシリンナトリウム５０μｇ／ｍＬ、寒天　１．５％）に塗布した後３７℃で一晩静置し、得られたコロニーに対しＳａｐｐｈｉｒｅ　Ａｍｐ（ＴＡＫＡＲＡ）及びプライマーｆｏｒＣＰＣＲ　ｐＥＴ２１ａ　Ｆ（配列番号１５）、ｆｏｒＣＰＣＲ　ｐＥＴ２１ａ　Ｒ（配列番号１６）を用いたＰＣＲ反応を行い、目的ＤＮＡ断片の導入が確認された菌株を形質転換株として選抜した。形質転換株をＬＢａｍｐ液体培地（Ｂａｃｔｏ　Ｔｒｙｐｔｏｎ　１％、Ｙｅａｓｔ　Ｅｘｔｒａｃｔ　０．５％、ＮａＣｌ　１％，アンピシリンナトリウム５０μｇ／ｍＬ）１ｍＬに接種し、３７℃で一晩培養した。この培養液よりハイピュアプラスミドアイソレーションキット（ロシュライフサイエンス）を用いて各プラスミドベクターの精製を行った。

[0055] ＜プラスミドベクターの宿主細胞への導入＞

上記で得られたプラスミドベクターｐＥＴ－ＨＦＭ１２２，ｐＥＴ－ＨＦＭ３００，ｐＥＴ－ＨＦＭ６８９を用いて、大腸菌ＢＬ２１（ＤＥ３）株（ニッポンジーン）をコンピテントセル形質転換法により形質転換した。得られた形質転換細胞液をＬＢａｍｐ寒天培地に塗布した後３７℃で一晩静置し、得られたコロニーを形質転換株（ＨＦＭ１２２株、ＨＦＭ３００株、ＨＦＭ６８９株）とした。

[0056] 実施例２　形質転換株を用いた３－ヒドロキシ－４－アミノ安息香酸の生産

＜形質転換株の培養＞

上記で得られたＨＦＭ１２２株、ＨＦＭ３００株、ＨＦＭ６８９株をそれぞれＬＢａｍｐ液体培地（Ｂａｃｔｏ　Ｔｒｙｐｔｏｎ　１％、Ｙｅａｓｔ　Ｅｘｔｒａｃｔ　０．５％、ＮａＣｌ　１％，アンピシリンナトリウム５０μｇ／ｍＬ）１ｍＬに接種し、３７℃で一晩培養した。得られた培養液１００μＬをＯｖｅｒｎｉｇｈｔ　Ｅｘｐｒｅｓｓ培地（Ｍｅｒｃｋ）１０ｍＬに接種し、３７℃で約２４時間培養した後、遠心分離により菌体を回収した。

[0057] ＜菌体破砕液の調製＞

上記で得られたＨＦＭ１２２株、ＨＦＭ３００株、ＨＦＭ６８９株の菌体をＢｕｇｂｕｓｔｅｒ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ　Ｒｅａｇｅｎｔ（Ｍｅｒｃｋ）１ｍＬを用いて懸濁し３０℃で２０分間振盪した後、遠心分離により不溶分を除去したものを菌体破砕液とした。

[0058] ＜３－ヒドロキシ－４－アミノ安息香酸の生産能＞

上記で得られたＨＦＭ１２２株、ＨＦＭ３００株、ＨＦＭ６８９株の菌体破砕液を８０μＬ添加した９６穴アッセイプレート（イワキ）に、１００ｍＭ　リン酸バッファー（ｐＨ７．０）８０μＬ，１００ｍＭ　ＮＡＤＰＨ　２０μＬ，２０ｍＭ　４－アミノ安息香酸　２０μＬを加え、１時間静置した後、後述する参考例１に記載の手順にて３－ヒドロキシ－４－アミノ安息香酸の定量を行った。

菌体破砕液の総タンパク量をバイオ・ラッドプロテインアッセイ（Ｂｉｏ

－ｒａｄ）を用いて定量し、下記式に従いＨＦＭ１２２株及びＨＦＭ６８９株における３－ヒドロキシ－４－アミノ安息香酸の生産能とその向上率を算出した。

[0059] ３－ヒドロキシ－４－アミノ安息香酸生産能＝（反応後の３－ヒドロキシ－４－アミノ安息香酸濃度/総タンパク量）

[0060] 生産能向上率（％）＝（ＨＦＭ１２２株及びＨＦＭ６８９株の３－ヒドロキシ－４－アミノ安息香酸生産能／ＨＦＭ３００株の３－ヒドロキシ－４－アミノ安息香酸生産能）×１００－１００

[0061] 結果を表２に示す。非特許文献３、４に示唆のあるＨＦＭ３００株と比較して、ＨＦＭ１２２株及びＨＦＭ６８９株では、それぞれ４６％及び１１４％の生産能の向上が観察された。

