

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2017年2月2日(02.02.2017)



(10) 国際公開番号
WO 2017/018060 A1

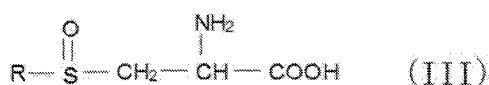
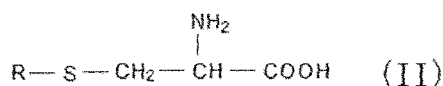
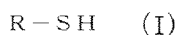
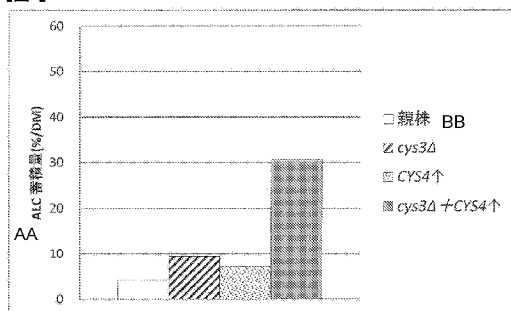
- (51) 国際特許分類:
C12P 13/12 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
C12N 9/88 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/066974
- (22) 国際出願日: 2016年6月7日(07.06.2016)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2015-147936 2015年7月27日(27.07.2015) JP
- (71) 出願人: 味の素株式会社(AJINOMOTO CO., INC.)
[JP/JP]; 〒1048315 東京都中央区京橋一丁目1番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 山本 英樹(YAMAMOTO, Hideki); 〒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). 菅原 誠吾(SUGAWARA, Seigo); 〒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: 高島 一(TAKASHIMA, Hajime); 〒5410044 大阪府大阪市中央区伏見町四丁目1番1号 明治安田生命大阪御堂筋ビル Osaka (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR),

[続葉有]

(54) Title: PRODUCTION METHOD FOR CYSTEINE DERIVATIVE AND CYSTEINE SULFOXIDE DERIVATIVE

(54) 発明の名称: システイン誘導体及びシステインスルホキシド誘導体の製造方法

[図8]



AA ALC accumulation amount (%/DM)
BB Parent strain

(57) Abstract: The present invention provides a method for reacting a thiol compound represented by formula (I) (R in the formula is as defined in the description) with L-serine in the presence of cystathionine β-synthase to produce a cysteine derivative represented by formula (II) (R in the formula is as defined above), and a method for reacting the cysteine derivative with an oxidase and a substrate thereof to produce a cysteine sulfoxide derivative represented by formula (III) (R in the formula is as defined above). With these methods, it is possible to produce the cysteine derivative and the cysteine sulfoxide derivative stably on an industrial scale and using means that are safe for use in food products.

(57) 要約: 本願発明は、シスタチオニンβ-シンターゼの存在下、式(I): (式中、Rは明細書中に記載の通りである) で表されるチオール化合物とL-セリンとを反応させて式(II): (式中、Rは上述の通りである) で表されるシステイン誘導体を製造する方法、及び該システイン誘導体と、オキシダーゼ及びその基質とを反応させて式(III): (式中、Rは上述の通りである) で表されるシステインスルホキシド誘導体を製造する方法を提供する。当該方法により、システイン誘導体やシステインスルホキシド誘導体を、工業的規模で安定的に、且つ食品に使用する際にも安全な方法で製造することが可能となる。



OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— 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))

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称：

システイン誘導体及びシステインスルホキシド誘導体の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、システイン誘導体及びシステインスルホキシド誘導体の製造方法に関する。

背景技術

[0002] システイン誘導体やシステインスルホキシド誘導体は、医薬品の中間体、食品添加物の原材料として期待されており、安価な工業的製法が種々検討されている。システイン誘導体の製造法として、システインデスルフヒドラーゼ（特許文献1、2）、トリプトファンシンターゼ（特許文献3、4）によるS-アルキルシステイン又はS-アルケニルシステインの製造法の報告があるが、その産生量は十分なものではない。

[0003] 一方、システインスルホキシド誘導体の製造法として、過酸化水素によるS-アルキルシステインスルホキシド又はS-アルケニルシステインスルホキシドの製造法が複数報告されているが（非特許文献1、2）、食品に使用する際には残存する過酸化水素の除去が必要となる。

先行技術文献

特許文献

- [0004] 特許文献1：特開昭50-132178号公報
特許文献2：特開昭52-139785号公報
特許文献3：特開昭58-146287号公報
特許文献4：特開2006-288242号公報

非特許文献

- [0005] 非特許文献1：Bull. Korean Chem. Soc. (2011) Vol.32, No.1 319
非特許文献2：Tetrahedron: Asymmetry 24 (2013) pp.990-94

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明は、医薬品の中間体、食品添加物の原材料として期待されているシステイン誘導体やシステインスルホキシド誘導体、特に、S-アルキルシステインやS-アルケニルシステイン等のシステイン誘導体、及びS-アルキルシステインスルホキシドやS-アルケニルシステインスルホキシド等のシステインスルホキシド誘導体を、工業的規模で安定的に、且つ食品に使用する際にも安全な方法で製造する方法を提供することを目的とする。

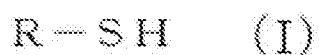
課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、上記目的を達成すべく、チオール化合物とL-セリンから酵素的にシステイン誘導体を製造する方法に着目し、鋭意検討した結果、シスタチオニンβ-シンターゼがその責任酵素となり得ることを見出した。さらに、システイン誘導体を酵素的にシステインスルホキシド誘導体に変換する方法に着目し、鋭意検討した結果、オキシダーゼによって効率よくシステイン誘導体をシステインスルホキシド誘導体に変換する方法を見出した。これらの知見を得て、従来に比べ、より効率よく、安定的にシステイン誘導体及びシステインスルホキシド誘導体を得ることに成功して本発明を完成するに至った。

[0008] 即ち、本発明は以下の通りである。

[1] シスタチオニンβ-シンターゼの存在下、式(I)：

[0009] [化1]

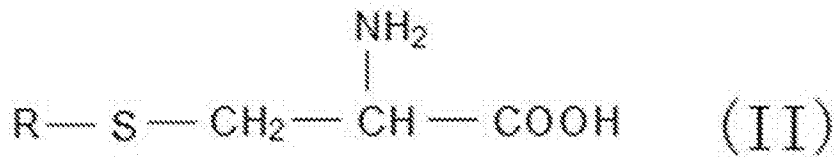


[0010] (式中、RはC₁₋₆アルキル基又はC₂₋₆アルケニル基を表す)

で表されるチオール化合物とL-セリンとを反応させることを特徴とする、
式(II)：

[0011]

[化2]



[0012] (式中、Rは上述の通りである)

で表されるシステイン誘導体の製造方法。

[2] 各式中、Rが1-プロペニル基、プロピル基、メチル基またはアリル基である、上記[1]記載の方法。

[3] 前記シスタチオニンβ-シントラーゼがシスタチオニンβ-シントラーゼ生産性微生物由来である、上記[1]又は[2]記載の方法。

[4] 前記微生物が、シスタチオニンβ-シントラーゼ活性が増強されている変異株である、上記[3]記載の方法。

[5] 前記シスタチオニンβ-シントラーゼがCYS4遺伝子によってコードされる酵素である、上記[4]記載の方法。

[6] 前記微生物が、シスタチオニンγ-リアーゼ活性が低減されている変異株である、上記[3]～[5]のいずれかに記載の方法。

[7] 前記シスタチオニンγ-リアーゼがCYS3遺伝子によってコードされる酵素である、上記[6]記載の方法。

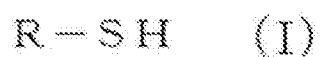
[8] 前記微生物が酵母である、上記[3]～[7]のいずれかに記載の方法。

[9] 前記酵母がSaccharomyces属酵母である、上記[8]記載の方法。

[10] 前記Saccharomyces属酵母がSaccharomyces cerevisiaeである、上記[9]記載の方法。

[11] シスタチオニンβ-シントラーゼの存在下、式(I)：

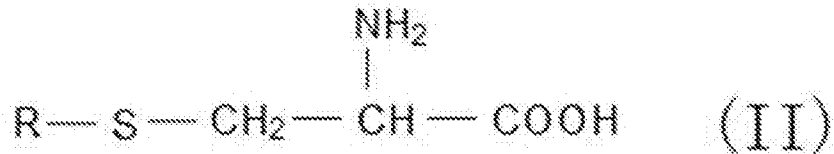
[0013] [化3]



[0014] (式中、RはC₁₋₆アルキル基又はC₂₋₆アルケニル基を表す)

で表されるチオール化合物とL-セリンとを反応させて式(II)：

[0015] [化4]

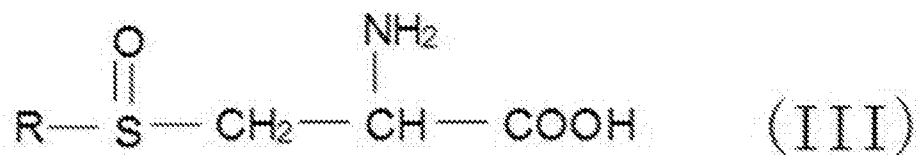


[0016] (式中、Rは上述の通りである)

で表されるシステイン誘導体を製造する工程(工程1)、及び

工程1で得られたシステイン誘導体と、オキシダーゼ及びその基質とを反応させて式(III)：

[0017] [化5]



[0018] (式中、Rは上述の通りである)

で表されるシステインスルホキシド誘導体を製造する工程(工程2)を含む、該システインスルホキシド誘導体の製造方法。

[12] オキシダーゼがグルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、ウリカーゼ、コレステロールオキシダーゼ、コリンオキシダーゼ及びアシルCoAオキシダーゼからなる群より選択される少なくとも1種である、上記[11]記載の方法。

[13] 各式中、Rが1-プロペニル基、プロピル基、メチル基またはアリル基である、上記[11]又は[12]記載の方法。

[14] 前記シスタチオニンβ-シントラーゼがシスタチオニンβ-シントラーゼ生産性微生物由来である、上記[11]～[13]のいずれかに記載の方法。

[15] 前記微生物が、シスタチオニンβ-シントラーゼ活性が增強されてい

る変異株である、上記〔14〕記載の方法。

〔16〕前記シスタチオニンβ-シンターゼがCYS4遺伝子によってコードされる酵素である、上記〔15〕記載の方法。

〔17〕前記微生物が、シスタチオニンγ-リアーゼ活性が低減されている変異株である、上記〔14〕～〔16〕のいずれかに記載の方法。

〔18〕前記シスタチオニンγ-リアーゼがCYS3遺伝子によってコードされる酵素である、上記〔17〕記載の方法。

〔19〕前記微生物が酵母である、上記〔14〕～〔18〕のいずれかに記載の方法。

〔20〕前記酵母がSaccharomyces属酵母である、上記〔19〕記載の方法。

〔21〕前記Saccharomyces属酵母がSaccharomyces cerevisiaeである、上記〔20〕記載の方法。

〔22〕シスタチオニンβ-シンターゼ活性を有する酵母を培養し、該酵母の抽出物および／または培養物の存在下、式（I）：

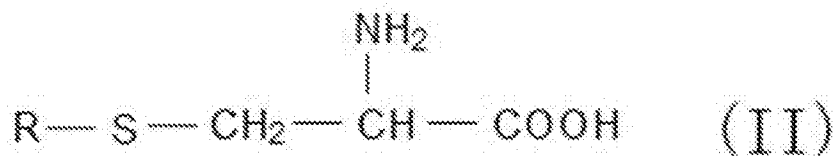
[0019] [化6]



