

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2006 年 2 月 9 日 (09.02.2006)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2006/013802 A1

- (51) 国際特許分類:
C12P 41/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2005/014007
- (22) 国際出願日: 2005 年 8 月 1 日 (01.08.2005)
- (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2004-230139 2004 年 8 月 6 日 (06.08.2004) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社力ネカ (KANEKA CORPORATION) [JP/JP]; 〒5308288 大阪府大阪市北区中之島 3 丁目 2 番 4 号 Osaka (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 岩崎 晃 (IWASAKI, Akira) [JP/JP]; 〒6750068 兵庫県加古川市加古川町中津 6 6 5 - 1 0 Hyogo (JP). 鷺田 元久 (WASHIDA, Motohisa) [JP/JP]; 〒6550032 兵庫県神戸市垂水区星が丘 1 丁目 1 - 2 8 - 6 1 0 Hyogo (JP). 長谷川 淳三 (HASEGAWA, Junzou) [JP/JP]; 〒6740057 兵庫県明石市大久保町高岡 2 丁目 1 3 - 4 Hyogo (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, 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.
- (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, LV, 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。

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCTION OF ENANTIOMER-ENRICHED COMPOUNDS

(54) 発明の名称: エナンチオマー豊富化化合物の製造方法

(57) Abstract: A process for the production of enantiomer-enriched compounds which comprises (1) bringing an enantiomer mixture into contact with a stereoselective dehydrogenase containing NAD⁺ (nicotinamide adenine dinucleotide) as coenzyme to oxidize one enantiomer preferentially and form NADH with the other enantiomer left unoxidized, and (2) bringing the NADH formed by the oxidation into contact with a water-formation type NADH oxidase stable under oxidative conditions to convert the NADH into NAD⁺. According to the process, the regeneration of NAD⁺ in the production of enantiomer-enriched compounds from enantiomer mixtures with a dehydrogenase can be attained even without adding a stabilizer, and enantiomer-enriched compounds can be produced efficiently.

(57) 要約: 本発明は、以下の (1) および (2) を含むエナンチオマー豊富化化合物の製造方法に関する。(1) エナンチオマー混合物を、NAD⁺ (ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド) を補酵素とする立体選択的脱水素酵素と接触させ、一方のエナンチオマーを優先的に酸化し、他方のエナンチオマーを残存させ、NADH を生成させる。(2) (1) の酸化反応により生成した NADH を、酸化的条件下で安定である水生成型 NADH オキシダーゼと接触させ NAD⁺ へ変換する。本発明によれば、脱水素酵素を用いるエナンチオマー混合物からエナンチオマー豊富化化合物の製造において、安定化剤を添加せずとも NAD⁺ の再生が可能であり、効率的にエナンチオマー豊富化化合物を得ることができる。

WO 2006/013802 A1

明 細 書

エナンチオマー豊富化化合物の製造方法

技術分野

- [0001] 本発明は、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(以下NAD⁺と略す)を補酵素とする脱水素酵素による酸化反応において、ストレプトコッカス属由来水生成型NADHオキシダーゼを用いる補酵素NAD⁺の再生方法、並びに本NAD⁺再生方法を利用したエナンチオマー混合物からの光学活性化合物の製造方法に関する。

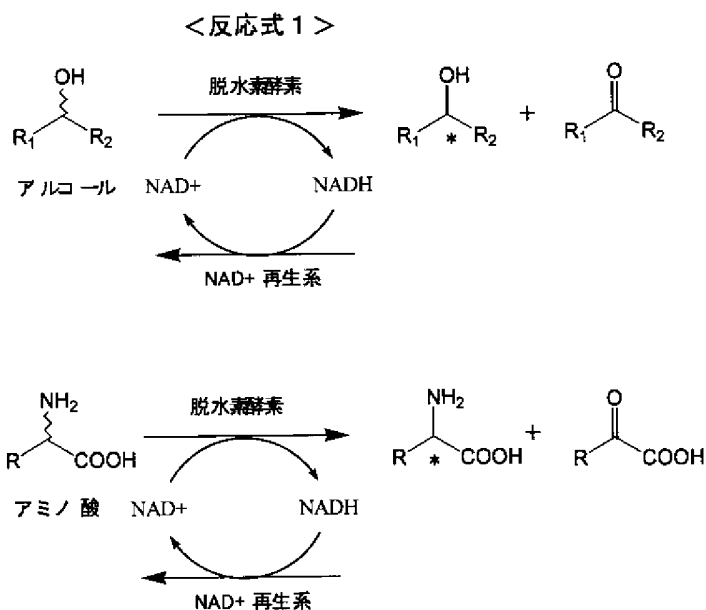
関連出願の相互参照

- [0002] 日本国特許2004-230139号(2004年8月6日出願)の明細書、請求の範囲、図面および要約を含む全開示内容は、これら全開示内容を参照することによって本出願に合体される。

背景技術

- [0003] E. C. 1. 1やE. C. 1. 4に分類される酸化還元酵素(例えば脱水素酵素)には、NAD⁺などの補酵素存在下、アルコールやアミノ酸をケトンやケト酸へ酸化する反応を触媒するものがある。多くの場合、それら脱水素酵素による酸化反応は立体選択的であるため、アルコール類やアミノ酸類のエナンチオマー混合物にこれら酵素を作用させれば、一方のエナンチオマーのみ酸化され、残存するエナンチオマーが豊富化される。この反応は光学活性化合物の製造に有効な方法である。
- [0004] しかしながら、上記酸化反応の際には酸化型補酵素NAD⁺はNADHへ変換されるため、反応には化学量論量のNAD⁺が必要である。しかし、下の反応式1に示すように、脱水素酵素による酸化反応によって生じたNADHをNAD⁺へ変換する反応(NAD⁺再生系)を共役させる事により、NAD⁺の化学量論量の使用を避け、その使用量を減らす事が可能である(反応式1において、*は不斉炭素を表し、この絶対配置は(R)でもよく、(S)でもよい)。

- [0005] [化1]



