

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2006 年 12 月 7 日 (07.12.2006)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2006/129628 A1

- (51) 国際特許分類:
C12P 7/24 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2006/310715
- (22) 国際出願日: 2006 年 5 月 30 日 (30.05.2006)
- (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2005-158393 2005 年 5 月 31 日 (31.05.2005) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社カネカ (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 (米国についてのみ): 吉田 崇 (YOSHIDA, Takashi) [JP/JP]; 〒6768688 兵庫県高砂市高砂町宮前町 1-8 株式会社カネカ内 Hyogo (JP). 田岡 直明 (TAOKA, Naoaki) [JP/JP]; 〒6768688 兵庫県高砂市高砂町宮前町 1-8 株式会社カネカ内 Hyogo (JP).
- (74) 共通の代表者: 株式会社カネカ (KANEKA CORPORATION); 〒5308288 大阪府大阪市北区中之島 3 丁目 2 番 4 号 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, 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, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, 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 OPTICALLY ACTIVE 2-SUBSTITUTED PROPANAL DERIVATIVE

(54) 発明の名称: 光学活性 2-置換プロパナル誘導体の製造法

(57) Abstract: Provided is a process for producing an optically active 2-substituted propanal derivative, more specifically a process for producing an optically active 2-substituted propanal derivative by stereoselectively reducing a carbon-carbon double bond in a 2-substituted acrolein derivative with an enzyme source capable of stereoselectively reducing the carbon-carbon double bond stereoselectively. The process can produce an optically active 2-substituted propanal derivative which is useful as an intermediate for a pharmaceutical, sweetening agent or the like, particularly an optically active 2-alkylpropanal derivative, from an inexpensive, readily available starting material in a simple manner.

(57) 要約: 本発明は、光学活性 2-置換プロパナル誘導体の製造方法、より詳細には、2-置換アクロレイン誘導体の炭素-炭素二重結合を、その炭素-炭素二重結合を立体選択的に還元する能力を有する酵素源を用いて立体選択的に還元することにより、光学活性 2-置換プロパナル誘導体を製造する方法に関する。本発明によれば、医薬品や甘味料等の中間体として有用な光学活性 2-置換プロパナル誘導体、とりわけ光学活性 2-アルキルプロパナル誘導体を、安価で入手容易な原料から簡便な方法で製造することができる。

WO 2006/129628 A1

明 細 書

光学活性2－置換プロパナール誘導体の製造法

技術分野

- [0001] 本発明は、医薬品または甘味料等の中間体として有用な、光学活性2－置換プロパナール誘導体、中でも光学活性2－アルキルプロパナール誘導体の製法に関する。より詳細には、安価に入手可能な2－置換アクロレイン誘導体を、その炭素－炭素二重結合を立体選択的に還元する能力を有する酵素源を用いて立体選択的に還元することを特徴とする、光学活性2－置換プロパナール誘導体、中でも光学活性2－アルキルプロパナール誘導体の製法に関する。

関連出願の相互参照

- [0002] 日本国特許2005－158393号(2005年5月31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] 光学活性2－置換プロパナール誘導体の製造法として、以下の様な方法が知られている。
- 1) プロリン誘導体を不斉補助基として用い、プロパナールを不斉アルキル化することにより、光学純度94%eeの(R)－2－メチルペンタナールを合成する方法(非特許文献1)。
 - 2) ベアウベリア・スルフレセンス(*Beauveria Sulfurescens*)を用いて2－メチルー2－ペンタナールを微生物還元して光学活性2－メチルー1－ペンタノールを取得し、これを酸化して光学活性2－メチルペンタナールを合成する方法(非特許文献2)。

非特許文献1: New Journal of Chemistry, 24(12), 973-975 (2000)

非特許文献2: Tetrahedron, 37(22), 3825-3829 (1981)

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0004] 上記1)の方法では、不斉アルキル化反応に高価な不斉補助基が必要である。上

記2)の方法では、副生物である2-メチル-2-ペンテン-1-オールが多量に生成する。

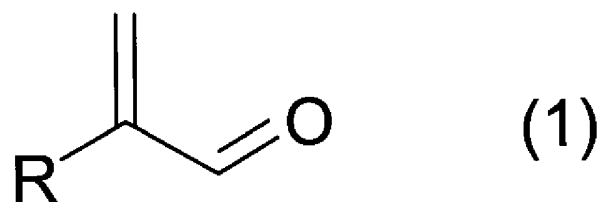
[0005] 上記に鑑み、本発明の目的は、医薬品や甘味料等の中間体として有用な光学活性2-置換プロパナール誘導体、中でも光学活性2-アルキルプロパナール誘導体を安価で入手容易な原料から簡便に製造する方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明者等は上記課題につき鋭意検討を行った結果、安価に入手可能な2-置換アクロレイン誘導体を、その炭素-炭素二重結合を立体選択的に還元する能力を有する酵素源を用いて立体選択的に還元することにより、光学活性2-置換プロパナール誘導体を簡便に製造する方法を見出した。

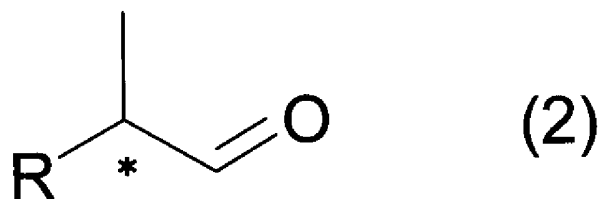
[0007] 即ち、本発明の特徴の1つは、一般式(1)：

[0008] [化3]



[0009] (式中、Rは置換基を有するメチル基、置換基を有しても良い炭素数2～10のアルキル基、又は置換基を有しても良い炭素数5～15のアラルキル基を表す。)で表される2-置換アクロレイン誘導体に、当該2-置換アクロレイン誘導体(1)の炭素-炭素二重結合を立体選択的に還元する能力を有する酵素源を作用させることを特徴とする、一般式(2)：

[0010] [化4]



[0011] (式中、Rは前記と同じ。＊は不斉炭素を表す。)で表される光学活性2-置換プロパナール誘導体の製造法を提供する。

[0012] 本発明のその他の特徴およびそれらの効果は、以下の実施形態および図面によって明らかにされる。

発明の効果

[0013] 本発明の上記方法により、医薬品や甘味料等の中間体として有用な光学活性2-置換プロパナール誘導体を安価な原料から簡便に製造することができる。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]図1は、組換えベクターpTSYE2G1の作製法及び構造を示す概略図である。

発明を実施するための最良の形態

[0015] 1. 2-置換アクロレイン誘導体(出発物質)

まず、本発明の実施形態に関わる化合物について説明する。本発明の実施形態としての製造方法における出発物質は、前記式(1)で表される2-置換アクロレイン化合物である。前記式(1)における置換基Rとしては、置換基を有するメチル基、置換基を有していても良い炭素数2～10のアルキル基、又は置換基を有していても良い炭素数5～15のアラルキル基が挙げられる。

[0016] 置換基を有する場合の置換基としては、酵素源による反応に悪影響を及ぼさない限り特に制限されず、例えばハロゲン原子、ヒドロキシル基、アルデヒド基、カルボキシル基、シアノ基、アミノ基またはニトロ基等の置換基が挙げられる。

[0017] 例えば、置換基を有するメチル基としては、クロロメチル基、ブロムメチル基、ヨードメチル基、ヒドロキシメチル基、アミノメチル基、又はシアノメチル基等が挙げられる。

[0018] 置換基を有していても良い炭素数2～10のアルキル基としては、置換又は無置換のエチル基、n-プロピル基、iso-プロピル基、n-ブチル基、sec-ブチル基、tert-ブチル基、n-ペンチル基、又はn-ヘキシル基等が挙げられる。置換基を有する場合の置換基としては、ハロゲン原子、水酸基、アミノ基、シアノ基等が挙げられるが、本発明の還元反応に悪影響を及ぼさない限りこれらに限定されるものではない。

[0019] 置換基を有していても良い炭素数5～15のアラルキル基としては、ベンジル基、o-クロロベンジル基、m-ブロモベンジル基、p-フルオロベンジル基、p-ニトロベンジル

基、p-シアノベンジル基、m-メトキシベンジル基、フェネチル基、ナフチルメチル基、又はピリジルメチル基等が挙げられる。

[0020] 上記のなかでもRとして好ましくは、置換基を有しても良い炭素数2～10のアルキル基であり、より好ましくは置換基を有しても良い炭素数2～4のアルキル基であり、更に好ましくはエチル基、n-プロピル基またはn-ブチル基であり、最も好ましくはn-ブチル基である。

