

(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
2012年4月19日(19.04.2012)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2012/050125 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01) *C12N 9/10* (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01) *C12P 17/10* (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2011/073416
- (22) 国際出願日: 2011年10月12日(12.10.2011)
- (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 2010-232003 2010年10月14日(14.10.2010) JP
 61/477,402 2011年4月20日(20.04.2011) US
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 味の素株式会社 (Ajinomoto Co., Inc.) [JP/JP]; 〒1048315 東京都中央区京橋一丁目15番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 高倉 康彰 (TAKAKURA, Yasuaki) [JP/JP]; 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). 荻野 博臣 (OGINO, Hiroomi) [JP/JP]; 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). 杉山 雅一 (SUGIYAMA, Masakazu) [JP/JP]; 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). 森 健一 (MORI, Kenichi) [JP/JP]; 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). 田渕 英莉 (TABUCHI, Eri) [JP/JP]; 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). 石川 弘紀 (ISHIKAWA, Koki) [JP/JP]; 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). 田上 宇乃 (TAGAMI, Uno) [JP/JP]; 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内 Kanagawa (JP).
- 内 Kanagawa (JP). 藤井 秀美 (FUJII, Hidemi) [JP/JP]; 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内 Kanagawa (JP).
- (74) 代理人: 酒井 宏明, 外(SAKAI, Hiroaki et al.); 〒1006020 東京都千代田区霞が関三丁目2番5号 霞が関ビルディング 酒井国際特許事務所 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, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, 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, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
 — 国際調査報告(条約第21条(3))
 — 規則13の2に基づいて明細書とは別に提出された、寄託された生物材料に関する表示(規則13の2.4(d)(i)及び48.2(a)(viii))
 — 明細書の別個の部分として表した配列リスト(規則5.2(a))

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING MONATIN

(54) 発明の名称: モナチンの製造方法

(57) Abstract: The present invention provides a methodology for improving the yield of 2R,4R-monatin. Specifically, the present invention provides: a method for producing 2S,4R-monatin or a salt thereof, which comprises a process wherein 2S,4R-monatin is produced by bringing 4R-IHOG into contact with an L-amino acid amino transferase in the presence of L-amino acid; a method for producing 2R,4R-monatin or a salt thereof, which comprises a process wherein 2R,4R-monatin is produced by isomerizing 2S,4R-monatin; and the like. These production methods may also comprise a process wherein 4R-IHOG is produced by condensing indole-3-pyruvic acid and pyruvic acid and a process wherein indole-3-pyruvic acid is produced by deaminating tryptophan.

(57) 要約: 本発明は、2R、4R-モナチンの収率を改善する方法論を提供することを提供する。具体的には、本発明は、L-アミノ酸の存在下において、4R-IHOGをL-アミノ酸アミノトランスフェラーゼに接触させて、2S、4R-モナチンを生成することを含む、2S、4R-モナチンまたはその塩の製造方法、ならびに2S、4R-モナチンを異性化させて、2R、4R-モナチンを生成することを含む、2R、4R-モナチンまたはその塩の製造方法などを提供する。これらの製造方法は、インドール-3-ピルビン酸およびピルビン酸を縮合して、4R-IHOGを生成すること、ならびにトリプトファンを脱アミノ化して、インドール-3-ピルビン酸を生成することをさらに含む。



WO 2012/050125 A1

明 細 書

発明の名称：モナティンの製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼを用いたモナティンの製造方法などに関する。

背景技術

[0002] モナティン〔4-（インドール-3-イル-メチル）-4-ヒドロキシ-グルタミン酸〕は、南アフリカの灌木シュレロチトン・イリシホリアス（*Schlerochiton ilicifolius*）の根に含有されるアミノ酸の一種であり、ショ糖の千数百倍の甘味を有していることから、特に低カロリー甘味料として期待される化合物である（特許文献1を参照）。モナティンは、2位と4位に不斉炭素を有しており、モナティンの天然型の立体異性体は（2S, 4S）体である。また、非天然型の3種の立体異性体が、有機化学的手法により合成されている。これらの全ての立体異性体が甘味に優れており、甘味料としての利用が期待される。

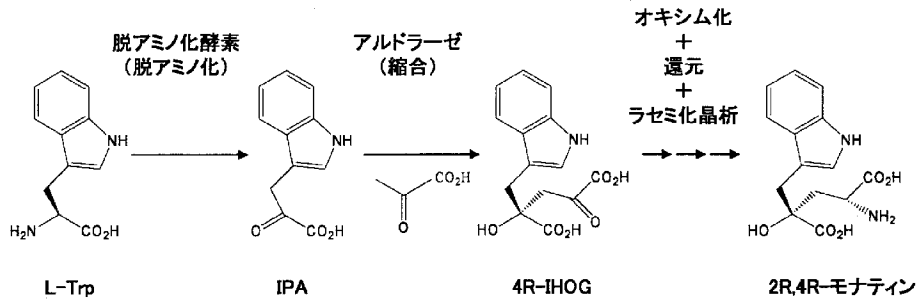
[0003] モナティンの製造方法としては、幾つかの方法が報告されている（例、特許文献2を参照）。しかしながら、報告されている方法はいずれも多段階の工程を必要とするものであり、モナティンの合成収率の改善が求められている。

[0004] 具体的には、モナティンの製造方法としては、L-トリプトファン（L-Trp）からインドール-3-ピルビン酸（以下、必要に応じて「IPA」と称する）を合成し、得られたIPAおよびピルビン酸から4R体の4-（インドール-3-イル-メチル）-4-ヒドロキシ-2-オキソグルタル酸（以下、必要に応じて「4R-IHOG」と称する）を合成し、続いて得られた4R-IHOGをオキシム化反応、還元反応およびエピ化晶析法に付すことにより、2R, 4R-モナティンを製造する下記の方法（従来の方法（1））が知られている（特許文献2を参照）。

しかしながら、アルドラーゼ工程（第二工程）は平衡反応ゆえ、必ずしも満足いく収率が得られる反応とは言えなかった。

[0005] [化1]

従来の2R,4R-モノタインの製造方法(1)



[0006] また、2R, 4R-モノタインの収率を改善するため、ワンポット (one-pot) 酵素反応により2R, 4R-モノタインを製造する方法（従来の方法(2)）が考案されている（特許文献3～6を参照）。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：特開昭64-25757号公報

特許文献2：国際公開第2003/059865号

特許文献3：国際公開第2007/133184号

特許文献4：国際公開第2005/042756号

特許文献5：米国特許出願公開第2006/0252135号明細書

特許文献6：米国特許出願公開第2008/020434号明細書

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明の目的は、良好な収率でモノタインを製造する方法を提供することである。

[0009] 本発明者らは、鋭意検討した結果、L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼを用いることにより上記課題を解決しうることを見出し、本願発明を完成するに至った。4R-IHOGに作用するL-アミノ酸アミノトランスフェ

ラーゼは、これまで知られていない。

[0010] すなわち、本発明は、以下のとおりである。

〔1〕 L-アミノ酸の存在下において、4R-1HOGをL-アミノ酸アミノトランスフェラーゼに接触させて、2S, 4R-モナティンを生成することを含む、2S, 4R-モナティンまたはその塩の製造方法。

〔2〕 L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼの作用によりL-アミノ酸から生成したケト酸を、デカルボキシラーゼに接触させて分解することをさらに含む、〔1〕の製造方法。

〔3〕 L-アミノ酸がL-アスパラギン酸である、〔1〕の製造方法。

〔4〕 L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼの作用によりL-アスパラギン酸から生成したオキサロ酢酸を、オキサロ酢酸デカルボキシラーゼに接触させて、ピルビン酸を不可逆的に生成することをさらに含む、〔3〕の製造方法。

〔5〕 L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼが、アルスロバクター属、バチルス属、カンジダ属、コリネバクテリウム属、ロデロミセス属、マイクロコッカス属、マイクロバクテリウム属、ノカルディア属、シュードモナス属、リゾビウム属、ステノトロホモナス属、ディエジア属、オクロバクトラム属、ブレブンディモナス属、バークホルデルリア属、カーニモナス属、ヤロウイア属、クロストリジウム属、デイノコッカス属、ユーバクテリウム属、ラクトバチルス属、メタノサーモバクター属、ホルミジウム属、ピロコッカス属、ロドコッカス属、サッカロマイセス属、サッカロファガス属、シノリゾビウム属、サーモアナエロバクター属、サーモトガ属、またはサーマス属に属する微生物に由来する、〔1〕の製造方法。

〔6〕 L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼが、アルスロバクター・エスピー、バチルス・アルティトゥディニス、バチルス・セルロシリティカス、バチルス・プミルス、バチルス・エスピー、カンジダ・ノルベゲンシス、カンジダ・インコンスピクア、コリネバクテリウム・アンモニアゲネス、コリネバクテリウム・グルタミカム、ロデロミセス・エロンギスポルス、マイク

ロコッカス・ルテウス、マイクロバクテリウム・エスピー、ノカルディア・グロベルラ、シュードモナス・クロロラフィス、シュードモナス・シトロノクロリス、シュードモナス・フラギ、シュードモナス・プチダ、シュードモナス・シンキサンタ、シュードモナス・タエトロレンス、シュードモナス・エスピー、リゾビウム・ラディオバクター、リゾビウム・エスピー、ステノトロホモナス・エスピー、ディエジア・マリス、オクロバクトラム・シュードグリグノネンス、ブレブンディモナス・ディミヌタ、バークホルデルリア・エスピー、カーニモナス・エスピー、ヤロウィア・リポリティカ、クロストリジウム・セルロリティカム、デイノコッカス・ゲオサーマリス、ユーバクテリウム・レクター、ラクトバチルス・アシドフィルス、メタノサーモバクター・サーマウトトロフィカス、ホルミジウム・ラピデウム、ピロコッカス・ホリコシイ、ロドコッカス・エリスロポリス、サッカロマイセス・セレビジアエ、サッカロファガス・デグラダンス、シノリゾビウム・メリロティ、サーモアナエロバクター・テングコンゲネシス、サーモトガ・マリチマ、またはサーマス・サーモフィラスに属する微生物に由来する、〔5〕の製造方法。

〔7〕 L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼが、配列番号2、配列番号48、配列番号53、配列番号61、配列番号65、配列番号67、配列番号69、配列番号73、配列番号75、配列番号77、配列番号83、配列番号85、配列番号87、配列番号89、配列番号91、配列番号93、配列番号95、配列番号97、配列番号99、配列番号101、配列番号103、配列番号105、配列番号107、配列番号109、または配列番号111により表されるアミノ酸配列に対して90%以上の同一性を示すアミノ酸配列からなる、〔1〕の製造方法。

〔8〕 L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼが、配列番号2により表されるアミノ酸配列において39位、109位、128位、150位、258位、287位、288位、289位、303位、358位、及び431位のアミノ酸残基から選ばれる1個以上のアミノ酸残基の変異を含む、〔7〕の製

造方法。

〔9〕 1個以上のアミノ酸残基の変異が、以下からなる群より選ばれる1個以上のアミノ酸残基の置換である、〔8〕の製造方法：

- 1) 39位のリジンのアルギニンへの置換；
- 2) 258位のセリンのグリシンへの置換；
- 3) 287位のグルタミンのグルタミン酸への置換；
- 4) 288位のスレオニンのグリシンへの置換；
- 5) 289位のイソロイシンのアラニンへの置換；
- 6) 109位のアスパラギン酸のグリシンへの置換；
- 7) 150位のアスパラギン酸のチロシンへの置換；
- 8) 303位のフェニルアラニンのロイシンへの置換；
- 9) 358位のアスパラギン酸のチロシンへの置換；
- 10) 431位のセリンのスレオニンへの置換；及び
- 11) 128位のグルタミン酸のグリシンへの置換。

〔10〕 L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼを発現する形質転換体を用いて、4R-IHOGをL-アミノ酸アミノトランスフェラーゼに接触させる、〔1〕の製造方法。

〔11〕 インドール-3-ピルビン酸およびピルビン酸を縮合して、4R-IHOGを生成することをさらに含む、〔1〕の製造方法。

〔12〕 インドール-3-ピルビン酸およびピルビン酸をアルドラーゼに接触させることにより、インドール-3-ピルビン酸およびピルビン酸を縮合する、〔11〕の製造方法。

〔13〕 4R-IHOGの生成に用いられるピルビン酸の少なくとも一部が、オキサロ酢酸デカルボキシラーゼの作用によりオキサロ酢酸から生成したピルビン酸に由来する、〔11〕の製造方法。

〔14〕 トリプトファンを脱アミノ化して、インドール-3-ピルビン酸を生成することをさらに含む、〔11〕の製造方法。

〔15〕 トリプトファンを脱アミノ化酵素に接触させることにより、トリプ

トファンを脱アミノ化する、〔14〕の製造方法。

〔16〕2S, 4R-モナティンまたはその塩の製造が1つの反応槽中で行われる、〔11〕または〔14〕の製造方法。

〔17〕以下(1)および(11)を含む、2R, 4R-モナティンまたはその塩の製造方法：

(1)〔1〕の方法により、2S, 4R-モナティンを生成すること；および

(11)2S, 4R-モナティンを異性化させて、2R, 4R-モナティンを生成すること。

〔18〕芳香族アルデヒドの存在下において、2S, 4R-モナティンを異性化する、〔17〕の製造方法。

〔19〕塩がナトリウム塩またはカリウム塩である、〔17〕の製造方法。

〔20〕下記(A)～(D)からなる群より選ばれるタンパク質である、L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ：

(A)配列番号2、配列番号48、配列番号53、または配列番号61により表されるアミノ酸配列からなるタンパク質；

(B)配列番号2、配列番号48、配列番号53、または配列番号61により表されるアミノ酸配列を含むタンパク質；

(C)配列番号2、配列番号48、配列番号53、または配列番号61により表されるアミノ酸配列に対して90%以上の同一性を示すアミノ酸配列からなり、かつL-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ活性を有する、タンパク質；ならびに

(D)配列番号2、配列番号48、配列番号53、または配列番号61により表されるアミノ酸配列において、アミノ酸残基の欠失、置換、付加および挿入からなる群より選ばれる、1または数個のアミノ酸残基の変異を含むアミノ酸配列からなり、かつL-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ活性を有する、タンパク質。

〔21〕L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼが、配列番号2により表さ

れるアミノ酸配列において39位、109位、128位、150位、258位、287位、288位、289位、303位、358位、及び431位のアミノ酸残基から選ばれる1個以上のアミノ酸残基の変異を含む、〔20〕のL-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ。

〔22〕1個以上のアミノ酸残基の変異が、以下からなる群より選ばれる1個以上のアミノ酸残基の置換である、〔21〕のL-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ：

- 1) 39位のリジンのアルギニンへの置換；
- 2) 258位のセリンのグリシンへの置換；
- 3) 287位のグルタミンのグルタミン酸への置換；
- 4) 288位のスレオニンのグリシンへの置換；
- 5) 289位のイソロイシンのアラニンへの置換；
- 6) 109位のアスパラギン酸のグリシンへの置換；
- 7) 150位のヒスチジンのチロシンへの置換；
- 8) 303位のフェニルアラニンのロイシンへの置換；
- 9) 358位のアスパラギン酸のチロシンへの置換；
- 10) 431位のセリンのスレオニンへの置換；及び
- 11) 128位のグルタミン酸のグリシンへの置換。

〔23〕下記(a)～(e)からなる群より選ばれる、ポリヌクレオチド：

(a) 配列番号1、配列番号47、配列番号52、または配列番号60により表されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド；

(b) 配列番号1、配列番号47、配列番号52、または配列番号60により表されるヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド；

(c) 配列番号1、配列番号47、配列番号52、または配列番号60により表されるアミノ酸配列に対して90%以上の同一性を示すヌクレオチド配列からなり、かつL-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ活性を有するタンパク質をコードする、ポリヌクレオチド；

(d) 配列番号1、配列番号47、配列番号52、または配列番号60によ

り表されるヌクレオチド配列に対して相補的なヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェント条件下でハイブリダイズし、かつL-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ活性を有するタンパク質をコードする、ポリヌクレオチド；ならびに

(e) [20] のL-アミノ酸アミノトランスフェラーゼをコードするポリヌクレオチド。

[24] [23] のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

[25] [24] の発現ベクターが導入された形質転換体。

[26] [25] の形質転換体を培地中で培養して、L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼを得ることを含む、L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼの製造方法。

[27] L-アミノ酸の存在下において、4R-1HOGを[20]のL-アミノ酸アミノトランスフェラーゼに接触させて、2S, 4R-モナティン生成することを含む、2S, 4R-モナティンまたはその塩の製造方法。

[28] 以下(1')および(11')を含む、2R, 4R-モナティンまたはその塩の製造方法：

(1') [27]の方法により、2S, 4R-モナティン生成すること；
および

(11') 2S, 4R-モナティンを異性化させて、2R, 4R-モナティン生成すること。

[29] 芳香族アルデヒドの存在下において、2S, 4R-モナティンを異性化する、[28]の製造方法。

[30] 塩がナトリウム塩またはカリウム塩である、[28]の製造方法。

発明の効果

[0011] 本発明の方法は、L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼを用いて4R-1HOGから2S, 4R-モナティンを良好な収率で製造することにより、2R, 4R-モナティンの収率の改善に寄与できる。本発明の方法はまた、1HOGから2S, 4R-モナティンを生成する際、高価なD-アミノ酸（

D-Aspなどを基質として使用する必要がない、あるいはL-アミノ酸からD-アミノ酸を生成するラセマーゼなどの酵素を添加する必要がない、といった利点を有する。本発明の方法はさらに、4R-IHOGから2S, 4R-モナティンを生成する反応（第3工程）のみならず、L-TrpからIPAを生成する反応（第1工程）、およびIPAから4R-IHOGを生成する反応（第2工程）を実施する場合、全体の反応平衡を第3工程で規定することが可能であり、第2工程の反応平衡を4R-IHOGの生成方向に大きくシフトさせることができる。この場合、本発明の方法は、L-Trpの副生（第1工程の逆反応の進行）を回避することにより、非常に良好な収率で2S, 4R-モナティンを製造することを可能にする。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]図1は、本発明の製造方法の一例を示す図である。Trp：トリプトファン；IPA：インドール-3-ピルビン酸；IHOG：4-（インドール-3-イル-メチル）-4-ヒドロキシ-2-オキソグルタル酸；モナティン：4-（インドール-3-イル-メチル）-4-ヒドロキシグルタミン酸。

[図2]図2は、本発明の製造方法の一例を示す図である。略号は、図1と同様である。

[図3]図3は、本発明の製造方法の好ましい例を示す図である。L-Trp：L-トリプトファン；L-Asp：L-アスパラギン酸；OAA：オキサロ酢酸；PA：ピルビン酸。他の略号は、図1と同様である。

[図4]図4は、L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ変異体（ID166）を用いた、400mlスケールにおけるL-Trpからの2S, 4R-モナティン生成反応を示す図である。SR-Monatin：2S, 4R-モナティン；SS-Monatin：2S, 4S-モナティン；IHOG：4R-IHOG；Trp：L-Trp。

[図5]図5は、L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ変異体（ID189）を用いた、80mlスケールにおけるL-Trpからの2S, 4R-モナテ

イン生成反応を示す図である。略称は、図4と同様である。

[図6]図5は、L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ変異体 (ID296) を用いた、80mlスケールにおけるL-Trpからの2S, 4R-モナティン生成反応を示す図である。略称は、図4と同様である。

発明を実施するための形態

[0013] (1) 2S, 4R-モナティンまたはその塩の製造方法

本発明は、2S, 4R-モナティンまたはその塩の製造方法(1)を提供する。本発明の製造方法は、(1-1) 4R-IHOGから2S, 4R-モナティンを製造する方法、(1-2) IPAおよびピルビン酸から2S, 4R-モナティンを製造する方法、(1-3) トリプトファンから2S, 4R-モナティンを製造する方法に分類できる。(1-1)、(1-2)、(1-3)の方法は、L-アミノ酸の存在下において、4R-IHOGをL-アミノ酸アミノトランスフェラーゼに接触させて、2S, 4R-モナティンを生成することを含むという点で共通する。

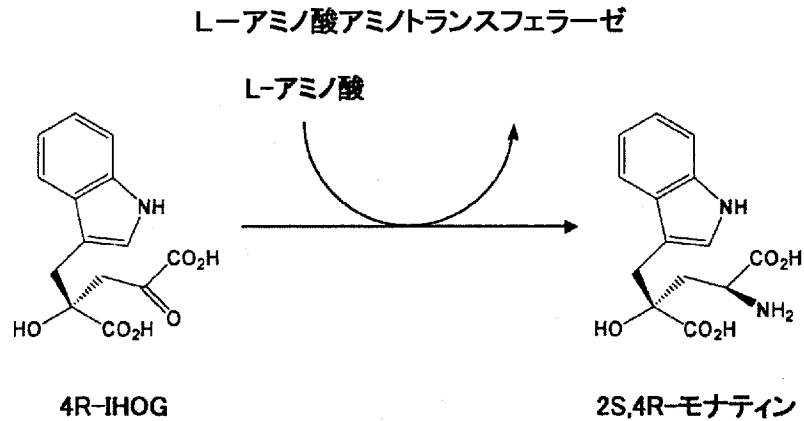
[0014] (1-1) 4R-IHOGから2S, 4R-モナティンを製造する方法

本方法は、L-アミノ酸の存在下において、4R-IHOGをL-アミノ酸アミノトランスフェラーゼに接触させて、2S, 4R-モナティンを生成すること(反応1)を含む。L-アミノ酸の存在下において、4R-IHOGをL-アミノ酸アミノトランスフェラーゼに接触させることにより、L-アミノ酸のアミノ基が4R-IHOGに転移して、2S, 4R-モナティンを生成し得る。

[0015]

[化2]

(反応1)



[0016] L-アミノ酸の種類は、L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼによりそのアミノ基が目的の基質である4R-IHOGに転移され得るL-アミノ酸である限り特に限定されない。このようなL-アミノ酸としては、L- α -アミノ酸等の種々のL-アミノ酸が知られている。具体的には、このようなL-アミノ酸としては、L-アスパラギン酸、L-アラニン、L-リジン、L-アルギニン、L-ヒスチジン、L-グルタミン酸、L-アスパラギン、L-グルタミン、L-セリン、L-スレオニン、L-チロシン、L-システイン、L-バリン、L-ロイシン、L-イソロイシン、L-プロリン、L-フェニルアラニン、L-メチオニン、L-トリプトファンが挙げられる。L-アミノ酸は、塩の形態で反応液中に添加されたものであってもよい。反応液中のL-アミノ酸の濃度は、例えば、1 mM~3 Mであり、好ましくは20 mM~1 Mであり、より好ましくは100 mM~500 mMである。

[0017] 一実施形態では、L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼは、細菌、放線菌、酵母等の微生物に由来するタンパク質であり得る。微生物の分類は、当該分野で周知の分類法、例えば、NCBI (National Center for Biotechnology Information) のデータベース (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=91347>) で用いられている分類法により行うことができる。L-アミノ酸アミ

ノトランスフェラーゼが由来する微生物の例としては、アルスロバクター (*Arthrobacter*) 属、バチルス (*Bacillus*) 属、カンジダ (*Candida*) 属、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属、ロデロミセス (*Lodderomyces*) 属、マイクロコッカス (*Micrococcus*) 属、マイクロバクテリウム (*Microbacterium*) 属、ノカルディア (*Nocardia*) 属、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属、リゾビウム (*Rhizobium*) 属、ステノトロホモナス (*Stenotrophomonas*) 属、ディエジア (*Dietzia*) 属、オクロバクトラム (*Ochrobactrum*) 属、ブレブンディモナス (*Brevundimonas*) 属、バークホルデルリア (*Burkholderia*) 属、カーニモナス (*Carnimonas*) 属、ヤロウィア (*Yarrowia*) 属、クロストリジウム (*Clostridium*) 属、デイノコッカス (*Deinococcus*) 属、ユーバクテリウム (*Eubacterium*) 属、ラクトバチルス (*Lactobacillus*) 属、メタノコッカス (*Methanococcus*) 属、メタノサーモバクター (*Methanothermobacter*) 属、ホルミジウム (*Phormidium*) 属、ピロコッカス (*Pyrococcus*) 属、ロドコッカス (*Rhodococcus*) 属、サッカロマイセス (*Saccharomyces*) 属、サッカロファガス (*Saccharophagus*) 属、シノリゾビウム (*Sinorhizobium*) 属、サーモアナエロバクター (*Thermoanaerobacter*) 属、サーモトガ (*Thermotoga*) 属、およびサーマス (*Thermus*) 属に属する微生物が挙げられる。

[0018] 具体的には、アルスロバクター属に属する微生物の例としては、アルスロバクター・エスピー (*Arthrobacter* sp.) が挙げられる。

[0019] バチルス属に属する微生物の例としては、バチルス・アルティトゥディニス (*Bacillus altitudinis*)、バチルス・セルロシリティカス (*Bacillus cellulosilyticus*)、バチ

ルス・プミルス (*Bacillus pumilus*)、バチルス・エスピー (*Bacillus sp.*) が挙げられる。カンジダ属に属する微生物の例としては、カンジダ・ノルベゲンシス (*Candida norvegensis*)、カンジダ・インコンスピクア (*Candida inconspicua*) が挙げられる。コリネバクテリウム属に属する微生物の例としては、コリネバクテリウム・アンモニアゲネス (*Corynebacterium ammoniagenes*)、コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) が挙げられる。ロデロミセス属に属する微生物の例としては、ロデロミセス・エロンギスポルス (*Lodderomyces elongisporus*) が挙げられる。マイクロコッカス属に属する微生物の例としては、マイクロコッカス・ルテウス (*Micrococcus luteus*) が挙げられる。マイクロバクテリウム属に属する微生物の例としては、マイクロバクテリウム・エスピー (*Microbacterium sp.*) が挙げられる。ノカルディア属に属する微生物の例としては、ノカルディア・グロベルラ (*Nocardia globberula*) が挙げられる。

[0020] シュードモナス属に属する微生物の例としては、シュードモナス・クロロラフィス (*Pseudomonas chlororaphis*) [例、シュードモナス・クロロラフィス・サブエスピー・クロロラフィス (*Pseudomonas chlororaphis subsp. chlororaphis*)]、シュードモナス・シトロノクロリス (*Pseudomonas citronoclolis*)、シュードモナス・フラギ (*Pseudomonas fragi*)、シュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*)、シュードモナス・シンキサント (*Pseudomonas synxantha*)、シュードモナス・タエトロレンス (*Pseudomonas taetrolens*)、シュードモナス・エスピー (*Pseudomonas sp.*) が挙げられる。

[0021] リゾビウム属に属する微生物の例としては、リゾビウム・ラディオバクタ

— (*Rhizobium radiobacter*)、リゾビウム・エスピー
— (*Rhizobium sp.*) が挙げられる。ステノトロホモナス属に
属する微生物の例としては、ステノトロホモナス・エスピー (*Stenot
rophomonas sp.*) が挙げられる。ディエジア属に属する微生物
の例としては、ディエジア・マリス (*Dietzia maris*) が挙
げられる。オクロバクトラム属に属する微生物の例としては、オクロバクト
ラム・シュードグリグノネンス (*Ochrobactrum pseudo
grignonense*) が挙げられる。ブレブンディモナス属に属する微
生物の例としては、ブレブンディモナス・ディミヌタ (*Brevundim
onas diminuta*) が挙げられる。バークホルデリア属に属する
微生物の例としては、バークホルデリア・エスピー (*Burkholder
ia sp.*) が挙げられる。カーニモナス属に属する微生物の例としては
、カーニモナス・エスピー (*Carnimonas sp.*) が挙げられる
。ヤロウシア属に属する微生物の例としては、ヤロウシア・リポリティカ (*Yarrowia lypolytica*) が挙げられる。

[0022] クロストリジウム (*Clostridium*) 属に属する微生物の例とし
ては、クロストリジウム・セルロリティカム (*Clostridium c
ellulolyticum*) が挙げられる。デイノコッカス (*Deino
coccus*) 属に属する微生物の例としては、デイノコッカス・ゲオサー
マリス (*Deinococcus geothermalis*) が挙げられ
る。ユーバクテリウム (*Eubacterium*) 属に属する微生物の例と
しては、ユーバクテリウム・レクタール (*Eubacterium rect
ale*) が挙げられる。ラクトバチルス (*Lactobacillus a
cidophilus*) 属に属する微生物の例としては、ラクトバチルス・
アシドフィルス (*Lactobacillus acidophilus*)
が挙げられる。メタノコッカス (*Methanococcus*) 属に属する
微生物の例としては、メタノコッカス・ヤナシュイ (*Methanococ
cus jannaschii*) が挙げられる。メタノサーモバクター (*M*

ethanothermobacter) 属に属する微生物の例としては、メタノサーモバクター・サーマウトロフィカス (Methanothermobacter thermautotrophicus) が挙げられる。ホルミジウム (Phormidium) 属に属する微生物の例としては、ホルミジウム・ラピデウム (Phormidium lapideum) が挙げられる。ピロコッカス (Pyrococcus) 属に属する微生物の例としては、ピロコッカス・ホリコシイ (Pyrococcus horikoshii) が挙げられる。ロドコッカス (Rhodococcus) 属に属する微生物の例としては、ロドコッカス・エリスロポリス (Rhodococcus erythropolis) が挙げられる。サッカロマイセス (Saccharomyces) 属に属する微生物の例としては、サッカロマイセス・セレビジアエ (Saccharomyces cerevisiae) が挙げられる。サッカロファガス (Saccharophagus) 属に属する微生物の例としては、サッカロファガス・デグラダンス (Saccharophagus degradans) が挙げられる。シノリゾビウム (Sinorhizobium) 属に属する微生物の例としては、シノリゾビウム・メリロティ (Sinorhizobium meliloti) が挙げられる。サーモアナエロバクター (Thermoanaerobacter) 属に属する微生物の例としては、サーモアナエロバクター・テングコンゲネシス (Thermoanaerobacter tengcongensis) が挙げられる。サーモトガ (Thermotoga) 属に属する微生物の例としては、サーモトガ・マリチマ (Thermotoga maritima) が挙げられる。サーマス (Thermus) 属に属する微生物の例としては、サーマス・サーモフィラス (Thermus thermophilus) が挙げられる。

[0023] 別の実施形態では、L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼは、天然のタンパク質もしくは人工の変異型タンパク質であり得る。このようなL-アミノ酸アミノトランスフェラーゼとしては、配列番号2、配列番号48、配列

番号53、配列番号61、配列番号65、配列番号67、配列番号69、配列番号73、配列番号75、配列番号77、配列番号83、配列番号85、配列番号87、配列番号89、配列番号91、配列番号93、配列番号95、配列番号97、配列番号99、配列番号101、配列番号103、配列番号105、配列番号107、配列番号109、または配列番号111で表されるアミノ酸配列と高い相同性（例、類似性、同一性）を有するアミノ酸配列からなり、かつL-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ活性を有するものが挙げられる。用語「L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ活性」とは、L-アミノ酸のアミノ基を目的の基質である4R-IHOGに転移して、アミノ基を有する目的化合物である2S, 4R-モナティンを生成する活性をいう。具体的には、L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼとしては、配列番号2で表されるアミノ酸配列に対して、80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%、特に好ましくは98%以上または99%以上の相同性（例、類似性、同一性）を有するアミノ酸配列からなり、かつL-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ活性を有するタンパク質が挙げられる。

[0024] アミノ酸配列および塩基配列の相同性は、例えばKarlinおよびAltschulによるアルゴリズムBLAST (Pro. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 5873 (1993)) やPearsonによるFASTA (Methods Enzymol., 183, 63 (1990)) を用いて決定することができる。このアルゴリズムBLASTに基づいて、BLASTP、BLASTNとよばれるプログラムが開発されているので (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>参照)、これらのプログラムをデフォルト設定で用いて、アミノ酸配列および塩基配列の相同性を計算してもよい。また、アミノ酸配列の相同性としては、例えば、株式会社ゼネティックスのソフトウェアGENETYX Ver 7.0.9を使用し、ORFにコードされるポリペプチド鎖全長を用いて、Unit Size to Compare=2の設定でMarching countをpercentage計算させた際の数値を用いてもよい。アミノ酸配

列および塩基配列の相同性として、これらの計算で導き出される値のうち、最も低い値を採用してもよい。

[0025] さらに別の実施形態では、L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼは、配列番号2、配列番号48、配列番号53、配列番号61、配列番号65、配列番号67、配列番号69、配列番号73、配列番号75、配列番号77、配列番号83、配列番号85、配列番号87、配列番号89、配列番号91、配列番号93、配列番号95、配列番号97、配列番号99、配列番号101、配列番号103、配列番号105、配列番号107、配列番号109、または配列番号111により表されるアミノ酸配列において、1または数個のアミノ酸残基の変異（例、欠失、置換、付加および挿入）を含むアミノ酸配列からなり、かつL-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ活性を有するタンパク質であり得る。1または数個のアミノ酸残基の変異は、アミノ酸配列中の1つの領域に導入されてもよいが、複数の異なる領域に導入されてもよい。用語「1または数個」は、タンパク質の立体構造や活性を大きく損なわない範囲を示すものである。タンパク質の場合における用語「1または数個」が示す数は、例えば、1～100個、好ましくは1～80個、より好ましくは1～50個、1～30個、1～20個、1～10個または1～5個である。このような変異は、L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼをコードする遺伝子を保持する微生物の個体差および種差等に基づく天然に生じる変異（mutantまたはvariant）に起因していてもよい。

[0026] アミノ酸配列において変異を導入すべきアミノ酸残基の位置は、当業者に自明である。具体的には、当業者は、1）同種の活性を有する複数のタンパク質のアミノ酸配列（例、配列番号2により表されるアミノ酸配列、および他のL-アミノ酸アミノトランスフェラーゼのアミノ酸配列）を比較し、2）相対的に保存されている領域、および相対的に保存されていない領域を明らかにし、次いで、3）相対的に保存されている領域および相対的に保存されていない領域から、それぞれ、機能に重要な役割を果たし得る領域および機能に重要な役割を果たし得ない領域を予測できるので、構造・機能の相関

性を認識できる。したがって、当業者は、L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼのアミノ酸配列において変異を導入すべきアミノ酸残基の位置を特定できる。

[0027] アミノ酸残基が置換により変異される場合、アミノ酸残基の置換は、保存的置換であってもよい。本明細書中で用いられる場合、用語「保存的置換」とは、所定のアミノ酸残基を、類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置換することをいう。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当該分野で周知である。例えば、このようなファミリーとしては、塩基性側鎖を有するアミノ酸（例、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖を有するアミノ酸（例、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電性極性側鎖を有するアミノ酸（例、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖を有するアミノ酸（例、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、 β 位分岐側鎖を有するアミノ酸（例、スレオニン、バリン、イソロイシン）、芳香族側鎖を有するアミノ酸（例、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）、ヒドロキシル基（例、アルコール性、フェノール性）含有側鎖を有するアミノ酸（例、セリン、スレオニン、チロシン）、および硫黄含有側鎖を有するアミノ酸（例、システイン、メチオニン）が挙げられる。好ましくは、アミノ酸の保存的置換は、アスパラギン酸とグルタミン酸との間での置換、アルギニンとリジンとヒスチジンとの間での置換、トリプトファンとフェニルアラニンとの間での置換、フェニルアラニンとバリンとの間での置換、ロイシンとイソロイシンとアラニンとの間での置換、およびグリシンとアラニンとの間での置換であってもよい。

[0028] さらに別の実施形態では、L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼは、配列番号1、配列番号47、配列番号52、配列番号60、配列番号64、配列番号66、配列番号68、配列番号72、配列番号74、配列番号76、配列番号82、配列番号84、配列番号86、配列番号88、配列番号90

、配列番号92、配列番号94、配列番号96、配列番号98、配列番号100、配列番号102、配列番号104、配列番号106、配列番号108、または配列番号110で表される塩基配列に相補的な塩基配列とストリンジেন্টな条件下でハイブリダイズするDNAによりコードされ、かつL-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ活性を有するタンパク質であってもよい。「ストリンジेंटな条件」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。このような条件を明確に数値化することは困難であるが、一例を示せば、相同性（例、同一性）が高いポリヌクレオチド同士、例えば80%、好ましくは90%以上、より好ましくは95%、特に好ましくは98%以上の相同性を有するポリヌクレオチド同士がハイブリダイズし、それより低い相同性を示すポリヌクレオチド同士がハイブリダイズしない条件である。具体的には、このような条件としては、6×SSC（塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム）中、約45℃でのハイブリダイゼーション、続いて、0.2×SSC、0.1%SDS中、50～65℃での1または2回以上の洗浄が挙げられる。