[0006] 従来より、ラクトバチルス・ブレビス (*Lactobacillus brevis*) 由来の水生成型NADHオキシダーゼを補酵素再生系に利用した光学活性化合物の合成方法が報告されている(特許文献1、非特許文献1、2)。オキシダーゼは、酸素でNADHを酸化して、NAD⁺と水を生成する反応を触媒する酵素であり、その反応には酸素の存在が必須である。水生成型NADHオキシダーゼによるNADHからのNAD⁺生成反応は非可逆的である。また、反応産物としてはNAD⁺以外に水が生成するのみであり、NAD⁺再生系における本酵素の使用は好ましいという。

[0007] しかし、ラクトバチルス・ブレビス由来の水生成型NADHオキシダーゼは、酸化に対する感受性が強く、その安定化にはDTT(ジチオスレイトール)などの添加が必要である(非特許文献1)。従って、本微生物由来の水生成型NADHオキシダーゼをNAD⁺再生系に使用する場合にも、反応系にDTTなどの安定化剤を添加する必要がある。

[0008] ラクトバチルス・ブレビス以外にラクトバチルス・サンフランシスコセンシス (*Lactobacillus sanfranciscensis*) 由来の水生成型NADHオキシダーゼをNAD⁺再生酵素に利用した光学活性化合物の合成方法が報告されているが、この場合も反応系にDTT

を添加している(非特許文献3)。

特許文献1:特開2003-116585

非特許文献1:Enzyme and Microbial Technology 32, 205-211 (2003)

非特許文献2:Org. Lett. Vol. 5, No20, 3649-3650 (2003)

非特許文献3:Adv. Synth. Catal. 345, 707-712 (2003)

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0009] 従来のラクトバチルス・ブレビス及びラクトバチルス・サンフランシスコセンシス由来の水生成型NADHオキシダーゼをNAD⁺再生酵素として使用する場合、一般的には反応系にDTT添加が必要となる。DTT添加が必要となる場合、(1)DTT添加による余分なコストがかかる点、(2)反応に使用する基質、生成物によっては、添加したDTTと反応してしまい収率が低下する可能性がある点、(3)そのようなDTTとの反応の結果、DTT濃度が低下し、NADHオキシダーゼの保護効果が減少してしまう点等の課題がある。これらの課題は、例えば工業的製法に適用する際には特に考慮する必要がある。

[0010] 本発明は、脱水素酵素による立体選択的酸化反応時のNAD⁺再生系に、活性、安定性などの点で優れ、特に反応時にDTTなどの酵素保護剤を必要としない水生成型NADHオキシダーゼを使用することによる、効率的な光学活性アルコール、アミノ酸などの有用物質を製造する方法を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0011] 本発明者らは、上記課題につき、ストレプトコッカス属微生物、さらに詳しく言えばストレプトコッカス・ミュータンス由来のNADHオキシダーゼが、安定化にDTTなどの保護剤の添加も必要とせず、NAD⁺再生酵素として、非常に有利であることを見出し本発明を完成した。

(1)、本発明は、以下の(1)および(2)を含むエナンチオマー豊富化化合物の製造方法を対象とする。(1)エナンチオマー混合物を、NAD⁺(ニコチンアミドアデニジヌクレオチド)を補酵素とする立体選択的脱水素酵素と接触させ、一方のエナンチオマーを優先的に酸化し、他方のエナンチオマーを残存させ、NADHを生成させる

。(2) (1)の酸化反応により生成したNADHを、酸化的条件下で安定である水生成型NADHオキシダーゼと接触させNAD⁺へ変換する。

[0012] 本発明は、さらに以下の対象を含む。

(10) NAD⁺ (ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド)を補酵素とする立体選択的脱水素酵素によってエナンチオマー混合物のうち的一方の立体のエナンチオマーを優先的に酸化する反応において、

前記反応に伴って生ずるNADHをNAD⁺に再変換するために、酸素存在下であっても酵素保護剤なしで安定であることを特徴とする水生成型NADHオキシダーゼを利用する方法。

(11) NAD⁺を補酵素とする立体選択的脱水素酵素と組み合わせて使用し得る、酸化的条件下で安定である水生成型NADHオキシダーゼ。

(12) NAD⁺を補酵素とする脱水素反応に伴って生ずるNADHをNAD⁺に再変換する補酵素再生機能を有し、かつ、酵素保護剤なしで用いられることを特徴とする補酵素再生系用の水生成型NADHオキシダーゼ。

(13) NAD⁺を補酵素とする立体選択的脱水素酵素の遺伝子と、酸化的条件下で安定である水生成型NADHオキシダーゼの遺伝子とを含むベクター。

(14) NAD⁺を補酵素とする立体選択的脱水素酵素の遺伝子と、酸化的条件下で安定である水生成型NADHオキシダーゼの遺伝子とを含むベクターによって形質転換された形質転換体微生物。

(15) NAD⁺を補酵素とする立体選択的脱水素酵素と、酸化的条件下で安定である水生成型NADHオキシダーゼとを含む組成物。

発明の効果

[0013] ストレプトコッカス属微生物由来の水生成型NADHオキシダーゼをNAD⁺再生系に用いることにより、還元剤などの酵素安定化剤を添加せずとも、NAD⁺の再生反応が効率良く進む。従って、該NAD⁺再生系を脱水素酵素による立体選択的酸化反応と共役させれば、エナンチオマー混合物から効率的にエナンチオマー豊富化合物を得る事が可能となる。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]実施形態としての組み換えベクターpNTNXの作成方法を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

[0015] 1. 水生成型NADHオキシダーゼ

本発明のNAD再生系に使用する「水生成型NADHオキシダーゼ」は、酸化的条件下で安定である、すなわち、失活しないもの、または顕著な失活が抑制されるものを使用する。

[0016] 本明細書における「酸化的条件下で安定である」とは、酸素存在下、例えば、特に脱気操作をしていない緩衝液中、又は酵素液を含んだ試験管を振盪するなどの酸素供給条件下において顕著な失活なく、NADHをNAD⁺へと変換する反応を触媒する場合を含む概念である。また、酸素存在下において、酵素保護剤を利用しない場合であっても酵素保護剤を利用する場合と同様に安定である状態も、「酸化的条件下で安定である」という概念に含まれる。