[0021] 前記式(1)で表される化合物は、工業的に入手可能、あるいは工業的に入手可能な原料から容易に合成することができる。例えば、2-ブチルアクロレインは、n-ヘキサナール、ジメチルアミン塩酸塩、及び37%ホルマリン溶液の混合物を、70℃で24時間攪拌することにより容易に合成することができる(Journal of chemical research, Synopses 7, 262-3 (1978)参照)。

[0022] 2. 光学活性2-置換プロパナール誘導体(生成物)

実施形態としての製造方法における生成物は、前記式(2)で表される光学活性2-置換プロパナール誘導体である。前記式(2)において、Rは前記式(1)の場合と同じであり、*は不斉炭素を表す。

[0023] 3. 光学活性2-置換プロパナール誘導体の製造法

次に、本発明の実施形態としての光学活性2-置換プロパナール誘導体の製造法について説明する。

[0024] 実施形態においては、前記式(1)で表される2-置換アクロレイン誘導体の炭素-炭素二重結合を立体選択的に還元する活性を有する酵素源の存在下、当該2-置換アクロレイン誘導体(1)の二重結合を立体選択的に還元することにより、前記式(2)で表される光学活性2-置換プロパナール誘導体を製造する。

[0025] 4. 酵素源

ここで、「酵素源」とは、上記還元活性を有する酵素自体はもちろんのこと、上記還元活性を有する微生物の培養物およびその処理物も含まれる。「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、また、その処理物であってもよい。「その処理物」とは、例えば、粗抽出液、凍結乾燥菌体、アセトン乾燥菌体、またはそれら菌体の破砕物等を意味する。さらに上記酵素源は、公知の手段で固定化して

、固定化酵素又は固定化菌体として用いることもできる。固定化は、当業者に周知の方法(例えば架橋法、物理的吸着法、包括法等)で行うことができる。

- [0026] 実施形態において、前記式(1)で表される化合物の炭素－炭素二重結合を立体選択的に還元する活性を有する酵素源としては、キャンディダ(Candida)属、クルイベロマイセス(Kluyveromyces)属、ピキア(Pichia)属、ロドトルラ(Rhodotorula)属、サッカロマイセス(Saccharomyces)属、スポリディオボルス(Sporidiobolus)属、スポロボロマイセス(Spolobolomyces)属、トリゴノプシス(Trigonopsis)属、チゴサッカロマイセス(Zygosaccharomyces)属、アクロモバクター(Achromobacter)属、アシディフィリウム(Acidiphilium)属、アルカリゲネス(Alcaligenes)属、アースロバクター(Arthrobacter)属、バシラス(Bacillus)属、コリネバクテリウム(Corynebacterium)属、エシェリヒア(Escherichia)属、マイクロコッカス(Micrococcus)属、シュードモナス(Pseudomonas)属、パエニバシラス(Paenibacillus)属、またはザントモナス(Xanthomonas)属に属する微生物由来の酵素源が挙げられる。

- [0027] 4－1. 酵素源(R選択的に還元する活性を有する酵素源の例)

上記酵素源のうち、前記式(1)で表される化合物の炭素－炭素二重結合をR選択的に還元する活性を有する酵素源としては、キャンディダ・カンタレリ(Candida cantarellii)、キャンディダ・エチェルシー(Candida etchellsii)、キャンディダ・ケフィル(Candida kefyr)、キャンディダ・ムサエ(Candida musae)、キャンディダ・ニトラトフィラ(Candida nitratophila)、キャンディダ・サケ(Candida sake)、キャンディダ・ステラータ(Candida stellata)、キャンディダ・ジラノイデス(Candida zeylanoides)、クライベロマイセス・ラクティス・バー・ドロソフィラルム(Kluyveromyces lactis var. drosophilum)、ピキア・メンブранаエファシエンス(Pichia membranaefaciens)、ピキア・ヒーディー(Pichia heedii)、ロドトルラ・ミヌタ(Rhodotorula minuta) サッカロマイセス・ユニスポラス(Saccharomyces unisporus)、サッカロマイセス・バヤナス(Saccharomyces bayanus) サッカロマイセス・セルビジエ(Saccharomyces cerevisiae)、サッカロマイセス・カステリ(Saccharomyces castellii)、サッカロマイセス・パストリアヌス(Saccharomyces pastorianus)、スポリディオボルス・ジョンソニー(Sporidiobolus johnsonii)、スポリディオボルス・サルモニコラ(Sporidiobolus salmonicolor)、スポロボロマイセス・サルモニコラ(Spolobolomyces salmoni

color)、トリゴノプシス・バリアビリス(Trigonopsis variabilis)、チゴサッカロマイセス・バ
イリー(Zygosaccharomyces bailii)、アースロバクター・ニコチアーネ(Arthrobacter nic
otianae)、アシディフィリウム・クリプタム(Acidiphilium cryptum)、バシラス・セレウス(B
acillus cereus)、バシラス・コアグランス(Bacillus coagulans)、バシラス・リヘニホルミス
(Bacillus licheniformis)、バシラス・プミラス(Bacillus pumilus)、バシラス・バディウス(Ba
cillus badius)、バシラス・ファエリクス(Bacillus sphaericus)、マイクロコッカス・ルテウス(
Micrococcus luteus)、シュードモナス・シュツツエリ(Pseudomonas stutzeri)、シュード
モナス・フラギ(Pseudomonas fragi)、シュードモナス・プチダ(Pseudomonas putida)、
パエニバシラス・アルベイ(Paenibacillus alvei) 又はザントモナス・スピーシーズ(Xanth
omonas sp.)等の微生物由来の酵素源が好ましい。

[0028] 4-2. 酵素源(S選択的に還元する活性を有する酵素源の例)

また、前記式(1)で表される化合物の炭素-炭素二重結合をS選択的に還元する
活性を有する酵素源としては、アクロモバクター・キシロキダンス・サブスピーシーズ・
デニトリフィカンス(Achromobacter xylosoxidans subsp. denitrificans)、アルカリゲネス
・フェカリス(Alcaligenes faecalis)、アルカリゲネス・スピーシーズ(Alcaligenes sp.)、ア
ースロバクター・クリスタロポエテス(Arthrobacter crystallopoietes)、アースロバクター
・プロトフォロマイス(Arthrobacter protophormise)、コリネバクテリウム・アンモニアゲ
ネス(Corynebacterium ammoniagenes) 又はエシェリヒア・コリ(Escherichia coli)等の
微生物由来の酵素源が好ましい。

[0029] 5. 微生物

また、上記還元酵素の由来となる微生物としては、野生株または変異株のいずれで
もよい。あるいは細胞融合または遺伝子操作等の遺伝学的手法により誘導される微
生物も用いることができる。

[0030] さらにこれら微生物由来の還元酵素を生産する能力を有する組換え微生物であ
ってもよい。該酵素を生産する組換え微生物は、例えば、これらの酵素を単離及び
／または精製して酵素のアミノ酸配列の一部または全部を決定する工程、このアミ
ノ酸配列に基づいて酵素をコードするDNA配列を得る工程、このDNAを他の微生物
に導入して組換え微生物を得る工程、及びこの組換え微生物を培養して、本酵素を