[0029] 好ましい実施形態では、L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼは、配列番号2で表されるアミノ酸配列における39位、109位、128位、150位、258位、287位、288位、289位、303位、358位、及び431位のアミノ酸残基から選ばれる1個以上（例、1個または2個）の任意のアミノ酸残基が置換等により変異しているL-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ変異体であってもよい。L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ変異体の好ましい例は、以下からなる群より選ばれる1個以上（例、1個または2個）の置換を含むものである：

- 1) 39位のリジンのアルギニンへの置換；
- 2) 258位のセリンのグリシンへの置換；
- 3) 287位のグルタミンのグルタミン酸への置換；
- 4) 288位のスレオニンのグリシンへの置換；
- 5) 289位のイソロイシンのアラニンへの置換；

- 6) 109位のアスパラギン酸のグリシンへの置換；
- 7) 150位のコリンチンのチロシンへの置換；
- 8) 303位のアミノ酸フェニルアラニンのロイシンへの置換；
- 9) 358位のアスパラギン酸のチロシンへの置換；
- 10) 431位のセリンのスレオニンへの置換；及び
- 11) 128位のグルタミン酸のグリシンへの置換

[0030] 配列番号2で表されるアミノ酸配列における39位、109位、128位、150位、258位、287位、288位、289位、303位、358位、及び431位のアミノ酸残基から選ばれる1個以上（例、1個または2個）の任意のアミノ酸残基の置換の組み合わせに関しては、例えば以下に示すような組み合わせの変異を導入することもできるが、本発明において用いることの出来るアミノ酸置換の組み合わせは以下に限定されるものではない。

- a) T288G
- b) S258G/I289A
- c) K39R/T288G
- d) Q287E/T288G
- e) K39R/D109R/T288G/S431T
- f) K39R/D109R/T288G/F303L
- g) D109R/Q287E/T288G/F303L
- h) D109R/S258G/I289A/F303L
- i) D109R/Q287E/T288G/S431T
- j) D109R/S258G/I289A/S431T
- k) K39R/D109R/E128G/T288G/F303L
- l) K39R/D109G/E128G/T288G/F303L
- m) D109R/E128G/Q287E/T288G/F303L
- n) D109R/E128G/S258G/I289A/S431T
- o) D109G/E128G/Q287E/T288G/F303L

p) D109G/E128G/S258G/I289A/F303L

q) K39R/D109G/H150Y/T288G/F303L/D358Y/S431T

r) K39R/D109G/E128G/H150Y/T288G/F303L/D358Y

s) D109G/H150Y/Q287E/T288G/F303L/D358Y/S431T

t) D109G/H150Y/S258G/I289A/F303L/D358Y/S431T

u) D109G/E128G/H150Y/Q287E/T288G/F303L/D358Y

v) D109G/E128G/H150Y/S258G/I289A/F303L/D358Y

[0031] 一実施形態では、4R-IHOGのL-アミノ酸アミノトランスフェラーゼとの接触は、4R-IHOG、およびL-アミノ酸アミノトランスフェラーゼの産生菌から抽出されたL-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ（抽出酵素）を、反応液中に共存させることにより達成できる。L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼの産生菌としては、例えば、L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼを天然で産生している菌（例、上述した微生物）、およびL-アミノ酸アミノトランスフェラーゼを発現する形質転換体が挙げられる。具体的には、抽出酵素としては、例えば、精製酵素、粗酵素、固定化酵素、培養ブロス、培養ブロス処理物（例、上記産生菌から調製されたL-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ含有画分、上記産生菌の破砕物および溶解物）が挙げられる。培養ブロスから培養ブロス処理物を得るための処理としては、例えば、熱処理（42℃～80℃、pH3～12、1分～24時間）、溶剤処理（例、キシレン、トルエン、エタノール、イソプロピルアルコール）、界面活性剤（例、Tween20, Triton X-100）、溶菌酵素処理（例：リゾチーム処理）が挙げられる。あるいは、培養ブロスを温度

、pH等を調整しながら保持することによりブロス中に検出される酵素活性を上昇せしめた後に反応に供してもよい。この場合の温度は4℃～60℃で、好ましくは20℃から37℃に設定されうる。また、pHは3～12に、好ましくはpH7～9に設定されうる。時間は5分～20日間程度、好ましくは1時間～7日間程度に設定されうる。ブロス保持中に通気攪拌をしても良いし、しなくとも良い。

[0032] 別の実施形態では、4R-IHOGのL-アミノ酸アミノトランスフェラーゼとの接触は、4R-IHOG、およびL-アミノ酸アミノトランスフェラーゼの産生菌を、反応液（例、培養液）中に共存させることにより達成できる。

[0033] 本発明の製造方法（1）で用いられる反応液としては、目的の反応が進行する限り特に限定されず、例えば、水、緩衝液が用いられる。緩衝液としては、例えば、Tris緩衝液、リン酸緩衝液（例、 KH_2PO_4 ）、炭酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、酢酸緩衝液が挙げられる。緩衝液の濃度は、例えば0.1mM～10M、好ましくは1mM～1Mであってもよい。本発明の製造方法においてL-アミノ酸アミノトランスフェラーゼの産生菌が用いられる場合、培養液が反応液として用いられてもよい。このような培養液は、例えば、後述する培地を用いて調製できる。本発明の製造方法で用いられる反応液は、補酵素としてピリドキサルリン酸（PLP）をさらに含んでもよい。PLPは、塩の形態で反応液中に添加されたものであってもよい。反応液中のPLPの濃度は、例えば、 $1\mu\text{M}$ ～100mMであり、好ましくは $10\mu\text{M}$ ～1mMであってもよい。反応液がPLPを含む場合、PLPにより触媒され得る異性化反応により、2S, 4R-モナティンから2R, 4R-モナティンを生成する効果もまた期待され得る（例、実施例11を参照）。

[0034] 本発明の製造方法（1）で用いられる反応液のpHは、目的の反応が進行する限り特に限定されないが、例えばpH5～10、好ましくはpH6～9、より好ましくはpH7～8である。

[0035] 本発明の製造方法（1）における反応温度は、目的の反応が進行する限り

特に限定されないが、例えば10～50℃、好ましくは20～40℃、より好ましくは25～35℃である。

[0036] 本発明の製造方法(1)における反応時間は、2S, 4R-モナティンが生成するのに十分な時間である限り特に限定されないが、例えば、2～100時間、好ましくは4～50時間、より好ましくは8～25時間である。

[0037] L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼの産生菌として、L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼを発現する形質転換体を用いられる場合、この形質転換体は、例えば、L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼの発現ベクターを作製し、次いで、この発現ベクターを宿主に導入することにより作製できる。例えば、配列番号1で表されるヌクレオチド配列を有するDNAを組み込んだ発現ベクターを作製して適切な宿主に導入することにより、L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼを発現する形質転換体を得ることができる。L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼを発現させるための宿主としては、例えばエシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) 等のエシェリヒア属細菌、コリネバクテリウム属細菌 (例、コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*))、およびバチルス属細菌 (例、バチルス・ズブチリス (*Bacillus subtilis*)) をはじめとする種々の原核細胞、サッカロマイセス属細菌 (例、サッカロマイセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*))、ピヒア属細菌 (例、ピヒア・スティピティス (*Pichia stipitidis*))、アスペルギルス属細菌 (例、アスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*)) をはじめとする種々の真核細胞を用いることができる。宿主としては、所定の遺伝子を欠損する株を用いてもよい。欠損され得るこのような遺伝子としては、例えば、AspC、宿主由来L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ、宿主由来アルドラーゼ、宿主由来脱アミノ化酵素が挙げられる。形質転換体としては、例えば、細胞質中にベクターを保有する形質転換体、およびゲノム上に目的遺伝子が導入された形質転換体が挙げられる。

[0038] L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼの産生菌は、所定の培養装置（例、試験管、フラスコ、ジャーファーメンターなど）を用いて、後述の組成を有する培地において培養することができる。培養条件は適宜設定することができる。具体的には、培養温度は、25℃～37℃であってもよく、pHは6.5～7.5であってもよく、培養時間は1h～100hであってもよい。また、溶存酸素濃度を管理しつつ培養を行っても良い。この場合、培養液中の溶存酸素濃度（DO値）を制御の指標として用いることがある。大気中の酸素濃度を21%とした場合の相対的な溶存酸素濃度DO値が、例えば1～10%を、好ましくは3%～8%を下回らない様に、通気・攪拌条件を制御することが出来る。また、培養はバッチ培養であっても、フェドバッチ培養であっても良い。フェドバッチ培養の場合は糖源となる溶液やリン酸を含む溶液を培養液に連続的あるいは不連続的に逐次添加して、培養を継続することも出来る。

[0039] 形質転換される宿主は、上述したとおりであるが、大腸菌について詳述すると、大腸菌K12株亜種のエシェリヒア コリ JM109株、DH5 α 株、HB101株、BL21（DE3）株などから選択することが出来る。形質転換を行う方法、および形質転換体を選別する方法は、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edition, Cold Spring Harbor press（2001/01/15）などにも記載されている。以下、形質転換された大腸菌を作製し、これを用いて所定の酵素を製造する方法を、一例としてより具体的に説明する。

[0040] L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼをコードするDNAを発現させるプロモータとしては、通常E. coliにおける異種タンパク質生産に用いられるプロモータを使用することができ、例えば、PhoA、PhoC、T7プロモータ、lacプロモータ、trpプロモータ、trcプロモータ、tacプロモータ、ラムダファージのPRプロモータ、PLプロモータ、T5プロモータ等の強力なプロモータが挙げられ、PhoA、PhoC、la

cが好ましい。また、ベクターとしては、例えば、pUC（例、pUC19、pUC18）、pSTV、pBR（例、pBR322）、pHSG（例、pHSG299、pHSG298、pHSG399、pHSG398）、RSF（例、RSF1010）、pACYC（例、pACYC177、pACYC184）、pMW（例、pMW119、pMW118、pMW219、pMW218）、pQE（例、pQE30）、およびその誘導体等を用いてもよい。他のベクターとしては、ファージDNAのベクターを利用してもよい。さらに、プロモータを含み、挿入DNA配列を発現させることができる発現ベクターを使用してもよい。好ましくは、ベクターは、pUC、pSTV、pMWであってもよい。

[0041] また、L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ遺伝子の下流に転写終結配列であるターミネータを連結してもよい。このようなターミネータとしては、例えば、T7ターミネータ、fdファージターミネータ、T4ターミネータ、テトラサイクリン耐性遺伝子のターミネータ、大腸菌trpA遺伝子のターミネータが挙げられる。

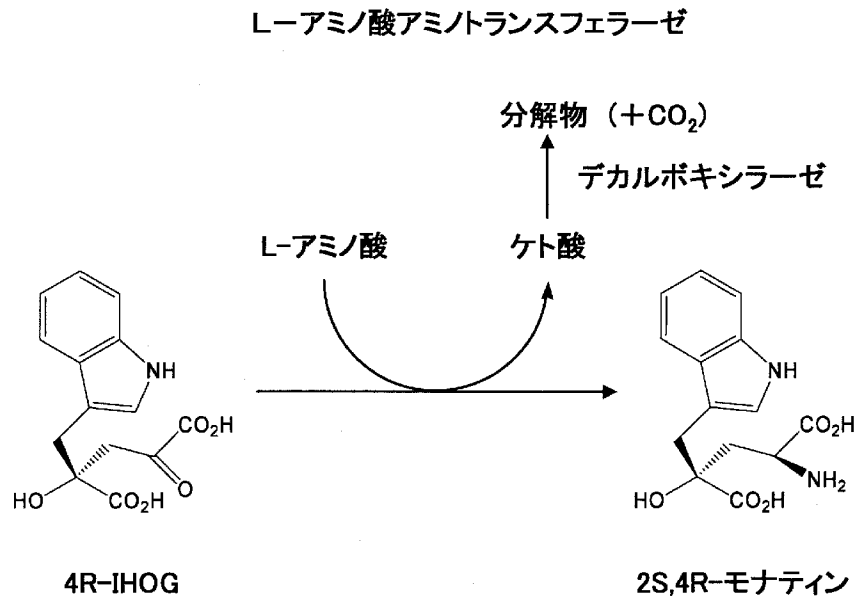
[0042] L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ遺伝子を大腸菌に導入するためのベクターとしては、いわゆるマルチコピー型のものが好ましく、ColE1由来の複製開始点を有するプラスミド、例えばpUC系のプラスミドやpBR322系のプラスミドあるいはその誘導体が発現される。ここで、「誘導体」とは、塩基の置換、欠失、挿入、付加および／または逆位などによってプラスミドに改変を施したものを意味する。なお、ここでいう「改変」とは、変異剤やUV照射などによる変異処理、あるいは自然変異などによる改変をも含む。

[0043] また、形質転換体を選別するために、ベクターがアンピシリン耐性遺伝子等のマーカーを有することが好ましい。このようなプラスミドとして、強力なプロモータを持つ発現ベクターが市販されている（例、pUC系（タカラバイオ社製）、pPROK系（クローンテック製）、pKK233-2（クローンテック製））。

- [0044] 得られた発現ベクターを用いて大腸菌を形質転換し、この大腸菌を培養すると、L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼが発現される。
- [0045] 培地としては、M9-カザミノ酸培地、LB培地など、大腸菌を培養するために通常用いる培地を用いてもよい。培地は、所定の炭素源、窒素源、補酵素（例、塩酸ピリドキシン）を含有していてもよい。具体的には、ペプトン、酵母エキス、NaCl、グルコース、MgSO₄、硫酸アンモニウム、リン酸2水素カリウム、硫酸第二鉄、硫酸マンガン、チアミン、大豆塩酸加水分解物、ディスホームGD113-K（日本油脂）などを用いても良い。また、培養条件、生産誘導条件は、用いたベクターのマーカ、プロモータ、宿主菌等の種類に応じて適宜選択する。
- [0046] L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼを回収するには、以下の方法などがある。L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼは、L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ産生菌を回収した後、菌体を破碎（例、ソニケーション、ホモジナイゼーション）あるいは溶解（例、リゾチーム処理）することにより、破碎物および溶解物として得ることができる。このような破碎物および溶解物を、抽出、沈澱、濾過、カラムクロマトグラフィー等の手法に供することにより、精製酵素、粗酵素、またはL-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ含有画分等を得ることもできる。
- [0047] 好ましい実施形態では、本発明の製造方法は、L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼの作用によりL-アミノ酸（例、L- α -アミノ酸）から生成したケト酸（R-COOH）を、デカルボキシラーゼに接触させて分解することをさらに含む（反応1'を参照）。L-アミノ酸からアミノ基転移反応により生成したケト酸の分解を促進することにより、4R-1HOGから2S, 4R-モナティンを生成する反応の平衡を、より多量の2S, 4R-モナティンを生成するようにシフトさせることができる。
- [0048]

[化3]

(反応1')

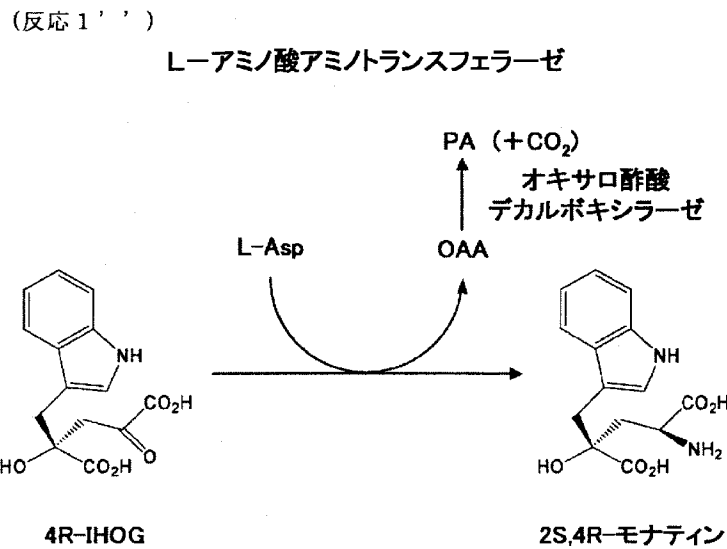


[0049] 本発明で用いられるデカルボキシラーゼは、ケト酸の脱炭酸反応を触媒する酵素である。デカルボキシラーゼによる脱炭酸反応は、不可逆的であり得る。ケト酸の不可逆的な脱炭酸反応のために用いられるデカルボキシラーゼとしては、種々の酵素が知られており、例えば、シュードモナス・スタッツェリ (*Pseudomonas stutzeri*) 由来オキサロ酢酸デカルボキシラーゼ (*Arch Biochem Biophys.*, 365, 17-24, 1999)、ザイモナス・モビリス (*Zymomonas mobilis*) 由来ピルビン酸デカルボキシラーゼ (*Applied Microbiology and Biotechnology*, 17, 152-157, 1983) が挙げられる。

[0050] 特に好ましい実施形態では、本発明の製造方法は、L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼの作用によりL-アスパラギン酸 (L-Asp) から生成したオキサロ酢酸 (OAA) を、オキサロ酢酸デカルボキシラーゼに接触させて、ピルビン酸 (PA) を生成することを含む (反応1' を参照)。オキサロ酢酸からのピルビン酸の不可逆的生成を促進することにより、4R-

1 HOGから2 S, 4 R-モノティンを生成する反応の平衡を、より多量の2 S, 4 R-モノティンを生成するようにシフトさせることができる。L-アスパラギン酸は、塩の形態で反応液中に添加されたものであってもよい。反応液中のL-アスパラギン酸の濃度は、1 mM~3 Mであり、好ましくは20 mM~1 Mであり、より好ましくは100 mM~500 mMである。

[0051] [化4]



[0052] 本発明で用いられるオキサロ酢酸デカルボキシラーゼは、オキサロ酢酸の脱炭酸反応を触媒して、ピルビン酸を生成する酵素である。オキサロ酢酸デカルボキシラーゼによる脱炭酸反応は、不可逆的であり得る。オキサロ酢酸の不可逆的な脱炭酸反応のために用いられるオキサロ酢酸デカルボキシラーゼとしては、種々の酵素が知られている。このようなオキサロ酢酸デカルボキシラーゼの例としては、例えば、シュドモナス・スタッツェリ (*Pseudomonas stutzeri*) 由来オキサロ酢酸デカルボキシラーゼ (*Arch Biochem Biophys.*, 365, 17-24, 1999)、クレブシエラ・アエロゲネス (*Klebsiella aerogenes*) 由来オキサロ酢酸デカルボキシラーゼ (*FEBS Lett.*, 141, 59-62, 1982)、スルホロブス・ソルファタリカス (*Sulfolobus solfataricus*) 由来オキサロ酢酸デカルボキシラーゼ (*Biochim Biophys Acta.*, 957,

301-311, 1988) が挙げられる。

[0053] 4R-IHOGからの2S, 4R-モナティンの製造においてデカルボキシラーゼが使用される場合、L-アミノ酸から生成したケト酸のデカルボキシラーゼとの接触は、ケト酸、およびデカルボキシラーゼの産生菌から抽出されたデカルボキシラーゼ（抽出酵素）、またはデカルボキシラーゼの産生菌を、反応液（例、培養液）中に共存させることにより達成できる。デカルボキシラーゼの産生菌としては、例えば、デカルボキシラーゼを天然で産生している菌、およびデカルボキシラーゼを発現する形質転換体が挙げられる。抽出酵素としては、例えば、精製酵素、粗酵素、固定化酵素、培養ブロス、培養ブロス処理物（例、上記産生菌から調製されたデカルボキシラーゼ含有画分、上記産生菌の破砕物および溶解物）が挙げられる。培養ブロスから培養ブロス処理物を得るための処理としては、例えば、熱処理（42℃～80℃、pH3～12、1分～24時間）、溶剤処理（例、キシレン、トルエン、エタノール、イソプロピルアルコール）、界面活性剤（例、Tween 20, Triton X-100）、溶菌酵素処理（例：リゾチーム処理）が挙げられる。あるいは、培養ブロスを温度、pH等を調整しながら保持することによりブロス中に検出される酵素活性を上昇せしめた後に反応に供してもよい。この場合の温度は4℃～60℃で、好ましくは20℃から37℃に設定されうる。また、pHは3～12に、好ましくはpH7～9に設定されうる。時間は5分～20日間程度、好ましくは1時間～7日間程度に設定されうる。ブロス保持中に通気攪拌をしても良いし、しなくとも良い。

[0054] 4R-IHOGからの2S, 4R-モナティンの製造においてL-アミノ酸アミノトランスフェラーゼおよびデカルボキシラーゼの両方が使用される場合、L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼおよびデカルボキシラーゼは、以下の様式で反応液中に提供されてもよい。

- ・ L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ（抽出酵素）およびデカルボキシラーゼ（抽出酵素）

- ・ L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼの産生菌およびデカルボキシラー

ゼ（抽出酵素）

・ L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ（抽出酵素）およびデカルボキシラーゼの産生菌

・ L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼの産生菌およびデカルボキシラーゼの産生菌

・ L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼおよびデカルボキシラーゼの産生菌

[0055] 好ましくは、L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼおよびデカルボキシラーゼの産生菌は、形質転換体であってもよい。このような形質転換体は、
i) L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼの発現ベクターを、デカルボキシラーゼの産生菌に導入することにより、ii) デカルボキシラーゼの発現ベクターを、L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼの産生菌に導入することにより、iii) L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼの第1の発現ベクターおよびデカルボキシラーゼの第2の発現ベクターを、宿主の微生物に導入することにより、iv) L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼおよびデカルボキシラーゼの発現ベクターを、宿主の微生物に導入することにより、作製できる。L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼおよびデカルボキシラーゼの発現ベクターとしては、例えば、i') L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼをコードする第1のポリヌクレオチド、および当該第1のポリヌクレオチドに機能可能に連結された第1のプロモーターから構成される第1の発現単位、ならびにデカルボキシラーゼをコードする第2のポリヌクレオチド、および当該第2のポリヌクレオチドに機能可能に連結された第2のプロモーターから構成される第2の発現単位を含む発現ベクター、ならびにii') L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼをコードする第1のポリヌクレオチドおよびデカルボキシラーゼをコードする第2のポリヌクレオチド、ならびに当該第1および第2のポリヌクレオチドに機能可能に連結されたプロモーターを含む発現ベクター（ポリシストロニックmRNAを発現し得るベクター）が挙げられる。L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼをコー

ドする第1のポリヌクレオチドは、デカルボキシラーゼをコードする第2のポリヌクレオチドに対して上流に位置していてもよいし、下流に位置していてもよい。

[0056] (1-2) IPAおよびピルビン酸から2S, 4R-モナティンを製造する方法

本発明の製造方法は、4R-IHOGを調製するために、IPAおよびピルビン酸を縮合させて、4R-IHOGを生成することをさらに含んでいてもよい。IPAおよびピルビン酸の縮合は、有機化学的手法、およびアルドラーゼを用いる酵素法により行うことができる。有機化学的手法によりIPAおよびピルビン酸を縮合させて4R-IHOGを生成する方法は、例えば、国際公開第2003/059865号、米国特許出願公開第2008/0207920号明細書に開示されている。アルドラーゼを用いる酵素法によりIPAおよびピルビン酸を縮合させて4R-IHOGを生成する方法は、例えば、国際公開第2003/056026号、特開2006-204285、米国特許出願公開第2005/0244939号明細書、国際公開第2007/103989号に開示されている。したがって、本発明では、IPAおよびピルビン酸から4R-IHOGを調製するために、これらの方法を用いることができる。

[0057] 4R-IHOGの調製に用いられるIPAは、不安定な化合物である。したがって、IPAおよびピルビン酸の縮合は、IPAの安定化因子の存在下において行なわれてもよい。IPAの安定化因子としては、例えば、スーパーオキシドジムスターゼ（例、国際公開第2009/028338号を参照）、メルカプトエタノール（例、国際公開第2009/028338号）を参照）が挙げられる。例えば、国際公開第2009/028338号には、スーパーオキシドジムスターゼを発現する形質転換体が開示されているので、本発明の方法では、このような形質転換体を用いてもよい。

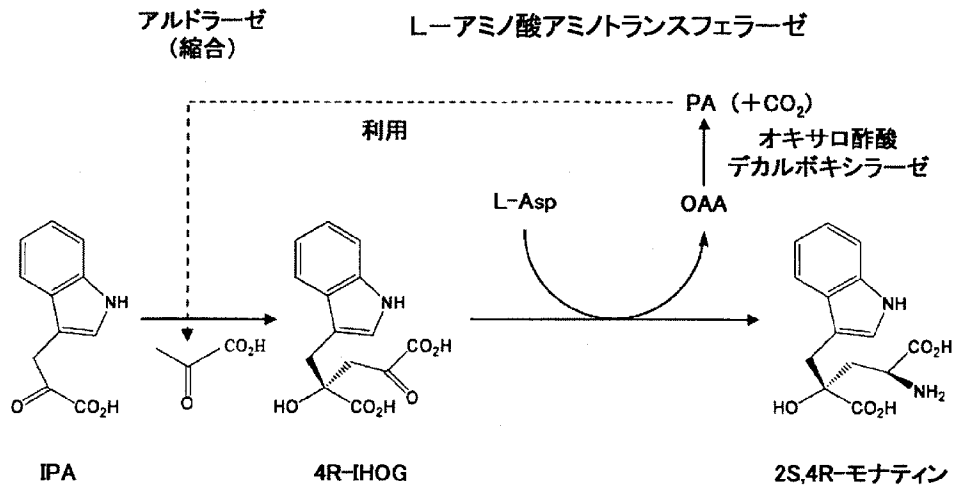
[0058] IPAおよびピルビン酸から4R-IHOGを生成する反応、ならびに4R-IHOGから2S, 4R-モナティンを生成する反応は、別々にまたは

並行して進行させてもよい。また、これらの反応は、1つの反応槽中で実施してもよい。1つの反応槽中でこれらの反応を実施する場合、これらの反応は、基質および酵素を順番にまたは同時に添加することにより行われ得る。具体的には、アルドラーゼを用いる酵素法によりIPAおよびピルビン酸から4R-IHOGを生成する反応、およびL-アミノ酸アミノトランスフェラーゼにより4R-IHOGから2S, 4R-モナティンを生成する反応が行なわれる場合、(1) IPA、ピルビン酸およびアルドラーゼ、ならびに(2) L-アミノ酸およびL-アミノ酸アミノトランスフェラーゼを、1つの反応槽中に順番にまたは同時に添加してもよい。ピルビン酸は、塩(例、ナトリウム塩)の形態で反応液中に添加されたものであってもよい。ピルビン酸は、任意の方法(例、バッチ法、フィード法)で反応液中に添加されてもよい。反応液中のピルビン酸の濃度は、例えば0.1 mM~10 M、好ましくは1 mM~1 Mであってもよい。

[0059] 好ましい実施形態では、本発明の製造方法は、以下のように上記反応1'と併用される。この場合、オキサロ酢酸から不可逆的に生成したピルビン酸が、4R-IHOGの調製のために利用される。換言すれば、4R-IHOGの生成に用いられるピルビン酸の少なくとも一部が、オキサロ酢酸デカルボキシラーゼの作用によりオキサロ酢酸から生成したピルビン酸に由来し得る。この場合、2S, 4R-モナティンの生成と連動してピルビン酸がオキサロ酢酸から生成するので、反応系中のL-アミノ酸の存在量が十分であれば、反応系中のピルビン酸の初期量は必ずしも重要でない点に留意すべきである。したがって、反応系中に、L-アミノ酸を、ピルビン酸に比し、より多量に添加してもよい。

[0060]

[化5]



[0061] IPAおよびピルビン酸からの4R-IHOGの製造においてアルドラーゼが使用される場合、IPAおよびピルビン酸とのアルドラーゼとの接触は、IPAおよびピルビン酸、ならびにアルドラーゼの産生菌から抽出されたアルドラーゼ（抽出酵素）、またはアルドラーゼの産生菌を、反応液（例、培養液）中に共存させることにより達成できる。アルドラーゼの産生菌としては、例えば、アルドラーゼを天然で産生している菌、およびアルドラーゼを発現する形質転換体が挙げられる。抽出酵素としては、例えば、精製酵素、粗酵素、固定化酵素、培養ブロス、培養ブロス処理物（例、上記産生菌から調製されたアルドラーゼ含有画分、上記産生菌の破砕物および溶解物）が挙げられる。培養ブロスから培養ブロス処理物を得るための処理としては、例えば、熱処理（42℃～80℃、pH3～12、1分～24時間）、溶剤処理（例、キシレン、トルエン）、界面活性剤処理が挙げられる。培養ブロスは、4℃～60℃、pH3～12、5分～20日間（通気攪拌あり／なし）の条件下で用いられてもよい。アルドラーゼの産生菌は、他の酵素（例、スーパーオキシドジムスターゼ、L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ、デカルボキシラーゼ）をさらに発現していてもよい。あるいは、アルドラーゼの産生菌に加えて、他の酵素の産生菌を、反応液中に共存させてもよい。反応液としては、例えば、本発明の製造方法（1-1）で述べたものを使用できる。

[0062] 好ましくは、アルドラーゼ、L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼおよびデカルボキシラーゼの産生菌は、形質転換体であってもよい。アルドラーゼ、L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ及びデカルボキシラーゼの発現は、同一の形質転換体を用いて行われても良いし、2つの形質転換体の組み合わせで行われても良いし、3種類別々の形質転換体で発現させても良い。アルドラーゼ、L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ及びデカルボキシラーゼ遺伝子を同一の形質転換体で発現させる場合には、染色体にこれらの遺伝子を組み込んでも良いし、一つのベクターにアルドラーゼ、L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ及びデカルボキシラーゼの遺伝子を連結しても良い。あるいは、L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼの発現ベクターを、デカルボキシラーゼ及びアルドラーゼの産生菌に導入しても良いし、L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼの第1の発現ベクターおよびデカルボキシラーゼ及びアルドラーゼの第2の発現ベクターを、宿主の微生物に導入しても良い。アルドラーゼ、L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼおよびデカルボキシラーゼの発現ベクターとしては、例えば、i') L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼをコードする第1のポリヌクレオチド、および当該第1のポリヌクレオチドに機能可能に連結された第1のプロモーターから構成される第1の発現単位、ならびにデカルボキシラーゼをコードする第2のポリヌクレオチド、および当該第2のポリヌクレオチドに機能可能に連結された第2のプロモーターから構成される第2の発現単位、およびアルドラーゼをコードする第3のポリヌクレオチド、及び当該第3のポリヌクレオチドに機能可能に連結された第3のプロモーターから構成される第3の発現単位を含む発現ベクター、ならびに i i') L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼをコードする第1のポリヌクレオチドおよびデカルボキシラーゼをコードする第2のポリヌクレオチド、ならびに当該第1および第2のポリヌクレオチドに機能可能に連結されたプロモーターから構成される第1の発現単位、及びアルドラーゼをコードする第3のポリヌクレオチド及び第3のポリヌクレオチドに機能可能に連結されたプロモーターから構成される第2の発現単

位を含む発現ベクター（ポリシストロニックmRNAを発現し得るベクター）が挙げられる。L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ、デカルボキシラーゼ及びアルドラーゼをコードする遺伝子のプラスミド上での配置には特段の制約は無い。

[0063] 反応の温度、pH、時間等の種々の条件は、目的の反応が進行し得る限り適宜設定できるが、例えば、アルドラーゼを用いる酵素法の条件は、本発明の製造方法（1-1）で述べたものと同様であってもよい。

[0064] （1-3）トリプトファンまたはその塩から2S, 4R-モノチンまたはその塩を製造する方法

本発明の製造方法は、IPAを調製するために、トリプトファン（Trp）を脱アミノ化することをさらに含んでもよい。Trpとしては、L-Trp、D-Trp、ならびにL-TrpおよびD-Trpの混合物が挙げられる。Trpの脱アミノ化は、有機化学的手法、および脱アミノ化酵素を用いる酵素法により行うことができる。

[0065] 有機化学的手法によりTrpを脱アミノ化してIPAを生成する方法としては、種々の方法が知られている。このような方法としては、例えば、トリプトファンを出発原料とし、プロトン受容体脱水用塩基の存在下、ピリジンアルデヒドと反応させる方法（例、特表昭62-501912号公報、国際公開第1987/000169号を参照）、インドールとethyl-3-bromopyruvate ester oximeとを原料に用いた縮合反応の後、酸加水分解に付す方法（例、欧州特許出願公開第421946号明細書を参照）が挙げられる。

[0066] 本明細書中で用いられる場合、用語「脱アミノ化酵素」とは、TrpからIPAを生成し得る酵素をいう。TrpからのIPAの生成は、本質的には、Trpのアミノ基（-NH₂）をオキシ基（=O）に変換することである。したがって、この反応を触媒する酵素は、アミノ酸デアミナーゼ、アミノトランスフェラーゼ、アミノ酸オキシダーゼ等の別称で称呼される場合がある。したがって、用語「脱アミノ化酵素」は、TrpからIPAを生成し得る

任意の酵素を意味するものとし、TrpからIPAを生成する反応を触媒する別名の酵素（例、アミノ酸デアミナーゼ、アミノトランスフェラーゼ、アミノ酸オキシダーゼ）も「脱アミノ化酵素」に含まれるものとする。

アミノ酸デアミナーゼまたはその産生菌を用いてTrpからIPAを生成する方法としては、例えば、国際公開第2009/028338号に開示される方法が挙げられる。アミノ酸デアミナーゼ触媒する反応の一般式としては、以下が挙げられる<式：アミノ酸+H₂O→2-オキシ酸+NH₃>。

また、アミノトランスフェラーゼまたはその産生菌を用いてTrpからIPAを生成する方法としては、例えば、東ドイツ特許DD 297190、特開昭59-95894号公報、国際公開第2003/091396号、米国特許出願公開2005/0282260号明細書に開示される方法が挙げられる。

L-アミノ酸オキシダーゼまたはその産生菌を用いてTrpからIPAを生成する方法としては、例えば、米国特許第5,002,963号公報、John A. Duerreら (Journal of Bacteriology 1975, vol 121, No. 2, p656-663)、特開昭57-146573号公報、国際公開第2003/056026号、国際公開第2009/028338号に開示される方法が挙げられる。アミノ酸オキシダーゼの触媒する反応の一般式としては、以下が挙げられる<式：アミノ酸+O₂+H₂O→2-オキシ酸+H₂O₂+NH₃>。この際、副生する過酸化水素による化合物の分解を抑制する目的で、カタラーゼなどの過酸化水素分解酵素を反応液に添加してもよい。

[0067] TrpからIPAを生成する反応、IPAおよびピルビン酸から4R-IHOGを生成する反応、ならびに4R-IHOGから2S, 4R-モナティン生成する反応は、別々にまたは並行して進行させてもよい。これらの反応は、1つの反応槽中で実施してもよい。1つの反応槽中でこれらの反応を実施する場合、これらの反応は、基質および酵素を順番にまたは同時に添加することにより行われ得る。具体的には、脱アミノ化酵素を用いる酵素法に

より *Trp* を脱アミノ化して *IPA* を生成する反応、アルドラーゼを用いる酵素法により *IPA* およびピルビン酸から *4R-IPG* を生成する反応、ならびに *L*-アミノ酸アミノトランスフェラーゼにより *4R-IPG* から *2S, 4R*-モナティンを生成する反応が行なわれる場合、(1) *Trp* および脱アミノ化酵素、(2) ピルビン酸およびアルドラーゼ、ならびに (3) *L*-アミノ酸および *L*-アミノ酸アミノトランスフェラーゼを、1つの反応槽中に順番にまたは同時に添加してもよい。