[0017] 本発明で使用する「酸化的条件下で安定である水生成型NADHオキシダーゼ」は、DTTなどの酵素保護剤非存在下で、酸素存在下、約20℃、約3時間で約70%以上、好ましくは約80%以上、更に好ましくは約90%以上の活性が保持される。

[0018] 本発明の「水生成型NADHオキシダーゼ」の起源としては、例えばストレプトコッカス属微生物が挙げられ、好ましくはストレプトコッカス・ミュータンス、さらに好ましくはストレプトコッカス・ミュータンスNCIB11723を挙げることが出来る。ストレプトコッカス・ミュータンスNCIB11723由来の水生成型NADHオキシダーゼのアミノ酸配列、およびそれをコードするDNAの塩基配列は、既に報告されている(特許文献:特開平8-196281)。

[0019] 配列番号1、2は、ストレプトコッカス・ミュータンスNCIB11723由来の水生成型NADHオキシダーゼのアミノ酸配列、およびそれをコードするDNAの塩基配列を示す。当該ストレプトコッカス属は、野生株であってもよく、また変異株であってもよい。変異株は、定法に従い、UV照射や、N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン(NTG)、メチルエタンスルホネート(EMS)等の変異剤による処理により取得することができる。変異株が本発明のNADHオキシダーゼを生産しうる限り、当該変異株は本発明に用いるNADHオキシダーゼの入手源として使用しうる。

- [0020] 該ストレプトコッカス属微生物由来の水生成型NADHオキシダーゼは、従来のラクトバチルス属由来の酵素とは異なり、安定化のためにDTTなどの還元剤の添加を必要とせず、本発明の目的であるNAD⁺再生系への使用に好ましいと言える。水生成型NADHオキシダーゼは、ストレプトコッカス属細菌の培養液から酵素を調製して取得可能であり、その他、本酵素をコードするDNAをベクターに組込み、これを宿主内に導入して得られる形質転換体内で酵素遺伝子を発現させることによって容易かつ大量に取得可能である。
- [0021] 本発明では、「水生成型NADHオキシダーゼ」として、配列番号1に示すアミノ酸配列からなる酵素タンパク質と実質的に同一の酵素タンパク質を使用できる。「実質的に同一」の酵素タンパク質とは、酵素タンパク質のアミノ酸配列において、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれ以上の置換、欠失および／または挿入を導入し、そのとき該酵素タンパク質が同等の機能を有する場合、当該酵素タンパク質は実質的に同一であるといえる。また、本発明で使用する酵素タンパク質は配列番号1に示すアミノ酸配列と60%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、そして最も好ましくは99%以上のアミノ酸配列の同一性を有し、配列番号1に示すアミノ酸配列からなる酵素タンパク質と同等の機能を有する場合、当該酵素タンパク質は実質的に同一であると言える。
- [0022] 上記アミノ酸配列の「同一性」とは、比較対象となる配列を最適な状態にアラインメントされた状態で比較することにより決定される。比較対象となる配列は、最適な状態にアラインメントされた場合に、付加または欠失を有していてもよい。アミノ酸配列の同一性は、例えば相同検索プログラムFASTA (W.R. Pearson & D.J. Lipman P.N.A.S. (1988) 85:2444-2448) やBLAST (Altschul et. al., J. Mol. Biol. (1990) 215:403-410) を用いて2つのアミノ酸配列を比較した場合に、Identityの値で算出することができる。BLAST分析を実施するためのソフトウェアは、National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nih.gov/>) を通じて公衆に利用可能である。
- [0023] ここでいう同等の機能を有する酵素タンパク質は、それらをコードするヌクレオチド配列に相補的な配列を有するヌクレオチド鎖に、ストリンジェント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列を含むDNAによりコードされ得る。

[0024] 該ストリンジェント条件下のハイブリダイゼーション条件の例は:好ましくは約7%のドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、約0.5MのSodium phosphate、1mMのEDTA中で約50℃でハイブリダイゼーション、および約2XSSC、約0.1%のSDS中で50℃の洗浄;より望ましくは約7%のドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、約0.5MのSodium phosphate、約1mMのEDTAで50℃でハイブリダイゼーション、および約1XSSC、約0.1%のSDSで約50℃の洗浄;より望ましくは約7%のドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、約0.5MのSodium phosphate、約1mMのEDTAで約50℃でハイブリダイゼーション、および約0.5XSSC、約0.1%のSDSで約50℃の洗浄;より好ましくは約7%のドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、約0.5MのSodium phosphate、約1mMのEDTAで約50℃でハイブリダイゼーション、および約0.1XSSC、約0.1%のSDSで約50℃の洗浄;並びになおより好ましくは約7%のドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、約0.5MのSodium phosphate、約1mMのEDTAで約50℃で、約0.1XSSC、約0.1%のSDSで約65℃の洗浄である。もともと、該条件は、ヌクレオチド鎖の長さ、該配列、および異なる環境パラメーターに依存して異なり得る。より長い配列は、より高い温度で特異的にハイブリダイズする。

[0025] 核酸のハイブリダイゼーションの詳細なガイドは、例えばTijssen(1993) Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes part I chapter 2, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assay", Elsevier, New Yorkに見出される。

[0026] 2. ベクター

上記形質転換体を得るために用いられるベクターとしては、適切な宿主内で本発明の酵素遺伝子を発現できるものであればいずれもが使用できる。このようなベクターとしては、例えば、プラスミドベクター、ファージベクター、コスミドベクターなどが挙げられる。また、他の宿主との間での遺伝子交換が可能なシャトルベクターも使用できる。このようなベクターは、作動可能に連結されたプロモーター(例えばlacUV5プロモーター、trpプロモーター、trcプロモーター、tacプロモーター、lppプロモーター、tufBプロモーター、recAプロモーター、pLプロモーター)等の制御因子を含み、本発明のDNAと作動可能に連結された発現単位を含む発現ベクターとして好適

に使用できる。例えば、pUCNT(国際公開第WO94/03613号パンフレット)等が好適に使用できる。

[0027] 本明細書で用いる用語「制御因子」は、機能的プロモーター及び、任意の関連する転写要素(例えばエンハンサー、CCAATボックス、TATAボックス、SPI部位など)を有する塩基配列をいう。本明細書で用いる用語「作動可能に連結」は、遺伝子が発現するように、DNAと、その発現を調節するプロモーター、エンハンサー等の種々の調節エレメントとが宿主細胞中で作動できる状態で連結されることをいう。制御因子のタイプ及び種類が宿主に応じて変わり得ることは、当業者に周知の事項である。