得る工程を含有する方法により得ることができる(国際公開第WO98/35025号公報に記載の方法参照)。

- [0031] 上記のような組換え微生物としては、上記還元酵素をコードするDNAを有するベクターで宿主微生物を形質転換して得られる形質転換微生物が挙げられる。また、宿主微生物としては大腸菌 (*Escherichia coli*) が好ましい。より好ましくは、上記サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 由来のNADPHデヒドロゲナーゼ (Old Yellow Enzyme 2) 遺伝子 (The Journal of Biological chemistry, 268, 6097-6106 (1993)参照) を有するベクターで形質転換された *Escherichia coli* HB101 (pTSYE2) 等が挙げられる。この *Escherichia coli* HB101(pTSYE2) の取得方法は、後述の実施例7に記載した。
- [0032] また、上記酵素源として、国際生化学・分子生物学連合の酵素分類法によりEC 1.6.99に分類される酸化還元酵素を用いることもできる。EC 1.6.99に分類される酸化還元酵素としては、EC 1.6.99.1:NADPHデヒドロゲナーゼ、EC 1.6.99.2:NAD(P)Hデヒドロゲナーゼ(キノン)、EC 1.6.99.3:NADHデヒドロゲナーゼ、EC 1.6.99.5:NADHデヒドロゲナーゼ(キノン)、またはEC 1.6.99.6:NADPHデヒドロゲナーゼ(キノン)に分類される酵素が挙げられ、なかでもEC 1.6.99.1に分類されるNADPHデヒドロゲナーゼ(別名:Old Yellow Enzyme)が好ましい。
- [0033] NADPHデヒドロゲナーゼとしては、カンディダ (*Candida*) 属、クルイベロマイセス (*Kluyveromyces*) 属、サッカロマイセス (*Saccharomyces*) 属、又はシズサッカロマイセス (*Schizosaccharomyces*) 属等の酵母に広く分布していることが報告されており、とりわけ、サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 由来のNADPHデヒドロゲナーゼ (Old Yellow Enzyme 2) が好ましい。
- [0034] 酵素源として用いる微生物のための培養培地は、その微生物が増殖し得るものである限り特に限定されない。例えば、炭素源として、グルコース、シュクロース等の糖質、エタノール、グリセロール等のアルコール類、オレイン酸、ステアリン酸等の脂肪酸及びそのエステル類、菜種油、大豆油等の油類、窒素源として、硫酸アンモニウム、硝酸ナトリウム、ペプトン、カザミノ酸、コーンスティープリカー、ふすま、酵母エキスなど、無機塩類として、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、炭酸カルシウム、磷酸1

水素カリウム、磷酸2水素カリウムなど、他の栄養源として、麦芽エキス、肉エキス等を含有する通常の液体培地が使用することができる。培養は好氣的に行い、通常、培養時間は1～5日間程度、培地のpHが3～9、培養温度は10～50℃で行うことができる。

[0035] 6. 還元反応

実施形態において、前記式(1)で表される化合物の炭素－炭素二重結合の還元反応は、適当な溶媒に、基質となる前記式(1)で表される2－置換アクロレイン誘導体、補酵素NAD(P)H及び前記微生物の培養物またはその処理物等を添加し、pH調整下攪拌することにより行うことができる。

[0036] 上記還元反応条件は用いる酵素、微生物またはその処理物、基質濃度等によって異なるが、通常、基質濃度は約0.1～100重量%、好ましくは1～60重量%であり、補酵素NAD(P)Hは基質に対して0.0001～100モル%、好ましくは0.0001～0.1モル%、反応温度は10～60℃、好ましくは20～50℃であり、反応のpHは4～9、好ましくは5～8であり、反応時間は1～120時間、好ましくは1～72時間で行うことができる。また、反応には有機系の溶媒を混合して用いてもよい。有機系溶媒としては、例えば、トルエン、酢酸エチル、酢酸n-ブチル、ヘキサン、イソプロパノール、メタノール、ジイソプロピルエーテル、アセトン、ジメチルスルホキシド等が挙げられる。

[0037] 基質は一括または連続的に添加することができる。また、反応はバッチ方式または連続方式で行うことができる。

[0038] 7. 還元反応(補酵素再生系を用いる例)

実施形態の還元工程において、一般に用いられる補酵素NAD(P)H再生系を組み合わせて用いてもよい。これにより、高価な補酵素の使用量を大幅に減少させることができる。代表的なNAD(P)H再生系としては、例えば、グルコース脱水素酵素及びグルコースを用いる方法が挙げられる。

[0039] 還元酵素遺伝子及びこの酵素が依存する補酵素を再生する能力を有する酵素(例えばグルコース脱水素酵素)の遺伝子を同一宿主微生物内に導入した形質転換微生物、すなわち、実施形態の還元酵素をコードするDNA及び該酵素が依存する補酵素を再生する能力を有する酵素(例えばグルコース脱水素酵素)の遺伝子を同一

宿主微生物内に導入した形質転換微生物の培養物またはその処理物等を用いて、上記と同様の反応を行えば、別途に補酵素の再生に必要な酵素源を調整する必要がないため、より低コストで光学活性2-置換プロパナール誘導体を製造することができる。

[0040] 上記のような形質転換微生物としては、上記還元酵素をコードするDNA及び該酵素が依存する補酵素を再生する能力を有する酵素をコードするDNAの両者を有するプラスミドで形質転換された形質転換微生物が挙げられる。ここで、補酵素を再生する能力を有する酵素としては、グルコース脱水素酵素が好ましく、バシラス・メガテリウム (*Bacillus megaterium*) 由来のグルコース脱水素酵素がより好ましい。また、宿主微生物としては大腸菌 (*Escherichia coli*) が好ましい。そのような好ましい形質転換微生物として、後述の実施例で説明する *Escherichia coli* HB101 (pTSYE2G1) が挙げられる。

[0041] 形質転換微生物の培養は、それらが増殖する限り、通常の、炭素源、窒素源、無機塩類、有機栄養素などを含む液体栄養培地を用いて実施できる。

[0042] また、形質転換微生物中の補酵素再生能を有する酵素の活性は、常法により測定することができる。例えば、グルコース脱水素酵素の活性は、1Mのトリス塩酸緩衝液 (pH8.0) に、100mMのグルコース、2mMの補酵素NADPまたはNAD、および酵素を添加し、25℃で1分間反応させた際の、波長340nmにおける吸光度の増加速度から算出できる。

[0043] なお、本発明の還元工程を、補酵素再生系と組み合わせて実施する、または、酵素源として上記形質転換微生物の培養物もしくはその処理物を用いる場合は、補酵素として、より安価な酸化型のNAD(P)を添加して反応を行うことも可能である。

[0044] 8. 光学活性2-置換プロパナール誘導体の精製

還元反応で生じた光学活性2-置換プロパナール誘導体の精製方法は特に限定されないが、反応液から直接あるいは菌体等を分離後、酢酸エチル、トルエン、*t*-ブチルメチルエーテル、ヘキサン、塩化メチレン等の有機溶媒で抽出し、脱水後、濃縮した後、蒸留、クロマトグラフィー等の処理を行うことにより精製することができる。反応液から菌体を分離する場合は、遠心分離や濾過等の常法で行うことができる。

[0045] 9. その他の誘導体への変換

上述の方法により前記式(2)で表される光学活性2-置換プロパノール誘導体を得た後、当該化合物のアルデヒド基を酸化すると、光学活性2-置換プロピオン酸誘導体を製造することができる。また、前記式(2)の化合物のアルデヒド基を還元すると光学活性2-置換プロパノール誘導体を製造することもできる。

[0046] アルデヒド基の酸化方法としては、過マンガン酸カリウム(KMnO_4)、クロム酸(CrO_3)、硝酸等を用いる化学的手法やアルデヒドデヒドロゲナーゼ等を用いる酵素的手法が挙げられ、いずれの方法を用いても良い。

[0047] また、アルデヒド基の還元方法としては、水素化リチウムアルミニウム(LiAlH_4)、ホウ水素化ナトリウム(NaBH_4)等の金属水素化物を用いる化学的手法やアルデヒドリダクターゼ等を用いる酵素的手法が挙げられ、いずれの方法を用いても良い。

実施例

[0048] 以下に実施例を挙げ、本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

[0049] (実施例1) 光学活性2-メチル-1-ヘキサノールの製造法

グルコース5%、ペプトン1%、酵母エキス1%からなる液体培地(pH6.5)を調製し、500ml容坂口フラスコに50mlずつ分注して、120℃で20分間蒸気滅菌した。これらの液体培地に表1に示した微生物をそれぞれ1白金耳植菌し、30℃で2～3日間振盪培養した。この培養液から遠心分離により菌体を集め、菌体を水洗し、氷冷アセトンを添加した後、減圧乾燥することによりアセトン乾燥菌体を調製した。栓付試験管に、アセトン乾燥菌体5mgを量り取り、100mMリン酸緩衝液(pH6.5) 500 μl に懸濁させた。この溶液に、グルコース25mg、NAD及びNADP各0.5mg、グルコース脱水素酵素(天野エンザイム社製) 5Uを加えた。その後、基質2-ブチルアクロレイン2mgを酢酸エチル500 μl に溶解させて栓付試験管に加え、30℃で20時間攪拌した。反応後、反応液を遠心分離し、酢酸エチル層中の基質及び生成物をトリフルオロアセチル誘導体化してガスクロマトグラフィー(GC)により分析することで、反応変換率、及び、生成物の光学純度を求めた。その結果を表1に示す(反応変換率は10～100%)。