[0020]（式中、RはC₁₋₆アルキル基又はC₂₋₆アルケニル基を表す）

で表されるチオール化合物とL-セリンとを反応させることを特徴とする、式（II）：

[0021] [化7]



[0022]（式中、Rは上述の通りである）

で表されるシステイン誘導体の製造方法。

〔23〕各式中、Rが1-プロペニル基、プロピル基、メチル基またはアリ

ル基である、上記〔22〕記載の方法。

〔24〕シスタチオンβ-シンターゼ活性を有する酵母を培養し、該酵母の抽出物および／または培養物の存在下、式（I）：

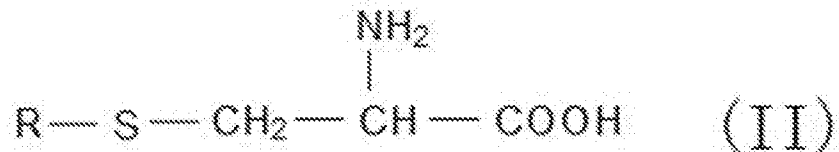
[0023] [化8]



[0024]（式中、RはC₁₋₆アルキル基又はC₂₋₆アルケニル基を表す）

で表されるチオール化合物とL-セリンとを反応させて式（II）：

[0025] [化9]

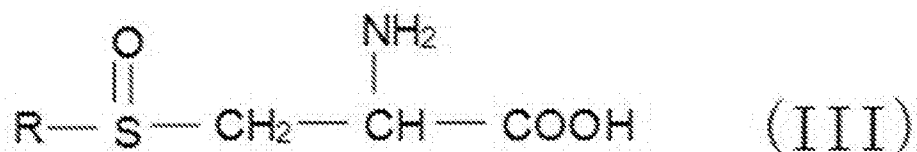


[0026]（式中、Rは上述の通りである）

で表されるシステイン誘導体を製造する工程（工程1）、及び

工程1で得られたシステイン誘導体と、オキシダーゼ及びその基質とを反応させて式（III）：

[0027] [化10]



[0028]（式中、Rは上述の通りである）

で表されるシステインスルホキッド誘導体を製造する工程（工程2）を含む、該システインスルホキッド誘導体の製造方法。

〔25〕オキシダーゼがグルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、ウリカーゼ、コレステロールオキシダーゼ、コリンオキシダーゼ及びアシルCoAオキシダーゼからなる群より選択される少なくとも1種である、

上記〔24〕記載の方法。

〔26〕各式中、Rが1-プロペニル基、プロピル基、メチル基またはアリル基である、上記〔24〕又は〔25〕記載の方法。

〔27〕前記酵母が、CYS4遺伝子高発現変異株；CYS3遺伝子低発現変異株；及びCYS4遺伝子高発現且つCYS3遺伝子低発現変異株からなる群より選択される少なくとも1種である、上記〔22〕～〔26〕のいずれかに記載の方法。

〔28〕前記酵母がSaccharomyces属酵母である、上記〔22〕～〔27〕のいずれかに記載の方法。

〔29〕前記Saccharomyces属酵母がSaccharomyces cerevisiaeである、上記〔28〕記載の方法。

〔30〕該酵母の抽出物および／または培養物のシスタチオニンβ-シターゼ活性が、抽出物および／または培養物1gあたり2500U以上、5000U以上、10000U以上、20000U以上、30000U以上、又は40000U以上である、上記〔22〕～〔29〕のいずれかに記載の方法。

〔31〕該酵母の抽出物および／または培養物のシスタチオニンβ-シターゼ活性が、抽出物および／または培養物1gあたり 1×10^6 U以下、 5×10^5 U以下、 1×10^5 U以下、又は 5×10^4 U以下である、上記〔22〕～〔30〕のいずれかに記載の方法。

〔32〕該酵母の抽出物および／または培養物のシスタチオニンγ-リアーゼ活性が、抽出物および／または培養物1gあたり100U以下、50U以下、10U以下、1U以下、又は実質的に含まないかあるいは0Uである、上記〔22〕～〔31〕のいずれかに記載の方法。

発明の効果

[0029] 本発明によれば、より効率よく、且つ安定的にシステイン誘導体及びシステインスルホキシド誘導体を製造することができる。

図面の簡単な説明

[0030] [図1]各種酵素をコードする遺伝子を欠失させた酵母変異株におけるS-アリルシステイン (ALC) の生成量を測定した結果を示すグラフである。野生株：実験室酵母である*Saccharomyces cerevisiae* BY4742、 $\Delta CYS3$: $CYS3$ 遺伝子欠失変異株、 $\Delta CYS4$: $CYS4$ 遺伝子欠失変異株、 $\Delta TRP5$: $TRP5$ 遺伝子欠失変異株、 $\Delta MET17$: $MET17$ 遺伝子欠失変異株。縦軸は反応液中のALCの濃度 (ppm) を示す。

[図2]精製シスタチオニン β -シンターゼ存在下、S-アリルメルカプタンとL-セリンとを反応させて得られるS-アリルシステイン (ALC) の生成量を経時的に定量した結果を示すグラフである。縦軸は反応液中のALCの濃度 (ppm) を示す。横軸は反応時間 (hr) を示す。

[図3]精製シスタチオニン β -シンターゼ存在下、S-メチルメルカプタンとL-セリンとを反応させて得られるS-メチルシステインの生成量を経時的に定量した結果を示すグラフである。縦軸は反応液中のS-メチルシステインの濃度 (ppm) を示す。横軸は反応時間 (hr) を示す。

[図4]精製シスタチオニン β -シンターゼ存在下、S-プロピルメルカプタンとL-セリンとを反応させて得られるS-プロピルシステインの生成量を経時的に定量した結果を示すグラフである。縦軸は反応液中のS-プロピルシステインの濃度 (ppm) を示す。横軸は反応時間 (hr) を示す。

[図5]グルコースオキシダーゼ存在下、あるいは非存在下での、グルコースとS-アリルシステインとを反応させて得られるS-アリルシステインスルホキシド (ALCSO) の生成量を経時的に定量した結果を示すグラフである。上段は試験区1の、中段は試験区2の、下段は試験区3の結果をそれぞれ示す。縦軸は反応液中のグルコン酸、ALC、ALCSOの濃度 (ppm) を示す。横軸は反応時間 (hr) を示す。

[図6]菌株から粗酵素液を調製する方法を示すチャート図である。

[図7]ALC生成試験における各反応条件を示す。

[図8]各菌株 (親株、 $cys3\Delta$ 、 $CYS4\uparrow$ 、 $cys3\Delta+CYS4\uparrow$) のALC蓄積能を示したグラフである。縦軸は酵母乾燥重量当たりのALC蓄積量 (%) を示す。

。

発明を実施するための形態

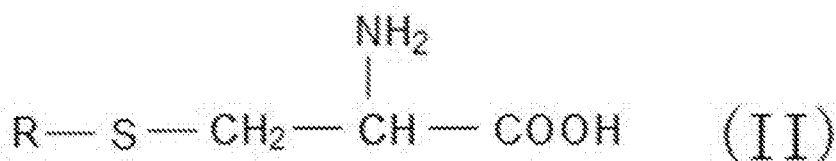
[0031] 本明細書中、「 C_{1-6} アルキル基」とは、炭素数1～6、好ましくは1～3の直鎖又は分岐鎖アルキル基を意味し、具体的には、メチル、エチル、 n -プロピル、イソプロピル、 n -ブチル、イソブチル、 sec -ブチルおよび $tert$ -ブチル、ペンチル、ヘキシル等が挙げられる。好ましくは、メチル及びプロピルである。

本明細書中、「 C_{2-6} アルケニル基」とは、炭素数2～6、好ましくは2又は3の直鎖又は分岐鎖アルケニル基を意味し、前記アルキル基において、1個又は複数の二重結合を有するもの等が挙げられる。具体的には、ビニル、アリル（2-プロペニル）、1-プロペニル、1-ブテニル、2-ブテニル、3-ブテニル、1, 3-ブタジエニル、3-メチル-2-ブテニル等が挙げられる。好ましくは1-プロペニル又はアリルである。

[0032] 1. システイン誘導体の製造方法

本発明は、式（I）：

[0033] [化11]



[0034] （式中、Rは C_{1-6} アルキル基又は C_{2-6} アルケニル基を表す）

で表されるシステイン誘導体（以下、単にシステイン誘導体（I）とも称する）を酵素的に製造する方法を提供する。

当該方法は、シスタチオニン β -シンターゼの存在下、式（I）：

[0035] [化12]



[0036] （式中、Rの定義は上述の通りである）

で表されるチオール化合物（以下、単にチオール化合物（I）とも称する）とL-セリンとを反応させることを特徴とする。

本発明において、Rとして好ましくは、1-プロペニル基、プロピル基、メチル基及びアリル基である。

[0037] シスタチオニン β -シンターゼは、ホモシステインとセリンからシスタチオニンを合成する反応を触媒する酵素をいい、EC 4. 2. 1. 22に分類される。その構造遺伝子は例えば*Saccharomyces cerevisiae*ではCYS4遺伝子（GenBank NM_001181284）として知られている。本発明で用いられるシスタチオニン β -シンターゼは、チオール化合物（I）とL-セリンとからシステイン誘導体（II）を製造できるものであればその由来は特に限定されない。天然物であっても、化学的又は生化学的に合成されたものであってもよく、また、遺伝子工学的に生産されたものであってもよい。好ましくはシスタチオニン β -シンターゼ生産性微生物由来である。シスタチオニン β -シンターゼ生産性微生物は、シスタチオニン β -シンターゼを細胞内に蓄積できるものであれば特に限定されない。具体的には、酵母、糸状菌、担子菌などが挙げられ、好ましくは酵母である。酵母とは、単細胞の真菌を示し、有孢子酵母、担子菌酵母、不完全酵母などが挙げられる。この中でも例えば、*Saccharomyces*属、*Candida*属、*Pichia*属、*Hansenula*属、*Zygosaccharomyces*属など有孢子酵母が好ましく、*Saccharomyces*属、*Candida*属がより好ましく、*Saccharomyces*属が最も好ましい。*Saccharomyces*属酵母には、実験室酵母、清酒酵母、焼酎酵母、ワイン酵母、ビール酵母、パン酵母なども含まれる。より好ましくは*Saccharomyces cerevisiae*及び*Candida utilis*であり、最も好ましくは*Saccharomyces cerevisiae*である。これらの菌株は商業的に入手が可能であるか、あるいは既知文献に基づいて入手、調製が可能である。例えばアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（住所 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852 P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, United States of America）では、各菌株に対応する登録番号が付与されており、この登録番号を利用して分譲を受けることが出来る（http :

／／www.atcc.org／参照）。各菌株に対応する登録番号は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションのカタログに記載されている。Saccharomyces cerevisiaeとしては、具体的には、BY4742株(ATCC204508)やS288C株(ATCC26108)を用いることができる。また、Candida utilisとしては、具体的には、Candida utilis ATCC22023株を用いることができる。特に好ましくはSaccharomyces cerevisiaeである。

[0038] シスタチオニンβ-シンターゼ生産性微生物は、野生株であってもよいし、システイン誘導体(11)の合成に関与する酵素に変異を有するよう改変されたもの、即ち変異株であってもよい。

シスタチオニンβ-シンターゼ生産性微生物における、システイン誘導体(11)の合成に関与する酵素としては、後述の実施例で本発明者らが明らかにしているように、正に制御する酵素としてシスタチオニンβ-シンターゼが、負に制御する酵素としてシスタチオニンγ-リアーゼが挙げられる。シスタチオニンγ-リアーゼは、シスタチオニンをシステインとα-ケト酪酸に分解するような反応を触媒する酵素をいい、EC4.4.1.1に分類される。その構造遺伝子は例えばSaccharomyces cerevisiaeではCYS3遺伝子(GenBank NM_001178157)として知られている。

