

(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
2025年1月2日(02.01.2025)



(10) 国際公開番号

WO 2025/005153 A1

(51) 国際特許分類:
C12P 13/00 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2024/023249

(22) 国際出願日: 2024年6月26日(26.06.2024)

(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:
PCT/JP2023/024236 2023年6月29日(29.06.2023) JP
PCT/JP2023/047340 2023年12月28日(28.12.2023) JP

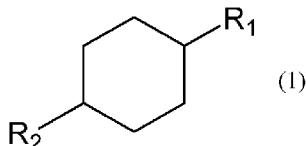
(71) 出願人: キリンホールディングス株式会社 (KIRIN HOLDINGS KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒1640001 東京都中野区中野四丁目10番2号 中野セントラルパークサウス Tokyo (JP). 協和発酵バイオ株

式会社 (KYOWA HAKKO BIO CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1008185 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 合田 明日香 (GODA Asuka); 〒1640001 東京都中野区中野四丁目10番2号 中野セントラルパークサウス キリンホールディングス株式会社内 Tokyo (JP). 山下 誠 (YAMASHITA Makoto); 〒1640001 東京都中野区中野四丁目10番2号 中野セントラルパークサウス キリンホールディングス株式会社内 Tokyo (JP). 瀬戸 健人 (KOUKETSU Kento); 〒1640001 東京都中野区中野四丁目10番2号 中野セントラルパークサウス キリンホールディングス株式会社内 Tokyo (JP). 青木 山本 ▲祐 ▼梨子 (AOKI YAMAMOTO Yuriko); 〒1008185 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 協和発酵バイオ株

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING 4-(AMINOMETHYL)CYCLOHEXANE-1-CARBOXYLIC ACID

(54) 発明の名称: 4-(アミノメチル)シクロヘキサノール-1-カルボン酸の製造方法



(57) Abstract: A method for producing according to one embodiment is a method in which cis- and/or trans-4-(aminomethyl)cyclohexane-1-carboxylic acid is produced from a substrate or intermediate compound that is a compound represented by general formula (1) in the presence of at least one enzyme selected from a protein having an activity of converting a hydroxy group into an aldehyde group, a protein having an activity of converting an aldehyde group into a carboxy group and a protein having an activity of reversibly converting between an aldehyde group and an amino group. In formula, R₁ and R₂ are respectively and independently CH₂OH, CHO, COOH or CH₂NH₂, excluding the case where one of R₁ and R₂ is COOH and the other is CH₂NH₂, and the case where R₁ and R₂ are both COOH. Specifically, the compound represented by general formula (1) is any one of compounds 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 and 8.

(57) 要約: 一実施形態の製造方法は、一般式(1)で表される化合物を基質化合物または中間体化合物として、ヒドロキシ基をアルデヒド基に変換する活性を有するタンパク質、アルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有するタンパク質、およびアルデヒド基とアミノ基を可逆的に変換する活性を有するタンパク質から選択される少なくとも一つの酵素の存在下で、シス体および/またはトランス体の4-(アミノメチル)シクロヘキサノール-1-カルボン酸を製造する方法である。〔式中、R₁およびR₂は、それぞれ独立してCH₂OH、CHO、COOH、またはCH₂NH₂である(但し、R₁とR₂の一方がCOOHであり、他方がCH₂NH₂である場合、およびR₁とR₂が共にCOOHである場合を除く)〕具体的には、上記一般式(1)で表される化合物が化合物1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8のいずれか一つである。



式会社内 Tokyo (JP). 渡邊 太郎(WATANABE Taro); 〒1640001 東京都中野区中野四丁目 1 0 番 2 号 中野セントラルパークサウス キリンホールディングス株式会社内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 長谷川 芳樹, 外(HASEGAWA Yoshiki et al.); 〒1000005 東京都千代田区丸の内二丁目 1 番 1 号 丸の内 M Y P L A Z A (明治安田生命ビル) 9 階 創英国際特許法律事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 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))

明 細 書

発明の名称：

4－（アミノメチル）シクロヘキサン－1－カルボン酸の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、4－（アミノメチル）シクロヘキサン－1－カルボン酸の製造において使用するタンパク質、および、該タンパク質を用いた4－（アミノメチル）シクロヘキサン－1－カルボン酸の製造方法に関する。また、本発明は、効率的なトランス－4－（アミノメチル）シクロヘキサン－1－カルボン酸の製造方法に関する。

背景技術

[0002] 4－（アミノメチル）シクロヘキサン－1－カルボン酸（4－（a m i n o m e t h y l）c y c l o h e x a n e c a r b o x y l i c a c i d；AMCHA）は、抗プラスミン剤として開発された人工合成アミノ酸である（非特許文献1）。AMCHAにはシス型とトランス型の立体異性体が存在する。このうち、非特許文献2により、トランス型に抗プラスミン作用があることが確認された。トランス型の4－（アミノメチル）シクロヘキサン－1－カルボン酸であるトランス－4－アミノメチルシクロヘキサン－1－カルボン酸（t－AMCHA）は、トラネキサム酸（T r a n e x a m i c a c i d；TXA）とも呼ばれ、その抗プラスミン作用から、止血剤、抗炎症剤として出血の予防・治療に用いられる（非特許文献3～4）。

[0003] 4－（アミノメチル）シクロヘキサン－1－カルボン酸の製造法としては、主に化学合成法が知られている。例えば、特許文献1には、4－（クロロメチル）安息香酸を出発原料として、アミノ化反応および水素付加反応を経て4－（アミノメチル）シクロヘキサン－1－カルボン酸を生成し、続く異性化反応の3段の化学合成反応により、トランス体の4－（アミノメチル）シクロヘキサン－1－カルボン酸を製造する方法が開示されている。

[0004] 上記を含む化学合成法は高温および高圧での反応を必要としており、エネ

ルギーコストが高く、環境負荷も大きいことが課題である。

- [0005] 化学合成法の代替としては、微生物を利用した製造方法が挙げられる。特許文献2には、1, 4-ビス(アミノメチル)シクロヘキサンのシス体およびトランス体混合物にコリネバクテリウム属またはノカルディア属に属する微生物を接触させ、トランス体の4-(アミノメチル)シクロヘキサノール-1-カルボン酸を製造する方法が開示されている。しかしながら、該方法は自然界から分離した微生物自体を用いた変換反応であるため、4-(アミノメチル)シクロヘキサノール-1-カルボン酸の生産性も低く、また活性本体の酵素の同定も行われていない。

先行技術文献

特許文献

- [0006] 特許文献1: CN 1 1 4 0 1 4 7 6 8 A
特許文献2: 特開昭63-152991号公報
特許文献3: CN 1 1 4 2 3 1 5 0 7 A
特許文献4: CN 1 1 5 9 6 0 8 5 4 A

非特許文献

- [0007] 非特許文献1: Keio Journal of Medicine (1962)11, 8, 105-115
非特許文献2: Keio Journal of Medicine (1964) 18, 4, 177-185
非特許文献3: European Journal of Haematology (2020) 104, 2, 79-87
非特許文献4: Journal of Trauma and Acute Care Surgery (2019) 86, 1, 101-107
非特許文献5: Bioresources and Bioprocessing (2022) 9, 80

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0008] 本発明は、新規な酵素反応経路に基づき4-(アミノメチル)シクロヘキサノール-1-カルボン酸を製造する方法、および、当該酵素反応に使用できるタンパク質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

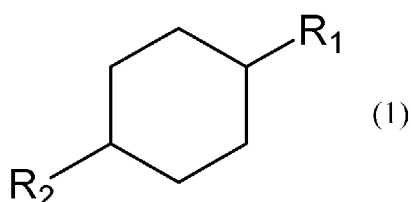
[0009] 本発明者らは、1, 4-ビス（アミノメチル）シクロヘキサンから4-（アミノメチル）シクロヘキサン-1-カルボン酸を生成する反応経路として、アミノ基転移酵素およびアルデヒドデヒドロゲナーゼによる酵素反応経路を想定し、目的の活性を有する可能性のあるタンパク質を各々選定した。また、当該タンパク質を大腸菌株で発現、精製し、酵素反応を実施することで、1, 4-ビス（アミノメチル）シクロヘキサンから4-（アミノメチル）シクロヘキサン-1-カルボン酸を生成できることを見出した。更なる研究の結果、本発明者らは、1, 4-シクロヘキサンジメタノールから4-（アミノメチル）シクロヘキサン-1-カルボン酸を生成する反応経路として、コリンオキシダーゼ、アミノ基転移酵素およびアルデヒドデヒドロゲナーゼによる酵素反応経路を想定し、目的の活性を有する可能性のあるタンパク質を各々選定した。また、当該タンパク質を大腸菌株で発現させ、静止菌体反応を実施することで、1, 4-シクロヘキサンジメタノールから4-（アミノメチル）シクロヘキサン-1-カルボン酸を生成できることを見出し、本発明の完成に至った。

[0010] 本発明は、例えば、以下の各発明に関する。

[A 1]

下記一般式（1）で表される化合物を基質化合物または中間体化合物として、ヒドロキシ基をアルデヒド基に変換する活性を有するタンパク質、アルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有するタンパク質、およびアルデヒド基とアミノ基を可逆的に変換する活性を有するタンパク質から選択される少なくとも一つの酵素の存在下で、シス体および／またはトランス体の4-（アミノメチル）シクロヘキサン-1-カルボン酸を製造する方法。

[化1]



[式中、 R_1 および R_2 は、それぞれ独立して CH_2OH 、 CHO 、 $COOH$ 、または CH_2NH_2 である（但し、 R_1 と R_2 の一方が $COOH$ であり、他方が CH_2NH_2 である場合、および R_1 と R_2 が共に $COOH$ である場合を除く）]

具体的には、上記一般式（１）で表される化合物は化合物１，２，３，４，５，６，７または８のいずれか一つである。

[A 2]

上記ヒドロキシ基をアルデヒド基に変換する活性を有するタンパク質、上記アルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有するタンパク質、および上記アルデヒド基とアミノ基を可逆的に変換する活性を有するタンパク質の存在下で製造する、[A 1]に記載の方法。

[A 3]

R_1 と R_2 の一方が CH_2OH であり、他方が CH_2OH 、 CHO 、または CH_2NH_2 である、上記一般式（１）で表される化合物を基質化合物または中間体化合物とする場合、上記ヒドロキシ基をアルデヒド基に変換する活性を有するタンパク質、上記アルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有するタンパク質、および上記アルデヒド基とアミノ基を可逆的に変換する活性を有するタンパク質の存在下で製造する、[A 2]に記載の方法。

[A 4]

R_1 と R_2 の一方が CH_2NH_2 であり、他方が CHO である、一般式（１）で表される化合物を基質化合物または中間体化合物とする場合、上記アルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有するタンパク質の存在下で製造する、[A 1]に記載の方法。

[A 5]

R_1 と R_2 の一方が CHO であり、他方が $COOH$ である、一般式（１）で表される化合物を基質化合物または中間体化合物とする場合、上記アルデヒド基とアミノ基を可逆的に変換する活性を有するタンパク質の存在下で製造する、[A 1]に記載の方法。

[A 6]

R_1 と R_2 の一方が CHO であり、他方が CH_2NH_2 、もしくは CHO である、または R_1 と R_2 が共に CH_2NH_2 である、一般式(1)で表される化合物を基質化合物または中間体化合物とする場合、上記アルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有するタンパク質、および上記アルデヒド基とアミノ基を可逆的に変換する活性を有するタンパク質の存在下で製造する、[A 1]に記載の方法。

[A 7]

R_1 と R_2 の一方が CH_2OH であり、他方が CH_2NH_2 である、一般式(1)で表される化合物を基質化合物または中間体化合物とする場合、上記ヒドロキシ基をアルデヒド基に変換する活性を有するタンパク質、および上記アルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有するタンパク質の存在下で製造する、[A 1]に記載の方法。

[A 8]

R_1 と R_2 の一方が CH_2OH であり、他方が $COOH$ である、一般式(1)で表される化合物を基質化合物または中間体化合物とする場合、上記ヒドロキシ基をアルデヒド基に変換する活性を有するタンパク質、および上記アルデヒド基とアミノ基を可逆的に変換する活性を有するタンパク質の存在下で製造する、[A 1]に記載の方法。

[A 9]

上記ヒドロキシ基をアルデヒド基に変換する活性を有するタンパク質が、オキシダーゼ活性を有するタンパク質、デヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質およびアルデヒドレダクターゼ活性を有するタンパク質から選択される少なくとも1つであり、上記アルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有するタンパク質が、アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質、および／またはアルデヒドオキシダーゼ活性を有するタンパク質であり、上記アルデヒド基とアミノ基を可逆的に変換する活性を有するタンパク質が、アミノ基転移酵素活性を有するタンパク質、アミンデヒドロゲナーゼ活

性を有するタンパク質およびアミノキシダーゼ活性を有するタンパク質から選択される少なくとも1つである、[A 1]～[A 8]のいずれかに記載の方法。

[A 1 0]

上記ヒドロキシ基をアルデヒド基に変換する活性を有するタンパク質が、コリンオキシダーゼ活性を有するタンパク質であり、上記アルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有するタンパク質が、アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質であり、上記アルデヒド基とアミノ基を可逆的に変換する活性を有するタンパク質が、アミノ基転移酵素活性を有するタンパク質である、[A 1]～[A 9]のいずれかに記載の方法。

[A 1 1]

上記コリンオキシダーゼ活性を有するタンパク質が、配列番号201で表されるアミノ酸配列と60%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質であり、上記アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質が、配列番号19～22、35～46および127～139のいずれか1つで表されるアミノ酸配列と50%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質であり、上記アミノ基転移酵素活性を有するタンパク質が、配列番号1～4および103～105のいずれか1つで表されるアミノ酸配列と60%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質である、[A 1 0]に記載の方法。

[A 1 2]

上記一般式(1)において、 R_1 と R_2 の一方が COOH であり、他方が CHO で表される化合物(すなわち化合物5)が下記(i)および(ii)のいずれか一つの基質化合物または中間体化合物から生じた化合物である、[A 5]に記載の方法。

(i) R_1 と R_2 が共に CHO である化合物(すなわち化合物3)

(ii) R_1 と R_2 の一方が COOH であり、他方が CH_2OH である化合物(すなわち化合物4)

[A 1 3]

上記一般式 (1) において、 R_1 と R_2 の一方が CH_2NH_2 であり、他方が CHO である、化合物 (すなわち化合物 7) が下記 (i) および (ii) のいずれか一つの基質化合物または中間体化合物から生じた化合物である、[A 4] に記載の方法。

(i) R_1 と R_2 が共に CHO である化合物 (すなわち化合物 3)

(ii) R_1 と R_2 の一方が CH_2NH_2 であり、他方が CH_2OH である化合物 (すなわち化合物 6)

[A 1 4]

上記一般式 (1) において、 R_1 と R_2 が共に CHO である化合物 (すなわち化合物 3)、 R_1 と R_2 の一方が $COOH$ であり、他方が CH_2OH である化合物 (すなわち化合物 4) または、 R_1 と R_2 の一方が CH_2NH_2 であり、他方が CH_2OH である化合物 (すなわち化合物 6) のいずれか一つを基質化合物または中間体化合物とし、ヒドロキシ基をアルデヒド基に変換する活性を有するタンパク質、アルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有するタンパク質、およびアルデヒド基とアミノ基を可逆的に変換する活性を有するタンパク質から選択される少なくとも一つの酵素の存在下で、シス体および／またはトランス体の 4- (アミノメチル) シクロヘキサン-1-カルボン酸を製造する、[A 1] に記載の方法。

[A 1 5]

上記一般式 (1) において、 R_1 と R_2 が共に CHO である化合物 (すなわち化合物 3) を基質化合物または中間体化合物とする場合、アルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有するタンパク質、およびアルデヒド基とアミノ基を可逆的に変換する活性を有するタンパク質の存在下で、

上記一般式 (1) において、 R_1 と R_2 の一方が $COOH$ であり、他方が CH_2OH である化合物 (すなわち化合物 4) を基質化合物または中間体化合物とする場合、ヒドロキシ基をアルデヒド基に変換する活性を有するタンパク質、およびアルデヒド基とアミノ基を可逆的に変換する活性を有するタンパ

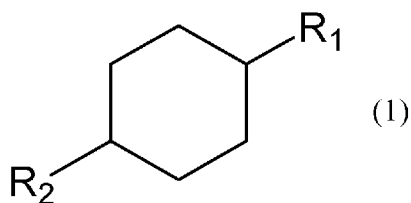
ク質の存在下で、または、

上記一般式（１）において、 R_1 と R_2 の一方が CH_2NH_2 であり、他方が CH_2OH である化合物（すなわち化合物６）を基質化合物または中間体化合物する場合、ヒドロキシ基をアルデヒド基に変換する活性を有するタンパク質、およびアルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有するタンパク質の存在下で、シス体および／またはトランス体の４－（アミノメチル）シクロヘキサノール１－カルボン酸を製造する、〔Ａ１４〕に記載の方法。

〔Ａ１６〕

下記一般式（１）で表される化合物を基質化合物または中間体化合物として、ヒドロキシ基をアルデヒド基に変換する活性を有するタンパク質、アルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有するタンパク質、およびアルデヒド基とアミノ基を可逆的に変換する活性を有するタンパク質から選択される少なくとも一つの酵素の存在下で、シス体および／またはトランス体の４－（アミノメチル）シクロヘキサノール１－カルボン酸を製造する方法であって、上記アルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有するタンパク質が配列番号１２７～１３９のいずれか１つで表されるアミノ酸配列、またはこれらのいずれか１つで表されるアミノ酸配列と５０％以上、６０％以上、７０％以上、７５％以上、８０％以上、９０％以上、９３％以上、９５％以上、または９８％以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質である、方法。

〔化２〕



〔式中、 R_1 および R_2 は、それぞれ独立して CH_2OH 、 CHO 、 $COOH$ 、または CH_2NH_2 である（但し、 R_1 と R_2 の一方が $COOH$ であり、他方が CH_2NH_2 である場合、および R_1 と R_2 が共に $COOH$ である場合を除く）

]

具体的には、上記一般式（１）で表される化合物は化合物１，２，３，４，５，６，７または８のいずれか一つである。

[A 1 7]

上記ヒドロキシ基をアルデヒド基に変換する活性を有するタンパク質、上記アルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有するタンパク質、および上記アルデヒド基とアミノ基を可逆的に変換する活性を有するタンパク質の存在下で製造する、[A 1 6]に記載の方法。

[A 1 8]

アルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有するタンパク質の存在下でシス体および／またはトランス体の４－（アミノメチル）シクロヘキサノール－１－カルボン酸を製造する方法であって、

上記一般式（１）において、 R_1 と R_2 の一方が CH_2NH_2 であり、他方が CHO である、化合物（すなわち化合物７）を基質化合物または中間体化合物とする、シス体および／またはトランス体の４－（アミノメチル）シクロヘキサノール－１－カルボン酸を製造する、[A 1 6]に記載の方法。

[A 1 9]

アルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有するタンパク質およびアルデヒド基とアミノ基を可逆的に変換する活性を有するタンパク質の存在下でシス体および／またはトランス体の４－（アミノメチル）シクロヘキサノール－１－カルボン酸を製造する方法であって、

上記一般式（１）において、 R_1 と R_2 が共に CHO である化合物（すなわち化合物３）および／または上記一般式（１）において、 R_1 と R_2 が共に CH_2NH_2 である、化合物（すなわち化合物８）を基質化合物または中間体化合物とする、シス体および／またはトランス体の４－（アミノメチル）シクロヘキサノール－１－カルボン酸を製造する、[A 1 6]に記載の方法。

[A 2 0]

アルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有するタンパク質およびヒ

ドロキシ基をアルデヒド基に変換する活性を有するタンパク質の存在下でシス体および／またはトランス体の4-(アミノメチル)シクロヘキサノール-1-カルボン酸を製造する方法であって、

上記一般式(1)において、 R_1 と R_2 の一方が CH_2NH_2 であり、他方が CH_2OH である化合物(すなわち化合物6)を基質化合物または中間体化合物とする、シス体および／またはトランス体の4-(アミノメチル)シクロヘキサノール-1-カルボン酸を製造する、[A16]に記載の方法。

[A21]

ヒドロキシ基をアルデヒド基に変換する活性を有するタンパク質、アルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有するタンパク質、およびアルデヒド基とアミノ基を可逆的に変換する活性を有するタンパク質の存在下でシス体および／またはトランス体の4-(アミノメチル)シクロヘキサノール-1-カルボン酸を製造する方法であって、

上記一般式(1)において、 R_1 と R_2 の一方が CH_2OH であり、他方が CH_2OH または CHO である化合物(すなわち化合物1または化合物2)を基質化合物または中間体化合物とする、シス体および／またはトランス体の4-(アミノメチル)シクロヘキサノール-1-カルボン酸を製造する、[A16]に記載の方法。

[A22]

上記アルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有するタンパク質が、以下の1)から6)の少なくともいずれか1つである、[A16]～[A21]のいずれかに記載の方法。

1) 配列番号19で表されるアミノ酸配列と71%以上、75%以上、80%以上、90%以上、93%以上、95%以上、または98%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質

2) 配列番号20で表されるアミノ酸配列と68%以上、70%以上、75%以上、80%以上、90%以上、93%以上、95%以上、または98%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質

3) *Pseudomonas* 属由来アルデヒドデヒドロゲナーゼであり、かつ配列番号20で表されるアミノ酸配列と50%以上、60%以上、70%以上、75%以上、80%以上、90%以上、93%以上、95%以上、または98%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質

4) 配列番号21で表されるアミノ酸配列と63%、70%以上、75%以上、80%以上、90%以上、93%以上、95%以上、または98%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質

5) 配列番号40で表されるアミノ酸配列と56.5%以上、60%以上、70%以上、75%以上、80%以上、90%以上、93%以上、95%以上、または98%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質

6) 配列番号41で表されるアミノ酸配列と63.9%以上、70%以上、75%以上、80%以上、90%以上、93%以上、95%以上、または98%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質

[A23]

上記アルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有するタンパク質が、配列番号127~131、133~135、138、および139のいずれか1つで表されるアミノ酸配列からなるタンパク質である、[A22]に記載の方法。

[A24]

上記アルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有するタンパク質が、アルデヒド基を有する化合物のアルデヒド基を酸化させるアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有し、*Pseudomonas* 属細菌由来のアルデヒドデヒドロゲナーゼである、[A22]に記載の方法。

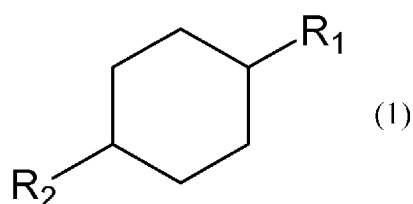
[A25]

下記一般式(1)で表される化合物であって、下記(i)の化合物を基質化合物または中間体化合物として、ヒドロキシ基をアルデヒド基に変換する活性を有するタンパク質、アルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有するタンパク質、およびアルデヒド基とアミノ基を可逆的に変換する活性を

有するタンパク質から選択される少なくとも一つの酵素の存在下で、シス体および／またはトランス体の4-（アミノメチル）シクロヘキサン-1-カルボン酸を製造する方法。

(i) 一般式(1)において、 R_1 および R_2 は、それぞれ独立して CH_2OH 、 CHO 、 $COOH$ 、または CH_2NH_2 である。但し、一般式(1)において、 R_1 と R_2 の一方が $COOH$ であり、他方が CH_2NH_2 である場合、 R_1 と R_2 が共に $COOH$ である場合、および R_1 と R_2 の一方が CH_2NH_2 であり、他方が CHO である場合（すなわち一般式(1)で表される化合物が化合物7である場合）を除く。すなわち、上記一般式(1)で表される化合物は化合物1, 2, 3, 4, 5または6のいずれか一つである。

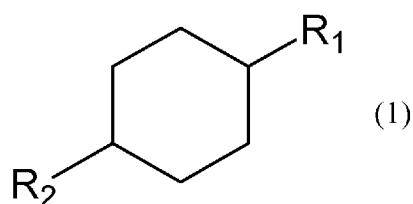
[化3]



[A26]

下記一般式(1)で表される化合物を基質化合物または中間体化合物として、ヒドロキシ基をアルデヒド基に変換する活性を有するタンパク質、アルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有するタンパク質、およびアルデヒド基とアミノ基を可逆的に変換する活性を有するタンパク質から選択される少なくとも一つの酵素の存在下で、シス体および／またはトランス体の4-（アミノメチル）シクロヘキサン-1-カルボン酸を製造する方法であって、上記アルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有するタンパク質が配列番号207で表されるアミノ酸配列、または当該アミノ酸配列と50%以上、60%以上、70%以上、75%以上、80%以上、90%以上、93%以上、95%以上、または98%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質である、方法。

[化4]



[式中、 R_1 および R_2 は、それぞれ独立して CH_2OH 、 CHO 、 $COOH$ 、または CH_2NH_2 である（但し、 R_1 と R_2 の一方が $COOH$ であり、他方が CH_2NH_2 である場合、および R_1 と R_2 が共に $COOH$ である場合を除く）]

具体的には、上記一般式（１）で表される化合物は化合物１，２，３，４，５，６，７または８のいずれか一つである。

[A 2 7]

上記ヒドロキシ基をアルデヒド基に変換する活性を有するタンパク質が、オキシダーゼ活性を有するタンパク質、デヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質およびアルデヒドレダクターゼ活性を有するタンパク質から選択される少なくとも１つであり、上記アルデヒド基とアミノ基を可逆的に変換する活性を有するタンパク質が、アミノ基転移酵素活性を有するタンパク質、アミンデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質およびアミノオキシダーゼ活性を有するタンパク質から選択される少なくとも１つである、[A 1 6]に記載の方法。

[A 2 8]

上記ヒドロキシ基をアルデヒド基に変換する活性を有するタンパク質が、コリンオキシダーゼ活性を有するタンパク質であり、上記アルデヒド基とアミノ基を可逆的に変換する活性を有するタンパク質が、アミノ基転移酵素活性を有するタンパク質である、[A 1 6]に記載の方法。

[A 2 9]

上記コリンオキシダーゼ活性を有するタンパク質が、配列番号２０１で表されるアミノ酸配列と６０％以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるタ

ンパク質であり、上記アミノ基転移酵素活性を有するタンパク質が、配列番号 1～4 および 103～105 のいずれか 1 つで表されるアミノ酸配列と 60%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質である、[A 16] に記載の方法。

[A 30]

上記一般式 (1) において、 R_1 と R_2 の一方が CH_2NH_2 であり、他方が CHO である、化合物 (すなわち化合物 7) が下記 (i) および (ii) のいずれか一つの基質化合物または中間体化合物から生じた化合物である、[A 18] に記載の方法。

(i) R_1 と R_2 が共に CHO である化合物 (すなわち化合物 3)

(ii) R_1 と R_2 の一方が CH_2OH であり、他方が CH_2NH_2 である化合物 (すなわち化合物 6)

[A 31]

上記一般式 (1) において、 R_1 と R_2 が共に CHO である化合物 (すなわち化合物 3)、 R_1 と R_2 の一方が $COOH$ であり、他方が CH_2OH である化合物 (すなわち化合物 4) または、 R_1 と R_2 の一方が CH_2NH_2 であり、他方が CH_2OH である化合物 (すなわち化合物 6) のいずれか一つを基質化合物または中間体化合物とし、ヒドロキシ基をアルデヒド基に変換する活性を有するタンパク質、アルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有するタンパク質、およびアルデヒド基とアミノ基を可逆的に変換する活性を有するタンパク質から選択される少なくとも一つの酵素の存在下で、シス体および／またはトランス体の 4- (アミノメチル) シクロヘキサン-1-カルボン酸を製造する、[A 16] に記載の方法。

[A 32]

上記一般式 (1) において、 R_1 と R_2 が共に CHO である化合物 (すなわち化合物 3) を基質化合物または中間体化合物とする場合、アルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有するタンパク質、およびアルデヒド基とアミノ基を可逆的に変換する活性を有するタンパク質の存在下で、

上記一般式（１）において、 R_1 と R_2 の一方が $COOH$ であり、他方が CH_2OH である化合物（すなわち化合物４）を基質化合物または中間体化合物とする場合、ヒドロキシ基をアルデヒド基に変換する活性を有するタンパク質、およびアルデヒド基とアミノ基を可逆的に変換する活性を有するタンパク質の存在下で、または、

上記一般式（１）において、 R_1 と R_2 の一方が CH_2NH_2 であり、他方が CH_2OH である化合物（すなわち化合物６）を基質化合物または中間体化合物とする場合、ヒドロキシ基をアルデヒド基に変換する活性を有するタンパク質、およびアルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有するタンパク質の存在下で、シス体および／またはトランス体の４－（アミノメチル）シクロヘキサノール１－カルボン酸を製造する、[A 3 1]に記載の方法。

[0011] 本発明はまた、例えば、以下の各発明にも関する。

[1]

１，４－ビス（アミノメチル）シクロヘキサンのアミノ基を他の化合物へ転移させ、４－（アミノメチル）シクロヘキサノール１－カルバルデヒドを産生させるアミノ基転移酵素活性を有し、かつ配列番号１～４および１０３～１０５のいずれか１つで表されるアミノ酸配列と６０％以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質。

[2]

[1]に記載のタンパク質をコードするDNA。

[3]

[2]に記載のDNAを含む組換え体DNA。

[4]

[2]に記載のDNAを含むか、または、[3]に記載の組換え体DNAで宿主細胞を形質転換して得られる、組換え細胞。

[5]

４－（アミノメチル）シクロヘキサノール１－カルバルデヒドのアルデヒド基を酸化させ、４－（アミノメチル）シクロヘキサノール１－カルボン酸を産

生させるアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有し、かつ配列番号 19～22、35～46 および 127～139 のいずれか 1 つで表されるアミノ酸配列と 50% 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質。

[6]

4-（アミノメチル）シクロヘキサノール-1-カルバルデヒドのアルデヒド基を酸化させ、4-（アミノメチル）シクロヘキサノール-1-カルボン酸を生させるアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有し、かつ配列番号 19～22、35～46 および 127～139 のいずれか 1 つで表されるアミノ酸配列と 60% 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質。

[7]

[5] または [6] に記載のタンパク質をコードする DNA。

[8]

[7] に記載の DNA を含む組換え体 DNA。

[9]

[7] に記載の DNA を含むか、または、[8] に記載の組換え体 DNA で宿主細胞を形質転換して得られる、組換え細胞。

[10]

シス体および／またはトランス体の 1, 4-ビス（アミノメチル）シクロヘキサノールから、シス体および／またはトランス体の 4-（アミノメチル）シクロヘキサノール-1-カルボン酸を製造するための製造方法であって、

(i) アミノ基転移酵素の存在下、1, 4-ビス（アミノメチル）シクロヘキサノールから 4-（アミノメチル）シクロヘキサノール-1-カルバルデヒドを製造する工程と、

(ii) アルデヒドデヒドロゲナーゼの存在下、4-（アミノメチル）シクロヘキサノール-1-カルバルデヒドから 4-（アミノメチル）シクロヘキサノール-1-カルボン酸を製造する工程とを含む、製造方法。

[11]

上記アミノ基転移酵素が〔１〕に記載のタンパク質であり、上記アルデヒドデヒドロゲナーゼが〔５〕または〔６〕に記載のタンパク質である、〔１０〕に記載の製造方法。

〔１２〕

上記方法の一部または全部において、アラニンデヒドロゲナーゼ、および／または、 NADH オキシダーゼを共存させることを含む、〔１０〕または〔１１〕に記載の製造方法。

〔１３〕

シス体および／またはトランス体の１，４－ビス（アミノメチル）シクロヘキサンから、トランス－４－（アミノメチル）シクロヘキサノールカルボン酸を製造する、〔１０〕～〔１２〕のいずれかに記載の製造方法。

〔１４〕

シス体および／またはトランス体の１，４－ビス（アミノメチル）シクロヘキサンから、シス－４－（アミノメチル）シクロヘキサノールカルボン酸を製造する、〔１０〕～〔１２〕のいずれかに記載の製造方法。

〔１５〕

上記方法の一部または全部が、中性または塩基性条件下で行われる、〔１０〕～〔１３〕のいずれに記載の製造方法。

〔１６〕

上記方法の一部または全部が、２級アミンの存在下で行われる、〔１５〕に記載の製造方法。

〔１７〕

アルデヒドデヒドロゲナーゼであって、４－（アミノメチル）シクロヘキサノールカルバルデヒドのアルデヒド基を酸化させて、４－（アミノメチル）シクロヘキサノールカルボン酸を産生させるアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有する、タンパク質。

〔１８〕

ベンズアルデヒドデヒドロゲナーゼであって、４－（アミノメチル）シク

ロヘキサン-1-カルバルデヒドのアルデヒド基を酸化させて、4-(アミノメチル)シクロヘキサン-1-カルボン酸を産生させるアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有する、[17]に記載のタンパク質。

[19]

上記アルデヒドデヒドロゲナーゼが、*Pseudomonas*属細菌由来のアルデヒドデヒドロゲナーゼである、[17]または[18]に記載のタンパク。

[20]

配列番号19~22、35~46および127~139のいずれか1つで表されるアミノ酸配列と50%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなる、[17]または[18]に記載のタンパク質。

[21]

4-(アミノメチル)シクロヘキサン-1-カルバルデヒドから、4-(アミノメチル)シクロヘキサン-1-カルボン酸を産生させるアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有し、配列番号20で表されるアミノ酸配列と50%以上の同一性を有するアミノ酸配列であって、かつ、配列番号20で表されるアミノ酸配列とアライメントしたとき、下記(1)~(26)の少なくとも1つのアミノ酸基を含むアミノ酸配列からなる、タンパク質。

- (1) 35位相当位置のアミノ酸残基がグリシン残基(G)である
- (2) 65位相当位置のアミノ酸残基がアラニン残基(A)である
- (3) 82位相当位置のアミノ酸残基がロイシン残基(L)である
- (4) 104位相当位置のアミノ酸残基がグリシン残基(G)である
- (5) 109位相当位置のアミノ酸残基がグリシン残基(G)である
- (6) 110位相当位置のアミノ酸残基がイソロイシン残基(I)である
- (7) 117位相当位置のアミノ酸残基がグルタミン残基(Q)である
- (8) 122位相当位置のアミノ酸残基がアラニン残基(A)である
- (9) 124位相当位置のアミノ酸残基がロイシン残基(L)である
- (10) 134位相当位置のアミノ酸残基がバリン残基(V)である

