

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2006年1月26日 (26.01.2006)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2006/008872 A1

- (51) 国際特許分類⁷: C12N 15/55, (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, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2005/009345
- (22) 国際出願日: 2005年5月23日 (23.05.2005)
- (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2004-214241 2004年7月22日 (22.07.2004) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 三菱瓦斯化学株式会社 (MITSUBISHI GAS CHEMICAL COMPANY, INC.) [JP/JP]; 〒1008324 東京都千代田区丸の内二丁目5番2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): 浅野 泰久 (ASANO, Yasuhisa) [JP/JP]; 〒9300066 富山県富山市千石町2丁目6-4-803 Toyama (JP). 井上 敦 (INOUE, Atsushi) [JP/JP]; 〒9503112 新潟県新潟市太夫浜字新割182番地 三菱瓦斯化学株式会社 新潟研究所内 Niigata (JP).
- (74) 代理人: 川口 嘉之, 外 (KAWAGUCHI, Yoshiyuki et al.); 〒1030004 東京都中央区東日本橋3丁目4番10号 アクロポリス21ビル6階 Tokyo (JP).
- (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, LS, MW, MZ, NA, 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 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。



WO 2006/008872 A1

(54) Title: L-AMINO ACID AMIDE ASYMMETRIC HYDROLASE AND DNA ENCODING THE SAME

(54) 発明の名称: L体アミノ酸アミド不斉加水分解酵素及びそれをコードするDNA

(57) Abstract: An L-amino acid is produced from an L-amino acid amide by constructing a transgenic microorganism via the transfer of a gene which encodes an enzyme stereoselectively hydrolyzing an amide bond of an L-amino acid amide, in particular, an L-2-alkylcysteine amide and using the microbial cells or processed microbial cells thus obtained.

(57) 要約: L体のアミノ酸アミド、特にL体の2-アルキルシステインアミドのアミド結合を立体選択的に加水分解する酵素をコードする遺伝子を導入して組換え微生物を作製し、得られた微生物の菌体又は菌体処理物を用いて、L体のアミノ酸アミドからL体のアミノ酸を製造する。

明 細 書

L体アミノ酸アミド不斉加水分解酵素及びそれをコードするDNA

技術分野

- [0001] 本発明は、新規なL体アミノ酸アミド不斉加水分解酵素及びそれをコードするDNA、並びにそれらの利用に関する。更に詳しくは、L体のアミノ酸アミド、特にL体の2-アルキルシステインアミドのアミド結合を立体選択的に加水分解する活性を少なくとも有する新規な酵素、及び該酵素タンパク質をコードするDNA、並びに該DNAを導入した組換え微生物、及び該組換え微生物を使用することによって、酵素の培養生産性を大幅に向上させると共に、そのようにして得られた酵素を用いることによって、L体のアミノ酸アミドを効率的にL体のアミノ酸に変換する方法に関する。光学活性なアミノ酸やアミノ酸アミド、特に光学活性な2-アルキルシステインや2-アルキルシステインアミドは、各種工業薬品、医薬及び農薬の製造中間体として重要な物質である。

背景技術

- [0002] アミノ酸アミドから光学活性なアミノ酸を製造する方法としては、例えば、ラセミ体のアミノ酸アミドのアミド結合を立体選択的に不斉加水分解する酵素を含んだ微生物や微生物の菌体処理物を作用させる方法が、工業的に優れた方法として知られている(例えば、特許文献1, 2参照)。しかしながら、このような生体由来の触媒である酵素は、穏和な反応条件で、しかも極めて高い反応特異性で目的産物を生成させると言う優れた特徴を有する反面、触媒可能な基質の種類が限られたり、菌体の酵素産生量そのものが少ないため、反応を行うに当たって多量の菌体を必要とし、結果的に、経済的に不利となり採用できなくなると言う技術的問題点を抱えていた。
- [0003] そこで、このような働きをする酵素の産生量を高める目的から、アミノ酸アミドを立体選択的に加水分解する酵素の酵素タンパク質をコードするDNAを、遺伝子組換え手法でクローン化して形質転換体となし、該形質転換体を用いてラセミ体のアミノ酸アミドから光学活性アミノ酸を製造するという試みがなされた(例えば、特許文献3~8、非特許文献1参照)。

[0004] 例えば、特許文献3には、Variovorax由来のD-アミダーゼ、それをコードするDNA、そのような核酸を含有するプラスミド、ベクター及び微生物、ハイブリダイズする核酸、核酸を製造するためのプライマー等が、また特許文献4には改変型アミノ酸アミダーゼとそれを用いたD体アミノ酸の製造方法が開示されている。しかしながら、これらの方法はD体のアミノ酸アミドにのみ作用するものであって、L体のアミノ酸アミドを加水分解することはできない。

一方、L体のアミノ酸アミドに作用する例としては、例えば、特許文献5には、シュードモナス アプトフォルマンズ由来のL体のアミノ酸アミドのアミド結合を立体選択的に加水分解する酵素とそれをコードするDNAが開示されている。しかしながら、この酵素はL-プロリンアミドに対する活性は高いが、その他のL体のアミノ酸アミドに対する活性は低い。

[0005] その他、特許文献6は、コマモナス アシドボランズ由来の酵素タンパクとこれをコードするDNA並びにこの酵素タンパクを用いた光学活性有機酸の製造方法が開示されており、その中にアミノ酸アミドの不斉加水分解も開示されているが、ロイシンアミド又はフェニルアラニンアミドを基質とした場合だけである。また、特許文献7には、 α -アミノ酸アミド及び α -ヒドロキシ酸アミドを立体選択的に加水分解するアミダーゼ活性を有するタンパク質とこれをコードするDNAが開示されているが、好ましいアミノ酸アミドとして開示されているのはt-ロイシンアミドを基質とした場合だけである。また、特許文献8には、ペプチドアミダーゼを含有する微生物の獲得方法、それにより得られた微生物、その中に含有されるペプチドアミダーゼ及びその使用方法が開示されているが、この酵素は、ジペプチドアミドやN-アセチルアミノ酸アミド又は保護されたアミノ酸アミドに対して高い活性を有するが、未保護のアミノ酸アミドを加水分解する活性を有していない。さらに、例えば非特許文献1には、 α 位にアルキル基を有するアミノ酸アミドを立体選択的に加水分解する酵素が開示されているが、ここで開示されている例はメチルバリン、メチルロイシン及びメチルフェニルアラニン等の炭化水素型の側鎖を有するアミノ酸に限られており、側鎖にメルカプト基とアルキル基を有する2-アルキルシステインに関する記載は一切認められない。