ここで、「変異株」とは、野生株もしくは改変前の株(親株)と比較して、該酵素活性が増強されている、あるいは低減されている(活性の完全な消失も含む)株のことを意味する。本発明において好適に用いられる変異株としては、Saccharomyces cerevisiae変異株が挙げられ、特に、シスタチオニンβ-シンターゼをコードする遺伝子を高発現する「CYS4遺伝子高発現変異株」やシスタチオニンγ-リアーゼをコードする遺伝子の発現が抑制された「CYS3遺伝子低発現変異株」が挙げられる。野生株(Saccharomyces cerevisiae BY4742)と比較した場合、「CYS4遺伝子高発現変異株」では、CYS4遺伝子の発現が有意に増強されており、具体的には、1.5倍以上、より好ましくは2倍以上、さらに好ましくは3倍以上、特に好ましくは5倍以上、最も好ましくは10倍以上増強されている。野生株(Saccharom

yces cerevisiae BY4742) と比較した場合、「C Y S 3 遺伝子低発現変異株」では、C Y S 3 遺伝子の発現が有意に低減されており、具体的には50%以下、より好ましくは30%以下、さらに好ましくは20%以下、特に好ましくは10%以下、最も好ましくは5%以下に低減されている。また、シスタチオニγγーリアーゼ遺伝子の発現が実質的に消失している（即ち、検出限界未満である）のが好ましい。これらの変異株は天然に存在する（自然変異）ものであってもよいし、人為的に作出されたものであってもよい。人為的に作出する方法としては、セルフクローニングによる方法、従来育種法（例えば薬剤変異、交雑）等が挙げられる。後述の「酵素活性が低減されるような改変」あるいは「酵素活性を増強させるような改変」の為の各手法であってもよい。

[0039] 「酵素活性が低減されている」とは、目的の酵素活性（本発明ではシスタチオニγγーリアーゼ活性）が野生株や親株等の非改変株と比較して減少していることを意味し、活性が完全に消失している場合を含む。野生株（*Saccharomyces cerevisiae* BY4742）と比較した場合、シスタチオニγγーリアーゼ活性は、好ましくは50%以下、より好ましくは30%以下、さらに好ましくは20%以下、特に好ましくは10%以下、最も好ましくは5%以下に低減されている。また、シスタチオニγγーリアーゼ活性は実質的に消失しているのが好ましい。

[0040] 酵素活性が低減されるような改変は、例えば、突然変異処理又は遺伝子組換え技術により実施することができる。

[0041] 突然変異処理としては、紫外線照射、またはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン（MNNG）、エチルメタンサルフォネート（EMS）、メチルメタンサルフォネート（MMS）等の変異処理に通常用いられている変異剤による処理が挙げられる。

[0042] 遺伝子組換え技術としては、例えば、公知の技術（FEMS Microbiology Letters 165 (1998) 335-340、JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Dec. 1995, p7171-7177、Curr Genet 1986; 10(8): 573-578、WO 98/14600等）を利用できる。

[0043] また、酵素活性が低減される（酵素活性の完全な消失を含む）ような改変は、例えば、該酵素をコードする遺伝子を破壊することにより実施することができる。遺伝子の破壊は、例えば、染色体上の目的の酵素をコードする遺伝子のコード領域の一部または全部を欠失させることにより達成できる。さらには、染色体上の遺伝子の前後の配列を含めて、遺伝子全体を欠失させてもよい。また、遺伝子の破壊は、例えば、染色体上の目的の酵素をコードする遺伝子のコード領域にアミノ酸置換（ミスセンス変異）を導入すること、終始コドンを導入すること（ナンセンス変異）、あるいは1～2塩基を付加または欠失するフレームシフト変異を導入すること等によっても達成できる。また、遺伝子の破壊は、例えば、染色体上の目的の酵素をコードする遺伝子のコード領域に他の配列を挿入することによっても達成できる。

[0044] 「酵素活性が増強されている」とは、目的の酵素活性（本発明ではシスタチオニンβ-シンターゼ活性）が野生株や親株等の非改変株と比較して増強されていることを意味する。シスタチオニンβ-シンターゼ活性は、野生株（*Saccharomyces cerevisiae* BY4742）と比較した場合、好ましくは1.5倍以上、より好ましくは2倍以上、さらに好ましくは3倍以上、特に好ましくは5倍以上、最も好ましくは10倍以上に増強されている。

[0045] 酵素活性を増強させるような改変は、例えば、目的の酵素をコードする遺伝子の発現を増大させることにより達成できる。遺伝子の発現の増大は、例えば、染色体上の遺伝子のプロモーターをより強力なプロモーターに置換することにより達成できる。また、遺伝子の発現の増大は、例えば、染色体上に目的の遺伝子を導入する等して遺伝子のコピー数を増加させることにより達成できる。また、トランスポゾンに遺伝子を組み込み、それを染色体へ遺伝子の多数のコピーを導入するよう転移させてもよい。さらに遺伝子のコピー数の増加は、目的遺伝子を含むベクターを宿主に導入することによっても達成できる。また、酵素活性が増強されるような改変は、例えば、目的の酵素の比活性を増大させることによっても達成できる。また、「酵素活性が増強されている」とは、もともと目的の酵素活性を有する微生物において目的

の酵素活性を増強させるだけでなく、もともと目的の酵素活性を有さない菌株において目的の酵素活性を付与するよう該酵素をコードする遺伝子を新たに導入し、当該酵素を発現するようになる場合を含む。

[0046] 目的遺伝子を宿主に導入する場合、宿主は目的遺伝子が由来する菌株と同種であっても異種であってもよい。

[0047] 目的の酵素活性が増強された、あるいは低減されたことの確認は、同酵素の活性を測定することによって行うことができる。シスタチオニン β -シクターゼの活性を測定する方法としては、例えばKrausらの方法 (Jan P. Kraus, Methods in ENZYMOLOGY 143 (1987) 388-394) 及びそれに準じた方法が挙げられる。より具体的には、シスタチオニン β -シクターゼの活性は、緩衝液 (50 mMリン酸カリウムバッファー、pH 9) 中、基質 (3 mMホモシステイン、3 mMセリン、100 μ Mピリドキサルリン酸) と45°Cで1時間反応させる方法によって測定することができる。本発明及び本明細書では該反応により1分間に1 μ molのシスタチオニンを生成するのに必要な酵素量を1 Uと定義する。シスタチオニン γ -リアーゼの活性を測定する方法としては、例えばYamagataらの方法 (Journal of Bacteriology, Aug. 1993, p. 4800-4808) 及びそれに準じた方法が挙げられる。より具体的には、シスタチオニン γ -リアーゼの活性は、緩衝液 (50 mMリン酸カリウムバッファー、pH 7.4) 中、基質 [3 mMシステイン (シスタチオニンを基質とすると、 β -リアーゼが共存している場合、その活性が測定値に影響を与える場合があるのでシステインを基質とする)、100 μ Mピリドキサルリン酸] と30°Cで1時間反応させる方法によって測定することができる。本発明及び本明細書では該反応により1分間に1 μ molのピルビン酸を生成するのに必要な酵素量を1 Uと定義する。

[0048] 目的の酵素活性が増強された、あるいは低減されたことの確認は、目的の酵素をコードする遺伝子の転写量が増加あるいは減少したことを確認することや、目的の酵素の量が増加あるいは減少したことを確認することにより行うことができる。

- [0049] 目的の酵素をコードする遺伝子の転写量が増加あるいは減少したことの確認は、同遺伝子から転写されるmRNAの量を非改変株と比較することによって行うことが出来る。mRNAの量を評価する方法としては、ノーザンハイブリダイゼーション、RT-PCR等が挙げられる（Molecular cloning (Cold spring Harbor Laboratory Press, Cold spring Harbor (USA), 2001)）。該転写量が減少している場合には、mRNAの量は、非改変株と比較して、例えば、50%以下、30%以下、20%以下、10%以下、5%以下、または0%に減少していることが好ましい。該転写量が増加している場合には、mRNAの量は、非改変株と比較して、例えば、1.5倍以上、2倍以上、3倍以上、5倍以上、または10倍以上に増加していることが好ましい。
- [0050] 目的の酵素の量が増加あるいは減少したことの確認は、抗体を用いてウェスタンブロットによって行うことが出来る（Molecular cloning (Cold spring Harbor Laboratory Press, Cold spring Harbor (USA), 2001)）。目的の酵素の量が減少している場合には、その量は、非改変株と比較して、例えば、50%以下、30%以下、20%以下、10%以下、5%以下、または0%に減少していることが好ましい。目的の酵素の量が増加している場合には、その量は、非改変株と比較して、例えば、1.5倍以上、2倍以上、3倍以上、5倍以上、または10倍以上に増加していることが好ましい。
- [0051] 尚、シスタチオニンβ-シントラーゼの酵素反応の生成物であるシスタチオニンはシスタチオニンγ-リアーゼにより分解される為、シスタチオニンγ-リアーゼ共存下では、上記測定法によるシスタチオニンβ-シントラーゼ遺伝子の発現量における変動の程度と上記測定法によるシスタチオニンβ-シントラーゼ活性における変動の程度とは必ずしも一致しない。シスタチオニンγ-リアーゼ共存下では、シスタチオニンβ-シントラーゼ活性はシスタチオニンγ-リアーゼが存在しない場合に比べて低い値となる。シスタチオニンγ-リアーゼ共存下でシスタチオニンβ-シントラーゼ活性を測定する場合には予めシスタチオニンγ-リアーゼ活性によるシスタチオニンの消費量を算出し補正しておくことが好ましい。

[0052] 本発明において好ましく用いられるシスタチオニン β -シンターゼ生産性微生物としては、(A) シスタチオニン β -シンターゼ活性が増強されている変異株、(B) シスタチオニン γ -リアーゼ活性が低減されている変異株、あるいは(C) シスタチオニン β -シンターゼ活性が増強され且つシスタチオニン γ -リアーゼ活性が低減されている変異株であり、より好ましくは(D) C Y S 4 遺伝子高発現変異株、(E) C Y S 3 遺伝子低発現変異株、あるいは(F) C Y S 4 遺伝子高発現且つC Y S 3 遺伝子低発現変異株酵母である。

変異株(E)の好ましい一実施態様としては、C Y S 3 遺伝子破壊変異株(E')が挙げられる。変異株(F)の好ましい一実施態様としては、C Y S 4 遺伝子高発現且つC Y S 3 遺伝子破壊変異株(F')が挙げられる。

[0053] 本発明で用いるシスタチオニン β -シンターゼは、これを産生する微生物(例えば、シスタチオニン β -シンターゼ活性を有する酵母、当該酵母のC Y S 4 遺伝子高発現及び／又はC Y S 3 遺伝子破壊変異株)を培養して得られる微生物の培養物から調製することができる。例えば、シスタチオニン β -シンターゼ生産性微生物の培養方法を以下に示す。