(11) 144位相当位置のアミノ酸残基がバリン残基(V)である

(12) 160位相当位置のアミノ酸残基がフェニルアラニン残基(F)である

(13) 271位相当位置のアミノ酸残基がグリシン残基(G)である

(14) 290位相当位置のアミノ酸残基がアラニン残基(A)である

(15) 319位相当位置のアミノ酸残基がアスパラギン酸残基(D)である

(16) 333位相当位置のアミノ酸残基がアスパラギン酸残基(D)である

(17) 365位相当位置のアミノ酸残基がグルタミン残基(Q)である

(18) 390位相当位置のアミノ酸残基がイソロイシン残基(I)である

(19) 420位相当位置のアミノ酸残基がアラニン残基(A)である

(20) 423位相当位置のアミノ酸残基がロイシン残基(L)である

(21) 434位相当位置のアミノ酸残基がバリン残基(V)である

(22) 440位相当位置のアミノ酸残基がプロリン残基(P)である

(23) 443位相当位置のアミノ酸残基がシステイン残基(C)である

(24) 445位相当位置のアミノ酸残基がプロリン残基(P)である

(25) 466位相当位置のアミノ酸残基がセリン残基(S)である

(26) 467位相当位置のアミノ酸残基がイソロイシン残基(I)である

[22]

[17]～[21]のいずれかに記載のタンパク質をコードするDNA。

[23]

[22]に記載のDNAを含む組換え体DNA。

[24]

[22]に記載のDNAを含むか、または、[23]に記載の組換え体DNAで宿主細胞を形質転換して得られる、組換え細胞。

[25]

上記アミノ基転移酵素が[1]に記載のタンパク質であり、上記アルデヒ

ドデヒドロゲナーゼが〔１７〕～〔２１〕のいずれかに記載のタンパク質である、〔１０〕に記載の製造方法。

〔２６〕

上記方法の一部または全部において、アラニンデヒドロゲナーゼ、および／または、 NADH オキシダーゼを共存させる、〔２５〕に記載の製造方法。

〔２７〕

シス体および／またはトランス体の１，４－ビス（アミノメチル）シクロヘキサンから、トランス－４－（アミノメチル）シクロヘキサン－１－カルボン酸を製造する、〔２５〕または〔２６〕に記載の製造方法。

〔２８〕

シス体および／またはトランス体の１，４－ビス（アミノメチル）シクロヘキサンから、シス－４－（アミノメチル）シクロヘキサン－１－カルボン酸を製造する、〔２５〕または〔２６〕に記載の製造方法。

〔２９〕

上記方法の一部または全部が、中性または塩基性条件下で行われる、〔２５〕～〔２８〕のいずれかに記載の製造方法。

〔３０〕

上記方法の一部または全部が、２級アミンの存在下で行われる、〔２５〕～〔２８〕のいずれかに記載の製造方法。

〔３１〕

〔２〕並びに〔７〕もしくは〔２２〕に記載のDNA、および／または上記ヒドロキシ基を有する化合物のヒドロキシ基をアルデヒド基に変換する活性を有するタンパク質をコードするDNAを含む組換え体DNA。

〔３２〕

〔２〕並びに〔７〕もしくは〔２２〕に記載のDNA、および／または上記ヒドロキシ基を有する化合物のヒドロキシ基をアルデヒド基に変換する活性を有するタンパク質をコードするDNAを含むか、または、〔３１〕に記

載の組換え体DNAで宿主細胞を形質転換して得られる、組換え細胞。

[33]

上記ヒドロキシ基を有する化合物のヒドロキシ基をアルデヒド基に変換する活性を有する酵素をコードするDNAを更に含むか、上記ヒドロキシ基を有する化合物のヒドロキシ基をアルデヒド基に変換する活性を有する酵素をコードするDNAを更に含む組換え体DNAで宿主細胞を形質転換して得られる、[32]に記載の組換え細胞。

発明の効果

[0012] 本発明のヒドロキシ基を有する化合物のヒドロキシ基をアルデヒド基に変換する活性を有するタンパク質（例えば、オキシダーゼ活性を有するタンパク質）、本発明のアルデヒド基とアミノ基を可逆的に変換する活性を有するタンパク質（例えば、アミノ基転移酵素活性を有するタンパク質）、および／または本発明のアルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有するタンパク質（例えば、アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質）によれば、新規な酵素反応経路に基づき4-（アミノメチル）シクロヘキサノール-1-カルボン酸を製造することができる。また、目的とする4-（アミノメチル）シクロヘキサノール-1-カルボン酸の立体構造に応じて、アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質の基質特異性を活用することで、シス体およびトランス体混合物を基質として用いた場合にも、目的の構造の化合物を選択的に多く生成させることができる。

[0013] 本発明の製造方法によれば、高温高圧を必要とせず、製造コストを低減しながら、効率的に4-（アミノメチル）シクロヘキサノール-1-カルボン酸を製造することができる。また、オキシダーゼ活性を有するタンパク質を用いる場合には、酸素および／または補酵素、アミノ基転移酵素活性を有するタンパク質を用いる場合には、アミノ基を受容する化合物（例えばケト酸）もしくはアミノ基を供与する化合物（例えばアミノ酸）、デヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質やアルデヒドレダクターゼ活性を有するタンパク質を用いる場合には、補酵素、および／またはそれらの再生系を反応系に導入す

ることで、酵素反応をより効率化させ4-(アミノメチル)シクロヘキサノール-1-カルボン酸の生産性を向上させることができる。さらに、1,4-ビス(アミノメチル)シクロヘキサノールのシス体およびトランス体混合物を基質として用いた場合に、トランス体の4-(アミノメチル)シクロヘキサノール-1-カルバルデヒドに選択的に作用する本発明のアルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有するタンパク質(例えば、アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質)を用い、かつ、反応を中性または塩基性で行うことで、中間体化合物の一つである4-(アミノメチル)シクロヘキサノール-1-カルバルデヒドのシス体からトランス体への異性化反応が促進されるため、動的速度論分割により高収率かつ高選択的にトランス体の4-(アミノメチル)シクロヘキサノール-1-カルボン酸(トラネキサム酸)を製造することができる。加えて、1,4-シクロヘキサジメタノールを基質として用いた場合、1,4-ビス(アミノメチル)シクロヘキサノールを基質として用いた場合と比較してもより安価に4-(アミノメチル)シクロヘキサノール-1-カルボン酸を製造することができる。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]一実施形態における、シス体またはトランス体の1,4-ビス(アミノメチル)シクロヘキサノールからシス体またはトランス体の4-(アミノメチル)シクロヘキサノール-1-カルバルデヒド、および、シス体またはトランス体の4-(アミノメチル)シクロヘキサノール-1-カルボン酸を製造するスキームを示す。

[図2]実施例1のアミノ基転移酵素活性を有するタンパク質(AT)発現プラスミド(pQE80L-PpAT8)の構築方法を示す模式図である。

[図3]実施例1における、PatA酵素反応液のLC-MSクロマトグラム(EIC: 142.10 m/z)を示す。

[図4]実施例7における、ATおよびアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質(ALDH)共発現プラスミド(pET28a-PatA-XyIC)の構築方法を示す模式図である。

[図5A]図5 Aおよび図5 Bは、実施例11における、アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質（ALDH）のアミノ酸配列を、アライメントした結果を示す図である。

[図5B]図5 Aおよび図5 Bは、実施例11における、アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質（ALDH）のアミノ酸配列を、アライメントした結果を示す図である。

[図6]一実施形態における、一般式（1）で表される化合物から4-（アミノメチル）シクロヘキサン-1-カルボン酸を製造するスキームを示す。

[図7]一般式（1）で表される各化合物の置換基、当該各化合物を基質化合物または中間体化合物として用いた場合の4-（アミノメチル）シクロヘキサン-1-カルボン酸への予想合成ルート、およびその際に使用する酵素を示す表である。

[図8]実施例15における酵素反応液のo-フタルアルデヒド（OPA）誘導体化分析クロマトグラムである。

[図9]実施例15における酵素反応液のジニトロフェニルヒドラジン（DNPH）誘導体化分析クロマトグラムである。

発明を実施するための形態

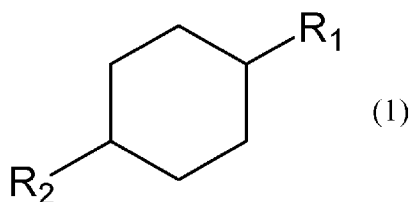
[0015] 1. 化合物および酵素反応

本発明における目的化合物である4-（アミノメチル）シクロヘキサン-1-カルボン酸（4-（aminomethyl）cyclohexane-1-carboxylic acid；以下、場合によって「AMCHA」という）は非天然型のアミノ酸である（以下、本発明において目的化合物という場合がある）。4-（アミノメチル）シクロヘキサン-1-カルボン酸にはシス体であるシス-4-（アミノメチル）シクロヘキサン-1-カルボン酸（cis-4-（aminomethyl）cyclohexane-1-carboxylic acid）と、トランス体であるトランス-4-（アミノメチル）シクロヘキサン-1-カルボン酸（trans-4-（aminomethyl）cyclohexane-1-carboxy

l i c a c i d) が存在する。このうちトランス-4- (アミノメチル) シクロヘキサン-1-カルボン酸は、トラネキサム酸 (T r a n e x a m i c a c i d ; 以下、場合によって「TXA」という) とも呼ばれる。本明細書において特に示さない限り、「トラネキサム酸」または「TXA」はトランス-4- (アミノメチル) シクロヘキサン-1-カルボン酸を意味し、シス-4- (アミノメチル) シクロヘキサン-1-カルボン酸は、シストラネキサム酸またはシス-TXA (c i s - T X A) という。

[0016] 本発明における目的化合物を製造するための基質化合物（単に「基質」と呼ぶ場合がある）または中間体化合物（単に「中間体」と呼ぶ場合がある）は、下記一般式（1）で表される化合物である。なお、本発明における基質化合物とは、4- (アミノメチル) シクロヘキサン-1-カルボン酸の生産において、酵素によって触媒作用を受ける化合物を意味する。また、中間体化合物とは、基質化合物のうち、4- (アミノメチル) シクロヘキサン-1-カルボン酸の生産過程において、酵素による触媒作用を受けて生じた目的化合物以外の化合物であって、更に同一または他の酵素によって触媒作用を受ける化合物を意味する。各化合物（化合物1～8）の置換基は図7に示しており、各化合物の化学名は図6に示す。すべての化合物は、シスおよびトランスであり得る場合は、特に明記しない限り、シス体およびトランス体の両方を含む。

[化5]



[式中、 R_1 および R_2 は、それぞれ独立して CH_2OH 、 CHO 、 $COOH$ 、または CH_2NH_2 である（但し、 R_1 と R_2 の一方が $COOH$ であり、他方が CH_2NH_2 である場合、および R_1 と R_2 が共に $COOH$ である場合を除く）]

具体的には、上記一般式（１）で表される化合物は化合物１，２，３，４，５，６，７または８のいずれか一つである。

[0017] また、本発明における基質化合物または中間体化合物である化合物１～８の化合物名は、以下のとおりである。これらの化合物のうち、市販で容易に入手できる化合物もしくは容易に合成できる化合物（例えば化合物１、化合物８）は、出発原料の基質化合物として好ましく用いられる。一方で、市販品がなく、合成・精製が困難で、または、安定性が悪い化合物は、中間体化合物として好ましく用いられる。

[0018] 化合物１：１，４－シクロヘキサンジメタノール（１，４－Cyclohexanedimethanol）

化合物２：４－（ヒドロキシメチル）シクロヘキサン－１－カルバルデヒド（４－（hydroxymethyl）cyclohexane－１－carbaldehyde）

化合物３：１，４－シクロヘキサンジカルバルデヒド（１，４－cyclohexanedicarboxylic acid）

化合物４：４－（ヒドロキシメチル）シクロヘキサン－１－カルボン酸（４－（hydroxymethyl）cyclohexane－１－carboxylic acid）

化合物５：４－ホルミルシクロヘキサン－１－カルボン酸（４－Formylcyclohexane－１－carboxylic acid）

化合物６：〔４－（アミノメチル）シクロヘキシル〕メタノール（〔４－（aminomethyl）cyclohexyl〕methanol）

化合物７：４－（アミノメチル）シクロヘキサン－１－カルバルデヒド（４－（aminomethyl）cyclohexane－１－carbaldehyde）

化合物８：１，４－ビス（アミノメチル）シクロヘキサン（１，４－bis（aminomethyl）cyclohexane）

[0019] 本発明における、目的化合物を製造するための酵素反応は、下記の（１）

～（３）の少なくとも１つを含む。

（１）ヒドロキシ基を有する化合物のヒドロキシ基をアルデヒド基に変換する酵素反応

（２）アルデヒド基とアミノ基を可逆的に変換する酵素反応、すなわち、アルデヒド基を有する化合物のアルデヒド基をアミノ基に変換する酵素反応と、その逆反応の、アミノ基を有する化合物のアミノ基をアルデヒド基に変換する酵素反応の両方

（３）アルデヒド基を有する化合物のアルデヒド基をカルボキシ基に変換する酵素反応

[0020] 本発明の酵素反応は、酵素の存在下で行われる。（１）の酵素反応に使われる酵素は、ヒドロキシ基をアルデヒド基に変換する活性を有するタンパク質であり、本明細書において「酵素Ａ」と呼ぶ場合があり、酵素Ａとしては、例えばオキシダーゼ活性を有するタンパク質（ＯＸ）、デヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質およびアルデヒドレダクターゼ活性を有するタンパク質が挙げられる。（２）の酵素反応に使われる酵素は、アルデヒド基とアミノ基を可逆的に変換する活性を有するタンパク質であり、本明細書において「酵素Ｂ」と呼ぶ場合があり、酵素Ｂとしては、例えばアミノ基転移酵素活性を有するタンパク質（ＡＴ）、アミンデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質およびアミノオキシダーゼ活性を有するタンパク質が挙げられる。（３）の酵素反応に使われる酵素は、アルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有するタンパク質であり、本明細書において「酵素Ｃ」と呼ぶ場合があり、酵素Ｃとしては、例えばアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質（ＡＬＤＨ）およびアルデヒドオキシダーゼ活性を有するタンパク質が挙げられる。これらの酵素は、後述の「２．本発明のタンパク質およびＤＮＡ」にて詳細に説明する。

[0021] 本発明の酵素反応において、酵素Ｂとしてアミノ基転移酵素活性を有するタンパク質を用いる場合には、アミノ基を供与する化合物またはアミノ基を受容する化合物を用いてもよい。本発明の酵素反応において、酵素Ａとして

デヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質またはアルデヒドレダクターゼ活性を有するタンパク質を用いる場合、酵素Bとしてアミンデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質を用いる場合、および／または、酵素Cとしてアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質を用いる場合には、電子受容体としての補酵素を用いてもよい。本発明の酵素反応において、酵素Aとしてオキシダーゼ活性を有するタンパク質を用いる場合、酵素Bとしてアミノオキシダーゼ活性を有するタンパク質を用いる場合、および／または、酵素Cとしてアルデヒドオキシダーゼ活性を有するタンパク質を用いる場合には、電子受容体としての酸素または／および補酵素を用いてもよい。アミノ基を供与する化合物としては、例えば、アミノ酸（例えば、アラニン、グルタミン酸、 α -アミノ酪酸）等が挙げられ、アミノ基を受容する化合物としては、例えば、ケト酸（例えば、ピルビン酸、 α -ケトグルタル酸、 α -ケト酪酸）等が挙げられる。補酵素としては、NAD(P)⁺、FAD等が挙げられる。

[0022] 一実施形態の酵素反応では、化合物1は、ヒドロキシ基をアルデヒド基に変換する活性を有するタンパク質（酵素A）の存在下において、化合物1のヒドロキシ基がアルデヒド基に変換されることにより、化合物2に変換され得る。

[0023] 一実施形態の酵素反応では、化合物2は、アルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有するタンパク質（酵素C）の存在下において、化合物2におけるアルデヒド基がカルボキシ基に変換されることにより化合物4に変換され得る。また、化合物2は、酵素Aの存在下において、化合物2のヒドロキシ基がアルデヒド基に変換されることにより、化合物3に変換され得る。さらに、化合物2は、アルデヒド基とアミノ基を可逆的に変換する活性を有するタンパク質（酵素B）の存在下において、化合物2のアルデヒド基がアミノ基に変換されることにより、化合物6に変換され得る。

[0024] 一実施形態の酵素反応では、化合物3は、酵素Cの存在下において、化合物3の一方のアルデヒド基がカルボキシ基に変換されることにより、化合物

5に変換され得る。また、化合物3は、酵素Bの存在下において、化合物3のアルデヒド基がアミノ基に変換されることにより、化合物7に変換され得る。

[0025] 一実施形態の酵素反応では、化合物4は、酵素Aの存在下において、化合物4のヒドロキシ基がアルデヒド基に変換されることにより、化合物5に変換され得る。

[0026] 一実施形態の酵素反応では、化合物5は、酵素Bの存在下において、化合物5のアルデヒド基がアミノ基に変換されることにより、4-(アミノメチル)シクロヘキサノール-1-カルボン酸（目的化合物）に変換され得る。

[0027] 一実施形態の酵素反応では、化合物6は、酵素Aの存在下において、化合物6のヒドロキシ基がアルデヒド基に変換されることにより、化合物7に変換され得る。また、化合物6は、酵素Bの存在下において、化合物6のアミノ基がアルデヒド基に変換されることにより、化合物2に変換され得る。

[0028] 一実施形態の酵素反応では、化合物7は、酵素Cの存在下において、化合物7のアルデヒド基がカルボキシ基に変換されることにより、目的化合物に変換され得る。また、化合物7は、酵素Bの存在下において、化合物7のアミノ基がアルデヒド基に変換されることにより、化合物3に変換され得る。

[0029] 一実施形態の酵素反応では、化合物8は、酵素Bの存在下において、化合物8のアミノ基がアルデヒド基に変換されることにより、化合物7に変換され得る。

[0030] 一実施形態の酵素反応において、1,4-ビス(アミノメチル)シクロヘキサン(化合物8)を基質として用いる。該酵素反応は、化合物8から中間体である化合物7を経由して、目的化合物を生成する酵素反応である。該酵素反応は、以下に示すように、2ステップの反応を含む。第1のステップにおいては、基質化合物の1,4-ビス(アミノメチル)シクロヘキサン(1,4-bis(aminomethyl)cyclohexane、化合物8)は、アミノ基を受容できる化合物であるケト酸(例えば、ピルビン酸)と反応し、酵素Bとしてのアミノ基転移酵素活性を有するタンパク質(AT

）によって、中間体である 4-（アミノメチル）シクロヘキサン-1-カルバルデヒド（4-（aminomethyl）cyclohexane-1-carbaldehyde、化合物 7）、およびアミノ基を受容した化合物（ケト酸としてピルビン酸を用いた場合にはアラニン）に変換される。第 2 のステップにおいては、中間体の 4-（アミノメチル）シクロヘキサン-1-カルバルデヒド（化合物 7）は、酵素 C としてのアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質（ALDH）によって、NAD（P）⁺ を補酵素とし、4-（アミノメチル）シクロヘキサン-1-カルボン酸および NAD（P）H に変換される（図 1、図 6 および図 7）。第 1 のステップの酵素反応と第 2 のステップの酵素反応は、別々の反応系に分けて順番に行われていてもよいが、一つの反応系において行われるのが望ましい。

[0031] また、第 1 のステップで、アミノ基を受容するための化合物としてピルビン酸を使用する場合、産生されたアラニンはアラニンデヒドロゲナーゼによって、ピルビン酸に変換（再生）されることが可能であり、第 2 のステップで、産生された NAD（P）H は、NAD（P）H オキシダーゼによって NAD（P）⁺ に変換（再生）されることが可能である。他にも、NAD（P）H を電氣的に酸化することによっても NAD（P）⁺ を再生することが可能である（図 1）。

[0032] 基質化合物または中間体化合物の 1, 4-ビス（アミノメチル）シクロヘキサン（化合物 8）は、シス体およびトランス体混合物であっても、トランス体であってもシス体であってもよい。また、4-（アミノメチル）シクロヘキサン-1-カルバルデヒド（化合物 7）も、シス体およびトランス体混合物であっても、トランス体であってもシス体であってもよい。

[0033] 別の実施形態の酵素反応において、1, 4-シクロヘキサジメタノール（化合物 1）を基質として用いる。該酵素反応は、図 6 および図 7 に示すように、化合物 1 から目的化合物を生成する複数の酵素反応を含む。該酵素反応は、以下に示す酵素反応を含んでもよい。まず、基質化合物の 1, 4-シクロヘキサジメタノール（化合物 1）は、ヒドロキシ基を有する化合物の

ヒドロキシ基をアルデヒド基に変換する活性を有する酵素（酵素A）によって、4-（ヒドロキシメチル）シクロヘキサン-1-カルバルデヒド（化合物2）に変換され、次に様々な酵素反応を経て、最終的に目的化合物の4-（アミノメチル）シクロヘキサン-1-カルボン酸に変換される。これらの酵素反応は、複数の反応系に分けて順番に行われていてもよいが、一つの反応系において行われるのが望ましい。

[0034] 具体的には、上記4-（ヒドロキシメチル）シクロヘキサン-1-カルバルデヒド（化合物2）は、ヒドロキシ基を有する化合物のヒドロキシ基をアルデヒド基に変換する活性を有する酵素（酵素A；例えば、オキシダーゼ活性を有するタンパク質）、アルデヒド基とアミノ基を可逆的に変換する活性を有する酵素（酵素B；例えば、アミノ基転移酵素活性を有するタンパク質）、およびアルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有する酵素（酵素C；例えば、アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質）の存在下で、目的化合物の4-（アミノメチル）シクロヘキサン-1-カルボン酸に変換され得る。これらの酵素の存在下での酵素反応は、4-（ヒドロキシメチル）シクロヘキサン-1-カルバルデヒド（化合物2）が、様々な化合物（化合物3、化合物4、化合物6）に変換され、更に4-ホルミルシクロヘキサン-1-カルボン酸（化合物5）および／または4-（アミノメチル）シクロヘキサン-1-カルバルデヒド（化合物7）に変換されたのち、最終的に目的化合物の4-（アミノメチル）シクロヘキサン-1-カルボン酸に変換される反応経路があり得る（図6）。なお、化合物3と化合物7、および、化合物2と化合物6は、アルデヒド基とアミノ基を可逆的に変換する活性を有する酵素（酵素B）の存在下で、それぞれ相互に変換され得る。

[0035] 上記の酵素反応において、アルデヒド基とアミノ基を可逆的に変換する活性を有するタンパク質（酵素B）のうち、アミノ基転移酵素活性を有するタンパク質は、アミノ基を供与できる化合物であるアミノ酸（例えば、アラニンまたはグルタミン酸）から、アルデヒド基を有する基質および／または中間体にアミノ基を供与し、アミノ基を受容した生成物とケト酸（アミノ酸と

してアラニンを用いた場合はピルビン酸、グルタミン酸を用いた場合は α -ケトグルタル酸)を生成する。また、上記の逆反応においては、同様にアミノ基を有する基質および／または中間体とケト酸から、アルデヒド基を有する生成物とアミノ酸を生成する。

[0036] アミノ基を供与するための化合物としてアラニンまたはグルタミン酸を使用する場合、產生されたピルビン酸または α -ケトグルタル酸は、後述のアラニンデヒドロゲナーゼまたはグルタミン酸デヒドロゲナーゼによって、アラニンまたはグルタミン酸に変換(再生)されることが可能である。また、逆反応においても同様に再生が可能である。

[0037] 上記の酵素反応において、酵素A、Bおよび／またはCとして、デヒドロゲナーゼ(例えば、酵素Aとしてアルコールデヒドロゲナーゼ、酵素Bとしてアミンデヒドロゲナーゼ、酵素Cとしてアルデヒドデヒドロゲナーゼ等)を用いる場合、基質および／または中間体が補酵素NAD(P)⁺によって酸化され、生成物とNAD(P)Hを生成する。同様に、酵素Aとしてアルデヒドレダクターゼを用いる場合、基質および／または中間体が補酵素NAD(P)⁺によって酸化され、生成物とNAD(P)Hを生成する。

[0038] 上記反応において、產生されたNAD(P)Hは、後述のNAD(P)HオキシダーゼによってNAD(P)⁺に変換(再生)されることが可能である。

[0039] 上記の酵素反応において、基質化合物の1,4-シクロヘキサジメタノール(化合物1)は、シス体およびトランス体混合物であっても、トランス体であってもシス体であってもよい。4-(アミノメチル)シクロヘキサノール-1-カルバルデヒド(化合物7)、および4-ホルミルシクロヘキサノール-1-カルボン酸(化合物5)もシス体およびトランス体混合物であっても、トランス体であってもシス体であってもよい。

[0040] なお、特許文献3および非特許文献5には、1,4-シクロヘキサジメタノールから1,4-シクロヘキサジカルバルデヒドを生成する *Arthrobacter chlorophenolicus* 由来コリンオキシダ

ーゼ変異体が開示されており、特許文献4には、1, 4-シクロヘキサンジカルバルデヒドから1, 4-ビス（アミノメチル）シクロヘキサンを生成する *Escherichia coli* 由来プロテシナミノトランスフェラーゼ（Pat A）変異体が開示されている。しかしながら、本発明の酵素反応経路に基づいて1, 4-シクロヘキサンジメタノールから4-（アミノメチル）シクロヘキサン-1-カルボン酸を製造できることは知られていない。

[0041] 2. 本発明のタンパク質およびDNA

（1）本発明のアルデヒド基とアミノ基を可逆的に変換する活性を有するタンパク質（酵素B）およびそれをコードするDNA

本明細書において、「アルデヒド基とアミノ基を可逆的に変換する活性」とは、アルデヒド基を有する化合物のアルデヒド基をアミノ基に変換する酵素反応と、その逆反応の、アミノ基を有する化合物のアミノ基をアルデヒド基に変換する酵素反応の両方を触媒する活性を意味する。本明細書において、これらのタンパク質は併せて「酵素B」という。アルデヒド基とアミノ基を可逆的に変換する活性を有するタンパク質は、「アルデヒド基とアミノ基を可逆的に変換する酵素」ともいう。

[0042] 本発明のアルデヒド基とアミノ基を可逆的に変換する活性を有するタンパク質（酵素B）は、具体的に、図6および図7に示すアミノ基を有する化合物である[4-（アミノメチル）シクロヘキシル]メタノール（化合物6）、4-（アミノメチル）シクロヘキサン-1-カルバルデヒド（化合物7）、または1, 4-ビス（アミノメチル）シクロヘキサン（化合物8）のアミノ基をアルデヒド基に変換する、または図6および図7に示すアルデヒド基を有する化合物である4-（ヒドロキシメチル）シクロヘキサン-1-カルバルデヒド（化合物2）、1, 4-シクロヘキサンジカルバルデヒド（化合物3）、または4-ホルミルシクロヘキサン-1-カルボン酸（化合物5）のアルデヒド基をアミノ基に変換する活性を有するタンパク質である。

[0043] アルデヒド基とアミノ基を可逆的に変換する活性を有するタンパク質（酵

素B)としては、例えば、アミノ基転移酵素活性を有するタンパク質、アミン脱水素酵素（アミンデヒドロゲナーゼ）活性を有するタンパク質、およびアミン酸化酵素（アミノオキシダーゼ）活性を有するタンパク質等が挙げられ、好ましくはアミノ基転移酵素活性を有するタンパク質である。

[0044] アミノ基転移酵素（アミノトランスフェラーゼ；*aminotransferase*；AT、もしくは、トランスアミナーゼ；*transaminase*と表現される）とは、生化学においてアミノ酸と α -ケト酸の間の反応を触媒する酵素の総称である。本明細書において、アミノ基転移酵素活性を有することとは、アミノ基を有する化合物からアミノ基を別の化合物に転移し、カルボニル基に変換する可逆反応を触媒する活性をいう。本明細書において、アミノ基転移酵素活性を有するタンパク質とは、アミノ基を有する化合物からアミノ基を別の化合物に転移し、カルボニル基に変換する可逆反応を触媒する活性を有するタンパク質をいい、「AT」と呼ぶ場合がある。

[0045] 一実施形態のATは、例えば、配列番号1～4および103～105のいずれか1つで表されるアミノ酸配列と60%以上（好ましくは、70%以上、75%以上、80%以上、90%以上、93%以上、95%以上、または98%以上）の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ、アミノ基転移酵素活性を有する、タンパク質である。

[0046] 本実施形態のATは、配列番号1～4および103～105のいずれか1つで表されるアミノ酸配列からなるタンパク質であってもよい。配列番号1で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質は*Pseudomonas putida* KT2440由来アミノ基転移酵素PpAT8であり、配列番号2で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質は*Pseudomonas putida* KT2440由来アミノ基転移酵素PpAT2であり、配列番号3で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質は*Aeromonas salmonicida* subsp. *Salmonicida*由来アミノ基転移酵素AsAT5であり、配列番号4で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質は*Escherichia coli* K12 MG165

5由来アミノ基転移酵素P a t Aである。配列番号103～105で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質は、表3に記載の微生物由来の、配列番号1または4で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質（P p A T 8またはP a t A）のホモログタンパク質（相同タンパク質）である。これらのタンパク質は、これまで、上述の図6に示すアミノ基を有する化合物のアミノ基を他の化合物へ転移させる活性または上述の図6に示すアルデヒド基を有する化合物にアミノ基を転移させる活性を有することは知られていない。

[0047] 別の実施形態のA Tは、上記アミノ基転移酵素活性を有するタンパク質の変異タンパク質または相同タンパク質であってよく、例えば、上記配列番号1～4および103～105のいずれか1つで表されるアミノ酸配列からなるタンパク質の変異タンパク質または相同タンパク質であって、配列番号1～4および103～105のいずれか1つで表されるアミノ酸配列と60%以上（好ましくは、70%以上、75%以上、80%以上、90%以上、93%以上、95%以上、または98%以上）の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ、アミノ基転移酵素活性を有する、タンパク質である。

[0048] 本明細書において、変異タンパク質とは、元となるタンパク質中のアミノ酸残基を人為的に欠失若しくは置換、または該タンパク質中に人為的にアミノ酸残基を挿入若しくは付加して得られるタンパク質をいう。本明細書において、相同タンパク質とは、自然界に存在する生物が有するタンパク質であって、進化上の起源が同一のタンパク質に由来する一群のタンパク質をいう。相同タンパク質は、互いに構造および機能が類似している。

[0049] 変異タンパク質において、アミノ酸が欠失、置換、挿入または付加されたとは、アミノ酸配列中の任意の位置において、1～20個のアミノ酸が欠失、置換、挿入または付加されていてもよく、例えば、1～15個、1～10個、1～5個、1～4個、1～3個、1～2個、または1個のアミノ酸が欠失、置換、挿入または付加されていてもよい。

[0050] 置換、挿入または付加されるアミノ酸は天然型と非天然型を問わない。天然型アミノ酸としては、L-アラニン、L-アスパラギン、L-アスパラギ

ン酸、L-グルタミン、L-グルタミン酸、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン、L-アルギニン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン、L-システイン等が挙げられる。

[0051] 以下に、相互に置換可能なアミノ酸の例を示す。同一群に含まれるアミノ酸は相互に置換可能である。

A群：ロイシン、イソロイシン、ノルロイシン、バリン、ノルバリン、アラニン、2-アミノブタン酸、メチオニン、D-メチルセリン、L-β-チルグリシン、L-β-チルアラニン、シクロヘキシルアラニン

B群：アスパラギン酸、グルタミン酸、イソアスパラギン酸、イソグルタミン酸、2-アミノアジピン酸、2-アミノスベリン酸

C群：アスパラギン、グルタミン

D群：リジン、アルギニン、オルニチン、2, 4-ジアミノブタン酸、2, 3-ジアミノプロピオン酸

E群：プロリン、3-ヒドロキシプロリン、4-ヒドロキシプロリン

F群：セリン、スレオニン、ホモセリン

G群：フェニルアラニン、チロシン

[0052] 配列番号1～4および103～105のいずれか1つで表されるアミノ酸配列からなるタンパク質の変異タンパク質または相同タンパク質のアミノ酸配列は、配列番号1～4および103～105のいずれか1つで表されるアミノ酸配列に対し、少なくとも60%以上、好ましくは70%以上、75%以上、80%以上、90%以上、または93%以上、さらに好ましくは95%以上、最も好ましくは98%以上の同一性を有する。

[0053] アミノ酸配列や塩基配列の同一性（相同性ともいう）は、Karlin and AltschulによるアルゴリズムBLAST [Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 90, 5873 (1993)] やFASTA [Methods Enzymol., 183, 63 (1990)] を用い

て決定することができる。このアルゴリズムBLASTに基づいて、BLASTNやBLASTXとよばれるプログラムが開発されている [J. Mol. Biol., 215, 403 (1990)]。BLASTに基づいてBLASTNを使用して塩基配列を解析する場合には、パラメータは、例えばScore=100、wordlength=12とする。また、BLASTに基づいてBLASTXを使用してアミノ酸配列を解析する場合には、パラメータは、例えばscore=50、wordlength=3とする。BLASTとGapped BLASTプログラムを用いる場合には、各プログラムのデフォルトパラメータを用いる。これらの解析方法の具体的な手法は公知である。

[0054] アミン脱水素酵素（アミンデヒドロゲナーゼ；amine dehydrogenase）とは、生化学においてNAD（P）⁺を補酵素としてアミノ基を有する化合物とアルデヒド基を有する化合物との間の酸化還元反応を触媒する酵素群の総称である。本明細書において、アミンデヒドロゲナーゼ活性を有することとは、アミノ基を有する化合物のアミノ基を酸化する反応を介して、アルデヒド基に変換する反応と、アルデヒド基を有する化合物のアルデヒド基を還元する反応を介して、アミノ基に変換する反応と、の可逆反応を触媒する活性をいう。本明細書において、アミンデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質とは、上記アミンデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質をいう。

[0055] 一実施形態のアミンデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質は、図6に示す化合物のアミノ基とアルデヒド基を可逆的に変換する活性を有しているものであれば特に限定されないが、公知のアミンデヒドロゲナーゼであってもよい。公知のアミンデヒドロゲナーゼとして、例えば、Bacillus属細菌由来アミンデヒドロゲナーゼ（例えば、Bacillus badius由来アミンデヒドロゲナーゼ、Bacillus stearothermophilus由来アミンデヒドロゲナーゼ、Streptomyces virginiae由来アミンデヒドロゲナーゼ、Pseudomon

as putida 由来アミンデヒドロゲナーゼ、*Escherichia coli* 由来アミンデヒドロゲナーゼ、*Salmonella enterica* 由来アミンデヒドロゲナーゼ等）が挙げられる。

[0056] 一実施形態のアミンデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質は、アミンデヒドロゲナーゼの変異タンパク質または相同タンパク質であって、図6に示す化合物（例えば、化合物2、化合物3、化合物5、化合物6、化合物7、化合物8）のアミノ基とアルデヒド基を可逆的に変換する活性を有するタンパク質であってもよい。このようなタンパク質としては、例えば、上記の公知のアミンデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列と60%以上（好ましくは、70%以上、75%以上、80%以上、90%以上、93%以上、95%以上、または98%以上）の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ、アミンデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質であってよい。