[0050] 分析条件、反応変換率及び光学純度の計算方法は以下の通りである。

[GC分析条件]

キャピラリーカラム:Cyclodex- β ϕ 0.25mm I. D. $\times$ 60m (J&W Scientific 社製)

キャリアーガス:He 300kPa

検出器:FID、

カラム温度:45°C

検出時間:(R)-2-メチル-1-ヘキサナール 49.9分、(S)-2-メチル-1-ヘキサナール 51.5分、2-ブチルアクロレイン 44.6分

反応変換率(%) = 生成物量 / (基質量 + 生成物量) $\times$ 100

光学純度(%ee) = (A - B) / (A + B) $\times$ 100 (A及びBは対応する鏡像異性体量を表し、A > Bである)

[0051] [表1]

微生物		反応変換率 (%)	光学純度 (%ee)	立体配置
<i>Candida cantarellii</i>	NBRC 1261	40.2	96.7	R
<i>Candida etchellsii</i>	NBRC 1229	18.2	95.9	R
<i>Candida kefyr</i>	NBRC 0706	27.9	97.3	R
<i>Candida musae</i>	NBRC 1582	36.7	73.4	R
<i>Candida nitratophila</i>	NBRC 10004	37.6	90.2	R
<i>Candida sake</i>	CBS 5093	32.1	92.2	R
<i>Candida stellata</i>	NBRC 0701	14.8	89.9	R
<i>Candida zeylanoides</i>	NBRC 0738	27.2	93.1	R
<i>Kluyveromyces lactis</i> var. <i>drosophilae</i>	NBRC 1012	18.8	97.0	R
<i>Pichia membranaefaciens</i>	IAM 4258	16.9	91.8	R
<i>Pichia canadensis</i>	NBRC 0976	18.4	95.0	R
<i>Pichia heedii</i>	NBRC 10019	48.8	92.6	R
<i>Rhodotorula minuta</i>	NBRC 0387	46.7	95.3	R
<i>Saccharomyces unisporus</i>	NBRC 0215	23.8	95.8	R
<i>Saccharomyces bayanus</i>	NBRC 0213	20.1	91.4	R
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ATCC26108	48.2	92.4	R
<i>Saccharomyces pastorianus</i>	NBRC 1265	35.9	96.9	R
<i>Saccharomyces castellii</i>	NBRC 0285	27.3	94.3	R
<i>Sporidiobolus johnsonii</i>	NBRC 6903	39.8	69.1	R
<i>Sporidiobolus salmonicolor</i>	NBRC 1035	16.5	74.8	R
<i>Sporobolomyces salmonicolor</i>	IAM 12249	20.2	84.0	R
<i>Trigonopsis variabilis</i>	NBRC 0671	15.1	81.9	R
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	NBRC 0488	23.8	93.9	R

[0052] (実施例2) 光学活性2-メチル-1-ヘキサナールの製造法

肉エキス1%、ペプトン1%、酵母エキス0.5%、塩化ナトリウム1%からなる液体培地(pH6.5)を調製し、大型試験管に5mlずつ分注して、120°Cで20分間蒸気滅菌した。これらの液体培地に表2に示した微生物をそれぞれ1白金耳植菌し、30°Cで2～3日間振盪培養した。この培養液から遠心分離により菌体を集め、100mMリン酸緩衝液(pH6.5)1mlで洗浄し、同緩衝液500 μ lに再懸濁させ、栓付試験管に移し

た。この溶液に、グルコース25mg、NAD及びNADP各0.5mg、グルコース脱水素酵素(天野エンザイム社製)5Uを加えた。その後、基質2-ブチルアクロレイン2mgを酢酸エチル500 μ lに溶解させて栓付試験管に加え、30℃で20時間攪拌した。反応後、反応液を遠心分離し、酢酸エチル層中の基質及び生成物量を実施例1と同様の方法で分析することにより、反応変換率、及び、生成物の光学純度を求めた。その結果を表2に示す(反応変換率は10~100%)。

[0053] [表2]

微生物		反応変換率 (%)	光学純度 (%ee)	立体配置
<i>Arthrobacter nicotianae</i>	NBRC 14234	45.2	42.9	R
<i>Acidiphilium cryptum</i>	NBRC 14242	44.8	45.7	R
<i>Bacillus cereus</i>	NBRC 3466	21.9	84.3	R
<i>Bacillus coagulans</i>	NBRC 3886	19.0	95.7	R
<i>Bacillus licheniformis</i>	IAM 11054	16.2	83.1	R
<i>Bacillus pumilus</i>	NBRC 12086	18.3	94.7	R
<i>Bacillus badius</i>	ATCC 14574	29.1	88.7	R
<i>Bacillus sphaericus</i>	NBRC 3525	73.3	90.7	R
<i>Micrococcus luteus</i>	NBRC 13867	47.8	66.6	R
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	NBRC 13596	30.2	55.4	R
<i>Pseudomonas fragi</i>	NBRC 3458	47.2	65.0	R
<i>Pseudomonas putida</i>	NBRC 14164	24.7	13.3	R
<i>Paenibacillus alvei</i>	NBRC 3343	35.7	89.7	R
<i>Xanthomonas</i> sp.	NBRC 3084	65.0	86.1	R
<i>Xanthomonas</i> sp.	NBRC 3085	52.2	86.0	R
<i>Achromobacter xylosoxidans</i> subsp. <i>denitrificans</i>	NBRC 15125	11.5	33.5	S
<i>Alcaligenes faecalis</i>	NBRC 13111	15.7	63.2	S
<i>Alcaligenes</i> sp.	NBRC 14130	10.5	29.9	S
<i>Arthrobacter crystallopoietes</i>	NBRC 14235	12.9	54.0	S
<i>Arthrobacter protophormiae</i>	NBRC 12128	16.8	25.2	S
<i>Corynebacterium ammoniagenes</i>	NBRC 12072	14.4	65.0	S
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 11303	55.1	78.3	S

[0054] (実施例3) 光学活性2-メチル-1-アルキルプロパナールの製造法

栓付試験管に、実施例1で調製したアセトン乾燥菌体5mg、又は実施例2で調製した培養液から分離した菌体を、100mMリン酸緩衝液(pH6.5) 500 μ lに懸濁させた。この溶液に、グルコース25mg、NAD及びNADP各0.5mg、グルコース脱水素酵素(天野エンザイム社製)5Uを加えた。その後、表3に示す各基質2mgを酢酸エチル500 μ lに溶解させて栓付試験管に加え、30℃で20時間攪拌した。反応後、反応液を遠心分離し、酢酸エチル層中の基質及び生成物量をガスクロマトグラフィー(GC)により分析することで、反応変換率、及び、生成物の光学純度を求めた。その結果を表3に示す。

[0055] 分析条件は以下の通りである。

[GC分析条件(2-メチルブタナール:基質及び生成物をトリフルオロアセチル誘導体化)]

キャピラリーカラム:Cyclodex- β ϕ 0.25mm I. D. $\times$ 60m(J&W Scientific

社製)

キャリアーガス:He 300kPa

検出器:FID

カラム温度:40°C

検出時間:(R)-2-メチル-1-ブタナール 16.7分、(S)-2-メチル-1-ブタナール 17.0分、2-エチルアクロレイン 15.0分

[GC分析条件(2-メチルオクタナール)]

キャピラリーカラム:TC-WAX ϕ 0.25mm I. D. $\times$ 15m (GLサイエンス社製)

キャリアーガス:He 80kPa

検出器:FID

カラム温度:80°C

検出時間:2-メチル-1-オクタナール 2.8分、2-ヘキシルアクロレイン 3.6分

[0056] [表3]