[0054] シスタチオニン β -シンターゼ生産性微生物を培養するための培地としては、使用するシスタチオニン β -シンターゼ生産性微生物の種類によって適宜選択される。炭素源、窒素源、無機物および必要に応じて少量の微量栄養素を含むものであれば、合成培地または天然培地のいずれも使用可能である。培地に使用する炭素源および窒素源は使用する微生物の利用可能なものならばいずれの種類を用いてもよい。炭素源としては、グルコース、グリセロール、フラクトース、シュクロース、マルトース、マンノース、澱粉、澱粉加水分解物、糖蜜など種々の炭水化物が使用できる。窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、酢酸アンモニウムなどの各種の無機および有機アンモニウム塩類、または肉エキス、酵母エキス、コーン・スティープ・リカー、カゼイン加水分解物、フィッシュミールあるいはその消化物、脱脂大豆粕あるいはその消化物などの天然有

機窒素源が使用可能である。天然有機窒素源の多くの場合は窒素源であるとともに炭素源にもなり得る。無機物としては、リン酸一水素カリウム、リン酸二水素カリウム、塩化カリウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄などが必要に応じて使用できる。例えば、実施例に記載したYPD培地を好適に利用することができる。

[0055] 培養は、振とう培養あるいは通気攪拌深部培養などの好氣的条件下で行う。培養温度は好ましくは20～50℃、特に好ましくは28～37℃の範囲である。培養中の培地のpHは微生物の生育に応じて適宜調整すればよく、例えばpH5～7が挙げられる。培養時間は通常12時間～10日間、より好ましくは24時間～5日間、さらに好ましくは36時間～3日間である。

[0056] 前記のようにして得られる微生物等を含む培養物からシスタチオニンβ-シンターゼを回収する。本発明で使用されるシスタチオニンβ-シンターゼはその酵素活性が維持されている限り必ずしも単離精製されている必要はない。すなわち、シスタチオニンβ-シンターゼ生産性微生物（好ましくはシスタチオニンβ-シンターゼ活性を有する酵母）をそのまま、あるいは該微生物の培養物、該培養物から遠心分離などの方法によって採取した生菌体、その乾燥菌体を本発明の方法に用いることができる。あるいはシスタチオニンβ-シンターゼ生産性微生物（好ましくはシスタチオニンβ-シンターゼ活性を有する酵母）の生菌体あるいはその乾燥菌体を破砕、自己消化、超音波などで処理することによって得られる抽出物（菌体処理物とも称する）を本発明の方法に用いることができる。さらに該菌体処理物から得られるシスタチオニンβ-シンターゼを含む粗精製物を本発明の方法に用いることができる。また、これらの固定化酵素または固定化菌体を本発明の製造方法に用いることもできる。

[0057] 本発明の方法において、シスタチオニンβ-シンターゼ生産性微生物（好ましくはシスタチオニンβ-シンターゼ活性を有する酵母）の抽出物および／または培養物をシスタチオニンβ-シンターゼとして用いる場合、該抽出物および／または培養物の酵素活性は、1gあたり、通常2500U以上で

あり、好ましくは5000U以上、10000U以上、20000U以上、30000U以上、又は40000U以上である。酵素活性が低すぎると十分な酵素反応が得られない。一方、操作性やコストの観点から、該抽出物および／または培養物の酵素活性は、1gあたり、通常 1×10^6 U以下、好ましくは 5×10^5 U以下、 1×10^5 U以下、又は 5×10^4 U以下である。

本発明の方法において、シスタチオニン β -シンターゼ生産性微生物（好ましくはシスタチオニン β -シンターゼ活性を有する酵母）の抽出物および／または培養物をシスタチオニン β -シンターゼとして用いる場合、該抽出物および／または培養物はシスタチオニン γ -リアーゼ活性が低いものであることが好ましい。従って、該抽出物および／または培養物のシスタチオニン γ -リアーゼ活性は、通常1gあたり100U以下、50U以下、10U以下、1U以下、又は実質的に含まないかあるいは0Uである。

[0058] チオール化合物（I）とL-セリンとを前記のシスタチオニン β -シンターゼの存在下で反応させることにより、システイン誘導体（II）を製造することができる。原料である、L-セリン及びチオール化合物（I）はいずれも市販されており容易に入手可能である。

[0059] チオール化合物（I）とL-セリンとの反応は、通常、水性溶媒中で行われる。水性溶媒としては、酵素反応を阻害しない限り特に限定されないが、生理食塩水、リン酸カリウム緩衝液、トリス-塩酸緩衝液、グリシン-水酸化ナトリウム緩衝液、ホウ酸-水酸化ナトリウム緩衝液等を挙げることができる。

[0060] 反応液中のL-セリンの濃度は特に限定されないが、好ましくは1～20重量%、特に好ましくは1～10重量%である。

[0061] 反応液中のチオール化合物（I）の濃度は、用いる化合物の種類によっても異なり、酵素反応を阻害しない範囲であれば特に制限されないが、好ましくは10重量%以下の濃度で使用される。なお、反応中に酵素反応を阻害しない濃度範囲になるように、チオール化合物（I）を逐次添加してもよい。また、反応に際して、基質の他に補酵素であるピリドキサルリン酸を0.

1～100 ppmの範囲で添加することが好ましい。

[0062] 反応に用いるシスタチオニンβ-シンターゼの量は、基質濃度、反応時間、その他の条件によって適宜調整し得るが、好ましくは反応液1 g当たり0.1 U～1000 U、好ましくは1 U～500 U、より好ましくは10 U～250 Uの範囲で添加する。

[0063] 反応はpH 7～9.5、好ましくはpH 8～9の範囲で実施される。反応温度は通常、4℃～60℃で実施されるが、酵素の安定性と反応速度の点で、好ましくは20℃～55℃、より好ましくは35℃～50℃で実施される。反応時間は所望のシステイン誘導体(II)の合成量に応じて適宜設定されるが、通常、0.5～24時間、好ましくは1～10時間、特に好ましくは1～5時間、最も好ましくは1～3時間である。

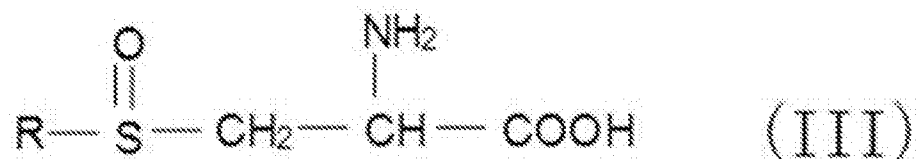
[0064] 前記の反応で得られる反応液からシステイン誘導体(II)を分離し、回収する方法は、公知のあらゆる方法が使用可能である。一例をあげればトリクロロ酢酸(TCA)沈殿法、限外濾過濃縮法、硫酸沈殿法(塩析)、有機溶媒(例、アセトン、エタノール、プロパノール、メタノール等)沈殿法、水溶性ポリマー(例、ポリエチレングリコール、デキストラン等)沈殿法、酸性沈殿法、等電点沈殿法等が挙げられる。

[0065] システイン誘導体(II)を分離、回収することなく、該システイン誘導体(II)と、オキシダーゼ及びその基質とを反応させることによってシステインスルホキシド誘導体(III)を製造することもできる。

[0066] 2. システインスルホキシド誘導体の製造方法

本発明は、式(III)

[0067] [化13]



[0068] (式中、RはC₁₋₆アルキル基又はC₂₋₆アルケニル基を表す)

で表されるシステインスルホキシド誘導体（以下、単にシステインスルホキシド誘導体（ⅠⅠⅠ）とも称する）を酵素的に製造する方法を提供する。

当該方法は、システイン誘導体（ⅠⅠ）と、オキシダーゼ及びその基質とを反応させることを特徴とする。オキシダーゼとその基質とが反応することにより産生される過酸化水素によりシステイン誘導体（ⅠⅠ）がシステインスルホキシド誘導体（ⅠⅠⅠ）に変換される。

本発明において、Rとして好ましくは、1-プロペニル基、プロピル基、メチル基及びアリル基である。

[0069] 当該方法において使用するオキシダーゼは基質と反応することにより過酸化水素を産生するものであれば特に限定されない。具体的には、グルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、ウリカーゼ、コレステロールオキシダーゼ、コリンオキシダーゼ、アシルCoAオキシダーゼ等が挙げられる。これらの酵素の少なくとも1種が使用される。好ましくはグルコースオキシダーゼである。

[0070] グルコースオキシダーゼは、二量体のタンパク質でEC 1. 1. 3. 4に分類される。グルコースオキシダーゼは、グルコースを基質として、酸素存在下、グルコノラクトン（グルコノラクトンは、非酵素的にグルコン酸へと加水分解される）と過酸化水素を生成する反応を触媒する酵素である。本発明で用いられるグルコースオキシダーゼは、上記酵素作用を有するものであればその由来は特に限定されない。天然物であっても、化学的又は生化学的に合成されたものであってもよく、また、遺伝子工学的に生産されたものであってもよい。本発明では、商業的に入手可能なものが好適に利用できる。例えば、「スミチームPGO」という商品名で新日本化学工業（株）より市販されている微生物由来のグルコースオキシダーゼが挙げられる。

グルコースオキシダーゼの活性は、生成した過酸化水素にアミノアンチピリン及びフェノール存在下でペルオキシダーゼを作用させることでキノンイミン色素を生成させる反応を用いて測定することができる。生成したキノンイミン色素の量を検量線より求め酵素活性を算出する。本発明及び本明細書

では1分間に1 μmol のグルコースを酸化するのに必要な酵素量を1 Uと定義する。

[0071] ガラクトースオキシダーゼは、EC 1. 1. 3. 9に分類され、D-ガラクトースを基質として酸素存在下、D-ガラクトーヘキソジアルドースと過酸化水素を生成する反応を触媒する酵素である。

[0072] ウリカーゼは、EC 1. 7. 3. 3に分類され、尿酸を基質として酸素存在下、アラントインと過酸化水素を生成する反応を触媒する酵素である。

[0073] コレステロールオキシダーゼは、EC 1. 1. 3. 6に分類され、 3β -ヒドロキシステロイドを基質として酸素存在下、 3α -オキシステロイドと過酸化水素を生成する反応を触媒する酵素である。

[0074] コリンオキシダーゼは、EC 1. 1. 3. 17に分類される酵素である。コリンオキシダーゼは、コリンを基質として酸素存在下、ベタインアルデヒドと過酸化水素を生成する反応（第一反応）と、ベタインアルデヒドを基質として酸素存在下、ベタインと過酸化水素を生成する反応（第二反応）とを触媒する酵素である。

[0075] アシルCoAオキシダーゼは、EC 1. 3. 3. 6に分類され、アシルCoAを基質として酸素存在下、トランス-2, 3-デヒドロアシルCoAと過酸化水素を生成する反応を触媒する酵素である。

[0076] 本発明で用いられるガラクトースオキシダーゼ、ウリカーゼ、コレステロールオキシダーゼ、コリンオキシダーゼ、アシルCoAオキシダーゼは、上記酵素作用を有するものであればその由来は特に限定されない。天然物であっても、化学的又は生化学的に合成されたものであってもよく、また、遺伝子工学的に生産されたものであってもよい。本発明では、商業的に入手可能なものが好適に利用できる。

[0077] 原料である、システイン誘導体(11)は、いかなる方法によって調製されたものであってもよいが、好ましくは、上記1. のシステイン誘導体の製造方法により調製された化合物である。

[0078] 以下、オキシダーゼがグルコースオキシダーゼである場合を例に詳述する

。

システイン誘導体（ⅠⅠ）と基質であるグルコースとの反応は、通常、水性溶媒中、酸素の存在下で実施される。好ましくは反応容器中に空気を流通させて実施される。水性溶媒としては、酵素反応を阻害しない限り特に限定されないが、生理食塩水、リン酸カリウム緩衝液、トリスー塩酸緩衝液、グリシンー水酸化ナトリウム緩衝液、ホウ酸ー水酸化ナトリウム緩衝液等を挙げることができる。