[0057] アミン酸化酵素（アミノオキシダーゼ；*amine oxidase*）とは、生化学において酸素を電子受容体としてアミノ基を有する化合物とアルデヒド基を有する化合物の間の酸化還元反応を触媒する酵素の総称である。本明細書において、アミノオキシダーゼ活性を有することとは、アミノ基を有する化合物のアミノ基を酸化する反応を介して、アルデヒド基に変換する可逆反応を触媒する活性をいう。本明細書において、アミノオキシダーゼ活性を有するタンパク質とは、アミノ基を有する化合物のアミノ基を酸化する反応を介して、アルデヒド基に変換する可逆反応を触媒する活性を有するタンパク質をいう。

[0058] 一実施形態のアミノオキシダーゼ活性を有するタンパク質は、図6に示す化合物のアミノ基とアルデヒド基を可逆的に変換する活性を有しているものであれば特に限定されないが、公知のアミノオキシダーゼであってもよい。公知のアミノオキシダーゼとしては、一級アミノオキシダーゼ、ジアミノオキシダーゼまたはプトレシンオキシダーゼであってよい。

[0059] 一実施形態のプトレシンオキシダーゼは、*Aspergillus* 属真菌由来プトレシンオキシダーゼ（例えば、*Aspergillus nidu*

*lans*由来プトレシンオキシダーゼ、*Aspergillus luchuensis*由来プトレシンオキシダーゼ等)、*Bos taurus*由来プトレシンオキシダーゼ、*Candida*属真菌由来プトレシンオキシダーゼ(例えば、*Candida albicans*由来プトレシンオキシダーゼ、*Candida parapsilosis*由来プトレシンオキシダーゼ、*Candida tropicalis*由来プトレシンオキシダーゼ等)、*Kocuria*属細菌由来プトレシンオキシダーゼ(例えば、*Kocuria rosea*由来プトレシンオキシダーゼ等)、*Meyerozyma guilliermondii*由来プトレシンオキシダーゼ、*Micrococcus luteus*由来プトレシンオキシダーゼ、*Paenarthrobacter*属細菌由来プトレシンオキシダーゼ(例えば、*Paenarthrobacter aureescens*由来プトレシンオキシダーゼ等)、*Pichia kudriavzevii*由来プトレシンオキシダーゼ、*Pisum sativum*由来プトレシンオキシダーゼ、*Pseudomonas*属細菌由来プトレシンオキシダーゼ(例えば、*Pseudomonas putida*由来プトレシンオキシダーゼ等)、*Rhodococcus*属細菌由来プトレシンオキシダーゼ(例えば、*Rhodococcus erythropolis*由来プトレシンオキシダーゼ、*Rhodococcus opacus*由来プトレシンオキシダーゼ等)である。

[0060] 一実施形態の一級アミンオキシダーゼは、*Paenarthrobacter aureescens*由来一級アミンオキシダーゼ、*Trifolium pratense*由来一級アミンオキシダーゼ、*Huperzia serrata*由来一級アミンオキシダーゼ、*Homo sapiens*由来一級アミンオキシダーゼ、*Malus domestica*由来一級アミンオキシダーゼ、*Pisum sativum*由来一級アミンオキシダーゼ、*Nicotiana tabacum*由来一級アミンオキシダーゼ、*Arabidopsis thaliana*由来一級アミンオキシダーゼ、*Euphorbia characias*由来一級アミンオキシダーゼ、Hupe

*rzia serrata*由来一級アミノキシダーゼ、*Lens culinaris*由来一級アミノキシダーゼ、*Trifolium pratense*由来一級アミノキシダーゼ、*Arabidopsis thaliana*由来一級アミノキシダーゼ、*Arthrobacter globiformis*由来一級アミノキシダーゼ、*Aspergillus*属真菌由来一級アミノキシダーゼ（例えば、*Aspergillus carbonarius*由来一級アミノキシダーゼ、*Aspergillus nidulans*由来一級アミノキシダーゼ、*Aspergillus niger*由来一級アミノキシダーゼ、*Aspergillus luchuensis*由来一級アミノキシダーゼ等）、*Bos taurus*由来一級アミノキシダーゼ、*Escherichia coli*由来一級アミノキシダーゼ、*Lathyrus sativus*由来一級アミノキシダーゼ、*Mus musculus*由来一級アミノキシダーゼ、*Mycobacterium* sp. 由来一級アミノキシダーゼ、*Ogataea angusta*由来一級アミノキシダーゼ、*Onobrychis viciifolia*由来一級アミノキシダーゼ、*Rattus norvegicus*由来一級アミノキシダーゼ、*Rhodococcus opacus*由来一級アミノキシダーゼ、*Schizosaccharomyces pombe*由来一級アミノキシダーゼ、*Sus scrofa*由来一級アミノキシダーゼ、*Trifolium pratense*由来一級アミノキシダーゼ、*Vicia faba*由来一級アミノキシダーゼである。

[0061] 一実施形態のジアミノキシダーゼは、*Brugmansia x candida*由来ジアミノキシダーゼ、*Glycine max*由来ジアミノキシダーゼ、*Homo sapiens*由来ジアミノキシダーゼ、*Hyoscyamus niger*由来ジアミノキシダーゼ、*Lathyrus*属植物由来ジアミノキシダーゼ（例えば、*Lathyrus sativus*由来ジアミノキシダーゼ、*Lathyrus cicera*由来ジ

アミノキシダーゼ等)、*Nicotiana tabacum*由来ジアミンオキシダーゼ、*Pisum*属植物由来ジアミンオキシダーゼ（例えば、*Pisum sativum*由来ジアミンオキシダーゼ、*Pinus sylvestris*由来ジアミンオキシダーゼ等）、*Sus scrofa*由来ジアミンオキシダーゼ、*Trifolium subterraneum*由来ジアミンオキシダーゼ、*Yarrowia lipolytica*由来ジアミンオキシダーゼ、*Arthrobacter*属細菌由来ジアミンオキシダーゼ（例えば、*Arthrobacter* sp. 由来ジアミンオキシダーゼ、*Arthrobacter globiformis*由来ジアミンオキシダーゼ等）、*Papaver somniferum*由来ジアミンオキシダーゼ、*Arachis hypogaea*由来ジアミンオキシダーゼ、*Euphorbia characias*由来ジアミンオキシダーゼ、*Lens culinaris*由来ジアミンオキシダーゼ、*Vicia faba*由来ジアミンオキシダーゼ、*Rattus norvegicus*由来ジアミンオキシダーゼ、*Aspergillus*属真菌由来ジアミンオキシダーゼ（例えば、*Aspergillus niger*由来ジアミンオキシダーゼ、*Aspergillus luchuensis*由来ジアミンオキシダーゼ等）である。

[0062] 一実施形態のアミノキシダーゼ活性を有するタンパク質は、アミノキシダーゼの変異タンパク質または相同タンパク質であって、アミノ基を有する化合物のアミノ基とアルデヒド基を可逆的に変換する活性を有するタンパク質であってよい。このようなタンパク質としては、例えば、上記のアミノキシダーゼのアミノ酸配列と60%以上（好ましくは、70%以上、75%以上、80%以上、90%以上、93%以上、95%以上、または98%以上）の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ、アミノキシダーゼ活性を有するタンパク質であってよい。

[0063] アルデヒド基とアミノ基を可逆的に変換する活性を有することは、例えば以下の方法により確認することができる。まず、後述の方法により、上記活

性を確認しようとするタンパク質をコードするDNAを含む組換え体DNAを作製する。次に、該組換え体DNAで、大腸菌などの微生物を形質転換して得られる微生物を培養し、該培地に図6のアミノ基を有する化合物（例えば、化合物6、化合物7または化合物8）、図6のアルデヒド基を有する化合物（例えば、化合物2、化合物3、化合物5または化合物7）、またはピルビン酸等のケト酸またはアラニン等のアミノ酸、あるいはNAD(P)⁺等の補酵素を添加し、対応するアミノ基がアルデヒド基に変換された化合物、またはアルデヒド基がアミノ基に変換された化合物を生成させる。最後に、HPLCなどを用いる一般的な分析方法を用いて菌体内や培養上清中の上記生成化合物を検出することにより、対象タンパク質がアルデヒド基とアミノ基を可逆的に変換する活性を有していることを確認することができる。

[0064] 一実施形態の酵素BをコードするDNAは、例えば、配列番号1～4および103～105のいずれか1つで表されるアミノ酸配列と60%以上（好ましくは、70%以上、75%以上、80%以上、90%以上、93%以上、95%以上、または98%以上）の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ、アミノ基転移酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAである。本明細書において、DNAは遺伝子であってよく、遺伝子の一部であってもよく、人工合成したDNA（例えば変異タンパク質をコードするDNA、またはコドン最適化したDNA）であってよい。

[0065] 本実施形態の酵素BをコードするDNAは、例えば、配列番号1～4および103～105のいずれか1つで表されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列であり、その一例として、配列番号5～8および108～110のいずれか1つで表される塩基配列からなるDNAを挙げられる。

[0066] 別の実施形態の酵素BをコードするDNAは、例えば、配列番号1～4および103～105のいずれか1つで表されるアミノ酸配列からなるタンパク質の変異タンパク質または相同タンパク質をコードするDNAである。変異タンパク質または相同タンパク質をコードするDNAは、配列番号5～8

および108～110のいずれか1つで表された塩基配列の任意の位置において、1～50個の塩基が欠失、置換、挿入または付加されていてもよく、例えば、1～40個、1～30個、1～25個、1～20個、1～15個、1～10個、1～5個、1～4個、1～3個、1～2個、または1個の塩基が欠失、置換、挿入または付加されていてもよい。また、変異タンパク質または相同タンパク質をコードするDNAは、好ましくは、配列番号5～8および108～110のいずれか1つで表される塩基配列と少なくとも60%以上、好ましくは70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、または93%以上、さらに好ましくは95%以上、最も好ましくは98%以上の同一性を有する塩基配列からなり、より好ましくは配列番号5～8および108～110のいずれか1つで表される塩基配列からなる。

[0067] 配列番号5～8および108～110のいずれか1つで表される塩基配列からなるDNA、または配列が分かっている相同タンパク質をコードするDNAは、ゲノムDNAを鋳型に適切なプライマーを用いてPCRにて増幅してもよい。その際に、プライマーの末端に制限酵素サイトなどの発現ベクターへのクローニングのためのDNA配列を含ませてもよい。相同タンパク質はまた、検索に基づきプローブまたはプライマーを設計し、当該DNAを有する微生物を用いた相同タンパク質をコードするDNAを取得することができる。変異タンパク質をコードするDNAは、エラープローンPCR、PCRによる部分特異的変異導入法、または市販の部分特異的変異導入キット等によって取得することができる。さらに、一実施形態のATをコードするDNAは、決定されたDNAの塩基配列に基づいて、日本テクノサービス社製NTS MシリーズDNA合成装置等を用いて化学合成することにより、目的とするDNAを調製することもできる。

[0068] ここで、一実施形態のDNAを宿主細胞の発現に最適なコドンとなるように塩基を置換することにより、該DNAがコードするタンパク質の発現量を向上させることもできる。宿主細胞におけるコドン使用頻度の情報は、公共のデータベースを通じて入手することができる。

- [0069] 一実施形態の酵素BをコードするDNAは、また、例えば、配列番号5～8および108～110のいずれか1つで表される塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAであってよい。ハイブリダイズするとは、特定の塩基配列を有するDNAまたは該DNAの一部にDNAがハイブリダイズする工程である。従って、該特定の塩基配列を有するDNAまたは該DNAの一部にハイブリダイズするDNAの塩基配列は、ノーザンまたはサザンブロット解析のプローブとして有用であるか、またはPCR解析のオリゴヌクレオチドプライマーとして使用できる長さのDNAであってもよい。
- [0070] プローブとして用いるDNAとしては、少なくとも100塩基以上、好ましくは200塩基以上、より好ましくは500塩基以上のDNAを挙げることができ、プライマーとして用いられるDNAとしては、少なくとも10塩基以上、好ましくは15塩基以上のDNAを挙げることができる。
- [0071] DNAのハイブリダイゼーション実験の方法はよく知られており、例えばモレキュラー・クローニング第4版(Cold Spring Harbor Laboratory Press (2012))、Methods for General and Molecular Bacteriology (ASM Press (1994))、Immunology methods manual (Academic press (1997))の他、多数の他の標準的な教科書に従ってハイブリダイゼーションの条件を決定し、実験を行うことができる。
- [0072] また、市販のハイブリダイゼーションキットに付属した説明書に従うことによっても、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAを取得することができる。市販のハイブリダイゼーションキットとしては、例えばランダムプライム法によりプローブを作製し、ストリンジェントな条件でハイブリダイゼーションを行うランダムプライムドDNAラベリングキット(ロシュ・ダイアグノスティックス社製)を挙げることができる。
- [0073] 上記のストリンジェントな条件とは、例えばDNAを固定化したフィルタ

ーとプローブDNAとを50%ホルムアミド、5×SSC（750mMの塩化ナトリウム、75mMのクエン酸ナトリウム）、50mMのリン酸ナトリウム（pH7.6）、5×デンハルト溶液、10%の硫酸デキストラン、および20μg/Lの変性させたサケ精子DNAを含む溶液中にて42℃で一晩インキュベートした後、例えば約65℃の0.2×SSC溶液中で該フィルターを洗浄する条件を挙げることができる。

[0074] 上記した様々な条件は、ハイブリダイゼーション実験のバックグラウンドを抑えるために用いるブロッキング試薬を添加または変更することにより設定することもできる。上記したブロッキング試薬の添加は、条件を適合させるために、ハイブリダイゼーション条件の変更を伴ってもよい。

[0075] 上記したストリンジェントな条件下でハイブリダイズ可能なDNAとしては、例えば上記BLASTやFASTA等のプログラムを用いて計算した時に、配列番号5～8および108～110のいずれか1つで表される塩基配列と少なくとも60%以上、好ましくは70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、または93%以上、さらに好ましくは95%以上、最も好ましくは98%以上の同一性を有する塩基配列からなるDNAを挙げることができる。

[0076] 一実施形態の酵素BをコードするDNAは、また、上記アミノ基転移酵素活性を有するタンパク質、アミンデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質、またはアミノキシダーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNAであってもよい。

[0077] (2) 本発明のアルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有するタンパク質（酵素C）およびそれをコードするDNA

本明細書において、「アルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性」とは、アルデヒド基を有する化合物のアルデヒド基をカルボキシ基に変換する酵素反応を触媒する活性を意味する。本明細書において、これらのタンパク質は併せて「酵素C」という。アルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有するタンパク質は、「アルデヒド基をカルボキシ基に変換する酵素」とも

いう。

[0078] 本発明のアルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有するタンパク質（酵素C）は、具体的に、図6および図7に示すアルデヒド基を有する化合物である、4-（ヒドロキシメチル）シクロヘキサン-1-カルバルデヒド（化合物2）、1, 4-シクロヘキサンジカルバルデヒド（化合物3）、または4-（アミノメチル）シクロヘキサン-1-カルバルデヒド（化合物7）をそれぞれ図6および図7に示すカルボン酸である、4-（ヒドロキシメチル）シクロヘキサン-1-カルボン酸（化合物4）、4-ホルミルシクロヘキサン-1-カルボン酸（化合物5）、または4-（アミノメチル）シクロヘキサン-1-カルボン酸（目的化合物）に変換する反応を触媒する活性を有するタンパク質である。

[0079] アルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有するタンパク質としては、例えば、アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質、アルデヒドオキシダーゼ活性を有するタンパク質等が挙げられる。

[0080] アルデヒドデヒドロゲナーゼ（A l d e h y d e d e h y d r o g e n a s e s ; A L D H）とは、生化学においてNAD（P）⁺を補酵素としてアルデヒドからカルボン酸への酸化反応を触媒する酵素群の総称である。本明細書において、アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有することとは、アルデヒド基を有する化合物のアルデヒド基を酸化させ、カルボキシ基に変換する反応を触媒する活性をいう。本明細書において、アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質とは、アルデヒド基を有する化合物のアルデヒド基を酸化させ、カルボキシ基に変換する反応を触媒する活性を有するタンパク質をいい、「ALDH」と呼ぶ場合がある。

[0081] 一実施形態のALDHは、例えば、配列番号19～22、35～46127～139、および207のいずれか1つで表されるアミノ酸配列と50%以上、または60%以上（好ましくは、70%以上、75%以上、80%以上、90%以上、93%以上、95%以上、または98%以上）の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ、アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有

する、タンパク質である。

[0082] 本実施形態のALDHは、配列番号19～22、35～46、127～139、および207のいずれか1つで表されるアミノ酸配列からなるタンパク質であってもよい。配列番号19で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質は*Escherichia coli* K12 MG1655由来ガンマーアミノブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼPatDであり、配列番号20で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質は*Pseudomonas putida* CSV86由来ベンズアルデヒドデヒドロゲナーゼXylCであり、配列番号21で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質は*Pseudomonas putida* S12由来フェニルアセトアルデヒドデヒドロゲナーゼStyDであり、配列番号22で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質は*Pseudomonas putida* NCIMB 9866由来4-ヒドロキシベンズアルデヒドデヒドロゲナーゼPchAである。配列番号35～46および127～139で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質は、表13および表20に記載の微生物由来の、配列番号19、20または21で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質（PatD、XylCまたはStyD）のホモログタンパク質（相同タンパク質）である。配列番号207で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質は、*Xanthomonas campestris*由来ベンズアルデヒドデヒドロゲナーゼである。これらのタンパク質は、これまで上述の図6に示すアルデヒド基を有する化合物のアルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有することは知られていない。

[0083] 別の実施形態のALDHは、アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質の変異タンパク質または相同タンパク質であってよく、例えば、上記配列番号19～22、35～46、127～139、および207のいずれか1つで表されるアミノ酸配列からなるタンパク質の変異タンパク質または相同タンパク質であって、配列番号19～22、35～46、127～139、および207のいずれか1つで表されるアミノ酸配列と50%以上、

または60%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ、アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有する、タンパク質である。変異タンパク質または相同タンパク質のアミノ酸配列は、配列番号19～22、35～46、127～139、および207のいずれか1つで表されるアミノ酸配列に対し、少なくとも50%以上、または60%以上、好ましくは70%以上、75%以上、80%以上または85%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは93%以上または95%以上、最も好ましくは98%以上の同一性を有する。

[0084] アルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有することは、例えば以下の方法により確認することができる。まず、後述の方法により、上記活性を確認しようとするタンパク質をコードするDNAを含む組換え体DNAを作製する。次に、該組換え体DNAで、大腸菌などの微生物を形質転換して得られる微生物を培養し、該培地に化合物2、3または7およびNAD(P)⁺またはFAD等の補酵素を添加し、目的のカルボン酸を生成させる。最後に、HPLCなどを用いる一般的な分析方法を用いて菌体内や培養上清中の目的のカルボン酸を検出することにより、対象タンパク質がアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有していることを確認することができる。

[0085] 別のさらなる実施形態のALDHは、アルデヒド基を有する化合物のアルデヒド基を酸化させるアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有し、以下の1)から6)のいずれか1つ以上に分類されるタンパク質であってもよい。

- 1) 配列番号19で表されるアミノ酸配列と71%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質
- 2) 配列番号20で表されるアミノ酸配列と68%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質
- 3) *Pseudomonas* 属由来アルデヒドデヒドロゲナーゼであり、かつ配列番号20で表されるアミノ酸配列と50%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質
- 4) 配列番号21で表されるアミノ酸配列と63%以上の同一性を有するア

ミノ酸配列からなるタンパク質

5) 配列番号40で表されるアミノ酸配列と56. 5%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質

6) 配列番号41で表されるアミノ酸配列と63. 9%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質

[0086] このようなALDHとしては、例えば配列番号19~21、35~41、44~46、127~131、133~135、138、および139のいずれか1つで表されるアミノ酸配列からなるタンパク質が挙げられる。

[0087] さらなる別の実施形態のアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質 (ALDH) は、好ましくは *Pseudomonas* 属細菌由来のアルデヒドデヒドロゲナーゼである。

[0088] *Pseudomonas* 属細菌としては、例えば、*Pseudomonas putida*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Pseudomonas sp.*、*Pseudomonas sp.* MAP12、*Pseudomonas fluorescens*、*Pseudomonas syringae*、*Pseudomonas amygdali*、*Pseudomonas oryzae*、*Pseudomonas maltophilia*、*Pseudomonas trivialis*、*Pseudomonas savastanoi*、*Pseudomonas stutzeri* 等が挙げられる。

[0089] 他の実施形態のALDHは、ベンズアルデヒドデヒドロゲナーゼであって、アルデヒド基を有する化合物のアルデヒド基を酸化させるアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有する、タンパク質であってもよい。

[0090] 本実施形態のベンズアルデヒドデヒドロゲナーゼは、アルデヒド基を有する化合物のアルデヒド基を酸化させるアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有する。ベンズアルデヒドデヒドロゲナーゼは、アルデヒドデヒドロゲナーゼの1種であり、特にベンズアルデヒドから安息香酸への酸化反応を触媒する酵素群の総称である。

[0091] 本実施形態のベンズアルデヒドデヒドロゲナーゼは、上記の *Pseudomonas* 属細菌のほか、ベンズアルデヒドデヒドロゲナーゼを発現する微生物由来のベンズアルデヒドデヒドロゲナーゼであってもよく、ベンズアルデヒドデヒドロゲナーゼを発現する微生物としては、*Hydrogenophaga aromaticivorans*、*Alteromonas*、*Tepidiphilus succinatimandens*、*Halomonas cupida*、*Glaciimonas immobilis*、*Paraburkholderia unamae*、*Marinobacter salsuginis*、*Aromatoleum toluclasticum*、*Burkholderia*__sp.、*Burkholderia*__sp. __D7、*Bacillus subtilis*、*Acinetobacter guillouiae*、*Polaromonas* sp.、*Bacillus* sp.、*Chloroflexi bacterium*、*Halioxenophilus aromaticivorans*、*Novosphingobium aromaticivorans*、*Oceanobacillus iheyensis*、*Sphingobium chungbukense*、*Streptomyces violaceoruber*、*Rhodococcus aetherivorans*、*Xanthomonas campestris*、*Streptomyces calvus*、*Prauserella muralis*、*Acinetobacter calcoaceticus*、*Xanthomonas campestris*、*Acidovorax* sp.、*Streptomyces* sp. 等が挙げられる。

[0092] 一実施形態のベンズアルデヒドデヒドロゲナーゼは、配列番号20、40、41、43、127～137、139、および207のいずれか1つで表されるアミノ酸配列からなるタンパク質であってもよい。また、別の実施形態のベンズアルデヒドデヒドロゲナーゼは、上記配列番号20、40、41、43、127～137、139、および207のいずれか1つで表される

アミノ酸配列からなるタンパク質の変異タンパク質または相同タンパク質であって、配列番号20、40、41、43、127～137、139、および207のいずれか1つで表されるアミノ酸配列と50%以上、または60%以上（好ましくは65%以上、70%以上、75%以上、80%以上、90%以上、93%以上、95%以上、または98%以上）の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ、アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有する、タンパク質であってもよい。

[0093] 別のさらなる実施形態のベンズアルデヒドデヒドロゲナーゼは、アルデヒド基を有する化合物のアルデヒド基を酸化するアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有し、以下の7) から12) のいずれか1つ以上に分類されるタンパク質であってもよい。

7) 配列番号19で表されるアミノ酸配列と71%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質

8) 配列番号20で表されるアミノ酸配列と68%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質

9) *Pseudomonas* 属由来アルデヒドデヒドロゲナーゼであり、かつ配列番号20で表されるアミノ酸配列と50%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質

10) 配列番号21で表されるアミノ酸配列と63%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質

11) 配列番号40で表されるアミノ酸配列と56.5%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質

12) 配列番号41で表されるアミノ酸配列と63.9%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質

このようなベンズアルデヒドデヒドロゲナーゼとしては、例えば配列番号20、40、41、127～131、133～135、および139のいずれか1つで表されるアミノ酸配列からなるタンパク質が挙げられる。

[0094] 別のさらなる実施形態のALDHは、上記ベンズアルデヒドデヒドロゲナ

ーゼの変異タンパク質または相同タンパク質であってよく、例えば、アルデヒド基を有する化合物のアルデヒド基を酸化するアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有し、配列番号20で表されるアミノ酸配列と50%以上（好ましくは55%以上、60%以上、65%以上、70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、93%以上、95%以上、または98%以上）の同一性を有するアミノ酸配列であって、かつ、配列番号20で表されるアミノ酸配列とアライメントしたとき、下記（1）～（26）の少なくとも1つのアミノ酸基を含むアミノ酸配列からなる、タンパク質である。

- （1）35位相当位置のアミノ酸残基がグリシン残基（G）である
- （2）65位相当位置のアミノ酸残基がアラニン残基（A）である
- （3）82位相当位置のアミノ酸残基がロイシン残基（L）である
- （4）104位相当位置のアミノ酸残基がグリシン残基（G）である
- （5）109位相当位置のアミノ酸残基がグリシン残基（G）である
- （6）110位相当位置のアミノ酸残基がイソロイシン残基（I）である
- （7）117位相当位置のアミノ酸残基がグルタミン残基（Q）である
- （8）122位相当位置のアミノ酸残基がアラニン残基（A）である
- （9）124位相当位置のアミノ酸残基がロイシン残基（L）である
- （10）134位相当位置のアミノ酸残基がバリン残基（V）である
- （11）144位相当位置のアミノ酸残基がバリン残基（V）である
- （12）160位相当位置のアミノ酸残基がフェニルアラニン残基（F）である
- （13）271位相当位置のアミノ酸残基がグリシン残基（G）である
- （14）290位相当位置のアミノ酸残基がアラニン残基（A）である
- （15）319位相当位置のアミノ酸残基がアスパラギン酸残基（D）である
- （16）333位相当位置のアミノ酸残基がアスパラギン酸残基（D）である
- （17）365位相当位置のアミノ酸残基がグルタミン残基（Q）である

(18) 390位相当位置のアミノ酸残基がイソロイシン残基(I)である

(19) 420位相当位置のアミノ酸残基がアラニン残基(A)である

(20) 423位相当位置のアミノ酸残基がロイシン残基(L)である

(21) 434位相当位置のアミノ酸残基がバリン残基(V)である

(22) 440位相当位置のアミノ酸残基がプロリン残基(P)である

(23) 443位相当位置のアミノ酸残基がシステイン残基(C)である

(24) 445位相当位置のアミノ酸残基がプロリン残基(P)である

(25) 466位相当位置のアミノ酸残基がセリン残基(S)である

(26) 467位相当位置のアミノ酸残基がイソロイシン残基(I)である

[0095] ここで、例えば、「35位相当位置のアミノ酸残基」とは、対象のタンパク質のアミノ酸配列と配列番号20で表されるアミノ酸配列とをアライメントした際に、配列番号20の第35番目のアミノ酸残基の位置に対応する位置にある、対象タンパク質のアミノ酸配列におけるアミノ酸残基を意味する。

[0096] 後述の実施例に示すとおり、上記(1)～(26)に示すアミノ酸残基は、トランス-4-(アミノメチル)シクロヘキサノ-1-カルバルデヒドに対する特異性が特に高いALDHで保存されているアミノ酸残基であることが示唆された。そのため、本実施形態のアルデヒドデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列が上記(1)～(26)の少なくとも1つのアミノ酸基を含むことで、トランス-4-(アミノメチル)シクロヘキサノ-1-カルバルデヒドに対する特異性を有すると考えられる。すなわち、本実施形態のALDHは、トランス選択性(トランス特異性、ともいう)の高いアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有し得る。ここで、トランス選択性が高いこととは、ALDHを用いて4-(アミノメチル)シクロヘキサノ-1-カルボン酸を製造する場合、生成される、トラネキサム酸(TXA)および/またはシス-TXAを含む4-(アミノメチル)シクロヘキサノ-1-カルボン酸において、後述の数2で示される計算式を用いて算出された4-(アミノメチル)シクロヘキサノ-1-カルボン酸のトランス比率が50%超、特にトランス特異

性が高いこととは、上記トランス比率が70%以上であることを意味する。

なお、本出願における「選択性」は「特異性」と同義として扱い、また、「選択的」であることは、「特異的」であることと同義として扱う。

[0097] 本実施形態のアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質のアミノ酸配列は、上記(1)～(26)の少なくとも1つのアミノ酸基を含んでいればよく、例えば、2以上、3以上、4以上、5以上、6以上、7以上、8以上、9以上、10以上、11以上、12以上、13以上、14以上、15以上、16以上、17以上、18以上、19以上、20以上、21以上、22以上、23以上、24以上、25以上、または26全てを含んでいてもよい。

[0098] アミノ酸配列のアライメントは、例えば、公知のアライメントプログラム Clustal Omega を用いて作成することができる。Clustal Omega は、例えば、<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>より利用することができる。Clustal Omega を用いてアライメントを作成する際のパラメータは、例えばデフォルトの値を用いることができる。

[0099] 本実施形態のアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質は、配列番号20、40、41、127、128、130、131、および133のいずれか1つで表されるアミノ酸配列と50%以上（好ましくは55%以上、60%以上、65%以上、70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、93%以上、95%以上、または98%以上）の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ、アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有する、タンパク質であってもよい。

[0100] アルデヒドオキシダーゼ (Aldehyde oxidases) とは、生化学においてFADを補酵素として、酸素を用いてアルデヒドからカルボン酸への酸化反応を触媒する酵素群の総称である。本明細書において、アルデヒドオキシダーゼ活性を有することとは、アルデヒド基を有する化合物のアルデヒド基を酸化させ、カルボキシ基に変換する反応を触媒する活性をい

う。本明細書において、アルデヒドオキシダーゼ活性を有するタンパク質とは、アルデヒド基を有する化合物のアルデヒド基を酸化させ、カルボキシ基に変換する反応を触媒する活性を有するタンパク質をいう。

[0101] 一実施形態のアルデヒドオキシダーゼ活性を有するタンパク質は、*Escherichia coli* 由来アルデヒドオキシダーゼ、*Pseudomonas* 属細菌由来由来アルデヒドオキシダーゼ（例えば、*Pseudomonas putida* 由来アルデヒドオキシダーゼ、*Pseudomonas stutzeri* 由来アルデヒドオキシダーゼ、*Pseudomonas sp.* 由来アルデヒドオキシダーゼ等）、*Cavia porcellus* 由来アルデヒドオキシダーゼ、*Oryctolagus cuniculus* 由来アルデヒドオキシダーゼ、*Mus musculus* 由来アルデヒドオキシダーゼ、*Arabidopsis thaliana* 由来アルデヒドオキシダーゼ、*Solanum lycopersicum* 由来アルデヒドオキシダーゼ、*Rattus norvegicus* 由来アルデヒドオキシダーゼ、*Streptomyces moderatus* 由来アルデヒドオキシダーゼ、*Homo sapiens* 由来アルデヒドオキシダーゼ、*Culex quinquefasciatus* 由来アルデヒドオキシダーゼ、*Burkholderia sp.* 由来アルデヒドオキシダーゼ、*Arabidopsis thaliana* 由来アルデヒドオキシダーゼ、*Gluconobacter thailandicus* 由来アルデヒドオキシダーゼである。本実施形態のアルデヒドオキシダーゼ活性を有するタンパク質は、これらのアルデヒドオキシダーゼの変異タンパク質または相同タンパク質であって、アルデヒドオキシダーゼ活性を有するタンパク質であってもよい。また、これらのアルデヒドオキシダーゼのアミノ酸配列と60%以上（好ましくは、70%以上、75%以上、80%以上、90%以上、93%以上、95%以上、または98%以上）の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ、アルデヒドオキシダーゼ活性を有する、タンパク質であってもよい。

[0102] 本実施形態の酵素CをコードするDNAは、上記アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNAである。一実施形態のALDHをコードするDNAは、配列番号19～22、35～46、127～139、および207のいずれか1つで表されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列であり、その一例として、配列番号23～26、47～58、140～152および208のいずれか1つで表される塩基配列からなるDNAを挙げられる。

[0103] 別の実施形態の酵素CをコードするDNAは、アルデヒドデヒドロゲナーゼをコードするDNAであってもよく、例えば、配列番号19～22、35～46、127～139および207のいずれか1つで表されるアミノ酸配列からなるタンパク質の変異タンパク質または相同タンパク質をコードするDNAである。変異タンパク質または相同タンパク質をコードするDNAは、配列番号23～26、47～58、140～152、および208のいずれか1つで表された塩基配列の任意の位置において、1～50個の塩基が欠失、置換、挿入または付加されていてもよく、例えば、1～40個、1～30個、1～25個、1～20個、1～15個、1～10個、1～5個、1～4個、1～3個、1～2個、または1個の塩基が欠失、置換、挿入または付加されていてもよい。一実施形態のALDHをコードするDNAは、好ましくは、配列番号23～26、47～58、140～152および208のいずれか1つで表される塩基配列と少なくとも50%以上または60%以上、好ましくは70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、または90%以上、さらに好ましくは93%以上または95%以上、最も好ましくは98%以上の同一性を有する塩基配列からなり、より好ましくは配列番号23～26、47～58、140～152および208のいずれか1つで表される塩基配列からなる。

[0104] 一実施形態の酵素CをコードするDNAは、アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNAであってもよく、例えば、配列番号23～26、47～58、140～152および208のいずれか1つ

で表される塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAであってよい。ストリンジェントな条件下でハイブリダイズ可能なDNAとしては、例えばBLASTやFASTA等のプログラムを用いて計算した時に、配列番号23～26、47～58、140～152および208のいずれか1つで表される塩基配列と少なくとも50%以上または60%以上、好ましくは70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、または90%以上、さらに好ましくは93%以上または95%以上、最も好ましくは98%以上の同一性を有する塩基配列からなるDNAを挙げることができる。

[0105] 本実施形態の酵素CをコードするDNAは、例えば、上記アルデヒドオキシダーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNAであってもよい。

[0106] (3) 本発明のヒドロキシ基をアルデヒド基に変換する活性を有するタンパク質（酵素A）およびそれをコードするDNA

本明細書において、「ヒドロキシ基をアルデヒド基に変換する活性」とは、ヒドロキシ基を有する化合物のヒドロキシ基を酸化し、当該ヒドロキシ基をアルデヒド基に変換する活性を意味する。本明細書において、これらのタンパク質は併せて「酵素A」という。ヒドロキシ基をアルデヒド基に変換する活性を有するタンパク質は、「ヒドロキシ基をアルデヒド基に変換する酵素」ともいう。