[0006] 通常の天然型アミノ酸以外の特殊アミノ酸であるアルキルシステインの誘導體であ

る2-アルキルシステインは、 α 位の炭素原子にアルキル基を有する他、メルカプト基、アミノ基及びカルボキシル基と言った反応性に富む複数の置換基を分子内に有しており、特にその光学活性体は各種工業薬品、医薬、農薬等の製造原料、汎用キラルビルディングブロックとして広範な活用が期待される化合物であり、産業上非常に有用な化合物であるため、工業的に有利な、安価な製造方法の開発が望まれていた。

[0007] しかしながら、上述したように、L体の2-アルキルシステインアミドのアミド結合を立体選択的に加水分解する活性を有する酵素は知られておらず、従って、このような方法で光学活性な2-アルキルシステイン、又は光学活性な2-アルキルシステインアミドを製造する方法も知られていなかった。また、その他のL体のアミノ酸アミドに対する基質スペクトルが広く、工業原料として有用な種々のアミノ酸アミド類に対応できる高活性かつ高立体選択的なL体のアミノ酸アミド加水分解酵素、及び該酵素の効率的な生産方法と利用方法が求められていた。

[0008] 特許文献1:特開昭61-293394号公報

特許文献2:特開昭62-55097号公報

特許文献3:特開2003-225094号公報

特許文献4:特開2002-253256号公報

特許文献5:特開2003-250558号公報

特許文献6:特開平8-256771号公報

特許文献7:国際公開第00/63354号パンフレット

特許文献8:特許第3112090号明細書

非特許文献1:H. F. M. Hermes他、Applied and Environmental microbiology, Vol. 60, No1, p. 153-159, 1994

発明の開示

[0009] 本発明の目的は、各種工業薬品、医薬及び農薬の製造中間体として広範な活用が期待され、産業上、非常に有用な化合物である光学活性なアミノ酸、特に光学活性な2-アルキルシステインを製造するために好適に使用できる、L体アミノ酸アミド不斉加水分解酵素及びそれをコードするDNA、該DNAを含有する組換え体DNA

を導入した組換え微生物、並びにこれらを用いた光学活性アミノ酸、特に光学活性な2-アルキルシステインの製造方法を提供することにある。

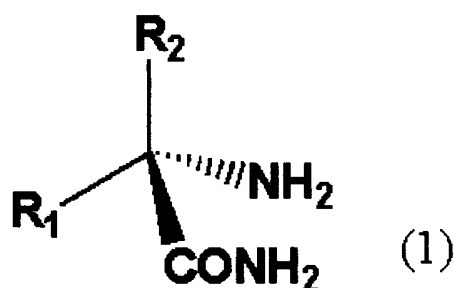
[0010] 本発明者らは、上記課題を解決するため鋭意検討を重ねた結果、L体のアミノ酸アミド、特にL体の2-アルキルシステインアミドのアミド結合を立体選択的に加水分解する高い酵素活性を有する微生物を新規に見出し、この微生物から当該触媒活性を示す酵素を初めて単離・精製した。更に、この酵素をコードするDNAを初めて分離取得し、該DNAを含む組換え体DNA、及び該組換え体DNAを導入した組換え微生物を調製し、発現させることに成功した。また、更に、このようにして得られた組換え微生物を培養することによって、DNA供与体として使用した野生株の場合と比較して、顕著に高い比活性を有する菌体又は酵素溶液を調製することが可能になり、L体のアミノ酸アミド、特にL体の2-アルキルシステインアミドを極めて効率よく対応のL体の2-アルキルシステインに変換することができるようになった。

[0011] また、本発明のL体のアミノ酸アミド不斉加水分解酵素は、L体の2-アルキルシステインアミドの不斉加水分解活性を有するだけでなく、基質スペクトルが非常に広く、L-アラニン、L-バリン、L-ロイシン、L-フェニルアラニン等に代表される天然型の通常アミノ酸、更には、L-2-アミノ酪酸、L- ϵ -ロイシン、L-フェニルグリシン、L-p-クロロフェニルグリシン、L-アリシンエチレンアセタール、L-ペニシルアミン、(4R)-5,5-ジメチル-1,3-チアゾリジン-4-カルボン酸等のいわゆる特殊アミノ酸に対応する各種のL体のアミノ酸アミドを不斉加水分解することができる。このように本発明の酵素は、L体のアミノ酸アミドのアミド結合を選択的に加水分解するという厳格な立体特異性と、幅広い種類のL体のアミノ酸アミドに反応するという性質を併せ持った、従来知られている酵素と異なる産業的利用性に優れた新規な酵素である。

[0012] すなわち、本発明は、以下の(1)に示すL体アミノ酸アミド不斉加水分解酵素、(2)～(3)に示すL体アミノ酸アミド不斉加水分解酵素をコードするDNA、(4)～(5)に示す組換え微生物、(6)に示す当該酵素を用いたL体アミノ酸アミドからL体アミノ酸を製造する方法、(7)～(9)に示すL体の2-アルキルシステインアミドからL体の2-アルキルシステインを製造する方法に関するものである。

- (1) 配列番号8に示されるアミノ酸番号1～355で表されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列から1個若しくは複数個のアミノ酸が欠損、置換、又は付加されたアミノ酸配列を有する、L体のアミノ酸アミドのアミド結合を立体選択的に加水分解する酵素。
- (2) (1)記載の酵素の酵素タンパク質をコードするDNA。
- (3) 配列番号7に示される塩基配列の内の塩基番号868～1932で表される塩基配列、又は該塩基配列とストリンジントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有する、(2)記載のDNA。
- (4) (2)又は(3)記載のDNAが導入された組換え微生物。
- (5) 組換え微生物がエシエリシア コリ (*Escherichia coli*)である、(4)記載の組換え微生物。
- (6) (1)記載の酵素をL体のアミノ酸アミドに作用させL体のアミノ酸に変換する、L体のアミノ酸の製造方法。
- (7) L体のアミノ酸アミドが式1に示す化合物である、(6)記載の製造方法。