[0079] 反応液中のグルコースの濃度は特に限定されないが、通常、0.1～10重量%、好ましくは0.1～1重量%である。所望によりグルコースを反応の途中で追加することもでき、また、追加することが好ましい。

[0080] 反応液中のシステイン誘導体（ⅠⅠ）の濃度は、用いる化合物の種類によって異なるが、酵素反応を阻害しない範囲であれば特に制限されない。通常、0.1～10重量%、好ましくは0.1～1重量%である。

[0081] 反応に用いるグルコースオキシダーゼの量は、基質濃度、反応時間、その他の条件によって適宜調整し得るが、好ましくは反応液1g当たり0.001U～100U、好ましくは0.01U～50U、より好ましくは0.1U～10Uの範囲で添加する。

[0082] 反応はpH5～7、好ましくは5.5～6.5で実施される。反応は好ましくは4℃～60℃で行われるが、酵素の安定性と反応速度の点で、特に好ましくは、30℃～50℃、より好ましくは35～45℃で実施される。反応時間は所望のシステインスルホキシド誘導体（ⅠⅠⅠ）の合成量に応じて適宜設定されるが、通常、0.5～24時間、好ましくは1～10時間、さらに好ましくは1～5時間である。

[0083] 前記の反応で得られる反応液からシステインスルホキシド誘導体（ⅠⅠⅠ）を分離し、回収する方法は、公知の方法が使用可能である。一例をあげればトリクロロ酢酸（TCA）沈殿法、限外濾過濃縮法、硫酸沈殿法（塩析）、有機溶媒（例、アセトン、エタノール、プロパノール、メタノール等）沈殿法、水溶性ポリマー（例、ポリエチレングリコール、デキストラン等）沈

殿法、酸性沈殿法、等電点沈殿法等が挙げられる。

[0084] 以下に実施例を示して、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

実施例

[0085] 実施例 1 : S-アリルシステイン (ALC) 生成に関与する酵素の同定

表 1 に示す酵母の各酵素の遺伝子破壊株を用いて S-アリルシステイン生成量を測定し、チオール化合物及び L-セリンからの S-アリルシステインの生成に寄与する酵素を調べた。

[0086] [表 1]

	酵素名	E.C	遺伝子名	ORF名
1	Cystathionine γ -lyase (cystine desulfhydrase)	4.4.1.1	CYS3	YAL012W
3	Cystathionine β -synthase (L-serine hydro-lyase)	4.2.1.22	CYS4	YGR155W
2	Tryptophan synthase	4.2.1.20	TRP5	YGL026C
4	Cysteine synthase (O-acetylserine (thiol)-lyase)	2.5.1.47	MET17	YLR303W

[0087] (1) 菌株作成

野生株として実験室酵母である *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 を用い、CYS3 遺伝子、CYS4 遺伝子、TRP5 遺伝子又は MET17 遺伝子を欠失させた変異株（それぞれ、 Δ CYS3、 Δ CYS4、 Δ TRP5、 Δ MET17）を用いた。各変異株は Thermo Scientific 社製の市販品 (Yeast Knockout Clones and Collections) を使用した。

(2) 培養／反応

野生株 (BY4742) 及び各変異株 (Δ CYS3、 Δ CYS4、 Δ TRP5、 Δ MET17) をそれぞれ 1 白金耳ずつ、5 mL の YPD 培地 (1% 酵母エキス、2% ペプトン、2% グルコース) に接種し、30℃、180 rpm で 72 時間振盪培養した。該培養液の全量を 100 mL の YPD 培地 (0.6% 酵母エキス、0.5% ペプトン、3% グルコース) に移し、さらに 30℃、120 rpm で 48 時間振盪培養した。得られた培養液を 10 分間遠心分離 (4℃、9000 rpm) して沈殿物を菌体として回収した。菌体を 1 mL のプロテアーゼ阻害剤を含有する抽出用バッファー中でビーズ破砕 (4600 rpm、氷上) し、遠心分離した。

得られた上清を用いて S-アリルメルカプタンからの ALC の生成量を測

定した。反応バッファーには50 mMリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) を用い、基質としてはS-アリルメルカプタン及び硫安・ピルビン酸を用いた。生成したALCは10% TCAで沈殿させ、LC/MSにより定量した。

(3) 結果

2時間反応後のALC生成量の結果を図1に示す。ΔCYS4変異株ではALCが生成しなかった。ΔCYS3変異株でALC生成量が有意に増加した。これらの結果よりCYS4遺伝子がALC生成に関与する酵素をコードする遺伝子であると考えられた。さらに、CYS3遺伝子がALC分解に関与する酵素をコードする遺伝子であるか、あるいはCYS4発現へ負の影響を及ぼす可能性が考えられた。

[0088] 実施例2：精製シスタチオニンβ-シンターゼによるS-アリルシステイン生成

実施例1で、CYS4遺伝子がALC生成に関与する酵素をコードする遺伝子であると推定されたので、本実施例では、CYS4遺伝子高発現変異株から得られた精製シスタチオニンβ-シンターゼにより、S-アリルシステインが生成するか検証した。

1. 精製シスタチオニンβ-シンターゼの調製

まず、以下に示す手法により、CYS4を高発現する*Saccharomyces cerevisiae*株を作製した。

菌株作製法

遺伝子発現を増強する親株としては*Saccharomyces cerevisiae* BY4742を用い、CYS3遺伝子破壊株BY4742 *cys3Δ* 含め、Thermo Scientific社製、Yeast Knockout Clones and Collectionsより入手した。CYS4遺伝子増強にはインテグレーションタイププラスミドを導入することにより作製した。インテグレーションプラスミドの作成法は以下の方法にて行った。

CYS4遺伝子を高発現させるためのインテグレーションタイププラスミドは、まず構成的高発現プロモーターであるTDH3遺伝子(Glyceraldehyde

-3-phosphate dehydrogenase)プロモーター (T D H 3 p) からC Y S 4 遺伝子を発現するマルチコピープラスミドを作製し、そのプラスミドを鋳型として増幅したT D H 3 p - C Y S 4 断片をp U C 1 9 プラスミド (インビトロジェン) にクローン化することにより作製した。プラスミド作製の過程でE. coliコンピテント細胞としてD H 5 - α もしくはJ M 1 0 9 株 (タカラバイオ) を用いた。

(マルチコピープラスミドの作製)

まず、SmaI制限酵素認識配列を有する配列番号1で示されるプライマーおよびXbaI制限酵素認識配列を有する配列番号2で示されるプライマーを用い、野生型*Saccharomyces cerevisiae* S288C (ATCC 204508)のゲノムDNAを鋳型としてPCRを行い、T D H 3プロモーターを有するDNA断片を得た。PCR条件は、変性(94°C, 10 sec)、アニーリング(60°C, 10 sec)、伸長(72°C, 4 min)、25サイクルとした。次に、このDNA断片をp Y E S 2のSmaI-XbaI部位にクローン化し、プラスミドp Y E S 2 - T D H 3 pを得た (本実施例で使用した制限酵素は全てタカラバイオ社より入手した)。

続いて配列番号3で示されるプライマーおよび6コピーのヒスチジンをコードする塩基配列を付加した配列番号4で示されるプライマーを用い、野生型*Saccharomyces cerevisiae* S288C (ATCC 204508)のゲノムDNAを鋳型にPCRし、遺伝子のC末端に6コピーのHis-tagを有するC Y S 4 DNA断片を得た。PCR条件は、変性(94°C, 10 sec)、アニーリング(60°C, 10 sec)、伸長(72°C, 4 min)、25サイクルとした。次に、このDNA断片を、制限酵素XbaIで消化し、線状にしたp Y E S 2 - T D H 3 pにi n - f u s i o nクローニング法(Clontech社、In-Fusion (登録商標) HD Cloning Kit)によりプラスミドp Y E S 2 - T D H 3 p - C Y S 4 __ 6 x H i sを得た。

(インテグレーションタイププラスミドの作製)

SmaI制限酵素認識配列を有する配列番号5で示されるプライマーおよびAat II制限酵素認識配列を有する配列番号6で示されるプライマーを用い、S288CのゲノムDNAを鋳型にPCRし、U R A 3 DNA断片を得た。続いてp

UC19のSmaI-AatII部位にURA3断片をクローン化し、pUC19-URA3プラスミドを作製した。続いて、配列番号7で示されるプライマーおよび配列番号8で示されるプライマーでpYES2-TDH3p-CYS4__6xHisプラスミドを鋳型とし、TDH3p-CYS4__6xHis断片を増幅した。それぞれのDNA断片をpUC19-URA3のSphI-EcoRI部位にin-fusionクローニング法により導入し、インテグレーションタイププラスミド、pUC19-TDH3p-CYS4-URA3を作製した。

(CYS4遺伝子高発現プラスミドを有する株(CYS4遺伝子高発現株)の作製)

CYS4遺伝子高発現用インテグレーションタイププラスミドpUC19-TDH3p-CYS4-URA3をBglIIで消化することにより線状化し、ウラシル要求性株であるBY4742あるいはBY4742 cys3Δを形質転換することによりCYS4遺伝子高発現株を作製した。形質転換はFrozen-EZ Yeast Transformation II Kit (Zymo Research社)を使用して行い、ウラシルを含まない平板培地上で菌体を生育させることによりインテグレーションプラスミドが導入された菌を選択した。

配列番号1

5' ATACCCGGAATAAAAAACACGCTTTTTCAGTTCGAGT 3'

配列番号2

5' ATATCTAGATTTGTTTGTTTATGTGTGTTTATTGAAAC 3'

配列番号3

5' GTTTCGAATAAACACACATAAACAAACAAAATGACTAAATCTGAGCAGC 3'

配列番号4

5' GCGTGACATAACTAATTACATGATTTAATGATGATGATGATGTGCTAAGTAGCTCAG 3'

配列番号5

5' ATACCCGGGGATAAGGAGAATCCATACAAG 3'

配列番号6

5' ATAGACGTCTTAGTTTTGCTGGCCGCATC 3'

配列番号 7

5' GACCATGATTACGCCAAGCTTGCTATTTTCGAGGACCTTGTC 3'

配列番号 8

5' GATCCATGAGATGATGAACGAATTATGCTAAGTAGCTCAG 3'

得られたC Y S 4 遺伝子高発現株を培養し、培養物からC Y S 4 遺伝子に付されたH i s タグによりシスタチオニンβ-シンターゼを精製した。

2. 反応

得られた精製シスタチオニンβ-シンターゼ（2.64 mg/mL ; 200 μL）を用いてS-アリルメルカプタンからのALCの生成量を測定した。酵素液200 μL、セリン溶液（0.158 g/10 mL、1760 μL）、10 mMピリドキサルリン酸（20 μL）及びS-アリルメルカプタン（20 μL）を30℃、50 rpmで反応させた。反応バッファーには50 mMリン酸カリウム緩衝液（pH 7.4）を用いた。ここで、シスタチオニンβ-シンターゼ活性は、反応液1 gあたり109 Uであった。反応直後（0 hr）、1時間後（1 hr）、2時間後（2 hr）及び3時間後（3 hr）のALCの生成量を評価した。生成したALCは10% TCAを添加して反応を止め、LC/MSで定量した。

3. 結果

結果を図2に示す。シスタチオニンβ-シンターゼにより、S-アリルメルカプタン及びL-セリンからS-アリルシステインが生成することが確認された。

[0089] 実施例3：精製シスタチオニンβ-シンターゼによるS-メチルシステイン生成

実施例2で得られた精製シスタチオニンβ-シンターゼ（0.23 mg/mL ; 100 μL）を用いてS-メチルメルカプタンからのS-メチルシステインの生成量を測定した。酵素液100 μL、セリン溶液（0.158 g/10 mL、1760 μL）、10 mMピリドキサルリン酸（20 μL）