[0107] 本発明のヒドロキシ基をアルデヒド基に変換する活性を有するタンパク質は、図6および図7に示すヒドロキシ基を有する化合物である、1,4-シクロヘキサンジメタノール（化合物1）、4-（ヒドロキシメチル）シクロヘキサノー1-カルバルデヒド（化合物2）、[4-（アミノメチル）シクロヘキシル]メタノール（化合物6）、4-（ヒドロキシメチル）シクロヘキサノー1-カルボン酸（化合物4）から、それぞれ図6に示すアルデヒド基を有する化合物である、4-（ヒドロキシメチル）シクロヘキサノー1-カルバルデヒド（化合物2）、1,4-シクロヘキサンジカルバルデヒド（化合物3）、4-（アミノメチル）シクロヘキサノー1-カルバルデヒド（

化合物 7)、または 4-ホルミルシクロヘキサノール-1-カルボン酸(化合物 5)への反応を触媒する活性を有するタンパク質である。

[0108] 本発明のヒドロキシ基をアルデヒド基に変換する活性を有する酵素(酵素 A)としては、例えば、オキシダーゼ(酸化酵素)活性を有するタンパク質、デヒドロゲナーゼ(脱水素酵素)活性を有するタンパク質、アルデヒドレダクターゼ活性を有するタンパク質等が挙げられる。

[0109] オキシダーゼ(oxidase)とは、分子状酸素を電子受容体として基質を酸化する酵素の総称である。本明細書において、酵素 A としてオキシダーゼ活性を有することとは、ヒドロキシ基を有する化合物のヒドロキシ基を酸化させ、アルデヒド基に変換する反応を触媒する活性をいう。本明細書において、酵素 A としてのオキシダーゼ活性を有するタンパク質とは、ヒドロキシ基を有する化合物のヒドロキシ基を酸化させ、アルデヒド基に変換する反応を触媒する活性を有するタンパク質をいい、本明細書において「OX」という場合がある。

[0110] 一実施形態の OX は、例えば、フラビンアデニンジヌクレオチド(FAD)結合オキシダーゼ、フェノールオキシダーゼであってよく、FAD 結合オキシダーゼであることが好ましい。なお、FAD 結合オキシダーゼとは、FAD が酵素の活性部位に結合し、FAD を補酵素として使用するオキシダーゼの総称であり、フェノールオキシダーゼとは、フェノール類を基質とするオキシダーゼの総称である。

[0111] 本明細書において、FAD 結合オキシダーゼは、上記ヒドロキシ基を有する化合物を基質にして、分子状酸素を電子受容体とし、基質のヒドロキシ基をアルデヒド基に変換する活性を有する酵素を意味する。本明細書において、FAD 結合オキシダーゼには、例えば、アルコールオキシダーゼ、コリンオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼ、サルコシンオキシダーゼ、L- α -グリセロリン酸オキシダーゼ等も含み得る。FAD 結合オキシダーゼとしては、コリンオキシダーゼが好ましい。フェノールオキシダーゼとしては、例えば、ラッカーゼ等が挙げられる。

[0112] 一実施形態の酵素AとしてのOXは、アルコールオキシダーゼであってもよく、例えば、*Pichia*属真菌由来アルコールオキシダーゼ（例えば、*Pichia pastoris*由来アルコールオキシダーゼ、*Pichia* sp. 由来アルコールオキシダーゼ等）、*Komagataella pastoris*由来アルコールオキシダーゼ、*Ogataea*属真菌由来アルコールオキシダーゼ（例えば、*Ogataea angusta*由来アルコールオキシダーゼ、*Ogataea thermomethanolica*由来アルコールオキシダーゼ、*Ogataea methanolica*由来アルコールオキシダーゼ等）、*Phanerodontia chrysosporium*由来アルコールオキシダーゼ、*Aspergillus*属真菌由来アルコールオキシダーゼ（例えば、*Aspergillus terreus*由来アルコールオキシダーゼ、*Aspergillus ochraceus*由来アルコールオキシダーゼ）、*Ochrobactrum* sp. 由来アルコールオキシダーゼ、*Thermoascus aurantiacus*由来アルコールオキシダーゼ、*Gloeophyllum trabeum*由来アルコールオキシダーゼ、*Colletotrichum graminicola*由来アルコールオキシダーゼ、*Arthrobacter globiformis*由来アルコールオキシダーゼ、*Comamonas* sp. 由来アルコールオキシダーゼ、*Cornu aspersum*由来アルコールオキシダーゼ、*Candida*属真菌由来アルコールオキシダーゼ（例えば、*Candida methanosorbosa*由来アルコールオキシダーゼ、*Candida* sp. 由来アルコールオキシダーゼ等）、または*Rhodococcus triatoma*e由来アルコールオキシダーゼ等である。

[0113] 一実施形態の酵素AとしてのOXは、コリンオキシダーゼであってもよく、例えば、*Arthrobacter*属細菌由来コリンオキシダーゼ（例えば、*Arthrobacter chlorophenolicus*由来コリンオキシダーゼ、*Arthrobacter globiformis*由

来コリンオキシダーゼ等)、*Achromobacter cholinophagum*由来コリンオキシダーゼ、*Arthrobacter paszens*由来コリンオキシダーゼ、*Fusarium oxysporum*由来コリンオキシダーゼ、*Cylindrocarpon didymum*由来コリンオキシダーゼ、*Glutamicibacter nicotiana*由来コリンオキシダーゼ、*Alcaligenes sp.* 由来コリンオキシダーゼ、*Rattus norvegicus*由来コリンオキシダーゼ、*Sinorhizobium meliloti*由来コリンオキシダーゼ、または*Solanum tuberosum*由来コリンオキシダーゼ等である。一実施形態のOXは好ましくは*Arthrobacter*属細菌由来コリンオキシダーゼであり、より好ましくは*Arthrobacter chlorophenolicus*由来コリンオキシダーゼである。

[0114] 一実施形態の酵素AとしてのOXは、グルコースオキシダーゼであってもよく、例えば、*Fusarium*属菌由来グルコースオキシダーゼ（例えば、*Fusarium graminearum*由来グルコースオキシダーゼ、*Fusarium oxysporum*由来グルコースオキシダーゼ等）、*Aspergillus*属真菌由来グルコースオキシダーゼ（例えば、*Aspergillus niger*由来グルコースオキシダーゼ、*Aspergillus sp.* 由来グルコースオキシダーゼ等）、*Cladosporium neopsychrotolerans*由来グルコースオキシダーゼ、*Penicillium*属菌由来グルコースオキシダーゼ（例えば、*Penicillium adametzii*由来グルコースオキシダーゼ、*Penicillium amagasakiense*由来グルコースオキシダーゼ、*Penicillium janthinellum*由来グルコースオキシダーゼ、*Penicillium sp.* 由来グルコースオキシダーゼ等）、*Streptomyces coelicolor*由来グルコースオキシダーゼ、または*Talaromyces*属菌由来グルコースオキシダーゼ（例えば、*Talaromyces funiculosus*由来

グルコースオキシダーゼ、*Talaromyces purpureogenus* 由来グルコースオキシダーゼ等) 等である。

[0115] 一実施形態の酵素AとしてのOXは、ラッカーゼであってもよく、例えば、*Trametes* 属細菌由来ラッカーゼ (例えば、*Trametes versicolor* 由来ラッカーゼ、*Trametes villosa* 由来ラッカーゼ等)、*Bacillus* 属細菌由来ラッカーゼ (例えば、*Bacillus subtilis* 由来ラッカーゼ、*Bacillus pumilus* 由来ラッカーゼ等)、*Escherichia coli* 由来ラッカーゼ、または *Pseudomonas putida* 由来ラッカーゼ等である。

[0116] 一実施形態の酵素AとしてのOXは、例えば、ヒドロキシ基をアルデヒド基に変換する活性を有し、かつ配列番号201で表されるアミノ酸配列と60%以上 (好ましくは、70%以上、75%以上、80%以上、90%以上、93%以上、95%以上、または98%以上) の同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質である。

[0117] 本実施形態の酵素AとしてのOXは、配列番号201で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質であってよい。配列番号201で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質は *Arthrobacter chlorophenolicus* 由来コリンオキシダーゼである。

[0118] 本明細書において、デヒドロゲナーゼ (dehydrogenase) は、 NAD(P)^+ などの補酵素を電子受容体として上記基質を酸化する酵素の総称である。本明細書において、酵素Aとしてデヒドロゲナーゼ活性を有することとは、ヒドロキシ基を有する化合物を基質にして、 NAD(P)^+ などの補酵素を電子受容体として基質を酸化する反応を触媒する活性をいう。本明細書において、酵素Aとしてデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質とは、デヒドロゲナーゼ活性を有することとは、ヒドロキシ基を有する化合物を基質にして、 NAD(P)^+ などの補酵素を電子受容体として上記基質を酸化する反応を触媒する活性を有するタンパク質をいう。

[0119] 一実施形態の酵素Aとしてデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質は、アルコールデヒドロゲナーゼであってもよく、例えば、*Sulfolobus solfataricus*由来アルコールデヒドロゲナーゼ、*Brevibacterium* sp. 由来アルコールデヒドロゲナーゼ、*Horse* 肝臓由来アルコールデヒドロゲナーゼ、または *Pseudomonas putida* 由来アルコールデヒドロゲナーゼ等である。

[0120] 本明細書において、アルデヒドレダクターゼ (aldehyde reductase) とは、生化学において、NAD (P) ⁺などの補酵素を電子受容体として、ヒドロキシ基を有する基質のヒドロキシ基をアルデヒド基に酸化する酵素を意味する。本明細書において、アルデヒドレダクターゼ活性を有することとは、NAD (P) ⁺などの補酵素を電子受容体として、ヒドロキシ基を有する基質のヒドロキシ基をアルデヒド基に酸化する反応を触媒する活性をいう。本明細書において、アルデヒドレダクターゼ活性を有するタンパク質とは、NAD (P) ⁺などの補酵素を電子受容体として、ヒドロキシ基を有する基質のヒドロキシ基をアルデヒド基に酸化する反応を触媒する活性を有するタンパク質をいう。

[0121] 一実施形態のアルデヒドレダクターゼ活性を有するタンパク質は、*Saccharomyces cerevisiae*由来アルデヒドレダクターゼ、*Rhodococcus ruber*由来アルデヒドレダクターゼ、*Magnusiomyces capitatus*アルデヒドレダクターゼ、*Saccharolobus solfataricus*由来アルデヒドレダクターゼ、*Thermus thermophilus*由来アルデヒドレダクターゼ、*Corynebacterium glutamicum*由来アルデヒドレダクターゼ、*Escherichia coli*由来アルデヒドレダクターゼ、*Geobacillus*属細菌由来アルデヒドレダクターゼ、*Pseudomonas putida*由来アルデヒドレダクターゼ等である。

[0122] ヒドロキシ基をアルデヒド基に変換する活性を有することは、例えば以下

の方法により確認することができる。まず、後述の方法により、上記活性を確認しようとするタンパク質をコードするDNAを含む組換え体DNAを製作する。次に、該組換え体DNAで、大腸菌などの微生物を形質転換して得られる微生物を培養し、該培地に化合物1、化合物2、化合物6、または化合物4を添加し目的のアルデヒドを生成させる。最後に、HPLCなどを用いる一般的な分析方法を用いて菌体内や培養上清中の目的のアルデヒドを検出することにより、対象タンパク質がヒドロキシ基をアルデヒド基に変換する活性を有していることを確認することができる。

[0123] 一実施形態の酵素AをコードするDNAは、コリンオキシダーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNAであってもよく、例えば、配列番号201で表されるアミノ酸配列と60%以上（好ましくは、70%以上、75%以上、80%以上、90%以上、93%以上、95%以上、または98%以上）の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ、コリンオキシダーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNAである。本明細書において、DNAは遺伝子であってもよく、遺伝子の一部であってもよい。

[0124] 本実施形態の酵素AをコードするDNAは、コリンオキシダーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNAであってもよく、例えば、配列番号201で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列であり、その一例として、配列番号202で表される塩基配列からなるDNAを挙げられる。

[0125] 別の実施形態の酵素AをコードするDNAは、コリンオキシダーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNAであってもよく、例えば、配列番号201で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質の変異タンパク質または相同タンパク質をコードするDNAである。変異タンパク質または相同タンパク質をコードするDNAは、配列番号202で表された塩基配列の任意の位置において、1～50個の塩基が欠失、置換、挿入または付加されていてもよく、例えば、1～40個、1～30個、1～25個、1～20個、1～15個、1～10個、1～5個、1～4個、1～3個、1～2個、または1個

の塩基が欠失、置換、挿入または付加されていてもよい。また、変異タンパク質または相同タンパク質をコードするDNAは、好ましくは、配列番号202で表される塩基配列と少なくとも60%以上、好ましくは70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、または93%以上、さらに好ましくは95%以上、最も好ましくは98%以上の同一性を有する塩基配列からなり、より好ましくは配列番号202で表される塩基配列からなる。

[0126] 配列番号202で表される塩基配列からなるDNA、または配列が分かっている相同タンパク質をコードするDNAは、ゲノムDNAを鋳型に適切なプライマーを用いてPCRにて増幅してもよい。その際に、プライマーの末端に制限酵素サイトなどの発現ベクターへのクローニングのためのDNA配列を含ませてもよい。相同タンパク質はまた、検索に基づきプローブまたはプライマーを設計し、当該DNAを有する微生物を用いた相同タンパク質をコードするDNAを取得することができる。変異タンパク質をコードするDNAは、エラープローンPCR、PCRによる部分特異的変異導入法、または市販の部分特異的変異導入キット等によって取得することができる。さらに、一実施形態のATをコードするDNAは、決定されたDNAの塩基配列に基づいて、日本テクノサービス社製NTS MシリーズDNA合成装置等を用いて化学合成することにより、目的とするDNAを調製することもできる。

[0127] 一実施形態の酵素AをコードするDNAは、また、コリンオキシダーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNAであってもよく、例えば、配列番号202で表される塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAであってよい。ストリンジェントな条件下でハイブリダイズ可能なDNAとしては、例えばBLASTやFASTA等のプログラムを用いて計算した時に、配列番号202で表される塩基配列と少なくとも50%以上または60%以上、好ましくは70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、または90%以上、さらに好ま

しくは93%以上または95%以上、最も好ましくは98%以上の同一性を有する塩基配列からなるDNAを挙げることができる。

[0128] 一実施形態の酵素AをコードするDNAは、例えば、酵素Aとしてのオキシダーゼ活性を有するタンパク質、デヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質およびアルデヒドレダクターゼ活性を有するタンパク質をコードするDNAであってもよい。

[0129] 3. 本発明の組換え体DNA

本発明の組換え体DNAは、本発明のヒドロキシ基を有する化合物のヒドロキシ基をアルデヒド基に変換する活性を有するタンパク質（酵素A）をコードするDNA、本発明のアルデヒド基とアミノ基を可逆的に変換する活性を有するタンパク質（酵素B）をコードするDNA、および／または、本発明のアルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有するタンパク質（酵素C）をコードするDNAを含み、これらの酵素のうち、同じ酵素活性を有する1種の酵素をコードするDNAを含んでもよく、異なる酵素活性を有する複数種の酵素をコードするDNAを含んでもよい。複数種の酵素をコードするDNAを含む場合は、酵素Aと酵素B、酵素Aと酵素C、酵素Bと酵素C、酵素Aと酵素Bと酵素C等の組み合わせをコードするDNAを含んでもよい。ここで、同じ酵素活性を有する酵素（例えば、酵素A）としては、複数の異なる酵素を含んでもよい。

[0130] 本発明の組換え体DNAはまた、後述するアラニンデヒドロゲナーゼまたはグルタミン酸デヒドロゲナーゼをコードするDNA、および／または、NADHオキシダーゼをコードするDNAをさらに含んでもよい。本発明の組換え体DNAは、一つの組換え体DNAに1種類のみの酵素をコードするDNAを含んでもよく、複数種類の酵素をコードするDNAを含んでもよい。複数種類の場合は、それぞれの酵素は一つのプロモーターによって制御されていてもよく、別々のプロモーターによって制御されていてもよい。

[0131] 本発明の組換え体DNAは、宿主細胞において自律複製可能なベクターおよび／または宿主細胞の染色体への組込が可能なベクターであって、上記D

N Aを転写できるベクターである。

[0132] 細菌等の原核生物を宿主細胞として用いる場合は、本発明の組換え体DNAは、上記各種酵素をコードするDNAのほかに、プロモーター、リボソーム結合配列、および転写終結配列をさらに含むことが好ましく、さらに、プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。ここで、リボソーム結合配列であるシャインーダルガノ（Shine-Dalgarno）配列と開始コドンの間は、適当な距離、例えば6～18塩基に調節することが好ましい。本発明の組換え体DNAにおいては、上記各種酵素をコードするDNAの発現には転写終結配列は必ずしも必要ではないが、構造遺伝子の直下に転写終結配列を配置することが好ましい。

[0133] ベクターとしては、目的のDNAを宿主に導入し、増殖、発現させるための適当なDNA分子であれば特に限定されず、プラスミドのみならず、例えば、人工染色体、トランスポゾンを用いたベクター、コスミドを用いてもよい。

[0134] 本発明の組換え体DNAを導入する宿主細胞としてエシェリヒア属に属する微生物を用いる場合、ベクターとしては、例えば、pCold1、pSTV28、pSTV29、pUC118（いずれもタカラバイオ社製）、pMW118、pMW119、pMW218（いずれもニッポンジーン社製）、pET21a、pET28a、pCDF-1b、pRSF-1b（いずれもメルクミリポア社製）、pMAL-c5x（ニューイングランドバイオラブス社製）、pGEX-4T-1、pTrc99A（いずれもGEヘルスケアバイオサイエンス社製）、pTrcHis、pSE280（いずれもサーモフィッシャー・サイエンティフィック社製）、pGEMEX-1（プロメガ社製）、pQE-30、pQE-60、pQE80L（いずれもキアゲン社製）、pET-3、pBluescript11 SK（+）、pBluescript11 KS（-）（いずれもアジレント・テクノロジー社製）、pKYP10（特開昭58-110600号公報）、pKYP200 [Agric. Biol. Chem., 48, 669 (1984)]

、pLSA1 [Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)]、pGEL1 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 82, 4306 (1985)]、pTrs30 [Escherichia coli JM109/pTrs30 (FERM BP-5407) より調製]、pTrs32 [Escherichia coli JM109/pTrs32 (FERM BP-5408) より調製]、pTK31 [APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 2007, Vol. 73, No. 20, p6378-6385]、pPE167 (Appl. Environ. Microbiol. 2007, 73:6378-6385)、pPAC31 (WO98/12343)、pUC19 [Gene, 33, 103 (1985)]、pPA1 (特開昭63-233798号公報)等を挙げることができる。

[0135] 上記のベクターを用いる場合のプロモーターとしては、エシェリヒア属に属する微生物の細胞中で機能するものであればいかなるものでもよいが、例えば、trpプロモーター、gapAプロモーター、lacプロモーター、PLプロモーター、PRプロモーター、PSEプロモーター等の、Escherichia coliやファージ等に由来するプロモーターを用いることができる。また、trpプロモーターを2つ直列させたプロモーター、tacプロモーター、trcプロモーター、lacT5プロモーター、lacT7プロモーター、letIプロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーターも用いることもできる。

[0136] 本発明の組換え体DNAを導入する宿主細胞としてコリネ型細菌を用いる場合、ベクターとしては、例えば、pCG1 (特開昭57-134500号公報)、pCG2 (特開昭58-35197号公報)、pCG4 (特開昭57-183799号公報)、pCG11 (特開昭57-134500号公報)、pCG116、pCE54、pCB101 (いずれも特開昭58-105999号公報)、pCE51、pCE52、pCE53 [いずれもMol

ecular and General Genetics, 196, 175 (1984)]等を挙げることができる。

[0137] 上記のベクターを用いる場合のプロモーターとしては、コリネ型細菌の細胞中で機能するものであればいかなるものでもよいが、例えば、P54-6プロモーター [Appl. Microbiol. Biotechnol., 53, p674-679 (2000)]を用いることができる。

[0138] 本発明の組換え体DNAを導入する宿主細胞として酵母菌株を用いる場合、ベクターとしては、例えば、YE p13 (ATCC37115)、YE p24 (ATCC37051)、YC p50 (ATCC37419)、pHS19、pHS15などを挙げることができる。

[0139] 上記のベクターを用いる場合のプロモーターとしては、酵母菌株の細胞中で機能するものであればいかなるものでもよいが、例えば、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター、gal1プロモーター、gal10プロモーター、ヒートショックポリペプチドプロモーター、MF α 1プロモーター、CUP1プロモーター等のプロモーターを挙げることができる。

[0140] 本発明の組換え体DNAは、例えば、In-Fusion (商標) HD Cloning Kit (タカラバイオ社)を用いる、または、所望の酵素をコードするDNA断片を制限酵素処理する等して、上記の適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することによって作製することができる。

[0141] 4. 本発明の組換え細胞

本発明の組換え細胞は、本発明のDNAを含むか、または、本発明の組換え体DNAで宿主細胞を形質転換して得られる組換え細胞である。また、後述するアラニンデヒドロゲナーゼまたはグルタミン酸デヒドロゲナーゼをコードするDNA、および／または、NADHオキシダーゼをコードするDNAをさらに含んでもよい。組換え細胞において、本発明のDNAまたは組換え体DNAはゲノムに組み込まれていてもよく、自律複製可能なプラスミドとして存在していてもよいが、本発明のDNAが転写可能な状態で含まれて

いる。1つの宿主細胞を1種類のためのDNAを含んでいてもよく、2種類以上のDNAを含んでよい。

[0142] 宿主細胞は、原核生物、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等のいずれであってもよいが、好ましくは、原核生物または酵母菌株を、より好ましくは、エシェリヒア属、セラチア属、バチルス属、ブレヴィバクテリウム属、コリネバクテリウム属、ミクロバクテリウム属、若しくはシュドモナス属等に属する原核生物、またはサッカロマイセス属、シゾサッカロマイセス属、クルイベロミセス属、トリコスポロン属、シワニオミセス属、ピチア属、若しくはキャンディダ属等に属する酵母菌株を、最も好ましくは、*Escherichia coli* BL21 codon plus、*Escherichia coli* XL1-Blue、*Escherichia coli* XL2-Blue（いずれもアジレント・テクノロジー社製）、*Escherichia coli* BL21 (DE3)（ノバジェン社製）、*Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS（メルクミリポア社製）、*Escherichia coli* DH5 α 、*Escherichia coli* HST08Premium、*Escherichia coli* HST02、*Escherichia coli* HST04 dam-/dcm-、*Escherichia coli* JM109、*Escherichia coli* HB101、*Escherichia coli* CJ236、*Escherichia coli* BMH71-18 mutS、*Escherichia coli* MV1184、*Escherichia coli* TH2（いずれもタカラバイオ社製）、*Escherichia coli* W、*Escherichia coli* JM101、*Escherichia coli* W3110、*Escherichia coli* MG1655、*Escherichia coli* DH1、*Escherichia coli* MC1000、*Escherichia coli* W1485、*Escherichia coli* MP347、*Escherichia coli* NM52

2、*Escherichia coli* ATCC9637、*Serratia ficaria*、*Serratia fonticola*、*Serratia liquefaciens*、*Serratia marcescens*、*Bacillus subtilis*、*Bacillus amyloliquefaciens*、*Brevibacterium immariophilum* ATCC14068、*Brevibacterium saccharolyticum* ATCC14066、*Corynebacterium ammoniagenes*、*Corynebacterium glutamicum* ATCC13032、*Corynebacterium glutamicum* ATCC14067、*Corynebacterium glutamicum* ATCC13869、*Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC13870、*Microbacterium ammoniaphilum* ATCC15354、若しくは*Pseudomonas* sp. D-0110等の原核生物、または*Saccharomyces cerevisiae*、*Schizosaccharomyces pombe*、*Kluyveromyces lactis*、*Trichosporon pullulans*、*Schwanniomyces alluvius*、*Pichia pastoris*、若しくは*Candida utilis*等の酵母菌株を挙げることができる。

[0143] 本発明の組換え体DNAを宿主細胞において自律複製可能なプラスミドとして導入する方法としては、例えば、カルシウムイオンを用いる方法 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 69, 2110 (1972)]、プロトプラスト法 (日本国特開昭63-248394号公報)、エレクトロポレーション法 [Nucleic Acids Res., 16, 6127 (1988)]、並びに、スフェロプラスト法 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 81, 4889 (1984)]、酢酸リチウム法 [J. Bacteriol., 1

53, 163 (1983)] 等の方法を挙げることができる。

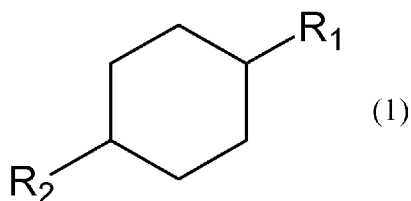
[0144] 本発明の組換え体DNAを宿主細胞の染色体中に導入する方法としては、例えば、相同組換え法を挙げることができる。相同組換え法としては、例えば、導入したい宿主細胞内では自律複製できない薬剤耐性遺伝子を有するプラスミドDNAと連結して作製できる相同組換え用プラスミドを用いる方法を挙げることができる。Escherichia coliで頻用される相同組換えを利用した方法としては、例えば、ラムダファージの相同組換え系を利用して、組換え体DNAを導入する方法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 6641-6645 (2000)]を挙げることができる。

[0145] さらに、組換え体DNAと共に染色体上に組み込まれた枯草菌レバンシュークラゼによって大腸菌がスクロース感受性となることを利用した選択法や、ストレプトマイシン耐性の変異rpsL遺伝子を有する大腸菌に野生型rpsL遺伝子を組み込むことによって大腸菌がストレプトマイシン感受性となることを利用した選択法[Mol. Microbiol., 55, 137 (2005)、Biosci. Biotechnol. Biochem., 71, 2905 (2007)]等を用いて、宿主細胞の染色体DNA上の目的の領域が本発明のDNAまたは組換え体DNAに置換された大腸菌を取得することができる。

[0146] 5. 本発明の製造方法

本発明の製造方法は、下記一般式(1)で表される化合物を基質化合物または中間体化合物として、ヒドロキシ基をアルデヒド基に変換する活性を有するタンパク質、アルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有するタンパク質、およびアルデヒド基とアミノ基を可逆的に変換する活性を有するタンパク質から選択される少なくとも一つの酵素の存在下で、シス体および／またはトランス体の4-(アミノメチル)シクロヘキサノール-1-カルボン酸を製造する方法である。

[化6]



[式中、 R_1 および R_2 は、それぞれ独立して CH_2OH 、 CHO 、 $COOH$ 、または CH_2NH_2 である（但し、 R_1 と R_2 の一方が $COOH$ であり、他方が CH_2NH_2 である場合、および R_1 と R_2 が共に $COOH$ である場合を除く）]

具体的には、上記一般式（１）で表される化合物は化合物１，２，３，４，５，６，７または８のいずれか一つである。

[0147] 本発明の製造方法における、ヒドロキシ基をアルデヒド基に変換する活性を有するタンパク質、アルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有するタンパク質、およびアルデヒド基とアミノ基を可逆的に変換する活性を有するタンパク質は、それぞれ酵素Ａ、酵素Ｃおよび酵素Ｂであり、本発明の製造方法において、これらの酵素の１種（酵素Ａのみ、酵素Ｂのみ、または酵素Ｃのみ）の存在下であっても、２種（酵素Ａ＋酵素Ｂ、酵素Ａ＋酵素Ｃ、または、酵素Ｂ＋酵素Ｃ）または３種全部（酵素Ａ＋酵素Ｂ＋酵素Ｃ）の存在下で製造してもよい。本発明の製造方法において、基質化合物または中間体化合物として、化合物１～８を用い得る。その場合、各酵素反応（合成経路）および各酵素反応に使用される酵素は、図６および図７に示す。ここで、本発明の製造方法における、各化合物、酵素、酵素反応は上記「１．化合物および酵素反応」、および「２．本発明のタンパク質およびＤＮＡ」で記載のとおりである。

[0148] 化合物１～８の少なくとも１つを中間体化合物とする場合、酵素Ａ、酵素Ｂおよび酵素Ｃの少なくとも１種に加え、化合物１～８の生成に必要な任意の酵素および任意の基質化合物の存在下で、化合物１～８の少なくとも１つを生成させてもよい。

[0149] 一実施形態の製造方法は、ヒドロキシ基をアルデヒド基に変換する活性を有するタンパク質（酵素A）、アルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有するタンパク質（酵素C）、およびアルデヒド基とアミノ基を可逆的に変換する活性を有するタンパク質（酵素B）の存在下で行われる。例えば、 R_1 と R_2 の一方が CH_2OH であり、他方が CH_2OH 、 CHO 、または CH_2NH_2 である、一般式（1）で表される化合物（化合物1、2または6）を基質化合物または中間体化合物とする場合、ヒドロキシ基をアルデヒド基に変換する活性を有するタンパク質（酵素A）、アルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有するタンパク質（酵素C）、およびアルデヒド基とアミノ基を可逆的に変換する活性を有するタンパク質（酵素B）の存在下で行うことが好ましい。

[0150] また、 R_1 と R_2 の一方が CH_2NH_2 であり、他方が CHO である、一般式（1）で表される化合物（化合物7）を基質化合物または中間体化合物とする場合、アルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有するタンパク質（酵素C）の存在下で行うことが好ましい。

[0151] この場合、上記一般式（1）において、 R_1 と R_2 の一方が CH_2NH_2 であり、他方が CHO である、化合物（すなわち化合物7）が下記（i）および（ii）のいずれか一つの基質化合物または中間体化合物から生じた化合物であることがより好ましい。

（i） R_1 と R_2 が共に CHO である化合物（すなわち化合物3）

（ii） R_1 と R_2 の一方が CH_2NH_2 であり、他方が CH_2OH である化合物（すなわち化合物6）

[0152] R_1 と R_2 の一方が CHO であり、他方が $COOH$ である、一般式（1）で表される化合物（化合物5）を基質化合物または中間体化合物とする場合、アルデヒド基とアミノ基を可逆的に変換する活性を有するタンパク質（酵素B）の存在下で行うことが好ましい。

[0153] この場合、上記一般式（1）において、 R_1 と R_2 の一方が $COOH$ であり、他方が CHO で表される化合物（すなわち化合物5）が下記（i）および

(i i) のいずれか一つの基質化合物または中間体化合物から生じた化合物であることがより好ましい。

(i) R_1 と R_2 が共にCHOである化合物（すなわち化合物3）

(i i) R_1 と R_2 の一方がCOOHであり、他方が CH_2OH である化合物（すなわち化合物4）

[0154] R_1 と R_2 の一方がCHOであり、他方が CH_2NH_2 、もしくはCHOである、または R_1 と R_2 が共に CH_2NH_2 である、一般式（1）で表される化合物（化合物7、3または8）を基質化合物または中間体化合物とする場合、アルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有するタンパク質（酵素C）、およびアルデヒド基とアミノ基を可逆的に変換する活性を有するタンパク質（酵素B）の存在下で行うことが好ましい。

[0155] R_1 と R_2 の一方が CH_2OH であり、他方が CH_2NH_2 である、一般式（1）で表される化合物（化合物6）を基質化合物または中間体化合物とする場合、ヒドロキシ基をアルデヒド基に変換する活性を有するタンパク質（酵素A）、およびアルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有するタンパク質（酵素C）の存在下で行うことが好ましい。

[0156] R_1 と R_2 の一方が CH_2OH であり、他方がCOOHである、一般式（1）で表される化合物（化合物4）を基質化合物または中間体化合物とする場合、ヒドロキシ基をアルデヒド基に変換する活性を有するタンパク質（酵素A）、およびアルデヒド基とアミノ基を可逆的に変換する活性を有するタンパク質（酵素B）の存在下で行うことが好ましい。

[0157] ヒドロキシ基をアルデヒド基に変換する活性を有するタンパク質（酵素A）が、コリンオキシダーゼであることが好ましく、コリンオキシダーゼが、配列番号201で示されるアミノ酸配列と60%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質であることが好ましい。アルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有するタンパク質（酵素C）が、アルデヒドデヒドロゲナーゼであることが好ましく、アルデヒドデヒドロゲナーゼが、配列番号19～22、35～46および127～139のいずれか1つで表される

アミノ酸配列と50%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質であることが好ましい。アルデヒド基とアミノ基を可逆的に変換する活性を有するタンパク質（酵素B）が、アミノ基転移酵素であることが好ましく、アミノ基転移酵素が、配列番号1～4および103～105のいずれか1つで表されるアミノ酸配列と60%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質であることが好ましい。

[0158] 基質化合物として、化合物1または化合物8が好ましく用いられ、化合物1がより好ましく用いられる。

[0159] 酵素A、酵素B、および／または酵素Cの存在下とは、反応系において、反応を触媒できるように、活性のある酵素A、酵素B、および／または酵素Cが存在していることを意味する。例えば、本発明の酵素A、酵素B、および／または酵素Cを反応系に添加するか、あるいは、本発明の酵素A、酵素B、および／または酵素CをコードするDNAを含み、当該酵素を発現できる細胞、または本発明の酵素A、酵素B、および／または酵素CをコードするDNAを含む組換え体DNAで宿主細胞を形質転換して得られる組換え細胞であって当該酵素を発現できる細胞を作用させる工程を含む。ここで、細胞を作用させることとは、細胞を培養する系に、基質物質を添加し、細胞が発現するタンパク質と作用させることである。

[0160] 一実施形態の製造方法は、1, 4-ビス（アミノメチル）シクロヘキサン（化合物8）を基質化合物とする製造方法であって、

（i）アルデヒド基とアミノ基を可逆的に変換する活性を有するタンパク質（酵素B）の存在下、1, 4-ビス（アミノメチル）シクロヘキサン（化合物8）から4-（アミノメチル）シクロヘキサール-1-カルバルデヒド（化合物7）を製造する工程と、

（ii）アルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有するタンパク質（酵素C）の存在下、4-（アミノメチル）シクロヘキサール-1-カルバルデヒド（化合物7）から4-（アミノメチル）シクロヘキサール-1-カルボン酸（目的化合物）を製造する工程と

を含む。

[0161] 別の実施形態の製造方法は、1, 4-シクロヘキサンジメタノール（化合物1）を基質化合物とする製造方法であって、

（i i i）ヒドロキシ基をアルデヒド基に変換する活性を有するタンパク質（酵素A）の存在下において、1, 4-シクロヘキサンジメタノール（化合物1）のヒドロキシ基をアルデヒド基に変換し、4-（ヒドロキシメチル）シクロヘキサノール-1-カルバルデヒド（化合物2）を製造する工程（工程（i i i））を含む。

[0162] 4-（ヒドロキシメチル）シクロヘキサノール-1-カルバルデヒド（化合物2）を基質化合物または中間体化合物として、目的化合物の4-（アミノメチル）シクロヘキサノール-1-カルボン酸を製造する方法は、図6および図7に示すように、複数の経路を経由する可能性があり、所望の反応経路に応じて、基質化合物または中間体化合物、および酵素を選択すればよい。それぞれの酵素を用いて変換できる化合物は、以下のとおりである。