[0013] [化1]



式1中のR₁は水素、低級アルキル基、置換低級アルキル基、フェニル基、置換フェニル基、複素環基、置換複素環基、又はR₁が結合している炭素原子及び該炭素原子に結合しているアミノ基と一体となって含窒素複素環を形成し得る基である。ここで、低級アルキル基としては、炭素数1～4のアルキル基などが挙げられ、置換低級アルキル基としては、そのうちの1又は複数の水素が、例えば、ヒドロキシ基、メキシ基、メルカプト基、メチルメルカプト基、アミノ基、グアニル基、カルボキシ基、カルボキサミド基、ハロゲン基、フェニル基、ヒドロキシフェニル基、イミダズリル基などで置換された炭素数1～4のアルキル基などが挙げられる。置換フェニル基としては、任意の水素がヒドロキシ基、メキシ基、メルカプト基、メチルメルカプト基、アミノ基、グアニル

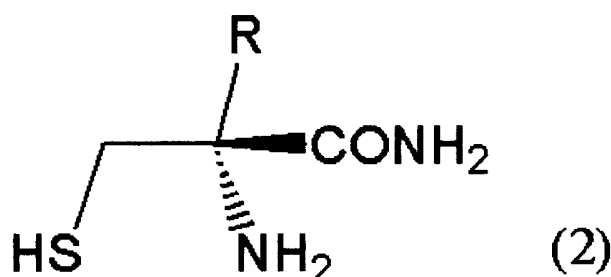
基、カルボキシル基、カルボキサミド基、ハロゲン基などで置換されたフェニル基などが挙げられる。また、複素環基としては、インドリル基、イミダゾリル基などが挙げられ、置換複素環基としては、任意の水素がヒドロキシ基、メキシ基、メルカプト基、メチルメルカプト基、アミノ基、グアニル基、カルボキシル基、カルボキサミド基、ハロゲン基などで置換された前記のインドリル基、イミダゾリル基などの複素環基が挙げられる。さらに、 R_1 が結合している炭素原子及び該炭素原子に結合しているアミノ基と一体となって含窒素複素環を形成し得る基としては、ピロリジン環、ピロール環、チアゾリジン環、オキサゾリジン環などが挙げられる。

R_2 は水素、又は炭素数1～4の低級アルキル基である。

なお、 R_1 と R_2 が同時に水素である場合は化合物(1)からは除かれる。

[0014] (8) L体のアミノ酸アミドが式2に示す化合物である、(6)記載の製造方法。

[化2]



(式2中のRは炭素数1～4の低級アルキル基を示す。)

(9) 式2中のRがメチル基である、(8)記載の製造方法。

[0015] なお、本発明の酵素は、その活性が失われぬ限り、配列番号8に示されるアミノ酸番号1～355で表されるアミノ酸配列から、1個若しくは複数個のアミノ酸が、欠損、置換、又は付加されたアミノ酸配列を有するものであってもよい。複数個のアミノ酸の数としては、好ましくは2～20個、好ましくは2～10個、特に好ましくは2～5個である。また、本発明の酵素は、配列番号8の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%以上の相同性を有し、かつL体のアミノ酸アミドのアミド結合を立体選択的に加水分解する酵素作用を有するものであってもよい。

[0016] また、本発明の酵素をコードするDNAは、配列番号7の塩基配列の塩基番号868～1932を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつL体のアミ

ノ酸アミドのアミド結合を立体選択に加水分解する酵素をコードするDNAであってもよい。ストリンジントな条件としては、例えば、80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上の相同性を有するDNAが互いにハイブリダイズする条件、具体的には、例えば、ハイブリダイズ反応を行い、60°C、1×SSC、0.1%SDS、好ましくは60°C、0.1×SSC、0.1%SDS、特に好ましくは65°C、0.1×SSC、0.1%SDSで洗浄する条件が挙げられる。

発明を実施するための最良の形態

[0017] 以下、本発明の実施形態を詳細に説明する。本発明の酵素をコードするDNAの供与体となりうる微生物は、L体のアミノ酸アミド、特にL体の2-アルキルシステインアミドのアミド結合を立体選択的に加水分解する酵素活性を有する微生物であればよい。そのような微生物を見出す方法としては、タイプカルチャー等の保存菌株の中から選択する方法、或いは自然界から分離する方法がある。本発明者らは、まず保存菌株について検討を行い、そのような酵素活性を有する微生物として、例えば、プロタミノバクテリウム属、ミコプラズマ属、及びキサントバクテリウム属に属する微生物、より具体的にはプロタミノバクテリウム アルボフラバス(*Protaminobacter alboflavus*)、ミコプラズマ ラモサ(*Mycoplana ramosa*)、ミコプラズマ ディモルファ(*Mycoplana dimorpha*)、キサントバクテリウム オートトロピカス(*Xanthobacter autotrophicus*)、キサントバクテリウム フラバス(*Xanthobacter flavus*)等の微生物が該当することを見出した。

[0018] 次に、より好適な菌株を求め自然界からの分離を鋭意行った結果、キサントバクテリウム フラバス(*X. flavus*)と同定される新たな菌株を分離することに成功した。本菌株は、下記の菌学的性質(表1)に示すように、グラム染色陰性の非運動性桿菌であり、多形態、カタラーゼ反応陽性、オキシダーゼ反応陽性であることからキサントバクテリウム属に属する微生物と判断され、さらに16SrDNA(16SrRNA遺伝子)の部分塩基配列約500bpを用いて帰属分類群を推定した結果、部分塩基配列が相同率100%でキサントバクテリウム フラバス(*X. flavus*)と一致し、分子系統樹上でもキサントバクテリウム フラバス(*X. flavus*)と同じ場所に位置したことから、キサントバクテリウム フラバス(*X. flavus*)と同定し、NR303株と命名した。