及び15%メチルメルカプタン(120 μ L)を30℃、50 rpmで反応させた。反応バッファーには50 mMリン酸カリウム緩衝液(pH 7.4)を用いた。ここで、シスタチオニン β -シンターゼ活性は、反応液1 gあたり19 Uであった。反応直後(0 hr)、1時間後(1 hr)、2時間後(2 hr)及び3時間後(3 hr)のS-メチルシステインの生成量を評価した。生成したS-メチルシステインは10%TCAを添加して反応を止め、LC/MSで定量した。

結果を図3に示す。シスタチオニン β -シンターゼにより、S-メチルメルカプタン及びL-セリンからS-メチルシステインが生成することが確認された。

[0090] 実施例4：精製シスタチオニン β -シンターゼによるS-プロピルシステイン生成

実施例2で得られた精製シスタチオニン β -シンターゼ(0.23 mg/mL; 100 μ L)を用いてS-プロピルメルカプタンからのS-プロピルシステインの生成量を測定した。酵素液100 μ L、セリン溶液(0.158 g/10 mL、1760 μ L)、10 mMピリドキサルリン酸(20 μ L)及びプロピルメルカプタン(20 μ L)を30℃、50 rpmで反応させた。反応バッファーには50 mMリン酸カリウム緩衝液(pH 7.4)を用いた。ここで、シスタチオニン β -シンターゼ活性は、反応液1 gあたり19 Uであった。反応直後(0 hr)、1時間後(1 hr)、2時間後(2 hr)及び3時間後(3 hr)のS-プロピルシステインの生成量を評価した。生成したS-プロピルシステインは10%TCAを添加して反応を止め、LC/MSで定量した。

結果を図4に示す。シスタチオニン β -シンターゼにより、S-プロピルメルカプタン及びL-セリンからS-プロピルシステインが生成することが確認された。

[0091] 実施例5：グルコースオキシダーゼ(GO)によるS-アシルシステインスルホキシド(ALCSO)の生成

グルコース及びS-アリルシステイン（ALC）からALCSOを生成する反応を、表2に記載の3つの試験区について調べた。ALCとしては実施例1で調製したものをを用いた。GOとしては、食品添加物「スミチームPGO」（新日本化学（株））を用いた。

反応は、40℃、pH6.0（50mMリン酸カリウム緩衝液）、300rpmで5時間行った。

さらに反応容器中、空気流量1000mL／分でノズル径10～50μmのノズルから空気を通気（エアレーション）した。

[0092] [表2]

	試験区 1	試験区 2	試験区 3
グルコース	0.16% (10mM)	0.16% (10mM)	0.16% (10mM) +0.16% (10mM)
ALC	0.18% (10mM)	0.18% (10mM)	0.18% (10mM)
GO	なし	0.23% (6.3U/g)	0.23% (6.3U/g) +0.23% (6.3U/g)

[0093] 試験区1では、GOを添加せずエアレーションのみ行った。

試験区2では、GOを添加した。

試験区3では、反応1時間後にGOを0.23%、とグルコースを、0.16%追加した。

結果を図5に示す。

GOを添加しなかった試験区1ではほとんどALCSOを生成しなかった。GOを添加した試験区2ではグルコン酸の生成が見られたが、反応1時間でプラトーに達した。同様の傾向がALC消費、ALCSO生成にも見られた。反応性の低下による過酸化水素供給の減少が影響していると推定された。しかしながら、反応1時間後にGO及びグルコースを追加する（試験区3）ことにより、ALCからALCSOの変換は再度進行し、終了させることができた。

[0094] 実施例6：CYS4遺伝子高発現酵母変異株を用いたS-アリルシステインスルホキシド

（ALCSO）の生成

実施例2で作成したCYS4遺伝子高発現変異株を用いて、実施例1（2

）と同様にして培養する。培養後、菌体を集めて（集菌）、菌体を破砕し抽出液を調製する。この抽出液（酵母エキスを酵素源）にL-セリン及びS-アリルメルカプタン等の基質を添加してALCを生産させる（工程I）。

反応液にグルコースオキシダーゼを添加してグルコースを酸化処理し、ALCをALCSOに変換する（工程II）ことによってALCSOを含む酵母エキスを得る。

[0095] 実施例7：CYS3遺伝子活性が低減した変異株を用いたS-アリルシステインスルホキシド（ALCSO）の生成

シスタチオニンβ-シンターゼ生産性微生物の野生株に紫外線を照射して変異処理をして、得られた変異株の中からシステイン要求性株をスクリーニングすることによりCYS3遺伝子活性が低減した変異株を取得する。得られた変異株を用いて実施例6同様、工程I及び工程IIを実施することによって、ALCSOを含む酵母エキスを得る。

[0096] 実施例8：各遺伝子破壊株、高発現株のALC蓄積能の評価

BY4742を親株として、CYS3遺伝子の破壊（cys3Δと略す）、CYS4遺伝子の高発現（CYS4↑と略す）、CYS3遺伝子の破壊かつCYS4遺伝子の高発現（cys3Δ+CYS4↑と略す）の効果を検証した。親株及び各変異株は、それぞれThermo Scientific社製、Yeast Knockout Clones and Collectionsより入手するか、あるいは実施例2と同様にして作製した。

図6に示した方法にて各菌株から粗酵素液を調製し、図7に示した反応条件にてALC生成試験を実施した。各菌株の粗酵素液のシスタチオニンβ-シンターゼ活性（酵母エキス固形分1g当たり）はいずれも2500U以上であり、特にCYS4遺伝子高発現変異株では5000U以上でありさらにCYS3遺伝子が破壊された、CYS4遺伝子高発現かつCYS3遺伝子低発現の変異株では、シスタチオニンβ-シンターゼ活性（酵母エキス固形分1g当たり）は23312Uであった。

また、CYS3遺伝子が破壊された変異株では、シスタチオニンγ-リアーゼ活性（酵母エキス固形分1g当たり）が0Uであることが確認された。

使用した酵母乾燥重量当たりのALC蓄積量を測定した。乾燥重量（DMと略す）の測定法は以下の通り。

（測定法）

秤量瓶（#6-743-01）の空重量を電子天秤にて測定し、酵母菌体懸濁液1mlを秤量瓶に入れた後の重量を電子天秤にて測定。その後オーブン（DN600 YAMATO）にて105℃1時間乾燥後の重量を測定した。オーブン乾燥前後の重量割合からDM（%）を測定する。

各菌株のALC蓄積能を図8に示す。親株と比較して、CYS3遺伝子破壊あるいはCYS4遺伝子高発現によりALCが有意に蓄積した。また、CYS3遺伝子破壊かつCYS4遺伝子高発現によりALCの蓄積が顕著に増加した。

産業上の利用可能性

[0097] 本発明の方法によれば、医薬品の中間体、食品添加物の原材料として期待されているシステイン誘導体及びシステインスルホキシド誘導体を、より効率よく且つ安定的に製造することができる。

本出願は、日本で出願された特願2015-147936（出願日2015年7月27日）を基礎としておりその内容は本明細書に全て包含されるものである。

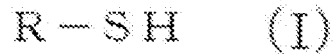
配列表フリーテキスト

[0098] 配列番号1：PCRプライマー
配列番号2：PCRプライマー
配列番号3：PCRプライマー
配列番号4：PCRプライマー
配列番号5：PCRプライマー
配列番号6：PCRプライマー
配列番号7：PCRプライマー
配列番号8：PCRプライマー

請求の範囲

[請求項1] シスタチオンin β -シンターゼの存在下、式 (I) :

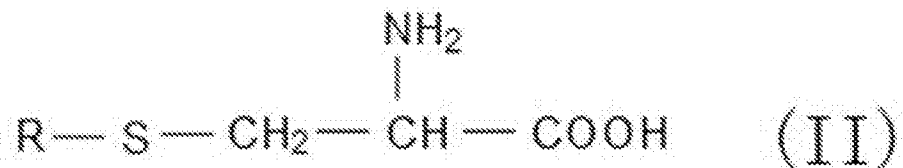
[化1]



(式中、RはC₁₋₆アルキル基又はC₂₋₆アルケニル基を表す)

で表されるチオール化合物とL-セリンとを反応させることを特徴とする、式 (I) :

[化2]



(式中、Rは上述の通りである)

で表されるシステイン誘導体の製造方法。

[請求項2] 各式中、Rが1-プロペニル基、プロピル基、メチル基またはアリル基である、請求項1記載の方法。

[請求項3] 前記シスタチオンin β -シンターゼがシスタチオンin β -シンターゼ生産性微生物由来である、請求項1又は2記載の方法。

[請求項4] 前記微生物が、シスタチオンin β -シンターゼ活性が増強されている変異株である、請求項3記載の方法。

[請求項5] 前記シスタチオンin β -シンターゼがCYS4遺伝子によってコードされる酵素である、請求項4記載の方法。

[請求項6] 前記微生物が、シスタチオンin γ -リアーゼ活性が低減されている変異株である、請求項3～5のいずれか1項に記載の方法。

[請求項7] 前記シスタチオンin γ -リアーゼがCYS3遺伝子によってコードされる酵素である、請求項6記載の方法。

[請求項8] 前記微生物が酵母である、請求項3～7のいずれか1項に記載の方

法。

[請求項9] 前記酵母が*Saccharomyces*属酵母である、請求項8記載の方法。

[請求項10] 前記*Saccharomyces*属酵母が*Saccharomyces cerevisiae*である、請求項9記載の方法。

[請求項11] シスタチオニンβ-シントラーゼの存在下、式(I)：

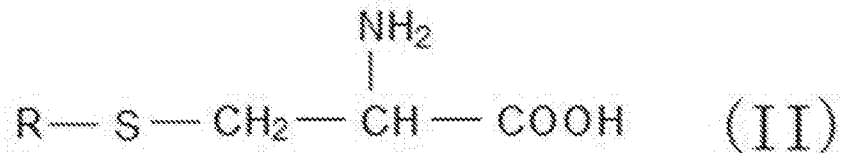
[化3]



(式中、RはC₁₋₆アルキル基又はC₂₋₆アルケニル基を表す)

で表されるチオール化合物とL-セリンとを反応させて式(II)：

[化4]

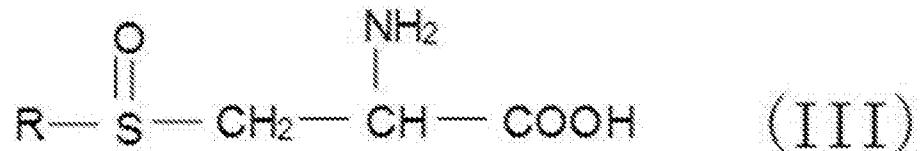


(式中、Rは上述の通りである)

で表されるシステイン誘導体を製造する工程(工程1)、及び

工程1で得られたシステイン誘導体と、オキシダーゼ及びその基質とを反応させて式(III)：

[化5]



(式中、Rは上述の通りである)

で表されるシステインスルホキシド誘導体を製造する工程(工程2)を含む、該システインスルホキシド誘導体の製造方法。

[請求項12] 前記オキシダーゼがグルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、ウリカーゼ、コレステロールオキシダーゼ、コリンオキシダ