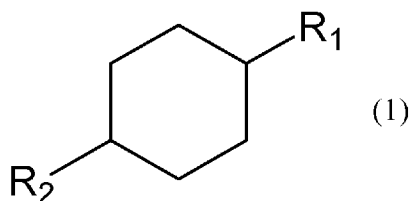
酵素A：化合物1から化合物2、化合物2から化合物3、化合物4から化合物5、化合物6から化合物7（工程（i i i）と同様に行うことができる）

酵素B：化合物8から化合物7、化合物7から化合物3（可逆的）、化合物5から目的化合物（可逆的）、化合物2から化合物6（可逆的）（工程（i）と同様に行うことができる）

酵素C：化合物2から化合物4、化合物3から化合物5、化合物7から目的化合物（工程（i i）と同様に行うことができる）

[0163] 別の実施形態の製造方法は、下記一般式（1）で表される化合物を基質化合物として、ヒドロキシ基をアルデヒド基に変換する活性を有するタンパク質、アルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有するタンパク質、およびアルデヒド基とアミノ基を可逆的に変換する活性を有するタンパク質から選択される少なくとも一つの酵素の存在下で、シス体および／またはトランス体の4-（アミノメチル）シクロヘキサノール-1-カルボン酸を製造する方法である。

[化7]

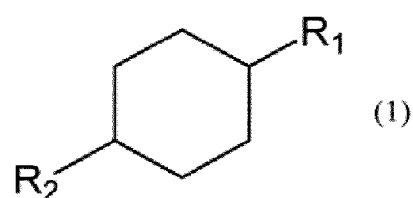


[式中、 R_1 および R_2 は、それぞれ独立して CH_2OH 、 CHO 、 $COOH$ 、または CH_2NH_2 である（但し、 R_1 と R_2 の一方が $COOH$ であり、他方が CH_2NH_2 である場合、 R_1 と R_2 が共に $COOH$ である場合、および一般式（１）で表される化合物が R_1 と R_2 の一方が CH_2NH_2 であって、他方が CHO または CH_2NH_2 である場合を除く）]

具体的には、上記一般式（１）で表される化合物は、化合物１、２、３、４、５および６のいずれか一つである。

[0164] 別の実施形態の製造方法は、下記一般式（１）で表される化合物を中間体化合物として、ヒドロキシ基をアルデヒド基に変換する活性を有するタンパク質、アルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有するタンパク質、およびアルデヒド基とアミノ基を可逆的に変換する活性を有するタンパク質から選択される少なくとも一つの酵素の存在下で、シス体および／またはトランス体の４－（アミノメチル）シクロヘキサノール１－カルボン酸を製造する方法である。

[化8]



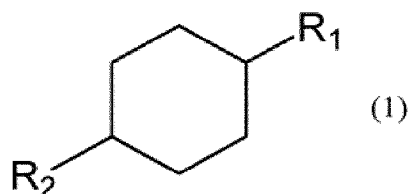
[式中、 R_1 および R_2 は、それぞれ独立して CH_2OH 、 CHO 、 $COOH$ 、または CH_2NH_2 である（但し、 R_1 と R_2 の一方が $COOH$ であり、他方が CH_2NH_2 である場合、 R_1 と R_2 が共に $COOH$ である場合、一般式（１）で表される化合物が R_1 と R_2 の一方が CH_2NH_2 であって、他方が CH_2NH_2 である場合および、

R_1 と R_2 の一方が CH_2NH_2 であり、他方が CHO であって、化合物8から生じた中間体化合物である場合、を除く)]

具体的には、上記一般式(1)で表される化合物は、化合物1、2、3、4、5、6および7のいずれか一つであって、化合物7が化合物8から生じた中間体化合物である場合を除く。

[0165] 別の実施形態の製造方法は、下記一般式(1)で表される化合物を基質化合物または中間体化合物として、ヒドロキシ基をアルデヒド基に変換する活性を有するタンパク質、アルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有するタンパク質、およびアルデヒド基とアミノ基を可逆的に変換する活性を有するタンパク質から選択される少なくとも一つの酵素の存在下で、シス体および／またはトランス体の4-(アミノメチル)シクロヘキサノール-1-カルボン酸を製造する方法である。

[化9]



[式中、 R_1 および R_2 は、それぞれ独立して CH_2OH 、 CHO 、 $COOH$ 、または CH_2NH_2 であり、かつ、上記一般式(1)で表される化合物が、

(i) R_1 と R_2 の一方が $COOH$ であり、他方は CH_2OH または CHO である、基質化合物または中間体化合物(すなわち化合物4または化合物5)、

(ii) R_1 と R_2 の一方が CH_2NH_2 であり、他方は CH_2OH である、基質化合物または中間体化合物(すなわち化合物6)、

および、

(iii) R_1 と R_2 が共に CHO であるか、または R_1 と R_2 の一方が CH_2OH であり他方が CH_2NH_2 である一般式(1)で表される化合物(すなわち化合物3または6)から生じた化合物であって、 R_1 と R_2 の一方が CH_2NH_2 であり、他方が CHO である中間体化合物(すなわち化合物7)、

の少なくともいずれか一つである。]

具体的には、上記一般式(1)で表される化合物は、基質化合物としての化合物1、2、3、4、5および6の少なくともいずれか一つであり、あるいは、中間体化合物としての化合物1、2、3、4、5および6、ならびに、化合物3もしくは6から生じた化合物7の少なくともいずれか一つである。

[0166] 一実施形態の製造方法は、上記一般式(1)において、 R_1 と R_2 が共にCHOである化合物(すなわち化合物3)、 R_1 と R_2 の一方がCOOHであり、他方が CH_2OH である化合物(すなわち化合物4)または、 R_1 と R_2 の一方が CH_2NH_2 であり、他方が CH_2OH である化合物(すなわち化合物6)のいずれか一つを基質化合物または中間体化合物とし、ヒドロキシ基をアルデヒド基に変換する活性を有するタンパク質、アルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有するタンパク質、およびアルデヒド基とアミノ基を可逆的に変換する活性を有するタンパク質から選択される少なくとも一つの酵素の存在下で、シス体および／またはトランス体の4-(アミノメチル)シクロヘキサノール-1-カルボン酸を製造する方法であることが好ましい。

[0167] 当該実施形態の製造方法は、上記一般式(1)において、 R_1 と R_2 が共にCHOである化合物(すなわち化合物3)を基質化合物または中間体化合物とする場合、アルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有するタンパク質、およびアルデヒド基とアミノ基を可逆的に変換する活性を有するタンパク質の存在下で、

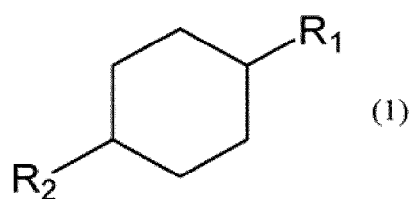
上記一般式(1)において、 R_1 と R_2 の一方がCOOHであり、他方が CH_2OH である化合物(すなわち化合物4)を基質化合物または中間体化合物とする場合、ヒドロキシ基をアルデヒド基に変換する活性を有するタンパク質、およびアルデヒド基とアミノ基を可逆的に変換する活性を有するタンパク質の存在下で、または、

上記一般式(1)において、 R_1 と R_2 の一方が CH_2NH_2 であり、他方が CH_2OH である化合物(すなわち化合物6)を基質化合物または中間体化合物とする場合、ヒドロキシ基をアルデヒド基に変換する活性を有するタンパク

質、およびアルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有するタンパク質の存在下で、シス体および／またはトランス体の4-(アミノメチル)シクロヘキサノール-1-カルボン酸を製造する方法であることがより好ましい。

[0168] 一実施形態の製造方法（以下、「実施形態Aの製造方法」とも記載する。）は、下記一般式（1）で表される化合物を基質化合物または中間体化合物として、ヒドロキシ基をアルデヒド基に変換する活性を有するタンパク質、アルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有するタンパク質、およびアルデヒド基とアミノ基を可逆的に変換する活性を有するタンパク質から選択される少なくとも一つの酵素の存在下で、シス体および／またはトランス体の4-(アミノメチル)シクロヘキサノール-1-カルボン酸を製造する方法であって、上記アルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有するタンパク質が配列番号127～139のいずれか1つで表されるアミノ酸配列、またはこれらのいずれか1つで表されるアミノ酸配列と50%以上、60%以上、70%以上、75%以上、80%以上、90%以上、93%以上、95%以上、または98%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質である方法であってもよい。

[化10]



[式中、 R_1 および R_2 は、それぞれ独立して CH_2OH 、 CHO 、 $COOH$ 、または CH_2NH_2 である（但し、 R_1 と R_2 の一方が $COOH$ であり、他方が CH_2NH_2 である場合、および R_1 と R_2 が共に $COOH$ である場合を除く）]

具体的には、上記一般式（1）で表される化合物は化合物1，2，3，4，5，6，7または8のいずれか一つである。

[0169] 実施形態Aの製造方法は、上記ヒドロキシ基をアルデヒド基に変換する活

性を有するタンパク質、上記アルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有するタンパク質、および上記アルデヒド基とアミノ基を可逆的に変換する活性を有するタンパク質の存在下で製造する方法であることが好ましい。

[0170] 実施形態Aの製造方法は、アルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有するタンパク質の存在下でシス体および／またはトランス体の4-（アミノメチル）シクロヘキサノール-1-カルボン酸を製造する方法であって、

上記一般式（1）において、 R_1 と R_2 の一方が CH_2NH_2 であり、他方が CHO である、化合物（すなわち化合物7）を基質化合物または中間体化合物とする、シス体および／またはトランス体の4-（アミノメチル）シクロヘキサノール-1-カルボン酸を製造する方法であることが好ましい。

[0171] この場合、上記一般式（1）において、 R_1 と R_2 の一方が CH_2NH_2 であり、他方が CHO である、化合物（すなわち化合物7）が下記（i）および（ii）のいずれか一つの基質化合物または中間体化合物から生じた化合物であることがより好ましい。

（i） R_1 と R_2 が共に CHO である化合物（すなわち化合物3）

（ii） R_1 と R_2 の一方が CH_2NH_2 であり、他方が CH_2OH である化合物（すなわち化合物6）

[0172] 実施形態Aの製造方法は、アルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有するタンパク質およびアルデヒド基とアミノ基を可逆的に変換する活性を有するタンパク質の存在下でシス体および／またはトランス体の4-（アミノメチル）シクロヘキサノール-1-カルボン酸を製造する方法であって、

上記一般式（1）において、 R_1 と R_2 が共に CHO である化合物（すなわち化合物3）および／または上記一般式（1）において、 R_1 と R_2 が共に CH_2NH_2 である、化合物（すなわち化合物8）を基質化合物または中間体化合物とする、シス体および／またはトランス体の4-（アミノメチル）シクロヘキサノール-1-カルボン酸を製造する方法であることが好ましい。

[0173] 実施形態Aの製造方法は、アルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有するタンパク質およびヒドロキシ基をアルデヒド基に変換する活性を有す

るタンパク質の存在下でシス体および／またはトランス体の4-(アミノメチル)シクロヘキサノール-1-カルボン酸を製造する方法であって、

上記一般式(1)において、 R_1 と R_2 の一方が CH_2NH_2 であり、他方が CH_2OH である化合物(すなわち化合物6)を基質化合物または中間体化合物とする、シス体および／またはトランス体の4-(アミノメチル)シクロヘキサノール-1-カルボン酸を製造する方法であることが好ましい。

[0174] 実施形態Aの製造方法は、ヒドロキシ基をアルデヒド基に変換する活性を有するタンパク質、アルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有するタンパク質、およびアルデヒド基とアミノ基を可逆的に変換する活性を有するタンパク質の存在下でシス体および／またはトランス体の4-(アミノメチル)シクロヘキサノール-1-カルボン酸を製造する方法であって、

上記一般式(1)において、 R_1 と R_2 の一方が CH_2OH であり、他方が CH_2OH または CHO である化合物(すなわち化合物1または化合物2)を基質化合物または中間体化合物とする、シス体および／またはトランス体の4-(アミノメチル)シクロヘキサノール-1-カルボン酸を製造する方法であることが好ましい。

[0175] 実施形態Aの製造方法において、上記アルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有するタンパク質が、以下の1)から6)の少なくともいずれか1つであることが好ましい。

1) 配列番号19で表されるアミノ酸配列と71%以上、75%以上、80%以上、90%以上、93%以上、95%以上、または98%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質

2) 配列番号20で表されるアミノ酸配列と68%以上、70%以上、75%以上、80%以上、90%以上、93%以上、95%以上、または98%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質

3) *Pseudomonas*属由来アルデヒドデヒドロゲナーゼであり、かつ配列番号20で表されるアミノ酸配列と50%以上、60%以上、70%以上、75%以上、80%以上、90%以上、93%以上、95%以上、ま

たは98%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質

4) 配列番号21で表されるアミノ酸配列と63%、70%以上、75%以上、80%以上、90%以上、93%以上、95%以上、または98%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質

5) 配列番号40で表されるアミノ酸配列と56.5%以上、60%以上、70%以上、75%以上、80%以上、90%以上、93%以上、95%以上、または98%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質

6) 配列番号41で表されるアミノ酸配列と63.9%以上、70%以上、75%以上、80%以上、90%以上、93%以上、95%以上、または98%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質

[0176] 実施形態Aの製造方法において、上記アルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有するタンパク質が、以下の1)から6)の少なくともいずれか1つである場合、上記アルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有するタンパク質が、配列番号127~131、133~135、138、および139のいずれか1つで表されるアミノ酸配列からなるタンパク質であることが好ましい。

[0177] 実施形態Aの製造方法において、上記アルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有するタンパク質が、以下の1)から6)の少なくともいずれか1つである場合、上記アルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有するタンパク質が、アルデヒド基を有する化合物のアルデヒド基を酸化させるアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有し、*Pseudomonas*属細菌由来のアルデヒドデヒドロゲナーゼであることが好ましい。

[0178] 実施形態Aの製造方法において、上記ヒドロキシ基をアルデヒド基に変換する活性を有するタンパク質が、オキシダーゼ活性を有するタンパク質、デヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質およびアルデヒドレダクターゼ活性を有するタンパク質から選択される少なくとも1つであり、上記アルデヒド基とアミノ基を可逆的に変換する活性を有するタンパク質が、アミノ基転移酵素活性を有するタンパク質、アミンデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパ

ク質およびアミノキシダーゼ活性を有するタンパク質から選択される少なくとも1つであることが好ましい。

[0179] 実施形態Aの製造方法において、上記ヒドロキシ基をアルデヒド基に変換する活性を有するタンパク質が、コリンオキシダーゼ活性を有するタンパク質であり、上記アルデヒド基とアミノ基を可逆的に変換する活性を有するタンパク質が、アミノ基転移酵素活性を有するタンパク質であることが好ましい。

[0180] 実施形態Aの製造方法において、上記コリンオキシダーゼ活性を有するタンパク質が、配列番号201で表されるアミノ酸配列と60%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質であり、上記アミノ基転移酵素活性を有するタンパク質が、配列番号1～4および103～105のいずれか1つで表されるアミノ酸配列と60%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質であることが好ましい。

[0181] 実施形態Aの製造方法は、上記一般式(1)において、 R_1 と R_2 が共にCHOである化合物(すなわち化合物3)、 R_1 と R_2 の一方がCOOHであり、他方が CH_2OH である化合物(すなわち化合物4)または、 R_1 と R_2 の一方が CH_2NH_2 であり、他方が CH_2OH である化合物(すなわち化合物6)のいずれか一つを基質化合物または中間体化合物とし、ヒドロキシ基をアルデヒド基に変換する活性を有するタンパク質、アルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有するタンパク質、およびアルデヒド基とアミノ基を可逆的に変換する活性を有するタンパク質から選択される少なくとも一つの酵素の存在下で、シス体および／またはトランス体の4-(アミノメチル)シクロヘキサノール-1-カルボン酸を製造する方法であることが好ましい。

[0182] 実施形態Aの製造方法は、上記一般式(1)において、 R_1 と R_2 が共にCHOである化合物(すなわち化合物3)を基質化合物または中間体化合物とする場合、アルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有するタンパク質、およびアルデヒド基とアミノ基を可逆的に変換する活性を有するタンパク質の存在下で、

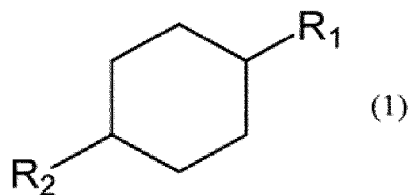
上記一般式（１）において、 R_1 と R_2 の一方が COOH であり、他方が CH_2OH である化合物（すなわち化合物４）を基質化合物または中間体化合物とする場合、ヒドロキシ基をアルデヒド基に変換する活性を有するタンパク質、およびアルデヒド基とアミノ基を可逆的に変換する活性を有するタンパク質の存在下で、または、

上記一般式（１）において、 R_1 と R_2 の一方が CH_2NH_2 であり、他方が CH_2OH である化合物（すなわち化合物６）を基質化合物または中間体化合物とする場合、ヒドロキシ基をアルデヒド基に変換する活性を有するタンパク質、およびアルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有するタンパク質の存在下で、シス体および／またはトランス体の４－（アミノメチル）シクロヘキサノール１－カルボン酸を製造する方法であることが好ましい。

[0183] 別の実施形態の製造方法は、下記一般式（１）で表される化合物であって、下記（ｉ）の化合物を基質化合物または中間体化合物として、ヒドロキシ基をアルデヒド基に変換する活性を有するタンパク質、アルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有するタンパク質、およびアルデヒド基とアミノ基を可逆的に変換する活性を有するタンパク質から選択される少なくとも一つの酵素の存在下で、シス体および／またはトランス体の４－（アミノメチル）シクロヘキサノール１－カルボン酸を製造する方法であってもよい。

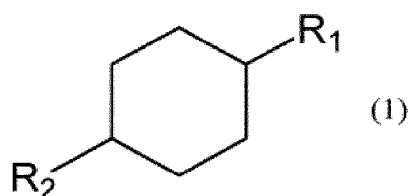
（ｉ）一般式（１）において、 R_1 および R_2 は、それぞれ独立して CH_2OH 、 CHO 、 COOH 、または CH_2NH_2 である。但し、一般式（１）において、 R_1 と R_2 の一方が COOH であり、他方が CH_2NH_2 である場合、 R_1 と R_2 が共に COOH である場合、および R_1 と R_2 の一方が CH_2NH_2 であり、他方が CHO である場合（すなわち一般式（１）で表される化合物が化合物７である場合）を除く。すなわち、上記一般式（１）で表される化合物は化合物１，２，３，４，５または６のいずれか一つである。

[化11]



[0184] 別の実施形態の製造方法は、下記一般式（１）で表される化合物を基質化合物または中間体化合物として、ヒドロキシ基をアルデヒド基に変換する活性を有するタンパク質、アルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有するタンパク質、およびアルデヒド基とアミノ基を可逆的に変換する活性を有するタンパク質から選択される少なくとも一つの酵素の存在下で、シス体および／またはトランス体の４－（アミノメチル）シクロヘキサノール１－カルボン酸を製造する方法であって、上記アルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有するタンパク質が配列番号２０７で表されるアミノ酸配列、または当該アミノ酸配列と５０％以上、６０％以上、７０％以上、７５％以上、８０％以上、９０％以上、９３％以上、９５％以上、または９８％以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質である、方法であってもよい。

[化12]



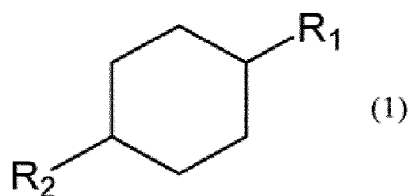
[式中、 R_1 および R_2 は、それぞれ独立して CH_2OH 、 CHO 、 $COOH$ 、または CH_2NH_2 である（但し、 R_1 と R_2 の一方が $COOH$ であり、他方が CH_2NH_2 である場合、および R_1 と R_2 が共に $COOH$ である場合を除く）]

具体的には、上記一般式（１）で表される化合物は化合物１，２，３，４，５，６，７または８のいずれか一つである。

[0185] 別の実施形態の製造方法は、下記一般式（１）で表される化合物を基質化

合物または中間体化合物として、ヒドロキシ基をアルデヒド基に変換する活性を有するタンパク質、アルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有するタンパク質、およびアルデヒド基とアミノ基を可逆的に変換する活性を有するタンパク質から選択される少なくとも一つの酵素の存在下で、シス体および／またはトランス体の4-（アミノメチル）シクロヘキサノール-1-カルボン酸を製造する方法である。

[化13]



[式中、 R_1 および R_2 は、それぞれ独立して CH_2OH 、 CHO 、 $COOH$ 、または CH_2NH_2 である（但し、 R_1 と R_2 の一方が $COOH$ の場合、他方は CH_2OH または CHO に限る）]

具体的には、上記一般式（1）で表される化合物は、化合物1、2、3、4、5、6、7および8のいずれか1つの化合物である。

[0186] 本発明の製造方法における各酵素反応工程において、基質化合物または中間体化合物（例えば、工程（i）の1, 4-ビス（アミノメチル）シクロヘキサノール（化合物8）や工程（iii）の1, 4-シクロヘキサジメタノール（化合物1））はトランス体、シス体またはそれらの混合物のいずれであってもよく、原料の入手しやすさからトランス体とシス体の混合物であることが好ましい。また、各工程の中間体化合物（例えば、工程（i）の4-（アミノメチル）シクロヘキサノール-1-カルバルデヒド（化合物7）、工程（iii）の4-（ヒドロキシメチル）シクロヘキサノール-1-カルバルデヒド（化合物2）または4-ホルミルシクロヘキサノール-1-カルボン酸（化合物5））は、トランス体、シス体またはそれらの混合物のいずれであってもよい。生成する各工程の中間体化合物は、トラネキサム酸の製造に供給される場合、トランス体であることが好ましい。トランス体およびシス体混合物に

において、トランス体およびシス体の比率は問わないが、トランス体の比率は50%超であることが好ましい。

[0187] 本発明の製造方法において、各酵素反応工程の基質化合物、例えば、工程(i)の1,4-ビス(アミノメチル)シクロヘキサン(化合物8)、または、工程(ii)の4-(アミノメチル)シクロヘキサノール-1-カルバルデヒド(化合物7)が、各工程で、例えば、工程(i)の4-(アミノメチル)シクロヘキサノール-1-カルバルデヒド(化合物7)、または、工程(ii)の4-(アミノメチル)シクロヘキサノール-1-カルボン酸(目的化合物)と立体構造が異なる場合、本実施形態の製造方法の一部または全部が、中性または塩基性条件下で行われることが好ましく、たとえば工程(i)の工程の一部または全部、および/または、工程(ii)の工程の一部または全部が、中性または塩基性条件下で行われることが好ましい。反応を中性または塩基性条件下で行うと、反応中間体である4-(アミノメチル)シクロヘキサノール-1-カルバルデヒド(化合物7)のシス体からトランス体、または、トランス体からシス体への異性化が促進される。pH9以上の塩基性条件下では特に異性化しやすく、4-(アミノメチル)シクロヘキサノール-1-カルバルデヒド(化合物7)の異性化はトランス比率およそ60%で平衡化する。これにより、例えばトランス体の4-(アミノメチル)シクロヘキサノール-1-カルボン酸(トラネキサム酸)を最終目的産物とする場合に、基質としてシス体、またはシス体およびトランス体混合物を用いる場合であっても、後述のトランス選択性の高いアルデヒドデヒドロゲナーゼを用いることで、トランス体の4-(アミノメチル)シクロヘキサノール-1-カルボン酸をより多く得ることができ、すなわち、産物混合物におけるより高いトランス比率を得ることができる。これによって、高収率でトラネキサム酸を製造することができる。一方で、トランス体を基質とした場合、酸性(たとえば、pH4~6)とすることで、異性化を防止することで、トランス体の産物をより多く得ることができる。

[0188] 中性とは、反応液のpHが7前後であり、塩基性とは、反応液のpHが7

超～12であればよく、中性または塩基性とは、反応液のpHが好ましくは7～12であり、より好ましくは7～10である。塩基性にする手法としては特に限定されず、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニア等を添加することで達成することができる。工程の一部が中性または塩基性で行われるとは、該工程の始めから途中までを中性または塩基性とするか、途中から終わりまでを中性または塩基性とすることを意味する。ここで、工程の始めとは反応液に酵素を含ませる前であり、工程の終わりとは酵素反応終了後である（以下同じ）。中性または塩基性によって、シス体をトランス体に異性化させる場合、20%以上、例えば、40%以上または50%以上、60%以上の異性化率を得ることができる。また、トランス体をシス体に異性化させる場合、20%以上、例えば、30%以上または35%以上の異性化率を得ることができる。

[0189] 本発明の製造方法の各酵素反応工程の基質化合物と、中間体化合物または目的化合物の立体構造が異なる場合、反応工程の一部または全部が2級アミンの存在下で行われることが好ましい。2級アミンの存在によって4-（アミノメチル）シクロヘキサノン-1-カルバルデヒドの異性化が促進される。2級アミンとしては、例えばL-プロリン、ピロリジン、ピロリジン誘導体、トランス-4-ヒドロキシ-L-プロリン等が挙げられる。2級アミンの反応液へ添加量としては、0.01～500mMであればよく、0.1～200mMであることが好ましい。2級アミンの添加によって、20%以上、例えば、60%以上のシス体からトランス体への異性化率を得ることができ、または20%以上、例えば、30%以上または35%以上のトランス体からシス体への異性化率を得ることができる。

[0190] 本発明の製造方法の各酵素反応工程は、当該工程の酵素反応を触媒する酵素（本発明の酵素A、酵素B、および／または酵素C）を酵素源として用い、該酵素源および基質化合物を水性媒体中に存在せしめ、中間体化合物または目的化合物を水性媒体中に生成、蓄積させてもよいし、当該工程の酵素反応を触媒する酵素（本発明の酵素A、酵素B、および／または酵素C）を生

産する能力を有する細胞を培地に培養し、該培養物中に中間体化合物または目的化合物を生成、蓄積させてもよい。

[0191] 酵素源を用いる方法において、酵素源としては、精製したタンパク質であってもよく、または、目的の活性を有するタンパク質を生産する能力を有する細胞を培地に培養して得られる培養物若しくは該培養物の処理物であってもよい。

[0192] 上記培養物若しくは培養物の処理物は、酵素源としての目的の活性を有するタンパク質を含む。培養物の処理物としては、培養物の濃縮物、培養物の乾燥物、培養物を遠心分離して得られる菌体、該菌体の乾燥物、該菌体の凍結乾燥物、該菌体の界面活性剤処理物、該菌体の超音波処理物、該菌体の機械的摩砕処理物、該菌体の溶媒処理物、該菌体の酵素処理物、該菌体のタンパク質分画物、該菌体の固定化物あるいは該菌体より抽出して得られる酵素標品などが挙げられる。

[0193] 各工程において、酵素源として精製したタンパク質を用いる場合、当該工程の酵素反応を触媒する酵素（本発明の酵素A、酵素B、および／または酵素C）の量としては、基質化合物または中間体化合物に対して、0.01～100重量%であればよく、0.1～50重量%であることが好ましい。酵素源として培養物または該培養物の処理物を酵素源として用いる場合、該酵素源の量は当該酵素源の比活性等により異なるが、例えば、基質化合物または中間体化合物に対して、湿菌体重量として5～1000重量%であればよく、10～400重量%であることが好ましい。

[0194] 水性媒体としては、水、リン酸塩、炭酸塩、酢酸塩、ホウ酸塩、クエン酸塩、トリス、2-モルホリノエタンスルホン酸（以下、MESと表記）、3-モルホリノプロパンスルホン酸（以下、MOPSと表記）、N-シクロヘキシル-2-アミノエタンスルホン酸（以下、CHESと表記）、4-（2-ヒドロキシエチル）-1-ピペラジニエタンスルホン酸（以下、HEPESと表記）などの緩衝液、メタノールやエタノールなどのアルコール類、酢酸エチルなどのエステル類、アセトンなどのケトン類、アセトアミドなど

のアミド類などを挙げることができる。また、酵素源として用いた微生物の培養液を水性媒体として用いることもできる。

[0195] 酵素Bを触媒とする酵素反応工程（例えば、工程（i））において、上記1. で述べたとおり、酵素Bの一つであるアミノ基移転酵素活性を有するタンパク質の存在下でアミノ基を有する化合物からアルデヒド基を有する化合物へ変換する酵素反応、例えば、1, 4-ビス（アミノメチル）シクロヘキササン（化合物8）等のアミノ基を有する化合物を4-（アミノメチル）シクロヘキササン-1-カルバルデヒド（化合物7）等のアルデヒド基を有する化合物に変換する酵素反応は、アミノ基を受容できる化合物を共存させることが望ましい。また、上記1. で述べたとおり、酵素Bの存在下におけるアルデヒド基を有する化合物からアミノ基を有する化合物へ変換する酵素反応、例えば、化合物3を化合物7に変換する反応は、アミノ基を供与できる化合物を共存させることが望ましい。

[0196] アミノ基を受容できる化合物としては、ケト酸が挙げられ、好ましくはピルビン酸、 α -ケトグルタル酸、 α -ケト酪酸等が挙げられる。アミノ基を供与できる化合物としては、アミノ酸が挙げられ、好ましくはアラニン、グルタミン酸、 α -アミノ酪酸等が挙げられる。

[0197] ケト酸は、アミノ基を受容できるものであればその由来は問わないが、ケト酸を生産する能力を有する微生物の培養物または該培養物の処理物をそのまま、あるいは該培養物または該培養物の処理物から回収したケト酸を用いてもよい。アミノ酸は、アミノ基を供与できるものであればその由来は問わないが、アミノ酸を生産する能力を有する微生物の培養物または該培養物の処理物をそのまま、あるいは該培養物または該培養物の処理物から回収したアミノ酸を用いてもよい。

[0198] また、ケト酸は添加するのではなく、反応系において産生させてもよい。例えば、微生物を培地に培養し、中間体化合物または目的化合物を生成、蓄積させる場合（例えば化合物8から化合物7を生成、蓄積させる場合）、該微生物にケト酸を生産する能力を有する微生物を用いてもよい。ケト酸を生

産する能力を有する微生物とは、例えば、生体内でのピルビン酸分解に関するピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体の遺伝子を欠失あるいは弱化させた微生物、乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子を欠失あるいは弱化させた微生物、ピルビン酸オキシダーゼ遺伝子を欠失あるいは弱化させた微生物などが挙げられる。ここで、「弱化させる」こととは、対象遺伝子（例えば、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体の遺伝子）の発現量または酵素の活性を低減させることを意味する。

[0199] また、アミノ酸は添加するのではなく、反応系において産生させてもよい。例えば、微生物を培地で培養し、中間体化合物または目的化合物を生成、蓄積させる場合（例えば化合物2から化合物6を生成、蓄積させる場合）、該微生物にアミノ酸を生産する能力を有する微生物を用いてもよい。アミノ酸を生産する能力を有する微生物とは、例えば、生体内でのグルタミン酸分解に関するグルタミン酸脱炭酸酵素の遺伝子を欠失あるいは弱化させた微生物、グルタミン酸生合成に関する遺伝子を強化させた微生物などが挙げられる。ここで、「弱化させる」こととは、対象遺伝子の発現量または酵素の活性を低減させることを意味し、「強化させる」こととは、対象遺伝子の発現量または酵素の活性を増大させることを意味する。

[0200] 酵素Bを触媒とする酵素反応工程において、ケト酸またはアミノ酸を添加する場合、添加量としては、例えば、基質化合物（例えば、化合物8または化合物2）に対してモル比0.01～100であればよく、0.01～60であることが好ましい。

[0201] 本実施形態の製造方法は、方法の一部または全部において、アラニンデヒドロゲナーゼもしくはグルタミン酸デヒドロゲナーゼ、および／または、NAD(P)Hオキシダーゼを共存させることを含む。特に、酵素Bとしてアミノ基転移酵素の存在下で製造する場合（例えば、第1のステップ（工程（i））や4-（ヒドロキシメチル）シクロヘキサノール-1-カルバルデヒド（化合物2）から目的化合物である4-アミノメチルシクロヘキサノール-1-カルボン酸を製造する工程）において、アラニンデヒドロゲナーゼもしくはグ

ルタミン酸デヒドロゲナーゼ、および／または、NADHオキシダーゼを共存させることが好ましく、酵素Cとしてアルデヒドデヒドロゲナーゼの存在下で製造する場合（例えば、第2のステップ（工程（i i））や4-（ヒドロキシメチル）シクロヘキサン-1-カルバルデヒド（化合物2）から目的化合物（4-アミノメチルシクロヘキサン-1-カルボン酸）を製造する工程）、酵素Bとしてアミンデヒドロゲナーゼの存在下で製造する場合（例えば、第1のステップ（工程（i））や4-（ヒドロキシメチル）シクロヘキサン-1-カルバルデヒド（化合物2）から目的化合物（4-アミノメチルシクロヘキサン-1-カルボン酸）を製造する工程）、および／または、酵素Aとしてデヒドロゲナーゼおよび／またはアルデヒドレダクターゼの存在下で製造する場合（例えば、工程（i i i）や4-（ヒドロキシメチル）シクロヘキサン-1-カルバルデヒド（化合物2）から目的化合物（4-アミノメチルシクロヘキサン-1-カルボン酸）を製造する工程）において、NADHオキシダーゼを共存させることが好ましい。

[0202] 酵素Bとしてアミノ基転移酵素活性を有するタンパク質を触媒とする酵素反応工程において、ケト酸としてピルビン酸またはアミノ酸としてアラニンを用いる場合には、アラニンデヒドロゲナーゼ（alanine dehydrogenase；AlaDH）を共存させることが好ましい。上記1.で説明したとおり、AlaDHはNAD⁺を補酵素として利用し、產生されたアラニンをピルビン酸に変換（再生）すること、または、產生されたピルビン酸をアラニンに変換（再生）することを触媒できる酵素である。したがって、AlaDHを共存させることによって、ピルビン酸またはアラニンが再利用され、少ない原料で効率よくアミノ基転移反応を進行させることができる。また、AlaDHを共存させる場合には、反応で要するNAD⁺を添加することが望ましい。同様に、アミノ酸としてグルタミン酸を用いる場合には、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ（glutamate dehydrogenase；GDH）を共存させることが好ましい。GDHはNAD⁺を補酵素として利用し、產生された α -ケトグルタル酸をグルタミン酸に変換（再