[0028] 3. 形質転換体

本発明の遺伝子を含むDNAを含有する組換えベクターを導入する宿主としては、細菌、酵母、糸状菌、植物細胞、動物細胞などが挙げられるが、大腸菌が特に好ましい。本発明のDNAは定法により宿主細胞に導入できる。宿主細胞として大腸菌を用いる場合、例えば塩化カルシウム法により、本発明のDNAを導入できる。

[0029] 本明細書における形質転換体(または組換え体)は、異種性核酸分子が導入された宿主生物を意味する。一般的に核酸分子は、宿主のゲノムに安定的に組み込まれるか、または、染色体外の分子と存在する。そのような染色体外の分子は、自己複製することができる。形質転換された細胞、組織または生物は、形質転換プロセスの最終産物のみならず、そのトランスジェニック後代もまた含まれる。

[0030] 4. 反応

本発明の一つの実施形態では、脱水素酵素による立体選択的酸化によるエナンチオマー豊富化反応において、ストレプトコッカス属細菌由来水生成型NADHオキシダーゼによるNAD⁺再生系を利用することを特徴としている。したがって、本発明は、立体選択的酸化反応に、ストレプトコッカス属由来の水生成型NADHオキシダーゼによるNAD⁺再生系を共役させる点を一つの特徴とするものであり、製造するエナンチオマー豊富化化合物、更には反応に使用する脱水素酵素の種類によって、本発明はなんら限定されるものではない。

[0031] 5. 基質

本発明により製造されるエナンチオマー豊富化化合物のための原料は、エナンチ

オマー混合物を含む。本発明の「エナンチオマー混合物」としては、不斉炭素を有し、その不斉炭素に、脱水素酵素で酸化され得る水酸基、アミノ基、ホルミル基等が結合した化合物が挙げられる。具体的には、ジオール誘導体などを含めたアルコール誘導体、ヒドロキシ酸誘導体、アミノ酸誘導体などが挙げられる。

[0032] 「誘導体」は、ある化合物に小部分の構造上の変化があつてできる化合物である。化合物中の水素原子あるいは特定の原子団が、他の原子あるいは原子団によって置換された化合物は、該化合物の誘導体であると理解される。

[0033] 6. 脱水素酵素

上記アルコール誘導体、ヒドロキシ酸誘導体の製造には、E. C. 1. 1. 1に分類される酵素群で、その反応がエナンチオマー選択的でありNAD⁺を補酵素として利用できるものであればいかなるものも使用し得る。上記アミノ酸誘導体の製造にはE. C. 1. 4. 1に分類される酵素群で、その反応がエナンチオマー選択的でありNAD⁺を補酵素として利用できるものであればいかなるものも使用し得る。例を挙げると、以前我々が見出したセルロモナス・スピーシーズ(*Cellulomonas* sp.)株に由来する脱水素酵素(特願2004-182926)は、NAD依存性の酵素であり、1, 2-ブタンジオール及び1, 3-ブタンジオールの(R)体に対し立体選択的酸化活性を有する。また、上記酵素は、3-クロロ-1, 2-プロパンジオールの(S)体に対し立体選択的酸化活性を有する。

[0034] 従つて、本発明の脱水素酵素として上記酵素を使用すれば、1, 2-ブタンジオールまたは1, 3-ブタンジオールのエナンチオマー混合物から(S)体のエナンチオマー豊富化された上記ジオールを得る事ができる。また、(本発明の脱水素酵素として上記酵素を使用すれば、)3-クロロ-1, 2-プロパンジオールのエナンチオマー混合物から(R)体のエナンチオマー豊富化された上記ジオールを得る事が出来る。

[0035] また、キャンディダ・マリス(*Candida maris*) IFO10003株に由来する脱水素酵素(国際公開第WO01/005996号パンフレット)は1-フェニルエタノールの(R)体に対し立体選択的酸化反応を触媒する。

[0036] したがって、本発明の脱水素酵素として上記酵素を使用すれば、1-フェニルエタノールのエナンチオマー混合物から(S)体のエナンチオマー豊富化化合物を得る事

が出来る。また、L体またはD体特異的アミノ酸脱水素酵素を使用すれば、アミノ酸誘導体のエナンチオマー混合物からそれぞれD体、L体のエナンチオマー豊富化されたアミノ酸誘導体を得ることが出来る。

[0037] 7. エナンチオマー豊富化

本発明における「エナンチオマー豊富化化合物」とは、目的の対掌体が、もう一方の対掌体との混合物において50%モル量以上、好ましくは約70%以上、更に好ましくは約90%以上の割合で存在するものを意味する。

[0038] 本発明のエナンチオマー豊富化反応は、以下のように行うことができる。まず、適当な溶媒中に、エナンチオマー混合物と、その一方のエナンチオマーに対し酸化活性を有する脱水素酵素と、水生成型NADHオキシダーゼ及びNAD⁺とを添加し攪拌する事により行うことができる。

[0039] 本発明の水生成型NADHオキシダーゼは、NAD⁺を補酵素とする立体選択的脱水素酵素と組み合わせて使用し得る。ここで、「組み合わせて使用」とは、水生成型NADHオキシダーゼおよび脱水素酵素の両酵素を反応液に同時に添加する場合のほか、両酵素が反応液中で共存する状態となる限り、両酵素を異なる時期に添加する場合も含まれる。

[0040] 反応条件は、用いる基質、酸化還元酵素などにより異なるが、通常、反応は約5～80℃好ましくは約10～50℃の温度で行われ、またpHは約4～10、好ましくは約5～9で行う。基質であるエナンチオマー混合物は約0.1～80% (w/v)、好ましくは約1～60%の仕込み濃度で添加できる。NAD⁺は基質に対して約0.00001～1モル%、好ましくは約0.00001～0.1% (w/v)の濃度で行う。また、NADHオキシダーゼの反応には、酸素が必要であるため、反応液が空気または比較的純粋な酸素存在下で行われる事が好ましい。また、反応液への酸素の溶解を促進するため、反応は、振盪あるいは攪拌条件下で行われる事が好ましい。さらに大気圧以上の加圧下で反応する事により、反応液への酸素の溶解度が向上し、反応がより効率に進む場合もある。