微生物		2-エチルアクロレイン			2-ヘキシルアクロレイン		
		反応変換率 (%)	光学純度 (%ee)	立体配置	反応変換率 (%)	光学純度 (%ee)	立体配置
<i>Candida cantarellii</i>	NBRC 1261	40.8	93.5	R	83.7	-	-
<i>Candida etchellsii</i>	NBRC 1229	13.3	89.7	R	26.2	-	-
<i>Candida kefyr</i>	NBRC 0706	25.2	93.2	R	39.5	-	-
<i>Kluyveromyces lactis</i> var. <i>drosophilae</i>	NBRC 1012	17.6	93.0	R	25.6	-	-
<i>Pichia canadensis</i>	NBRC 0976	15.4	91.4	R	15.7	-	-
<i>Rhodotorula minuta</i>	NBRC 0387	32.7	92.7	R	56.0	-	-
<i>Saccharomyces unisporus</i>	NBRC 0215	19.2	90.7	R	31.7	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ATCC 26108	48.2	92.4	R	52.8	-	-
<i>Saccharomyces pastorianus</i>	NBRC 1265	28.7	94.1	R	44.4	-	-
<i>Bacillus coagulans</i>	NBRC 3886	12.3	65.9	R	6.7	-	-
<i>Bacillus pumilus</i>	NBRC 12086	49.8	97.8	R	11.9	-	-
<i>Bacillus badius</i>	ATCC 14574	13.2	85.6	R	5.8	-	-
<i>Bacillus sphaericus</i>	NBRC 3525	51.2	79.5	R	19.0	-	-
<i>Paenibacillus alvei</i>	NBRC 3343	10.0	80.4	R	91.6	-	-
<i>Xanthomonas</i> sp.	NBRC 3084	16.4	89.0	R	22.1	-	-
<i>Xanthomonas</i> sp.	NBRC 3085	14.3	90.0	R	18.0	-	-
<i>Alcaligenes faecalis</i>	NBRC 13111	0.7	40.5	S	0.5	-	-
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 11303	18.8	57.0	S	18.0	-	-

[0057] (実施例4) 光学活性2-メチル-3-フェニルプロパナールの製造法

栓付試験管に、実施例1で調製したアセトン乾燥菌体5mg、又は実施例2で調製した培養液から分離した菌体を、100mMリン酸緩衝液(pH6.5) 500 μ lに懸濁させた。この溶液に、グルコース25mg、NAD及びNADP各0.5mg、グルコース脱水素酵素(天野エンザイム社製)5Uを加えた。その後、基質2-ベンジルアクロレイン2mgを酢酸エチル500 μ lに溶解させて栓付試験管に加え、30°Cで20時間攪拌した。反応後、反応液を遠心分離し、酢酸エチル層中の基質及び生成物をトリフルオロアセチル誘導体化してガスクロマトグラフィー(GC)により分析することで、反応変換率、

及び、生成物の光学純度を求めた。その結果を表4に示す。

[0058] 分析条件は以下の通りである。

[GC分析条件]

キャピラリーカラム:Cyclodex- β ϕ 0.25mm I. D. $\times$ 60m (J&W Scientific 社製)

キャリアーガス:He 300kPa

検出器:FID

カラム温度:80°C

検出時間:(R)-2-メチル-3-フェニルプロパナール 113.9分、(S)-2-メチル-3-フェニルプロパナール 116.9分、2-ベンジルアクロレイン 96.2分

[0059] [表4]

微生物		反応変換率 (%)	光学純度 (%ee)	立体配置
<i>Candida cantarellii</i>	NBRC 1261	63.4	86.4	R
<i>Candida etchellsii</i>	NBRC 1229	22.2	43.0	R
<i>Candida kefyr</i>	NBRC 0706	33.7	85.6	R
<i>Kluyveromyces lactis</i> var. <i>drosophilae</i>	NBRC 1012	25.1	42.0	R
<i>Pichia canadensis</i>	NBRC 0976	18.0	68.0	R
<i>Rhodotorula minuta</i>	NBRC 0387	61.1	83.2	R
<i>Saccharomyces unisporus</i>	NBRC 0215	32.9	33.8	R
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ATCC 26108	61.6	94.2	R
<i>Saccharomyces pastorianus</i>	NBRC 1265	44.5	78.0	R
<i>Bacillus coagulans</i>	NBRC 3886	12.3	22.0	R
<i>Bacillus pumilus</i>	NBRC 12086	32.8	14.8	R
<i>Bacillus badius</i>	ATCC 14574	10.3	55.0	R
<i>Bacillus sphaericus</i>	NBRC 3525	39.1	67.0	R
<i>Paenibacillus alvei</i>	NBRC 3343	9.1	55.2	R
<i>Xanthomonas</i> sp.	NBRC 3084	7.4	65.3	R
<i>Xanthomonas</i> sp.	NBRC 3085	7.4	55.9	R
<i>Alcaligenes faecalis</i>	NBRC 13111	2.7	81.2	S
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 11303	57.4	70.2	S

[0060] (実施例5) サッカロマイセス・セレビジエ S288C (ATCC26108) 株由来のNADPHデヒドロゲナーゼ遺伝子 (Old Yellow Enzyme 2 遺伝子) のクローニング

サッカロマイセス・セレビジエ S288C (ATCC26108) (*Saccharomyces cerevisiae* S288C (ATCC26108)) 株由来のNADPHデヒドロゲナーゼ (Old Yellow Enzyme 2, 以後、OYE2と呼ぶ) を大腸菌で発現させるために、以下に示した方法で発現ベクターを調製した (Appl Environ Microbiol., 69, 933, (2003) 参照)。

[0061] 先ず、サッカロマイセス・セレビジエ S288C (ATCC26108) 株の染色体DNAを鋳型とした1段階目のPCRによりOYE2遺伝子を含むDNA断片を増幅した。次いで、1段階目のPCRで得られたDNA断片を鋳型とした2段階目のPCRにより、OYE2遺伝子の開始コドン部分にSacI部位を付加し、かつ終始コドンの直後に新たな終始

コドンとSalI部位を付加した二本鎖DNAを取得した。詳細を以下に示した。

- [0062] プライマー1:5' - cgtccagatatagaataaatcatcatattaag - 3' (配列表の配列番号1)と、プライマー2:5' - gaaatggtgctacaaagtacggttaacac - 3' (配列表の配列番号2)を合成した。このプライマー2種(プライマー1及び2)各50pmol、サッカロマイセス・セレビジェ S288C(ATCC26108)株の染色体DNA200ng、dNTP各10nmol、ExTaq(宝酒造社製)2.5Uを含む ExTaq用緩衝液50 μ lを調製した。熱変性(97℃、0.5分)、アニーリング(55℃、1分)、伸長反応(72℃、1分)の条件にてPCR反応を行い、4℃まで冷却後、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片の増幅を確認し、増幅断片をゲルから回収した。尚、染色体DNAは、通常のDNA単離法、例えば酢酸カリウム法等により調製した。次いで、OYE2遺伝子の開始コドン上流に大腸菌のShine-Dalgarno配列(SD配列、9ヌクレオチド)を、さらにその直前にSacI認識部位を付加したプライマー3:5' - atcgagctctaaggaggttaacaatgccatttgtaaggac - 3' (配列表の配列番号3)、及び終始コドンの直後に新たな終始コドンとSalI認識部位を付加したプライマー4:5' - acgcgtcgacttattaattttgtcccaaccg - 3' (配列表の配列番号4)を合成した。このプライマー2種(プライマー3及び4)各50pmol、先のPCR反応で増幅したDNA断片200ng、dNTP各10nmol、ExTaq(宝酒造社製)2.5Uを含む ExTaq用緩衝液50 μ lを調製し、上記と同じ条件にてPCR反応を行った。その結果、OYE2遺伝子の開始コドンから5塩基上流に大腸菌のShine-Dalgarno配列(SD配列)が、さらにその直前にSacI認識部位が付加され、かつ、終始コドンの直後に新たな終始コドンとSalI認識部位が付加された二本鎖DNAを取得した。この二本鎖DNAをSacI及びSalIで消化し、プラスミドpUCNT(国際公開第WO94/03613号公報に記載の方法で当業者が取得可能)のNdeI部位中のGをTに変換したプラスミドpUCTのlacプロモーターの下流のSacI、SalI部位に挿入することにより、組換えベクターpTSYE2を構築した。

- [0063] (実施例6)グルコース脱水素酵素遺伝子を更に含む発現ベクターの構築

プライマー5:5' - acgcgtcgactaaggaggttaacaatgtataaagatttagaagg - 3' (配列表の配列番号5)と、プライマー6:5' - gcgctgcagttatccgcgtcctgcttgga - 3' (配列表の配列番号6)を用い、プラスミドpGDK1(Eur. J. Biochem., 186, 389 (1989)参照)を鋳