[0068] *Trp* から *IPA* の製造において脱アミノ化酵素が使用される場合、*Trp* との脱アミノ化酵素との接触は、*Trp*、および脱アミノ化酵素の産生菌から抽出された脱アミノ化酵素（抽出酵素）、または脱アミノ化酵素の産生菌を、反応液（例、培養液）中に共存させることにより達成できる。脱アミノ化酵素の産生菌としては、例えば、脱アミノ化酵素を天然で産生している菌、および脱アミノ化酵素を発現する形質転換体が挙げられる。例えば、国際公開第2009/028338号、実施例2に記載の *pTB2* 株（*Providencia rettgeri* 株由来アミノ酸デアミナーゼ遺伝子を導入した *E. coli* 組み換え株）を用いてもよい。さらには当該プラスミドのデアミナーゼ遺伝子に機能可能なプロモーター（例、*phoA*、*phoC*、*trp*、*lac*、*tac* プロモーター）を連結しても良い。また、*E. coli* を宿主として用いる場合には特定の遺伝子、例えば *aspC* 遺伝子を欠損させた宿主にデアミナーゼ発現プラスミドを導入しても良い。抽出酵素としては、例えば、精製酵素、粗酵素、固定化酵素、培養ブロス、培養ブロス処理物（例、上記産生菌から調製された脱アミノ化酵素含有画分、上記産生菌の破碎物および溶解物）が挙げられる。培養ブロスから培養ブロス処理物を得るための処理としては、例えば、熱処理（42℃～80℃、pH3～12、1分～24時間）、溶剤処理（例、キシレン、トルエン、エタノール、イソプロピルアルコール）、界面活性剤（例、Tween20、Triton X-100）、溶菌酵素処理（例：リゾチーム処理）が挙げられる。あるいは、培養ブロスを温度、pH等を調整しながら保持することにより

ブロス中に検出される酵素活性を上昇せしめた後に反応に供してもよい。この場合の温度は4℃～60℃で、好ましくは20℃から37℃に設定されうる。また、pHは3～12に、好ましくはpH7～9に設定されうる。時間は5分～20日間程度、好ましくは1時間～7日間程度に設定されうる。ブロス保持中に通気攪拌をしても良いし、しなくとも良い。脱アミノ化酵素の産生菌は、他の酵素（例、アルドラーゼ、スーパーオキシドジムスターゼ、L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ、デカルボキシラーゼ）をさらに発現していてもよい。あるいは、脱アミノ化酵素の産生菌に加えて、他の酵素の産生菌を、反応液中に共存させてもよい。反応液としては、例えば、本発明の製造方法（1-1）で述べたものを使用できる。Trpは、好ましくはL-Trpである。Trpは、塩の形態で反応液中に添加されたものであってもよい。反応液中のTrpの濃度は、例えば、1mM～3Mであり、好ましくは20mM～1Mであり、より好ましくは20mM～300mMである。

[0069] 反応の温度、pH、時間等の種々の条件は、目的の反応が進行し得る限り適宜設定できるが、例えば、脱アミノ化酵素を用いる酵素法の条件は、本発明の製造方法（1-1）で述べたものと同様であってもよい。

[0070] 好ましい実施形態では、本発明の製造方法（1-3）が1つの反応槽中で行われる場合、デアミナーゼ、アルドラーゼ、L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ、およびオキサロ酢酸デカルボキシラーゼ、ならびに／あるいはそれらを発現する1以上の形質転換体が用いられる。スーパーオキシドジムスターゼ、ならびに／あるいはそれを発現する形質転換体がさらに用いられ、これらの酵素は、変異体であってもよい。酵素の発現系としては、上述したような形質転換体を用いることができる。具体的には、細胞質中に目的遺伝子の発現ベクターを保有する形質転換体、およびゲノム上に目的遺伝子が導入された形質転換体、ならびに細胞質中に目的遺伝子の発現ベクターを保有し、かつゲノム上に目的遺伝子が導入された形質転換体が挙げられる。形質転換体の作製に用いられる発現ベクターとしては、上述したよう

な発現ベクターを用いることができる。

[0071] 好ましい実施形態では、本発明の製造方法（1-3）が1つの反応槽中で行われる場合、L-T r p、L-A s p、P A、緩衝液（例、リン酸緩衝液、トリス緩衝液）、P L Pを、所定の濃度で含む反応液を用いることができる。L-T r p濃度は、例えば1 m M~3 M、好ましくは1 0 m M~1 M、より好ましくは5 0 m M~3 0 0 m Mである。L-A s p濃度は、例えば1 m M~3 M、好ましくは1 0 0 m M~1 M、より好ましくは2 0 0 m M~4 0 0 m Mである。L-A s pは、塩の形態（例、ナトリウム塩、カリウム塩）であっても、フリーの形態であってもよい。L-A s pがフリーの形態で用いられる場合、反応液への投入後に、p Hを適宜調整しても構わない。この場合、p Hの調整には、アルカリ溶液（例、N a O H水溶液、K O H水溶液）が用いられてもよい。P A濃度は、例えば1 m M~3 M、好ましくは1 0 m M~1 0 0 m Mである。P Aは、塩の形態（例、ナトリウム塩、カリウム塩）であっても、フリーの形態であってもよい。P Aがフリーの形態で用いられる場合、反応液への投入後にp Hを適宜調整しても構わない。P L P濃度は、例えば1 μ M~1 0 0 m M、好ましくは1 0 μ M~1 m Mである。反応液は、マグネシウム、リン酸、消泡剤をさらに含んでもよい。マグネシウムが塩として用いられる場合、マグネシウム塩の形態としては、特段の制約はなく、例えば、塩化マグネシウム、硫酸マグネシウムが挙げられる。マグネシウム濃度は、例えば0. 1 m M~1 0 0 m M、好ましくは0. 5 m M~5 m Mである。また、リン酸が塩として用いられる場合、リン酸塩の形態としては、特段の制約は無く、例えば、カリウム塩（例、1カリウム塩、2カリウム塩、3カリウム塩）、ナトリウム塩（例、1ナトリウム塩、2ナトリウム塩、3ナトリウム塩）が挙げられる。リン酸濃度は、例えば1 m M~1 0 0 m M、好ましくは1 0 m M~5 0 m Mである。消泡剤としては、特段の制約は無く、例えばG D 1 1 3 Kが挙げられる。消泡剤の濃度は、特段の制約は無いが、例えば0. 0 0 0 1 %~1 % (v / v)、好ましくは0. 0 0 1 %~0. 1 % (v / v) である。p H、温度、通気、攪拌、時間等

の反応条件は、適宜設定することができる。反応液のpHは、例えば5～10、好ましくはpH6～9、より好ましくはpH7～8である。反応中のpHの制御は、酸またはアルカリを適宜添加することにより達成し得る。この場合に使用する酸、アルカリとしては、特段の制約は無いが、例えば塩酸、リン酸、硫酸、アンモニアガス、アンモニア水、NaOH水溶液、KOH水溶液が挙げられる。pH調整に用いる酸、アルカリの濃度は、特段の制約は無く、例えば溶液が用いられる場合には0.1N～20N、好ましくは3N～12Nである。反応温度は、例えば10℃～50℃、好ましくは20℃～40℃、より好ましくは25℃～35℃である。反応にジャーファーメンターなどの通気・攪拌制御が可能な容器を用いる場合、反応液中の溶存酸素濃度は、通気・攪拌条件を制御することにより設定することができる。当業者であれば使用する容器に応じた通気・攪拌条件の設定をすることは可能である。例えば1L容ジャーファーメンターを使用する場合、通気条件は、例えば1/200～1vvm、好ましくは1/100～1/10vvmであり、攪拌条件は、例えば100rpm～1000rpm、好ましくは400rpm～700rpmである。反応に添加する酵素としては、精製酵素、酵素発現菌体、酵素発現菌体処理物、酵素発現菌体を含む培養液ブロス、および酵素発現菌体を含む培養液ブロスの処理物が挙げられる。培養ブロスから培養ブロス処理物を得るための処理としては、例えば、熱処理（例、42℃～80℃、pH3～12、1分～24時間）、溶剤処理（例、キシレン、トルエン、エタノール、イソプロピルアルコール）、界面活性剤（例、Tween 20, Triton X-100）、溶菌酵素処理（例、リゾチーム処理）が挙げられる。あるいは、培養ブロスを温度、pH等の条件を調整しながら保持することによりブロス中に検出される酵素活性を上昇せしめた後に反応に供してもよい。この場合、培養ブロスの温度は、例えば4℃～60℃、好ましくは20℃～37℃である。また、培養ブロスのpHは、例えば3～12、好ましくは7～9である。保持時間は、例えば5分～20日間程度、好ましくは1時間～7日間程度である。培養ブロスの保持中に通気攪拌をして

も良いし、しなくともよい。

[0072] 反応液に添加するそれぞれの酵素量は、予め各々の酵素活性値を測定することにより、適宜設定することができる。デアミナーゼ活性、アルドラーゼ活性、L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ活性、及びオキザロ酢酸デカルボキシラーゼ活性は、例えば、以下の方法により測定することができる。

デアミナーゼ活性：10mM L-Phe、100mM NH₄Cl、100mM Tris-HCl (pH8.0)、0.25mM NADH、フェニルアラニンデヒドロゲナーゼ (ユニチカ社製、*Thermoactinomyces intermedius*由来)、25℃。340nmの減少から活性を算出。

L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ活性 (L-Asp/ α -KG活性)：100mM L-Asp-Na-1aq、10mM α -KG-2Na、50 μ M PLP、100mM Tris-HCl (pH8.0)、0.25mM NADH、MDH 2U/ml、25℃。340nmの減少から活性を算出。MDHはMalic Dehydrogenase from porcine heart (Sigma) を用いた。

アルドラーゼ活性：2mM 4-phenyl-4-hydroxy-2-oxo glutarate (PHOG)、100mM Tris-HCl (pH7.0)、1mM MgCl₂、0.25mM NADH、10U/ml lactate dehydrogenase (オリエンタル酵母社製、*Leuconostoc mesenteroides*由来)、25℃。340nmの減少から活性を算出。

オキザロ酢酸デカルボキシラーゼ活性：1mM オキザロ酢酸、100mM Tris-HCl (pH8.0)、0.25mM NADH、10U/ml lactate dehydrogenase (オリエンタル酵母社製、*Leuconostoc mesenteroides*由来)、25℃。340nmの減少から活性を算出。

このようにして決定された酵素活性に基づくと、反応液中に添加される酵

素量は、以下のとおりであってもよい。反応液中に添加されるデアミナーゼの量は、例えば0.1~20 U/ml、好ましくは0.5~2 U/mlである。反応液中に添加されるアルドラーゼの量は、例えば1~1000 U/ml、好ましくは10~100 U/mlである。反応液中に添加されるL-アミノ酸アミノトランスフェラーゼの量は、例えば1~1000 U/ml、好ましくは10~100 U/mlである。反応液中に添加されるオキザロ酢酸デカルボキシラーゼの量は、例えば0.01 U/ml以上、好ましくは0.1 U/ml以上である。各基質は、バッチ法またはフィード法により反応系に添加されてもよい。酵素、酵素発現菌体、酵素発現菌体処理物、培養ブロス、または培養ブロス処理物もまた、バッチ法またはフィード法により反応系に添加されてもよい。反応時間は、例えば2~100時間、好ましくは4~50時間、より好ましくは8~25時間である。反応液は、適切な条件（例、温度、pH、時間）下で殺菌されてもよい。

[0073] 本発明の製造方法（1-2）が1つの反応槽中で行われる場合、このような製造方法は、上述した本発明の製造方法（1-3）に準じて行うことができる。

[0074] 本発明の製造方法（1-1）（1-2）（1-3）のいずれかによって得られた2S, 4R-モナティン含有反応液を、カラム処理、晶析処理、抽出処理等の既知の精製方法を駆使することによって、精製された2S, 4R-モナティンを得ることができる。精製された2S, 4R-モナティンを、2R, 4R-モナティンまたはその塩の製造方法（2）に供することができる。また、本発明の製造方法（1-1）（1-2）（1-3）のいずれかによって得られた2S, 4R-モナティン含有反応液をそのまま、2R, 4R-モナティンまたはその塩の製造方法（2）に供することができる。

[0075] （2）2R, 4R-モナティンまたはその塩の製造方法

本発明は、2R, 4R-モナティンまたはその塩の製造方法（2）を提供する。本発明の製造方法は、本発明の製造方法（1）により2S, 4R-モナティンまたはその塩を製造すること、ならびに2S, 4R-モナティンま

たはその塩を異性化して、2 R, 4 R-モナティンまたはその塩を生成することを含む。

[0076] 2 S, 4 R-モナティンの2 R, 4 R-モナティンへの異性化は、当該異性化を可能にする任意の方法により行うことができる（例、国際公開第2005/082850号、国際公開第03/059865号を参照）。しかしながら、2 R, 4 R-モナティンの収率を向上させるという観点からは、2 S, 4 R-モナティンの異性化は、好ましくは、エピ化晶析により行われる（例、国際公開第2005/082850号を参照）。エピ化晶析とは、異性化反応および晶析を同時に行う方法である。本件の場合、エピ化晶析により、2 S, 4 R-モナティンを2 R, 4 R-モナティンに変換する2位の異性化反応、および変換された2 R, 4 R-モナティンの晶析が同時に行われる。

[0077] エピ化晶析においては、アルデヒドの存在下において異性化反応が行われてもよい。アルデヒドとしては、脂肪族アルデヒドまたは芳香族アルデヒドが挙げられるが、芳香族アルデヒドが好ましい。異性化反応に用いられる2 S, 4 R-モナティンとしては、精製された2 S, 4 R-モナティンを用いてもよいし、2 S, 4 R-モナティン含有する反応液を用いてもよい。

[0078] 脂肪族アルデヒドとしては、例えばホルムアルデヒド、アセトアルデヒド、プロピオンアルデヒド、n-ブチルアルデヒド、1-ブチルアルデヒド、n-バレールアルデヒド、カプロンアルデヒド、n-ヘプチルアルデヒド、アクロレイン、メタクロレイン等の炭素数1~7の飽和または不飽和アルデヒドを用いることができる。

[0079] 芳香族アルデヒドとしては、例えばベンズアルデヒド、サリチルアルデヒド、m-ヒドロキシベンズアルデヒド、p-ヒドロキシベンズアルデヒド、o-ニトロベンズアルデヒド、p-ニトロベンズアルデヒド、5-ニトロサリチルアルデヒド、3,5-ジクロロサリチルアルデヒド、アニスアルデヒド、o-バニリン、バニリン、フルフラール、ピリドキサール、5-リン酸ピリドキサール等を用いることができる。芳香族アルデヒドとしては、特に

、ピリドキサル、5-ニトロサリチルアルデヒド、3,5-ジクロロサリチルアルデヒドが好ましい。

- [0080] アルデヒドは、系に存在するモナティンに対して0.01~1モル当量、より好ましくは0.05~0.5モル当量の範囲で使用することができる。
- [0081] エピ化晶析は、アルデヒドの存在下に行われ、溶媒としては水と有機溶媒との混合溶媒が使用される。有機溶媒としては、水と混和する有機溶媒が使用されるが、特にメタノール、エタノール、プロパノール、イソプロパノール等のアルコールが好ましい、有機溶媒は異なる2種以上のものを混合して用いてもよい。有機溶媒と水の比率は、好ましくは体積比で有機溶媒：水=1：0.01~1：1、更に好ましくは1：0.1~1：0.5の範囲で設定される。
- [0082] エピ化晶析の温度は、好ましくは0~100℃、更に好ましくは40~80℃の範囲で設定される。エピ化晶析を行う時間は、好ましくは10時間から1週間、更に好ましくは15時間から96時間の範囲で設定される。
- [0083] pHは、4~13、好ましくは4.5~10、更に好ましくは5~9の範囲で設定される。pHの調整は酸およびアルカリを用いて行うことができる。用いられる酸は特に限定されず、酢酸などの有機酸、または塩酸、硫酸などの無機酸を使用することができる。アルカリも特に限定されず、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム等のアルカリ金属水酸化物、アンモニア、アミン等の有機塩基を使用することができる。
- [0084] 上記方法で得られる各化合物は、公知の分離精製手段、例えば、濃縮、減圧濃縮、溶媒抽出、晶出、再結晶、転溶、活性炭処理、イオン交換樹脂又は合成吸着樹脂等を用いたクロマトグラフィーなどの処理を必要に応じて組み合わせることにより単離精製することができる。本発明の方法において用いられる化合物および本発明の方法により製造される化合物（目的化合物）の塩は、それ自体公知の手段に従い、例えば、目的化合物に無機酸または有機酸を加えることによって製造することができる。また、目的化合物またはその塩は、水和物であってもよく、水和物および非水和物のいずれも本発明の範

囲に包含されるものである。本発明の製造方法に用いられる化合物（例、T r p、I P A、4 R - I H O G、2 S、4 R - モナティン）は、ナトリウム塩、カリウム塩、アンモニウム塩等の各種塩の形態であってもよい。また、本発明の製造方法により得られる化合物（例、I P A、4 R - I H O G、2 S、4 R - モナティン、2 R、4 R - モナティン）もまた、各種塩の形態であってもよい。

[0085] 以下の実施例により、本発明を詳細に説明するが、これらの実施例により本発明が限定されるものではない。

実施例

[0086] (H P L C分析条件)

実施例1～7では、H P L C分析を実施した場合、当該実施例に示す条件にてH P L C分析を実施した。

一方、実施例8～15では、以下に示す条件にてH P L C分析を実施した。

検出器：紫外吸光光度計（測定波長：210nm）

カラム温度：40℃

カラム：CAPCELLPAK C18 Type MGII，内径3mm，

長さ25cm，粒径5μm，資生堂（株）

移動相：A液 20mM磷酸二水素カリウム水溶液：アセトニトリル
=95：5

B液 20mM磷酸二水素カリウム水溶液：アセトニトリル
=60：40

グラジエントプログラム：以下の表1を参照

[0087]

[表1]

表1. グラジエントプログラム

時間(分)	移動相A (%)	移動相B (%)
0.0	100	0
15.0	100	0
40.0	0	100
45.0	0	100
45.1	100	0

[0088] 流量 : 毎分0.45 mL

注入量 : 20 μ L

分析時間 : 60分

[0089] 実施例1: *Bacillus altitudinis* AJ1616菌体抽出液を用いた4R-IHOGからの2S, 4R-モナティン生成

CM2G寒天培地(酵母エキス 10g/l、ポリペプトン 10g/l、グルコース 5g/l、塩化ナトリウム 5g/l、寒天 15g/l、pH7.0)に*Bacillus altitudinis* AJ1616を塗布し、30°Cで2日間培養した。

得られた菌体を酵素生産培地(酵母エキス 10g/l、ポリペプトン 10g/l、グルコース 1g/l、リン酸水素二カリウム 3g/l、リン酸二水素カリウム 1g/l、硫酸マグネシウム七水和物 0.1g/l、硫酸アンモニウム 5g/l) 3mlに一白金耳接種し、試験管で30°Cにて16時間振とう培養した。培養液2mlより菌体を遠心分離により集め、Tris-HCl (pH7.6) 20mMにて洗浄、懸濁し、菌体懸濁液を1ml調製した。

この菌体懸濁液1mlにガラスビーズ(0.1mm)を1g添加し、マルチビーズショッカー(安井器械)を用いて菌体を破碎した。得られた破碎液を遠心分離し、上清を菌体抽出液とした。

2S, 4R-モナティン合成反応液(4R-IHOG 9.5mM、4S

- I H O G 0.5 mM、L - A s p 100 mM、P L P 50 μ M、T r i s - H C l 100 mM、p H 8.0) 0.1 ml に、B a c i l l u s a l t i t u d i n i s A J 1616 菌体抽出液が0.05 ml 含まれるよう調製し、30°C で20時間反応させた。反応終了後、生成した2 S, 4 R - モナティンを定量したところ、0.21 mM であった。

[0090] 2 S, 4 R - モナティンの定量は、U P L C (ウォータース) を用いて行った。分析条件は以下に示す通りである。

移動相：20 mM K H₂ P O₄ / アセトニトリル = 100 / 5

流速：0.15 ml / min

カラム温度：40°C

検出：U V 210 nm

カラム：A C Q U I T Y U P L C B E H C 18、2.1 × 50 mm、1.7 μ m (ウォータース)

[0091] 実施例2：B a c i l l u s a l t i t u d i n i s A J 1616 由来アミノトランスフェラーゼの精製

B a c i l l u s a l t i t u d i n i s A J 1616 の可溶性画分から、2 S, 4 R - モナティンを生成するアミノトランスフェラーゼの精製を以下の通り行った。実施例1と同様にして、2 S, 4 R - モナティン合成反応および2 S, 4 R - モナティンの定量を行った。

[0092] (1) 可溶性画分の調製

C M 2 G 寒天培地 (酵母エキス 10 g / l、ポリペプトン 10 g / l、グルコース 5 g / l、塩化ナトリウム 5 g / l、寒天 15 g / l、p H 7.0) に B a c i l l u s a l t i t u d i n i s A J 1616 を塗布し、30°C で2日間培養した。

得られた菌体を T B (T e r r i f i c B r o t h) 培地160 ml に一白金耳接種し、500 ml 容坂口フラスコで30°C にて16時間振とう培養した。得られた培養液約2000 ml より菌体を遠心分離により集め、T r i s - H C l (p H 7.6) 20 mM、N a C l 100 mM にて洗浄

、懸濁し、4℃で30分間超音波破碎した。遠心分離により破碎液から菌体残渣を除き、得られた上清を可溶性画分とした。

[0093] (2) 陰イオン交換クロマトグラフィー

上記の可溶性画分を、Tris-HCl (pH 7.6) 20 mM、NaCl 100 mMで平衡化した陰イオン交換クロマトグラフィーカラムHi Load 26/10 Q Sepharose HP (GEヘルスケアバイオサイエンス製、CV=53 ml) に供して担体に吸着させた。担体に吸着しなかったタンパク質 (非吸着タンパク質) をTris-HCl (pH 7.6) 20 mM、NaCl 100 mMで用いて洗い流した後、NaCl濃度を100 mMから500 mMまで直線的に変化させて、8 ml/minの流速で吸着したタンパク質の溶出を行った。各溶出画分について2 S, 4 R-モナティン生成活性を検出したところ、約200 mM NaCl相当の画分に2 S, 4 R-モナティン生成活性が認められた。

[0094] (3) 疎水性クロマトグラフィー

2 S, 4 R-モナティン生成活性が検出された画分を集めて、硫酸アンモニウム 1.4 M、Tris-HCl 20 mM (pH 7.6) となるよう、硫酸アンモニウム、Tris-HCl (pH 7.6) を添加した。この溶液を硫酸アンモニウム 1.4 M、Tris-HCl 20 mM (pH 7.6) で平衡化した疎水性クロマトグラフィーカラムHi Load 16/10 Phenyl Sepharose HP (GEヘルスケアバイオサイエンス社製、CV=20 ml) に供して担体に吸着させた。担体に吸着しなかった非吸着タンパク質を硫酸アンモニウム 1.4 M、Tris-HCl (pH 7.6) 20 mMを用いて洗い流した後、硫酸アンモニウム濃度を1.4 Mから0 Mまで直線的に変化させて、3 ml/minの流速で2 S, 4 R-モナティン生成酵素を溶出させた。得られた各溶出画分について2 S, 4 R-モナティン生成活性を測定したところ、約1.0 M硫酸アンモニウム相当の画分に2 S, 4 R-モナティン生成活性が認められた。

[0095] (4) ゲル濾過クロマトグラフィー

2 S, 4 R-モノティン生成活性が検出された画分を集めて、アミコンウルトラ-15 30k (ミリポア) を用いて濃縮した。得られた濃縮液を、Tris-HCl (pH 7.6) 20mM、NaCl 150mMで希釈した。Tris-HCl (pH 7.6) 20mM、NaCl 150mMで平衡化されたゲルろ過カラムHiLoad 16/60 Superdex 200 pg (GEヘルスケアバイオサイエンス製、CV=120ml) に供し、1ml/minの流速で溶出した。この操作により分子量約120kDaと見積もられる位置で2 S, 4 R-モノティン生成活性が確認された。

[0096] (5) 陰イオン交換クロマトグラフィー

2 S, 4 R-モノティン生成活性が検出された画分を集めて、Tris-HCl (pH 7.6) 20mM、NaCl 100mMで平衡化した陰イオン交換クロマトグラフィーカラムMono Q 5/5 (ファルマシア (GEヘルスケアバイオサイエンス) 製、CV=1ml) に供して担体に吸着させた。担体に吸着しなかったタンパク質 (非吸着タンパク質) をTris-HCl (pH 7.6) 20mM、NaCl 100mMで用いて洗い流した後、NaCl濃度を100mMから500mMまで直線的に変化させて、0.5ml/minの流速で吸着したタンパク質の溶出を行った。得られた各溶出画分について2 S, 4 R-モノティン生成活性を検出したところ、約200mM NaCl相当の画分に2 S, 4 R-モノティン生成活性が認められた。

[0097] (6) SDS-PAGE

得られた画分をSDS-PAGEに供したところ、活性画分には45kDa付近にバンドが1本認められた。このバンドを、2 S, 4 R-モノティンを生成するアミノトランスフェラーゼの候補としてN末端アミノ酸配列解析に供した。また、内部アミノ酸配列解析に供した。

[0098] 実施例3: *Bacillus altitudinis* AJ1616由来アミノトランスフェラーゼのN末端および内部アミノ酸配列決定

実施例2で得られた精製酵素溶液をN末端アミノ酸配列解析に供したところ、SGFTALSEAELNDLY（配列番号4）のN末端アミノ酸配列が得られた。また、SDS-PAGEゲル中の試料をトリプシン処理し（pH8.0、35℃、20時間）、逆相HPLCに供して断片ペプチドを分離した。分取した画分についてアミノ酸配列解析を行ったところ、QLDLSMGMLDVV（配列番号5）の内部アミノ酸配列が得られた。N末端アミノ酸配列、内部アミノ酸配列ともに、*Bacillus pumilus* SAFR-032由来アミノトランスフェラーゼ（YP_001487343）と高い相同性を示した。

[0099] 実施例4：*Bacillus altitudinis* AJ1616由来アミノトランスフェラーゼ遺伝子のクローニング

実施例1と同様の方法で*Bacillus altitudinis* AJ1616を培養した。得られた培養液から遠心分離により集菌し、ゲノムDNAを抽出した。

得られたゲノムDNAを鋳型にして、アミノトランスフェラーゼ遺伝子を含むDNA断片をPCR増幅した。プライマーは、*Bacillus pumilus* SAFR-032のゲノムDNA配列（CP000813）を参考にして、アミノトランスフェラーゼ遺伝子の上流300bpと、下流200bpのDNA配列から設計した、プライマーBp-u300-f（5'-ctcaggaagcagggcgcaaaaagattaattt-3'：配列番号6）およびプライマーBp-d200-r（5'-ggatgctgtctttgtcatcccaaagtggat-3'：配列番号7）を用いた。PCRは、KOD-plus-ver. 2（東洋紡）を用いて以下の条件で行った。

[0100] 1 cycle 94℃、2min
 25 cycles 98℃、10sec
 55℃、10sec
 68℃、60sec

1 cycle 68°C、60 sec
4°C

[0101] 増幅した約1800bpのDNA断片の塩基配列を決定したところ、*Bacillus pumilus* SAFR-032アミノトランスフェラーゼ遺伝子 (NC_009848) と相同性の高い、1308bpのORFを含む塩基配列が明らかとなった。相同性はDNA配列で89%、アミノ酸配列で93%であった。

実施例3で得られたN末端アミノ酸配列、内部アミノ酸配列とも一致したため、2S、4R-モナティン生成活性を有するアミノトランスフェラーゼの遺伝子を取得できたと考えられた。

[0102] 実施例5 : *E. coli*での*Bacillus altitudinis* AJ1616由来アミノトランスフェラーゼ発現

(1) *Bacillus altitudinis* AJ1616由来アミノトランスフェラーゼ発現プラスミドの構築

Bacillus altitudinis AJ1616のゲノムDNAを鋳型にして、*Bacillus altitudinis* AJ1616由来アミノトランスフェラーゼ遺伝子を含むDNA断片をPCR増幅した。プライマーは、プライマー1616AT-Nde-f (5' -ggaaattccatATGAGCGGTTTTACAGCGTT-3' : 配列番号8) およびプライマー1616-xho-r (5' -gtcaaggagttttctcgagTACCGTTGGTGCTGATTGAC-3' : 配列番号9) を用いた。アミノトランスフェラーゼ遺伝子内のNdeI配列は、プライマー1616-deINde-f (5' -GGATTGAAGGAACAATGAAAAGCATGC-3' : 配列番号10) およびプライマー1616-deINde-r (5' -GCATGCTTTTTTCATgTGTTCCTTCAATCC-3' : 配列番号11) を用いて変換した。PCRは、KOD-plus-ver. 2 (東洋紡) を用いて以下の条件で行った。

[0103] 1 cycle 94°C、2 min
25 cycles 98°C、10 sec
55°C、10 sec
68°C、60 sec
1 cycle 68°C、60 sec
4°C

[0104] 得られた約1300bpのDNA断片をNdeI、XhoIで制限酵素処理し、同様にNdeI、XhoIで処理したpET-22b (Novagen)とライゲーションした。このライゲーション溶液でE. coli JM109を形質転換し、アンピシリン耐性株の中から目的のプラスミドを抽出し、このプラスミドをpET-22-1616AT-Hisと命名した。このプラスミドでは、C末端にHis-tagが付与されたBacillus altitudinis AJ1616由来アミノトランスフェラーゼ (1616AT-His)が発現する。

[0105] (2) E. coli発現株からの1616AT-His精製

構築した発現プラスミドpET-22-1616AT-HisをE. coli BL21 (DE3)に導入し、形質転換体をアンピシリン100mg/lを含むOvernight Express Instant TB Medium (Novagen) 160mlに1白金耳接種し、500ml容坂口フラスコを用いて37°Cで16時間振盪させた。培養終了後、得られた培養液約1000mlより菌体を遠心分離により集め、Tris-HCl (pH7.6) 20mM、NaCl 100mM、Imidazole 20mMにて洗浄、懸濁し、4°Cで30分間超音波破碎した。遠心分離により破碎液から菌体残渣を除き、得られた上清を可溶性画分とした。

得られた可溶性画分を、Tris-HCl (pH7.6) 20mM、NaCl 100mM、Imidazole 20mMで平衡化したHis-tagタンパク質精製カラムHisPrep FF 16/10 (ファルマシア (GEヘルスケアバイオサイエンス) 製、CV=20ml) に供して担

体に吸着させた。担体に吸着しなかったタンパク質（非吸着タンパク質）を Tris-HCl (pH 7.6) 20mM、NaCl 100mM、Imidazole 20mM で用いて洗い流した後、Imidazole 濃度を 20mM から 250mM まで直線的に変化させて、3ml/min の流速で吸着したタンパク質の溶出を行った。

得られた画分を集めて、アミコン ウルトラ-15 30k (ミリポア) を用いて濃縮した。濃縮液を、Tris-HCl (pH 7.6) 20mM、NaCl 100mM で希釈し、Tris-HCl (pH 7.6) 20mM、NaCl 100mM で平衡化した陰イオン交換クロマトグラフィーカラム HiLoad 16/10 Q Sepharose HP (GEヘルスケアバイオサイエンス製、CV=20ml) に供して担体に吸着させた。担体に吸着しなかったタンパク質（非吸着タンパク質）を Tris-HCl (pH 7.6) 20mM、NaCl 100mM で用いて洗い流した後、NaCl 濃度を 100mM から 500mM まで直線的に変化させて、3ml/min の流速で吸着したタンパク質の溶出を行った。

各溶出画分について 2S, 4R-モナティン生成活性を確認し、2S, 4R-モナティン生成活性が認められた画分を集めて、アミコン ウルトラ-15 30k (ミリポア) を用いて濃縮した。濃縮液を Tris-HCl (pH 7.6) 20mM で希釈し、1616AT-His 溶液とした。

[0106] 実施例 6 : 1616-AT-His を用いた 2S, 4R-モナティン合成反応

2S, 4R-モナティンの定量は、HPLC 分析により行った。分析条件は以下に示す通りである。

移動相 : 20mM KH_2PO_4 / アセトニトリル = 100 / 5

流速 : 1.0ml/min

カラム温度 : 40°C

検出 : UV 280nm

カラム : CAPCELL PAK MGII、4.6×150mm、

3 μ m (資生堂)

[0107] (1) 4R-IHOGからの2S, 4R-モナティン合成

反応液 (4R-IHOG 9.5 mM、4S-IHOG 0.5 mM、L-Asp 80 mM、PLP 50 μ M、Tris-HCl 100 mM、pH 8.0) 0.1 ml に、1616AT-His が 0.5 mg 含まれるよう調製した 1616AT-His 溶液 (実施例 5) を加え、25°C で 12 時間反応させた。反応終了後、生成した 2S, 4R-モナティンを定量したところ、8.6 mM であった。

[0108] (2) インドールピルビン酸 (IPA)、ピルビン酸 (PA) からの 2S, 4R-モナティン合成

反応液 (IPA 50 mM、PA 100 mM、L-Asp 100 mM、MgCl₂ 1 mM、PLP 50 μ M、Tris-HCl 100 mM、リン酸カリウム緩衝液 100 mM、pH 8.0) 0.1 ml に、1616AT-His が 0.5 mg (実施例 5 の 1616AT-His 溶液を使用)、SpAld (アルドラーゼ活性を有する溶液。調製法は、下記にて詳述する。特開 2006-204285 号公報もまた参照) が 0.01 mg、Oxaloacetate Decarboxylase (シグマ、04878) が 1 U 含まれるよう調製し、25°C で 2 時間反応させた。反応終了後、生成した 2S, 4R-モナティンを定量したところ、5.0 mM であった。

[0109] (3) L-Trp からの 2S, 4R-モナティン合成

反応液 (L-Trp 50 mM、PA 100 mM、L-Asp 400 mM、MgCl₂ 1 mM、PLP 50 μ M、Tris-HCl 100 mM、リン酸カリウム緩衝液 100 mM、pH 6.5) 1.0 ml に、1616AT-His が 5 mg (実施例 5 の 1616AT-His 溶液を使用)、SpAld が 0.2 mg、pTB2 株 (脱アミノ化酵素を発現し得る菌株。調製法は、下記にて詳述する。WO 2009/028338 もまた参照) の坂口フラスコ培養液 (TB 培地) が 0.4 ml、Superoxide Dismutase (シグマ、S8160) が 200 U、Oxaloac

etate Decarboxylase (シグマ、04878) が10U 含まれるよう調製し、25℃で12時間反応させた。反応は試験管を用いて、140rpmで振とうさせ行った。反応終了後、生成した2S, 4R-モノナティンを定量したところ、22mMであった(44%の収率)。

[0110] SpAldは以下の方法で調製した。

特開2006-204285号公報、実施例5に記載のプラスミドDNA、ptrpSpALDを鋳型にして、SpAld遺伝子を含むDNA断片をPCR増幅した。プライマーは、プライマーSpAld-f-NdeI (5' -GGAATTCCATATGACCCAGACGCGCCTCAA-3' : 配列番号12) およびプライマーSpAld-r-HindIII (5' -GCCCAAGCTTTCAGTACCCCGCCAGTTCGC-3' : 配列番号13) を用いた。アルドラーゼ遺伝子内のE. coliレアコドン(6L-ctc、13L-ctc、18P-ccc、38P-ccc、50P-ccc、77P-ccc、81P-ccc、84R-cga)は、それぞれ6L-ctg、13L-ctg、18P-ccg、38P-ccg、50P-ccg、77P-ccg、81P-ccg、84R-cgcに変換した。6Lを変換する際には、プライマー6L-f (5' -ACCCAGACGCGCCTGAACGGCATCATCCG-3' : 配列番号14) およびプライマー6L-r (5' -CGGATGATGCCGTTTCAGGCGCGTCTGGGT-3' : 配列番号15) を用いた。13Lを変換する際には、プライマー13L-f (5' -ATCATCCGCGCTCTGGAAGCCGGCAAGCC-3' : 配列番号16) およびプライマー13L-r (5' -GGCTTGCCGGCTTCCAGAGCGCGGATGAT-3' : 配列番号17) を用いた。18Pを変換する際には、プライマー18P-f (5' -GAAGCCGGCAAGCCGGCTTTCACCTGCTT-3' : 配列番号18) およびプライマー18P-r (5' -AAGCAGGTGAAAGCCGGCTTGCCGGCTTC-3' : 配列番号19) を用いた。38Pを変換する際には、プライマー38P-f (