[0019] 表1. 菌学的性質

細胞形態	桿菌
大きさ	(0.5-0.6×2.0 μm)
多形態	あり
運動性	なし
胞子の有無	なし
グラム染色	—
コロニー形態 (栄養寒天、30℃、24時間)	
円形	
全縁滑らか	
凸状	
光沢あり	
クリーム色	
生育温度	
37℃	+
40℃	—
カタラーゼ	+
オキシダーゼ	+
酸/ガス生産(グルコース)	—/—
O/Fテスト(グルコース)	—/—
硝酸塩還元	+
インドール生産	—
ブドウ糖 酸性化	—
アルギニンジヒドロラーゼ	—
ウレアーゼ	+
エスクリン加水分解	—
ゼラチン加水分解	—
β-ガラクトシダーゼ	—

チトクロームオキシダーゼ		+
資化性		
ブドウ糖	—	
L-アラビノース	—	
D-マンノース	—	
D-マンニトール	—	
N-アセチル-D-グルコサミン		—
マルトース	—	
グルコン酸カリウム		+
n-カプリン酸	—	
アジピン酸	—	
dl-リンゴ酸		+
クエン酸ナトリウム		+
酢酸フェニル		—
嫌氣的生育性		+

[0020] 一例として、本発明者らが新たに分離した上記キサントバクター フラバス(*X. flavus*) NR303株のアミノ酸アミド不斉加水分解酵素遺伝子の単離方法、及び該遺伝子のエシエリシア コリ(*E. coli*) JM109株への導入方法を、以下に示す。

[0021] DNA供与体微生物の培養は、通常資化し得る炭素源、窒素源、各微生物に必要な無機塩、栄養素等を含む培地を用いて行われる。培養時のpHは4～10の範囲が好ましく、温度は20～39℃が好ましい。培養は1日～1週間程度好氣的に行われる。

[0022] 酵素の精製は、通常の酵素精製法を用いることができる。すなわち、培養終了後の培養液から遠心分離や膜分離等の通常的手法によって菌体を集め、超音波処理等の機械的方法等によって菌体を破碎する。その後、遠心分離等によって残渣を除き粗酵素液を得る。次にこの粗酵素液を塩析、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、結晶化等により精製することができる。

- [0023] 精製した酵素のN末端アミノ酸配列を、自動エドマン分解アミノ酸シーケンサーH PG1005A protein sequencing system(ヒューレットパッカード社製)で決定し、決定したN末端配列をもとに、PCRで増幅するためのオリゴヌクレオチド(プライマー)を設計する。キサントバクター フラバス(*X. flavus*)より抽出した染色体DNAを鋳型としてPCRでDNAを増幅し、ラベルしてプローブとする。
- [0024] キサントバクター フラバス(*X. flavus*)より抽出したDNAを適当な制限酵素(例えばEcoRI等)で部分分解する。このDNA断片とラベル化したDNAプローブを用いて、サザンハイブリダイゼーションを行う。ここで特定されたDNAを抽出精製し、適当なプラスミドベクターに結合し、大腸菌を形質転換する。
- [0025] ラベル化したDNAプローブを用いてコロニーハイブリダイゼーションを行い、目的のDNA断片を含むクローンのプラスミドを取得する。このプラスミドを用いて、ベクターに組み込まれた、キサントバクター フラバス(*X. flavus*)由来のDNAの塩基配列を決定する。決定されたDNA塩基配列中にL体アミノ酸アミド不斉加水分解酵素遺伝子のアミノ酸配列の読み枠を見出し、上記工程で得られたDNA断片中に、L体アミノ酸アミド不斉加水分解酵素遺伝子の全コード領域が存在することを確認する。
- 得られたL体アミノ酸アミド不斉加水分解酵素遺伝子のDNA塩基配列を元に、プライマーを設計する。キサントバクター フラバス(*X. flavus*)より抽出した染色体DNAを鋳型としてPCRでDNAを増幅し、プラスミドベクター(pUC19)と結合する。これをpMCA1と命名する。pMCA1をE. coli(JM109)に形質転換し、L体アミノ酸アミド不斉加水分解酵素遺伝子を保有する組換え菌をpMCA1/JM109と命名する。
- [0026] なお、ここで得られた形質転換体pMCA1/JM109は、2004年5月21日に独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター(〒305-5466 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6)にFERM AP-20056として寄託され、その後、ブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、FERM BP-10334の受託番号で寄託されている。したがって、この形質転換体に保持されるプラスミドpMCA1から本発明の酵素をコードするDNAを取得することもできる。例えば、プラスミドpMCA1を、pUC19のマルチクローニングサイトに存在する配列を認識する制限酵素で消化して該DNAを取得してもよいし、プラスミドpMCA1を鋳型にし、配列番号7

の塩基配列に基づいて設計したプライマーを用いたPCR法により該DNAを取得してもよい。

また、キサントバクター フラバスのその他の株、又はキサントバクター フラバス以外の微生物の染色体から、本発明のDNAを取得することもできる。例えば、配列番号7の塩基配列に基づいて設計されたプローブを用い、ハイブリダイゼーション反応により、上記微生物由来の前記酵素をコードするDNAをその微生物の染色体DNAから単離することもできる。

[0027] 本発明のDNAを宿主微生物に導入するためのベクターとしては、プラスミドベクター(例えばpUC18、pUC19、pUC118等)、ファージベクター(例えばλgt11等)の何れでもよい。さらにベクターを用いずに宿主微生物の染色体へ直接組込むことも可能である。また、形質転換に用いられる宿主微生物としては、エシェリヒア属細菌、例えば、エシェリヒア コリ(E. coli)JM105株又はJM109株等が挙げられるが、特にこれらに限定されるものではない。