型としてPCRを行い、バシラス・メガテリウム (*Bacillus megaterium*) IAM1030株由来のグルコース脱水素酵素 (以後、GDHと呼ぶ) 遺伝子の開始コドンから5塩基上流に大腸菌のShine-Dalgarno配列 (SD配列) が、さらにその直前にSalI認識部位が付加され、かつ、終止コドンの直後に新たな終始コドンとPstI認識部位が付加された二本鎖DNAを取得した。得られた二本鎖DNAをSalIおよびPstIで消化した。これを上記の組換えベクターpTSYE2のSalI認識部位とPstI認識部位の間に挿入して、組換えベクターpTSYE2G1を構築した。pTSYE2G1の作製法および構造を図1に示す。

[0064] (実施例7) 形質転換体の作製

実施例5で構築した組換えベクターpTSYE2を用いて大腸菌 (*Escherichia coli*) HB101 (宝酒造社製) を形質転換し、菌形質転換体 *Escherichia coli* HB101 (pTSYE2) を得た。また、同様に、実施例6で構築した組換えベクターpTSYE2G1を用いて大腸菌 (*Escherichia coli*) HB101 (宝酒造社製) を形質転換し、形質転換体 *Escherichia coli* HB101 (pTSYE2G1) を得た。

[0065] (実施例8) 形質転換体における遺伝子の発現

実施例7で得た2種類の形質転換体、及びベクタープラスミドpUCT (実施例5参照) のみを導入した形質転換体 *Escherichia coli* HB101 (pUCT) のそれぞれを、100 μ g/ml のアンピシリンを含む2×YT液体培地 (バクト・トリプトン1.6%、バクト・イーストエキス1.0%、塩化ナトリウム0.5%、pH7.0) に接種し、37℃で24時間振盪培養した。培養液から遠心分離により菌体を集め、100mMリン酸緩衝液 (pH6.5) に懸濁し、UH-50型超音波ホモゲナイザー (SMT社製) を用いて超音波破碎を行い、遠心分離により菌体残渣を除去して無細胞抽出液を得た。この無細胞抽出液のOYE2活性、及びGDH活性を測定したものを表5に示した。

[0066] 実施例7で得られた2種類の形質転換体のいずれにおいても、OYE2活性の発現が認められた。また、GDH遺伝子を含む形質転換体 *Escherichia coli* HB101 (pTSYE2G1) では、GDH活性の発現も認められた。

[0067] 尚、OYE2活性は、100mMリン酸緩衝液 (pH6.5) に、基質2-シクロヘキセノン 1mM、補酵素NADPH 0.2mM及び粗酵素液を添加し、30℃で1分間反応を

行い、波長340nmの吸光度の減少速度より算出した。この反応条件において、1分間に1 μ molのNADPHをNADP⁺に酸化する酵素活性を1unitと定義した。

[0068] GDH活性は、1Mトリス塩酸緩衝液(pH8. 0)に、グルコース0. 1M、補酵素NAD P2mM、および粗酵素液を添加して25℃で1分間反応を行い、波長340nmにおける吸光度の増加速度より算出した。この反応条件において、1分間に1 μ molのNADPをNADPHに還元する酵素活性を1unitと定義した。

[0069] [表5]

菌株	OYE2活性(U/ml)	GDH活性(U/ml)
<i>E. coli</i> HB101(pUCT)	0.00	0.0
<i>E. coli</i> HB101(pTSYE2)	0.30	0.0
<i>E. coli</i> HB101(pTSYE2G1)	1.20	82.0

[0070] (実施例9)形質転換体を用いた(R)-2-メチル-1-アルキルプロパナールの製造法

実施例7で得た形質転換体*Escherichia coli* HB101 (pTSYE2)を、500ml容坂口フラスコ中で滅菌した50ml2×YT培地(バクト・トリプトン1. 6%、バクト・イーストエキス1. 0%、塩化ナトリウム0. 5%、pH7. 0)に接種し、30℃で2日間振盪培養した。得られた培養液を濃縮し、UH-50型超音波ホモゲナイザー(SMT社製)を用いて超音波破碎を行い、遠心分離により菌体残渣を除去して無細胞抽出液を得た。この無細胞抽出液50 μ l、グルコース25mg、NAD及びNADP各0. 5mg、グルコース脱水素酵素(天野エンザイム社製)5Uを100mM磷酸緩衝液(pH6. 5)450 μ lに溶解させ、栓付試験管に移した。その後、表6に示す各基質2mgを酢酸エチル500 μ lに溶解させて栓付試験管に加え、30℃で2時間攪拌した。反応後、反応液を遠心分離し、酢酸エチル層中の基質及び生成物量を実施例1及び3と同様の方法で分析することにより、反応変換率、及び、生成物の光学純度を求めた。その結果を表6に示す。

[0071] [表6]

基質	反応変換率 (%)	光学純度 (%ee)
2-エチルアクロレイン	96.7	96.0
2-ブチルアクロレイン	99.7	94.5
2-ヘキシルアクロレイン	98.6	-

[0072] (実施例10)形質転換体を用いた(R)-2-メチル-3-フェニルプロパナールの製造法

実施例9と同様に調製した形質転換体 *Escherichia coli* HB101 (pTSYE2)の無細胞抽出液液50 μ l、グルコース25mg、NAD及びNADP各0.5mg、グルコース脱水素酵素(天野エンザイム社製)5Uを100mM燐酸緩衝液(pH6.5)450 μ lに溶解させ、栓付試験管に移した。その後、基質2-ベンジルアクロレイン2mgを酢酸エチル500 μ lに溶解させて栓付試験管に加え、30℃で2時間攪拌した。反応後、反応液を遠心分離し、酢酸エチル層中の基質及び生成物量を実施例4と同様の方法で分析した。その結果、反応変換率99.3%で光学純度94.7%eeの(R)-2-メチル-3-フェニルプロパナールが得られた。

[0073] (実施例11)形質転換体を用いた(R)-2-メチル-1-ヘキサナールの製造法

実施例7で得た形質転換体 *Escherichia coli* HB101 (pTSYE2G1)を、500ml容坂口フラスコ中で滅菌した50ml2×YT培地(バクト・トリプトン1.6%、バクト・イーストエキス1.0%、塩化ナトリウム0.5%、pH7.0)に接種し、30℃で2日間振盪培養した。得られた培養液を濃縮し、UH-50型超音波ホモゲナイザー(SMT社製)を用いて超音波破碎を行い、遠心分離により菌体残渣を除去して無細胞抽出液を得た。500ml4頭フラスコに上記無細胞抽出液30ml、100mM燐酸緩衝液(pH6.5)195ml、55%グルコース水溶液25ml、NADP25mgを加えた。その後、基質2-ブチルアクロレイン1gをヘキサン100mlに溶解させ、25分間かけて反応系中に滴下した。pH調整下、30℃で1時間攪拌した後、ヘキサン層中の基質及び生成物量を実施例1と同様の方法で分析した。その後、反応液を分液し、減圧下にてヘキサンを留去して、収率80%、光学純度96.3%eeの(R)-2-メチル-1-ヘキサナールを取得した。

[0074] (実施例12)形質転換体を用いた5-ヒドロキシ-2-メチル-1-ペンタナールの

製造法

実施例11と同様に調製した、形質転換体 *Escherichia coli* HB101 (pTSYE2G1) の培養液 500 μ l、55% グルコース溶液 30 μ l、NADP0. 5mg を 100mM 磷酸緩衝液 (pH 6. 5) 100 μ l と混合して栓付試験管に移した。その後、基質 2-(3-ヒドロキシプロピル) アクロレイン 10mg を加えて 2 時間攪拌した。反応後、反応液を酢酸エチルで抽出し、酢酸エチル層の基質及び生成物量を、以下に示す分析条件にて GC 分析した。その結果、反応変換率 96. 9% で 5-ヒドロキシ-2-メチル-1-ペンタナールが得られた。

[0075] 分析条件は以下の通りである。

[GC 分析条件]

キャピラリーカラム: β -DEX225 ϕ 0. 25mm I. D. $\times$ 30m (SUPELCO 社製)

キャリアーガス: He 100kPa

検出器: FID

カラム温度: 120°C

検出時間: 5-ヒドロキシ-2-メチル-1-ペンタナール 7. 1分、2-(3-ヒドロキシプロピル) アクロレイン 14. 8分

[0076] (実施例13) 形質転換体を用いた (R)-5-ベンジルオキシ-2-メチル-1-ペンタナールの製造法

実施例11と同様に調製した形質転換体 *Escherichia coli* HB101 (pTSYE2G1) の培養液 500 μ l、55% グルコース溶液 30 μ l、NADP0. 5mg を 100mM 磷酸緩衝液 (pH 6. 5) 100 μ l と混合して栓付試験管に移した。その後、基質 2-(3-ベンジルオキシプロピル) アクロレイン 10mg を加えて 2 時間攪拌した。反応後、反応液を酢酸エチルで抽出し、酢酸エチル層の基質及び生成物量を、以下に示す分析条件にて GC 分析した結果、反応変換率 99. 1% で 5-ベンジルオキシ-2-メチル-1-ペンタナールが得られた。また、5-ベンジルオキシ-2-メチル-1-ペンタナールをホウ水素化ナトリウム (NaBH_4) で還元し、以下に示す分析条件にて HPLC 分析した結果、光学純度は 90. 0% ee (R) であった。