[0041] 8. 酵素

本発明に使用する酵素、例えば脱水素酵素、水生成型NADHオキシダーゼは、

単一にまたは部分的に精製された酵素であってもよいし、これら酵素を産生する生物（例えば微生物）の培養物またはその培養物の処理物を使用することも可能である。ここで、「微生物の培養物」とは、菌体を含む培養液あるいは培養菌体を意味し、「処理物」とは、例えば、粗抽出液、凍結乾燥菌体、アセトン乾燥菌体、あるいはそれらの磨砕物、これらの混合物などを意味する。更にそれらは、酵素自体または菌体のまま公知の手段（例えば、架橋法、物理的吸着法、包括法など）で固定化されて使用できる。

[0042] また、反応を行う際、脱水素酵素と水生成型NADHオキシダーゼの両者を同一宿主細胞内に導入した形質転換体（例えば形質転換体微生物）の培養物またはその培養物の処理物を用いれば、別々に両酵素を発現する微生物を培養する必要はないため、より低コストでエナンチオマー豊富化合物が製造できる。

[0043] また、例えば、両酵素を同一細胞内に発現した形質転換微生物を用いれば、微生物細胞内のNAD⁺を使用し、反応が進行することも可能となり、従って、外部から別途NAD⁺を添加する必要がない、または添加するNAD⁺の量を大幅に減らす事が可能となる。このような形質転換体は、使用する脱水素酵素をコードするDNA及び水生成型NADHオキシダーゼをコードするDNAを、同一のベクターに組み込み、これを宿主に導入することにより製造できるし、また、これら2種類のDNAを不適合性グループの異なる2種のベクターにそれぞれ組み込み、それらを同一の宿主に導入することによっても製造できる。

[0044] すなわち、使用する脱水素酵素をコードするDNAとNADHオキシダーゼをコードするDNAとを含有する組換えベクターを含む形質転換体や、使用する脱水素酵素をコードするDNAを含有する第1の組換えベクターと、NADHオキシダーゼをコードするDNAを含有する第2の組換えベクターとを含む形質転換体を使用できる。

[0045] 本発明のNAD⁺を補酵素とする立体選択的脱水素酵素と水生成型NADHオキシダーゼとを含む「組成物」は、両酵素、および所望により担体を混合することにより製造する。そのような組成物はまた、他の作用性物質、および慣行の添加物、例えば安定剤、湿潤剤、乳化剤、香味剤、緩衝剤などを含みうる。本発明の組成物は、本発明の方法のために使用しうる。

[0046] 以下に、実施例により本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれら実施例になんら限定されるものではない。

実施例

[0047] (実施例1) NADHオキシダーゼ遺伝子を含む組換えベクターの作成及び組換え大腸菌の作成)

大腸菌においてストレプトコッカス・ミュータンス由来の水生成型NADHオキシダーゼを発現させるために、形質転換に用いる組換えベクターを作成した。まずNADHオキシダーゼの構造遺伝子の開始部分にNdeI部位を付加し、かつ終止コドンの直後に新たな終止コドンとPstI部位を付加した二本鎖DNAを以下の方法により取得した。

[0048] 5' -gaggatttgcataatgagtaaaatcgattatg-3' (primer-1: 配列番号3) 及び 5' -atga aaacatgtgaattcccattgacataac-3' (primer-2: 配列番号4) 記載の合成プライマーの組み合わせで、水生成型NADHオキシダーゼ遺伝子を含むプラスミドpSSW61 (Biosci. Biotech. Biochem., 60(1), 39-43, 1996) を鋳型としてPCRを行い二本鎖DNA1を合成した。同様に、5' -gatatgtcaatgggaattcacatgttttcat-3' (primer-3: 配列番号5) 及び 5' -tttctgcagttatcattagcttttaagtct-3' (primer-4: 配列番号6) の合成プライマーの組み合わせで、水生成型NADHオキシダーゼ遺伝子を含むプラスミドpSSW61 (Biosci. Biotech. Biochem., 60(1), 39-43, 1996) を鋳型としてPCRを行い、二本鎖DNA2を合成した。

[0049] 更に前記2種の合成プライマー (primer-1、primer-4) を用い、上記で得た二本鎖DNA1、2の混合物を鋳型にPCRを行い、二本鎖DNAを得た。得られたDNA断片をNdeI及びPstI消化し、プラスミドpUCNT (国際公開第WO94/03613号パンフレット) のlacプロモーターの下流のNdeI、PstI部位に挿入することにより、組換えプラスミドpNTNXを取得した。

[0050] 図1は、pNTNXの作製法及び構造を示す。本組換えベクターpNTMXを用いて大腸菌HB101 (宝酒造株式会社製) を形質転換し、組換え大腸菌HB101 (pNTNX) を得た。

[0051] (実施例2) 組換え大腸菌によるNADHオキシダーゼの発現

実施例1で得た組換え大腸菌HB101 (pNTNX)を $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ のアンピシリン及びグリセリン0.8% (w/v)を含む $2\times\text{YT}$ 培地(バクト・トリプトン1.6% (w/v)、バクト・イーストエキス1.0% (w/v)、NaCl0.5% (w/v)、 $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ のアンピシリン、pH7.0)で培養し、集菌後、100mMトリス塩酸緩衝液(pH7)に懸濁し、超音波破碎法により破碎し無細胞抽出液を得た。本無細胞中のNADHオキシダーゼの比活性は 30U/mgタンパク であった。

[NADHオキシダーゼ活性の測定条件]

100mMリン酸緩衝液(pH7.0)にNADH0.17mM、EDTA0.2mM、FAD0.02mMを含む反応液0.95mlに酵素液0.05mlを添加し、 30°C での波長340nmの吸光度の減少を測定することにより行った。この反応条件において、1分間に $1\text{ }\mu\text{mol}$ のNADHを NAD^{+} に酸化する酵素活性を1unitと定義した。