[0028] なお、DNA、組換え体宿主としてのE. coliの取扱いなどに必要な操作は、当業者間で通常行われているものであり、例えばMolecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Ed. (ed. Sambrook J. and Russell D. W.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001(以下、モレキュラークローニング第3版と記す)に従えば容易に実施できる。使用する酵素、試薬類も全て市販の製品を用いることができ、特に断らない限り製品で指定されている使用条件に従えば完全にそれらの目的を達成することができる。該菌からの全DNA抽出は、例えばSaitoら(Biochim. Biophys. Acta. , 72, 619-629, 1963)の方法に準じて行うことができる。また、DNAのラベル化は従来から汎用されている放射性同位元素或いはジゴキシンゲン、ビオチン、フルオレセイン等の非放射性化合物の何れも使用可能であり、Rediprime™II Random Prime Labelling System(アマシヤムファルマシアバイオテック(株)社製)やAlkPhos™ Direct Labelling and Detection System(アマシヤムファルマシアバイオテック(株)社製)等を用いれば容易に実施できる。DNA塩基配列の決定もモレキュラークローニング第3版等に記された公知の方法を用いることができる。例えば、Li-Cor DNA Sequenc

er model 4000L等の機器を付属のマニュアルインストラクションに従って使用すれば容易に実施できる。また、ハイブリダイゼーションはモレキュラークロニング第3版等に記載されている方法に準じて行うことができる。

[0029] 本発明の形質転換微生物の培養は、通常資化し得る炭素源、窒素源、微生物に必須な無機塩、栄養素等を含む培地を用いて行われる。培養時のpHは4～10の範囲が好ましく、温度は20～50℃が好ましい。培養は1日～1週間程度好氣的に行われる。このようにして培養した形質転換微生物から通常の方法により本発明の酵素を得ることができる。このようにして得られた酵素は立体選択的に式(I)に示される化合物などのL体のアミノ酸アミドからL体のアミノ酸を製造する反応に用いることができる。ラセミ体等のDL体のアミノ酸アミドの混合物が基質である場合には、L体のアミノ酸とD体のアミノ酸アミドの混合物が得られる。この場合これらを分離することにより、L体のアミノ酸とD体のアミノ酸アミドがそれぞれ得られ、分離されたD体のアミノ酸アミドを別途加水分解することによってD体のアミノ酸が得られる。また、酵素反応の基質がL体のアミノ酸アミドのみからなる場合には対応したL体のアミノ酸が得られる。なお、形質転換体の菌体、又は該菌体の処理物を上記反応に用いることもできる。例えば、該菌体を含む培養液、分離菌体、菌体破砕物などを上記反応に使用することができ、常法に従って菌体又は酵素を固定化して使用することもできる。

[0030] 反応条件は、反応液に含まれるL体アミノ酸アミドの種類及び量によっても異なるが、反応液中の原料アミノ酸アミドの濃度としては0.1～40wt%、酵素量は、該酵素を含む組換え微生物の乾燥菌体基準で、原料アミノ酸アミド重量の0.00001～3倍、通常は0.00005～0.001倍が好ましい。反応温度は10～70℃、好ましくは20～60℃、pHは4～13、好ましくは5～10、よりさらには6～9が好ましい。また、2-アルキルシステインアミド及び2-アルキルシステインは酸化を受けやすく、酸素存在下で放置すると2量化したジスルフィドとなる。これを防止するため、生化学的不斉加水分解反応は窒素等の不活性ガス雰囲気下で行なうのが好ましいが、系内に2-メルカプトエタノール等の還元性物質を共存させる方法も可能である。また、反応に用いる全ての溶媒を反応実施前に脱気すると、副生成物を生成せず好適に反応が進行する。なお、本反応を行う際に、Mg、Cu、Zn、Fe、Mn、Ni、Co等の金属イオンを反

応系に加えることによって反応速度をより高めることができる。添加する量は金属イオンの種類によって異なり一概には言えないが、好ましくは1～50ppm、より好ましくは5～20ppmとなる濃度の金属イオンを添加することが望ましい。例えば、2価のMnイオンを5～20ppm加えた場合、反応速度は、無添加の場合に比較して2～5倍と大幅に向上する。また、不斉加水分解反応に使用した菌体又は菌体処理物は、遠心分離若しくは濾過操作などにより回収し、不斉加水分解反応用の酵素触媒として再利用することができる。なお、原料のアミノ酸アミドの反応液中における濃度が高い場合には、前記のアミノ酸アミドに対する酵素量は、使用量比が好ましい範囲の上限である3倍以下であって、反応が好適に実施できる比率を適宜選択すればよい。

[0031] DL体のアミノ酸アミドの不斉加水分解反応で生成したL体アミノ酸と未反応のD体アミノ酸アミドとの分離は、反応終了液から、例えば遠心分離や濾過膜などの通常の固液分離手段により微生物菌体を除いた後、減圧濃縮してから有機溶媒を加えてアミノ酸を析出させる方法、再結晶やカラムクロマトグラフィー等の公知の方法を利用でき、特に制限はないが、イオン交換電気透析法や、イオン交換樹脂による吸脱着を利用した分離方法も有効である。

[0032] 本発明のL体のアミノ酸アミド不斉加水分解酵素はL体の2-アルキルシステインアミドのアミド結合を効率的に加水分解する特徴を有する他、基質スペクトルが非常に広く、本酵素を用いることにより多種類のL体のアミノ酸アミドから対応のL体のアミノ酸を製造することができる。具体的には、2-メチル-L-システインに加え、L-アラニン、L-バリン、L-ロイシン、L-フェニルアラニン等に代表されるタンパク性アミノ酸、更にはL-2-アミノ酪酸、L-t-ロイシン、L-フェニルグリシン、L-p-クロロフェニルグリシン、L-アリシンエチレンアセタール、L-ペニシルアミン、(4R)-5,5-ジメチル-1,3-チアゾリジン-4-カルボン酸等のいわゆる非タンパク性アミノ酸を挙げることができるが、これに限定されるものではない。

実施例

[0033] 本発明を実施例及び比較例により更に具体的に説明するが、本発明はこれら例に限定されるものではない。

実施例1

アミノ酸アミド不斉加水分解酵素の単離

キサントバクター フラバス(Xanthobacter flavus)NR303株を、下表2の組成を有する培地3Lに接種し、30°Cで170時間培養し、遠心分離により菌体を取得した。菌体湿重量240gを超音波破碎し、遠心分離により無細胞抽出液を調製した。