生) することまたは產生されたグルタミン酸を α -ケトグルタル酸に変換(再生) することを触媒できる酵素である。

[0203] AlaDHは、アラニン・アスパラギン酸・グルタミン酸代謝酵素の一つであり、(アラニン+水+NAD⁺) と(ピルビン酸+NH₃+NADH+H⁺) との間の可逆反応を触媒する酸化還元酵素である。本発明の4-(アミノメチル)シクロヘキサン-1-カルボン酸の製造方法において、ケト酸としてピルビン酸を用いた場合に產生されるアラニンをピルビン酸に変換させることができる。また、本発明の4-(アミノメチル)シクロヘキサン-1-カルボン酸の製造方法において、アミノ酸としてアラニンをを用いた場合に產生されるピルビン酸をアラニンに変換させることができる。同様に、GDHは(グルタミン酸+水+NAD⁺) と(α -ケトグルタル酸+NH₃+NADH+H⁺) との間の可逆反応を触媒する酸化還元酵素である。

[0204] AlaDHとしては特に限定されず、例えば、*Bacillus subtilis*、*Alkalihalobacillus pseudofirmus*、*Staphylococcus aureus*由来のAlaDHであってよく、具体的には、*Bacillus subtilis* 168由来アラニンデヒドロゲナーゼBsAlaDH(アクセッション番号: WP__003243280.1)、*Alkalihalobacillus pseudofirmus*由来アラニンデヒドロゲナーゼApAlaDH(アクセッション番号: WP__012957376.1)、*Staphylococcus aureus*由来アラニンデヒドロゲナーゼSaAlaDH(アクセッション番号: WP__000689998.1)が挙げられる。

[0205] GDHとしては特に限定されず、例えば、*Escherichia coli*由来グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、*Bacillus*属細菌由来グルタミン酸デヒドロゲナーゼ(例えば、*Bacillus subtilis*由来グルタミン酸デヒドロゲナーゼ等)、*Pseudomonas*属細菌由来グルタミン酸デヒドロゲナーゼ(例えば、*Pseudomonas aeruginosa*由来グルタミン酸デヒドロゲナーゼ)、*Clostrid*

ium属細菌由来グルタミン酸デヒドロゲナーゼ *Aspergillus* 属真菌由来グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、*Peptoniphilus asaccharolyticus* 由来グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、*Saccharomyces cerevisiae* 由来グルタミン酸デヒドロゲナーゼ等が挙げられる。

[0206] AlaDH または GDH を共存させることとは、酵素 B としてアミノ基転移酵素を用いる反応において、AlaDH または GDH を発現する細胞の培養物または該培養物の処理物を添加してもよく、AlaDH または GDH を発現する細胞を共培養してもよく、あるいは、AlaDH または GDH をコードする DNA を上記組換え細胞に含ませてもよい。

[0207] AlaDH または GDH の量としては、アミノ基転移反応にて産生されるアラニン、ピルビン酸、グルタミン酸または α -ケトグルタル酸に対して、0.01～100 重量%であればよく、0.1～50 重量%であることが好ましい。培養物または該培養物の処理物を酵素源として用いる場合、該酵素源の量は当該酵素源の比活性等により異なるが、例えば、基質化合物または中間体化合物（例えば、1,4-ビス（アミノメチル）シクロヘキサン（化合物 8））に対して、湿菌体重量として 5～1000 重量%であればよく、10～400 重量%であることが好ましい。また、 NAD^+ を添加することが望ましい。 NAD^+ の添加量は、アミノ基転移反応にて産生されるアラニン、ピルビン酸、グルタミン酸または α -ケトグルタル酸に対してモル比 0.01～100 であればよく、0.01～60 であることが好ましい。

[0208] 酵素 C を触媒とする酵素反応工程（例えば、工程（ii））、酵素 B を触媒とする酵素反応工程（例えば、工程（i））、または、酵素 A を触媒とする酵素反応工程（例えば、工程（iii））において、上記 1. で述べたとおり、酵素 C の一つであるアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質の存在下で、アルデヒド基を有する化合物（例えば、4-（アミノメチル）シクロヘキサノール-1-カルバルデヒド（化合物 7））を、カルボキシ基を有する化合物（例えば、4-（アミノメチル）シクロヘキサノール-1-カル

ボン酸（目的化合物））に変換する酵素反応、酵素Aの一つであるデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質および／またはアルデヒドレダクターゼ活性を有するタンパク質の存在下で、ヒドロキシ基を有する化合物（例えば、化合物1）を、アルデヒド基を有する化合物（例えば、化合物2））に変換する酵素反応、および／または酵素Bの一つであるアミンデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質の存在下で、アミノ基を有する化合物（例えば、化合物8）を、アルデヒド基を有する化合物（例えば、化合物7）に変換する酵素反応では、例えば、補酵素であるNAD（P）⁺を共存させるのが望ましい。酵素Cのうちアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質、酵素Aのうちデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質およびアルデヒドレダクターゼ活性を有するタンパク質、酵素Bのうちアミンデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質は、補酵素としてNAD⁺を好むNAD⁺型、NADP⁺を好むNADP⁺型、NAD⁺とNADP⁺の両方を利用できるものが存在する。したがって、本発明の製造方法において、酵素Cのうちアルデヒドデヒドロゲナーゼを有するタンパク質、酵素Aのうちデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質およびアルデヒドレダクターゼ活性を有するタンパク質、酵素Bのうちアミンデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質のいずれかを使用する場合、当該タンパク質の利用性が高い補酵素を共存させることが好ましい。

[0209] NAD（P）⁺の量としては、基質化合物または中間体化合物（例えば、化合物1、7または8）に対してモル比0.01～100であればよく、好ましくは0.01～60であることが好ましい。

[0210] また、本発明の製造方法において、酵素Cとしてアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質、酵素Aとしてデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質若しくはアルデヒドレダクターゼ活性を有するタンパク質、および／または、酵素Bとしてアミンデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質を使用する場合、補酵素を供給する方法として、上記タンパク質を発現させる宿主に補酵素を生産する能力を有する微生物を用いることができる。これ

により、さらなる所望の4-(アミノメチル)シクロヘキサン-1-カルボン酸の生産量の向上が見込まれる。補酵素を生産する能力を有する微生物とは、例えば、生体内でのNAD(P)⁺分解に関与する遺伝子(例えば、mazG、nudC)を欠失、欠損あるいは弱化させた微生物、NAD(P)⁺生成に関与する遺伝子(例えば、pncB、nadA、nadB)を増強あるいは導入した微生物、上記NAD(P)⁺生成に関与する遺伝子産物の発現若しくは機能を抑制する遺伝子(例えば、nadR)を欠失、欠損あるいは弱化させた微生物などが挙げられる。

[0211] 酵素Cのうちアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質、酵素Aのうちデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質、アルデヒドレダクターゼ活性を有するタンパク質、および／または酵素Bのうちアミンデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質の量としては、基質化合物または中間体化合物(例えば、化合物1、7または8)に対して、0.01~100重量%であればよく、0.1~50重量%であることが好ましい。培養物または該培養物の処理物を酵素源として用いる場合、該酵素源の量は当該酵素源の比活性等により異なるが、例えば、基質化合物または中間体化合物(例えば、化合物1、7または8)に対して、湿菌体重量として5~1000重量%であればよく、10~400重量%であることが好ましい。

[0212] 酵素Aの一つであるデヒドロゲナーゼまたはアルデヒドレダクターゼ活性を有するタンパク質、酵素Bの一つであるアミンデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質、酵素Cの一つであるアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質、または／および、酵素Bとしてアミノ基転移酵素活性を有するタンパク質を用いる場合にアラニンデヒドロゲナーゼまたはグルタミン酸デヒドロゲナーゼの存在下で行う工程においてNAD(P)Hオキシダーゼ(NAD(P)H Oxidase; NOX)を共存させることが好ましい。

[0213] NAD(P)Hオキシダーゼは、代謝酵素の一つであり、(NAD(P)H + H⁺ + O₂)を(NAD(P)⁺ + H₂O₂またはH₂O)に変換する反応を

触媒する酸化還元酵素である。本発明の製造方法における、酵素Aの一つであるデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質またはアルデヒドレダクターゼ活性を有するタンパク質、酵素Bの一つであるアミンデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質、酵素Cの一つであるアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質、または／および、酵素Bとしてアミノ基転移酵素活性を有するタンパク質を用いる場合にアラニンデヒドロゲナーゼまたはグルタミン酸デヒドロゲナーゼの存在下で行う工程において産生されるNAD (P) HをNAD (P) ⁺に変換することができる。したがって、本工程においてNAD (P) Hオキシダーゼを共存させることによって、NAD (P) ⁺が再利用され、少ない原料で効率よく4- (アミノメチル) シクロヘキサノー1-カルボン酸を製造することができる。

[0214] NOXとしては特に限定されず、例えば、*Bacillus subtilis*、*Streptococcus mutans*、*Lactococcus lactis*、*Enterococcus faecalis*由来のNOXであってよく、具体的には、*Bacillus subtilis* 168由来NADHオキシダーゼBsNOX (アクセッション番号: NP__389836.1)、*Streptococcus mutans*由来NADHオキシダーゼSmNOX (アクセッション番号: WP__002268044.1)、*Lactococcus lactis*由来NADHオキシダーゼLiNOX (アクセッション番号: CAL97012.1)、*Enterococcus faecalis*由来NADHオキシダーゼEfNOX (アクセッション番号: WP__002361833.1) が挙げられる。

[0215] NAD (P) Hオキシダーゼを共存させることとは、NAD (P) Hオキシダーゼを発現する細胞の培養物または該培養物の処理物を添加してもよく、あるいは、NAD (P) Hオキシダーゼを発現する細胞を共培養してもよく、あるいは、NAD (P) HオキシダーゼをコードするDNAを上記組換え細胞に含ませてもよい。

[0216] NAD (P) Hオキシダーゼの量としては、アラニンデヒドロゲナーゼ活

性を有するタンパク質、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質、酵素Aのうちデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質、酵素Bのうちアミンデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質、または酵素Cのうちアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質を使用する場合に生成されるNAD(P)Hの合計量に対して、0.001～100重量%であればよく、0.01～50重量%であることが好ましい。培養物または該培養物の処理物を酵素源として用いる場合、該酵素源の量は当該酵素源の比活性等により異なるが、例えば、基質化合物または中間体化合物（例えば、化合物1または8）に対して、湿菌体重量として0.5～1000重量%であればよく、1～400重量%であることが好ましい。

[0217] NAD(P)Hオキシダーゼを共存させる代わりに、NAD(P)Hを電気的に酸化してNAD(P)⁺に再生させることもできる。

[0218] 基質化合物と、中間体化合物または目的化合物の立体構造が異なる場合には、方法の一部または全部が中性または塩基性で行われることが好ましく、さらに、方法の一部または全部が2級アミンの存在下で行われることが好ましい。基質化合物と、中間体化合物または目的化合物の立体構造が同一の場合には、方法の一部または全部が酸性で行われることが望ましい。

[0219] 上記の目的化合物の4-(アミノメチル)シクロヘキサノ-1-カルボン酸はシス体、トランス体またはその混合物のいずれであってもよい。シス体（すなわち、シス-トラネキサム酸）を目的とする場合には、アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質として、一実施形態のシス体基質を受け入れることのできる酵素、配列番号19、21、22、35～37、39、44～46、132、134、135および138のいずれか、あるいはこれらの変異あるいは相同タンパク質を用いることが好ましい。トランス体（すなわち、トラネキサム酸）を目的とする場合には、アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質として、一実施形態のトランス選択性の高い酵素、配列番号20、38、40、41、127、128、129、130、131、133、139、および207のいずれか、あるいはこれら

の変異あるいは相同タンパク質を用いることが好ましい。中でも、特にトランス特異性が高い酵素、配列番号20、40、41、127、128、130、131、133、および207のいずれか、あるいはこれらの変異あるいは相同タンパク質を用いることがより好ましい。シス体およびトランス体混合物を目的とするには、本発明の任意のアルデヒドデヒドロゲナーゼを用いればよい。シス体およびトランス体混合物のトランス体の比率は30%以上、例えば40%以上、50%以上、60%以上、または70%以上であることが好ましい。

[0220] 本明細書において、トランス選択性の高い酵素（ALDH）とは、後述の実施例において算出される、1,4-ビス（アミノメチル）シクロヘキサン（化合物8）のシス体およびトランス体混合物を用いて行われる二段階の反応によって生成する、4-（アミノメチル）シクロヘキサン-1-カルボン酸（AMCHA；目的化合物）のトランス体比率が50%超（例えば51%以上、55%以上、60%以上、65%以上、70%以上）の酵素を指し、中でもトランス体比率が70%以上の酵素は、特にトランス選択性の高い酵素とする。AMCHAのトランス比率は、より具体的には例えば、AMCHAのトランス体生成量とAMCHAのシス体生成量の合計量に対するAMCHAのトランス体生成量の比率に100を乗じることで算出することができる。これらのトランス特異性が高い酵素（アルデヒドデヒドロゲナーゼ）は高収率でトラネキサム酸を製造することができるため、トラネキサム酸の製造において有益であるといえる。

[0221] 各工程は別々に行ってもよく、同じ系において、同時進行に行ってもよい。その場合、各種酵素は、細胞に含まれていても、精製したタンパク質であってもよく、また、一部が細胞に含まれて、一部が精製したタンパク質であってもよい。

[0222] 上記細胞の培養は、通常の方法に従って実施できる。該細胞を培養する培地としては、該細胞が資化し得る炭素源、窒素源および無機塩類等を含有し、該細胞の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれ

を用いてもよい。

[0223] 発酵法による4-(アミノメチル)シクロヘキサン-1-カルボン酸の製造方法においては、培地中に基質化合物または中間体化合物（例えば、1,4-ビス(アミノメチル)シクロヘキサン(化合物8)または1,4-シクロヘキサンジメタノール(化合物1)）を添加することが望ましい。基質化合物または中間体化合物（例えば、1,4-ビス(アミノメチル)シクロヘキサン(化合物8)または1,4-シクロヘキサンジメタノール(化合物1)）は、培養前の培地中に添加してもよいし、培養の途中に培養液に添加してもよい。

[0224] また、基質化合物または中間体化合物（例えば、1,4-ビス(アミノメチル)シクロヘキサン(化合物8)または1,4-シクロヘキサンジメタノール(化合物1)）を培地に添加する代わりに、基質化合物または中間体化合物（例えば、1,4-ビス(アミノメチル)シクロヘキサン(化合物8)または1,4-シクロヘキサンジメタノール(化合物1)）を生成する能力を有する微生物を、上記細胞と共培養することにより、基質化合物または中間体化合物（例えば、1,4-ビス(アミノメチル)シクロヘキサン(化合物8)または1,4-シクロヘキサンジメタノール(化合物1)）を供給してもよい。

[0225] 炭素源としては、該細胞が資化し得るものであればよく、例えば、グルコース、フラクトース、シュクロース、これらを含む糖蜜、グリセロール、デンプンおよびデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸およびプロピオン酸等の有機酸、並びにエタノールおよびプロパノール等のアルコール類等が挙げられる。

[0226] 窒素源としては、例えば、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウムおよびリン酸アンモニウム等の無機酸もしくは有機酸のアンモニウム塩、その他の含窒素化合物、並びに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスチープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体、およびその消化物等が挙げられる。

- [0227] 無機塩としては、例えば、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅および炭酸カルシウム等が挙げられる。
- [0228] 発酵法による 4-（アミノメチル）シクロヘキサン-1-カルボン酸の製造法において、酵素 A の一つであるデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質またはアルデヒドレダクターゼ活性を有するタンパク質、酵素 B の一つであるアミノ基転移酵素活性を有するタンパク質またはアミンデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質、または酵素 C の一つであるアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質の基質となるピルビン酸、 α -ケトグルタル酸、 α -ケト酪酸、アラニン、グルタミン酸、 α -アミノ酪酸、 NAD^+ 、 NADP^+ 等を培地に添加してもよい。また、4-（アミノメチル）シクロヘキサン-1-カルバルデヒドの異性化を誘導するために、2級アミン、好ましくはL-プロリン、ピロリジン誘導体等を培地に添加してもよい。
- [0229] また、上記の化合物を添加する代わりに、これらを生産する能力を有する微生物を、上記細胞と共培養することや、上記酵素と共発現させることにより、これらの化合物を供給してもよい。
- [0230] 培養は、通常振盪培養または深部通気攪拌培養等の好気的条件下で行うことが好ましい。培養温度は15～40℃が好ましく、培養時間は、通常5時間～7日間である。培養中のpHは3.0～9.0に保持することが好ましい。pHの調整は、無機または有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニア等を用いて行う。
- [0231] また、培養中必要に応じて、アンピシリンやカナマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した組換え細胞を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。
- [0232] 例えば、lacプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピルー β -D-チオガラクトピラノシド等を、trpプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養する

ときにはインドールアクリル酸等を培地に添加してもよい。

[0233] 上記の培養により、培養物中または菌体内に中間体化合物または目的化合物（例えば、4-（アミノメチル）シクロヘキサン-1-カルボン酸）を生成させることにより、中間体化合物または目的化合物（例えば、4-（アミノメチル）シクロヘキサン-1-カルボン酸））、好ましくはトラネキサム酸を製造できる。4-（アミノメチル）シクロヘキサン-1-カルボン酸の定量は、LCMS（例えば、島津製作所社製の分析装置LCMS-8040）を用いて実施できる。

[0234] 該培養物中からの中間体化合物または目的化合物（例えば、4-（アミノメチル）シクロヘキサン-1-カルボン酸）の採取は通常イオン交換樹脂法、沈殿法その他の公知の方法を組み合わせることにより実施できる。なお、菌体内に中間体化合物または目的化合物（例えば、4-（アミノメチル）シクロヘキサン-1-カルボン酸）が蓄積する場合には、例えば菌体を超音波などにより破碎し、遠心分離によって菌体を除去して得られる上清からイオン交換樹脂法などによって、中間体化合物または目的化合物（例えば、4-（アミノメチル）シクロヘキサン-1-カルボン酸）を採取できる。

[0235] [分析例] 1, 4-ビス（アミノメチル）シクロヘキサン、4-（アミノメチル）シクロヘキサン-1-カルバルデヒドまたは4-（アミノメチル）シクロヘキサン-1-カルボン酸の分析、定量

実施例において、1, 4-ビス（アミノメチル）シクロヘキサン、4-（アミノメチル）シクロヘキサン-1-カルバルデヒドまたは4-（アミノメチル）シクロヘキサン-1-カルボン酸の分析、定量は以下に示す手順で行った。

[0236] 酵素反応後の酵素を含む反応液、静止菌体反応後の微生物を含む反応液または培養後の微生物を含む培養液を遠心分離し、上清を回収した。該上清に含まれる1, 4-ビス（アミノメチル）シクロヘキサン、4-（アミノメチル）シクロヘキサン-1-カルバルデヒドまたは4-（アミノメチル）シクロヘキサン-1-カルボン酸をLCMS-8040（島津製作所製）にて分

析した。下記分析条件では4-(アミノメチル)シクロヘキサン-1-カルバルデヒドおよび4-(アミノメチル)シクロヘキサン-1-カルボン酸におけるシーストランス異性体を分離することができる。

[0237] [分析例] 1, 4-ビス(アミノメチル)シクロヘキサン、4-(アミノメチル)シクロヘキサン-1-カルバルデヒドまたは4-(アミノメチル)シクロヘキサン-1-カルボン酸の分析、定量

実施例において、1, 4-ビス(アミノメチル)シクロヘキサン、4-(アミノメチル)シクロヘキサン-1-カルバルデヒドまたは4-(アミノメチル)シクロヘキサン-1-カルボン酸の分析、定量は以下に示す手順で行った。

[0238] 酵素反応後の酵素を含む反応液、静止菌体反応後の微生物を含む反応液または培養後の微生物を含む培養液を遠心分離し、上清を回収した。該上清に含まれる1, 4-ビス(アミノメチル)シクロヘキサン、4-(アミノメチル)シクロヘキサン-1-カルバルデヒドまたは4-(アミノメチル)シクロヘキサン-1-カルボン酸をLCMS-8040(島津製作所製)にて分析した。下記分析条件では4-(アミノメチル)シクロヘキサン-1-カルバルデヒドおよび4-(アミノメチル)シクロヘキサン-1-カルボン酸におけるシーストランス異性体を分離することができる。

[0239] [分析条件]

カラム: Develosil (商標) ODS-HG 5 μ m 2.0 $\times$ 150 mm (野村化学社)

カラム温度: 40 $^{\circ}$ C

移動相:

(移動相A) 5 mmol/Lヘプタフルオロ酪酸水

(移動相B) 5 mmol/Lヘプタフルオロ酪酸アセトニトリル

移動相AおよびB混合比

(0~5分) 100:0

(5~25分) 100:0から50:50

(25～30分) 50 : 50

(30～31分) 50 : 50から100 : 0

(31～35分) 100 : 0

流速 : 0.25 mL/min

検出 : ポジティブモード

検出イオン :

(1,4-ビス(アミノメチル)シクロヘキサン) 143.1 > 67.

0 m/z

(4-(アミノメチル)シクロヘキサン-1-カルバルデヒド) 142

. 1 m/z

(4-(アミノメチル)シクロヘキサン-1-カルボン酸) 158.2

> 95.0 m/z

[0240] 以下に実施例の詳細を示すが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

実施例

[0241] [実施例1] 1,4-ビス(アミノメチル)シクロヘキサンのアミノ基転移酵素活性を有するタンパク質(AT)の探索

(1) 評価するATの選定

これまで、1,4-ビス(アミノメチル)シクロヘキサンのアミノ基を転移させ、4-(アミノメチル)シクロヘキサン-1-カルバルデヒドを生成させる、アミノ基転移酵素活性を有する酵素は知られていなかった。本発明者らは、非天然化合物である1,4-ビス(アミノメチル)シクロヘキサンに対するアミノ基転移酵素活性を有する酵素を探索するため、過酷な環境中で生育することのできる *Pseudomonas putida* (Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104: 7745-7766) のうち、ゲノム情報が開示されている *Pseudomonas putida* KT2440 のゲノムにおいて、アミノトランスフェラーゼとしてアノテーションされている33個の酵素

を対象とし、アミノ基転移酵素活性を指標とした予備試験によって目的の活性を有する可能性のある酵素としてP p A T 8（配列番号1）およびP p A T 2（配列番号2）を選定した。さらに、P p A T 8と65%の同一性を有するホモログ酵素である*Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*由来アミノトランスフェラーゼA s A T 5（配列番号3）も評価対象とした。加えて、1, 4-ビス（アミノメチル）シクロヘキサンと同じく、一分子内に二つのアミノ基を有するプトレシンおよびカダベリンに対するアミノ基転移酵素活性が報告されている*Escherichia coli* K12 MG1655由来プトレシンアミノトランスフェラーゼP a t A（*Journal of Bacteriology*, 2012, 194, 15:4080-4088）（配列番号4）を評価対象とした。

[0242] （2）A T発現株の造成

表1の「プライマーセット」で表される塩基配列からなるDNAをプライマーセットとして、表1の「鋳型」に記載されたDNAを鋳型としてPCRを行い、各増幅DNA断片を得た。各種染色体DNAは常法により調製した。なお、本実施例で使用した遺伝子配列はすべてNational Center for Biotechnology Informationのデータベース（<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>）から取得した。また、本実施例のPCRにはすべてPrimeSTAR（商標）MAX DNA Polymerase（タカラバイオ社）を用いて、説明書に従い反応を行った。

[表1]

プライマーセット (配列番号)	鋳型	増幅DNA断片
11および12	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440 の染色体 DNA	PpAT8 (配列番号5)
13および14	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440 の染色体 DNA	PpAT2 (配列番号6)
15および16	<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> の染色体 DNA	AsAT5 (配列番号7)
17および18	<i>Escherichia coli</i> K12 MG1655 の染色体 DNA	PatA (配列番号8)

[0243] 配列番号9および10で表される塩基配列からなるDNAをプライマーセットとして、T5プロモーターおよびN末端Hisタグ配列を含むプラスミドpQE80L (QIAGEN社製)を鋳型にPCRを行い、約7kbのベクター断片を得た。なお、配列番号9で表される塩基配列の5'末端は、配列番号11、13、15および17で表される塩基配列の5'末端に相補的な配列を含み、配列番号10で表される塩基配列の5'末端は配列番号12、14、16および18で表される塩基配列の5'末端に相補的な配列を含む。

[0244] 上記で得られた各種増幅DNA断片とベクター断片をIn-Fusion HD Cloning Kit (タカラバイオ社製)を用いて連結することにより、各種ATを発現するプラスミド、pQE80L-PpAT8 (図2)、pQE80L-PpAT2、pQE80L-AsAT5およびpQE80L-PatAを造成した。得られたAT発現プラスミドpQE80L-PpAT8、pQE80L-PpAT2、pQE80L-AsAT5およびpQE80L-PatAを用い、*Escherichia coli* BL21 (DE3)を形質転換することで、各種プラスミドを有する組換え大腸菌を造成した。

[0245] (3) ATの発現および酵素精製

上記(2)で得られた各種組換え大腸菌を、100mg/Lのアンピシリ

ンを含む2 mLのLB培地の入った試験管に接種し30℃で16時間、振盪培養した。培養液を100 mg/Lのアンプシリンを含む40 mLのLB培地の入った250 mL容三角フラスコに接種し30℃で2時間振盪培養した後、終濃度が1 mMとなるようにisopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) を添加し、さらに30℃で5時間振盪培養した。培養液を遠心分離して湿菌体を取得した。該湿菌体から、TALON (商標) Metal Affinity Resin (Cientech社) を用いて酵素精製を行い、Hisタグ付加組換え型の精製酵素PpAT8、PpAT2、AsAT5およびPatAを取得した。

[0246] (4) 1, 4-ビス (アミノメチル) シクロヘキサンに対するアミノ基転移酵素活性の評価

(3) で精製した各精製酵素について、4- (アミノメチル) シクロヘキサン-1-カルバルデヒドの生成量を指標とし、各種ATの酵素活性を評価した。

上記(3) で取得した精製酵素 (PpAT8、PpAT2、AsAT5またはPatA) 0.07 mg、50 mMのMOPS (pH7.8)、10 mMの塩化マグネシウム、1 mMのDithiothreitol (DTT)、10 mMのピルビン酸、0.1 mMのPyridoxal phosphate (PLP)、並びに、10 mMの1, 4-ビス (アミノメチル) シクロヘキサンのシス体およびトランス体混合物 (トランス比率45.7%) を含む0.1 mLの反応液 (pH7.8) を調製し、30℃、400 rpmの条件で24時間反応を行った。また、ネガティブコントロールとして精製酵素液の代わりに等量のMOPS緩衝液を添加したものの反応液についても同様に反応を行った。

[0247] 反応終了後、反応液を希釈した後、遠心分離し、上清に含まれる反応生成物および残存基質をLCMS-8040にて分析した (図3)。生成物である4- (アミノメチル) シクロヘキサン-1-カルバルデヒドのトランス体またはシス体の各ピークは、その溶出位置とm/z値より総合的に判断し、

それぞれの生成量はピーク面積（Area値）で示した。結果を表2に示す。

[表2]

AT	残基質 (mM)	4-(アミノメチル)シクロヘキサン-1-カルバルデヒド生成量(Area値)	
		トランス体	シス体
— (ネガティブコントロール)	9.2	N.D.	N.D.
PpAT8	7.3	16079356	12472505
PpAT2	9.0	3194819	2482301
AsAT5	9.0	8037766	6369141
PatA	4.6	29942199	29023216

[0248] PpAT8、PpAT2、AsAT5またはPatAを添加し反応させた場合にのみ、4-(アミノメチル)シクロヘキサン-1-カルバルデヒドが生成蓄積されることを確認した。このうち、PatAは残存基質が少なく、かつ4-(アミノメチル)シクロヘキサン-1-カルバルデヒドの生成量が最も多かった。このことから、Escherichia coli K12 MG1655由来プトレシンアミノトランスフェラーゼPatAは、1, 4-ビス(アミノメチル)シクロヘキサンに対して高いアミノ基転移酵素活性を有することが分かった。

[0249] <ATホモログの1, 4-ビス(アミノメチル)シクロヘキサンに対するアミノ基転移酵素活性の評価>

(5) データベース上でのATホモログ酵素の探索

実施例1で1, 4-ビス(アミノメチル)シクロヘキサンに対する活性を有するATとして得られたPpAT8およびPatAのアミノ酸配列(配列番号5および8)をクエリーとして、National Center for Biotechnology Informationのタンパク質配列データベースであるBLAST(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)のホモロジー検索機能を用いて、各クエリー酵素と同一性40～85%の酵素を探索した。上記操

作によって抽出された酵素のアミノ酸配列（配列番号１０３～１０７）および各酵素をコードする塩基配列（配列番号１０８～１１２）を表３に示す。

[表3]

クエリー	ホモログ	同一性 (%)	由来微生物	アミノ酸配列	塩基配列
PpAT8	PcAT	84.8	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp. <i>aureofaciens</i> NBRC 3521	配列番号 103	配列番号 108
	PaAT	76.4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	配列番号 104	配列番号 109
	HeAT1	63.4	<i>Halomonas elongata</i> DSM 2581	配列番号 105	配列番号 110
	HeAT2	41.2	<i>Halomonas elongata</i> DSM 2581	配列番号 106	配列番号 111
PatA	MaAT	41.5	<i>Methanosarcina acetivorans</i> C2A	配列番号 107	配列番号 112

[0250] (6) A T ホモログ発現株の造成

上記表３に記載の各 A T ホモログ酵素の遺伝子断片を得るため、表４に示した鋳型、プライマー１および２を用いて、P C R 反応を行った。各種染色体 D N A は常法により調製した。このとき、配列番号 9 で表される塩基配列の 5' 末端は表４の各プライマー１で表される塩基配列の 5' 末端に相補な塩基配列を含み、配列番号 10 で表される塩基配列の 5' 末端は表４の各プライマー２で表される塩基配列の 5' 末端に相補な塩基配列を含む。

[表4]

クエリー	ホモログ	鋳型	プライマー１	プライマー２
PpAT8	PcAT	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp. <i>aureofaciens</i> NBRC 3521 染色体 DNA	配列番号 113	配列番号 114
	PaAT	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 染色体 DNA	配列番号 115	配列番号 116
	HeAT1	<i>Halomonas elongata</i> DSM 2581 染色体 DNA	配列番号 117	配列番号 118
	HeAT2	<i>Halomonas elongata</i> DSM 2581 染色体 DNA	配列番号 119	配列番号 120
PatA	MaAT	<i>Methanosarcina acetivorans</i> C2A 染色体 DNA	配列番号 121	配列番号 122

[0251] 上記 P C R によって得られた増幅 D N A 断片と実施例 1 で調製した p Q E 8 0 L のベクター断片をそれぞれ *In-Fusion* (商標) H D C l o n i n g K i t (タカラバイオ社) を用いて連結することにより、各 A T 発現プラスミドを造成した。得られた各発現プラスミドを用い、*E s c h e*

richia coli BL21 (DE3) を形質転換することで、各 A T 発現プラスミドを有する組換え大腸菌を造成した。

[0252] (7) A T ホモログの 1, 4-ビス (アミノメチル) シクロヘキサンに対するアミノ基転移酵素活性評価

上記 (6) で得た各 A T 発現プラスミドを有する組換え大腸菌を用いて、(3) と同様の方法で H i s タグ付加組換え型の各 A T 精製酵素を取得した。

[0253] 取得した各精製酵素 0.07 mg、50 mM の M O P S (p H 7.8)、1 mM の塩化マグネシウム、1 mM の D T T、1 mM のピルビン酸、0.1 mM の P L P、および、1 mM の 1, 4-ビス (アミノメチル) シクロヘキサンのシス体およびトランス体混合物 (トランス比率 45.7%) を含む 0.1 mL の反応液 (p H 7.8) を調製し、30℃、400 rpm の条件で 24 時間反応を行った。また、ネガティブコントロールとして精製酵素の代わりに等量の M O P S 緩衝液を添加した反応液、ポジティブコントロールとして精製酵素 P a t A を用いた反応液についても同様に反応を行った。

[0254] 反応終了後、(4) と同様の方法により反応生成物を分析した。結果を表 5 に示す。

[表5]

A T	残存基質 (mM)	4-(アミノメチル)シクロヘキサン-1-カル バルデヒド生成量 (A r e a 値)	
		トランス体	シス体
— (ネガティブコントロール)	1.26	N.D.	N.D.
PcAT	1.01	1972463	4143361
PaAT	0.76	2156060	8886741
HeAT1	0.87	831663	3931875
HeAT2	1.22	N.D.	N.D.
MaAT	1.29	N.D.	N.D.
PatA (ポジティブコントロール)	0.75	2085188	9881719

[0255] P c A T、P a A TおよびH e A T 1は、1, 4-ビス（アミノメチル）シクロヘキサンに対するアミノ基転移酵素活性を有し、4-（アミノメチル）シクロヘキサノン-1-カルバルデヒドを生成蓄積することを確認した。このうち、P a A TはP a t Aに匹敵する活性を有することが分かった。また、P p A T 8のホモログについてはP p A T 8との同一性60%以上で目的の活性を有することが示唆された。

[0256] [実施例2] 4-（アミノメチル）シクロヘキサノン-1-カルバルデヒドの産生工程におけるpHの影響

（1）アミノ基転移反応における溶液pHの影響評価

4-（アミノメチル）シクロヘキサノン-1-カルボン酸の中間体である4-（アミノメチル）シクロヘキサノン-1-カルバルデヒドの供給における、pH条件（pH7.0またはpH9.0）の影響を評価した。

[0257] 実施例1（3）で取得したP a t A精製酵素0.07mg、50mMのMOPS（pH7.0）または50mMのCHES（pH9.0）、1mMの塩化マグネシウム、1mMのDTT、1mMのピルビン酸、0.1mMのPLP、および、反応基質として1mMのシス体またはトランス体の1, 4-ビス（アミノメチル）シクロヘキサンを含む0.1mLの反応液を調製し、30℃、400rpmの条件で24時間反応を行った。

[0258] 反応終了後、反応液の上清中に含まれる4-（アミノメチル）シクロヘキサノン-1-カルバルデヒドを、LCMS-8040（島津製作所製）を用いて分析した。4-（アミノメチル）シクロヘキサノン-1-カルバルデヒドのトランス比率（中間体トランス比率）は、生成された4-（アミノメチル）シクロヘキサノン-1-カルバルデヒドのArea値に基づき、数1で示される計算式を用いて算出した。式中のトランス体はtrans-4-（アミノメチル）シクロヘキサノン-1-カルバルデヒドを意味し、シス体は、cis-4-（アミノメチル）シクロヘキサノン-1-カルバルデヒドを意味する。結果を表6に示す。

[数1]

中間体トランス比率(%) =

$$\left\{ \frac{\text{トランス体のArea値}}{\text{トランス体のArea値} + \text{シス体のArea値}} \right\} \times 100$$

[表6]