5' -CTGACCGATGCCCCGTATGACGGCGTGGT-3'
 ' : 配列番号20) およびプライマー-38P-r (5' -ACCACGCC
 GTCATACGGGGCATCGGTCAG-3' : 配列番号21) を用
 いた。50Pを変換する際には、プライマー-50P-f (5' -ATGGA
 GCACAACCCGTACGATGTCGCGGC-3' : 配列番号22
) およびプライマー-50P-r (5' -GCCGCGACATCGTACG
 GGTTGTGCTCCAT-3' : 配列番号23) を用いた。77P、8
 1P、84Rを変換する際には、プライマー-77P-81P-84R-f (
 5' -CGGTCGCGCCGTCGGTCACCCCGATCGCGCG
 CATCCCGGCCA-3' : 配列番号24) およびプライマー-77P-
 81P-84R-r (5' -TGGCCGGGATGCGCGCGATCG
 GGGTGACCGACGGCGCGACCG-3' : 配列番号25) を用
 いた。PCRは、KOD-plus (東洋紡) を用いて以下の条件で行った
 。

1 cycle	94°C、2min
25 cycles	94°C、15sec
	55°C、15sec
	68°C、60sec
1 cycle	68°C、60sec
	4°C

[0111] 得られた約900bpのDNA断片をNdeI、HindIIIで制限酵
 素処理し、同様にNdeI、HindIIIで処理したpSFN Sm_A
 et (国際公開第2006/075486号、実施例1, 6, 12) とライ
 ゲーションした。このライゲーション溶液でE. coli JM109を形
 質転換し、アンピシリン耐性株の中から目的のプラスミドを抽出し、このプ
 ラスミドをpSFN-SpAldと命名した。

[0112] 構築したプラスミドpSFN-SpAldを保有する菌株、E. coli
 JM109/pSFN-SpAldをアンピシリン100mg/lを含む

L B液体培地 50 ml に1白金耳接種し、500 ml 容坂口フラスコを用いて36℃で8時間振盪させた。培養終了後、得られた培養液 0.0006 ml をアンピシリン 100 mg/l を含むシード液体培地（グルコース 10 g、硫酸アンモニウム 5 g、リン酸二水素カリウム 1.4 g、大豆加水分解物 窒素量として 0.45 g、硫酸マグネシウム七水和物 1 g、硫酸鉄（II）七水和物 0.02 g、硫酸マンガン（II）五水和物 0.02 g、チアミン塩酸塩 1 mg、ディスホームGD-113K（日本油脂株式会社） 0.1 ml、pH 6.3、水で1 Lにする）300 ml を入れた1000 ml 容ジャーフェーマンターに添加し、シード培養を開始した。シード培養は33℃、通気1/1 vvm、攪拌700 rpm、アンモニアでpHを6.3に制御し、グルコースが消費されるまで行った。このようにして得られた培養液 15 ml を、アンピシリン 100 mg/l を含むメイン液体培地（グルコース 15 g、硫酸アンモニウム 5 g、リン酸 3.5 g、大豆加水分解物 窒素量として0.45 g、硫酸マグネシウム七水和物 1 g、硫酸鉄（II）七水和物 0.05 g、硫酸マンガン（II）五水和物 0.05 g、チアミン塩酸塩 1 mg、ディスホームGD-113K（日本油脂株式会社） 0.1 ml、pH 6.3、水で0.95 Lにする）285 ml を入れた1000 ml 容ジャーフェーマンターに添加し、メイン培養を開始した。メイン培養は36℃、通気1/1 vvm、アンモニアでpHを6.3に制御し、溶存酸素濃度が5%以上になるよう攪拌を700 rpm以上で制御した。メイン培地に含まれるグルコースが消費された後、500 g/l のグルコース溶液を滴下し、合計50時間培養を行った。

得られた培養液 100 ml から、菌体を遠心分離により集め、Tris-HCl (pH 7.6) 20 mMにて洗浄、懸濁し、4℃で30分間超音波破碎した。遠心分離により破碎液から菌体残渣を除き、得られた上清を可溶性画分とした。

上記の可溶性画分を、Tris-HCl (pH 7.6) 20 mMで平衡化した陰イオン交換クロマトグラフィーカラム Hi Load 26/10

Q Sepharose HP (GEヘルスケアバイオサイエンス製、CV = 53 ml) に供して担体に吸着させた。担体に吸着しなかったタンパク質 (非吸着タンパク質) を Tris-HCl (pH 7.6) 20 mM で用いて洗い流した後、NaCl 濃度を 0 mM から 500 mM まで直線的に変化させて、8 ml/min の流速で吸着したタンパク質の溶出を行った。アルドラーゼ活性を有する画分を集めて、硫酸アンモニウム 1 M、Tris-HCl (pH 7.6) 20 mM となるよう、硫酸アンモニウム、Tris-HCl (pH 7.6) を加えた。

[0113] 得られた溶液を硫酸アンモニウム 1 M、Tris-HCl (pH 7.6) 20 mM で平衡化した疎水性クロマトグラフィーカラム HiLoad 16/10 Phenyl Sepharose HP (GEヘルスケアバイオサイエンス社製、CV = 20 ml) に供して担体に吸着させた。担体に吸着しなかった非吸着タンパク質を硫酸アンモニウム 1 M、Tris-HCl (pH 7.6) 20 mM を用いて洗い流した後、硫酸アンモニウム濃度を 1 M から 0 M まで直線的に変化させて、3 ml/min の流速で吸着したタンパク質の溶出を行った。アルドラーゼ活性を有する画分を集めて、アミコン ウルトラ-15 10k (ミリポア) を用いて濃縮した。得られた濃縮液を、Tris-HCl (pH 7.6) 20 mM で希釈し、SpAld 溶液とした。アルドラーゼ活性は、PHOG を基質としたアルドール分解活性を以下の条件で測定した。

反応条件：りん酸緩衝液 (pH 7.0) 50 mM、PHOG 2 mM、NADH 0.25 mM、MgCl₂ 1 mM、Lactate dehydrogenase 16 U/ml、25°C、340 nm の吸光度を測定。

[0114] pTB2 株は以下の方法で調製した。

国際公開第 2009/028338 号、実施例 2 に記載の pTB2 株をアンピシリン 100 mg/l を含む TB 液体培地 50 ml に 1 白金耳接種し、500 ml 容坂口フラスコを用いて 37°C で 16 時間振盪させた。得られた培養液を、pTB2 株の坂口フラスコ培養液 (TB 培地) とした。

[0115] 実施例7：2S, 4R-モナティン生成活性菌による2S, 4R-モナティン合成

(1) 細菌による2S, 4R-モナティン合成

ニュートリエントブロス (NB) 寒天培地、あるいはCM2G寒天培地 (酵母エキス 10g/l、ポリペプトン 10g/l、グルコース 5g/l、NaCl 5g/l、寒天 15g/l、pH7.0) に、*Rhizobium radiobacter* LAT1、*Rhizobium radiobacter* AJ11568、*Dietzia maris* AJ2788、*Stenotrophomonas* sp. AJ3447、*Stenotrophomonas* sp. AJ13127、*Pseudomonas chlororaphis* subsp. *chlororaphis* NBRC3904、*Micrococcus luteus* NBRC3067、*Stenotrophomonas* sp. AJ11634、*Pseudomonas putida* NBRC12668、*Ochrobactrum pseudogrignonense* AJ3735、*Stenotrophomonas* sp. AJ1591、*Stenotrophomonas* sp. AJ3839、*Brevundimonas diminuta* AJ3958、*Pseudomonas citronoclolis* ATCC13674、*Arthrobacter* sp. IAM1390、*Rhizobium* sp. AJ12469、*Rhizobium radiobacter* AJ2777、*Burkholderia* sp. AJ3084、*Microbacterium* sp. AJ2787、*Pseudomonas taetrolens* ATCC4683、*Rhizobium radiobacter* ATCC4452、*Rhizobium radiobacter* AJ2557、*Carnimonas* sp. AJ3230、*Rhizobium radiobacter* NBRC12667、*Pseudomonas fragi* NBRC3458、*Rhizobium radiobacte*

r NBRC12664、*Corynebacterium ammoniagenes* NBRC12072、*Pseudomonas* sp. AJ1594、*Rhizobium radiobacter* ATCC6466、*Pseudomonas synxantha* NBRC3912、*Rhizobium radiobacter* ATCC4720、または *Pseudomonas* sp. LMG2833を塗布し、30℃で2日間培養した。

[0116] 得られた菌体を酵素生産培地（酵母エキス 10g/l、ポリペプトン 10g/l、グルコース 1g/l、リン酸水素二カリウム 3g/l、リン酸二水素カリウム 1g/l、硫酸マグネシウム七水和物 0.1g/l、硫酸アンモニウム 5g/l）3mlに一白金耳接種し、試験管で30℃にて16時間振とう培養した。培養液2mlより菌体を遠心分離により集め、Tris-HCl (pH7.6) 20mMにて洗浄、懸濁し、菌体懸濁液を1ml調製した。

この菌体懸濁液1mlにガラスビーズ(0.1mm)を1g添加し、マルチビーズショッカー(安井器械)を用いて菌体を破碎した。得られた破碎液を遠心分離し、上清を菌体抽出液とした。

実施例1と同様にして、2S, 4R-モナティン合成反応および2S, 4R-モナティンの定量を行ったところ、2S, 4R-モナティンの生成量は以下の通りであった(表2)。

[0117]

[表2]

表 2. 2S, 4R-モナティンの生成量

菌	2S4R-モナティンの生成量
<i>Rhizobium radiobacter</i> LAT1	3.8 mM
<i>Rhizobium radiobacter</i> AJ1568	3.5 mM
<i>Dietzia maris</i> AJ2788	3.2 mM
<i>Stenotrophomonas</i> sp. AJ3447	2.7 mM
<i>Stenotrophomonas</i> sp. AJ13127	2.7 mM
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp. <i>chlororaphis</i> NBRC3904	2.6 mM
<i>Micrococcus luteus</i> NBRC3067	2.3 mM
<i>Stenotrophomonas</i> sp. AJ11634	2.2 mM
<i>Pseudomonas putida</i> NBRC12668	2.2 mM
<i>Ochrobactrum pseudogrignonense</i> AJ3735	2.2 mM
<i>Stenotrophomonas</i> sp. AJ1591	2.1 mM
<i>Stenotrophomonas</i> sp. AJ3839	2.1 mM
<i>Brevundimonas diminuta</i> AJ3958	2.0 mM
<i>Pseudomonas citroncololis</i> ATCC13674	1.9 mM
<i>Arthrobacter</i> sp. AJ1436	1.7 mM
<i>Rhizobium</i> sp. AJ12469	1.6 mM
<i>Rhizobium radiobacter</i> AJ2777	1.5 mM
<i>Burkholderia</i> sp. AJ3084	1.5 mM
<i>Microbacterium</i> sp. AJ2787	1.5 mM
<i>Pseudomonas taetrolens</i> ATCC4683	1.4 mM
<i>Rhizobium radiobacter</i> ATCC4452	1.4 mM
<i>Rhizobium radiobacter</i> AJ2557	1.4 mM
<i>Carnimonas</i> sp. AJ3230	1.4 mM
<i>Rhizobium radiobacter</i> NBRC12667	1.3 mM
<i>Pseudomonas fragi</i> NBRC3458	1.3 mM
<i>Rhizobium radiobacter</i> NBRC12664	1.3 mM
<i>Corynebacterium ammoniagenes</i> NBRC12072	1.2 mM
<i>Pseudomonas</i> sp. AJ1594	1.2 mM
<i>Rhizobium radiobacter</i> ATCC6466	1.2 mM
<i>Pseudomonas synxantha</i> NBRC3912	1.1 mM
<i>Rhizobium radiobacter</i> ATCC4720	1.1 mM
<i>Pseudomonas</i> sp. AJ2438	1.0 mM

[0118] (2) 放線菌による 2S, 4R-モナティン合成

YMPG寒天培地（酵母エキス 3g/l、麦芽エキス 3g/l、ポリペプトン 5g/l、グルコース 10g/l、寒天 15g/l、pH7.0）に *Nocardia globerulea* ATCC21022 を塗布し、30℃で2日間培養した。

得られた菌体を YMPG 培地（酵母エキス 3g/l、麦芽エキス 3g/l、ポリペプトン 5g/l、グルコース 10g/l、pH7.0）3ml に一白金耳接種し、試験管で 30℃にて 16 時間振とう培養した。培養液 2ml より菌体を遠心分離により集め、Tris-HCl (pH7.6) 20mMにて洗浄、懸濁し、菌体懸濁液を 1ml 調製した。

この菌体懸濁液 1ml にガラスビーズ (0.1mm) を 1g 添加し、マル

チビーズショッカー（安井器械）を用いて菌体を破碎した。得られた破碎液を遠心分離し、上清を菌体抽出液とした。

実施例1と同様にして、2S, 4R-モナティン合成反応および2S, 4R-モナティンの定量を行ったところ、2S, 4R-モナティンの生成量は以下の通りであった（表3）。

[0119] [表3]

表3. 2S, 4R-モナティンの生成量

菌	2S4R-モナティンの生成量
<i>Nocardia globerula</i> ATCC21022	0.57 mM

[0120] (3) 酵母による2S, 4R-モナティン合成

YPD寒天培地（酵母エキス 10g/l、ポリペプトン 20g/l、グルコース 20g/l、寒天 15g/l）に *Lodderomyces elongisporus* CBS2605、*Candida norvegensis* NBRC0970、*Candida inconspicua* NBRC0621、*Yarrowia lipolytica* NBRC0746 を塗布し、30℃で2日間培養した。

得られた菌体をYPD培地（酵母エキス 10g/l、ポリペプトン 20g/l、グルコース 20g/l）3mlに一白金耳接種し、試験管で30℃にて16時間振とう培養した。培養液2mlより菌体を遠心分離により集め、Tris-HCl (pH7.6) 20mMにて洗浄、懸濁し、菌体懸濁液を1ml調製した。

この菌体懸濁液1mlにガラスビーズ（0.5mm）を1g添加し、マルチビーズショッカー（安井器械）を用いて菌体を破碎した。得られた破碎液を遠心分離し、上清を菌体抽出液とした。

実施例1と同様にして、2S, 4R-モナティン合成反応および2S, 4R-モナティンの定量を行ったところ、2S, 4R-モナティンの生成量は以下の通りであった（表4）。

[0121]

[表4]

表4. 2S, 4R-モナティンの生成量

菌	2S4R-モナティンの生成量
Lodderomyces elongisporus CBS2605	0.57 mM
Candida norvegensis NBRC0970	0.55 mM
Candida inconspicua NBRC0621	0.52 mM
Yarrowia lypolytica NBRC0746	0.52 mM

[0122] 実施例8：2S, 4R-モナティンカリウム塩二水和物の製造

還元反応濃縮液101.40g（モナティン36.62g、125.28ミリモル含有、(2S, 4R) : (2R, 4R) = 32 : 68）にエタノール149.00gを加えた後、種晶として2R, 4R-モナティンカリウム塩一水和物0.25gを添加し、56℃、4時間攪拌し、2R, 4R-モナティンカリウム塩一水和物の優先晶析を行った。析出した結晶をろ過により分離し（湿結晶31.27g）、母液225.80gを得た（モナティン22.41g、76.68ミリモル含有、(2S, 4R) : (2R, 4R) = 53 : 47）。この母液を10℃に冷却した後、5時間攪拌し、2S, 4R-モナティンカリウム塩二水和物の晶析を行った。析出した結晶をろ過により分離し（湿結晶32.74g）、減圧乾燥後、目的とする2S, 4R-モナティンカリウム塩二水和物9.88g（15.68ミリモル）を得た（HPLC純度：55.5%）。この粗結晶9.35gを水25.37gに溶解し、その溶解液にエタノール58.99gを加え25℃にて5時間攪拌し、2S, 4R-モナティンカリウム塩二水和物の精晶析を行った。析出した結晶をろ過により分離し（湿結晶4.49g）、減圧乾燥後、目的とする2S, 4R-モナティンカリウム塩二水和物3.75g（9.62ミリモル）を得た（HPLC純度：96.0%）。

[0123] なお、得られた結晶（2S, 4R-モナティンカリウム塩二水和物）の含水量およびカリウム含量は、水分測定法、イオンクロマトグラフィーによるカチオン分析法により解析した。実施した水分測定法、カチオン分析法の詳細を以下に示す。

[0124] （水分測定法）

測定装置：平沼水分自動測定装置 AQV-2000（平沼産業（株）製）

測定条件：滴定液=Hydranal Composite 5K（Riedel de Haen社製）

[0125]（カチオン分析法）

装置：東ソーIC2001

カラム：TSKgel SuperIC-Cation（4.6×150 mm）

ガードカラム：TSKgel SuperIC-Cation（1 cm）

サプレッセル：TSKgel TSKsuppressIC-C

カラム温度：40℃

溶離液流量：0.7 ml/min.

サンプル注入量：30 μl

検出：電気伝導度

溶離液組成：2.2 mMメタンスルホン酸+1.0 mM18-クラウン-6-エーテル+0.5 mMヒスチジン混合水溶液

[0126] ^1H NMR（400 MHz, D_2O ） δ ：2.11（dd, $J=19.0$, 27.0 Hz, 1H）, 2.39（dd, $J=5.0$, 27.0 Hz, 1H）, 3.14（s, 2H）, 3.90（dd, $J=5.0$, 19.0 Hz, 1H）, 7.06（m, 1H）, 7.13（m, 1H）, 7.15（s, 1H）, 7.40（d, 8.5 Hz, 1H）, 7.6（d, 8.5 Hz, 1H）

ESI-MS計算値 $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_5=292.11$

ESI-MS分析値 $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_5=290.9$ [M-H]⁻

[0127] 実施例9：5-ニトロサリチルアルデヒドを用いた異性化反応

2S, 4R-モナティンカリウム塩二水和物0.15 g（0.38ミリモル）を70%エタノール水溶液10.0 gに添加し、60℃にて完全に溶解させた。その溶解液に5-ニトロサリチルアルデヒド7.6 mg（0.04

5ミリモル)、酢酸7.5 μ L(0.13ミリモル)を添加し60 $^{\circ}$ Cにて48時間攪拌した。反応液をHPLCにて分析し、定量を行ったところ、反応液中の2S,4R-モナティンと2R,4R-モナティンのモル比は、1:2.1であった。

[0128] 実施例10:ピリドキサル塩酸塩を用いた異性化反応

2S,4R-モナティンカリウム塩二水和物0.15g(0.38ミリモル)を70%エタノール水溶液10.0gに添加し、60 $^{\circ}$ Cにて完全に溶解させた。その溶解液にピリドキサル塩酸塩9.1mg(0.045ミリモル)、酢酸7.5 μ L(0.13ミリモル)を添加し60 $^{\circ}$ Cにて48時間攪拌した。反応液をHPLCにて分析し、定量を行ったところ、反応液中の2S,4R-モナティンと2R,4R-モナティンのモル比は、1:1.3であった。

[0129] 実施例11:5-リン酸ピリドキサル一水和物を用いた異性化反応

2S,4R-モナティンカリウム塩二水和物0.15g(0.38ミリモル)を70%エタノール水溶液10.0gに添加し、60 $^{\circ}$ Cにて完全に溶解させた。その溶解液に5-リン酸ピリドキサル一水和物12.8mg(0.048ミリモル)、酢酸7.5 μ L(0.13ミリモル)を添加し60 $^{\circ}$ Cにて48時間攪拌した。反応液をHPLCにて分析し、定量を行ったところ、反応液中の2S,4R-モナティンと2R,4R-モナティンのモル比は、1:1.1であった。

[0130] 実施例12:サリチルアルデヒドを用いた異性化反応

2S,4R-モナティンカリウム塩二水和物0.15g(0.38ミリモル)を70%エタノール水溶液10.0gに添加し、60 $^{\circ}$ Cにて完全に溶解させた。その溶解液にサリチルアルデヒド5.3mg(4.6 μ L,0.043ミリモル)、酢酸7.5 μ L(0.13ミリモル)を添加し60 $^{\circ}$ Cにて48時間攪拌した。反応液をHPLCにて分析し、定量を行ったところ、反応液中の2S,4R-モナティンと2R,4R-モナティンのモル比は、1:0.6であった。

[0131] 実施例 13 : 3, 5-ジクロロサリチルアルデヒドを用いた異性化反応

2 S, 4 R-モナティンカリウム塩二水和物 0.15 g (0.38 ミリモル) を 70% エタノール水溶液 10.0 g に添加し、60°C にて完全に溶解させた。その溶解液に 3, 5-ジクロロサリチルアルデヒド 8.1 mg (0.042 ミリモル)、酢酸 7.5 μ L (0.13 ミリモル) を添加し 60°C にて 48 時間攪拌した。反応液を HPLC にて分析し、定量を行ったところ、反応液中の 2 S, 4 R-モナティンと 2 R, 4 R-モナティンのモル比は、1 : 1.5 であった。

[0132] 実施例 14 : 2 S, 4 R-モナティンカリウム塩二水和物を出発原料とした異性化晶析による 2 R, 4 R-モナティンカリウム塩一水和物の製造

2 S, 4 R-モナティンカリウム塩二水和物を 20% エタノール水溶液に添加し、60°C にて完全に溶解させる。この溶解液に 5-ニトロサリチルアルデヒドを 2 S, 4 R-モナティンに対して 5 モル%、酢酸を 2 S, 4 R-モナティンに対して 30 モル% 添加し、48 時間攪拌する。この反応液 (2 S, 4 R-モナティン : 2 R, 4 R-モナティン = 1 : 2.1) にエタノール濃度が 70% となるようエタノールを添加した後、種晶として 2 R, 4 R-モナティンカリウム塩一水和物を反応液中の 2 R, 4 R-モナティンに対して 1% 添加し、60°C、48 時間攪拌し、異性化晶析を行う。析出した結晶をろ過により分離し、減圧乾燥後、目的とする 2 R, 4 R-モナティンカリウム塩一水和物を得る。

[0133] 実施例 15 : グリオキシル酸を用いた異性化反応

2 S, 4 R-モナティンカリウム塩二水和物 0.15 g (0.38 ミリモル) を 70% エタノール水溶液 10.0 g に添加し、60°C にて完全に溶解させた。その溶解液に グリオキシル酸 5.1 mg (0.069 ミリモル)、酢酸 7.5 μ L (0.13 ミリモル) を添加し 60°C にて 48 時間攪拌した。反応液を HPLC にて分析し、定量を行ったところ、反応液中の 2 S, 4 R-モナティンと 2 R, 4 R-モナティンのモル比は、1 : 0.07 であった。

[0134] 実施例 16 : A J 1 6 1 6 株由来 L - アミノ酸アミノトランスフェラーゼ (L A T) の変異体の作製と各種ケト酸に対する比活性測定

(1) 部位特異的変異による変異型 L A T 発現プラスミドの作製

部位特異的変異による変異型 A J 1 6 1 6 株由来 L A T 発現プラスミドの作製は、 S t r a t a g e n e 社製 Q u i k C h a n g e S i t e - D i r e c t e d M u t a g e n e s i s K i t のプロトコルに準拠して行った。目的とするヌクレオチド残基の変異 (置換) を導入し、かつ 2 本鎖 D N A の各々の鎖に相補的になるように設計した 1 セットの D N A プライマーを合成した。作製した変異体と作製に用いたプライマーのヌクレオチド配列をそれぞれ表 5、6 に示す。 p E T 2 2 - A J 1 6 1 6 L A T - H i s (C) を鋳型とし、以下の P C R 条件で変異型プラスミドを作製した。

1	c y c l e	9 5 ° C	1	m i n
1 8	c y c l e s	9 5 ° C	3 0	s e c
		5 5 ° C	1	m i n
		6 8 ° C	8	m i n
	c y c l e s 終了後	4 ° C		

[0135] メチル化 D N A を認識して切断する制限酵素 D p n I 処理 (3 7 ° C、1 h r) によって鋳型 p E T 2 2 - A J 1 6 1 6 L A T - H i s (C) を切断した後に、得られた反応液で E . c o l i J M 1 0 9 を形質転換した。形質転換体よりプラスミドを回収してヌクレオチド配列を決定し、目的とするヌクレオチド残基の変異 (置換) が導入されていることを確認した。 I D 1 3 6 は S 2 5 8 G / I 2 8 9 A の 2 重変異体であるが、 S 2 5 8 G 変異体プラスミドを作製後に、 I 2 8 9 A 変異導入用プライマーを用いて同様の操作を繰り返すことにより構築した。また、 I D 1 8 9 は K 3 9 R / T 2 8 8 G の 2 重変異体であるが、 I D 1 6 6 (T 2 8 8 G) 変異体プラスミドを作製後に、 K 3 9 R 変異導入用プライマーを用いて同様の操作を繰り返すことにより構築した。 I D 2 9 6 は Q 2 8 7 E / T 2 8 8 G の 2 重変異体であるが、 T 2 8 8 G 変異体プラスミドを作製後に、 Q 2 8 7 E / T 2 8 8 G 変異導入

用プライマーを用いて同様の操作を繰り返すことにより構築した。

[0136] [表5]

表 5. 作製した変異体

ID	変異体
ID136	S258G/I289A
ID166	T288G
ID189	K39R/T288G
ID296	Q287E/T288G

[0137] [表6]

表 6. 変異導入に用いたプライマーのヌクレオチド配列

変異	プライマー名	ヌクレオチド配列(配列番号)
K39R	K39R_FW	gacatgtctagaggcgctccttcacaaaacag(配列番号26)
	K39R_RV	ctgttttggtgaaggacgacctctagacatgctc(配列番号27)
S258G	S258G_FW	gttcgcctctactggtaaaattacgttccc(配列番号28)
	S258G_RV	gggaacgtaattttaccagtagaggcgaac(配列番号29)
T288G	T288G_FW	cagctatcagttcaaggcattggccagataaaaatc(配列番号30)
	T288G_RV	gattttatctggcccaatgccttgaactgatagctg(配列番号31)
I289A	I289A_FW	ctatcagttcaaacgcctggccagataaaaatc(配列番号32)
	I289A_RV	gattttatctggccagcggttgaactgatag(配列番号33)
Q287E/T288G	Q287E_T288G_FW	cagctatcagttgaaggcattggccag(配列番号34)
	Q287E_T288G_RV	ctggcccaatgccttcaactgatagctg(配列番号35)

[0138] (2) 変異型LATの発現および精製

得られた変異型AJ1616LAT発現プラスミドでE. coli JM109 (DE3) を形質転換し、変異型AJ1616LAT発現株を作製した。LB-amp (100mg/l) プレート上で生育させた変異型AJ1616LAT発現株、pET22-AJ1616LATmut-His(C) / E. coli JM109 (DE3) の菌体を、アンピシリン100mg/lを含むOvernight Express Instant TB Medium (Novagen) 100mlに植菌し、37℃で16時間、坂口フラスコを用いて振とう培養を行った。培養終了後、得られた培養液より菌体を遠心分離により集め、Tris-HCl (pH7.6) 20mM、NaCl 300mM、Imidazole 10mMにて洗浄、懸濁し、超音波破碎を行った。遠心分離により破碎液から菌体残渣を除き、得られた上清を可溶性画分とした。得られた可溶性画分を、Tris-HCl (pH7.6) 20mM、NaCl 300mM、Imidazole 1

0 mMで平衡化したHis-tagタンパク質精製カラムHis TALON superflow 5ml Cartridge (Clontech) に供して担体に吸着させた。担体に吸着しなかったタンパク質(非吸着タンパク質)をTris-HCl (pH7.6) 20 mM、NaCl 300 mM、Imidazole 10 mMを用いて洗い流した後、Tris-HCl (pH7.6) 20 mM、NaCl 300 mM、Imidazole 150 mMを用いて、5 ml/minの流速で吸着したタンパク質の溶出を行った。得られた画分を集めて、アミコン ウルトラ-15 30k (ミリポア)を用いて濃縮した。濃縮液をTris-HCl (pH7.6) 20 mMで希釈し、変異型AJ1616LAT溶液とした。必要に応じて、培養液量、His TALONカラムの連結数を増やして精製を行った。

[0139] (3) タンパク質の濃度の測定

タンパク質の濃度の測定は、ナカライテスク社のプロテインアッセイCB B溶液(5倍希釈して使用)を用いて行った。タンパク質の濃度は、0.05、0.1、0.25、0.5 mg/mlのBSA溶液をスタンダードとして検量線を作成することにより、算出した。

[0140] (4) 比色法でのL-Asp/ α -KG、L-Asp/PA及びL-Asp/ \pm MHOG活性測定

AJ1616LATの各種基質に対する活性測定を実施した。アミノ基転移反応のアミノドナー基質としては100 mM L-Aspを用い、10 mMの各種ケト酸に対する比活性を比色法で測定した。

L-Asp/ α -KG (α -ケトグルタル酸) 活性: L-Asp-Na 100 mM、 α -KG-2Na 10 mM、PLP 50 μ M、Tris-HCl (pH8.0) 100 mM、NADH 0.25 mM、MDH 2 U/ml、25°C。340 nmの減少から活性を算出。MDHはMalic Dehydrogenase from porcine heart (Sigma)を用いた。なお、L-Asp/ α -KG活性は、表9において、アミノトランスフェラーゼ活性の項目「 α -KG」に示す。

L-Asp/PA活性: L-Asp-Na 100mM、PA-Na 100mM、PLP 50 μ M、Tris-HCl (pH8.0) 100mM、NADH 0.25mM、MDH (上記と同様) 2U/ml、25 $^{\circ}$ C。340nmの減少から活性を算出。なお、L-Asp/PA活性は、表9において、アミノトランスフェラーゼ活性の項目「PA」に示す。

L-Asp/(\pm)-MHOG (4-hydroxy-4-methyl-2-ketoglutarate) 活性: L-Asp-Na 100mM、(\pm)-MHOG 10mM、PLP 50 μ M、Tris-HCl (pH8.0) 100mM、NADH 0.25mM、MDH 2U/ml、LDH 10U/ml、25 $^{\circ}$ C。340nmの減少から活性を算出。LDHはD-Lactate dehydrogenase from *Leucosporium mesenteroides* (オリエンタル酵母) を用いた。(\pm)-MHOGに微量に混在しているPAを除くため、LDHを添加した。なお、L-Asp/(\pm)-MHOG活性は、表9において、アミノトランスフェラーゼ活性の項目「 \pm MHOG」に示す。

[0141] (5) L-Asp/4R-IHOG及びL-Asp/IPA活性測定

目的活性である4R-IHOGからの2S, 4R-モノティン生成活性及びIPAからのL-Trp副生活性をそれぞれ測定した。アミノ基転移反応のアミノドナー基質としては100mM L-Aspを用い、10mMの各種ケト酸に対するアミノ基転移反応を行い、生成したアミノ酸量をUPLCないしHPLCで定量し、比活性を算出した。

L-Asp/4R-IHOG活性 (10mM) : L-Asp-Na 100mM、4R-IHOG 10mM (微量の4S-IHOG含む)、PLP 50 μ M、Tris-HCl (pH8.0) 100mM、25 $^{\circ}$ C。UPLC分析を行い、生成した2S, 4R-モノティン、2S, 4S-モノティンを定量した。反応停止液は200mM クエン酸Na溶液 (pH4.5) を用いた。なお、L-Asp/4R-IHOG活性は、表9において、アミノトランスフェラーゼ活性の項目「4R-IHOG」に示す。

L-Asp/IPA活性：L-Asp-Na 100mM、IPA 10mM、PLP 50 μ M、Tris-HCl (pH8.0) 100mM (pHは反応液作成後に1N NaOHで8.0に調整)、25 $^{\circ}$ C。UPLC分析を行い、生成したTrpを定量した。反応停止液は200mM クエン酸Na溶液 (pH4.5) を用いた。なお、L-Asp/IPA活性は、表9において、アミノトランスフェラーゼ活性の項目「IPA」に示す。

生成したモナティン及びTrpの定量はWaters社製 ACQUITY UPLCシステムを用いて定量した。測定条件を以下に示す。0.2mlで15分間反応を行ってから反応停止し、反応停止後の反応液を遠心し上清0.2ml程度をUPLC分析に供した。Sample-Blankが0.01-0.05mMの範囲に入る希釈段階で測定した結果を活性値として採用した。

[0142] [表7]

UPLC

Column : ACQUITY UPLC HSS T3 2.1 x 50 mm

Column Temp. : 40 $^{\circ}$ C

Sample Temp. : 4 $^{\circ}$ C

Detection : UV 210 nm

Injection vol. : 5 μ l

Mobile Phase A : 20 mM KH₂PO₄ (Filt.)