表2. 培地組成

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3g
KH_2PO_4	1.4g
Na_2HPO_4	3g
NaHCO_3	0.3g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2g
2% CaCl_2	1g
Yeast extract	0.2g
ビタミン混液	1g
尿素	1g
グリセリン	10g
<u>微量ミネラル</u>	<u>3.5g</u>

1L (pH7.0)

これに30%飽和となるように硫酸アンモニウムを添加し、遠心分離して沈殿を除去した後、上清液に60%飽和となるように硫酸アンモニウムを追加添加した。生成した沈殿を遠心分離で集め、100mMリン酸カリウム緩衝液に溶解し、10mMリン酸カリウム緩衝液で透析した。これを10mMリン酸カリウム緩衝液で平衡化したDEAE-Toyopearl樹脂(東ソー(株)社製)に吸着させイオン交換クロマトグラフィーを行い、そのアミノ酸アミド不斉加水分解活性を有する画分を順次硫酸アンモニウムを用いたButyl-Toyopearlカラム(東ソー(株)社製)、Gigapiteカラム(生化学工業(株)社製)を用いてカラムクロマトグラフィーを行った。得られた精製酵素をSDS-PAGEにより分離したところ単一バンドであり、分子量は40000であった。

[0034] 実施例2

N末端アミノ酸配列の解析

実施例1により精製したポリペプチドのN末端アミノ酸配列を、自動エドマン分解アミノ酸シーケンサー HP G1005A Protein Sequencing System (ヒューレットパッカード社製)を用いて分析した。このアミノ酸配列は配列番号1で示される。

[0035] 実施例3

本発明DNA断片の取得

キサントバクター フラバス(*X. flavus*)を上記表1の培地5. 0mLに接種し、30℃で48時間培養した。遠心分離により微生物菌体を取得し、フェノールクロロホルム法を用いて該微生物の染色体DNAを取得した。実施例2で判明したアミノ酸配列から、配列番号2(AF)、3(BF)、4(AR)、5(BR)のプライマーを設計し、耐熱型DNAポリメラーゼ存在下これら4種のプライマーのうち、任意の2種を添加してPCRを行った。本PCRの産物をアガロースゲル電気泳動したところ配列番号3のプライマーBFと配列番号4のARを用いた反応液に87bpのDNAが特異的に増幅されていたので、これをアガロース電気泳動ゲルから抽出精製した。そのDNAの一部をpT7BlueT-Vector (Novagen社製)にクローニングしてLi-CorDNA Sequencer model 4000Lを用いて(操作方法は付属のマニュアルインストラクションに従った)塩基配列を決定した(配列番号6)。上記DegenerPCRにより増幅した87bpの精製DNAの残りをRediprime™II Random Prime Labelling System(アマシャムファルマシア バイオテック(株)社製)により標識した。

[0036] 実施例4

キサントバクター フラバス(*X. flavus*)染色体DNAライブラリーのサザンハイブリダイゼーション

実施例3記載の方法によりキサントバクター フラバス(*X. flavus*)の染色体DNAを取得した。本DNAをEcoRIで消化した後、実施例3で作製した87bpの標識DNAをプローブとして用いてサザンハイブリダイゼーションを行った。手法はモレキュラークローニング第3版に従った。その結果、約5kbのDNAバンドが検出され、本DNAをアガロースゲルから抽出精製し、pBluescriptII SK(-) (Stratagene社製)のEcoRI部位に挿入し、塩化カルシウムを用いた形質転換方法により*E. coli* (JM109)に導入した。

[0037] 実施例5

コロニーハイブリダイゼーション及びサブクローニング

実施例4において得られたE. coli (JM109)の形質転換株を50 μ g/mLアンピシリンを含むLB寒天培地(1Lの水溶液中にBacto Trypton 10.0g、Bacto Yeast Extract 5.0g、塩化ナトリウム 10.0g、寒天15.0gを含む)に塗布し、37°Cで一晩培養した。生じたコロニーをニトロセルロース膜CELLULOSE NITRATE(アドバンテック東洋(株)社製)にリフティングし、実施例3で取得したDNAプローブを用い、ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションの結果、陽性のクローンからプラスミドを取得し、Li-Cor DNA Sequencer model 4000Lを用いて、塩基配列を決定した(配列番号7)。

[0038] 実施例6

発現用プラスミドの構築及びE. coliの形質転換

キサントバクターフラバス(X. flavus)より抽出した染色体DNAを鋳型として、プライマーMCA-FとMCA-R(配列番号9及び配列番号10)を用いてPCRを行った。得られたPCR反応生成物を精製し、制限酵素HindIII及びXbaIで消化し、同様の酵素で消化したpUC19(宝酒造(株)社製)に連結してpMCA1を作製後、E. coli (JM109)に塩化カルシウム法で形質転換した。50 μ g/mLアンピシリンを含むLB寒天培地に形質転換株を塗布し、生育したクローンを取得して形質転換株pMCA1/JM109を得た。

[0039] 実施例7

形質転換体を用いた2-メチルシステインアミドラセミ混合物の不斉加水分解～塩化マンガン添加

下表3の組成の培地を調製し、この培地200mLを1Lの三角フラスコに入れ、滅菌後、アンピシリン50 μ g/mLを添加してから形質転換株pMCA1/JM109を接種し、37°Cで15時間振とう培養を行った。次いで、培養液から遠心分離により乾燥菌体0.1gに相当する生菌体を得た。

表3. 培地組成

pH 7.0

トリプトン	1%
酵母エキス	0.5%
塩化ナトリウム	0.5%

2-メチルシステインアミド塩酸塩のラセミ混合物10.0g (58.6mmol)を50mMリン酸緩衝液 (pH7.0) 300mLに溶かした後、500mLフラスコに入れ、2価のMnイオンの濃度が10ppmとなるように塩化マンガン水溶液を加え、さらに乾燥菌体0.01gに相当する生菌体を加えて、窒素気流下、30°Cで24時間攪拌して加水分解反応を行った。