[0062] [表2]

株名	３－ヒドロキシ－４－アミノ安息香酸濃度(g/L)	生産能向上率 (%)
HFM122株	0.082	46
HFM300株	0.056	-
HFM689株	0.120	114

[0063] 参考例１ ３－ヒドロキシ－４－アミノ安息香酸の定量

反応後の３－ヒドロキシ－４－アミノ安息香酸の定量はＨＰＬＣにより行った。ＨＰＬＣ分析に供する反応液を０．１％リン酸にて適宜希釈した後、アクロプレップ９６フィルタープレート（０．２μｍＧＨＰ膜、日本ポール）を用いて不溶物の除去を行なった。

[0064] ＨＰＬＣの装置は、ＬａＣｈｒｏｍ Ｅｌｉｔｅ（日立ハイテクノロジーズ）を用いた。分析カラムには、Ｌ－カラム ＯＤＳ（４．６ｍｍ Ｉ．Ｄ．×５０ｃｍ、化学物質評価研究機構）を用い、溶離液Ａを０．１％リン酸、溶離液Ｂを７０％メタノールとし、流速１．０ｍＬ／分、カラム温度４０℃の条件にてグラジエント溶出を行なった。３－ヒドロキシ－４－アミノ安息香酸の検出には、ＵＶ検出器（検出波長２８０ｎｍ）を用いた。標準試料

〔３－ヒドロキシ－４－アミノ安息香酸（販売元コードＡ１１９４、東京化成工業）〕を用いて濃度検量線を作成し、濃度検量線に基づいて３－ヒドロキシ－４－アミノ安息香酸の定量を行なった。

請求の範囲

[請求項1] ４－アミノ安息香酸類を、下記の（Ａ）又は（Ｂ）のポリペプチドを産生する微生物と接触させる工程を含む、３－ヒドロキシ－４－アミノ安息香酸類の製造方法。

（Ａ）配列番号２で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、又は配列番号２で示されるアミノ酸配列と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つ４－ヒドロキシ安息香酸水酸化酵素活性を有するポリペプチド

（Ｂ）配列番号６で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、又は配列番号２で示されるアミノ酸配列と少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列からなり、且つ４－ヒドロキシ安息香酸水酸化酵素活性を有するポリペプチド

[請求項2] 微生物が、下記の（ａ）又は（ｂ）のポリヌクレオチドを発現可能な状態で含む、請求項１記載の方法。

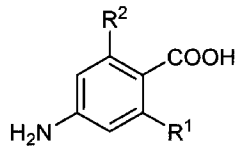
（ａ）配列番号１で示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、又は配列番号１で示されるヌクレオチド配列と少なくとも９０％の同一性を有するヌクレオチド配列からなり、４－ヒドロキシ安息香酸水酸化酵素活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

（ｂ）配列番号５で示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、又は配列番号５で示されるヌクレオチド配列と少なくとも９０％の同一性を有するヌクレオチド配列からなり、４－ヒドロキシ安息香酸水酸化酵素活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

[請求項3] 微生物が、大腸菌又はコリネバクテリウム属菌である請求項１又は２記載の方法。

[請求項4] ４－アミノ安息香酸類が、下記の一般式（１）：

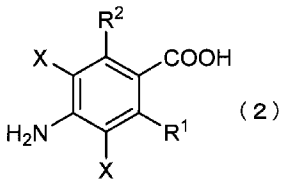
[化1]



（１）

〔式中、Ｒ１は水素原子、ヒドロキシ基、メトキシ基、アミノ基、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子、カルボキシ基、メチル基、エチル基を示し、Ｒ２は水素原子、ヒドロキシ基、メトキシ基、アミノ基、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子、カルボキシ基、メチル基、又はエチル基を示す。〕で示される４－アミノ安息香酸誘導体であり、３－ヒドロキシ－４－アミノ安息香酸類が下記の一般式（２）：

[化2]



（２）

〔式中、Ｒ１及びＲ２は前記と同じものを示し、Ｘは、一方が水素原子で他方がヒドロキシ基を示す。〕で示される３－ヒドロキシ－４－アミノ安息香酸誘導体である請求項１～３のいずれか１項記載の方法。

[請求項5] 式（１）で示される４－アミノ安息香酸誘導体及び式（２）で示される３－ヒドロキシ－４－アミノ安息香酸誘導体において、Ｒ１が水素原子、ヒドロキシ基、メトキシ基、フッ素原子又はメチル基である請求項４記載の方法。

[請求項6] 式（１）で示される４－アミノ安息香酸誘導体及び式（２）で示される３－ヒドロキシ－４－アミノ安息香酸誘導体において、Ｒ２が水素原子、ヒドロキシ基、メトキシ基、フッ素原子又はメチル基である請求項４又は５記載の方法。