Mobile Phase B : ACN

Flow rate : 0.5 ml/min

Method : 20 mM KH₂PO₄_05_HSS

Time (min)	A (%)	B (%)
0	96	4
1.9	96	4
2.0	60	40
2.2	60	40
2.3	96	4
3.0	96	4

[0143] 2S, 4R-モナティンを1.1minに、2S, 4S-モナティンを1.5minに、またTrpを1.3minにそれぞれ分別定量できる。

[0144] また、以下の分析条件でHPLCを用いた定量も併せて実施した。

HPLC条件 (モナティン、Trp、IPA、IAA (インドール酢酸)、IAD (インドールアルデヒド) 定量用条件)

カラム : CAPCELL PAK C18 TYPE MGII 3 μ m 4.6mm x 150mm (資生堂)

カラム温度 : 40 $^{\circ}$ C

検出波長 : 280nm

流速：1.0 ml/min

移動層：A：20 mM KH₂PO₄/CH₃CN=100/5、B：C

H₃CN

[0145] [表8]

Time (min)	A (%)	B (%)
0	100	0
6	100	0
11	90	10
25	90	10
26	100	0
30	100	0

[0146] (6) AJ1616株LAT変異体の各種ケト酸に対する比活性測定結果

作製した変異体を用いて100 mM L-Aspをアミノドナーとした際の10 mM ケト酸に対する比活性測定結果を表9に示す。作製した変異体のいずれにおいても、目的とする4R-IHOGを基質とした2S, 4R-モナティン生成活性の向上が認められた。また、目的活性に対する副反応の相対値に関しても、いずれの変異体においても目的活性(2S, 4R-モナティン生成活性)に対するL-Trp副活性、MHG(4-hydroxy-4-methyl glutamate)副活性、L-Ala副活性の低下が認められた。

[0147] [表9]

表9. 変異体の各種ケト酸に対する比活性

ID	変異	アミノトランスフェラーゼ活性 (U/mg)					2S, 4R-モナティン(SR)生成活性に対する副反応の相対値		
		α -KG	PA	\pm MHOG	4R-IHOG	IPA	Trp/SR	MHG/SR	Ala/SR
WT	WT	235	0.45	1.3	0.92	0.11	0.12	1.45	0.49
136	S258G/I289A	14	0.06	0.09	6.8	0.54	0.08	0.01	0.01
166	T288G	184	0.23	2.1	6.7	0.28	0.04	0.31	0.03
189	K39R/T288G	90	0.23	1.6	9.7	0.31	0.03	0.17	0.02
296	Q287E/T288G	50	0.18	1.5	11.1	0.24	0.02	0.14	0.02

[0148] 実施例17：E. coli JM109 Δ aspC株の構築とデアミナーゼ発現ブロスの作製

E. coli JM109 Δ aspCは、以下の方法で構築した。E. coli JM109/pKD46をLB-amp(100 mg/l)プレー

ト上で30℃、一晩培養した。得られた菌体をLB (Amp 100mg/l、L-Arabinose 10mMを含む) 50mlに接種した。これを30℃で坂口フラスコを用いて振とう培養し、O.D. 610が0.6程度になったところで培養温度を37℃に変更し、さらに1時間振とう培養を行った。得られた培養液から遠心分離で集菌、10% Glycerolで洗浄し、再度遠心分離、集菌した。これを10% Glycerolで懸濁しコンピテントセルとした。

pMW118-attL-cat-attRを鋳型にして、プライマーaspC-L1 (5'-TTTGAGAACATTACCGCCGCTCCTGCCGACCCGATTCTGGGCtgaagcctgcttttttat-3' : 配列番号36) とプライマーaspC-R1 (5'-CAGCACTGCCACAATCGCTTCGCACAGCGGAGCCATGTATCcgctcaagttagtataaa-3' : 配列番号37) を用いてPCR増幅を行った。得られたPCR産物をアガロースから抽出し、aspC遺伝子破壊用DNA断片とした。PCRは、KOD-plus-ver. 2 (東洋紡) を用いて行った。

精製したDNA断片でコンピテントセルを形質転換し、目的の形質転換体を37℃、LB-Cm (20mg/l) プレート上で選択した。形質転換体のaspC遺伝子領域にattL-cat-attRが挿入されていることをコロニーPCRで確認した。用いたプライマーは、プライマーaspC-up (5'-AACCTCTTGGCAACGGTAAAAAAGCTGAAC-3' : 配列番号38) とプライマーattL-1 (5'-TAGTGACCTGTTCGTTGC-3' : 配列番号39)、プライマーaspC-down (5'-GCCTGCGCAAAGTCGTATGTTTGGTCTGGA-5' : 配列番号40) とプライマーattR-1 (5'-TTACGTTTCTCGTTCAGC-3' : 配列番号41) である。PCRは、Z-taq (TAKARA) を用いた。

得られた形質転換体をLB (Cm 20mg/l) 3mlに接種し、37

℃で6時間振とう培養した。得られた培養液から遠心分離で集菌、10% Glycerolで洗浄し、再度遠心分離、集菌した。これを10% Glycerolで懸濁しコンピテントセルとした。

ゲノムDNAに挿入されたCm耐性遺伝子配列を除去するため、pMW-intxistsで上記コンピテントセルを形質転換した。目的の形質転換体を30℃、LB-amp (100mg/l)プレート上で選択した。得られた形質転換体を42℃、LBプレート上で一晩培養し、次に菌体をLB-amp (100mg/l)プレート、LB-Cm (20mg/l)プレートにそれぞれストリークし37℃で培養した。Amp、Cmどちらのプレートでも生育しないことを確認し、さらにプライマーaspC-up (5'-AACCTCTTGGCAACGGTAAAAAAGCTGAAC-3' : 配列番号38)とプライマーaspC-down (5'-GCCTGCGCAAAGTCGTATGTTTGGTCTGGA-5' : 配列番号40)を用いたコロニーPCRによりCm耐性遺伝子の除去を確認した。PCRは、Z-taq (TAKARA)を用いた。

得られた株をaspC欠損株、E. coli JM109ΔaspCとした。また、デアミナーゼ発現株pTB2/E. coli JM109ΔaspCは、デアミナーゼ発現プラスミドpTB2でE. coli JM109ΔaspCを形質転換し、構築した。本菌株をLB-amp (100mg/l)プレート上で37℃、一晩培養した。得られた菌体をTB-amp (100mg/l) 100mlに植菌、坂口フラスコを用いて37℃で16時間振とう培養を行った。得られた培養液をPs_aad brothとして用いた。

[0149] 実施例18 : オキザロ酢酸デカルボキシラーゼ発現株の構築

Pseudomonas putida KT2440株由来OAA Decarboxylaseの遺伝子合成をGenScript社に依頼し、OAA Decarboxylase遺伝子を含むDNA断片がpUC57に挿入されたプラスミドDNAを得た。コドン使用頻度はE. coliでの

発現用に至適化された（配列番号42、43を参照）。このプラスミドをNdeI、XhoIで切断し、NdeI、XhoIで切断したpET22bに挿入、得られたプラスミドをpET22-PpODC-His(C)と命名した。得られたプラスミドでE. coli BL21(DE3)を形質転換し、PpODC-His(C)の発現株pET22-PpODC-His(C)/E. coli BL21(DE3)を得た。LB-amp(100mg/l)プレート上で生育させたPpODC-His(C)発現株、pET22-PpODC-His(C)/E. coli BL21(DE3)の菌体を、アンピシリン100mg/lを含むOvernight Express Instant TB Medium(Novagen)100mlに植菌し、30℃で16時間、坂口フラスコを用いて振とう培養を行った。培養終了後、得られた培養液より菌体を遠心分離により集め、Tris-HCl(pH7.6)20mM、NaCl300mM、Imidazole10mMにて洗浄、懸濁し、超音波破碎を行った。遠心分離により破碎液から菌体残渣を除き、得られた上清を可溶性画分とした。得られた可溶性画分を、Tris-HCl(pH7.6)20mM、NaCl300mM、Imidazole10mMで平衡化したHis-tagタンパク質精製カラムHis TALON superflow 5ml Cartridge(Clontech)に供して担体に吸着させた。担体に吸着しなかったタンパク質(非吸着タンパク質)をTris-HCl(pH7.6)20mM、NaCl300mM、Imidazole10mMを用いて洗い流した後、Tris-HCl(pH7.6)20mM、NaCl300mM、Imidazole150mMを用いて、5ml/minの流速で吸着したタンパク質の溶出を行った。得られた画分を集めて、アミコン ウルトラ-15 10k(ミリポア)を用いて濃縮した。濃縮液をTris-HCl(pH7.6)20mMで希釈し、PpODC溶液とした。

ODC活性の測定条件は以下に示す条件で行った。

OAA 10 mM、Tris-HCl (pH8.0) 100mM、NADH 0.25mM、LDH 10U/ml、25°C。340nmの減少から活性を算出した。LDHはD-Lactate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides* (オリエンタル酵母)を用いた。1mlスケールで反応、分析を行い測定結果 (Sample Δ 340 nm/min) - (Blank Δ 340 nm/min) の値が0.05-0.15の範囲に入る希釈段階での活性値を採用した。酵素の希釈にはTris-HCl (pH7.6) 20mM、BSA 0.01%を用いた。

[0150] 実施例19: L-Trp 100mMからの2S, 4R-モナティンのワンポット合成反応 (WT、ID136、ID166)

精製した変異型AJ1616LATを用いて、以下の条件で22時間反応を行った。反応は試験管を用いて1mlで行った。サンプリングは14、18、22時間後に行った。サンプルをTEバッファーで希釈し、アミコンウルトラ-0.5mL 遠心式フィルター10kDaを用いて限外ろ過、ろ液を分析した。分析にはHPLCを用いた。

[0151] 反応条件: L-Trp 100mM、PA-Na 50mM、L-Asp-Na 300mM、MgCl₂ 1mM、PLP 50 μ M、Tris-HCl 100mM、KPB 20mM、pH7.0、Ps__aadブロス 40%、SpAld精製酵素 0.2mg/ml、OAA DCase市販酵素10U/ml、変異型AJ1616LAT精製酵素 2U/ml (vs 10mM 4R-IHOG)、SOD 市販酵素200U/ml、25°C、140rpm。

[0152] 反応に供した酵素の調製法を下記に示す。

Ps__aadブロス: 実施例17に記載の方法に従って調製した。

SpAld精製酵素: 実施例6に記載の方法に従ってSpALD発現株のジャー培養を行い、さらに60°Cで1時間の熱処理を行った。得られた熱処理後の培養液100mlから、菌体を遠心分離により集め、Tris-HC

1 (pH 7.6) 20 mMにて洗浄、懸濁し、超音波破碎を行った。遠心分離により破碎液から菌体残渣を除き、得られた上清を可溶性画分とした。この可溶性画分が硫酸アンモニウム 1M、Tris-HCl (pH 7.6) 20 mMを含むよう、硫酸アンモニウム、Tris-HCl (pH 7.6) を添加した。この溶液を硫酸アンモニウム 1M、Tris-HCl (pH 7.6) 20 mMで平衡化した疎水性クロマトグラフィーカラム Hi Load 26/10 Phenyl Sepharose HP (GEヘルスケアバイオサイエンス社製、CV=53 ml) カラムに供して担体に吸着させた。担体に吸着しなかった非吸着タンパク質を硫酸アンモニウム 1M、Tris-HCl (pH 7.6) 20 mMを用いて洗い流した後、硫酸アンモニウム濃度を1Mから0Mまで直線的に変化させて、8 ml/minの流速で吸着したタンパク質の溶出を行った。活性が検出された画分を集めて、アミコン ウルトラ-15 10k (ミリポア) を用いて濃縮した。得られた濃縮液を、Tris-HCl (pH 7.6) 20 mMで希釈し、SpAld溶液とした。アルドラーゼ活性の測定には、PHOG分解活性測定法を用いた (PHOG 2 mM、KPB 50 mM、MgCl₂ 1 mM、NADH 0.25 mM、LDH 16 U/ml、25°C、pH 7.0、340 nmの減少から活性を算出)。LDHはD-Lactate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides* (オリエンタル酵母) を用いた。

変異型AJ1616LAT:LB-amp (100 mg/l) プレート上で生育させた変異型AJ1616LAT発現株、pET22-AJ1616LATmut-His (C) /E. coli JM109 (DE3) の菌体を、アンピシリン100 mg/lを含むOvernight Express Instant TB Medium (Novagen) 100 mlに植菌し、37°Cで16時間、坂口フラスコを用いて振とう培養を行った。培養終了後、得られた培養液より菌体を遠心分離により集め、Tris-HCl (pH 7.6) 20 mM、NaCl 300 mM、Imidazole

10 mMにて洗浄、懸濁し、超音波破碎を行った。遠心分離により破碎液から菌体残渣を除き、得られた上清を可溶性画分とした。得られた可溶性画分を、Tris-HCl (pH7.6) 20 mM、NaCl 300 mM、Imidazole 10 mMで平衡化したHis-tagタンパク質精製カラムHis TALON superflow 5ml Cartridge (Clontech) に供して担体に吸着させた。担体に吸着しなかったタンパク質 (非吸着タンパク質) をTris-HCl (pH7.6) 20 mM、NaCl 300 mM、Imidazole 10 mMを用いて洗い流した後、Tris-HCl (pH7.6) 20 mM、NaCl 300 mM、Imidazole 150 mMを用いて、5 ml/minの流速で吸着したタンパク質の溶出を行った。得られた画分を集めて、アミコン ウルトラ-15 30k (ミリポア) を用いて濃縮した。濃縮液をTris-HCl (pH7.6) 20 mMで希釈し、変異型AJ1616LAT溶液とした。必要に応じて、培養液量、His TALONカラムの連結数を増やして精製を行った。

OAA DCase: Oxaloacetate Decarboxylase from *Pseudomonas* sp. (Sigma) を用いた。酵素量 (U) は、メーカー記載の値を用いた。

SOD: Superoxide Dismutase from bovine liver (Sigma) を用いた。酵素量 (U) は、メーカー記載の値を用いた。

[0153] ワンポット反応の結果、作製したID136, ID166変異型酵素において、野生株と比較した2S, 4R-モナティン収率向上効果が認められた (表10)。

[0154]

[表10]

表10. 100 mM Trpを基質とした2S, 4R-モナティンのワンポット反応収率

ID	変異	2S, 4R-モナティンのワンポット反応収率 (対Trp収率 %)		
		14 hr	18 hr	22 hr
WT	WT	23	30	30
136	S258G/I289A	68	77	72
166	T288G	84	83	85

[0155] 実施例20: 100 mM Trpからの2S, 4R-モナティンのワンポット反応 (ID166, 400 mlスケール)

精製したAJ1616LAT-ID166を用いて、以下の条件で6時間反応を行った。反応は1 L容S-ジャーを用いて400 mlで行った。適宜サンプリングを行い、サンプルをTEバッファーで希釈し、アミコンウルトラ-0.5 mL 遠心式フィルター 10 kDaを用いて限外ろ過、ろ液を分析した。分析にはHPLCおよびキャピラリー電気泳動を用いた。

[0156] 反応条件: L-Trp 100 mM、PA-Na 50 mM、L-Asp-Na 300 mM、MgCl₂ 1 mM、PLP 50 μM、KPB (pH 7.6) 20 mM、pH < 7.6 (1M H₂SO₄)、Ps__aad broth 40%、SpAld broth 10%、PpODC 5 U/ml、AJ1616LAT-ID166 4 U/ml (vs 10 mM 4R-IHOG)、SOD 100 U/ml、25°C、500 rpm、Air 20 ml/min (1/20 vvm)。

[0157] Ps__aadブ罗斯はpTB2/E. coli JM109ΔaspCブ罗斯を用いた。SpAldブ罗斯は実施例19に記載の熱処理ブ罗斯を用いた。PpODCは実施例18に記載の精製酵素を用いた。SODはSuperoxide Dismutase from bovine liver (Sigma)を用いた。

[0158] その結果、6時間後に86 mM 2S, 4R-モナティンの蓄積が確認された (図4)。液量補正後に算出された対L-Trp収率は89%であった。

[0159] 実施例21: 150 mM L-Trpからの2S, 4R-モナティンワンポ

ット反応 (ID189, 80mlスケール)

精製したAJ1616LAT-ID189を用いて、以下の条件で27時間反応を行った。反応は250mL容S-ジャーを用いて80mlで行った。適宜サンプリングを行い、サンプルをTEバッファーで希釈し、アミコンウルトラ-0.5mL 遠心式フィルター 10kDaを用いて限外ろ過、ろ液を分析した。分析にはHPLCおよびキャピラリー電気泳動を用いた。

[0160] 反応条件: L-Trp 150mM、PA-Na 50mM、L-Asp-Na 400mM、MgCl₂ 1mM、PLP 50μM、KPB (pH 7.6) 20mM、pH<7.6 (1M H₂SO₄)、Ps__aad broth 40%、SpAld broth 10%、PpODC 5U/ml、AJ1616LAT-ID189 4U/ml (vs 10mM 4R-IHOG)、SOD 100U/ml、25°C、380rpm、Air 4ml/min (1/20vvm)。

Ps__aadブ罗斯はpTB2/E. coli JM109ΔaspCブ罗斯を用いた。SpAldブ罗斯は実施例19に記載の熱処理ブ罗斯を用いた。PpODCは実施例18に記載の精製酵素を用いた。SODはSuperoxide Dismutase from bovine liver (Sigma)を用いた。

[0161] その結果、27時間後に105mM 2S, 4R-モナティンの蓄積が確認された(図5)。液量補正後に算出された対L-Trp収率は78%であった(図5)。

[0162] 実施例22: 2S, 4R-モナティンの単離

実施例20の酵素反応液435.45g (ロット101213 J4)をUF (MWCO: 3000)処理して得られた透過液435.66gに、ZN炭2.59gを添加し、室温(約26°C)で1時間攪拌した。活性炭を桐山濾紙(5C)で濾過し、得られた濾過液を1L四つ口フラスコに移液した。そのフラスコを5°Cの恒温槽に浸漬し、35%塩酸でpHを3.5になるように中和し、メカニカルスタラーで攪拌した(120rpm)。種晶を4

8 mg 添加し、結晶が析出しはじめると溶液 pH が上昇するので、目標 pH を維持するように pH コントローラーとペリスターポンプを用いて 1 N 塩酸を逐次添加した。24 時間攪拌して得られたスラリー溶液を濾過し、水 10 mL で結晶洗浄を行った後、湿結晶を 40 °C で減圧乾燥して 2 S, 4 R-モナティン 6.81 g を取得した。得られた結晶を HPLC 及び ¹H-NMR 分析を行いその品質を確認した。

[0163] HPLC area 純度 (210 nm) : 98.4%

¹H-NMR (in D₂O + K₂CO₃)

2.08–2.14 (1H, dd), 2.35–2.39 (1H, dd),
3.09–3.17 (2H, dd), 3.85–3.88 (1H, dd),
7.04–7.15 (3H, m), 7.39–7.41 (1H, m), 7.
64–7.66 (1H, d)

[0164] 実施例 23 : 2 R, 4 R-モナティンの合成

水 3.27 g に実施例 22 で取得した 2 S, 4 R-モナティン 3.10 g (10.4 mmol) 及び 50% KOH 1.165 g (10.4 mmol) を溶解し、更に EtOH 1.3 g、5-ニトロサリチルアルデヒド 0.0869 g (0.052 mmol) 及び酢酸 0.187 g (3.12 mmol) を添加した。25 時間後に EtOH 20.5 g 及び種晶 (2 R, 4 R-モナティン) 10 mg を添加し、更に 46.5 時間攪拌した。得られたスラリー溶液を室温まで冷却してから濾過を行い、85% EtOH 水 4 g で結晶洗浄を行った後、湿結晶を 40 °C で減圧乾燥して粗 2 R, 4 R-モナティン 2.3 g を取得した。得られた粗 2 R, 4 R-モナティン 2.1 g を水 6 mL に溶解し BA 炭 0.2 g を添加して室温 (25 °C 前後) で 1 時間攪拌後、0.45 µm のメンブレンフィルターで処理液を濾過し、その濾過液を 6.38 g まで減圧濃縮した。45 °C で濃縮液に EtOH 12 g を滴下し 1 時間攪拌した。更に EtOH 13.5 g を 1 時間で定量滴下し、45 °C で 16 時間攪拌後、25 °C まで冷却した。得られたスラリー液を濾過し、85% EtOH 水 3 g で結晶洗浄を行った後、湿結晶を 40 °C で減

圧乾燥して2 R, 4 R-モノテン 1.9 g (5.46 mmol) を取得した。得られた結晶、母液、洗液をHPLCで分析し、収率及び品質解析を実施した。

[0165] HPLC area純度 (210 nm) : 99.9%

¹H-NMR (in D₂O)

1.93-2.00 (1H, dd), 2.57-2.61 (1H, dd),
2.99-3.02 (1H, d), 3.19-3.22 (1H, d) 3.55-3.56 (1H, dd), 7.04-7.15 (3H, m), 7.39-7.41 (1H, m), 7.64-7.66 (1H, d)

[0166] [表11]

HPLC分析条件

DEGASSER	DGU-20A ₃ [SHIMAZU]
PUMP	LC-20AD [SHIMAZU 2台]
Column oven	CTO-20AC [SHIMAZU]
DIODE ARRAY DETECTOR	SPD-M20A [SHIMAZU]
Auto sampler	SIL-20AC _{HT} [SHIMAZU]
COMMUNICATION BUS MODULE	CBM-20A
System	LC solution [SHIMAZU]
Column	CAPCELL PAC C18 Type MG II 5 μ m 3.0mm ϕ *250 mm [資生堂(株)製]
カラム温度	40 $^{\circ}$ C
検出波長	210 nm
流速	0.35 ml/min
移動液組成	A液 20 mM KH ₂ PO ₄ /CH ₃ CN = 100/5 B液 20 mM KH ₂ PO ₄ /CH ₃ CN = 30/70
注入量	5 μ L
オートサンプラー溶液	CH ₃ CN/H ₂ O = 30/70
グラジエントパターン	

時間(分)	A液 (%)	B液 (%)
0	100	0
15	100	0
40	46	54
45	46	54
45.1	100	0
60	100	0

[0167] 実施例24 150 mM L-Trpからの2 S, 4 R-モノテンワンポット反応 (ID296, 80 mlスケール)

精製したAJ1616LAT-ID296を用いて、以下の条件で51時間反応を行った。反応は250 ml容ジャーを用いて80 mlで行った。適宜サンプリングを行い、サンプルをTEバッファーで希釈し、アミコンウルトラ-0.5 mL遠心式フィルター 10 kDaを用いて限外ろ過、ろ液を分析した。分析にはHPLCを用いた。

[0168] 反応条件: L-Trp 150 mM、PA-Na 50 mM、L-Asp-Na 400 mM、MgCl₂ 1 mM、PLP 50 μ M、KPB (pH

7.6) 20 mM、pH < 7.6 (1 M H₂SO₄)、Ps__aad broth 40%、SpAld broth 10%、PpODC 5 U/ml、AJ1616LAT-ID296 4 U/ml (vs 10 mM 4R-IHOG)、SOD 100 U/ml、25°C、380 rpm、Air 4 ml/min (1/20 vvm)。

Ps__aad ブロスは pTB2/E. coli JM109 ΔaspC ブロスを用いた。SpAld ブロスは実施例 19 に記載の熱処理ブロスを用いた。PpODC は実施例 18 に記載の精製酵素を用いた。SOD は Superoxide Dismutase from bovine liver (Sigma) を用いた。

[0169] その結果、39 時間後に 113 mM 2S、4R-モノティン蓄積が確認された (図 6)。液量補正後に算出された対 L-Trp 収率は 86% であった (図 6)。

[0170] 実施例 25: Rhizobium radiobacter AJ3976 由来アミノトランスフェラーゼの精製

Rhizobium radiobacter AJ3976 の可溶性画分から、2S、4R-モノティンを生成するアミノトランスフェラーゼの精製を以下の通り行った。L-Asp-Na-1 aq 100 mM、4R-IHOG 10 mM (微量の 4S-IHOG 含む)、PLP 50 μM、Tris-HCl (pH 8.0) 100 mM、25°C で反応を行い、生成した 2S、4R-モノティンを UPLC 分析で定量した。

[表12-1]

UPLC

Column : ACQUITY UPLC HSS T3 2.1 x 50 mm

Column Temp. : 40°C

Sample Temp. : 4°C

Detection : UV 210 nm

Injection vol. : 5 μl

Mobile Phase A : 20 mM KH₂PO₄ (Filt.)

Mobile Phase B : ACN

Flow rate : 0.5 ml/min

Method : 20 mM KH₂PO₄_05_HSS

Time (min)	A (%)	B (%)
0	96	4
1.9	96	4
2.0	60	40
2.2	60	40
2.3	96	4
3.0	96	4

[0171] (1) 可溶性画分の調製

LB寒天培地に *Rhizobium radiobacter* AJ3976 を塗布し、30℃で2日間培養した。

得られた菌体を酵素生産培地（酵母エキス 10g/l、トリプトン 10g/l、グルコース 1g/l、リン酸水素二カリウム 3g/l、リン酸二水素カリウム 1g/l、硫酸マグネシウム七水和物 0.1g/l、硫酸アンモニウム 5g/l）160mlに一白金耳接種し、500ml容坂口フラスコで30℃にて20時間振とう培養した。得られた培養液約1920mlより菌体を遠心分離により集め、Tris-HCl (pH7.6)

20mMにて洗浄、懸濁し、4℃で30分間超音波破碎した。遠心分離により破碎液から菌体残渣を除き、得られた上清を可溶性画分とした。

[0172] (2) 陰イオン交換クロマトグラフィー

上記の可溶性画分を、Tris-HCl (pH7.6) 20mMで平衡化した陰イオン交換クロマトグラフィーカラムHiLoad 26/10Q Sepharose HP (GEヘルスケアバイオサイエンス製、CV=53ml) に供して担体に吸着させた。担体に吸着しなかったタンパク質（非吸着タンパク質）をTris-HCl (pH7.6) 20mMで洗い流した後、NaCl濃度を0mMから500mMまで直線的に変化させて、2ml/minの流速で吸着したタンパク質の溶出を行った。各溶出画分について2S, 4R-モノナティン生成活性を検出したところ、約250mM NaCl相当の画分に2S, 4R-モノナティン生成活性が認められた。

[0173] (3) 疎水性クロマトグラフィー

2S, 4R-モノナティン生成活性が検出された画分を集めて、硫酸アンモニウム 1.0M、Tris-HCl 20mM (pH7.6) となるよう、硫酸アンモニウム、Tris-HCl (pH7.6) を添加した。この溶液を硫酸アンモニウム 1.0M、Tris-HCl 20mM (pH7.6) で平衡化した疎水性クロマトグラフィーカラムHiLoad 16/10 Phenyl Sepharose HP (GEヘルスケアバイオサイ

エンス社製、CV=20ml) に供して担体に吸着させた。担体に吸着しなかった非吸着タンパク質を硫酸アンモニウム1.0M、Tris-HCl (pH7.6) 20mMを用いて洗い流した後、硫酸アンモニウム濃度を1.0Mから0Mまで直線的に変化させて、3ml/minの流速で2S, 4R-モナティン生成酵素を溶出させた。得られた各溶出画分について2S, 4R-モナティン生成活性を測定したところ、約0.9M硫酸アンモニウム相当の画分に2S, 4R-モナティン生成活性が認められた。

[0174] (4) ゲル濾過クロマトグラフィー

2S, 4R-モナティン生成活性が検出された画分を集めて、アミコンウルトラ-15 10k (ミリポア) を用いて濃縮した。得られた濃縮液を、Tris-HCl (pH7.6) 20mM、NaCl 150mMで希釈した。Tris-HCl (pH7.6) 20mM、NaCl 150mMで平衡化されたゲルろ過カラムHiLoad 16/60 Superdex 200 pg (GEヘルスケアバイオサイエンス製、CV=120ml) に供し、1ml/minの流速で溶出した。この操作により分子量約100kDaと見積もられる位置で2S, 4R-モナティン生成活性が確認された。

[0175] (5) SDS-PAGE

得られた画分をSDS-PAGEに供したところ、活性画分には47kDa付近にバンドが1本認められた。このバンドを、2S, 4R-モナティンを生成するアミノトランスフェラーゼの候補としてN末端アミノ酸配列解析に供した。

[0176] 実施例26: *Rhizobium radiobacter* AJ3976
由来アミノトランスフェラーゼのN末端アミノ酸配列決定

実施例25で得られた精製酵素溶液をN末端アミノ酸配列解析に供したところ、AFLADILSRVKPSATIAVTQ (配列番号44) のN末端アミノ酸配列が得られた。N末端アミノ酸配列は、*Agrobacterium tumefaciens* str. C58由来アスパラギン酸アミ

ノトランスフェラーゼ (AAK87940) と高い相同性を示した。

[0177] 実施例 27 : *Rhizobium radiobacter* AJ3976
由来アミノトランスフェラーゼ遺伝子のクローニング

実施例 25 と同様の方法で *Rhizobium radiobacter* AJ3976 を培養した。得られた培養液から遠心分離により集菌し、ゲノム DNA を抽出した。

得られたゲノム DNA を鋳型にして、アミノトランスフェラーゼ遺伝子を含む DNA 断片を PCR 増幅した。プライマーは、*Agrobacterium tumefaciens* str. C58 のゲノム DNA 配列を参考にして、アミノトランスフェラーゼ遺伝子の上流 100 bp と、下流 100 bp の DNA 配列から設計した、プライマー Ag-u100-f (5' -c t g g t g c a g a t a a g c c g g c t t t t g a c c -3' : 配列番号 45) およびプライマー Ag-d100-r (5' -c c a c c t t c a t c a t g c t g c t g t t t c t c g -3' : 配列番号 46) を用いた。PCR は、KOD-plus-ver. 2 (東洋紡) を用いて以下の条件で行った。

1	cycle	94°C、2min
25	cycles	98°C、10sec
		55°C、10sec
		68°C、60sec
1	cycle	68°C、60sec
		4°C

[0178] 増幅した約 1400 bp の DNA 断片の塩基配列を決定したところ、*Agrobacterium tumefaciens* str. C58 由来アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ遺伝子 (Atu2196) と相同性の高い、1203 bp の ORF を含む塩基配列が明らかとなった (配列番号 47、48)。相同性は DNA 配列で 92%、アミノ酸配列で 97% であった。

実施例26で得られたN末端アミノ酸配列とも一致したため、2S, 4R-モノテン生成活性を有するアミノトランスフェラーゼの遺伝子を取得できたと考えられた。

[0179] 実施例28: *E. coli*での*Rhizobium radiobacter* AJ3976由来アミノトランスフェラーゼ発現

(1) *Rhizobium radiobacter* AJ3976由来アミノトランスフェラーゼ発現プラスミドの構築

Rhizobium radiobacter AJ3976のゲノムDNAを鋳型にして、*Rhizobium radiobacter* AJ3976由来アミノトランスフェラーゼ遺伝子を含むDNA断片をPCR増幅した。プライマーは、プライマー3976AT-Nde-f (5' - g g a a t t c c a t A T G G C C T T C C T T G C C G A C A T T C T C T - 3' : 配列番号49) およびプライマー3976-xho-r (5' - a c t c c g c t c g a g A C G G C A A T C G G C G C A G A A A C G C T G A - 3' : 配列番号50) を用いた。PCRは、KOD-plus-ver. 2 (東洋紡) を用いて以下の条件で行った。

1 cycle	94°C、2min
25 cycles	98°C、10sec
	55°C、10sec
	68°C、60sec
1 cycle	68°C、60sec
	4°C

[0180] 得られたDNA断片をNdeI、XhoIで制限酵素処理し、同様にNdeI、XhoIで処理したpET-22b (Novagen) とライゲーションした。このライゲーション溶液で*E. coli* JM109を形質転換し、アンピシリン耐性株の中から目的のプラスミドを抽出し、このプラスミドをpET-22-3976AT-Hisと命名した。このプラスミドでは、C末端にHis-tagが付与された*Rhizobium radiob*

acter AJ3976由来アミノトランスフェラーゼ (3976AT-His) が発現する。

[0181] (2) E. coli 発現株からの3976AT-His精製

構築した発現プラスミドpET-22-3976AT-HisをE. coli BL21 (DE3) に導入し、形質転換体をアンピシリン100mg/lを含むOvernight Express Instant TB Medium (Novagen) 160mlに白金耳接種し、500ml容坂口フラスコを用いて37℃で16時間振盪させた。培養終了後、得られた培養液約1000mlより菌体を遠心分離により集め、Tris-HCl (pH7.6) 20mM、NaCl 100mM、Imidazole 20mMにて洗浄、懸濁し、4℃で30分間超音波破碎した。遠心分離により破碎液から菌体残渣を除き、得られた上清を可溶性画分とした。

得られた可溶性画分を、Tris-HCl (pH7.6) 20mM、NaCl 100mM、Imidazole 20mMで平衡化したHis-tagタンパク質精製カラムHisPrep FF 16/10 (ファルマシア (GEヘルスケアバイオサイエンス) 製、CV=20ml) に供して担体に吸着させた。担体に吸着しなかったタンパク質 (非吸着タンパク質) をTris-HCl (pH7.6) 20mM、NaCl 100mM、Imidazole 20mMで用いて洗い流した後、Imidazole濃度を20mMから250mMまで直線的に変化させて、3ml/minの流速で吸着したタンパク質の溶出を行った。

得られた画分を集めて、アミコン ウルトラ-15 30k (ミリポア) を用いて濃縮した。濃縮液を、Tris-HCl (pH7.6) 20mMで希釈し、Tris-HCl (pH7.6) 20mMで平衡化した陰イオン交換クロマトグラフィーカラムHiLoad 16/10 Q Sepharose HP (GEヘルスケアバイオサイエンス製、CV=20ml) に供して担体に吸着させた。担体に吸着しなかったタンパク質 (非吸着タンパク質) をTris-HCl (pH7.6) 20mMで用いて洗い流した

後、NaCl濃度を0mMから500mMまで直線的に変化させて、3ml/minの流速で吸着したタンパク質の溶出を行った。

各溶出画分について2S, 4R-モナティン生成活性を確認し、2S, 4R-モナティン生成活性が認められた画分を集めて、アミコン ウルトラ15 30k (ミリポア) を用いて濃縮した。濃縮液をTris-HCl (pH7.6) 20mMで希釈し、3976AT-His溶液とした。

[0182] 実施例29: AJ3976LATの各種ケト酸に対する比活性測定結果

(1) 比色法でのL-Asp/ α -KG、L-Asp/PA、およびL-Asp/(\pm)-MHOG活性測定

AJ3976LATの各種基質に対する活性測定を実施した。アミノ基転移反応のアミノドナー基質としては100mM L-Aspを用い、10mMの各種ケト酸に対する比活性を比色法で測定した。

L-Asp/ α -KG活性: L-Asp-Na-1aq 100mM、 α -KG-2Na 10mM、PLP 50 μ M、Tris-HCl (pH8.0) 100mM、NADH 0.25mM、MDH 2U/ml、25 $^{\circ}$ C。340nmの減少から活性を算出。MDHはMalic Dehydrogenase from porcine heart (Sigma) を用いた。なお、L-Asp/ α -KG活性は、表13において、アミノトランスフェラーゼ活性の項目「 α -KG」に示す。

L-Asp/PA活性: L-Asp-Na-1aq 100mM、PA-Na 10mM、PLP 50 μ M、Tris-HCl (pH8.0) 100mM、NADH 0.25mM、MDH (上記と同様) 2U/ml、25 $^{\circ}$ C。340nmの減少から活性を算出。なお、L-Asp/PA活性は、表13において、アミノトランスフェラーゼ活性の項目「PA」に示す。

L-Asp/(\pm)-MHOG活性: L-Asp-Na-1aq 100mM、(\pm)-MHOG 10mM、PLP 50 μ M、Tris-HCl (pH8.0) 100mM、NADH 0.25mM、MDH (上記と同様) 2U/ml、LDH 10U/ml、25 $^{\circ}$ C。340nmの減少から活性

を算出。LDHはD-Lactate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides* (オリエンタル酵母)を用いた。(±)-MHOGに微量に混在しているPAを除くため、LDHを添加した。なお、L-Asp/(±)-MHOG活性は、表13において、アミノトランスフェラーゼ活性の項目「±MHOG」に示す。

[0183] (2) L-Asp/4R-IHOG、L-Asp/(±)-IHOG、及びL-Asp/IPA活性測定

目的活性である4R-IHOGからの2S, 4R-モナティン生成活性、(±)-IHOGからの2S, 4R-モナティン及び2S, 4S-モナティン生成活性、及びIPAからのL-Trp副生活性をそれぞれ測定した。アミノ基転移反応のアミノドナー基質としては100mM L-Aspを用い、10mMの各種ケト酸に対するアミノ基転移反応を行い、生成したアミノ酸量をUPLCで定量し、比活性を算出した。

L-Asp/4R-IHOG活性：L-Asp-Na-1aq 100mM、4R-IHOG 10mM (微量の4S-IHOG含む)、PLP 50μM、Tris-HCl (pH8.0) 100mM、25℃。UPLC分析を行い、生成した2S, 4R-モナティン、2S, 4S-モナティンを定量した。反応停止液は200mM クエン酸Na溶液 (pH4.5)を用いた。なお、L-Asp/4R-IHOG活性は、表13において、アミノトランスフェラーゼ活性の項目「4R-IHOG」に示す。

L-Asp/(±)-IHOG活性：L-Asp-Na-1aq 100mM、(±)-IHOG 10mM、PLP 50μM、Tris-HCl (pH8.0) 100mM、25℃。UPLC分析を行い、生成した2S, 4R-モナティン、2S, 4S-モナティンを定量した。反応停止液は200mM クエン酸Na溶液 (pH4.5)を用いた。なお、L-Asp/4R-IHOG活性は、表13において、アミノトランスフェラーゼ活性の項目「±IHOG」に示す。

L-Asp/IPA活性：L-Asp-Na-1aq 100mM、IP

A 10 mM、PLP 50 μM、Tris-HCl (pH 8.0) 100 mM (pHは反応液作成後に1N NaOHで8.0に調整)、25℃。UPLC分析を行い、生成したTrpを定量した。反応停止液は200 mM クエン酸Na溶液 (pH 4.5) を用いた。なお、L-Asp/IPA活性は、表13において、アミノトランスフェラーゼ活性の項目「IPA」に示す。

生成したモナティン及びTrpの定量はWaters社製 ACQUITY UPLCシステムを用いて定量した。測定条件を以下に示す。0.2 mlで15分間反応を行ってから反応停止し、反応停止後の反応液を遠心し上清0.2 ml程度をUPLC分析に供した。

[0184] [表12-2]

UPLC

Column : ACQUITY UPLC HSS T3 2.1 x 50 mm
 Column Temp. : 40°C
 Sample Temp. : 4°C
 Detection : UV 210 nm
 Injection vol. : 5 μl
 Mobile Phase A : 20 mM KH2PO4 (Filt.)
 Mobile Phase B : ACN
 Flow rate : 0.5 ml/min
 Method : 20 mM KH2PO4_05_HSS

Time (min)	A (%)	B (%)
0	96	4
1.9	96	4
2.0	60	40
2.2	60	40
2.3	96	4
3.0	96	4

[0185] 2S, 4R-モナティンを1.1 minに、2S, 4S-モナティンを1.5 minに、またTrpを1.3 minにそれぞれ分別定量できる。

[0186] (3) AJ3976LATの各種ケト酸に対する比活性測定結果

3976-AT-Hisを用いて100 mM L-Aspをアミノドナーとした際の10 mM ケト酸に対する比活性測定結果を表13に示す。

[0187] [表13]