[0077] 分析条件は以下の通りである。

[GC分析条件]

キャピラリーカラム:TC-WAX ϕ 0.25mm I. D. $\times$ 15m (GLサイエンス社製)

キャリアーガス:He 80kPa

検出器:FID

カラム温度:165°C

検出時間:5-ベンジルオキシ-2-メチル-1-ペンタナール 11.1分、2-(3-ベンジルオキシプロピル)アクロレイン 13.2分

[HPLC分析条件]

キラルカラム:OB-H ϕ 4.6mm I. D. $\times$ 250mm (ダイセル化学工業社製)

溶離液:ヘキサン/2-プロパノール 95/5

検出器:UV 254nm

カラム温度:25°C

検出時間:(S)-5-ベンジルオキシ-2-メチル-1-ペンタノール 12.2分、(R)-5-ベンジルオキシ-2-メチル-1-ペンタノール 14.3分

[0078] (参考例1) (R)-2-メチル-1-ヘキサン酸の製造法

アルデヒドデヒドロゲナーゼ (SIGMA社製) 5U、NAD 13mgを100mMリン酸緩衝液 (pH8.0) 500 μ lに溶解させ、栓付試験管に移した。その後、実施例11で取得した (R)-2-メチル-1-ヘキサナール 2mgを加えて、30°Cで20時間攪拌した。反応後、6N塩酸水溶液を加えて反応液を酸性とし、酢酸エチル 1mlを加えて基質及び生成物を抽出して、以下に示す分析条件にてGC分析した。その結果、反応変換率 99.1% で 96.5% ee の (R)-2-メチル-1-ヘキサン酸が得られた。

[0079] 分析条件は以下の通りである。

[GC分析条件]

キャピラリーカラム:G-PN ϕ 0.25mm I. D. $\times$ 30m (東京化成社製)

キャリアーガス:He 150kPa

検出器:FID

カラム温度:40°C

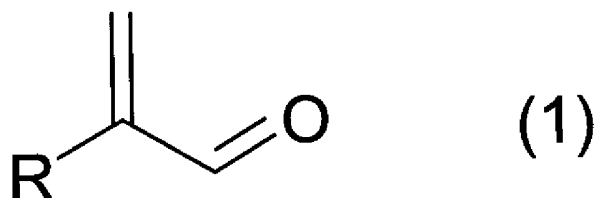
検出時間:(R)-2-メチルヘキサン酸 22.0分、(S)-2-メチルヘキサン酸 23

. 4分、2-メチル-1-ヘキサナール 15. 1分

請求の範囲

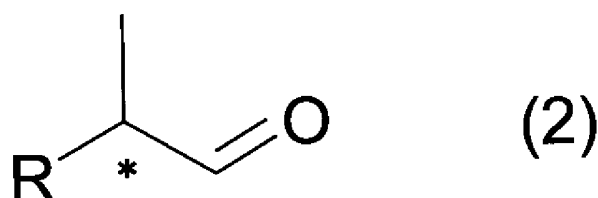
[1] 一般式(1):

[化1]



(式中、Rは置換基を有するメチル基、置換基を有しても良い炭素数2～10のアルキル基、又は炭素数5～15の置換基を有しても良いアラルキル基を表す。)で表される2-置換アクロレイン誘導体に、当該2-置換アクロレイン誘導体の炭素-炭素二重結合を立体選択的に還元する能力を有する酵素源を作用させることによる、一般式(2):

[化2]



(式中、Rは前記と同じ。*は不斉炭素を表す。)で表される光学活性2-置換プロパナール誘導体の製造法。

[2] Rが、置換基を有しても良い炭素数2～10のアルキル基である請求項1記載の製造法。

[3] Rが、置換基を有しても良い炭素数2～4のアルキル基である請求項1記載の製造法。

[4] 前記炭素-炭素二重結合を立体選択的に還元する能力を有する酵素源として、キャンディダ (Candida) 属、クルイベロマイセス (Kluyveromyces) 属、ピキア (Pichia) 属、ロドトルラ (Rhodotorula) 属、サッカロマイセス (Saccharomyces) 属、スポリディオボルス

(Sporidiobolus) 属、スポロボロマイセス (Spolobolomyces) 属、トリゴノプシス (Trigonopsis) 属、チゴサッカロマイセス (Zygosaccharomyces) 属、アクロモバクター (Achromobacter) 属、アシディフィリウム (Acidiphilium) 属、アルカリゲネス (Alcaligenes) 属、アースロバクター (Arthrobacter) 属、バシラス (Bacillus) 属、コリネバクテリウム (Corynebacterium) 属、エシェリヒア (Escherichia) 属、マイクロコッカス (Micrococcus) 属、シュードモナス (Pseudomonas) 属、パエニバシラス (Paenibacillus) 属、またはザントモナス (Xanthomonas) 属に属する微生物由来の酵素源を用いることを特徴とする請求項1～3のいずれか1項に記載の製造法。

- [5] 前記炭素－炭素二重結合を立体選択的に還元する能力を有する酵素源として、キャンディダ (Candida) 属、クルイベロマイセス (Kluyveromyces) 属、ピキア (Pichia) 属、ロドトルラ (Rhodotorula) 属、サッカロマイセス (Saccharomyces) 属、スポリディオボルス (Sporidiobolus) 属、スポロボロマイセス (Spolobolomyces) 属、トリゴノプシス (Trigonopsis) 属、チゴサッカロマイセス (Zygosaccharomyces) 属、アシディフィリウム (Acidiphilium) 属、アースロバクター (Arthrobacter) 属、バシラス (Bacillus) 属、マイクロコッカス (Micrococcus) 属、シュードモナス (Pseudomonas) 属、パエニバシラス (Paenibacillus) 属、またはザントモナス (Xanthomonas) 属に属する微生物に由来し、前記式(1)で表される化合物の炭素－炭素二重結合をR選択的に還元する能力を有する酵素源を用いる請求項1～3のいずれか1項に記載の製造法。

- [6] 前記R選択的に還元する能力を有する酵素源が、キャンディダ・カンタレリ (Candida cantarellii)、キャンディダ・エチェルシー (Candida etchellsii)、キャンディダ・ケフィル (Candida kefyr)、キャンディダ・ムサエ (Candida musae)、キャンディダ・ニトラトフィラ (Candida nitratophila)、キャンディダ・サケ (Candida sake)、キャンディダ・ステラータ (Candida stellata)、キャンディダ・ジラノイデス (Candida zeylanoides)、クライベロマイセス・ラクティス・バー・ドロソフィラルム (Kluyveromyces lactis var. drosophilum)、ピキア・メンブラナエファシエンシス (Pichia membranaefaciens)、ピキア・ヒーデー (Pichia heedii)、ロドトルラ・ミヌタ (Rhodotorula minuta)、サッカロマイセス・ユニスポラス (Saccharomyces unisporus)、サッカロマイセス・バヤナス (Saccharomyces bayanus) サッカロマイセス・セルビジエ (Saccharomyces cerevisiae)、サッカロマイセス・カステリ (Sacc