ーゼ及びアシルCoAオキシダーゼからなる群より選択される少なくとも1種である、請求項11記載の方法。

[請求項13] 各式中、Rが1-プロペニル基、プロピル基、メチル基またはアリル基である、請求項11又は12記載の方法。

[請求項14] 前記シスタチオニンβ-シンターゼがシスタチオニンβ-シンターゼ生産性微生物由来である、請求項11～13のいずれか1項に記載の方法。

[請求項15] 前記微生物が、シスタチオニンβ-シンターゼ活性が増強されている変異株である、請求項14記載の方法。

[請求項16] 前記シスタチオニンβ-シンターゼがCYS4遺伝子によってコードされる酵素である、請求項15記載の方法。

[請求項17] 前記微生物が、シスタチオニンγ-リアーゼ活性が低減されている変異株である、請求項14～16のいずれか1項に記載の方法。

[請求項18] 前記シスタチオニンγ-リアーゼがCYS3遺伝子によってコードされる酵素である、請求項17に記載の方法。

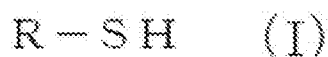
[請求項19] 前記微生物が酵母である、請求項14～18のいずれか1項に記載の方法。

[請求項20] 前記酵母がSaccharomyces属酵母である、請求項19記載の方法。

[請求項21] 前記Saccharomyces属酵母がSaccharomyces cerevisiaeである、請求項20記載の方法。

[請求項22] シスタチオニンβ-シンターゼ活性を有する酵母を培養し、該酵母の抽出物および／または培養物の存在下、式(I)：

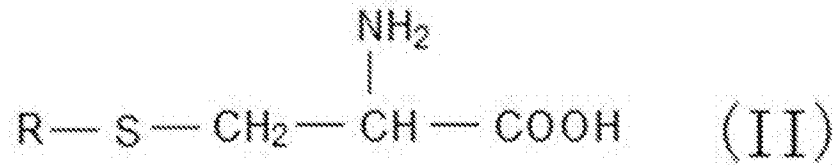
[化6]



(式中、RはC₁₋₆アルキル基又はC₂₋₆アルケニル基を表す)

で表されるチオール化合物とL-セリンとを反応させることを特徴とする、式(II)：

[化7]



(式中、Rは上述の通りである)

で表されるシステイン誘導体の製造方法。

[請求項23] 各式中、Rが1-プロペニル基、プロピル基、メチル基またはアリル基である、請求項22記載の方法。

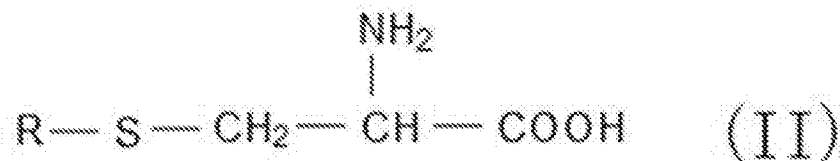
[請求項24] シスタチオニンβ-シントラーゼ活性を有する酵母を培養し、該酵母の抽出物および／または培養物の存在下、式(I)：

[化8]

(式中、RはC₁₋₆アルキル基又はC₂₋₆アルケニル基を表す)

で表されるチオール化合物とL-セリンとを反応させて式(II)：

[化9]

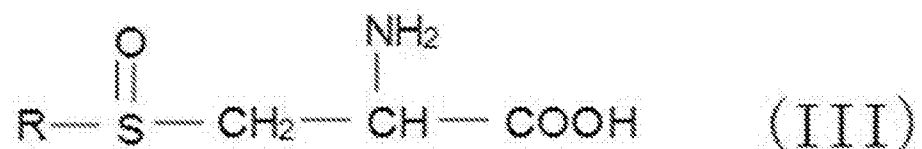


(式中、Rは上述の通りである)

で表されるシステイン誘導体を製造する工程(工程1)、及び

工程1で得られたシステイン誘導体と、オキシダーゼ及びその基質とを反応させて式(III)：

[化10]

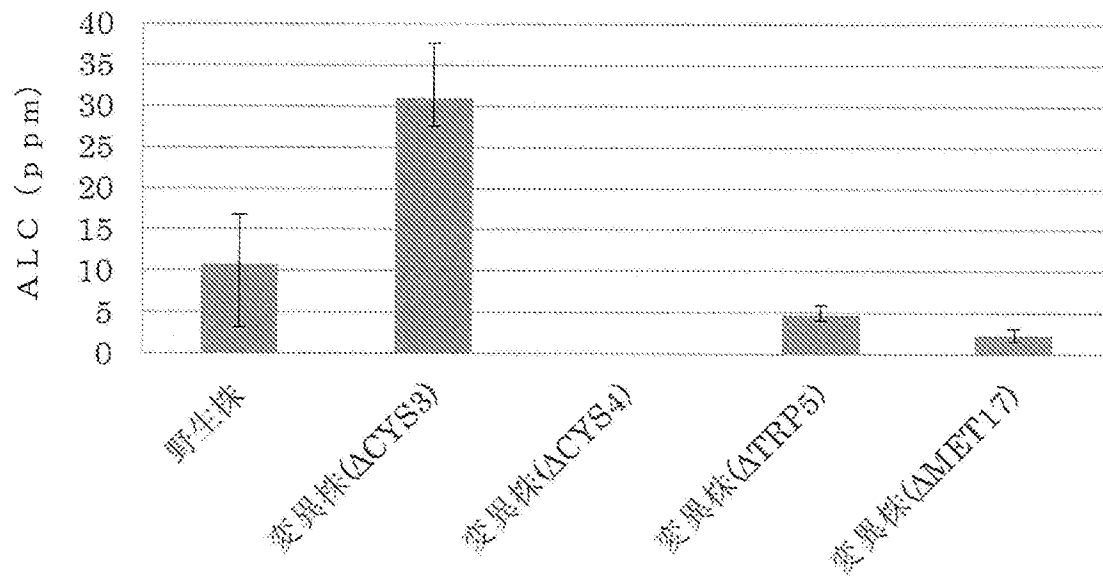


(式中、Rは上述の通りである)

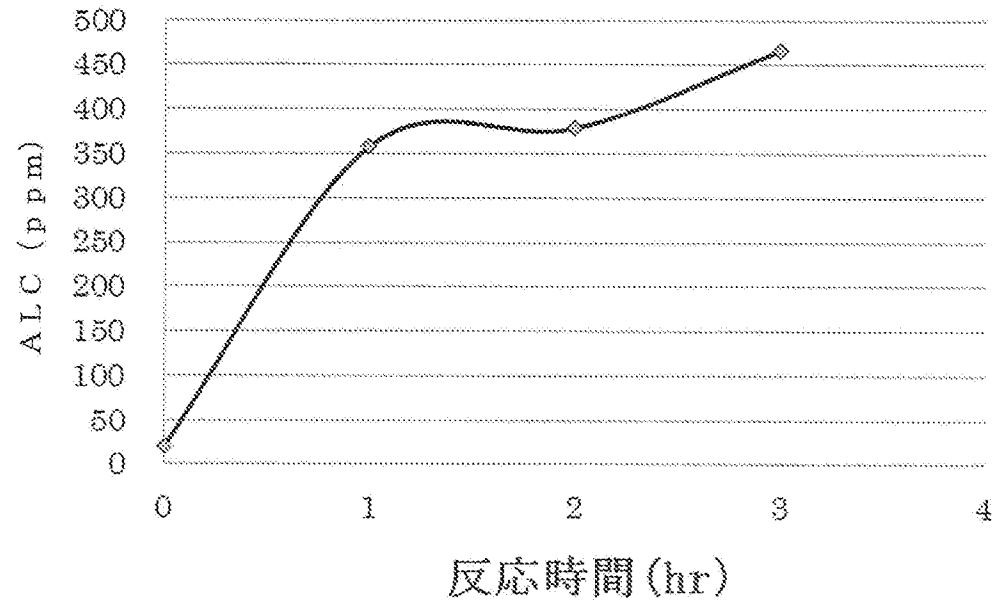
で表されるシステインスルホキシド誘導体を製造する工程(工程2)を含む、該システインスルホキシド誘導体の製造方法。

- [請求項25] 前記オキシダーゼがグルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、ウリカーゼ、コレステロールオキシダーゼ、コリンオキシダーゼ及びアシルCoAオキシダーゼからなる群より選択される少なくとも1種である、請求項24記載の方法。
- [請求項26] 各式中、Rが1-プロペニル基、プロピル基、メチル基またはアリル基である、請求項24又は25記載の方法。
- [請求項27] 前記酵母が、CYS4遺伝子高発現変異株；CYS3遺伝子低発現変異株；及びCYS4遺伝子高発現且つCYS3遺伝子低発現の変異株からなる群より選択される少なくとも1種である、請求項22～26のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項28] 前記酵母がSaccharomyces属酵母である、請求項22～27のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項29] 前記Saccharomyces属酵母がSaccharomyces cerevisiaeである、請求項28記載の方法。
- [請求項30] 該酵母の抽出物および／または培養物のシスタチオニンβ-シントラーゼ活性が、抽出物および／または培養物1gあたり2500U以上である、請求項22～29のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項31] 該酵母の抽出物および／または培養物のシスタチオニンβ-シントラーゼ活性が、抽出物および／または培養物1gあたり 1×10^6 U以下である、請求項22～30のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項32] 該酵母の抽出物および／または培養物のシスタチオニンγ-リアーゼ活性が、抽出物および／または培養物1gあたり100U以下である、請求項22～31のいずれか1項に記載の方法。

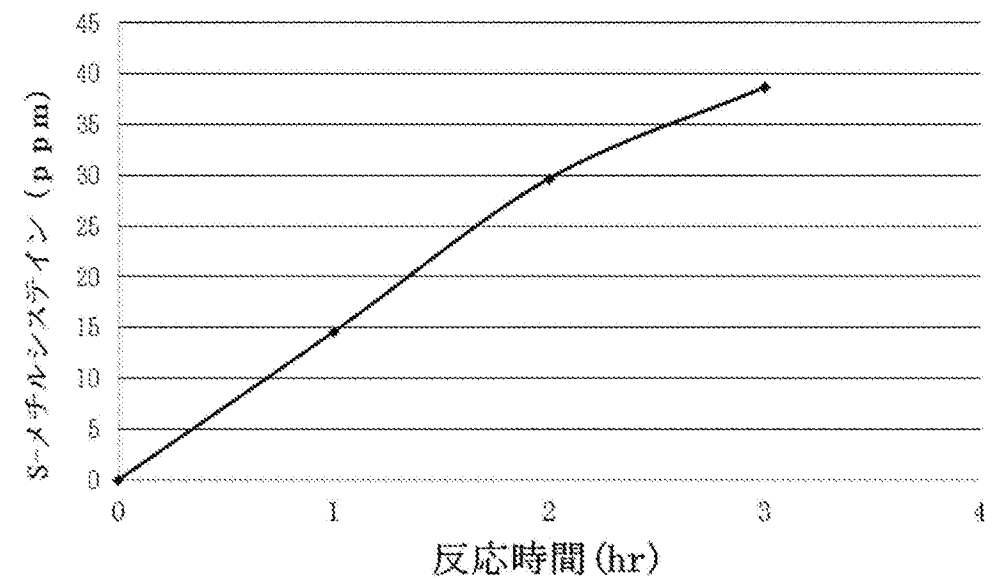
[図1]