表13. AJ3976LATの各種ケト酸に対する比活性

アミノトランスフェラーゼ活性 (U/mg)							
α-KG	PA	±MHOG	4R-IHOG		±IHOG		IPA
			SR	SS	SR	SS	
106	4.0	48	0.58	1.5	0.052	3.7	0.012

[0188] 実施例30 : pET-22-3976AT-His/E. coli BL21 (DE3) を用いた2S, 4R-モナティン合成反応

実施例28で作製したpET-22-3976AT-His/E. coli BL21 (DE3) をアンピシリン100mg/lを含むOvernight Express Instant TB Medium (Novagen) 3mlに白金耳接種し、試験管を用いて37℃で16時間振盪させた。培養終了後、得られた培養液1mlより菌体を遠心分離により集め、1mlのBugBuster Master Mix (Novagen) に懸濁した。得られた懸濁液を室温にて15分間静置して溶菌させ、遠心分離により菌体残渣を除き、得られた上清を可溶性画分とした。

得られた可溶性画分を用いて4R-IHOGからの2S, 4R-モナティン合成反応を行った。反応液 [L-Asp-Na-1aq 100mM、4R-IHOG 10mM (微量の4S-IHOG含む)、PLP 50μM、Tris-HCl 100mM、pH8.0] 0.1mlに、上記の可溶性画分が0.05ml含まれるように加え、25℃で1時間反応させた。反応終了後、生成した2S, 4R-モナティンを定量したところ、0.84mMであった。2S, 4R-モナティンの定量は、UPLC分析により行った。分析条件は実施例29と同様である。

[0189] 実施例31: Rhizobium sp. AJ12469由来アミノトランスフェラーゼの精製

Rhizobium sp. AJ12469の可溶性画分から、2S, 4R-モナティンを生成するアミノトランスフェラーゼの精製を以下の通り行った。実施例25と同様にして、2S, 4R-モナティン合成反応および2S, 4R-モナティンの定量を行った。

[0190] (1) 可溶性画分の調製

LB寒天培地にRhizobium sp. AJ12469を塗布し、30℃で2日間培養した。

得られた菌体を酵素生産培地 (酵母エキス 10g/l、トリプトン 10g/l、グルコース 1g/l、リン酸水素二カリウム 3g/l、リン酸二水素カリウム 1g/l、硫酸マグネシウム七水和物 0.1g/l、

硫酸アンモニウム 5 g/l) 160 ml に一白金耳接種し、500 ml 容量瓶で30℃にて16時間振とう培養した。得られた培養液約1920 ml より菌体を遠心分離により集め、Tris-HCl (pH 7.6) 20 mMにて洗浄、懸濁し、4℃で30分間超音波破碎した。遠心分離により破碎液から菌体残渣を除き、得られた上清を可溶性画分とした。

[0191] (2) 陰イオン交換クロマトグラフィー

上記の可溶性画分を、Tris-HCl (pH 7.6) 20 mMで平衡化した陰イオン交換クロマトグラフィーカラムHiLoad 26/10 Q Sepharose HP (GEヘルスケアバイオサイエンス製、CV = 53 ml) に供して担体に吸着させた。担体に吸着しなかったタンパク質 (非吸着タンパク質) をTris-HCl (pH 7.6) 20 mMで洗流した後、NaCl濃度を0 mMから500 mMまで直線的に変化させて、8 ml/minの流速で吸着したタンパク質の溶出を行った。各溶出画分について2 S, 4 R-モナティン生成活性を検出したところ、約200 mM NaCl相当の画分に2 S, 4 R-モナティン生成活性が認められた。

[0192] (3) 疎水性クロマトグラフィー

2 S, 4 R-モナティン生成活性が検出された画分を集めて、硫酸アンモニウム 1.5 M、Tris-HCl 20 mM (pH 7.6) となるよう、硫酸アンモニウム、Tris-HCl (pH 7.6) を添加した。この溶液を硫酸アンモニウム 1.5 M、Tris-HCl 20 mM (pH 7.6) で平衡化した疎水性クロマトグラフィーカラムHiLoad 16/10 Phenyl Sepharose HP (GEヘルスケアバイオサイエンス社製、CV = 20 ml) に供して担体に吸着させた。担体に吸着しなかった非吸着タンパク質を硫酸アンモニウム1.5 M、Tris-HCl (pH 7.6) 20 mMを用いて洗流した後、硫酸アンモニウム濃度を1.5 Mから0 Mまで直線的に変化させて、3 ml/minの流速で2 S, 4 R-モナティン生成酵素を溶出させた。得られた各溶出画分について2 S, 4 R-モナティン生成活性を測定したところ、約0.8 M硫酸アンモニウム

相当の画分に2S, 4R-モナティン生成活性が認められた。

[0193] (4) ゲル濾過クロマトグラフィー

2S, 4R-モナティン生成活性が検出された画分を集めて、アミコンウルトラ-15 10k (ミリポア) を用いて濃縮した。得られた濃縮液を、Tris-HCl (pH7.6) 20mM、NaCl 150mMで希釈した。Tris-HCl (pH7.6) 20mM、NaCl 150mMで平衡化されたゲルろ過カラムHiLoad 16/60 Superdex 200 pg (GEヘルスケアバイオサイエンス製、CV=120ml) に供し、1ml/minの流速で溶出した。この操作により分子量約100kDaと見積もられる位置で2S, 4R-モナティン生成活性が確認された。

[0194] (5) 陰イオン交換クロマトグラフィー

2S, 4R-モナティン生成活性が検出された画分を集めて、Tris-HCl (pH7.6) 20mMで平衡化した陰イオン交換クロマトグラフィーカラムMono Q 5/5 (ファルマシア (GEヘルスケアバイオサイエンス) 製、CV=1ml) に供して担体に吸着させた。担体に吸着しなかったタンパク質 (非吸着タンパク質) をTris-HCl (pH7.6) 20mMで洗い流した後、NaCl濃度を0mMから500mMまで直線的に変化させて、0.5ml/minの流速で吸着したタンパク質の溶出を行った。各溶出画分について2S, 4R-モナティン生成活性を検出したところ、約300mM NaCl相当の画分に2S, 4R-モナティン生成活性が認められた。

[0195] (6) SDS-PAGE

得られた画分をSDS-PAGEに供したところ、活性画分には47kDa付近にバンドが認められた。このバンドを、2S, 4R-モナティンを生成するアミノトランスフェラーゼの候補としてN末端アミノ酸配列解析に供した。

[0196] 実施例32: Rhizobium sp. AJ12469由来アミノトラン

スフェラーゼのN末端アミノ酸配列決定

実施例31で得られた精製酵素溶液をN末端アミノ酸配列解析に供したところ、AFLADILSRVKPSATIAVTQ（配列番号51）のN末端アミノ酸配列が得られた。N末端アミノ酸配列は、*Agrobacterium tumefaciens* str. C58由来アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AAK87940）と高い相同性を示した。

[0197] 実施例33：Rhizobium sp. AJ12469由来アミノトランスフェラーゼ遺伝子のクローニング

実施例31と同様の方法で*Rhizobium radiobacter* AJ3976を培養した。得られた培養液から遠心分離により集菌し、ゲノムDNAを抽出した。

得られたゲノムDNAを鋳型にして、アミノトランスフェラーゼ遺伝子を含むDNA断片をPCR増幅した。プライマーは、*Agrobacterium tumefaciens* str. C58のゲノムDNA配列を参考にして、アミノトランスフェラーゼ遺伝子上流100bpと、下流100bpのDNA配列から設計した、プライマーAg-u100-f（5'-ctggtgcagataagccggcttttgacc-3'：配列番号45）およびプライマーAg-d100-r（5'-ccaccttcattcatgctgctgtttctcg-3'：配列番号46）を用いた。PCRは、KOD-plus-ver. 2（東洋紡）を用いて以下の条件で行った。

1	cycle	94°C、2min
25	cycles	98°C、10sec
		55°C、10sec
		68°C、60sec
1	cycle	68°C、60sec
		4°C

[0198] 増幅した約1400bpのDNA断片の塩基配列を決定したところ、Ag

robacterium tumefaciens str. C58由来アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ遺伝子 (Atu2196) と相同性の高い、1203bpのORFを含む塩基配列が明らかとなった (配列番号52、53)。相同性はDNA配列で97%、アミノ酸配列で99%であった。

実施例32で得られたN末端アミノ酸配列とも一致したため、2S、4Rモノチン生成活性を有するアミノトランスフェラーゼの遺伝子を取得できたと考えられた。

[0199] 実施例34 : *E. coli*での*Rhizobium* sp. AJ12469由来アミノトランスフェラーゼ発現

(1) *Rhizobium* sp. AJ12469由来アミノトランスフェラーゼ発現プラスミドの構築

Rhizobium sp. AJ12469のゲノムDNAを鋳型にして、*Rhizobium* sp. AJ12469由来アミノトランスフェラーゼ遺伝子を含むDNA断片をPCR増幅した。プライマーは、プライマー12469AT-Nde-f (5' -gggaattccatATGGCCTTCCTTGCCGACATTCTCT-3' : 配列番号54) およびプライマー12469-xho-r (5' -actccgctcgagGCGGCAATCGGCGCAGAAACGCTGA-3' : 配列番号55) を用いた。PCRは、KOD-plus-ver. 2 (東洋紡) を用いて以下の条件で行った。

1 cycle	94°C、2min
25 cycles	98°C、10sec
	55°C、10sec
	68°C、60sec
1 cycle	68°C、60sec
	4°C

[0200] 得られたDNA断片をNdeI、XhoIで制限酵素処理し、同様にNd

e l、X h o lで処理したp E T-2 2 b (N o v a g e n)とライゲーションした。このライゲーション溶液でE. c o l i J M 1 0 9を形質転換し、アンピシリン耐性株の中から目的のプラスミドを抽出し、このプラスミドをp E T-2 2-1 2 4 6 9 A T-H i sと命名した。このプラスミドでは、C末端にH i s-t a gが付与されたR h i z o b i u m s p. A J 1 2 4 6 9由来アミノトランスフェラーゼ(1 2 4 6 9 A T-H i s)が発現する。

[0201] (2) E. c o l i発現株からの1 2 4 6 9 A T-H i s精製

構築した発現プラスミドp E T-2 2-1 2 4 6 9 A T-H i sをE. c o l i B L 2 1 (D E 3)に導入し、形質転換体をアンピシリン1 0 0 m g/lを含むO v e r n i g h t E x p r e s s I n s t a n t T B M e d i u m (N o v a g e n) 1 6 0 m lに白金耳接種し、5 0 0 m l容坂口フラスコを用いて3 7℃で1 6時間振盪させた。培養終了後、得られた培養液約1 0 0 0 m lより菌体を遠心分離により集め、T r i s-H C l (p H 7. 6) 2 0 m M、N a C l 1 0 0 m M、I m i d o z o l e 2 0 m Mにて洗浄、懸濁し、4℃で3 0分間超音波破碎した。遠心分離により破碎液から菌体残渣を除き、得られた上清を可溶性画分とした。

得られた可溶性画分を、T r i s-H C l (p H 7. 6) 2 0 m M、N a C l 1 0 0 m M、I m i d o z o l e 2 0 m Mで平衡化したH i s-t a gタンパク質精製カラムH i s P r e p F F 1 6/1 0 (ファルマシア(G Eヘルスケアバイオサイエンス)製、C V=2 0 m l)に供して担体に吸着させた。担体に吸着しなかったタンパク質(非吸着タンパク質)をT r i s-H C l (p H 7. 6) 2 0 m M、N a C l 1 0 0 m M、I m i d o z o l e 2 0 m Mで用いて洗い流した後、I m i d a z o l e濃度を2 0 m Mから2 5 0 m Mまで直線的に変化させて、3 m l/m i nの流速で吸着したタンパク質の溶出を行った。

得られた画分を集めて、アミコン ウルトラ-1 5 3 0 k (ミリポア)を用いて濃縮した。濃縮液を、T r i s-H C l (p H 7. 6) 2 0 m Mで

希釈し、Tris-HCl (pH 7.6) 20 mMで平衡化した陰イオン交換クロマトグラフィーカラムHiLoad 16/10 Q Sepharose HP (GEヘルスケアバイオサイエンス製、CV=20 ml) に供して担体に吸着させた。担体に吸着しなかったタンパク質 (非吸着タンパク質) をTris-HCl (pH 7.6) 20 mMで用いて洗い流した後、NaCl濃度を0 mMから500 mMまで直線的に変化させて、3 ml/minの流速で吸着したタンパク質の溶出を行った。

各溶出画分について2S, 4R-モナティン生成活性を確認し、2S, 4R-モナティン生成活性が認められた画分を集めて、アミコン ウルトラ15 30k (ミリポア) を用いて濃縮した。濃縮液をTris-HCl (pH 7.6) 20 mMで希釈し、12469AT-His溶液とした。

[0202] 実施例35 : AJ12469LATの各種ケト酸に対する比活性測定結果

(1) 比色法でのL-Asp/ α -KG、L-Asp/PA、およびL-Asp/(\pm)-MHOG活性測定

AJ12469LATの各種基質に対する活性測定を実施した。アミノ基転移反応のアミノドナー基質としては100 mM L-Aspを用い、10 mMの各種ケト酸に対する比活性を比色法で測定した。

L-Asp/ α -KG活性 : L-Asp-Na-1 aq 100 mM、 α -KG-2 Na 10 mM、PLP 50 μ M、Tris-HCl (pH 8.0) 100 mM、NADH 0.25 mM、MDH 2 U/ml、25°C。340 nmの減少から活性を算出。MDHはMalic Dehydrogenase from porcine heart (Sigma) を用いた。なお、L-Asp/ α -KG活性は、表15において、アミノトランスフェラーゼ活性の項目「 α -KG」に示す。

L-Asp/PA活性 : L-Asp-Na-1 aq 100 mM、PA-Na 10 mM、PLP 50 μ M、Tris-HCl (pH 8.0) 100 mM、NADH 0.25 mM、MDH (上記と同様) 2 U/ml、25°C。340 nmの減少から活性を算出。なお、L-Asp/PA活性は、表

15において、アミノトランスフェラーゼ活性の項目「PA」に示す。

L-Asp / (±) -MHOG活性: L-Asp-Na-1 aq 100 mM、(±) -MHOG 10 mM、PLP 50 μM、Tris-HCl (pH 8.0) 100 mM、NADH 0.25 mM、MDH (上記と同様) 2 U/ml、LDH 10 U/ml、25°C。340 nmの減少から活性を算出。LDHはD-Lactate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides* (オリエンタル酵母) を用いた。(±) -MHOGに微量に混在しているPAを除くため、LDHを添加した。なお、L-Asp / (±) -MHOG活性は、表15において、アミノトランスフェラーゼ活性の項目「±MHOG」に示す。

[0203] (2) L-Asp / 4R-IHOG、L-Asp / (±) -IHOG、及び L-Asp / IPA活性測定

目的活性である4R-IHOGからの2S, 4R-モナティン生成活性、(±) -IHOGからの2S, 4R-モナティン及び2S, 4S-モナティン生成活性、及びIPAからのL-Trp副生活性をそれぞれ測定した。アミノ基転移反応のアミノドナー基質としては100 mM L-Aspを用い、10 mMの各種ケト酸に対するアミノ基転移反応を行い、生成したアミノ酸量をUPLCで定量し、比活性を算出した。

L-Asp / 4R-IHOG活性: L-Asp-Na-1 aq 100 mM、4R-IHOG 10 mM (微量の4S-IHOG含む)、PLP 50 μM、Tris-HCl (pH 8.0) 100 mM、25°C。UPLC分析を行い、生成した2S, 4R-モナティン、2S, 4S-モナティンを定量した。反応停止液は200 mM クエン酸Na溶液 (pH 4.5) を用いた。なお、L-Asp / 4R-IHOG活性は、表15において、アミノトランスフェラーゼ活性の項目「4R-IHOG」に示す。

L-Asp / (±) -IHOG活性: L-Asp-Na-1 aq 100 mM、(±) -IHOG 10 mM、PLP 50 μM、Tris-HCl (pH 8.0) 100 mM、25°C。UPLC分析を行い、生成した2S

、4 R-モノテン、2 S、4 S-モノテンを定量した。反応停止液は200 mM クエン酸Na溶液 (pH 4.5) を用いた。なお、L-Asp / (±)-IHOG活性は、表13において、アミノトランスフェラーゼ活性の項目「±IHOG」に示す。

L-Asp / IPA活性: L-Asp-Na-1 aq 100 mM、IPA 10 mM、PLP 50 μM、Tris-HCl (pH 8.0) 100 mM (pHは反応液作成後に1 N NaOHで8.0に調整)、25°C。UPLC分析を行い、生成したTrpを定量した。反応停止液は200 mM クエン酸Na溶液 (pH 4.5) を用いた。なお、L-Asp / IPA活性は、表15において、アミノトランスフェラーゼ活性の項目「IPA」に示す。

生成したモノテン及びTrpの定量はWaters社製 ACQUITY UPLCシステムを用いて定量した。測定条件を以下に示す。0.2 mlで15分間反応を行ってから反応停止し、反応停止後の反応液を遠心し上清0.2 ml程度をUPLC分析に供した。

[0204] [表14]

UPLC

Column : ACQUITY UPLC HSS T3 2.1 x 50 mm

Column Temp. : 40°C

Sample Temp. : 4°C

Detection : UV 210 nm

Injection vol. : 5 μl

Mobile Phase A : 20 mM KH₂PO₄ (Filt.)

Mobile Phase B : ACN

Flow rate : 0.5 ml/min

Method : 20 mM KH₂PO₄_05_HSS

Time (min)	A (%)	B (%)
0	96	4
1.9	96	4
2.0	60	40
2.2	60	40
2.3	96	4
3.0	96	4

[0205] 2 S、4 R-モノテンを1.1 minに、2 S、4 S-モノテンを1.5 minに、またTrpを1.3 minにそれぞれ分別定量できる。

[0206] (3) AJ12469LATの各種ケト酸に対する比活性測定結果

12469-AT-Hisを用いて100 mM L-Aspをアミノドナーとした際の10 mM ケト酸に対する比活性測定結果を表15に示す。

[0207]

[表15]

表15. AJ12469LATの各種ケト酸に対する比活性

アミノトランスフェラーゼ活性 (U/mg)							
α -KG	PA	\pm MHOG	4R-IHOG		\pm IHOG		IPA
			SR	SS	SR	SS	
96	4.8	44	0.56	1.6	0.066	3.3	0.016

[0208] 実施例36: pET-22-12469AT-His/E. coli BL21 (DE3) を用いた2S, 4R-モナティン合成反応

実施例34で作製したpET-22-12469AT-His/E. coli BL21 (DE3) をアンピシリン100mg/lを含むOvernight Express Instant TB Medium (Novagen) 3mlに白金耳接種し、試験管を用いて37°Cで16時間振盪させた。培養終了後、得られた培養液1mlより菌体を遠心分離により集め、1mlのBugBuster Master Mix (Novagen) に懸濁した。得られた懸濁液を室温にて15分間静置して溶菌させ、遠心分離により菌体残渣を除き、得られた上清を可溶性画分とした。

得られた可溶性画分を用いて4R-IHOGからの2S, 4R-モナティン合成反応を行った。反応液 [L-Asp-Na-1aq 100mM、4R-IHOG 10mM (微量の4S-IHOG含む)、PLP 50 μ M、Tris-HCl 100mM、pH8.0] 0.1mlに、上記の可溶性画分が0.05ml含まれるように加え、25°Cで1時間反応させた。反応終了後、生成した2S, 4R-モナティンを定量したところ、0.87mMであった。2S, 4R-モナティンの定量は、UPLC分析により行った。分析条件は実施例29と同様である。

[0209] 実施例37: Corynebacterium ammoniagenes AJ1444由来アミノトランスフェラーゼの精製

Corynebacterium ammoniagenes AJ1444の可溶性画分から、2S, 4R-モナティンを生成するアミノトランスフェラーゼの精製を以下の通り行った。実施例25と同様にして、2S, 4R-モナティン合成反応および2S, 4R-モナティンの定量を行った。

[0210] (1) 可溶性画分の調製

LB寒天培地に *Corynebacterium ammoniagenes* AJ1444 を塗布し、30°Cで2日間培養した。

得られた菌体を酵素生産培地（酵母エキス 10 g/l、トリプトン 10 g/l、グルコース 1 g/l、リン酸水素二カリウム 3 g/l、リン酸二水素カリウム 1 g/l、硫酸マグネシウム七水和物 0.1 g/l、硫酸アンモニウム 5 g/l）160 ml に一白金耳接種し、500 ml 容坂口フラスコで30°Cにて16時間振とう培養した。得られた培養液約1760 ml より菌体を遠心分離により集め、Tris-HCl (pH7.6)

20 mMにて洗浄、懸濁してガラスビーズを加え、マルチビーズショッカー（安井器械）にて菌体を破碎した。遠心分離により破碎液から菌体残渣を除き、得られた上清を可溶性画分とした。

[0211] (2) 硫安沈殿

上記の可溶性画分に硫酸アンモニウム90% (w/w) を含むよう、硫酸アンモニウムを添加し、遠心分離により硫安沈殿を得た。

[0212] (3) 疎水性クロマトグラフィー

上記の硫安沈殿を、硫酸アンモニウム 1.0M、Tris-HCl 20 mM (pH7.6) に懸濁した。この溶液を硫酸アンモニウム 1.0M、Tris-HCl 20 mM (pH7.6) で平衡化した疎水性クロマトグラフィーカラムHiLoad 26/10 Phenyl Sepharose HP (GEヘルスケアバイオサイエンス社製、CV=53 ml) に供して担体に吸着させた。担体に吸着しなかった非吸着タンパク質を硫酸アンモニウム 1.0M、Tris-HCl (pH7.6) 20 mMを用いて洗い流した後、硫酸アンモニウム濃度を1.0Mから0Mまで直線的に変化させて、3 ml/minの流速で2S, 4R-モナティン生成酵素を溶出させた。得られた各溶出画分について2S, 4R-モナティン生成活性を測定したところ、約0.2M硫酸アンモニウム相当の画分に2S, 4R-モナティン生成活性が認められた。

[0213] (4) 陰イオン交換クロマトグラフィー

2 S, 4 R-モナティン生成活性が検出された画分を集めて、Tris-HCl (pH 7.6) 20 mMで一晩透析した。得られた溶液を、Tris-HCl (pH 7.6) 20 mMで平衡化した陰イオン交換クロマトグラフィーカラムHi Load 16/10 Q Sepharose HP (GEヘルスケアバイオサイエンス製、CV=20 ml) に供して担体に吸着させた。担体に吸着しなかったタンパク質(非吸着タンパク質)をTris-HCl (pH 7.6) 20 mMで洗い流した後、NaCl濃度を0 mMから500 mMまで直線的に変化させて、2.25 ml/minの流速で吸着したタンパク質の溶出を行った。各溶出画分について2 S, 4 R-モナティン生成活性を検出したところ、約400 mM NaCl相当の画分に2 S, 4 R-モナティン生成活性が認められた。

[0214] (5) ゲル濾過クロマトグラフィー

2 S, 4 R-モナティン生成活性が検出された画分を集めて、アミコンウルトラ-15 10k (ミリポア) を用いて濃縮した。得られた濃縮液を、Tris-HCl (pH 7.6) 20 mM、NaCl 150 mMで希釈した。Tris-HCl (pH 7.6) 20 mM、NaCl 150 mMで平衡化されたゲルろ過カラムHi Load 16/60 Superdex 200 pg (GEヘルスケアバイオサイエンス製、CV=120 ml) に供し、1.2 ml/minの流速で溶出した。この操作により分子量約85 kDaと見積もられる位置で2 S, 4 R-モナティン生成活性が確認された。

[0215] (6) 陰イオン交換クロマトグラフィー

2 S, 4 R-モナティン生成活性が検出された画分を集めて、Tris-HCl (pH 7.6) 20 mMで平衡化した陰イオン交換クロマトグラフィーカラムMono Q 5/5 (ファルマシア (GEヘルスケアバイオサイエンス) 製、CV=1 ml) に供して担体に吸着させた。担体に吸着しなかったタンパク質(非吸着タンパク質)をTris-HCl (pH 7.6)

20 mMで洗い流した後、NaCl濃度を0 mMから500 mMまで直線的に変化させて、1 ml/minの流速で吸着したタンパク質の溶出を行った。各溶出画分について2 S, 4 R-モナティン生成活性を検出したところ、約400 mM NaCl相当の画分に2 S, 4 R-モナティン生成活性が認められた。

[0216] (7) SDS-PAGE

得られた画分をSDS-PAGEに供したところ、活性画分には43 kDa付近にバンドが認められた。このバンドを、2 S, 4 R-モナティンを生成するアミノトランスフェラーゼの候補としてN末端アミノ酸配列解析に供した。

[0217] 実施例38: *Corynebacterium ammoniagenes*

AJ1444由来アミノトランスフェラーゼのN末端アミノ酸配列決定

実施例37で得られた精製酵素溶液をN末端アミノ酸配列解析に供したところ、MSXIAQXILDQ (配列番号112) のN末端アミノ酸配列が得られた。N末端アミノ酸配列は、*Corynebacterium striatum* ATCC6940由来アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (ZP__03935516) や*Corynebacterium ammoniagenes* DSM20306由来アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (ZP__06838515) と高い相同性を示した。

[0218] 実施例39: *Corynebacterium ammoniagenes*

AJ1444由来アミノトランスフェラーゼ遺伝子のクローニング

実施例37と同様の方法で*Corynebacterium ammoniagenes* AJ1444を培養した。得られた培養液から遠心分離により集菌し、ゲノムDNAを抽出した。

得られたゲノムDNAを鋳型にして、アミノトランスフェラーゼ遺伝子を含むDNA断片をPCR増幅した。プライマーは、*Corynebacterium ammoniagenes* DSM20306のゲノムDNA配列を参考にして、アミノトランスフェラーゼ遺伝子の下流50 bpのDNA

配列から設計した、プライマーCo-d50-r (5' -cttccttggaacaagtcgaggaagac-3' : 配列番号56)、およびCorynebacterium striatum ATCC6940由来アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (ZP_03935516) とCorynebacterium ammoniagenes DSM20306由来アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (ZP_06838515) のゲノムDNA配列で相同性の高い部分配列を参考にして設計した、プライマーCo-800-f (5' -gctatcgcacaattccaccgcacctt-3' : 配列番号57) を用いた。PCRは、KOD-plus-ver. 2 (東洋紡) を用いて以下の条件で行った。

1 cycle	94°C、2min
25 cycles	98°C、10sec
	55°C、10sec
	68°C、60sec
1 cycle	68°C、60sec
	4°C

[0219] 増幅した約400bpのDNA断片の塩基配列を決定し、その配列を基にしてプライマーCo-890-r (5' -acatcgttaagcaagcgaaccaccag-3' : 配列番号58)、およびプライマーCo-1060-r (5' -gaaagacaagcgaatgtgggtgctcg-3' : 配列番号59) を設計し、LA PCR in vitro Cloning Kit (タカラ) を用いてPCRを行った。PCRは、KOD-plus-ver. 2 (東洋紡) を用いて以下の条件で行った。

1 cycle	94°C、2min
25 cycles	98°C、10sec
	55°C、10sec
	68°C、60sec
1 cycle	68°C、60sec

4°C

[0220] その結果、*Corynebacterium ammoniagenes* DSM20306由来アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ遺伝子（HMPREF0281_02480）と相同性の高い、1134bpのORFを含む塩基配列が明らかとなった（配列番号60、61）。相同性はDNA配列で76%、アミノ酸配列で82%であった。

実施例38で得られたN末端アミノ酸配列とも一致したため、2S、4R-モノティン生成活性を有するアミノトランスフェラーゼの遺伝子を取得できたと考えられた。

[0221] 実施例40：E. coliでの*Corynebacterium ammoniagenes* AJ1444由来アミノトランスフェラーゼ発現

(1) *Corynebacterium ammoniagenes* AJ1444由来アミノトランスフェラーゼ発現プラスミドの構築

Corynebacterium ammoniagenes AJ1444のゲノムDNAを鋳型にして、*Corynebacterium ammoniagenes* AJ1444由来アミノトランスフェラーゼ遺伝子を含むDNA断片をPCR増幅した。プライマーは、プライマー1444A T-Nde-f（5' -ggaattccatATGAGCCACATCGCTCAACGCATCC-3'：配列番号62）およびプライマー1444-xho-r（5' -actccgctcgagGGACTTTTCGAAGTATTGGCGAATG-3'：配列番号63）を用いた。PCRは、KOD-plus-ver. 2（東洋紡）を用いて以下の条件で行った。

1 cycle	94°C、2min
25 cycles	98°C、10sec
	55°C、10sec
	68°C、60sec
1 cycle	68°C、60sec

4°C

[0222] 得られたDNA断片をNde I、Xho Iで制限酵素処理し、同様にNde I、Xho Iで処理したpET-22b (Novagen)とライゲーションした。このライゲーション溶液でE. coli JM109を形質転換し、アンピシリン耐性株の中から目的のプラスミドを抽出し、このプラスミドをpET-22-1444AT-Hisと命名した。このプラスミドでは、C末端にHis-tagが付与されたCorynebacterium ammoniagenes AJ1444由来アミノトランスフェラーゼ(1444AT-His)が発現する。

[0223] (2) E. coli発現株からの1444AT-His精製

構築した発現プラスミドpET-22-1444AT-HisをE. coli BL21 (DE3)に導入し、形質転換体をアンピシリン100mg/lを含むOvernight Express Instant TB Medium (Novagen) 160mlに白金耳接種し、500ml容坂口フラスコを用いて37℃で16時間振盪させた。培養終了後、得られた培養液約1000mlより菌体を遠心分離により集め、Tris-HCl (pH7.6) 20mM、NaCl 300mM、Imidazole 10mMにて洗浄、懸濁し、4℃で30分間超音波破碎した。遠心分離により破碎液から菌体残渣を除き、得られた上清を可溶性画分とした。

得られた可溶性画分を、Tris-HCl (pH7.6) 20mM、NaCl 300mM、Imidazole 10mMで平衡化したHis-tagタンパク質精製カラムHis TALON superflow 5ml Cartridge (Clontech)に供して担体に吸着させた。担体に吸着しなかったタンパク質(非吸着タンパク質)をTris-HCl (pH7.6) 20mM、NaCl 300mM、Imidazole 10mMで用いて洗い流した後、Tris-HCl (pH7.6) 20mM、NaCl 300mM、Imidazole 150mMを用いて5ml/minの流速で吸着したタンパク質の溶出を行った。

得られた画分を集めて、アミコン ウルトラ-15 30k (ミリポア)

を用いて濃縮した。濃縮液を、Tris-HCl (pH 7.6) 20 mMで希釈し、Tris-HCl (pH 7.6) 20 mMで平衡化した陰イオン交換クロマトグラフィーカラムHiLoad 16/10 Q Sepharose HP (GEヘルスケアバイオサイエンス製、CV=20 ml) に供して担体に吸着させた。担体に吸着しなかったタンパク質 (非吸着タンパク質) をTris-HCl (pH 7.6) 20 mMで用いて洗い流した後、NaCl濃度を0 mMから500 mMまで直線的に変化させて、3 ml/minの流速で吸着したタンパク質の溶出を行った。

各溶出画分について2S, 4R-モナティン生成活性を確認し、2S, 4R-モナティン生成活性が認められた画分を集めて、アミコン ウルトラ15 30k (ミリポア) を用いて濃縮した。濃縮液をTris-HCl (pH 7.6) 20 mMで希釈し、1444AT-His溶液とした。

[0224] 実施例41 : AJ1444LATの各種ケト酸に対する比活性測定結果

(1) 比色法でのL-Asp/ α -KG、L-Asp/PA、L-Asp/ \pm -MHOG、L-Glu/PA、およびL-Glu/ \pm MHOG活性測定

AJ1444LATの各種基質に対する活性測定を実施した。アミノ基転移反応のアミノドナー基質としては100 mM L-AspまたはL-Gluを用い、10 mMの各種ケト酸に対する比活性を比色法で測定した。

L-Asp/ α -KG活性 : L-Asp-Na-1 aq 100 mM、 α -KG-2 Na 10 mM、PLP 50 μ M、Tris-HCl (pH 8.0) 100 mM、NADH 0.25 mM、MDH 2 U/ml、25°C。340 nmの減少から活性を算出。MDHはMalic Dehydrogenase from porcine heart (Sigma) を用いた。なお、L-Asp/ α -KG活性は、表17において、アミノトランスフェラーゼ活性の項目「 α -KG」に示す。

L-Asp/PA活性 : L-Asp-Na-1 aq 100 mM、PA-Na 10 mM、PLP 50 μ M、Tris-HCl (pH 8.0) 10

0 mM、NADH 0.25 mM、MDH (上記と同様) 2 U/ml、25 °C。340 nmの減少から活性を算出。なお、L-Asp/PA活性は、表17において、アミノトランスフェラーゼ活性の項目「PA」に示す。

L-Asp/ (±) -MHOG活性: L-Asp-Na-1 aq 100 mM、(±) -MHOG 10 mM、PLP 50 μM、Tris-HCl (pH 8.0) 100 mM、NADH 0.25 mM、MDH (上記と同様) 2 U/ml、LDH 10 U/ml、25 °C。340 nmの減少から活性を算出。LDHはD-Lactate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides* (オリエンタル酵母) を用いた。(±) -MHOGに微量に混在しているPAを除くため、LDHを添加した。なお、L-Asp/ (±) -MHOG活性は、表17において、アミノトランスフェラーゼ活性の項目「±MHOG」に示す。

L-Glu/PA活性: L-Glu-Na 100 mM、PA 10 mM、PLP 50 μM、Tris-HCl (pH 8.0) 100 mM、NH₄Cl 100 mM、NADH 0.25 mM、GDH 10 U/ml、25 °C。340 nmの減少から活性を算出。GDHはL-Glutamic Dehydrogenase from bovine liver (Sigma) を用いた。なお、L-Glu/PA活性は、表17において、アミノトランスフェラーゼ活性の項目「PA」に示す。

L-Glu/ (±) -MHOG活性: L-Glu-Na 100 mM、(±) -MHOG 10 mM、PLP 50 μM、Tris-HCl (pH 8.0) 100 mM、NH₄Cl 100 mM、NADH 0.25 mM、GDH 10 U/ml、25 °C。340 nmの減少から活性を算出。なお、L-Glu/ (±) -MHOG活性は、表17において、アミノトランスフェラーゼ活性の項目「±MHOG」に示す。

[0225] (2) L-Asp/4R-IHOG、L-Asp/ (±) -IHOG、L-Asp/IPA、L-Glu/4R-IHOG、およびL-Glu/IPA 活性測定

目的活性である4R-IHOGからの2S, 4R-モノティン生成活性、(±)-IHOGからの2S, 4R-モノティン及び2S, 4S-モノティン生成活性、及びIPAからのL-Trp副生活性をそれぞれ測定した。アミノ基転移反応のアミノドナー基質としては100mM L-AspまたはL-Gluを用い、10mMの各種ケト酸に対するアミノ基転移反応を行い、生成したアミノ酸量をUPLCで定量し、比活性を算出した。

L-Asp/4R-IHOG活性：L-Asp-Na-1aq 100mM、4R-IHOG 10mM（微量の4S-IHOG含む）、PLP 50μM、Tris-HCl (pH8.0) 100mM、25℃。UPLC分析を行い、生成した2S, 4R-モノティン、2S, 4S-モノティンを定量した。反応停止液は200mM クエン酸Na溶液 (pH4.5) を用いた。なお、L-Asp/4R-IHOG活性は、表17において、アミノトランスフェラーゼ活性の項目「4R-IHOG」に示す。

L-Asp/(±)-IHOG活性：L-Asp-Na-1aq 100mM、(±)-IHOG 10mM、PLP 50μM、Tris-HCl (pH8.0) 100mM、25℃。UPLC分析を行い、生成した2S, 4R-モノティン、2S, 4S-モノティンを定量した。反応停止液は200mM クエン酸Na溶液 (pH4.5) を用いた。なお、L-Asp/(±)-IHOG活性は、表17において、アミノトランスフェラーゼ活性の項目「±IHOG」に示す。