[請求項7] 式（１）で示される４－アミノ安息香酸誘導体及び式（２）で示される３－ヒドロキシ－４－アミノ安息香酸誘導体において、R^1及びR^2が共に水素原子である請求項４記載の方法。

[請求項8] ４－アミノ安息香酸類と微生物の接触が、微生物の菌体破砕液と４－アミノ安息香酸類を２０℃～５０℃で５分～７２時間接触させる、請求項１～７のいずれか１項記載の方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2019/035142

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl. C12P13/00(2006.01)i, C12N15/09(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)
Int.Cl. C12P1/00-41/00

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

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2019
Registered utility model specifications of Japan	1996-2019
Published registered utility model applications of Japan	1994-2019

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPl us/JST7580 (JDreamIII)
CAplus/REGISTRY/DWPI/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN) UniProt/GeneSeq, 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.
Y	ENTSCH, Barrie et al., "para-Hydroxybenzoate hydroxylase containing 6-hydroxy-FAD is an effective enzyme with modified reaction mechanisms", The Journal of Biological Chemistry, 05 May 1987, vol. 262, no. 13, pp. 6060-6068, expermental procedures, table 1, fig. 3	1-8

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

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
06 November 2019 (06.11.2019)	19 November 2019 (19.11.2019)
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/JP2019/035142

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	OHTA, Yoshihiro et al., "Chain-growth condensation polymerization approach to synthesis of well-defined polybezoxazole: Importance of higher reactivity of 3-amino-4-hydroxybenzoic acid ester compared to 4-amino-3-hydroxybenzoic acid ester", Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry, 03 April 2014, vol. 52, pp. 1730-1736, Introduction	1-8
Y	JP 2001-316340 A (TOYOBO BOSEKI KABUSHIKI KAISHA) 13 November 2001, paragraphs [0002], [0003] & WO 2003/040085 A1	1-8
Y	MATHIAS, Lon J. et al., "Two-step synthesis of alky 1- and alkenylbenzoxazole polymers", Macromolecules, 1985, vol. 18, pp. 616-622, abstract	1-8
Y	p-hydroxybenzoate hydroxylase [Caulobacter vibrioides CB15], Database Genbank, Accession No. AAK24375. 1 [online], retrieval date 30 October 2019, internet:<URL:https://www.ncbi.n1m.nih.gov/protein/AAK24375.1>, 31 January 2014, entire text	1-8
Y	4-hydroxybenzoate 3-monooxygenase [Novosphingobium aromaticvorans DSM 12444], Database Genbank, Accession No. ABD26872. 1 [online], retrieval date 30 October 2019, internet:<URL:https://www.ncbi.n1m.nih.gov/protein/ABD26872.1>, 28 January 2014, entire text	1-8

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１９／０３５１４２

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12P13/00(2006.01)i, C12N15/09(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.　C12P1/00-41/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１９年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１９年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１９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)
CAplus/REGISTRY/DWPI/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)
UniProt/GeneSeq, 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
Y	ENTSCH, Barrie et al., para-Hydroxybenzoate hydroxylase containing 6-hydroxy-FAD is an effective enzyme with modified reaction mechanisms, The Journal of Biological Chemistry, 1987.05.05, Vol.262, No.13, p.6060-6068 Expermental Procedures, Table1, Figure3	1-8

☑　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
「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の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	国際調査報告の発送日
０６．１１．２０１９	１９．１１．２０１９

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
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）　４Ｂ　１１９４
鈴木　優志
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８

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	OHTA, Yoshihiro et al., Chain-growth condensation polymerization approach to synthesis of well-defined polybezoxazole: Importance of higher reactivity of 3-amino-4-hydroxybenzoic acid ester compared to 4-amino-3-hydroxybenzoic acid ester, Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry, 2014.04.03, Vol.52, p.1730-1736 Introduction	1-8
Y	JP 2001-316340 A (東洋紡績株式会社) 2001.11.13, 段落 0002,0003 & WO 2003/040085 A1	1-8
Y	MATHIAS, Lon J. et al., Two-step synthesis of alkyl- and alkenylbenzoxazole polymers, Macromolecules, 1985, Vol.18, p.616-622 Abstract	1-8
Y	p-hydroxybenzoate hydroxylase [Caulobacter vibrioides CB15], Database Genbank, Accession No. AAK24375.1 [online],検索日 2019 年 10 月 30 日,インターネット:<URL:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAK24375.1>, 2014.01.31 全文	1-8
Y	4-hydroxybenzoate 3-monooxygenase [Novosphingobium aromaticvorans DSM 12444], Database Genbank, Accession No. ABD26872.1 [online],検索日 2019 年 10 月 30 日,インターネット:<URL:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/ABD26872.1>, 2014.01.28 全文	1-8