基質	pH	4-(アミノメチル)シクロヘキサノン-1-カルバルデヒド生成量(Area値)		中間体トランス比率(%)
		trans	cis	
シス体	7.0	240436	14223981	1.7
	9.0	2210679	3469878	38.9
トランス体	7.0	3795074	207188	94.8
	9.0	3851428	1671628	69.7

[0259] シス体またはトランス体のいずれの基質を用いた場合にも、pH 7.0においては、生成される4-(アミノメチル)シクロヘキサノン-1-カルバルデヒドのおよそ95%以上が、添加した基質と同じ立体構造をとることが示された。他方、pH 9.0においては、添加した基質の異性体構造をとる4-(アミノメチル)シクロヘキサノン-1-カルバルデヒドが30%以上生成された。

[0260] この結果から、1,4-ビス(アミノメチル)シクロヘキサンのアミノ基転移反応において、反応溶液のpHによって生成される4-(アミノメチル)シクロヘキサノン-1-カルバルデヒドの立体構造が変化することが示唆された。

[0261] 上記立体構造の変化は、(i)アミノ基転移酵素の働きによるもの、(ii)アルデヒド基のケト-エノール互変異性によるもの、が考えられた。(iii)について、4-(アミノメチル)シクロヘキサノン-1-カルバルデヒドはアルデヒド基を有しており、一般に、アルデヒド基は酸性あるいは塩基性触媒存在下において、ケト型とエノール型との間で相互変換することが知られている(ケト-エノール互変異性)。4-(アミノメチル)シクロヘキサノン-1-カルバルデヒドのアルデヒド基がケト型からエノール型に変換されることにより、 α 位炭素上の水素が転移し、シクロヘキサンとの間に炭素-炭素二重結合が生成することによって、シス体とトランス体の区別がなくなると考えられる。したがって、酸あるいは塩基の存在下では、アミノ基転

移酵素による反応とは独立して、4-(アミノメチル)シクロヘキサン-1-カルバルデヒドの異性化反応が起こることが予想された。そこで、上記立体構造の変化が、アミノ基転移酵素に依存するかを確認するため、以下の試験を行った。

[0262] (2) 4-(アミノメチル)シクロヘキサン-1-カルバルデヒドのpH依存的な異性化の評価

上記(1)に従い、(i) pH 7.0の条件でPat A精製酵素とシス体の基質を反応させることにより中間体トランス比率が2.1%となった反応液、(ii) pH 7.0の条件でPat A精製酵素とトランス体基質を反応させることにより中間体トランス比率が95.3%となった反応液を、それぞれ調製した。Amicon (商標) Ultra 0.5 mL, 3K (Millipore社製)を用いて各反応液中の酵素を除去し、フロースルー画分を回収した。各フロースルー画分10 μ Lに対し、50 mMの酢酸ナトリウム緩衝液(pH 0またはpH 5.0)、50 mMのMES緩衝液(pH 6.0)、50 mMのリン酸ナトリウム緩衝液(pH 6.0またはpH 7.0)、50 mMのMOPS緩衝液(pH 7.0)、50 mMのCHES緩衝液(pH 9.0または10.0)、若しくは50 mMの炭酸ナトリウム緩衝液(pH 9.0または10.0)のいずれかの緩衝液を90 μ L添加し、30 $^{\circ}$ C、400 rpmの条件で20時間反応させた。

[0263] また、二級アミン添加による異性化への影響を評価するため、上記組成に50 mMのL-プロリンを添加した条件でも同様に反応を行った。反応終了後、上記(1)と同様の方法により反応生成物を分析し、中間体トランス比率を算出した。結果を表7に示す。

[表7]

基質	pH	緩衝液	Ｌ-プロリン	中間体トランス比率(%)
シス体	4	酢酸ナトリウム	-	1.7
	5	酢酸ナトリウム	-	3.1
	6	MES	-	3.2
		リン酸ナトリウム	-	7.3
		リン酸ナトリウム	+	10.0
	7	MOPS	-	3.6
		リン酸ナトリウム	-	16.3
		リン酸ナトリウム	+	24.0
	9	CHES	-	47.8
		重炭酸ナトリウム	-	22.6
		重炭酸ナトリウム	+	63.4
	10	CHES	-	63.4
		重炭酸ナトリウム	-	63.1
		重炭酸ナトリウム	+	66.5
トランス体	4	酢酸ナトリウム	-	100
	5	酢酸ナトリウム	-	100
	6	MES	-	91.1
		リン酸ナトリウム	-	87.2
		リン酸ナトリウム	+	88.8
	7	MOPS	-	94.5
		リン酸ナトリウム	-	85.0
		リン酸ナトリウム	+	75.7
	9	CHES	-	67.9
		重炭酸ナトリウム	-	79.5
		重炭酸ナトリウム	+	60.8
	10	CHES	-	63.9
		重炭酸ナトリウム	-	64.7
		重炭酸ナトリウム	+	65.1

[0264] 表7より、シス体またはトランス体のいずれの基質を用いた場合にも、pH 4～6の酸性条件下では中間体の異性化はほとんど起こらなかったが、pH 7以上では中間体トランス比率に変化が見られた。特に、pH 9～10の塩基性条件下では中間体の異性化が顕著に進行した。さらに、4-（アミノメチル）シクロヘキサノン-1-カルバルデヒドの異性化はトランス比率およそ60%で平衡化することがみてとれた。

[0265] また、プロリン添加条件においては、pH 4～6ではほとんど変化が見られなかったものの、pH 7では中間体の異性化が進む傾向がみられ、pH 9では中間体の異性化がさらに促進されることが分かった。

[0266] 以上より、酵素の有無に関わらず、中性または塩基性条件下において4-

(アミノメチル)シクロヘキサン-1-カルバルデヒドの異性化が起こることが明らかとなった。また、中性または塩基性条件下における異性化反応は、L-プロリンなどの二級アミンの共存下で促進されることが分かった。

[0267] 上記結果から、使用する基質の立体構造に合わせてpH条件を変更することにより、反応生成物の立体構造パターンをコントロールできることが示唆された。

[0268] [実施例3] アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質 (ALDH) の活性評価

(1) 評価するALDHの選定

これまで、4-(アミノメチル)シクロヘキサン-1-カルバルデヒドのアルデヒド基を酸化させ、4-(アミノメチル)シクロヘキサンカルボン酸を生成させる、アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有する酵素は知られていなかった。

[0269] 本発明では、実施例1の結果を踏まえ、Pat Aと同じくプトレシンおよびカダベリンの代謝に関わる*Escherichia coli* K12 MG1655由来NAD⁺依存型ガンマーアミノブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼPat D (FEBS Letters, 2005, 579:4107-4112) を評価対象のALDHとして選定した。加えて、基質である4-(アミノメチル)シクロヘキサン-1-カルバルデヒドは、カサ高く極性が低いシクロヘキサン環構造を有することを踏まえ、立体構造は異なるもののカサ高く極性が低いベンゼン環構造を有する基質に対するALDH活性が報告されている、*Pseudomonas putida* CSV86由来NAD⁺依存型ベンズアルデヒドデヒドロゲナーゼXyl C (Arch. Microbiol., 2011, 193:553-563)、*Pseudomonas putida* S12由来NAD⁺依存型フェニルアセトアルデヒドデヒドロゲナーゼStyD (Archives of Biochemistry and Biophysics, 2017, 616:47-58) および*Pseudomonas putida* NCIMB 9866

由来NADP⁺依存型4-ヒドロキシベンズアルデヒドデヒドロゲナーゼPchA (Appl. Microbiol. Biotechnol., 2014, 98:1349-1356) を、評価対象のALDHとして選定した。

[0270] (2) ALDH発現株の造成

(1) で選定したALDH (PatD、XylC、StyDおよびPchA) のアミノ酸配列を配列番号19～22に示す。これらの酵素をコードする塩基配列をそれぞれ配列番号23～26に示す。これらの酵素を発現する株は以下のように造成した。

[0271] 表8の「鋳型」に記載されたDNAを鋳型として、表8の「プライマーセット」で表される塩基配列からなるDNAをプライマーセットとしてPCRを行い、各DNA断片を増幅した。

[表8]

プライマーセット (配列番号)	鋳型	増幅 DNA 断片
27 および 28	Escherichia coli K12 MG1655 の染色体 DNA	PatD (配列番号 23)
29 および 30	配列番号 24 で表される DNA	XylC (配列番号 24)
31 および 32	配列番号 25 で表される DNA	StyD (配列番号 25)
33 および 34	配列番号 26 で表される DNA	PchA (配列番号 26)

[0272] Escherichia coli K12 MG1655の染色体DNAは常法により調製した。配列番号24で表されるDNAは、配列番号20で表されるPseudomonas putida CSV86由来XylCをコードする遺伝子の塩基配列であり、人工合成により調製した。配列番号25で表されるDNAは、配列番号21で表されるPseudomonas putida S12由来のStyDをコードする遺伝子の塩基配列であり、人工合成により調製した。配列番号26で表されるDNAは、配列番号22で表されるPseudomonas putida NCIMB 9

866由来PchAをコードする遺伝子の塩基配列であり、人工合成により調製した。

[0273] 配列番号9で表される塩基配列の5'末端は、配列番号27、29、31および33の5'末端に相補的な配列を含み、配列番号10で表される塩基配列の5'末端は、配列番号28、30、32および34で表される塩基配列の5'末端に相補的な配列を含む。

[0274] 上記で得られた各種増幅DNA断片と、実施例1で調整したpQE80Lベクター断片をIn-Fusion HD Cloning Kit (タカラバイオ社製)を用いて連結することにより、各種ALDHを発現するプラスミド、pQE80L-PatD、pQE80L-XyIC、pQE80L-StyDおよびpQE80L-PchAを造成した。

[0275] 上記で得られたALDH発現するプラスミド、pQE80L-PatD、pQE80L-XyIC、pQE80L-StyDおよびpQE80L-PchAを用い、Escherichia coli BL21 (DE3)を形質転換することで、各種プラスミドを有する大腸菌を造成した。

[0276] (3) ALDHの発現および酵素精製

上記(2)で得られた菌株を用いて、実施例1と同様の方法により湿菌体を取得し酵素精製を行うことで、Hisタグ付加組換え型の精製酵素PatD、XyIC、StyDおよびPchAを取得した。

[0277] (4) ATとの組み合わせ反応によるALDHの4-(アミノメチル)シクロヘキサノ-1-カルボン酸の生産性評価

<ALDHの補酵素としてNAD⁺を用いた場合>

上記(3)で取得した精製酵素(PatD、XyIC、StyDおよびPchA)0.07mg、実施例1(3)で取得したPatA 0.07mg、50mMのMOPS (pH7.8)、1mMの塩化マグネシウム、1mMのDTT、1mMのピルビン酸、0.1mMのPLP、2mMのニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD⁺)、および、1mMの1,4-ビス(アミノメチル)シクロヘキサンのシス体およびトランス体混合物(トランス

比率45.7%)を含む0.1mLの反応液(pH7.8)を調製し、30℃、400rpmの条件で24時間反応を行った。また、ネガティブコントロールとして精製酵素の代わりに等量のMOPS緩衝液を添加した反応液についても同様に反応を行った。

[0278] 反応終了後、実施例1と同様の方法により反応生成物を分析した。また、生成される4-(アミノメチル)シクロヘキサノール-1-カルボン酸について、トラネキサム酸(TXA)またはシス-TXAを選択的に生成可能か確認するため、TXAおよびcis-TXAの生成量に基づき、下記の数2で示される計算式を用いて4-(アミノメチル)シクロヘキサノール-1-カルボン酸のトランス比率(AMCHAトランス比率、AMCHAトランス率ともいう)を算出した。なお、各化合物の濃度(mM)は、濃度既知の標品のArea値との比較により算出した。

[数2]

$$\text{AMCHAトランス率(\%)} = \{\text{TXA (mM)} / (\text{TXA (mM)} + \text{cis-TXA (mM)})\} \times 100$$

[0279] まず、基質として1,4-ビス(アミノメチル)シクロヘキサンのシス体およびトランス体混合物(トランス比率45.7%)を用いた場合の結果を表9に示す。

[表9]

ALDH	生成量(mM)		AMCHAトランス比率(%)
	TXA	シス-TXA	
- (ネガティブコントロール)	N.D.	N.D.	-
PatD	0.38	0.70	35
XylC	0.46	0.10	82
StyD	0.37	0.49	43
PchA	N.D.	N.D.	-

N. D. : 定性限界以下(S/N<3)

[0280] 表9より、PatAおよび、PatD、XylCまたはStyDを組合せることで、1,4-ビス(アミノメチル)シクロヘキサノールを基質として4-(アミノメチル)シクロヘキサノール-1-カルボン酸を生成蓄積できることが

分かった。

[0281] また、基質はシス体およびトランス体混合物を用いたため、生成物である4-(アミノメチル)シクロヘキサノール-1-カルボン酸もシス体とトランス体の混合物となることが予想されたが、実際には、ALDHの種類によって生成される4-(アミノメチル)シクロヘキサノールカルボン酸のトランス比率が異なる結果となった。この結果から、ALDHには基質選択性があることが示唆された。特に、XylCを用いた場合に4-(アミノメチル)シクロヘキサノールカルボン酸のトランス比率が大きく、トランス体の4-(アミノメチル)シクロヘキサノール-1-カルバルデヒドに対し選択的に反応できることが示された。したがって、シス体およびトランス体混合物の基質からTXAを効率的に生成しようとした場合には、XylCが有用なALDHであるといえる。

[0282] 次に、基質として1,4-ビス(アミノメチル)シクロヘキサノールのトランス体のみを用いた場合の結果を表10に示す。

[表10]

ALDH	生成量(mM)	
	TXA	シス-TXA
- (ネガティブコントロール)	N.D.	N.D.
PatD	0.88	N.Q.
XylC	0.72	N.D.
StyD	0.83	N.D.

N. Q. : 定量限界以下($S/N < 10$)、N. D. : 定性限界以下($S/N < 3$)

[0283] 表10の結果より、トランス体を基質として用いた場合、いずれのALDHにおいてもTXAの生成は確認できたものの、シス-TXAはほとんど検出されなかった。したがって、トランス体の基質を用いた場合には、ここで見出したいずれのALDHにおいても高収率でTXAを生成できることから、TXA生産においては基質としてトランス体またはトランス体を多く含む基質の使用が望ましいことが示された。また、これらのALDHはトランス

体の基質を受け入れることができることがわかった。

[0284] 続いて、1, 4-ビス（アミノメチル）シクロヘキサンのシス体のみを基質として用いた場合の4-（アミノメチル）シクロヘキサンカルボン酸の生成量を評価した。

[0285] 上述と同様に取得した精製酵素PatAおよび各種ALDH（PatD、XylCまたはStyD）をそれぞれ0.07mg、50mMのMOPS（pH7.8）、10mMの塩化マグネシウム、1mMのDTT、10mMのピルビン酸、0.1mMのPLP、2mMのNAD⁺、および、10mMのシス体の1, 4-ビス（アミノメチル）シクロヘキサンを含む0.1mLの反応液を調製し、30℃、400rpmの条件で24時間反応を行った。結果を表11に示す。

[表11]

ALDH	生成量(mM)	
	TXA	シス-TXA
－ (ネガティブコントロール)	N.D.	N.D.
PatD	0.01	1.79
XylC	0.46	0.90
StyD	0.06	1.64

N. D. : 定性限界以下(S/N<3)

[0286] 表11より、シス体を基質として用いた場合は、いずれのALDHにおいても生成されるシス-TXAの割合が高くなることが分かった。また、XylCではシス-TXAの生産量が少ないことから、XylCはシス体基質を受け入れにくいことがわかった。

[0287] このうち、XylCを用いた場合のみ比較的高い割合でTXAが生成された。これは、本反応をpH7.8の弱塩基性条件で実施したため、実施例2で示した塩基性条件下での中間体の異性化が生じ、シス体の基質を添加した場合であってもトランス体の中間体が生成され、結果としてTXAが多く蓄積されたものと推察される。このことから、TXAの生産を目的とする場合

、ALDHとしてXylCを用いることでトランス体の中間体を選択的に酸化しTXAを生成すると同時に、残存しているシス体の中間体を中性または塩基性条件下で動的にトランス体へ異性化することにより、シス体およびトランス体混合物の基質を用いた場合であっても、理論上100%のTXAを生成可能であることが示唆された。

[0288] <ALDHの補酵素としてNADP⁺を用いた場合>

上記表6の結果においてALDH活性が確認できなかったPchAは、補酵素としてNADP⁺を利用することが知られている (Appl. Microbiol. Biotechnol., 2014, 98:1349-1356)。そこで、上記(3)で取得した精製酵素PchA、また比較対象としてXylCを用い、補酵素としてNADP⁺を用いた場合の4- (アミノメチル) シクロヘキサノン-1-カルバルデヒドのアルデヒド酸化活性を評価した。

[0289] 上記の反応液組成のうちNAD⁺に代替して1 mMのNADP⁺を添加した反応液を調製し、上記と同様の反応を行った。基質としてはシス体およびトランス体混合物 (トランス比率45.7%) を使用した。また、ネガティブコントロールとして精製酵素の代わりに等量のMOPS緩衝液を添加した反応液についても同様に反応を行った。

[0290] 反応終了後、上述と同様の方法により反応生成物を分析した。結果を表12に示す。

[表12]

ALDH	生成量(mM)		AMCHA トランス比率(%)
	TXA	シス-TXA	
- (ネガティブコントロール)	N.D.	N.D.	-
PchA	0.06	0.16	27
XylC	0.17	0.01	94

N. D. : 定性限界以下 (S/N < 3)

[0291] 表12より、PchAは補酵素としてNADP⁺を添加することで4- (ア

ミノメチル) シクロヘキサン-1-カルボン酸を生成することが可能であることを確認した。また、XyICはNAD⁺依存的な酵素として知られているが、4-(アミノメチル) シクロヘキサン-1-カルボン酸生産においてはNADP⁺も補酵素として利用可能であることがわかった。

[0292] [実施例4] ALDHホモログを用いた4-(アミノメチル) シクロヘキサンカルボン酸の生産

(1) データベース上でのALDHホモログ酵素の探索

実施例3で4-(アミノメチル) シクロヘキサン-1-カルボン酸生成が可能なALDHとして取得したPatD、XyICおよびStyDのアミノ酸配列(配列番号19~21)をクエリーとして、National Center for Biotechnology Informationのタンパク質配列データベースであるBLAST(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)のホモロジー検索機能を用いて、各酵素と同一性50~80%の酵素を探索した。上記操作によって抽出された酵素のアミノ酸配列(配列番号35~46)および各酵素をコードする塩基配列(配列番号47~58)を表13に示す。表13中、CkpatD、SepatD、CspatDおよびPppatDはいずれもガンマーアミノブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼとアノテーションされているタンパク質である。SsBD、HaBDおよびRrADはベンズアルデヒドデヒドロゲナーゼとアノテーションされているタンパク質である。PmsLADはフェニルアセトアルデヒドデヒドロゲナーゼとアノテーションされているタンパク質である。その他はアルデヒドデヒドロゲナーゼまたはそのファミリータンパク質とアノテーションされているタンパク質である。

[表13]

クエリ ー	ホモログ	同一性 (%)	由来微生物	アミノ酸配列	塩基配列
PatD	CkpatD	88.4	Citrobacter koseri ATCC BAA-895	配列番号 35	配列番号 47
	SepatD	83.3	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Choleraesuis str. SC-B67	配列番号 36	配列番号 48
	PapatD	73.0	Pectobacterium atrosepticum SCRI1043	配列番号 37	配列番号 49
	CspatD	83.3	Cronobacter sakazakii ATCC 29544	配列番号 38	配列番号 50
	PppatD	71.1	Pseudomonas putida KT2440	配列番号 39	配列番号 51
XylC	HaBD	84.2	Halioxenophilus aromaticivorans	配列番号 40	配列番号 52
	SsBD	72.4	Sphingomonas sp. TF3	配列番号 41	配列番号 53
	RiAD	48.4	Rhodococcus imtechensis	配列番号 42	配列番号 54
	RrAD	49.7	Rhodococcus ruber	配列番号 43	配列番号 55
StyD	PmsLAD	86.9	Pseudomonas sp. LQ26	配列番号 44	配列番号 56
	BIAD	69.9	Burkholderia lata	配列番号 45	配列番号 57
	PbsAD	63.3	Paraburkholderia sp. 5N	配列番号 46	配列番号 58

[0293] (2) ALDHホモログ発現株の造成

上記表13に記載の各ALDHホモログ酵素の遺伝子断片を得るため、表14に示した鋳型、プライマー1および2を用いて、PCR反応を行った。

[表14]

クエリー	ホモログ	鋳型	プライマー1	プライマー2
PatD	CkpatD	配列番号 47	配列番号 59	配列番号 60
	SepatD	配列番号 48	配列番号 61	配列番号 62
	PapatD	配列番号 49	配列番号 63	配列番号 64
	CspatD	Cronobacter sakazakii 染色体 DNA	配列番号 65	配列番号 66
	PppatD	Pseudomonas putida KT2440 染色体 DNA	配列番号 67	配列番号 68
XylC	HaBD	配列番号 52	配列番号 69	配列番号 70
	SsBD	配列番号 53	配列番号 71	配列番号 72
	RiAD	Rhodococcus imtechensis 染色体 DNA	配列番号 73	配列番号 74
	RrAD	Rhodococcus ruber 染色体 DNA	配列番号 75	配列番号 76
StyD	PmsLAD	配列番号 56	配列番号 77	配列番号 78
	BIAD	配列番号 57	配列番号 79	配列番号 80
	PbsAD	配列番号 58	配列番号 81	配列番号 82

[0294] 各種染色体DNAは常法により調製した。配列番号47で表されるDNAは、配列番号35で表される*Citrobacter koseri* ATCC BAA-895株由来ALDHをコードする遺伝子の塩基配列を、大腸菌で発現させるためにコドン最適化したDNAであり、人工合成により調製した。配列番号48で表されるDNAは、配列番号36で表される*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Choleraesuis* str. SC-B67株由来ALDHをコードする遺伝子の塩基配列を、大腸菌で発現させるためにコドン最適化したDNAであり、人工合成により調製した。配列番号49で表されるDNAは、配列番号37で表される*Pectobacterium atrosepticum* SCR11043株由来ALDHをコードする遺伝子の塩基配列を、大腸菌で発現させるためにコドン最適化したDNAであり、人工合成により調製した。配列番号52で表されるDNAは、配列番号40で表される*Halioxenophilus aromaticivorans*株由来ALDHをコードする遺伝子の塩基配列を、大腸菌で発現させるためにコドン最適化したDNAであり、人工合成により調製した。配列番号53で表されるDNAは、配列番号41で表される*Sphingomonas* sp. TF3株由来ALDHをコードする遺伝子の塩基配列を、大腸菌で発現させるためにコドン最適化したDNAであり、人工合成により調製した。配列番号56で表されるDNAは、配列番号44で表される*Pseudomonas* sp. LQ26株由来ALDHをコードする遺伝子の塩基配列を、大腸菌で発現させるためにコドン最適化したDNAであり、人工合成により調製した。配列番号57で表されるDNAは、配列番号45で表される*Burkholderia lata*株由来ALDHをコードする遺伝子の塩基配列を、大腸菌で発現させるためにコドン最適化したDNAであり、人工合成により調製した。配列番号58で表されるDNAは、配列番号46で表される*Paraburkholderia* sp. 5N株由来ALDHをコードする遺伝子の塩基配列を、大腸菌で発現させるためにコドン最適化

したDNAであり、人工合成により調製した。

[0295] このとき、配列番号9および表14の各プライマー1で表される塩基配列、配列番号10および表14の各プライマー2で表される塩基配列は、それぞれの5'末端に相補な塩基配列を含む。すなわち、配列番号9で表される塩基配列の5'末端は表14の各プライマー1で表される塩基配列の5'末端に相補な塩基配列を含み、配列番号10で表される塩基配列の5'末端は表14の各プライマー2で表される塩基配列の5'末端に相補な塩基配列を含む。

[0296] 上記PCRによって得られた増幅DNA断片と実施例1で調製したpQE80Lのベクター断片をそれぞれIn-Fusion (商標) HD Cloning Kit (タカラバイオ社) を用いて連結することにより、各ALDH発現プラスミドを造成した。

[0297] 上記で得られた各発現プラスミドを用い、Escherichia coli BL21 (DE3) を形質転換することで、各ALDH発現プラスミドを有する大腸菌を造成した。

[0298] (3) ALDHホモログの4-(アミノメチル)シクロヘキサンカルボン酸の生産性評価

上記(2)で得た各ALDH発現プラスミドを有する大腸菌を用いて、実施例1と同様の方法でHisタグ付加組換え型の各ALDH精製酵素を取得した。

[0299] 取得した精製酵素0.07mg、実施例1で取得したPatA 0.07mg、50mMのMOPS (pH7.8)、1mMの塩化マグネシウム、1mMのDTT、1mMのピルビン酸、0.1mMのPLP、1mMのNAD⁺、および、1mMの1,4-ビス(アミノメチル)シクロヘキサンのシス体およびトランス体混合物(トランス比率45.7%)を含む0.1mLの反応液(pH7.8)を調製し、30℃、400rpmの条件で24時間反応を行った。また、ネガティブコントロールとして精製酵素の代わりに等量のMOPS緩衝液を添加した反応液、ポジティブコントロールとして精製酵素

X y l Cを用いた反応液についても同様に反応を行った。

[0300] 反応終了後、実施例1と同様の方法により反応生成物を分析した。結果を表15に示す。

[表15]

クエリー	ALDH ホモログ	同一性 (%)	生成量(mM)		AMCHAトランス比率(%)
			TXA	シス-TXA	
—	— (ネガティブコントロール)	—	N.D.	N.D.	—
PatD	CkpatD	88.4	0.22	0.35	39
	SepatD	83.3	0.23	0.39	37
	CspatD	83.3	0.29	0.28	51
	PppatD	71.1	0.24	0.32	43
XylC	HaBD	84.2	0.33	0.06	85
	SsBD	72.4	0.20	0.03	87
	RiAD	48.4	0.02	0.02	50
	RrAD	49.7	0.01	0.01	50
StyD	PmsLAD	86.9	0.22	0.38	37
	BIAD	69.9	0.20	0.34	37
	PbsAD	63.3	0.21	0.37	36
—	XylC (ポジティブコントロール)	—	0.30	0.05	87

[0301] 表15より、PatD、XylCまたはStyDとの同一性が約60%以上のALDHを使用した場合も、4-(アミノメチル)シクロヘキサン-1-カルボン酸を生成可能であることが分かった。また、CspatD、HaBD、またはSsBDを用いた場合は、生成した4-(アミノメチル)シクロヘキサン-1-カルボン酸のトランス比率が50%よりも大きく、これらの酵素はトランス特異性が高い酵素であることが分かった。特に、XylCとの同一性が70%以上のHaBDまたはSsBDを用いた場合は、生成した4-(アミノメチル)シクロヘキサン-1-カルボン酸のトランス比率が70%以上であり、これらの酵素はXylCと同様に特にトランス選択的に反応する、すなわち、高いトランスを有することが分かった。

[0302] [実施例5] 補酵素再生系の導入によるTXA生産性評価

(1) アラニンデヒドロゲナーゼ (AlaDH) 発現株の造成

配列番号123で表される*Bacillus subtilis* 168由来アラニンデヒドロゲナーゼをコードするBsAlaDHの遺伝子断片を得るため、常法により調製した*Bacillus subtilis* 168の染色体DNAを鋳型として、配列番号83および84で表される塩基配列であるオリゴヌクレオチドをプライマーセットとして用いてPCR反応を行い、配列番号124で表されるBsAlaDH遺伝子断片を得た。配列番号9で表される塩基配列の5'末端は配列番号83で表される塩基配列の5'末端に相補的な配列を含み、配列番号10で表される塩基配列の5'末端は配列番号84で表される塩基配列の5'末端に相補的な配列を含む。

[0303] 上記PCRによって得られたBsAlaDH断片と実施例1で調製したpQE80Lのベクター断片をそれぞれIn-Fusion (商標) HD Cloning Kit (タカラバイオ社) を用いて連結することにより、発現プラスミドpQE80L-BsAlaDHを得た。

[0304] 上記で得られた発現プラスミドを用いて*Escherichia coli* BL21 (DE3) を形質転換し、BL21 (DE3) /pQE80L-BsAlaDHを得た。

[0305] (2) NADHオキシダーゼ (NOX) 発現株の造成

配列番号125で表される*Bacillus subtilis* 168由来NADHオキシダーゼをコードする、BsNOXの遺伝子断片を得るため、*Bacillus subtilis* 168の染色体DNAを鋳型として、配列番号85および86で表される塩基配列であるオリゴヌクレオチドをプライマーセットとして用いて、PCR反応を行い、配列番号126で表されるBsNOX遺伝子断片を得た。配列番号9で表される塩基配列の5'末端は配列番号85で表される塩基配列の5'末端に相補的な配列を含み、配列番号10で表される塩基配列の5'末端は配列番号86で表される塩基配列の5'末端に相補的な配列を含む。

[0306] 上記PCRによって得られたBsNOX遺伝子断片と実施例1で調製した

pQE80Lのベクター断片をそれぞれIn-Fusion（商標）HD Cloning Kit（タカラバイオ社）を用いて5連結することにより、発現プラスミドpQE80L-BsNOXを得た。

[0307] 上記で得られた発現プラスミドを用いて*Escherichia coli* BL21（DE3）を形質転換し、BL21（DE3）／pQE80L-BsNOXを得た。

[0308] （3）BsAlaDHおよびBsNOXの発現および酵素精製

上記で得られたBL21（DE3）／pQE80L-BsAlaDHおよびBL21（DE3）／pQE80L-BsNOXを用いて、実施例1と同様の方法でHisタグ付加組換え型の酵素精製BsAlaDHおよびBsNOXを取得した。

[0309] （4）AlaDHおよびNOXを導入したTXA生成活性評価

実施例1で取得したPatA 0.07mg、実施例2で取得したXylC 0.07mg、上記（3）で取得したBsAlaDH 0.07mg、BsNOX 0.07mg、50mMのMOPS（pH7.8）、1mMの塩化マグネシウム、1mMのDTT、1mMのピルビン酸、0.1mMのPLP、2mM NAD⁺、並びに、1mMの1,4-ビス（アミノメチル）シクロヘキサンのシス体およびトランス体混合物（トランス比率45.7%）を含む0.1mLの反応液（pH7.8）を調製し、30℃で400rpmの条件で24時間反応を行った。

[0310] 反応終了後、実施例1と同様の方法により反応生成物および残存基質を分析した。結果を表16に示す。

[表16]

再生酵素		生成量(mM)		
BsAlaDH	BsNOX	残基質	TXA	cis-TXA
—	—	0.56	0.46	0.09
+	+	0.13	0.71	0.27

[0311] 表16より、補酵素再生系のBsAlaDHとBsNOXを導入した場合

に、基質消費が進み、4-(アミノメチル)シクロヘキサノール-1-カルボン酸の生産性が向上した。

[0312] [実施例6] AT発現株およびALDH発現株を用いた静止菌体反応による4-(アミノメチル)シクロヘキサノール-1-カルボン酸生産

実施例1で造成したBL21(DE3)/pQE80L-PatA株およびBL21(DE3)/pQE80L-XylC株について、実施例1(2)と同様の方法で湿菌体を取得した。該湿菌体に終濃度10mL/Lとなるようキシレンを添加し、30℃で850rpmのもと30分間の膜処理を行った。

[0313] 50g/Lの各膜処理後湿菌体、50mM MOPS (pH7.8)、350mMのグルコース、50mMの1,4-ビス(アミノメチル)シクロヘキサンのシス体およびトランス体混合物(トランス比率45.7%)、50mMの塩化マグネシウム、並びに、50mMのNAD⁺を含有する0.4mLの反応液を調製し、30℃、850rpmの条件下で24時間反応を行った。

[0314] 反応終了後、実施例1と同様の方法により反応生成物を分析した。その結果、3.9mMのTXAおよび2.8mMのcis-TXAの生成蓄積を確認した。したがって、ATとALDHをそれぞれ発現する微生物菌体を用いた静止菌体反応によっても、4-(アミノメチル)シクロヘキサノール-1-カルボン酸を生成できることを確認した。

[0315] [実施例7] ATおよびALDH共発現株を用いた静止菌体反応による4-(アミノメチル)シクロヘキサノール-1-カルボン酸生産

(1) ATおよびALDHの共発現株の造成

ア) BL21(DE3)/pET28a-PatA-XylC株の造成

Escherichia coli K12 MG1655の染色体DNAを鋳型として、配列番号89および90で表される塩基配列であるオリゴヌクレオチドをプライマーセットとして用いてPCR反応を行い、PatA断片を得た。続いて、配列番号24で表される塩基配列を鋳型として、配列

番号 91 および 92 で表される塩基配列であるオリゴヌクレオチドをプライマーセットとして用いて PCR 反応を行い、XyIC 断片を得た。なお、配列番号 90 で表される塩基配列の 5' 末端は、配列番号 91 で表される塩基配列の 5' 末端に相補的な配列を含む。

[0316] 上記得られた PatA 断片および XyIC 断片を混合したものを鋳型として、配列番号 89 および 92 で表される塩基配列であるオリゴヌクレオチドをプライマーセットとして用いて PCR 反応を行い、2 断片を連結した DNA (以下、PatA-XyIC という。) 断片を得た。

[0317] さらに、配列番号 87 および 88 で表される塩基配列からなる DNA をプライマーセットとして、発現ベクター pET28a (Novagen 社製) を鋳型に PCR 反応を行い、約 5.2 kb のベクター断片を得た。なお、配列番号 87 で表される塩基配列の 5' 末端は配列番号 89 で表される塩基配列の 5' 末端に相補的な配列を含み、配列番号 88 で表される塩基配列の 5' 末端は配列番号 92 で表される塩基配列の 5' 末端に相補的な配列を含む。

[0318] 上記で得られた PatA-XyIC 断片とベクター断片を、In-Fusion (商標) HD Cloning Kit (タカラバイオ社) を用いて連結することにより、発現プラスミド pET28a-PatA-XyIC を得た (図 4)。

[0319] 上記で得られた発現プラスミドで *Escherichia coli* BL21 (DE3) を形質転換し、BL21 (DE3) / pET28a-PatA-XyIC 株を得た。

[0320] イ) BL21 (DE3) / pET28a-XyIC-PatA の造成

配列番号 24 で表される塩基配列を鋳型として、配列番号 93 および 94 で表される塩基配列であるオリゴヌクレオチドをプライマーセットとして用いて PCR 反応を行い、XyIC 断片を得た。*Escherichia coli* K12 MG1655 の染色体 DNA を鋳型として、配列番号 95 および 96 で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドをプライマーセ