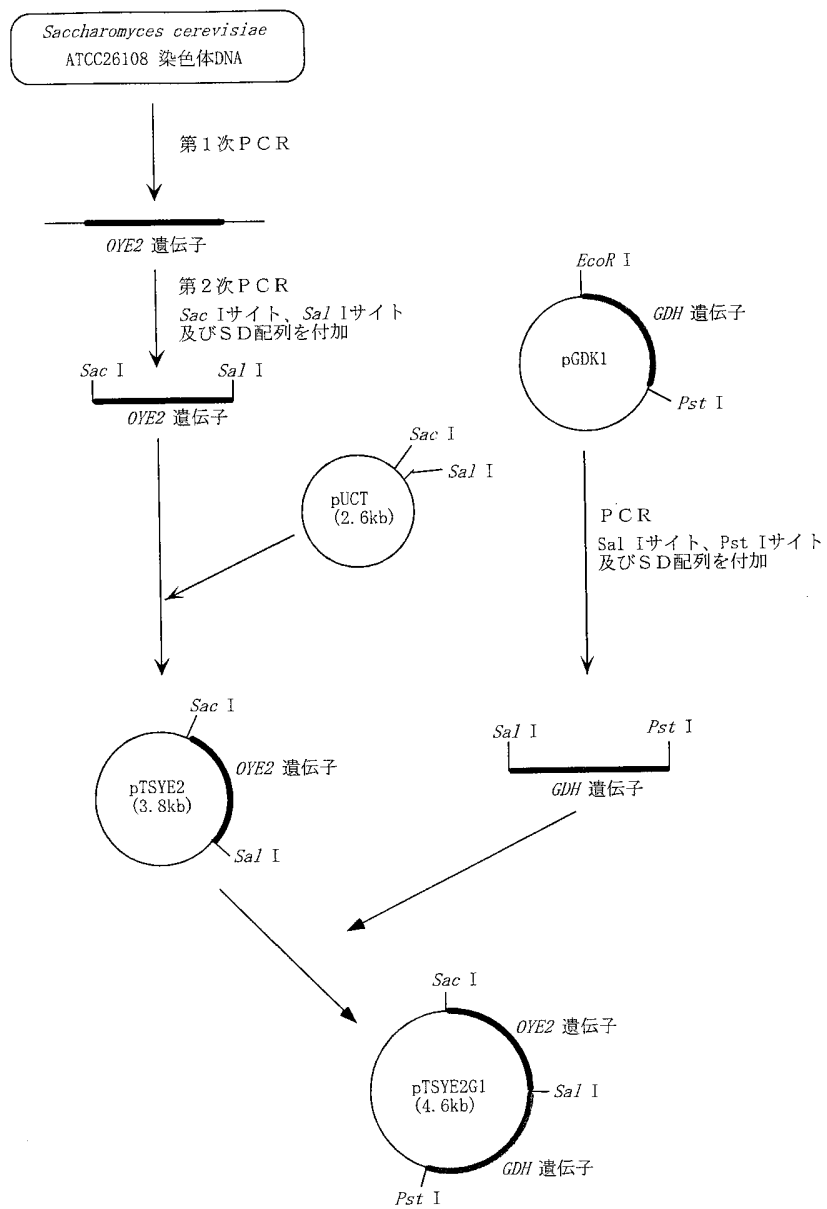
haromyces castellii)、サッカロマイセス・パストリアヌス(Saccharomyces pastorianus)、スポリディオボルス・ジョンソニー(Sporidiobolus johnsonii)、スポリディオボルス・サルモニコラ(Sporidiobolus salmonicolor)、スポロボロマイセス・サルモニコラ(Spolobolom yces salmonicolor)、トリゴノプシス・バリアビリス(Trigonopsis variabilis)、チゴサッカロマイセス・バイリー(Zygosaccharomyces bailii)、アースロバクター・ニコチアーネ(Arthrobacter nicotianae)、アシディフィリウム・クリプタム(Acidiphilium cryptum)、バシラス・セレウス(Bacillus cereus)、バシラス・コアグランス(Bacillus coagulans)、バシラス・リヘニホルミス(Bacillus licheniformis)、バシラス・プミラス(Bacillus pumilus)バシラス・バディウス(Bacillus badius)、バシラス・ファエリクス(Bacillus sphaericus)、マイクロコッカス・ルテウス(Micrococcus luteus)、シュードモナス・シュツツエリ(Pseudomonas stutzeri)、シュードモナス・フラギ(Pseudomonas fragi)、シュードモナス・プチダ(Pseudomonas putida)、パエニバシラス・アルベイ(Paenibacillus alvei)及びザントモナス・スピーシーズ(Xanthomonas sp.)からなる群より選択される1種以上の微生物由来の酵素源である請求項5記載の製造法。

- [7] 前記R選択的に還元する能力を有する酵素源が、サッカロマイセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)由来のNADPHデヒドロゲナーゼ(Old Yellow Enzyme 2)遺伝子を有するベクターで形質転換された形質転換微生物の培養物である請求項5記載の製造法。
- [8] 前記炭素－炭素二重結合を立体選択的に還元する能力を有する酵素源として、アクロモバクター(Achromobacter)属、アルカリゲネス(Alcaligenes)属、アースロバクター(Arthrobacter)属、コリネバクテリウム(Corynebacterium)属、またはエシェリヒア(Escherichia)属に属する微生物に由来し、前記式(1)で表される化合物の炭素－炭素二重結合をS選択的に還元する能力を有する酵素源を用いる請求項1～3のいずれか1項に記載の製造法。
- [9] 前記S選択的に還元する能力を有する酵素源が、アクロモバクター・キシロキダナス・サブスピーシーズ・デニトリフィカンス(Achromobacter xylosoxidans subsp. denitrificans)、アルカリゲネス・フェカリス(Alcaligenes faecalis)、アルカリゲネス・スピーシーズ(Alcaligenes sp.)、アースロバクター・クリスタロポエテス(Arthrobacter crystallopoiete

s)、アースロバクター・プロトフォロミス (Arthrobacter protophormise)、コリネバクテリウム・アンモニアゲネス (Corynebacterium ammoniagenes) 及びエシェリヒア・コリ (Escherichia coli) からなる群より選択される1種以上の微生物由来の酵素源である請求項8記載の製造法。

- [10] 前記炭素－炭素二重結合を立体選択的に還元する能力を有する酵素源として、EC番号 (Enzyme Commission Number) 1.6.99に分類される酸化還元酵素を用いる請求項1～3のいずれか1項に記載の製造法。
- [11] 前記EC 1.6.99に分類される酸化還元酵素として、EC 1.6.99.1に分類されるNADPHデヒドロゲナーゼを用い、かつ、前記式(2)で表される化合物のR体を製造する請求項10記載の製造法。
- [12] 前記NADPHデヒドロゲナーゼが、サッカロマイセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) 由来のNADPHデヒドロゲナーゼ (Old Yellow Enzyme 2) である請求項11記載の製造法。

[図1]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/310715

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12P7/24 (2006.01), C12N15/09 (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) C12P7/24 (2006.01), C12N15/09 (2006.01)				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched				
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA/REGISTRY/BIOSIS/CASREACT/WPIDS (STN)				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
A	Desrut, M.; Kergomard, A.; Renard, M.F.; Veschambre, H., Microbiological reduction of α, β -ethylenic aldehydes by Beauveria sulfurescens, Tetrahedron (1981), 37(22), 3825-9	1-12		
A	WO 2004/083166 A1 (Kaneka Corp.), 30 September, 2004 (30.09.04), Claims & EP 1604975 A	1-12		
A	WO 01/94337 A1 (Kaneka Corp.), 13 December, 2001 (13.12.01), Claims & EP 1288213 A	1-12		
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.				
<table border="0"> <tr> <td> * 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 </td> <td> "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 </td> </tr> </table>			* 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
* 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 04 July, 2006 (04.07.06)		Date of mailing of the international search report 11 July, 2006 (11.07.06)		
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer		
Facsimile No.		Telephone No.		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/310715

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 11-103878 A (Mitsubishi Chemical Corp.), 20 April, 1999 (20.04.99), Full text (Family: none)	1-12

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） Int.Cl. C12P7/24 (2006.01), C12N15/09 (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. C12P7/24 (2006.01), C12N15/09 (2006.01)			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） CA/REGISTRY/BIOSIS/CASREACT/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 請求の範囲の番号	
A	Desrut, M.; Kergomard, A.; Renard, M. F.; Veschambre, H., Microbiological reduction of α, β -ethylenic aldehydes by Beauveria sulfurescens, Tetrahedron (1981), 37(22), 3825-9	1 - 12	
A	WO 2004/083166 A1 (鐘淵化学工業株式会社) 2004. 0 9. 30, 請求の範囲 & EP 1604975 A	1 - 12	
☒ 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 04. 07. 2006		国際調査報告の発送日 11. 07. 2006	
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） 内藤 伸一 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	4N 8615

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	WO 01/94337 A1 (鐘淵化学工業株式会社) 2001. 12. 13, 請求の範囲 & EP 1288213 A	1-12
A	JP 11-103878 A (三菱化学株式会社) 1999. 04. 20, 文献全体ファミリーなし)	1-12