L-Asp/IPA活性：L-Asp-Na-1aq 100mM、IPA 10mM、PLP 50μM、Tris-HCl (pH8.0) 100mM (pHは反応液作成後に1N NaOHで8.0に調整)、25℃。UPLC分析を行い、生成したTrpを定量した。反応停止液は200mM クエン酸Na溶液 (pH4.5) を用いた。なお、L-Asp/IPA活性は、表17において、アミノトランスフェラーゼ活性の項目「IPA」に示す。

L-Glu/4R-IHOG活性：L-Glu-Na 100mM、4R

- I H O G 10 mM (微量の4 S - I H O G含む)、P L P 50 μM、T r i s - H C l (p H 8.0) 100 mM、25°C。U P L C分析を行い、生成した2 S, 4 R - モナティン、2 S, 4 S - モナティンを定量した。反応停止液は200 mM クエン酸Na溶液 (p H 4.5) を用いた。なお、L - G l u / 4 R - I H O G活性は、表17において、アミノトランスフェラーゼ活性の項目「4 R - I H O G」に示す。

L - G l u / I P A活性 : L - G l u - N a 100 mM、I P A 10 mM、P L P 50 μM、T r i s - H C l (p H 8.0) 100 mM (p Hは反応液作成後に1 N N a O Hで8.0に調整)、25°C。U P L C分析を行い、生成したT r pを定量した。反応停止液は200 mM クエン酸Na溶液 (p H 4.5) を用いた。なお、L - G l u / I P A活性は、表17において、アミノトランスフェラーゼ活性の項目「I P A」に示す。

[0226] 生成したモナティン及びT r pの定量はW a t e r s社製 A C Q U I T Y U P L Cシステムを用いて定量した。測定条件を以下に示す。0.2 mlで15分間反応を行ってから反応停止し、反応停止後の反応液を遠心し上清0.2 ml程度をU P L C分析に供した。

[0227] [表16]

UPLC

Column : ACQUITY UPLC HSS T3 2.1 x 50 mm
 Column Temp. : 40°C
 Sample Temp. : 4°C
 Detection : UV 210 nm
 Injection vol. : 5 μl
 Mobile Phase A : 20 mM KH₂PO₄ (Filt.)
 Mobile Phase B : ACN
 Flow rate : 0.5 ml/min
 Method : 20 mM KH₂PO₄_05_HSS

Time (min)	A (%)	B (%)
0	96	4
1.9	96	4
2.0	60	40
2.2	60	40
2.3	96	4
3.0	96	4

[0228] 2 S, 4 R - モナティンを1.1 minに、2 S, 4 S - モナティンを1.5 minに、またT r pを1.3 minにそれぞれ分別定量できる。

[0229] (3) A J 1 4 4 4 L A Tの各種ケト酸に対する比活性測定結果
 1 4 4 4 - A T - H i sを用いて100 mM L - A s pをアミノドナーとした際の10 mM ケト酸に対する比活性測定結果を表17に示す。

[0230] [表17]

表17. AJ1444LATの各種ケト酸に対する比活性

	アミノトランスフェラーゼ活性 (U/mg)							IPA
	α -KG	PA	\pm MHOG	4R-IHOG		\pm IHOG		
				SR	SS	SR	SS	
L-Asp	4.0	1.7	2.7	2.4	0.26	0.91	1.7	0.085
L-Glu	-	8.7	145	200	15	-	-	0.21

[0231] 実施例42: pET-22-1444AT-His/E. coli BL21 (DE3) を用いた2S, 4R-モナティン合成反応

実施例40で作製したpET-22-1444AT-His/E. coli BL21 (DE3) をアンピシリン100mg/lを含むOvernight Express Instant TB Medium (Novagen) 3mlに白金耳接種し、試験管を用いて37°Cで16時間振盪させた。培養終了後、得られた培養液1mlより菌体を遠心分離により集め、1mlのBugBuster Master Mix (Novagen) に懸濁した。得られた懸濁液を室温にて15分間静置して溶菌させ、遠心分離により菌体残渣を除き、得られた上清を可溶性画分とした。

得られた可溶性画分を用いて4R-IHOGからの2S, 4R-モナティン合成反応を行った。反応液 [L-Asp-Na-1aq 100mM、4R-IHOG 10mM (微量の4S-IHOG含む)、PLP 50 μ M、Tris-HCl 100mM、pH8.0] 0.1mlに、上記の可溶性画分が0.05ml含まれるように加え、25°Cで15分間反応させた。反応終了後、生成した2S, 4R-モナティンを定量したところ、0.13mMであった。2S, 4R-モナティンの定量は、UPLC分析により行った。分析条件は実施例29と同様である。

[0232] 実施例43: L-Trp 20mMからの2S, 4R-モナティンのワンポット合成反応 (AJ3976LAT、AJ12469LAT、AJ1444LAT)

精製した3976AT-His、12469AT-His、および1444AT-Hisを用いて、以下の条件で12時間反応を行った。反応は試験

管を用いて1mlで行った。適宜サンプリングを行い、サンプルをTEバッファーで希釈し、アミコンウルトラ-0.5mL遠心式フィルター10kDa(ミリポア)を用いて限外ろ過、ろ液を分析した。分析にはHPLCおよびキャピラリー電気泳動を用いた。

[0233] 反応条件：L-Trp 20mM、PA-Na 40mM、L-Asp-Na-1aq 160mM、MgCl₂ 1mM、PLP 50μM、Tris-HCl 100mM、KPB 20mM、pH7.0、Ps__aadブロス 20%、SpAld精製酵素 30U/ml、OAA DCase市販酵素10U/ml、LAT精製酵素 2U/ml (vs 10mM 4R-IHOG)、SOD市販酵素200U/ml、25℃、120rpm。

[0234] 反応に供した酵素の調製法を下記に示す。

Ps__aadブロス：実施例17に記載の方法に従って調製した。

SpAld精製酵素：実施例19に記載の方法に従って調整した。

AJ3976LAT、AJ12469LAT、AJ1444LAT：実施例28、34、40に記載の方法に従って調製した。

OAA DCase：Oxaloacetate Decarboxylase from *Pseudomonas* sp. (Sigma)を用いた。酵素量(U)は、メーカー記載の値を用いた。

SOD：Superoxide Dismutase from bovine liver (Sigma)を用いた。酵素量(U)は、メーカー記載の値を用いた。

[0235] ワンポット反応の結果、AJ3976LAT、AJ12469LAT、AJ1444LATにおいて、それぞれ4時間後に2S、4R-モナティンが12mM、11mM、13mM生成し、対L-Trp収率はそれぞれ58%、53%、64%であった。

[0236] 実施例44：50mM Trpからの2S、4R-モナティンのワンポット合成反応(AJ3976、80mlスケール)

精製した3976AT-Hisを用いて、以下の条件で12時間反応を行

った。反応は250ml容ミニジャーを用いて80mlで行った。適宜サンプリングを行い、サンプルをTEバッファーで希釈し、アミコンウルトラ0.5mL遠心式フィルター10kDa(ミリポア)を用いて限外ろ過、ろ液を分析した。分析にはHPLCおよびキャピラリー電気泳動を用いた。

[0237] 反応条件：L-Trp 50mM、PA-Na 50mM、L-Asp-Na-1aq 200mM、MgCl₂ 1mM、PLP 50μM、Tris-HCl (pH7.6) 100mM、KPB (pH7.6) 20mM、GD113K 0.0025%、pH<7.6 (1M H₂SO₄)、Ps__aad broth 20%、SpAld精製酵素 30U/ml、OAA DCase市販酵素 10U/ml、LAT精製酵素 2U/ml (vs 10mM 4R-IHOG)、SOD市販酵素 200U/ml、25°C、350-400rpm、Air 8ml/min (1/10vvm)。

[0238] 反応に供した酵素の調製法を下記に示す。

Ps__aadブロス：実施例17に記載の方法に従って調製した。

SpAld精製酵素：実施例19に記載の方法に従って調整した。

AJ3976LAT：実施例28に記載の方法に従って調製した。

OAA DCase：Oxaloacetate Decarboxylase from *Pseudomonas* sp. (Sigma)を用いた。酵素量(U)は、メーカー記載の値を用いた。

SOD：Superoxide Dismutase from bovine liver (Sigma)を用いた。酵素量(U)は、メーカー記載の値を用いた。

[0239] ワンポット反応の結果、8時間後に27mM 2S、4R-モナティンの蓄積が確認された。液量補正後に算出された対L-Trp収率は56%であった。

[0240] 実施例45：E. coliでのin silico選抜アミノトランスフェラーゼの発現

(1) *in silico* 選抜アミノトランスフェラーゼ発現プラスミドの構築

in silico から選抜した各種アミノトランスフェラーゼの遺伝子配列の5'末端にNdeI認識配列を、3'末端にXhoI認識配列を付与したDNA配列を、GenScript社のOptimumGene Codon Optimization Analysisに供し、*E. coli*での遺伝子発現効率が最適化された合成DNAを得た。アミノトランスフェラーゼの種類は以下の通りである。

Deinococcus Geothermalis DSM 11300 由来Putative Aminotransferase (Dge, ABF45244) (配列番号64、65)、*Corynebacterium glutamicum* R由来Hypothetical protein (Cgl, BAF53276) (配列番号66、67)、*Thermus thermophilus* HB27由来Lysn, Alpha-Aminoadipate Aminotransferase (TtHB, AAS80391) (配列番号68、69)、*Thermotoga Maritima*由来Aminotransferase, Putative (Tma1, AAD36207) (配列番号70、71)、*Pyrococcus Horikoshii* Ot3由来Human Kynurenine Aminotransferase II Homologue (PhoH, 1X0M) (配列番号72、73)、*Phormidium Lapid eum*由来Aspartate Aminotransferase (Pla, BAB86290) (配列番号74、75)、*Thermus Thermophilus*由来Aspartate Aminotransferase (Tth, BAD69869) (配列番号76、77)、*Pyrococcus Horikoshii* Ot3由来Aromatic Aminotransferase (PhoA, 1DJU) (配列番号78、79)、*Methanococcus jannaschii*由来Mj0684

(Mja, AAB98679) (配列番号80、81)、Thermotoga Maritima由来Aspartate Aminotransferase (Tma2, AAD36764) (配列番号82、83)、Saccharomyces cerevisiae由来Aspartate Aminotransferase (Sce, CAY81265) (配列番号84、85)、Eubacterium rectale由来Aspartate Aminotransferase (Ere, ACR74350) (配列番号86、87)、Bacillus pumilus SAFR-032由来Aspartate Aminotransferase (Bpu, ABV62783) (配列番号88、89)、Bacillus cellulosilyticus DSM 2522由来Putative transcriptional regulator, GntR family (Bce, ADU30616) (配列番号90、91)、Bacillus species (strain YM-2) 由来Aspartate Aminotransferase aspC (Bsp, AAA2250) (配列番号92、93)、Sinorhizobium meliloti 1021由来Aspartate AminotransferaseaatB (SmeB, CAC47870) (配列番号94、95)、Methanothermobacter thermautotrophicus str. Delta H由来Branched-chain amino-acid aminotransferase (Mth, AAB85907) (配列番号96、97)、Lactobacillus acidophilus由来Aspartate aminotransferase (Lba, AAV43507) (配列番号98、99)、Sinorhizobium meliloti 1021由来Aspartate aminotransferaseaatA (SmeA, CAC46904) (配列番号100、101)、Pyrococcus horikoshii OT3由来Hypothetical serine amin

otransferase (PhoS, BAA30413) (配列番号102、103)、Thermoanaerobacter tengcongensis MB4由来PLP-dependent aminotransferases (Tte, AAM24436) (配列番号104、105)、Clostridium cellulolyticum H10由来Putative transcriptional regulator, GntR family (Cce, ACL75101) (配列番号106、107)、Rhodococcus erythropolis PR4由来Aspartate aminotransferase AspT (Rer, BAH31070) (配列番号108、109)、Saccharophagus degradans 2-40由来Transcriptional regulator (Sde, ABD82545) (配列番号110、111)。

[0241]

[表18]

表18. アミノ酸配列同一性%の比較

ID	略称	AJ1616LATとの アミノ酸配列同一性 (%)	AJ3976LATとの アミノ酸配列同一性 (%)
1	Dge	46	23
2	Cgl	46	30
3	TtHB	20	22
4	Tma1	21	20
5	PhoH	20	22
6	Pla	18	45
7	Tth	17	47
8	PhoA	16	39
9	Mja	17	33
10	Tma2	15	27
11	Sce	20	19
12	Ere	30	26
13	Bpu	93	23
14	Bce	67	22
15	Bsp	17	45
16	SmeB	20	58
17	Mth	17	16
18	Lba	20	24
19	SmeA	21	89
20	PhoS	19	15
21	Tte	17	48
22	Cce	61	24
23	Rer	49	16
24	Sde	49	26

[0242] 合成DNAをそれぞれNdeI、XhoIで制限酵素処理し、同様にNdeI、XhoIで処理したpET-22b (Novagen)とライゲーションした。このライゲーション溶液でE. coli JM109を形質転換し、アンピシリン耐性株の中から目的のプラスミドを抽出した。これらのプラスミドをpET-22-AT-Hisと命名した。これらのプラスミドでは、C末端にHis-tagが付与された各種アミノトランスフェラーゼ(AT-His)が発現する。

[0243] (2) E. coli発現株からのAT-His精製

構築した各種発現プラスミドpET-22-AT-HisをE. coli BL21 (DE3)に導入し、形質転換体をアンピシリン100mg/lを含むOvernight Express Instant TB Medium (Novagen) 100mlに白金耳接種し、500ml容坂

口フラスコを用いて16時間振盪させた。振盪温度は、Lbaは25℃、Dge、Pla、Tth、Tma2、Sce、Ere、Bpu、Bce、Bsp、SmeA、PhoS、Rer、Sdeは30℃、Cgl、TtHB、PhoH、PhoA、SmeB、Tte、Cceは37℃、Tma1、Mja、Mthは42℃で行った。培養終了後、得られた培養液より菌体を遠心分離により集め、Tris-HCl (pH7.6) 20mM、NaCl 300mM、Imidazole 10mMにて洗浄、懸濁し、超音波破碎を行った。遠心分離により破碎液から菌体残渣を除き、得られた上清を可溶性画分とした。

得られた可溶性画分を、Tris-HCl (pH7.6) 20mM、NaCl 300mM、Imidazole 10mMで平衡化したHis-tagタンパク質精製カラムHis TALON superflow 5ml Cartridge (Clontech) に供して担体に吸着させた。担体に吸着しなかったタンパク質 (非吸着タンパク質) をTris-HCl (pH7.6) 20mM、NaCl 300mM、Imidazole 10mMを用いて洗い流した後、Tris-HCl (pH7.6) 20mM、NaCl 300mM、Imidazole 150mMを用いて、5ml/minの流速で吸着したタンパク質の溶出を行った。得られた画分を集めて、アミコン ウルトラ-15 10k (ミリポア) を用いて濃縮した。濃縮液をTris-HCl (pH7.6) 20mMで希釈し、各種LAT溶液とした。必要に応じて、培養液量、His TALONカラムの連結数を増やして精製を行った。

[0244] 実施例46: L-Trp 20mMからの2S, 4R-モナティンのワンポット合成反応

精製した各種AT-Hisを用いて、以下の条件で15時間反応を行った。反応は試験管を用いて1mlで行った。反応終了後にサンプルをTEバッファーで希釈し、アミコンウルトラ-0.5mL 遠心式フィルター10kDa (ミリポア) を用いて限外ろ過、ろ液を分析した。分析にはHPLCお

よびキャピラリー電気泳動を用いた。

[0245] 反応条件：L-Trp 20mM、PA-Na 40mM、L-Asp-Na-1aq 160mM、MgCl₂ 1mM、PLP 50μM、Tris-HCl 100mM、KPB 20mM、pH7.0、Ps__aadブロス 20%、SpAld精製酵素 30U/ml、OAA DCase市販酵素10U/ml、LAT精製酵素 1mg/ml、SOD市販酵素200U/ml、25℃、120rpm。

[0246] 反応に供した酵素の調製法を下記に示す。

Ps__aadブロス：実施例17に記載の方法に従って調製した。

SpAld精製酵素：実施例19に記載の方法に従って調整した。

各種LAT：実施例45に記載の方法に従って調製した。

OAA DCase：Oxaloacetate Decarboxylase from *Pseudomonas* sp. (Sigma)を用いた。酵素量(U)は、メーカー記載の値を用いた。

SOD：Superoxide Dismutase from bovine liver (Sigma)を用いた。酵素量(U)は、メーカー記載の値を用いた。

[0247] ワンポット反応の結果を表19に示す。Tth、Bpu、SmeA、Sdeにおいて、それぞれ2S、4R-モナティンが11mM、16mM、6mM、8mM生成し、対L-Trp収率はそれぞれ55%、78%、28%、42%であった。

[0248]

[表19]

表19. 20mM Trpを基質とした2S, 4R-モナティンのワンポット反応収率

ID	略称	対Trp収率(%)
1	Dge	4.4
2	Cgl	5.1
3	TtHB	1.5
4	Tma1	N.D.
5	PhoH	0.2
6	Pla	14.0
7	Tth	55.0
8	PhoA	N.D.
9	Mja	N.D.
10	Tma2	2.6
11	Sce	0.4
12	Ere	0.3
13	Bpu	78.0
14	Bce	0.3
15	Bsp	3.6
16	SmeB	2.6
17	Mth	0.4
18	Lba	1.0
19	SmeA	28.0
20	PhoS	0.1
21	Tte	6.2
22	Cce	6.5
23	Rer	0.5
24	Sde	42.0

N.D., Not Detected

[0249] 実施例47: L-Trp 20mMからの2S, 4R-モナティンのワンポット合成反応 (Tth, Bpu, SmeA, Sde)

精製した各種ATHisを用いて、以下の条件で15時間反応を行った。反応は試験管を用いて1mlで行った。反応終了後にサンプルをTEバッファーで希釈し、アミコンウルトラ-0.5mL遠心式フィルター10kDa (ミリポア) を用いて限外ろ過、ろ液を分析した。分析にはHPLCおよびキャピラリー電気泳動を用いた。

[0250] 反応条件: L-Trp 20mM、PA-Na 40mM、L-Asp-Na-1aq 160mM、MgCl₂ 1mM、PLP 50μM、Tris-HCl 100mM、KPB 20mM、pH7.0、Ps_aadブロス 20%、SpAld精製酵素 30U/ml、OAA DCase市販酵素10U/ml、LAT精製酵素 3mg/ml (Tthは12mg/ml、Bpuは1mg/ml)、SOD市販酵素200U/ml、25℃、

120 rpm。

[0251] 反応に供した酵素の調製法を下記に示す。

Ps__aadプロス：実施例17に記載の方法に従って調製した。

SpAld精製酵素：実施例19に記載の方法に従って調整した。

各種LAT：実施例45に記載の方法に従って調製した。

OAA DCase: Oxaloacetate Decarboxylase from *Pseudomonas* sp. (Sigma) を用いた。酵素量 (U) は、メーカー記載の値を用いた。

SOD: Superoxide Dismutase from bovine liver (Sigma) を用いた。酵素量 (U) は、メーカー記載の値を用いた。

[0252] ワンポット反応の結果を表20に示す。Tth、Bpu、SmeA、Sdeにおいて、それぞれ2S、4R-モナティンが18 mM、17 mM、11 mM、12 mM生成し、対L-Trp収率はそれぞれ92%、87%、54%、61%であった。

[0253] [表20]

表20. 20 mM Trpを基質とした2S、4R-モナティンのワンポット反応収率

略称	対Trp収率 (%)
Tth	92
Bpu	87
SmeA	54
Sde	61

[0254] 実施例48：L-Trp 100 mMからの2S、4R-モナティンのワンポット合成反応 (Tth、Bpu、SmeA、Sde)

Tth、Bpu、SmeA、Sdeの精製したAT-Hisを用いて、以下の条件で18時間反応を行った。反応は試験管を用いて1 mlで行った。反応終了後にサンプルをTEバッファーで希釈し、アミコンウルトラ0.5 mL 遠心式フィルター10 kDa (ミリポア) を用いて限外ろ過、ろ液を分析した。分析にはHPLCおよびキャピラリー電気泳動を用いた。

[0255] 反応条件：L-Trp 100 mM、PA-Na 50 mM、L-Asp

-Na 300mM、MgCl₂ 1mM、PLP 50μM、Tris-HCl 100mM、KPB 20mM、pH7.0、Ps__aadブロス40%、SpAld精製酵素 60U/ml、OAA DCase市販酵素 10U/ml、LAT精製酵素 3mg/ml (Tthは12mg/ml)、SOD市販酵素200U/ml、25℃、150rpm。

[0256] 反応に供した酵素の調製法を下記に示す。

Ps__aadブロス：実施例17に記載の方法に従って調製した。

SpAld精製酵素：実施例19に記載の方法に従って調整した。

各種LAT：実施例45に記載の方法に従って調製した。

OAA DCase: Oxaloacetate Decarboxylase from *Pseudomonas* sp. (Sigma) を用いた。酵素量 (U) は、メーカー記載の値を用いた。

SOD: Superoxide Dismutase from bovine liver (Sigma) を用いた。酵素量 (U) は、メーカー記載の値を用いた。

[0257] ワンポット反応の結果を表21に示す。Tth、Bpu、SmeA、Sdeにおいて、それぞれ2S, 4R-モナティンが72mM、46mM、6.4mM、20mM生成し、対L-Trp収率はそれぞれ72%、46%、6.4%、20%であった。

[0258] [表21]

表21. 100mM Trpを基質とした2S, 4R-モナティンのワンポット反応収率

略称	対Trp収率 (%)
Tth	72
Bpu	46
SmeA	6.4
Sde	20

[0259] (微生物の情報)

本明細書中に記載される、受託番号で特定された微生物は、その受託番号を参照することにより、所定の受託機関から入手可能である。表22に記載される微生物は、ブダペスト条約上の国際寄託機関である独立行政法人産業

技術総合研究所特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6）に下記の日付で寄託され、下記の受託番号が付されている。なお、表22に記載されるように、これらの微生物は、異なる名称が従来付されていたが、再同定の結果、現在は以下のとおり分類されている。

[0260] [表22]

表22.

微生物の現在の名称 (微生物の従来名称)	受託番号	寄託日
<i>Bacillus altitudinis</i> AJ1616 (<i>Bacillus</i> sp. AJ1616)	FERM-BP11429	2011年10月4日
<i>Stenotrophomonas</i> sp. AJ3447 (<i>Xanthomonas oryzae</i> AJ3447)	FERM-BP11422	2011年9月30日
<i>Stenotrophomonas</i> sp. AJ11634 (<i>Xanthomonas albilineans</i> AJ11634)	FERM-BP11423	2011年9月30日
<i>Ochrobactrum pseudogrignonense</i> AJ3735 (<i>Pseudomonas betainovorans</i> AJ3735)	FERM-BP11432	2011年10月4日
<i>Stenotrophomonas</i> sp. AJ1591 (<i>Pseudomonas putrefaciens</i> AJ1591)	FERM-BP11419	2011年9月27日
<i>Stenotrophomonas</i> sp. AJ3839 (<i>Pseudomonas peptidolytica</i> AJ3839)	FERM-BP11416	2011年9月15日
<i>Brevundimonas diminuta</i> AJ3958 (<i>Pseudomonas hydrogenovora</i> AJ3958)	FERM-BP11425	2011年9月30日
<i>Rhizobium</i> sp. AJ12469 (<i>Alcaligenes faecalis</i> AJ12469)	FERM-BP11430	2011年10月4日
<i>Carnimonas</i> sp. AJ3230 (<i>Achromobacter brunificans</i> AJ3230)	FERM-BP11431	2011年10月4日
<i>Pseudomonas</i> sp. AJ1594 (<i>Pseudomonas ovalis</i> AJ1594)	FERM-BP11424	2011年9月30日

[0261] また、表23に記載される微生物は、異なる名称が従来付されていたが、再同定の結果、現在は以下のとおり分類されている。なお、菌株 *Stenotrophomonas* sp. AJ13127は、受託番号 FERM-BP5568により特定される公知の菌株と同一である。

[0262]

[表23]

表 2 3 .

微生物の現在の名称 (微生物の従来名称)
Rhizobium radiobacter LAT1 (Rhizobium sp. LAT1)
Rhizobium radiobacter AJ11568 (Pseudomonas umorosa AJ11568)
Dietzia maris AJ2788 (Pseudomonas tabaci AJ2788)
Stenotrophomonas sp. AJ13127 (Stenotrophomonas sp. AJ13127)
Arthrobacter sp. IAM1390 (Arthrobacter ureafaciens IAM1390)
Burkholderia sp. AJ3084 (Pseudomonas multivorans AJ3084)
Rhizobium radiobacter AJ2557 (Alcaligenes metalcaligenes AJ2557)
Pseudomonas sp. LMG2833 (Achromobacter butyri LMG2833)

産業上の利用可能性

[0263] 以上のように、本発明の方法は、甘味料として使用できるモナチンの製造のために有用である。

配列表フリーテキスト

[0264] 配列番号1 : *Bacillus altitudinis* 由来のアミノトランスフェラーゼ遺伝子のヌクレオチド配列

配列番号2 : *Bacillus altitudinis* 由来のアミノトランスフェラーゼのアミノ酸配列

配列番号3 : *Bacillus altitudinis* 由来のアミノトランスフェラーゼ遺伝子 (塩基番号 231~1538)、ならびにその上流および下流領域のヌクレオチド配列

配列番号4 : *Bacillus altitudinis* 由来のアミノトランスフェラーゼ断片のアミノ酸配列

配列番号5 : *Bacillus altitudinis* 由来のアミノトランスフェラーゼ断片のアミノ酸配列

配列番号6 : *Bacillus altitudinis* 由来のアミノトランスフェラーゼ遺伝子を含むDNAフラグメントを増幅するためのフォー

ドプライマー (B p - u 2 0 0 - f)

配列番号7 : B a c i l l u s a l t i t u d i n i s由来のアミノトランスフェラーゼ遺伝子を含むDNAフラグメントを増幅するためのリバースプライマー (B p - d 2 0 0 - r)

配列番号8 : B a c i l l u s a l t i t u d i n i s由来のアミノトランスフェラーゼ遺伝子を含むDNAフラグメントを増幅するためのフォワードプライマー (1 6 1 6 A T - N d e - f)

配列番号9 : B a c i l l u s a l t i t u d i n i s由来のアミノトランスフェラーゼ遺伝子を含むDNAフラグメントを増幅するためのリバースプライマー (1 6 1 6 - x h o - r)

配列番号10 : B a c i l l u s a l t i t u d i n i s由来のアミノトランスフェラーゼ遺伝子上に見出される、N d e Iにより認識されるDNA配列を変換するためのフォワードプライマー (1 6 1 6 - d e I N d e - f)

配列番号11 : B a c i l l u s a l t i t u d i n i s由来のアミノトランスフェラーゼ遺伝子上に見出される、N d e Iにより認識されるDNA配列を変換するためのリバースプライマー (1 6 1 6 - d e I N d e - r)

配列番号12 : S p A l d遺伝子を含むDNAフラグメントを増幅するためのフォワードプライマー (S p A l d - f - N d e I)

配列番号13 : S p A l d遺伝子を含むDNAフラグメントを増幅するためのリバースプライマー (S p A l d - r - H i n d I I I)

配列番号14 : S p A l d遺伝子内のレアコドン6 Lを変換するためのフォワードプライマー (6 L - f)

配列番号15 : S p A l d遺伝子内のレアコドン6 Lを変換するためのリバースプライマー (6 L - r)

配列番号16 : S p A l d遺伝子内のレアコドン1 3 Lを変換するためのフォワードプライマー (1 3 L - f)

配列番号17 : S p A l d遺伝子内のレアコドン1 3 Lを変換するためのリ

バースプライマー (13L-r)

配列番号18: SpAld遺伝子内のレアコドン18Pを変換するためのフォワードプライマー (18P-f)

配列番号19: SpAld遺伝子内のレアコドン18Pを変換するためのリバースプライマー (18P-r)

配列番号20: SpAld遺伝子内のレアコドン38Pを変換するためのフォワードプライマー (38P-f)

配列番号21: SpAld遺伝子内のレアコドン38Pを変換するためのリバースプライマー (38P-r)

配列番号22: SpAld遺伝子内のレアコドン50Pを変換するためのフォワードプライマー (50P-f)

配列番号23: SpAld遺伝子内のレアコドン50Pを変換するためのリバースプライマー (50P-r)

配列番号24: SpAld遺伝子内のレアコドン77P、81Pおよび84Rを変換するためのフォワードプライマー (77P-81P-84R-f)

配列番号25: SpAld遺伝子内のレアコドン77P、81Pおよび84Rを変換するためのリバースプライマー (77P-81P-84R-r)

配列番号26: *Bacillus altitudinis* AJ1616由来のアミノトランスフェラーゼ変異体K39Rを調製するためのフォワードプライマー (K39R_FW)

配列番号27: *Bacillus altitudinis* AJ1616由来のアミノトランスフェラーゼ変異体K39Rを調製するためのリバースプライマー (K39R_RV)

配列番号28: *Bacillus altitudinis* AJ1616由来のアミノトランスフェラーゼ変異体S258Gを調製するためのフォワードプライマー (S258G_FW)

配列番号29: *Bacillus altitudinis* AJ1616由来のアミノトランスフェラーゼ変異体S258Gを調製するためのリバー

スプライマー (S258G_RV)

配列番号30: *Bacillus altitudinis* AJ1616

由来のアミノトランスフェラーゼ変異体T288Gを調製するためのフォワードプライマー (T288G_FW)

配列番号31: *Bacillus altitudinis* AJ1616

由来のアミノトランスフェラーゼ変異体T288Gを調製するためのリバースプライマー (T288G_RV)

配列番号32: *Bacillus altitudinis* AJ1616

由来のアミノトランスフェラーゼ変異体I289Aを調製するためのフォワードプライマー (I289A_FW)

配列番号33: *Bacillus altitudinis* AJ1616

由来のアミノトランスフェラーゼ変異体I289Aを調製するためのリバースプライマー (I289A_RV)

配列番号34: *Bacillus altitudinis* AJ1616

由来のアミノトランスフェラーゼ変異体Q287E/T288Gを調製するためのフォワードプライマー (Q287E/T288G_FW)

配列番号35: *Bacillus altitudinis* AJ1616

由来のアミノトランスフェラーゼ変異体Q287E/T288Gを調製するためのリバースプライマー (Q287E/T288G_RV)

配列番号36: aspC遺伝子を破壊するためのDNAフラグメントを調製するためのプライマー (aspC-L1)

配列番号37: aspC遺伝子を破壊するためのDNAフラグメントを調製するためのプライマー (aspC-R1)

配列番号38: aspC遺伝子領域内のattL-cat-attRの挿入を確認するためのプライマー (aspC-up)

配列番号39: aspC遺伝子領域内のattL-cat-attRの挿入を確認するためのプライマー (attL-1)

配列番号40: aspC遺伝子領域内のattL-cat-attRの挿入

を確認するためのプライマー (aspC-down)

配列番号41 : aspC遺伝子領域内のattL-cat-attRの挿入
を確認するためのプライマー (attR-1)

配列番号42 : *Pseudomonas putida*由来のオキザロ酢酸
デカルボキシラーゼ遺伝子のヌクレオチド配列

配列番号43 : *Pseudomonas putida*由来のオキザロ酢酸
デカルボキシラーゼ遺伝子のアミノ酸配列

配列番号44 : *Rhizobium radiobacter*由来のアミノ
トランスフェラーゼ断片のアミノ酸配列

配列番号45 : *Agrobacterium tumefaciens* s
tr. C58由来のゲノムDNA配列に基づいて設計されたフォワードプ
ライマー (Ag-u100-f)

配列番号46 : *Agrobacterium tumefaciens* s
tr. C58由来のゲノムDNA配列に基づいて設計されたリバースプ
ライマー (Ag-d100-r)

配列番号47 : *Rhizobium radiobacter*由来のアミノ
トランスフェラーゼ遺伝子のヌクレオチド配列

配列番号48 : *Rhizobium radiobacter*由来のアミノ
トランスフェラーゼのアミノ酸配列

配列番号49 : *Rhizobium radiobacter*由来のアミノ
トランスフェラーゼ遺伝子を含むDNAフラグメントを増幅するためのフォ
ワードプライマー (3976AT-Nde-f)

配列番号50 : *Rhizobium radiobacter*由来のアミノ
トランスフェラーゼ遺伝子を含むDNAフラグメントを増幅するためのリ
バースプライマー (3976-xho-r)

配列番号51 : *Rhizobium* sp. 由来のアミノトランスフェラー
ゼ断片のアミノ酸配列

配列番号52 : *Rhizobium* sp. 由来のアミノトランスフェラー

ゼ遺伝子のヌクレオチド配列

配列番号53 : *Rhizobium* sp. 由来のアミノトランスフェラーゼのアミノ酸配列

配列番号54 : *Rhizobium* sp. 由来のアミノトランスフェラーゼ遺伝子を含むDNAフラグメントを増幅するためのフォワードプライマー (12469AT-Nde-f)

配列番号55 : *Rhizobium* sp. 由来のアミノトランスフェラーゼ遺伝子を含むDNAフラグメントを増幅するためのリバースプライマー (12469-xho-r)

配列番号56 : *Corynebacterium ammoniagens* DSM20306由来のゲノムDNA配列に基づいて設計されたフォワードプライマー (Co-d50-r)

配列番号57 : *Corynebacterium striatum* ATCC6940由来のアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (ZP_03935516) および *Corynebacterium ammoniagens* DSM20306由来のアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼに対応するゲノムDNA配列の間の相同領域に基づいて設計されたリバースプライマー

配列番号58 : *Corynebacterium ammoniagens* 由来のアミノトランスフェラーゼ遺伝子を含むDNAフラグメントを増幅するためのフォワードプライマー (Co-890-r)

配列番号59 : *Corynebacterium ammoniagens* 由来のアミノトランスフェラーゼ遺伝子を含むDNAフラグメントを増幅するためのリバースプライマー (Co-1060-r)

配列番号60 : *Corynebacterium ammoniagens* 由来のアミノトランスフェラーゼ遺伝子のヌクレオチド配列

配列番号61 : *Corynebacterium ammoniagens* 由来のアミノトランスフェラーゼのアミノ酸配列

配列番号62 : *Corynebacterium ammoniagens*由来のアミノトランスフェラーゼ遺伝子を含むDNAフラグメントを増幅するためのフォワードプライマー (1444AT-Nde-f)

配列番号63 : *Corynebacterium ammoniagens*由来のアミノトランスフェラーゼ遺伝子を含むDNAフラグメントを増幅するためのリバースプライマー (1444-xho-r)