反応後、反応液から遠心分離によって菌体を除去して上清を得た。この上清液に活性炭1gを加えて1時間攪拌した後、活性炭を濾別してからエバポレーターで減圧にて水を留去した。ここに2-プロパノール20mLを加えて過熱攪拌後、5°Cに冷却して析出した結晶を濾取した。濾取した結晶をエタノールより再結晶して2-メチル-L-システイン3.04g (22.5mmol)を得た。反応に仕込んだラセミ混合物中の2-メチル-L-システインアミドからの単離収率は76.8mol%、2-メチルシステインアミドのラセミ混合物からの単離収率は38.4%であった。また、この固体を下表4のHPLC条件Aで分析した結果、光学純度は98%e. e. 以上であった。

表4. HPLC条件A

カラム: Sumichiral OA-5000 ((株)住化分析センター社製)

カラム温度: 60°C

溶離液: 3mM CuSO₄ 水溶液

流速: 1.0mL/min

検出: CD-2095plus (Jasco)

試料: 0.1%水溶液をホルマリン処理後、50μL注入

[0040] 実施例8

形質転換体を用いた2-メチルシステインアミドラセミ混合物の不斉加水分解～塩化マンガン非添加

実施例7において、塩化マンガン水溶液を加えずに生化学的不斉加水分解反応を行った。30°Cで24時間反応を行い、実施例7と同様の後処理を施し、1.50g(11.1

mmol)の2-メチル-L-システインが得られた。2-メチル-L-システインアミドからの単離収率は37.9mol%、2-メチルシステインアミドからの単離収率は18.9mol%、光学純度は98%e. e. 以上であった。

[0041] 比較例1

野生型微生物(菌体0.01g)を用いた2-メチルシステインアミドラセミ混合物の不斉加水分解

下表5の組成を有する培地を調製し、この培地200mLを1Lの三角フラスコに入れ、滅菌後、キサントバクター フラバス(X. flavus)を接種し、30°Cで170時間振とう培養を行った。次いで、培養液から遠心分離により乾燥菌体0.1gに相当する生菌体を得た。

表5. 培地組成

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3g
KH_2PO_4	1.4g
Na_2HPO_4	3g
NaHCO_3	0.3g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2g
2% CaCl_2	1g
Yeast extract	0.2g
ビタミン混液	1g
尿素	1g
グリセリン	10g
<u>微量ミネラル</u>	<u>3.5g</u>

1L (pH7.0)

2-メチルシステインアミド塩酸塩のラセミ混合物10.0g (58.6mmol)を50mMリン酸緩衝液 (pH7.0) 300mLに溶かした後、500mLフラスコに入れ、2価のMnイオンの濃度が10ppmとなるように塩化マンガン水溶液を加え、さらに乾燥菌体0.01gに相当する生菌体を加えて、窒素気流下、30°Cで24時間攪拌して加水分解反応を行った。反応後、反応液から遠心分離によって菌体を除去し、上清液を下表6のH

PLC条件Bで分析したところ、生成物である2-メチルシステインは認められなかった。

表6. HPLC条件B

カラム:LiChrosorb 100 RP-18(関東化学(株)社製)

カラム温度:40°C

溶離液:50mM HClO₄水溶液

流速:0.5mL/min

検出:RI

試料:0.1%水溶液を5 μ L注入

[0042] 比較例2

野生型微生物(菌体5g)を用いた2-メチルシステインアミドラセミ混合物の不斉加水分解

比較例1の培地組成で培養した10Lの培養液から遠心分離によりキサントバクテラフラバス(*X. flavus*)の乾燥菌体5gに相当する生菌体を得た。2-メチルシステインアミド塩酸塩のラセミ混合物10.0g(58.6mmol)を50mMリン酸緩衝液(pH7.0)300mLに溶かした後、500mLフラスコに入れ、2価のMnイオンの濃度が10ppmとなるように塩化マンガン水溶液を加え、さらに乾燥菌体5gに相当する生菌体を加えて、窒素気流下、30°Cで24時間攪拌して加水分解反応を行った。反応後、反応液から遠心分離によって菌体を除去し、上清液をHPLC条件Bで分析したところ、2-メチルシステインが28.2mmol生成していることが確認された。さらにHPLC条件Aで分析したところL体アミノ酸の光学純度が98%e. e. 以上であった。

[0043] 比較例3

野生型微生物を用いた2-メチルシステインアミドラセミ混合物の不斉加水分解～塩化マンガン非添加

比較例2において、塩化マンガン水溶液を加えずに生化学的不斉加水分解反応を行った。30°Cで24時間反応を行い、反応後、反応液から遠心分離によって菌体を除去し、上清液をHPLC条件Bで分析したところ、2-メチルシステインが13.9mmol生成していることが確認された。さらにHPLC条件Aで分析したところL体アミノ酸の

光学純度が98%e. e. 以上であった。

[0044] 実施例9

形質転換体を用いた種々のアミノ酸アミドのラセミ化合物の不斉加水分解

実施例7と同様に培養した形質転換株pMCA1/JM109の培養液を用いて、種々のアミノ酸アミドのラセミ混合物を基質として酵素反応を行った。基質化合物を50mMリン酸緩衝液(pH7.0)に溶解し、基質濃度を0.1%に調製し、菌体を添加して30°Cで酵素反応を行い、反応後、反応液から遠心分離によって菌体を除去し、立体選択性と反応率(反応率=反応後のアミノ酸mol量/(反応後のアミノ酸アミドmol量+反応後のアミノ酸mol量)×100)をHPLC条件A及びHPLC条件Bによって分析した。結果を表7に示す。何れの反応も、加水分解の選択性はL体選択的であり、生じたL体のアミノ酸の光学純度は、何れも98%e. e. 以上であった。

[0045] [表1]

表7. 各種アミノ酸アミドでの反応結果

基質	基質重量/乾燥菌体重量	反応時間	反応率
バリンアミド	0.01	24hr	44.3%
2-アミノ酪酸アミド	0.1	5hr	49.2%
t-ロイシンアミド	0.1	24hr	44.4%
アリシンアミドエチレンアセタール	0.01	24hr	44.3%
フェニルグリシンアミド	0.01	5hr	48.8%
p-クロロフェニルグリシンアミド	0.01	5hr	49.6%
フェニルアラニンアミド	0.01	5hr	47.8%
ペニシラミンアミド	0.01	5hr	44.9%
5,5-ジメチルチアゾリジン-4-カルボン酸アミド	0.1	24hr	47.0%