[0052] (実施例3)無細胞抽出液の調製

実施例1で得たNADHオキシダーゼを発現する組換え大腸菌HB101 (pNTNX)を500ml容坂口フラスコ中で滅菌した80mlの実施例2記載の培地に接種し、 30°C で32時間振とう培養した。集菌後、10mlの100mMリン酸緩衝液(pH7.0)に懸濁し、超音波破碎法により破碎後、遠心分離を行い、NADHオキシダーゼを含む無細胞抽出液を得た。

[0053] また、キャンディダ・マリス(*Candida maris*)由来脱水素酵素を発現する*E. coli* HB101 (pNTFP) (受託番号FERM BP-7116)およびセルロモナス・スピーシーズ(*Cellulomonas* sp.)由来脱水素酵素を発現する*E. coli* HB101 (pTSCS) (FERM BP-10024)のそれぞれを、500ml容坂口フラスコ中で滅菌した60mlの半合成培地(グリセリン1.5% (w/v)、イーストエキス0.3% (w/v)、 Na_2HPO_4 0.6% (w/v)、 KH_2HPO_4 0.3% (w/v)、NaCl0.2% (w/v)、 $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5% (w/v)、 $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ のアンピシリン、pH6.0)に植菌し、 37°C で37時間培養した。集菌後、それぞれ10mlの100mMリン酸緩衝液(pH7.0)に懸濁し、超音波破碎法により破碎後、遠心分離を行い、2種のNAD依存性脱水素酵素を含む無細胞抽出液を得た。HB101 (pTSCS)及びHB101 (pNTFP)から調製した無細胞抽出液中は、それぞれ 10U/mg の1, 2-ブタンジールに対する酸化活性、 5U/mg の1-

フェニルエタノールに対する酸化活性を有していた。

[0054] [1, 2-ブタンジオールまたは1-フェニルエタノール酸化活性の測定条件]
100mMリン酸緩衝液(pH7.0)に1, 2-ブタンジオールまたは1-フェニルエタノール20mM、NAD⁺0.17mMを含む反応液0.95mlに酵素液0.05mlを添加し、30℃での波長340nmの吸光度の増加を測定することにより行った。この反応条件において、1分間に1 μ molのNADHをNAD⁺に酸化する酵素活性を1unitと定義した。

[0055] なお、E. coli HB101 (pNTFP) (FERM-7116)は2000年4月11日に、E. coli HB101 (pTSCS) (FERM BP-10024)は2004年5月12日に、それぞれ前記の受託番号にて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(IPO D: 〒305-8566 茨城県つくば市東1-1-1 中央第6)に寄託されている。

[0056] (実施例4) 1, 2-ブタンジオールの光学分割

実施例3で調整したHB101 (pTSCS)無細胞抽出液(脱水素酵素)70 μ l、HB101 (pNTNX)無細胞抽出液(NADHオキシダーゼ酵素)28 μ l、10mgラセミ体1, 2-ブタンジオール、300mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.0)を含む反応液1mlを試験管中で20℃で振盪し23時間反応を行った。反応液200 μ lを硫酸アンモニウムで飽和させた後、酢酸エチル400 μ lにより1, 2-ブタンジオールを抽出した。本抽出液のうち100 μ lから減圧下で溶媒を除去し、残渣にトリフルオロ酢酸無水物200 μ lを加えて室温で10分間静置する事によりトリフルオロアセチル化したのち、減圧下で未反応のトリフルオロ酢酸無水物を除去した。さらに酢酸エチル500 μ lを加えて、トリフルオロ化した1, 2-ブタンジオールを溶解し、キャピラリーガスクロマトグラフィーにより光学純度を分析した。また、上記酵素反応液100 μ lを硫酸アンモニウムで飽和させた後、酢酸エチル1000 μ lにより1, 2-ブタンジオールを抽出し、本抽出液中の1, 2-ブタンジオール含量をガスクロマトグラフィーにより分析した。その結果、光学純度97%の(S)体-1, 2-ブタンジオールが収率49%で生成していた。

[0057] [光学純度の分析条件]

カラム: Chiradex G-TA (20m $\times$ 0.25mm) (ASTECC社製)

カラム温度: 60℃

注入温度:150℃

検出温度:150℃

キャリアーガス:ヘリウム(130kPa)

スプリット比:100/1

検出時間:1, 2-ブタンジオール R体5.0分、S体5.8分

[0058] [含量の分析条件]

カラム:HP-5 30m×0.32mmI.D. (Agilent Technologies社製)

検出:FID

カラム初期温度:50℃、カラム最終温度:200℃、昇温速度:6℃/分

注入温度:150℃

検出温度:300℃

キャリアーガス:ヘリウム(70kPa)

スプリット比:100/1

[0059] (実施例5)1-フェニルエタノールの光学分割

実施例3で調整したHB101 (pNTFP)無細胞抽出液(脱水素酵素) 19 μ l、HB101 (pNTNX)無細胞抽出液(NADHオキシダーゼ酵素) 28 μ l、10mgラセミ体1-フェニルエタノール、300mMリン酸カリウム緩衝液を含む反応液1mlを20℃で振盪し23時間反応を行った。反応液100 μ lを硫酸アンモニウムで飽和させた後、酢酸エチル700 μ lにより1-フェニルエタノールを抽出し、本抽出液中の1-フェニルエタノールの光学純度及び含量をHPCLにより分析した(カラム:ダイセル化学工業社製、Chiralcell OD-H(0.46×25cm)、カラム温度:25℃、溶離液:n-ヘキサン/2-プロパノール=9/1、流速:0.5ml/分、溶離時間:(R)体-12.2分、(S)体-13.3分)。その結果、光学純度100%の(S)体-1-フェニルエタノールが収率48%で生成していた。

[0060] [光学純度、含量の分析条件]

カラム:Chiralcell OD-H 0.46×25cm(ダイセル化学工業社製)

溶離液:n-ヘキサン/2-プロパノール=9/1

流速:0.5ml/分

溶離時間: (R) 体-12. 2分、 (S) 体-13. 3分)

[0061] (実施例6) 1-フェニルエタノールの光学分割(DTT添加、無添加)