配列番号64 : *Deinococcus geothermalis*由来のアミノトランスフェラーゼ遺伝子のヌクレオチド配列

配列番号65 : *Deinococcus geothermalis*由来のアミノトランスフェラーゼのアミノ酸配列

配列番号66 : *Corynebacterium glutamicum*由来のアミノトランスフェラーゼ遺伝子のヌクレオチド配列

配列番号67 : *Corynebacterium glutamicum*由来のアミノトランスフェラーゼのアミノ酸配列

配列番号68 : *Thermus thermophilus*由来のアミノトランスフェラーゼ遺伝子のヌクレオチド配列

配列番号69 : *Thermus thermophilus*由来のアミノトランスフェラーゼのアミノ酸配列

配列番号70 : *Thermotoga maritima*由来のアミノトランスフェラーゼ遺伝子のヌクレオチド配列

配列番号71 : *Thermotoga maritima*由来のアミノトランスフェラーゼのアミノ酸配列

配列番号72 : *Pyrococcus horikoshii*由来のアミノトランスフェラーゼ遺伝子のヌクレオチド配列

配列番号73 : *Pyrococcus horikoshii*由来のアミノトランスフェラーゼのアミノ酸配列

配列番号74 : *Phormidium lapideum*由来のアミノトランスフェラーゼ遺伝子のヌクレオチド配列

配列番号75 : *Phormidium lapideum*由来のアミノトランスフェラーゼのアミノ酸配列

配列番号76 : *Thermus thermophilus*由来のアミノトランスフェラーゼ遺伝子のヌクレオチド配列

配列番号77 : *Thermus thermophilus*由来のアミノトランスフェラーゼのアミノ酸配列

配列番号78 : *Pyrococcus horikoshii*由来のアミノトランスフェラーゼ遺伝子のヌクレオチド配列

配列番号79 : *Pyrococcus horikoshii*由来のアミノトランスフェラーゼのアミノ酸配列

配列番号80 : *Methanococcus jannaschii*由来のアミノトランスフェラーゼ遺伝子のヌクレオチド配列

配列番号81 : *Methanococcus jannaschii*由来のアミノトランスフェラーゼのアミノ酸配列

配列番号82 : *Thermotoga maritima*由来のアミノトランスフェラーゼ遺伝子のヌクレオチド配列

配列番号83 : *Thermotoga maritima*由来のアミノトランスフェラーゼのアミノ酸配列

配列番号84 : *Saccharomyces cerevisiae*由来のアミノトランスフェラーゼ遺伝子のヌクレオチド配列

配列番号85 : *Saccharomyces cerevisiae*由来のアミノトランスフェラーゼのアミノ酸配列

配列番号86 : *Eubacterium rectale*由来のアミノトランスフェラーゼ遺伝子のヌクレオチド配列

配列番号87 : *Eubacterium rectale*由来のアミノトランスフェラーゼのアミノ酸配列

配列番号88 : *Bacillus pumilus*由来のアミノトランスフェラーゼ遺伝子のヌクレオチド配列

配列番号89 : *Bacillus pumilus*由来のアミノトランスフェラーゼのアミノ酸配列

配列番号90 : *Bacillus cellulosilyticus*由来のアミノトランスフェラーゼ遺伝子のヌクレオチド配列

配列番号91 : *Bacillus cellulosilyticus*由来のアミノトランスフェラーゼのアミノ酸配列

配列番号92 : *Bacillus sp.* 由来のアミノトランスフェラーゼ遺伝子のヌクレオチド配列

配列番号93 : *Bacillus sp.* 由来のアミノトランスフェラーゼのアミノ酸配列

配列番号94 : *Sinorhizobium meliloti*由来のアミノトランスフェラーゼ遺伝子のヌクレオチド配列

配列番号95 : *Sinorhizobium meliloti*由来のアミノトランスフェラーゼのアミノ酸配列

配列番号96 : *Methanothermobacter thermautotrophicus*由来のアミノトランスフェラーゼ遺伝子のヌクレオチド配列

配列番号97 : *Methanothermobacter thermautotrophicus*由来のアミノトランスフェラーゼのアミノ酸配列

配列番号98 : *Lactobacillus acidophilus*由来のアミノトランスフェラーゼ遺伝子のヌクレオチド配列

配列番号99 : *Lactobacillus acidophilus*由来のアミノトランスフェラーゼのアミノ酸配列

配列番号100 : *Sinorhizobium meliloti*由来のアミノトランスフェラーゼ遺伝子のヌクレオチド配列

配列番号101 : *Sinorhizobium meliloti*由来のアミノトランスフェラーゼのアミノ酸配列

配列番号102 : *Pyrococcus horikoshii*由来のアミ

ノトランスフェラーゼ遺伝子のヌクレオチド配列

配列番号103: *Pyrococcus horikoshii*由来のアミノトランスフェラーゼのアミノ酸配列

配列番号104: *Thermoanaerobacter tengcongensis*由来のアミノトランスフェラーゼ遺伝子のヌクレオチド配列

配列番号105: *Thermoanaerobacter tengcongensis*由来のアミノトランスフェラーゼのアミノ酸配列

配列番号106: *Clostridium cellulolyticum*由来のアミノトランスフェラーゼ遺伝子のヌクレオチド配列

配列番号107: *Clostridium cellulolyticum*由来のアミノトランスフェラーゼのアミノ酸配列

配列番号108: *Rhodococcus erythropolis*由来のアミノトランスフェラーゼ遺伝子のヌクレオチド配列

配列番号109: *Rhodococcus erythropolis*由来のアミノトランスフェラーゼのアミノ酸配列

配列番号110: *Saccharophagus degradans*由来のアミノトランスフェラーゼ遺伝子のヌクレオチド配列

配列番号111: *Saccharophagus degradans*由来のアミノトランスフェラーゼのアミノ酸配列

配列番号112: *Corynebacterium ammoniagenes*由来のアミノトランスフェラーゼ断片のアミノ酸配列

請求の範囲

- [請求項1] L-アミノ酸の存在下において、4R-1HOGをL-アミノ酸アミノトランスフェラーゼに接触させて、2S, 4R-モナティンを生成することを含む、2S, 4R-モナティンまたはその塩の製造方法。
- [請求項2] L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼの作用によりL-アミノ酸から生成したケト酸を、デカルボキシラーゼに接触させて分解することをさらに含む、請求項1記載の製造方法。
- [請求項3] L-アミノ酸がL-アスパラギン酸である、請求項1記載の製造方法。
- [請求項4] L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼの作用によりL-アスパラギン酸から生成したオキサロ酢酸を、オキサロ酢酸デカルボキシラーゼに接触させて、ピルビン酸を不可逆的に生成することをさらに含む、請求項3記載の製造方法。
- [請求項5] L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼが、アルスロバクター属、バチルス属、カンジダ属、コリネバクテリウム属、ロデロミセス属、マイクロコッカス属、マイクロバクテリウム属、ノカルディア属、シュードモナス属、リゾビウム属、ステノトロホモナス属、ディエジア属、オクロバクトラム属、ブレブンディモナス属、バークホルデルリア属、カーニモナス属、ヤロウィア属、クロストリジウム属、デイノコッカス属、ユーバクテリウム属、ラクトバチルス属、メタノサーモバクター属、ホルミジウム属、ピロコッカス属、ロドコッカス属、サッカロマイセス属、サッカロファガス属、シノリゾビウム属、サーモアナエロバクター属、サーモトガ属、またはサーマス属に属する微生物に由来する、請求項1記載の製造方法。
- [請求項6] L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼが、アルスロバクター・エスピー、バチルス・アルティトゥディニス、バチルス・セルロシリティカス、バチルス・プミルス、バチルス・エスピー、カンジダ・ノル

ベゲンシス、カンジダ・インコンスピクア、コリネバクテリウム・アンモニアゲネス、コリネバクテリウム・グルタミカム、ロデロミセス・エロンギスポルス、マイクロコッカス・ルテウス、マイクロバクテリウム・エスピー、ノカルディア・グロベルラ、シュードモナス・クロロラフィス、シュードモナス・シトロノクロリス、シュードモナス・フラギ、シュードモナス・プチダ、シュードモナス・シンキサクタ、シュードモナス・タエトロレンス、シュードモナス・エスピー、リゾビウム・ラディオバクター、リゾビウム・エスピー、ステノトロホモナス・エスピー、ディエジア・マリス、オクロバクトラム・シュードグリグノネンス、ブレブンディモナス・ディミヌタ、バークホルデア・エスピー、カーニモナス・エスピー、ヤロウニア・リポリティカ、クロストリジウム・セルロリティカム、デイノコッカス・ゲオサーマリス、ユーバクテリウム・レクター、ラクトバチルス・アシドフィルス、メタノサーモバクター・サーマウトトロフィカス、ホルミジウム・ラピデウム、ピロコッカス・ホリコシイ、ロドコッカス・エリスロポリス、サッカロマイセス・セレビジアエ、サッカロファガス・デグラダンス、シノリゾビウム・メリロティ、サーモアナエロバクター・テングコンゲネシス、サーモトガ・マリチマ、またはサーマス・サーモフィラスに属する微生物に由来する、請求項5記載の製造方法。

[請求項7]

L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼが、配列番号2、配列番号48、配列番号53、配列番号61、配列番号65、配列番号67、配列番号69、配列番号73、配列番号75、配列番号77、配列番号83、配列番号85、配列番号87、配列番号89、配列番号91、配列番号93、配列番号95、配列番号97、配列番号99、配列番号101、配列番号103、配列番号105、配列番号107、配列番号109、または配列番号111により表されるアミノ酸配列に対して90%以上の同一性を示すアミノ酸配列からなる、請求項1記

載の製造方法。

[請求項8] L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼが、配列番号2により表されるアミノ酸配列において39位、109位、128位、150位、258位、287位、288位、289位、303位、358位、及び431位のアミノ酸残基から選ばれる1個以上のアミノ酸残基の変異を含む、請求項7記載の製造方法。

[請求項9] 1個以上のアミノ酸残基の変異が、以下からなる群より選ばれる1個以上のアミノ酸残基の置換である、請求項8記載の製造方法：

- 1) 39位のリジンのアルギニンへの置換；
- 2) 258位のセリンのグリシンへの置換；
- 3) 287位のグルタミンのグルタミン酸への置換；
- 4) 288位のスレオニンのグリシンへの置換；
- 5) 289位のイソロイシンのアラニンへの置換；
- 6) 109位のアスパラギン酸のグリシンへの置換；
- 7) 150位のヒスチジンのチロシンへの置換；
- 8) 303位のフェニルアラニンのロイシンへの置換；
- 9) 358位のアスパラギン酸のチロシンへの置換；
- 10) 431位のセリンのスレオニンへの置換；及び
- 11) 128位のグルタミン酸のグリシンへの置換。

[請求項10] L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼを発現する形質転換体を用いて、4R-IHOGをL-アミノ酸アミノトランスフェラーゼに接触させる、請求項1記載の製造方法。

[請求項11] インドール-3-ピルビン酸およびピルビン酸を縮合して、4R-IHOGを生成することをさらに含む、請求項1記載の製造方法。

[請求項12] インドール-3-ピルビン酸およびピルビン酸をアルドラーゼに接触させることにより、インドール-3-ピルビン酸およびピルビン酸を縮合する、請求項11記載の製造方法。

[請求項13] 4R-IHOGの生成に用いられるピルビン酸の少なくとも一部が

、オキサロ酢酸デカルボキシラーゼの作用によりオキサロ酢酸から生成したピルビン酸に由来する、請求項 1 1 記載の製造方法。

[請求項14] トリプトファンを脱アミノ化して、インドール-3-ピルビン酸を生成することをさらに含む、請求項 1 1 記載の製造方法。

[請求項15] トリプトファンを脱アミノ化酵素に接触させることにより、トリプトファンを脱アミノ化する、請求項 1 4 記載の製造方法。

[請求項16] 2 S, 4 R-モナティンまたはその塩の製造が 1 つの反応槽中で行われる、請求項 1 1 または 1 4 記載の製造方法。

[請求項17] 以下 (I) および (I I) を含む、2 R, 4 R-モナティンまたはその塩の製造方法：

(I) 請求項 1 記載の方法により、2 S, 4 R-モナティンを生成すること；および

(I I) 2 S, 4 R-モナティンを異性化させて、2 R, 4 R-モナティンを生成すること。

[請求項18] 芳香族アルデヒドの存在下において、2 S, 4 R-モナティンを異性化する、請求項 1 7 記載の製造方法。

[請求項19] 塩がナトリウム塩またはカリウム塩である、請求項 1 7 記載の製造方法。

[請求項20] 下記 (A) ~ (D) からなる群より選ばれるタンパク質である、L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ：

(A) 配列番号 2、配列番号 4 8、配列番号 5 3、または配列番号 6 1 により表されるアミノ酸配列からなるタンパク質；

(B) 配列番号 2、配列番号 4 8、配列番号 5 3、または配列番号 6 1 により表されるアミノ酸配列を含むタンパク質；

(C) 配列番号 2、配列番号 4 8、配列番号 5 3、または配列番号 6 1 により表されるアミノ酸配列に対して 9 0 % 以上の同一性を示すアミノ酸配列からなり、かつ L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ活性を有する、タンパク質；ならびに

(D) 配列番号 2、配列番号 48、配列番号 53、または配列番号 61 により表されるアミノ酸配列において、アミノ酸残基の欠失、置換、付加および挿入からなる群より選ばれる、1 または数個のアミノ酸残基の変異を含むアミノ酸配列からなり、かつ L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ活性を有する、タンパク質。

[請求項21] L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼが、配列番号 2 により表されるアミノ酸配列において 39 位、109 位、128 位、150 位、258 位、287 位、288 位、289 位、303 位、358 位、及び 431 位のアミノ酸残基から選ばれる 1 個以上のアミノ酸残基の変異を含む、請求項 20 記載の L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ。

[請求項22] 1 個以上のアミノ酸残基の変異が、以下からなる群より選ばれる 1 個以上のアミノ酸残基の置換である、請求項 21 記載の L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ：

- 1) 39 位のリジンのアルギニンへの置換；
- 2) 258 位のセリンのグリシンへの置換；
- 3) 287 位のグルタミンのグルタミン酸への置換；
- 4) 288 位のスレオニンのグリシンへの置換；
- 5) 289 位のイソロイシンのアラニンへの置換；
- 6) 109 位のアスパラギン酸のグリシンへの置換；
- 7) 150 位のヒスチジンのチロシンへの置換；
- 8) 303 位のフェニルアラニンのロイシンへの置換；
- 9) 358 位のアスパラギン酸のチロシンへの置換；
- 10) 431 位のセリンのスレオニンへの置換；及び
- 11) 128 位のグルタミン酸のグリシンへの置換。

[請求項23] 下記 (a) ~ (e) からなる群より選ばれる、ポリヌクレオチド：
(a) 配列番号 1、配列番号 47、配列番号 52、または配列番号 60 により表されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド；

(b) 配列番号 1、配列番号 47、配列番号 52、または配列番号 60 により表されるヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド；

(c) 配列番号 1、配列番号 47、配列番号 52、または配列番号 60 により表されるアミノ酸配列に対して 90%以上の同一性を示すヌクレオチド配列からなり、かつ L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ活性を有するタンパク質をコードする、ポリヌクレオチド；

(d) 配列番号 1、配列番号 47、配列番号 52、または配列番号 60 により表されるヌクレオチド配列に対して相補的なヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジент条件下でハイブリダイズし、かつ L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼ活性を有するタンパク質をコードする、ポリヌクレオチド；ならびに

(e) 請求項 20 記載の L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼをコードするポリヌクレオチド。

[請求項 24] 請求項 23 記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

[請求項 25] 請求項 24 記載の発現ベクターが導入された形質転換体。

[請求項 26] 請求項 25 記載の形質転換体を培地中で培養して、L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼを得ることを含む、L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼの製造方法。

[請求項 27] L-アミノ酸の存在下において、4R-1HOG を請求項 20 記載の L-アミノ酸アミノトランスフェラーゼに接触させて、2S, 4R-モノナティンを生成することを含む、2S, 4R-モノナティンまたはその塩の製造方法。

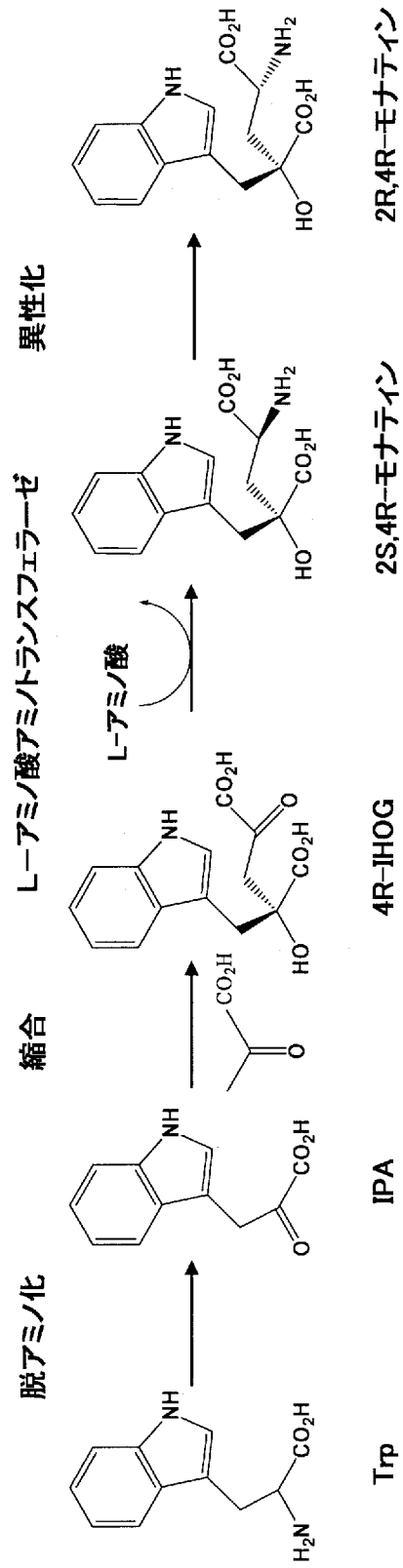
[請求項 28] 以下 (I') および (II') を含む、2R, 4R-モノナティンまたはその塩の製造方法：

(I') 請求項 27 記載の方法により、2S, 4R-モノナティンを生成すること；および

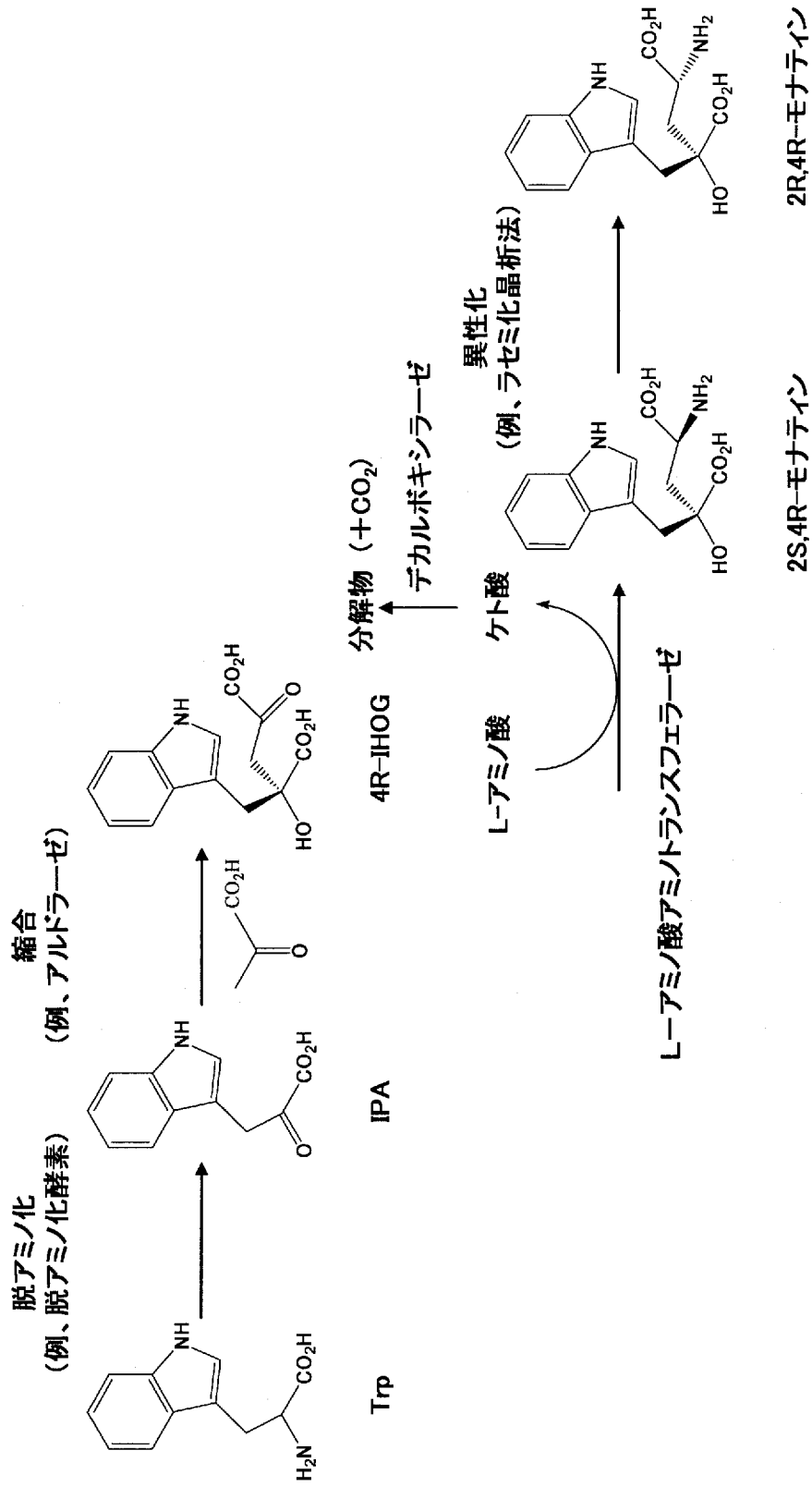
(II') 2S, 4R-モノナティンを異性化させて、2R, 4R-モノナティンを生成すること。

- [請求項29] 芳香族アルデヒドの存在下において、2 S, 4 R-モナティンを異性化する、請求項28記載の製造方法。
- [請求項30] 塩がナトリウム塩またはカリウム塩である、請求項28記載の製造方法。

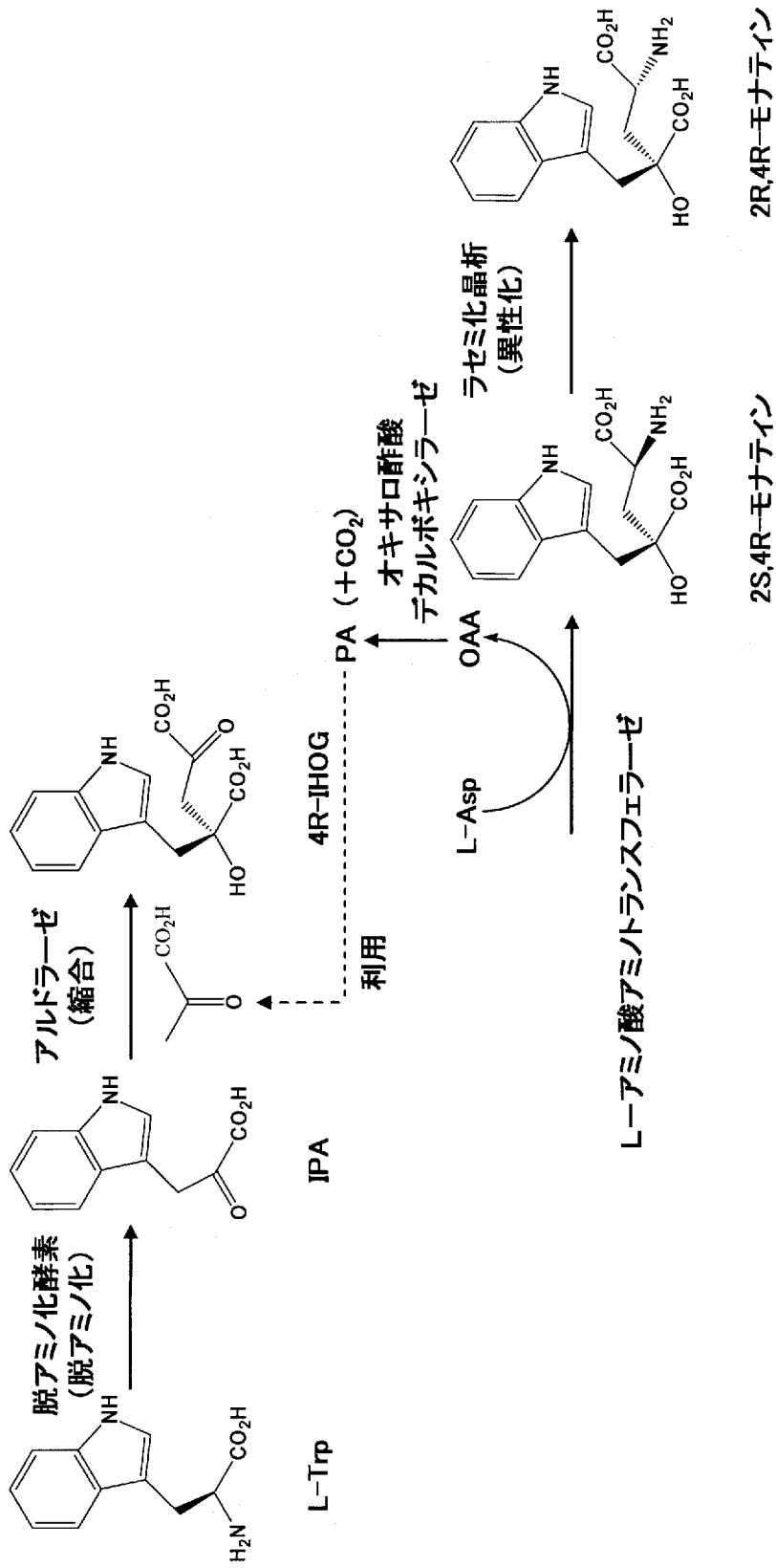
[図1]



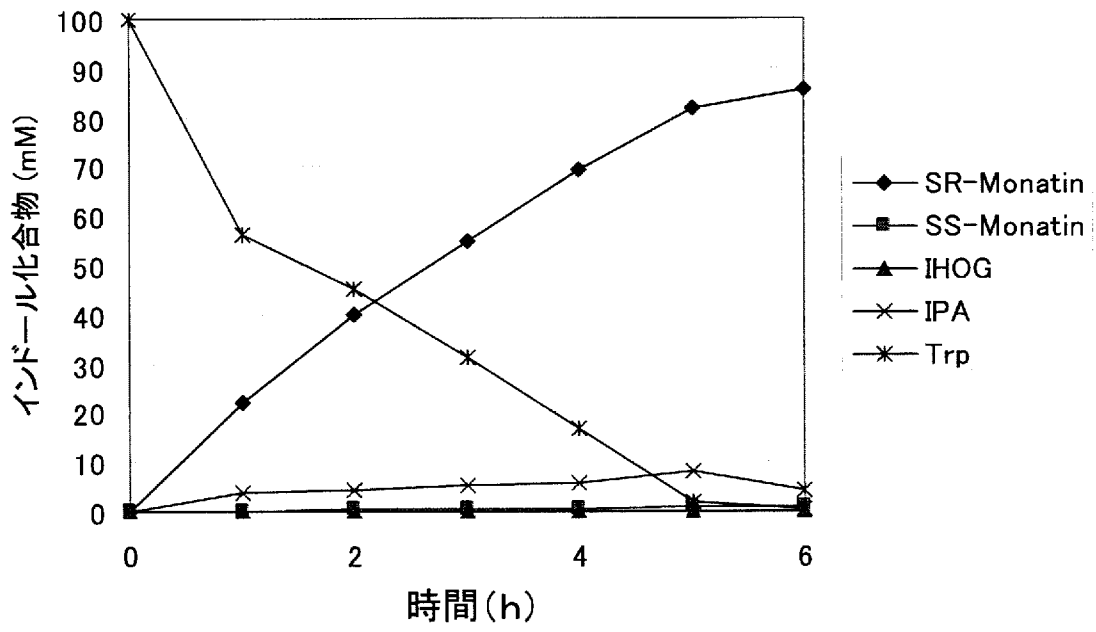
[図2]



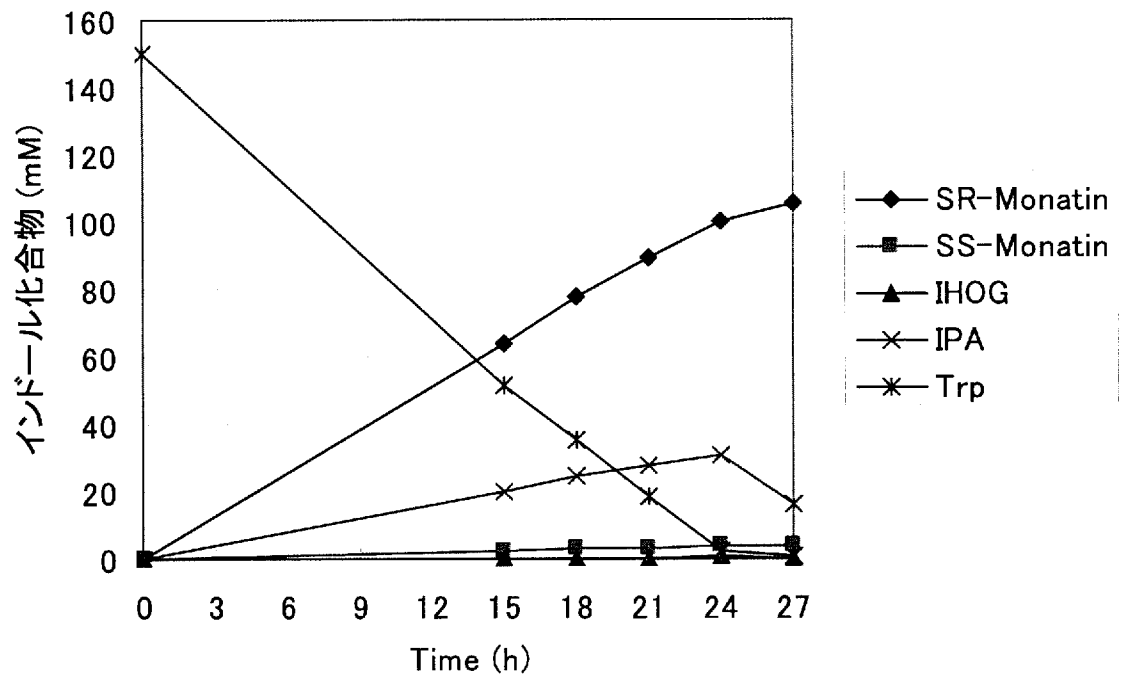
[図3]



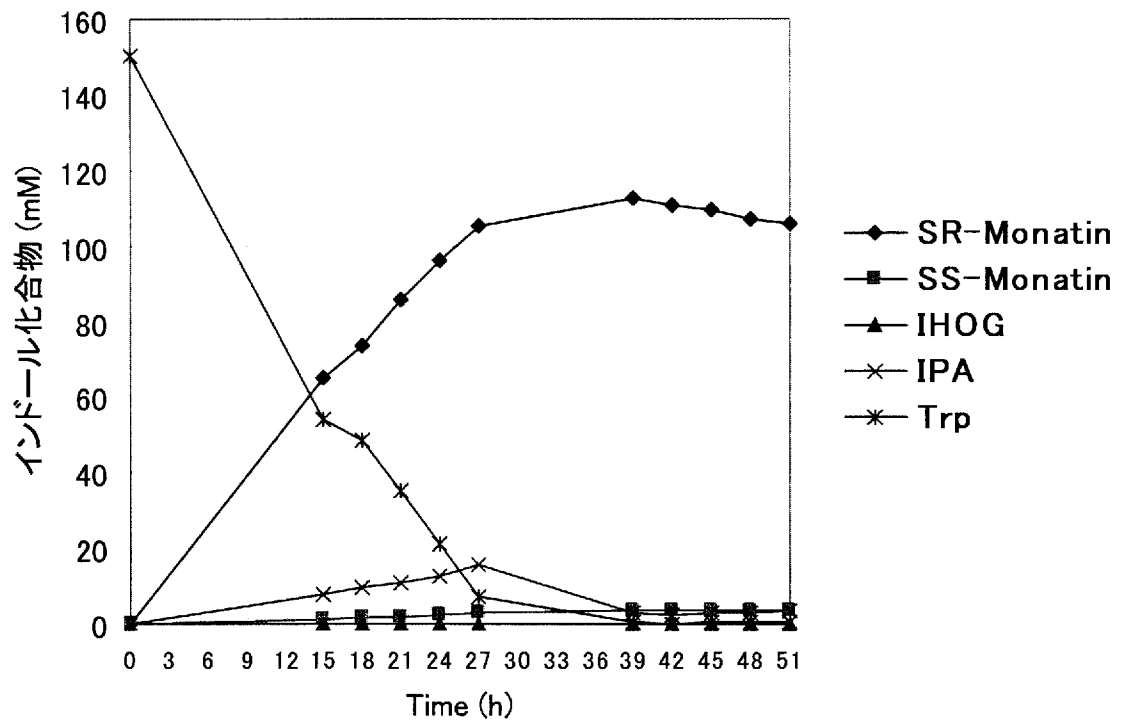
[図4]



[図5]



[図6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/073416

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N9/10(2006.01)i, C12P17/10(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)

C12N15/09, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N9/10, C12P17/10

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	JP 2006-204285 (Ajinomoto Co., Inc.), 10 August 2006 (10.08.2006), & EP 1605041 A2 & US 2006/0003426 A1	1, 10-12/ 1-19, 26-30
Y	WO 2009/028338 A1 (AJINOMOTO CO., INC.), 05 March 2009 (05.03.2009), & US 2010/0221795 A1	1, 10-12, 14-19
Y	WO 2005/082850 A1 (AJINOMOTO CO., INC.), 09 September 2005 (09.09.2005), & EP 1719758 A1 & US 2007/0066832 A1	1, 5-12, 14-19, 27-30
Y	WO 2005/001105 A1 (AJINOMOTO CO., INC.), 06 January 2005 (06.01.2005), & US 2006/0154343 A1	1, 10-12, 14-19

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
05 December, 2011 (05.12.11)

Date of mailing of the international search report
13 December, 2011 (13.12.11)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/073416

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 60-091993 A (Genetics Institute, Inc.), 23 May 1985 (23.05.1985), & EP 0135846 A2 & US 4518692 A	1-4, 13
X/Y	Database GenBank [online], Accessin No. CP000813, < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/CP000813? > 11-Oct-2007 uploaded, [retrieved on 02-Dec-2011] GIOIA J., et al., Definition: Bacillus pumilus SAFR-032, complete genome	20, 21, 23/ 20-30
X/Y	Database GenBank [online], Accessin No. AE007869, < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AE007869? > 21-JAN-2010 uploaded, [retrieved on 02-Dec-2011] WOOD DW., et al., Definition: Agrobacterium tumefaciens str. C58 circular chromosome, complete sequence	20, 21, 23/ 20-30
Y	Database GenBank [online], Accessin No. ADNS01000031, < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/ADNS01000031? > 11-May-2010 uploaded, [retrieved on 02-Dec-2011] WEINSTOCK G., et al., Definition: Corynebacterium ammoniagenes DSM 20306 C_ammoniagenes-1.0_Cont122.1, whole genome shotgun sequence	20-30

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, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N9/10(2006.01)i, C12P17/10(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, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N9/10, C12P17/10

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

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)

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)、JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)、GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq、UniProt/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/ Y	JP 2006-204285 (味の素株式会社) 2006.08.10 & EP 1605041 A2 & US 2006/0003426 A1	1,10-12/ 1-19,26-30
Y	WO 2009/028338 A1 (AJINOMOTO CO., INC.) 2009.03.05 & US 2010/0221795 A1	1,10-12,14-19
Y	WO 2005/082850 A1 (AJINOMOTO CO., INC.) 2005.09.09 & EP 1719758 A1 & US 2007/0066832 A1	1,5-12,14-19, 27-30

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、一般的な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

05.12.2011

国際調査報告の発送日

13.12.2011

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)

池上 文緒

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

4B

3765

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	WO 2005/001105 A1 (AJINOMOTO CO., INC.) 2005.01.06 & US 2006/0154343 A1	1,10-12, 14-19
Y	JP 60-091993 A (ジエネテイツクス・インスチチュート・ インコーポレーテッド) 1985.05.23 & EP 0135846 A2 & US 4518692 A	1-4,13
X/ Y	Database GenBank [online], Accessin No. CP000813, < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/CP000813? > 11-Oct-2007 uploaded, [retrieved on 02-Dec-2011] GIOIA J., et al., Definition: Bacillus pumilus SAFR-032, complete genome	20,21,23/ 20-30
X/ Y	Database GenBank [online], Accessin No. AE007869, < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/AE007869? > 21-JAN-2010 uploaded, [retrieved on 02-Dec-2011] WOOD DW., et al., Definition: Agrobacterium tumefaciens str. C58 circular chromosome, complete sequence	20,21,23/ 20-30
Y	Database GenBank [online], Accessin No. ADNS01000031, < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/ADNS01000031? > 11-May-2010 uploaded, [retrieved on 02-Dec-2011] WEINSTOCK G., et al., Definition: Corynebacterium ammoniagenes DSM 20306 C_ammoniagenes-1.0_Cont122.1, whole genome shotgun sequence	20-30