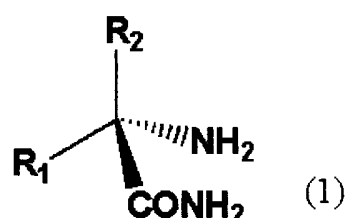
産業上の利用の可能性

[0046] 本発明により、各種工業薬品、医薬及び農薬の製造中間体として広範な活用が期待され、産業上、非常に有用な化合物である光学活性なアミノ酸、特に光学活性な2-アルキルシステインを製造する好適な方法を提供することができる。

請求の範囲

- [1] 配列番号8に示されるアミノ酸番号1～355で表されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列から1個若しくは複数個のアミノ酸が欠損、置換、又は付加されたアミノ酸配列を有する、L体のアミノ酸アミドのアミド結合を立体選択的に加水分解する酵素。
- [2] 請求項1記載の酵素の酵素タンパク質をコードするDNA。
- [3] 配列番号7に示される塩基配列の内の塩基番号868～1932で表される塩基配列、又は該塩基配列とストリンジエントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有する、請求項2記載のDNA。
- [4] 請求項2又は3記載のDNAが導入された組換え微生物。
- [5] 組換え微生物がエシェリシア コリ (*Escherichia coli*) である、請求項4記載の組換え微生物。
- [6] 請求項1記載の酵素をL体のアミノ酸アミドに作用させL体のアミノ酸に変換する、L体のアミノ酸の製造方法。
- [7] L体のアミノ酸アミドが式1に示す化合物である、請求項6記載の製造方法。

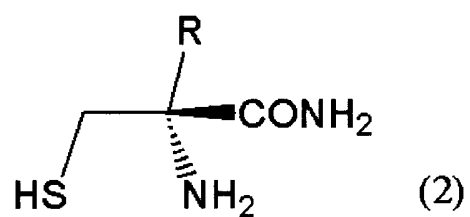
[化1]



(式1中のR₁は水素、低級アルキル基、置換低級アルキル基、フェニル基、置換フェニル基、複素環基、置換複素環基、又はR₁が結合している炭素原子及び該炭素原子に結合しているアミノ基と一体となって含窒素複素環を形成し得る基であり、R₂は水素、又は炭素数1～4の低級アルキル基を示す。ただし、R₁とR₂が同時に水素である場合は除く)

- [8] L体のアミノ酸アミドが式2に示す化合物である、請求項6記載の製造方法。

[化2]



(式2中のRは炭素数1~4の低級アルキル基を示す。)

[9] 式2中のRがメチル基である、請求項8記載の製造方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/009345

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl ⁷ C12N15/55, 1/15, 1/19, 1/21, 5/10, 9/80, C12P13/04		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl ⁷ C12N15/55, 1/15, 1/19, 1/21, 5/10, 9/80, C12P13/04		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2005 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2005 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2005		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS/WPI (DIALOG), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq, PubMed		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Larimer F.W. et al., Rhodopseudomonas palustris CGA009 complete genome; segment 8/16. Database GenBank accession No. BX572600, 2004 Apr., gene 297643..298632	1-9
A	JP 2000-513942 A (LONZA AG), 24 October, 2000 (24.10.00), Full text & WO 98/01568 A2 & EP 938584 A2 & US 2003/0087402 A1 & US 6773910 B1	1-9
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 02 June, 2005 (02.06.05)		Date of mailing of the international search report 21 June, 2005 (21.06.05)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/009345

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 5-161495 A (Mitsubishi Kasei Corp.), 29 June, 1993 (29.06.93), Full text & JP 5-30982 A & JP 5-30983 A & JP 5-30984 A & JP 5-103681 A & JP 5-161496 A & JP 5-236975 A & JP 5-236976 A & JP 5-236977 A & EP 530522 A2	1-9
A	JP 8-256771 A (Asahi Chemical Industry Co., Ltd.), 08 October, 1996 (08.10.96), Full text (Family: none)	1-9
A	JP 2003-250558 A (Mitsubishi Chemical Corp.), 09 September, 2003 (09.09.03), Full text (Family: none)	1-9
A	WO 00/63354 A1 (Mitsubishi Rayon Co., Ltd.), 26 October, 2000 (26.10.00), Full text & US 6617139 B1 & EP 1174499 A1	1-9

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. ⁷ C12N15/55, 1/15, 1/19, 1/21, 5/10, 9/80, C12P13/04			
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. ⁷ C12N15/55, 1/15, 1/19, 1/21, 5/10, 9/80, C12P13/04			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2005年 日本国実用新案登録公報 1996-2005年 日本国登録実用新案公報 1994-2005年			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) BIOSIS/WPI (DIALOG), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/Geneseq, PubMed			
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 請求の範囲の番号	
A	Larimer F.W. et al., Rhodopseudomonas palustris CGA009 complete genome; segment 8/16. Database GenBank accession No. BX572600, 2004 Apr., gene 297643..298632	1-9	
A	JP 2000-513942 A (ロンザ アーゲー) 2000.10.24 全文 & WO 98/01568 A2 & EP 938584 A2 & US 2003/0087402 A1 & US 6773910 B1	1-9	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日 02.06.2005		国際調査報告の発送日 21.6.2005	
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) 渡邊 潤也	4B 3131
		電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 5-161495 A(三菱化成株式会社)1993.06.29 全文 & JP 5-30982 A & JP 5-30983 A & JP 5-30984 A & JP 5-103681 A & JP 5-161496 A & JP 5-236975 A & JP 5-236976 A & JP 5-236977 A & EP 530522 A2	1-9
A	JP 8-256771 A (旭化成工業株式会社)1996.10.08 全文(ファミリーなし)	1-9
A	JP 2003-250558 A(三菱化学株式会社)2003.09.09 全文(ファミリーなし)	1-9
A	WO 00/63354 A1(三菱レイヨン株式会社)2000.10.26 全文 & US 6617139 B1 & EP 1174499 A1	1-9