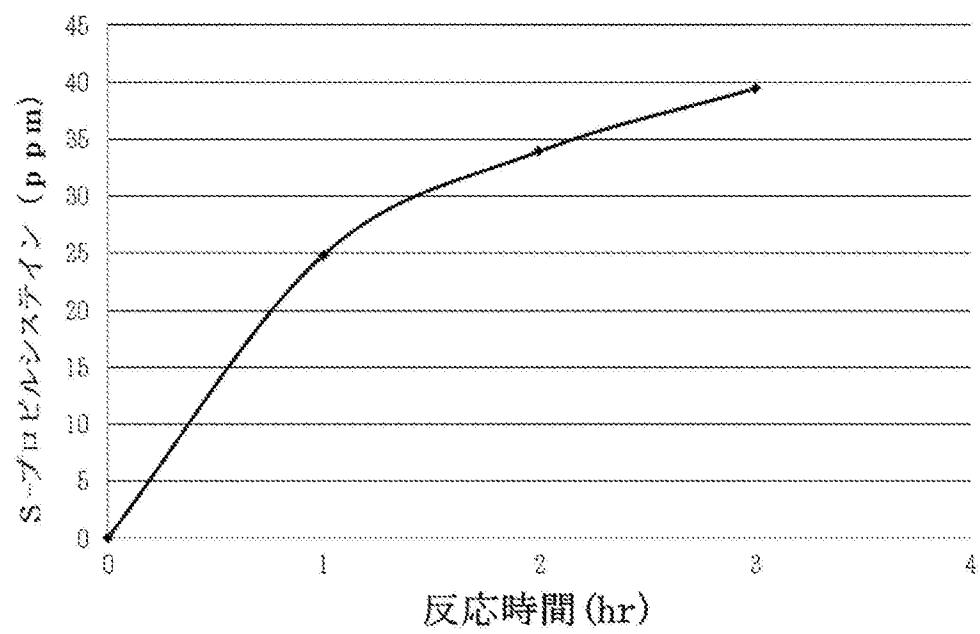
[図2]



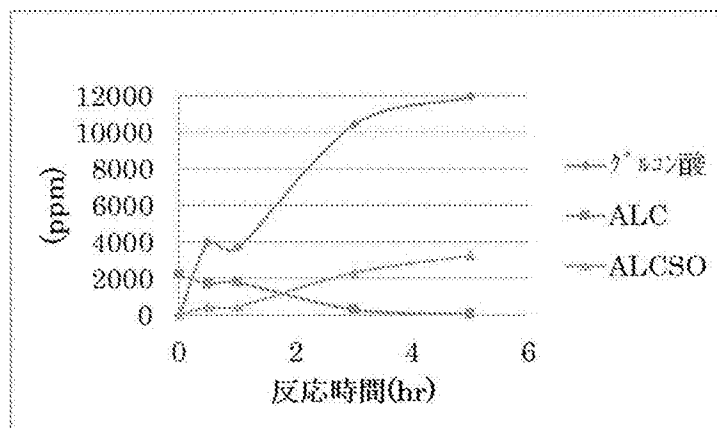
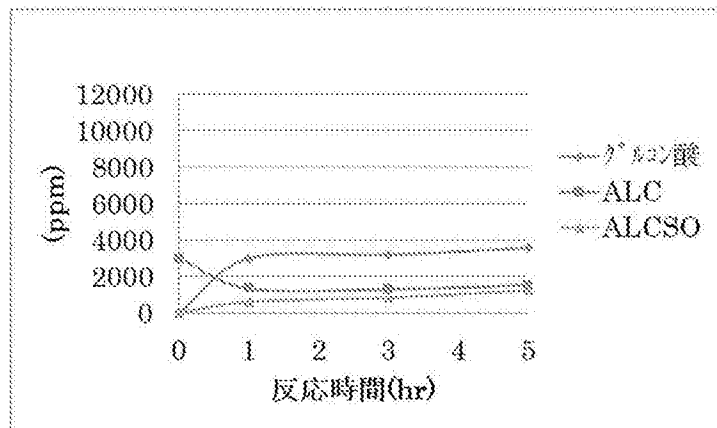
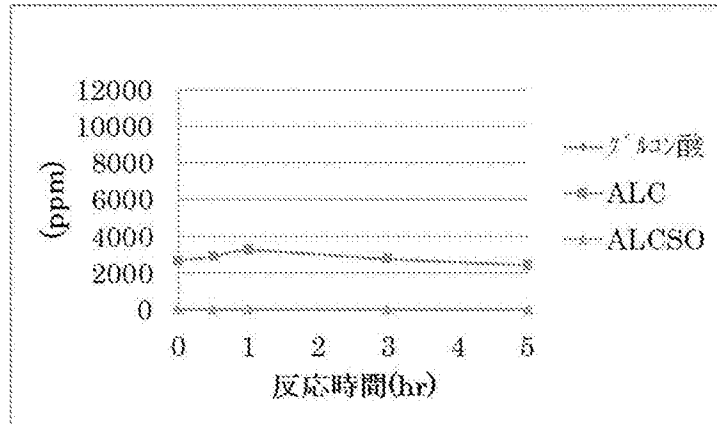
[図3]



[図4]



[図5]



[図6]

<投入>	<フロー>	<除去>	<条件>			
			温度(℃)	振とう(rpm)	回転数(rpm)	時間
	菌株プレート		—	—	—	—
	—白金耳		—	—	—	—
	YPD試験管培養 5ml		30	180	—	72hr
	YPD試験管培養 100ml		30	120	—	48hr
	遠心分離	遠心機CF15RX (EPRITACH)	4	—	9000	10min
		上清				
0.85% NaCl 30ml	菌体洗浄					
	遠心分離	遠心機CF15RX (EPRITACH)	4	—	9000	10min
抽出用バッファーpH7.4	菌懸濁液の等量					
	菌懸濁液					
	↓ 1ml					
シリコアピース® 2g	ビーズ破砕 (2ml Tube)	ビーズ破砕機 (破砕機)	—	2700	—	30secON- 60secOFF 12cycle
Y2BBS 60.5mm (200ml)	遠心分離	遠心機CF15RX (EPRITACH)	4	—	15000	10min
		沈殿				
	粗酵素液					

[図7]

反応液割合

	μ l	%
粗酵素液	200	10
ALSH	20	1
PLP 10mM	20	1
L-セリン溶液*	1760	88
合計	2000	100

*L-セリン溶液

L-セリン 0.158g
リン酸Kバッファー(pH7.4) 10ml

反応条件

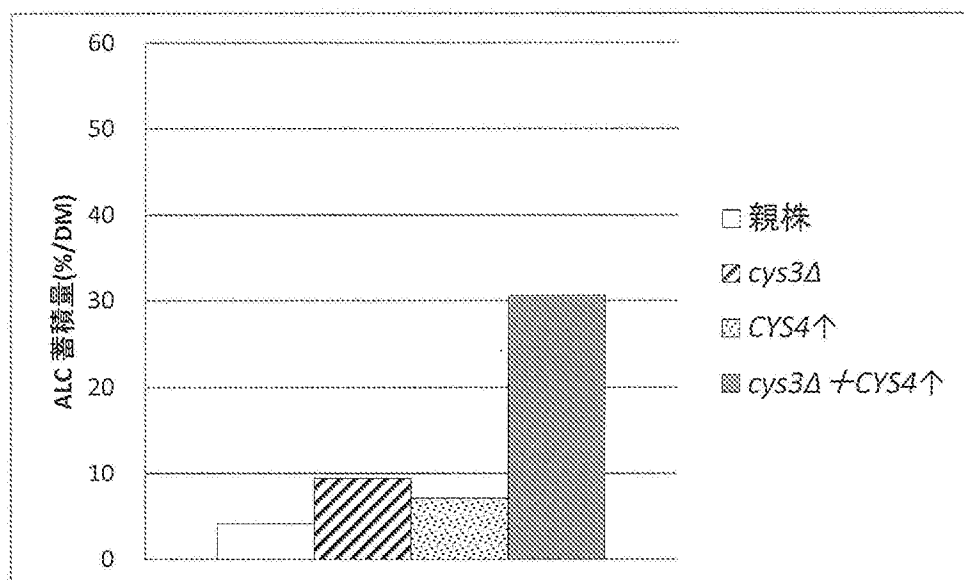
反応容器	15mlコニカルチューブ(#352196 ファルコン)
ウォーターバス	Water Bath T2 (THOMAS)
温度	30℃
時間	2hr
振とう数	50rpm

反応終了条件

	μ l
反応液	200
10%TCA	300

10%TCAを予め2ml Tube(#2-8087-01 アスワン)に入れ、反応液を入れ混合して反応を止めた

[図8]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/066974

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P13/12(2006.01)i, C12N9/88(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12P1/00-41/00, C12N9/00-9/99, C12N15/00-15/90

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	1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2016	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2016

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BRAUNSTEIN, Alexander E. et al., The beta-replacement-specific pyridoxal-P-dependent	1-4, 6, 8-10,
Y	lyases, Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol., 1984, Vol. 56, pp. 1-89, page 13, lines 16 to page 14, line 24, page 18, line 36 to page 22, line 19, page 38, line 1 to page 39, line 20, table I, forumula 8	22-23, 28-29 1-32
Y	JP 2001-112474 A (Kansai Technology Licensing Organization Co., Ltd.), 24 April 2001 (24.04.2001), fig. 1 (Family: none)	1-32

☒ 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
12 August 2016 (12.08.16)

Date of mailing of the international search report
30 August 2016 (30.08.16)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/066974

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	NAPOLI, Alessandro et al., Glucose-oxidase based self-destructing polymeric vesicles, Langmuir, 2004, Vol. 20, pp. 3487-3491, abstract	11-21,24-32
Y	JP 2013-505252 A (Cylene Pharmaceuticals, Inc.), 14 February 2013 (14.02.2013), paragraph [0215] & US 2011/0071136 A1 paragraph [0315] & WO 2011/035019 A1 & EP 2477493 A1 & CN 102647904 A & KR 10-2012-0104180 A	11-21,24-32
Y	JP 56-115756 A (Eli Lilly and Co.), 11 September 1981 (11.09.1981), page 11, lower left column, lines 12 to 16 & US 4293489 A column 7, line 67 to column 8, line 3 & EP 31220 A1	11-21,24-32

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12P13/12(2006.01)i, C12N9/88(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12P1/00-41/00, C12N9/00-9/99, C12N15/00-15/90

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	1971-2016年
日本国実用新案登録公報	1996-2016年
日本国登録実用新案公報	1994-2016年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

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	BRAUNSTEIN, Alexander E. et al., The beta-replacement-specific pyridoxal-P-dependent lyases, Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol., 1984, Vol. 56, pp. 1-89	1-4, 6, 8-10, 22-23, 28-29
Y	第13頁第16-第14頁第24行、第18頁第36行-第22頁第19行、第38頁第1行-第39頁第20行、Table I、式8	1-32

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

12.08.2016

国際調査報告の発送日

30.08.2016

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

西 賢二

4N

5803

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

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	JP 2001-112474 A (関西ティール・エル・オー株式会社) 2001.04.24, 図 1 (ファミリーなし)	1-32
Y	NAPOLI, Alessandro et al., Glucose-oxidase based self-destructing polymeric vesicles, Langmuir, 2004, Vol. 20, pp. 3487-3491 A b s t r a c t	11-21, 24-32
Y	JP 2013-505252 A (サイリーン ファーマシューティカルズ イン コーポレーティッド) 2013.02.14, 段落 [0215] & US 2011/0071136 A1、段落 [0315] & WO 2011/035019 A1 & EP 2477493 A1 & CN 102647904 A & KR 10-2012-0104180 A	11-21, 24-32
Y	JP 56-115756 A (イーライ・リリー・アンド・カンパニー) 1981.09.11, 第 11 頁左下欄第 12-16 行 & US 4293489 A、第 7 欄第 67 行-第 8 欄第 3 行 & EP 31220 A1	11-21, 24-32