実施例3で調整したHB101 (pNTFP) 無細胞抽出液(脱水素酵素) 10 μ l、HB101 (pNTNX) 無細胞抽出液(NADHオキシダーゼ) 5 μ l、10mgラセミ体1-フェニルエタノール、300mMリン酸カリウム緩衝液を含む反応液1mlおよび本反応液に5mMDTTを添加した反応液1mlを20°Cで振盪し6時間反応を行った。その後、実施例5と同様の方法で反応液中の1-フェニルエタノールの含量、光学純度を測定した。その結果、DTT無添加および添加した反応液中に、それぞれ光学純度95%の1-フェニルエタノールが収率50%、光学純度94%の1-フェニルエタノールが収率51%で生成していた。以上のように、反応液中にDTTを添加しない場合も、DTT添加した場合と同程度の反応が進行しており、実質的にDTTの添加の必要性は無かった。

[0062] (実施例7) 酸素存在下での水生成型NADHオキシダーゼの安定性

実施例3で調製した水生成型NADHオキシダーゼを含むHB101 (pNTNX) 無細胞抽出液0. 1mlを100mMリン酸緩衝液または5mMのDTTを含む100mMリン酸緩衝液0. 9mlに添加し、小型試験管中で静置または300rpmでの振盪条件下(酸素供給条件下)、20°C、3時間保存し、残存するNADHオキシダーゼ活性を測定した。その結果を表1に示す。いずれの条件においても、90%以上の活性が保持されていた。

[0063] [表1]

条件	残存活性(%)	
	静置	振盪
100mM リン酸緩衝液	92	93
100mMリン酸緩衝液(+5mM DTT)	94	93

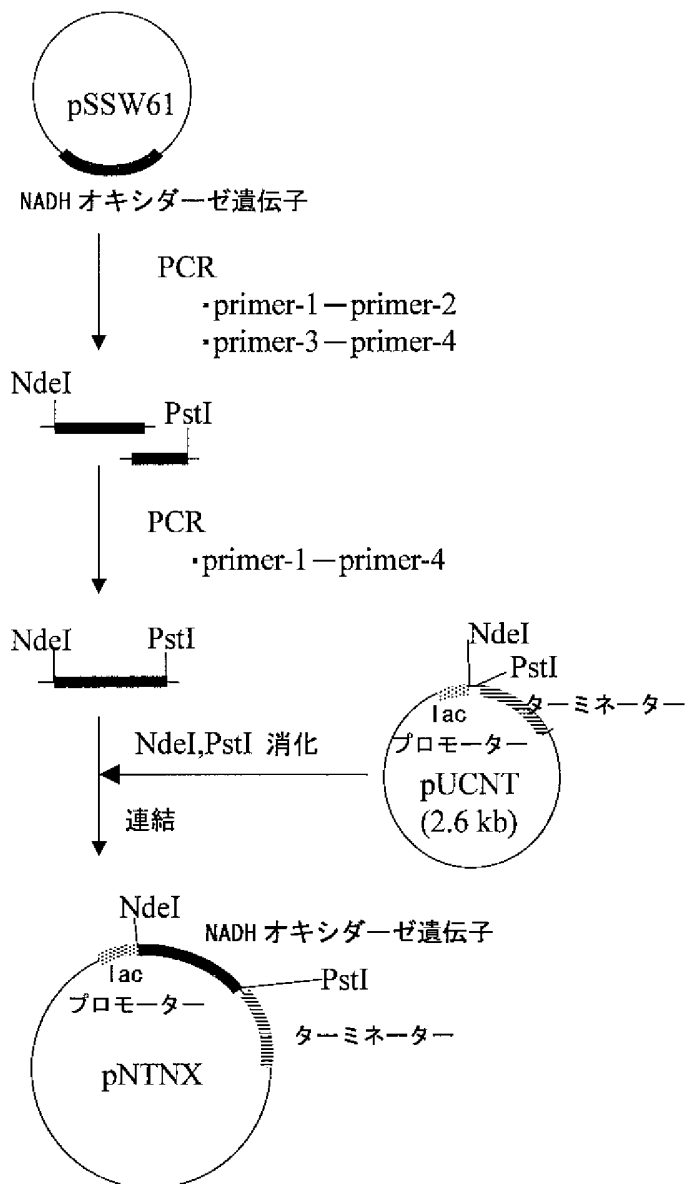
請求の範囲

- [1] 以下の(1)および(2)を含むエナンチオマー豊富化化合物の製造方法：
(1)エナンチオマー混合物を、NAD⁺ (ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド)を補酵素とする立体選択的脱水素酵素と接触させ、一方のエナンチオマーを優先的に酸化し、他方のエナンチオマーを残存させ、NADHを生成させる。
(2) (1)の酸化反応により生成したNADHを、酸化的条件下で安定である水生成型NADHオキシダーゼと接触させNAD⁺へ変換する。
- [2] 前記水生成型NADHオキシダーゼが、ストレプトコッカス(*Streptococcus*)属微生物由来の酵素またはそれと実質的に同一の酵素である請求項1記載の製造方法。
- [3] 前記ストレプトコッカス属微生物が、ストレプトコッカス・ミュータンス(*Streptococcus mutans*)である請求項2記載の製造方法。
- [4] 前記ストレプトコッカス・ミュータンスが、ストレプトコッカス・ミュータンス(*Streptococcus mutans*) NCIB11723またはその変異株である請求項3記載の製造方法。
- [5] 前記水生成型NADHオキシダーゼが、配列番号1に示すアミノ酸配列よりなるタンパク質またはそのタンパク質と実質的に同一のタンパク質を含む請求項4記載の製造方法。
- [6] 前記水生成型NADHオキシダーゼの酵素源が、当該酵素を組換え発現した微生物の培養物又はその培養物の処理物である、請求項1～5のいずれかに記載の製造方法。
- [7] 前記脱水素酵素の酵素源および水生成NADHオキシダーゼの酵素源が、それら両方の酵素を同一宿主内で発現した組換え微生物の培養物又はその培養物の処理物である、請求項1～5のいずれかに記載の製造方法。
- [8] 前記エナンチオマー混合物が、2級アルコールまたはその誘導体である請求項1～7のいずれかに記載の製造方法。
- [9] 前記エナンチオマー混合物が、アミノ酸またはその誘導体である請求項1～7のいずれかに記載の製造方法。
- [10] NAD⁺ (ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド)を補酵素とする立体選択的脱水素酵素によってエナンチオマー混合物のうちの一方の立体のエナンチオマーを優先的

に酸化する反応において、当該反応に伴って生ずるNADHをNAD⁺に再変換するために、酸素存在下であっても酵素保護剤なしで安定であることを特徴とする水生成型NADHオキシダーゼを利用する方法。

- [11] NAD⁺を補酵素とする立体選択的脱水素酵素と組み合わせて使用し得る、酸化的条件下で安定である水生成型NADHオキシダーゼ。
- [12] NAD⁺を補酵素とする脱水素反応に伴って生ずるNADHをNAD⁺に再変換する補酵素再生機能を有し、かつ、酵素保護剤なしで用いられることを特徴とする補酵素再生系用の水生成型NADHオキシダーゼ。
- [13] NAD⁺を補酵素とする立体選択的脱水素酵素の遺伝子と、酸化的条件下で安定である水生成型NADHオキシダーゼの遺伝子とを含むベクター。
- [14] NAD⁺を補酵素とする立体選択的脱水素酵素の遺伝子と、酸化的条件下で安定である水生成型NADHオキシダーゼの遺伝子とを含むベクターによって形質転換された形質転換体微生物。
- [15] NAD⁺を補酵素とする立体選択的脱水素酵素と、酸化的条件下で安定である水生成型NADHオキシダーゼとを含む組成物。

[図1]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/014007

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P41/00 (2006.01)

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 C12P41/00

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/MEDLINE/WPIDS (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,
 SwissProt/PIR/Geneseq, JSTPlus (JOIS), PubMed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Hummel W. et al., "An efficient and selective enzymatic oxidation system for the synthesis of enantiomerically pure D-tert-leucine.", (2003), Vol.5, No.20, pages 3649 to 3650	1-10
Y	WO 2001-005886 A1 (KANEKA Corp.), 25 January, 2001 (25.01.01), & EP 2001-116795 A1	1-10
Y	HIGUCHI M. et al., "Identification of two distinct NADH oxidases corresponding to H ₂ O ₂ -forming oxidase and H ₂ O-forming oxidase induced in Streptococcus mutans.", (1993), Vol.139, No.10, pages 2343 to 2351	2,3,6,7



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

14 October, 2005 (14.10.05)

Date of mailing of the international search report

01 November, 2005 (01.11.05)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/014007

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 8-196281 A (Nippon Paint Co., Ltd.), 06 August, 1996 (06.08.96), (Family: none)	2-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/014007

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The feature common to claims 1-10 is in short "a process of using a water-formation type NADH oxidase stable under oxidative conditions", while the feature common to claims 11-15 is "a water-formation type NADH oxidase stable under oxidative conditions". Thus, the feature common to a group of inventions of claims 1-10 and a group of inventions of claims 11-15 is "a water-formation type NADH oxidase stable under oxidative conditions". This oxidase includes one consisting of a protein having an amino acid sequence of sequence No. 1, and this oxidase is one publicly known at the time of filing of this application (see JP 08-196281 A). Thus, "a water-formation type NADH oxidase stable under
(continued to extra sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-10

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee..
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/014007

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

oxidative conditions" which is the main feature of both groups of inventions is a matter publicly known at the time of filing of this application, and is therefore not considered as a matter related to the novel constitution dealing with the problem to be solved. Consequently, there is no technical relationship between a group of inventions of claims 1-10 and a group of inventions of claims 11-15 involving one or more of the corresponding special technical features. Thus, the claim includes two inventions, i.e., a group of inventions of claims 1-10 and a group of inventions of claims 11-15.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ **C12P41/00** (2006.01)

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 C12P41/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2005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/MEDLINE/WPIDS (STN)、GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq、SwissProt/PIR/Geneseq、JSTPlus (JOIS)、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
Y	Hummel W. et al., "An efficient and selective enzymatic oxidation system for the synthesis of enantiomerically pure D-tert-leucine.", (2003), vol.5, no.20, p.3649-3650	1-10
Y	WO 2001-005886 A1 (鐘淵化学工業株式会社) 2001.01.25 & EP 2001-116795 A1	1-10
Y	Higuchi M. et al., "Identification of two distinct NADH oxidases corresponding to H ₂ O ₂ -forming oxidase and H ₂ O-forming oxidase	2, 3, 6, 7

☒ 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

14.10.2005

国際調査報告の発送日

01.11.2005

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)

斎藤 真由美

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

4B

3539

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
Y	induced in Streptococcus mutans.", (1993), vol.139, no.10, p.2343-2351 JP 8-196281 A (日本ペイント株式会社) 1996.08.06 ファミリーな し	2-7

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

請求の範囲をみると、請求の範囲に記載された請求項1-10に記載のそれぞれに関連した発明に共通する事項は、要するに「酸化的条件下で安定である水生成型NADHオキシダーゼを利用する方法」である。一方、請求項11-15に記載の発明に共通する事項は、「酸化的条件下で安定である水生成型NADHオキシダーゼ」である。ここで、請求項1-10に係る発明群と請求項11-15に係る発明群に共通する事項は、「酸化的条件下で安定である水生成型NADHオキシダーゼ」である。この酵素自体としては、「配列番号1に示すアミノ酸配列よりなるタンパク質である水生成型NADHオキシダーゼ」が含まれるが、該酵素は本願出願当時すでに公知である（特開平8-196281号公報）。そうすると、両発明群に記載する事項の主要部の「酸化的条件下で安定である水生成型NADHオキシダーゼ」が本願出願当時公知であるため、解決しようとする課題に対応した新規な構成に係る事項とは認められない。したがって、請求項11-15は、請求項1-10に係る発明との間に対応する「特別な技術的特徴」を含んでいるとは認められない。よって、請求の範囲には、請求項1-10に記載された発明と、同11-15に記載された発明の2発明が包含されている。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

1-10

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付を伴う異議申立てがなかった。