ットとして用いてPCR反応を行い、Pat A断片を得た。なお、配列番号94で表される塩基配列の5'末端は配列番号95で表される塩基配列の5'末端に相補的な配列を含む。

[0321] 上記で得られたXyIC断片およびPat A断片を混合したものを鋳型として、配列番号93および96で表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドをプライマーセットとして用いてPCR反応を行い、2断片を連結したDNA（以下、XyIC-Pat Aという。）断片を得た。なお、配列番号87で表される塩基配列の5'末端は配列番号93の5'末端に相補的な配列を含み、配列番号88で表される塩基配列の5'末端は配列番号96で表される塩基配列の5'末端に相補的な配列を含む。

[0322] 上記で得られたXyIC-Pat A断片と、上記ア)で得たベクター断片を、In-Fusion（商標）HD Cloning Kit（タカラバイオ社）を用いて連結することにより、発現プラスミドpET28a-XyIC-Pat Aを得た。

[0323] 上記で得られた発現プラスミドを用いてEscherichia coli BL21（DE3）を形質転換し、BL21（DE3）／pET28a-XyIC-Pat A株を得た。

[0324] ウ) BL21（DE3）／pUC19-Pat A-XyIC株の造成

Escherichia coli K12 MG1655の染色体DNAを鋳型として、配列番号99および90で表される塩基配列であるオリゴヌクレオチドをプライマーセットとして用いて、PCR反応を行い、Pat A断片を得た。続いて、配列番号24で表される塩基配列を鋳型として、配列番号91および100で表される塩基配列であるオリゴヌクレオチドをプライマーセットとして用いてPCR反応を行い、XyIC断片を得た。なお、配列番号90で表される塩基配列の5'末端は配列番号91で表される塩基配列の5'末端に相補的な配列を含む。

[0325] 上記で得られたPat A断片およびXyIC断片を混合したものを鋳型として、配列番号99および100で表される塩基配列からなるDNAをプラ

イマーセットとして用いてPCR反応を行い、2断片を連結したDNA（以下、Pat A-Xy I Cという。）断片を得た。

[0326] 配列番号97および98で表される塩基配列からなるDNAをプライマーセットとして、発現ベクターpUC19（ニッポンジーン社製）を鋳型にPCR反応を行い、約2.6kbのベクター断片を得た。なお、配列番号97で表される塩基配列の5'末端は配列番号99で表される塩基配列の5'末端に相補的な配列を含み、配列番号98で表される塩基配列の5'末端は配列番号100で表される塩基配列の5'末端に相補的な配列を含む。

[0327] 上記で得られたPat A-Xy I C断片とベクター断片を、In-Fusion（商標）HD Cloning Kit（タカラバイオ社）を用いて連結することにより、発現プラスミドpUC19-Pat A-Xy I Cを得た。

[0328] 上記で得られた発現プラスミドで*Escherichia coli* BL21（DE3）を形質転換し、BL21（DE3）/pUC19-Pat A-Xy I C株を得た。

[0329] エ）BL21（DE3）/pUC19-Xy I C-Pat A株の造成

配列番号24で表されるDNAを鋳型として、配列番号101および94で表される塩基配列であるオリゴヌクレオチドをプライマーセットとして用いてPCR反応を行い、Xy I C断片を得た。続いて*Escherichia coli* K12 MG1655の染色体DNAを鋳型として、配列番号95および102で表される塩基配列であるオリゴヌクレオチドをプライマーセットとして用いてPCR反応を行い、Pat A断片を得た。なお、配列番号94で表される塩基配列の5'末端は配列番号95で表される塩基配列の5'末端に相補的な配列を含む。

[0330] 上記で得られたXy I C断片およびPat A遺伝子断片を混合したものを鋳型として、配列番号101および102で表される塩基配列であるオリゴヌクレオチドをプライマーセットとして用いてPCR反応を行い、2断片を連結したDNA（以下、Xy I C-Pat Aという。）断片を得た。なお、

配列番号 97 で表される塩基配列の 5' 末端は配列番号 101 で表される塩基配列の 5' 末端に相補的な配列を含み、配列番号 98 で表される塩基配列の 5' 末端は配列番号 102 で表される塩基配列の 5' 末端に相補的な配列を含む。

[0331] 上記で得られた X y l C - P a t A 断片と、上記ウ) で得た p U C 19 のベクター断片を、I n - F u s i o n (商標) H D C l o n i n g K i t (タカラバイオ社) にて連結することにより、発現プラスミド p U C 19 - X y l C - P a t A を得た。

[0332] 上記で得られた発現プラスミドを用いて E s c h e r i c h i a c o l i B L 21 (D E 3) を形質転換し、B L 21 (D E 3) / p U C 19 - X y l C - P a t A 株を得た。

[0333] (2) A T および A L D H の共発現株を用いた菌体反応

上記 (1) で造成した B L 21 (D E 3) / p E T 28 a - P a t A - X y l C 株、B L 21 (D E 3) / p E T 28 a - X y l C - P a t A 株、B L 21 (D E 3) / p U C 19 - P a t A - X y l C 株および B L 21 (D E 3) / p U C 19 - X y l C - P a t A 株、および、ネガティブコントロールとして B L 21 (D E 3) 株を用い、静止菌体反応による 4 - (アミノメチル) シクロヘキサノー 1 - カルボン酸の生産性を評価した。

[0334] 各菌株を 30 m g / L のカナマイシンまたは 100 m g / L のアンピシリンを含む 2 m L の L B 培地の入った試験管に接種し、30℃で16時間、振盪培養した。該培養液を 30 m g / L のカナマイシンまたは 100 m g / L のアンピシリンを含む 40 m L の L B 培地の入った 250 m L 容三角フラスコに接種し 30℃で2時間振盪培養した後、終濃度が 1 m M となるように I P T G を添加し、さらに 37℃で5時間振盪培養した。またコントロールとして B L 21 (D E 3) をカナマイシンおよびアンピシリンを含まない培地で同様に培養した。

[0335] 培養後の該培養液を遠心分離して湿菌体を取得した。該湿菌体に終濃度 10 m L / L となるようキシレンを添加し、30℃で 850 r p m のもと 30

分間の膜処理を行った。

[0336] 100 g/Lの上記膜処理後湿菌体、50 mM MOPS (pH 7.8)、350 mMのグルコース、50 mMの1,4-ビス(アミノメチル)シクロヘキサンのシス体およびトランス体混合物(トランス比率45.7%)、50 mMの塩化マグネシウム、並びに、50 mMのNAD⁺を含有する0.4 mLの反応液を調製し、30℃、850 rpmの条件下で24時間反応を行った。

[0337] 反応終了後、実施例1と同様の方法により反応生成物を分析した。結果を表17示す。

[表17]

微生物	生成量(mM)	
	TXA	cis-TXA
BL21(DE3)	N.D.	N.D.
BL21(DE3)/pET28a-PatA-XylC	5.6	0.9
BL21(DE3)/pET28a-XylC-PatA	9.2	0.8
BL21(DE3)/pUC19-PatA-XylC	8.3	1.1
BL21(DE3)/pUC19-XylC-PatA	8.6	1.7

N. D. : 定性限界以下(S/N<3)

[0338] 表17より、PatAおよびXylCを共発現させた菌株を用いた静止菌体反応によっても、4-(アミノメチル)シクロヘキサノール-1-カルボン酸を生成できることを確認した。

[0339] いて、上記反応液からNAD⁺を除いた場合の4-(アミノメチル)シクロヘキサノール-1-カルボン酸の生産性を評価した。反応条件は上記に従った。結果を表18に示す。

[表18]

微生物	生成量 (mM)	
	TXA	cis-TXA
BL21(DE3)	N.D.	N.D.
BL21(DE3)/pET28a-PatA-XylC	1.0	0.1
BL21(DE3)/pET28a-XylC-PatA	2.7	0.2
BL21(DE3)/pUC19-PatA-XylC	4.1	0.2
BL21(DE3)/pUC19-XylC-PatA	3.0	0.4

N. D. : 定性限界以下 ($S/N < 3$)

[0340] 反応液から NAD^+ を除いた場合、4-（アミノメチル）シクロヘキサノー
1-カルボン酸の生成量が減少した。このことから、静止菌体反応による4-
（アミノメチル）シクロヘキサノー1-カルボン酸の生産において、補酵
素の供給が重要であることが示唆された。

[0341] [実施例8] ATおよびALDHの共発現株を用いた添加培養による4-（
アミノメチル）シクロヘキサノー1-カルボン酸生産

実施例7で造成したBL21(DE3)/pUC19-PatA-XylC株、BL21(DE3)/pUC19-XylC-PatA株、および、
ネガティブコントロールとしてBL21(DE3)株を用い、添加培養法に
よる4-（アミノメチル）シクロヘキサノー1-カルボン酸の生産性を評価
した。

[0342] 各菌株を100mg/Lのアンピシリンを含む2mLのLB培地の入った
試験管に接種し、30℃で16時間、振盪培養した。BL21(DE3)株
はアンピシリンを含まない培地で同様に培養した。該培養液を30mg/L
の100mg/Lのアンピシリンを含む4mLのLB培地の入った大試験管
に接種し、30℃で5時間培養した後、終濃度が1mMのIPTGおよび1
g/Lの1, 4-ビス（アミノメチル）シクロヘキサンのシス体およびトラ
ンス体混合物（トランス比率45.7%）を添加し、さらに37℃で24時
間培養した。

[0343] 培養終了後、実施例1と同様の方法により反応生成物を分析した。結果を
表19に示す。

[表19]

微生物	生成量 (μ M)
	TXA
BL21 (DE3)	4
BL21 (DE3) / pUC19-PatA-XylC	133
BL21 (DE3) / pUC19-XylC-PatA	27

[0344] 表19より、添加培養法によっても、TXAを生成できることを確認した。

[0345] [実施例9] ALDHホモログを用いた4-(アミノメチル)シクロヘキサンカルボン酸の生産

(1) ALDHホモログ酵素の探索

実施例3でトランス体基質に高い選択性を有するALDHであるXylCのアミノ酸配列(配列番号20)をクエリーとして、National Center for Biotechnology Informationのタンパク質配列データベースであるBLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)のホモロジー検索機能を用いて、XylCと同一性50%以上であり、かつ検索結果におけるホモログ酵素同士の同一性が90%未満のものを選択した。上記操作によって抽出された酵素のアミノ酸配列(配列番号127~139)を表20に示す。

[表20]

ALDH ホモログ	同一性(%)			由来微生物	アミノ酸配列 (配列番号)
	対 XylC	対 HaBD	対 SsBD		
1	68.0	65.3	76.0	Hydrogenophaga aromaticivorans	127
2	99.0	84.0	70.8	Pseudomonas aeruginosa	128
3	87.1	80.1	69.2	Pseudomonas sp. MAP12	129
4	82.6	92.2	67.8	Alteromonas	130
5	81.3	80.7	71.3	Tepidiphilus succinatimandens	131
6	51.8	52.2	57.9	Halomonas cupida	132
7	52.5	52.0	58.6	Pseudomonas fluorescens	133
8	57.3	55.9	63.9	Glaciimonas immobilis	134
9	58.7	57.1	64.5	Paraburkholderia unamae	135
10	55.1	54.7	57.8	Marinobacter salsuginis	136
11	57.6	56.4	63.0	Aromatoleum toluclasticum	137
12	58.9	57.2	64.9	Ideonella livida	138
13	58.7	56.5	62.2	Burkholderia_sp_D7	139

[0346] 表20のALDHホモログ1～11および13はいずれもベンズアルデヒドデヒドロゲナーゼ、ALDHホモログ12はアルデヒドデヒドロゲナーゼファミリータンパク質とアノテーションされているタンパク質である。

[0347] (2) ALDHホモログ発現株の造成

上記表20に記載の各ALDHホモログ酵素の遺伝子断片を得るため、表21に示した鋳型、プライマー1および2を用いて、PCR反応を行った。このとき、配列番号9で表される塩基配列の5'末端は表21の各プライマー1で表される塩基配列の5'末端に相補な塩基配列を含み、配列番号10で表される塩基配列の5'末端は表21の各プライマー2で表される塩基配列の5'末端に相補な塩基配列を含む。

[表21]

ALDH ホモログ	由来微生物	配列番号		
		鋳型	プライマー1	プライマー2
1	Hydrogenophaga aromaticivorans	140	153	154
2	Pseudomonas aeruginosa	141	155	156
3	Pseudomonas sp. MAP12	142	157	158
4	Alteromonas	143	159	160
5	Tepidiphilus succinatimandens	144	161	162
6	Halomonas cupida	145	163	164
7	Pseudomonas fluorescens	146	165	166
8	Glaciimonas immobilis	147	167	168
9	Paraburkholderia unamae	148	169	170
10	Marinobacter salsuginis	149	171	172
11	Aromatoleum toluclasticum	150	173	174
12	Ideonella livida	151	175	176
13	Burkholderia_sp_D7	152	177	178

[0348] 配列番号140～152で表されるDNAは、配列番号127～139で表されるALDHホモログ酵素をコードする遺伝子の塩基配列を、大腸菌で発現させるためにコドン最適化したDNAであり、人工合成により調製した。

[0349] 上記PCRによって得られた増幅DNA断片と実施例1で調製したpQE80Lのベクター断片をそれぞれIn-Fusion（商標）HD Cloning Kit（タカラバイオ社）を用いて連結することにより、各ALDH発現プラスミドを造成した。上記で得られた各発現プラスミドを用い、Escherichia coli BL21（DE3）を形質転換することで、各ALDH発現プラスミドを有する大腸菌を造成した。

[0350] （3）ALDHホモログの4-（アミノメチル）シクロヘキサンカルボン酸の生産性評価

上記（2）で得た各ALDH発現プラスミドを有する大腸菌を用いて、実施例1と同様の方法でHisタグ付加組換え型の各ALDH精製酵素を取得

した。

[0351] 取得した精製酵素 0.07 mg、実施例 1 で取得した Pat A 0.07 mg、50 mM の CHES (pH 9.0)、10 mM の塩化マグネシウム、1 mM の DTT、1 mM のピルビン酸、0.1 mM の PLP、1 mM の NAD⁺、および、1 mM の 1,4-ビス(アミノメチル)シクロヘキサンのシス体およびトランス体混合物(トランス比率 45.7%)を含む 0.1 mL の反応液(pH 7.8)を調製し、30℃、400 rpm の条件で 24 時間反応を行った。また、ポジティブコントロールとして精製酵素 Xyl C を用いた反応液についても同様に反応を行った。

[0352] 反応終了後、実施例 1 と同様の方法により反応生成物を分析した。結果を表 22 に示す。

[表22]

ALDH ホモログ	同一性(%)			生成量(mM)		AMCHA トランス比率 (%)
	対 XylC	対 HaBD	対 SsBD	TXA	シス- TXA	
1	68.0	65.3	76.0	0.25	0.04	85
2	99.0	84.0	70.8	0.45	0.17	72
3	87.1	80.1	69.2	0.50	0.35	59
4	82.6	92.2	67.8	0.59	0.06	90
5	81.3	80.7	71.3	0.55	0.23	71
6	51.8	52.2	57.9	0.02	0.04	39
7	52.5	52.0	58.6	0.11	0.03	78
8	57.3	55.9	63.9	0.22	0.46	32
9	58.7	57.1	64.5	0.19	0.21	48
10	55.1	54.7	57.8	0.01	0.01	54
11	57.6	56.4	63.0	0.03	0.02	59
12	58.9	57.2	64.9	0.04	0.06	41
13	58.7	56.5	62.2	0.18	0.16	53
XylC	100	84.2	74.2	0.57	0.18	76

[0353] 表22より、評価したすべてのALDHホモログ1～13において、4-（アミノメチル）シクロヘキサン-1-カルボン酸の生成が確認できた。特にALDHホモログ1～5、7～9、13を用いた場合に、4-（アミノメチル）シクロヘキサン-1-カルボン酸の顕著な生成が確認できた。また、ALDHホモログ1～5、7、13を用いた場合に生成した4-（アミノメチル）シクロヘキサン-1-カルボン酸のトランス比率が50%よりも大きく、トランス体基質に対する高い特異性を有していた。その中でも特に、ALDHホモログ1、2、4、5、7は4-（アミノメチル）シクロヘキサン-1-カルボン酸のトランス比率が70%以上であり、XylCに匹敵するトランス体基質に対する特に高い選択性を有することがわかった。中でも、

A L D H ホモログ 4 および 5 は X y I C と同等量のトランス-4-（アミノメチル）シクロヘキサノ-1-カルボン酸を生成した。

[0354] [実施例 10] ケト酸および補酵素供給強化による T X A 生産性評価

(1) 評価株の造成

ア) M G 1 6 5 5 / p Q E 8 0 L - X y I C - P a t A の造成

配列番号 24 で表される塩基配列を鋳型として、配列番号 179 および 94 で表される塩基配列であるオリゴヌクレオチドをプライマーセットとして用いて P C R 反応を行い、X y I C 断片を得た。続いて、E s c h e r i c h i a c o l i K 1 2 M G 1 6 5 5 の染色体 DNA を鋳型として、配列番号 95 および 180 で表される塩基配列であるオリゴヌクレオチドをプライマーセットとして用いて P C R 反応を行い、P a t A 断片を得た。なお、配列番号 94 で表される塩基配列の 5' 末端は、配列番号 95 で表される塩基配列の 5' 末端に相補的な配列を含む。

[0355] 上記得られた X y I C 断片および P a t A 断片を混合したものを鋳型として、配列番号 179 および 180 で表される塩基配列であるオリゴヌクレオチドをプライマーセットとして用いて P C R 反応を行い、2 断片を連結した DNA（以下、X y I C - P a t A という。）断片を得た。

[0356] さらに、配列番号 181 および 182 で表される塩基配列からなる DNA をプライマーセットとして、発現ベクター p Q E 8 0 L（Q I A G E N 社製）を鋳型に P C R 反応を行い、約 7 k b のベクター断片を得た。なお、配列番号 181 で表される塩基配列の 5' 末端は配列番号 179 で表される塩基配列の 5' 末端に相補的な配列を含み、配列番号 182 で表される塩基配列の 5' 末端は配列番号 180 で表される塩基配列の 5' 末端に相補的な配列を含む。

[0357] 上記で得られた X y I C - P a t A 断片とベクター断片を、I n - F u s i o n（商標）H D C l o n i n g K i t（タカラバイオ社）を用いて連結することにより、発現プラスミド p Q E 8 0 L - X y I C - P a t A を得た。上記で得られた発現プラスミドで E s c h e r i c h i a c o l i

MG1655を形質転換し、MG1655/pQE80L-XyIC-PatA株を得た。

[0358] イ) MG1655/pQE80L-PatA-BsAlaDH-XyIC-BsNOXの造成

Escherichia coli K12 MG1655の染色体DNAを鋳型として、配列番号183および90で表される塩基配列であるオリゴヌクレオチドをプライマーセットとして用いてPCR反応を行い、PatA断片を得た。続いて、配列番号24で表される塩基配列を鋳型として、配列番号91および30で表される塩基配列であるオリゴヌクレオチドをプライマーセットとして用いてPCR反応を行い、XyIC断片を得た。なお、配列番号90で表される塩基配列の5'末端は、配列番号91で表される塩基配列の5'末端に相補的な配列を含む。

[0359] 上記得られたPatA断片およびXyIC断片を混合したものを鋳型として、配列番号183および30で表される塩基配列であるオリゴヌクレオチドをプライマーセットとして用いてPCR反応を行い、2断片を連結したDNA（以下、PatA-XyICという。）断片を得た。

[0360] さらに、配列番号181および182で表される塩基配列からなるDNAをプライマーセットとして、発現ベクターpQE80L（QIAGEN社製）を鋳型にPCR反応を行い、約7kbのベクター断片を得た。なお、配列番号181で表される塩基配列の5'末端は配列番号183で表される塩基配列の5'末端に相補的な配列を含み、配列番号182で表される塩基配列の5'末端は配列番号30で表される塩基配列の5'末端に相補的な配列を含む。

[0361] 上記で得られたPatA断片とベクター断片を、In-Fusion（商標）HD Cloning Kit（タカラバイオ社）を用いて連結することにより、プラスミドpQE80L-PatA-XyICを得た。上記で得られたプラスミドを鋳型として、配列番号184および182で表される塩基配列からなるDNAをプライマーセットとしてPCR反応を行い、DN

A（以下、pQE80L-PatAという。）断片を得た。

[0362] *Bacillus subtilis* 168の染色体DNAを鋳型として、配列番号185および186で表される塩基配列であるオリゴヌクレオチドをプライマーセットとして用いてPCR反応を行い、BsAlaDH遺伝子断片を得た。*Bacillus subtilis* 168の染色体DNAを鋳型として、配列番号187および86で表される塩基配列であるオリゴヌクレオチドをプライマーセットとして用いてPCR反応を行い、BsNOX遺伝子断片を得た。なお、配列番号186で表される塩基配列の5'末端は、配列番号187で表される塩基配列の5'末端に相補的な配列を含む。

[0363] 上記得られたBsAlaDH遺伝子断片およびNOX遺伝子断片を混合したものを鋳型として、配列番号185および86で表される塩基配列であるオリゴヌクレオチドをプライマーセットとして用いてPCR反応を行い、2断片を連結したDNA（以下、BsAlaDH-BsNOXという。）断片を得た。

[0364] なお、配列番号185で表される塩基配列の5'末端は配列番号184で表される塩基配列の5'末端に相補的な配列を含み、配列番号86で表される塩基配列の5'末端は配列番号182で表される塩基配列の5'末端に相補的な配列を含む。

[0365] 上記で得られたpQE80L-PatA断片とBsAlaDH-BsNOX断片を、をIn-Fusion（商標）HD Cloning Kit（タカラバイオ社）を用いて連結することにより、プラスミドpQE80L-PatA-BsAlaDH-BsNOXを得た。

[0366] 上記で得られたプラスミドを鋳型として、配列番号188および189で表される塩基配列からなるDNAをプライマーセットとしてPCR反応を行い、DNA（以下、pQE80L-PatA-BsAlaDH-BsNOXという。）断片を得た。

[0367] 配列番号24で表される塩基配列を鋳型として、配列番号190および9

4で表される塩基配列であるオリゴヌクレオチドをプライマーセットとして用いてPCR反応を行い、XyIC断片を得た。

[0368] なお、配列番号188で表される塩基配列の5'末端は配列番号190で表される塩基配列の5'末端に相補的な配列を含み、配列番号189で表される塩基配列の5'末端は配列番号94で表される塩基配列の5'末端に相補的な配列を含む。

[0369] 上記で得られたpQE80L-PatA-BsAlaDH-BsNOX断片とXyIC断片を、In-Fusion (商標) HD Cloning Kit (タカラバイオ社)を用いて連結することにより、発現プラスミドpQE80L-PatA-BsAlaDH-XyIC-BsNOXを得た。

[0370] 上記で得られた発現プラスミドで*Escherichia coli* MG1655を形質転換し、MG1655/pQE80L-PatA-BsAlaDH-XyIC-BsNOX株を得た。

[0371] ウ) MG1655ΔaceE/pQE80L-patA-xyIC-ald-nox株の造成

＜遺伝子欠損の際にマーカーとして用いるDNA断片の取得＞

配列番号191および192で表される塩基配列からなるDNAをプライマーセットとして、pCatSac (Appl Environ Microbiol (2013) 79, 3033-3039)を鋳型としてPCRを行い、クロラムフェニコール耐性cat遺伝子およびスクロース感受性sacB遺伝子を含む、cat-sacB断片を得た。

[0372] ＜ピルビン酸デヒドロゲナーゼ活性が喪失した大腸菌の造成＞

ピルビン酸デヒドロゲナーゼをコードするDNA (以下、aceE遺伝子という。)を欠損した大腸菌を、以下の方法で造成した。常法により調製した*Escherichia coli* MG1655株のゲノムDNAを鋳型として、表23の「プライマーセット」で表される塩基配列からなるDNAをプライマーセットとしてPCRを行い、各DNA断片を増幅した。

[表23]

プライマーセット (配列番号)	増幅DNA断片	備考
193および194	aceE上流1	配列番号191および配列番号194で表される塩基配列の5'末端の配列は相補的である。
195および196	aceE下流1	配列番号192および配列番号195で表される塩基配列の5'末端の配列は相補的である。
193および197	aceE上流2	配列番号197および配列番号198で表される塩基配列の5'末端の配列は相補的である。
198および196	aceE下流2	

[0373] aceE上流1およびaceE上流2は、aceE遺伝子の開始コドンから開始コドンの上流約1000bpまでの領域を含む。aceE下流1およびaceE下流2は、aceE遺伝子の終止コドン下流約50bpから約1000bpまでの領域を含む。

[0374] aceE上流1、aceE下流1、およびcat-sacB断片を等モルの比率で混合したものを鋳型とし、配列番号193および196で表される塩基配列からなるDNAをプライマーセットに用いてPCRを行い、aceE遺伝子周辺領域の配列にcat-sacB断片が挿入された配列からなるDNA（以下、aceE::cat-sacBという。）断片を得た。

[0375] aceE上流2およびaceE下流2を等モルの比率で混合したものを鋳型とし、配列番号193および196で表される塩基配列からなるDNAをプライマーセットに用いてPCRを行い、aceEを含まず、aceE上流とaceE下流が直接連結した配列からなるDNA（以下、ΔaceEという。）断片を得た。

[0376] aceE::cat-sacB断片を、入リコンビナーゼをコードする遺伝子を含むプラスミドpKD46 [Datsenko, K. A., Warner, B. L., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, Vol. 97, 6640-6645 (2000)] を保持するMG1655株に

、エレクトロポレーション法により導入し、クロラムフェニコール耐性かつシュクロース感受性を示した形質転換体（*aceE* 遺伝子が *aceE::cat-sacB* に置換した形質転換体）を得た。

[0377] $\Delta aceE$ 断片を、当該形質転換体にエレクトロポレーション法により導入し、クロラムフェニコール感受性かつシュクロース耐性を示す形質転換体（*aceE::cat-sacB* が $\Delta aceE$ に置換した形質転換体）を得た。それらのうちからさらに、アンピシリン感受性を示す形質転換体（*pKD46* が脱落した形質転換体）を得た。当該形質転換体を *MG1655 $\Delta aceE$* と命名した。

[0378] <発現プラスミドの取得>

イ) で得たプラスミド *pQE80L-PatA-XylC* を鋳型として、配列番号 199 および 182 で表される塩基配列からなる DNA をプライマーセットに用いて PCR を行い、DNA（以下、*pQE80L-PatA-XylC* という。）断片を得た。

[0379] イ) で得た *BsAlaDH-BsNOX* 断片を鋳型として、配列番号 200 および 86 表される塩基配列からなる DNA をプライマーセットに用いて PCR を行い、DNA（以下、*BsAlaDH-BsNOX2* という。）断片を得た。

[0380] なお、配列番号 200 で表される塩基配列の 5' 末端は配列番号 199 で表される塩基配列の 5' 末端に相補的な配列を含み、配列番号 86 で表される塩基配列の 5' 末端は配列番号 182 で表される塩基配列の 5' 末端に相補的な配列を含む。

[0381] 上記で得られた *pQE80L-PatA-XylC* 断片と *BsAlaDH-BsNOX2* 断片を、*In-Fusion*（商標）*HD Cloning Kit*（タカラバイオ社）を用いて連結することにより、発現プラスミド *pQE80L-PatA-XylC-BsAlaDH-BsNOX* を得た。上記で得られた発現プラスミドで *Escherichia coli* *MG1655 $\Delta aceE$* を形質転換し、*MG1655 $\Delta aceE$ / pQE80L*

—PatA—XylC—BsAlaDH—BsNOX株を得た。

[0382] (2) 補酵素再生系導入株を用いた静止菌体反応

上記(1)で造成したMG1655/pQE80L—XylC—PatA株、MG1655/pQE80L—PatA—BsAlaDH—XylC—BsNOX株およびMG1655ΔaceE/pQE80L—PatA—XylC—BsAlaDH—BsNOX株、を用い、静止菌体反応による4-(アミノメチル)シクロヘキサノール-1-カルボン酸の生産性を評価した。

[0383] 各菌株を100mg/Lのアンピシリンを含む2mLのLB培地の入った試験管に接種し、30℃で16時間、振盪培養した。該培養液を100mg/Lのアンピシリンを含む40mLのLB培地の入った250mL容三角フラスコに接種し28℃で2時間振盪培養した後、終濃度が1mMとなるようにIPTGを添加し、さらに28℃で24時間振盪培養した。ただし、MG1655ΔaceE/pQE80L—PatA—XylC—BsAlaDH—BsNOX株のみ、IPTG添加までの培養時間を3時間半とした。

[0384] 培養後の該培養液を遠心分離して湿菌体を取得した。該湿菌体に終濃度10mL/Lとなるようキシレンを添加し、30℃で850rpmのもと30分間の膜処理を行った。

[0385] 100g/Lの上記膜処理後湿菌体、140mMのグルコース、50mMの1,4-ビス(アミノメチル)シクロヘキサノールのシス体およびトランス体混合物(トランス比率45.7%)、50mMの塩化マグネシウム、10mMのピルビン酸、並びに、10mMのNAD⁺を含有する0.2mLの反応液を調製し、30℃、850rpmの条件下で24時間反応を行った。

[0386] 反応終了後、実施例1と同様の方法により反応生成物および残存基質を分析した。結果を表24示す。

[表24]

微生物	残基質 (mM)	生成量(mM)	
		TXA	cis-TXA
MG1655/pQE80L-XylC-PatA	24.2	9.9	N.D.
MG1655/pQE80L-PatA-BsAlaDH-XylC-BsNOX	12.9	21.9	0.8
MG1655 Δ aceE/pQE80L-PatA-XylC-BsAlaDH-BsNOX	5.3	27.0	1.6

N. D. : 定性限界以下(S/N<3)

[0387] 表24より、ピルビン酸およびNAD⁺の再生遺伝子の導入により、4-(アミノメチル)シクロヘキサノール-1-カルボン酸の生産量と基質である1,4-ビス(アミノメチル)シクロヘキサノールの消費量が向上した。さらに、宿主大腸菌のピルビン酸分解遺伝子の破壊によっても目的物生産と基質消費が向上し、特に、基質消費の向上が顕著であった。このことから、ピルビン酸分解遺伝子の破壊により、基質のアミノ基転移反応が促進されたことが推察される。

[0388] 以上より、静止菌体反応による4-(アミノメチル)シクロヘキサノール-1-カルボン酸の生産において、ケト酸および補酵素を再生する酵素の遺伝子の導入または宿主におけるケト酸の分解系の遮断によって、ケト酸および補酵素の供給を強化することが有効であることが示された。

[0389] [実施例11] トランス-4-(アミノメチル)シクロヘキサノール-1-カルバルデヒドに対して高い特異性を有するALDHに共通するアミノ酸残基の抽出

実施例3、実施例4および実施例9において、シストランス体混合基質を用いた反応により、生成するAMCHAのトランス体比率が高かったALDHは、AMCHAの製造のうち、特にTXAの製造において有用であるといえる。これらのALDHに特徴的なアミノ酸残基を見出すため、アミノ酸配列の比較を行った。

[0390] 実施例3、実施例4および実施例9において、シストランス体混合基質を用いた反応により、生成するAMCHAのトランス体比率が70%以上で

あったALDH（配列番号20、40、41、127、128、130および131）を、4-（アミノメチル）シクロヘキサノール-1-カルバルデヒドのトランス体に対する特異性が特に高いALDHとして抽出した。その結果、いずれもベンズアルデヒドデヒドロゲナーゼとしてアノテーションされている酵素であった。そこで、実施例3、実施例4および実施例9において用いたベンズアルデヒドデヒドロゲナーゼとアノテーションされているALDHのうち、シス-トランス体混合基質を用いた反応により、生成するAMCHAのトランス体比率が50%未満であったALDH（配列番号134および135）を4-（アミノメチル）シクロヘキサノール-1-カルバルデヒドのトランス体に対する特異性をもたないALDHとして抽出した。

[0391] なお、酵素活性の強さによる影響を排除するため、実施例3、実施例4および実施例9のシス-トランス体混合基質を用いた反応により、生成するAMCHAが0.2mM未満であったALDHは除外した。

[0392] 上記操作で抽出されたALDHのアミノ酸配列を、Clustal Omegaを用いてアライメントした（図5Aおよび図5B）。さらに、トランス-4-（アミノメチル）シクロヘキサノール-1-カルバルデヒドに対する特異性が高いALDHで保存されており、かつ、トランス-4-（アミノメチル）シクロヘキサノール-1-カルバルデヒドに対する特異性をもたないALDHでは保存されていないアミノ酸残基を抽出した。抽出されたアミノ酸残基は、XyIC（配列番号20）に対応するアミノ酸残基番号で表25に示した。

[表25]

トランス-4-(アミノメチル)シクロヘキサン-1-カルバルデヒドに対する 特異性が高いALDHで保存されているアミノ酸残基			
G35	A122	D319	P440
A65	L124	D333	C443
L82	V134	Q365	P445
G104	V144	I390	S466
G109	F160	A420	I467
I110	G271	L423	
Q117	A290	V434	

[0393] 表25に示したアミノ酸残基は、ALDHがトランス-4-(アミノメチル)シクロヘキサン-1-カルバルデヒドに対する特に高い特異性をもつために重要であることが示唆される。

[0394] [実施例12] 1,4-シクロヘキサジメタノールを基質化合物とした4-(アミノメチル)シクロヘキサン-1-カルボン酸の生産

[0395] 実施例12では、図6に示す反応経路を想定し、1,4-シクロヘキサジメタノールを基質化合物として4-(アミノメチル)シクロヘキサン-1-カルボン酸の生産を試みた。

[0396] (1) OX、ATおよびALDH共発現株の造成

配列番号201で表される *Arthrobacter chlorophenolicus* 由来コリンオキシダーゼをコードする *AcCOx* 遺伝子断片を得るため、配列番号202で表される塩基配列を鋳型として、配列番号203および204で表される塩基配列であるオリゴヌクレオチドをプライマーセットに用いてPCR反応を行い、*AcCOx*断片を得た。なお、配列番号202で表される塩基配列は、*AcCOx* 遺伝子の塩基配列を、大腸菌で発現させるためにコドン最適化したDNAであり、人工合成により調製した。上記で得た *AcCOx* 遺伝子断片を鋳型として、配列番号203および配列番号205で表される塩基配列をプライマーセットに用いてPCR反応を行い、*AcCOx2*断片を得た。

[0397] [実施例10] の(1)イ)で得たプラスミドpQE80L-PatA-

XyICを鋳型として、配列番号181および206で表される塩基配列をプライマーセットに用いてPCR反応を行い、DNA（以下、pQE80L-PatA-XyIC2という。）断片を得た。なお、配列番号181で表される塩基配列の5'末端は、配列番号203で表される塩基配列の5'末端に相補的な配列を含み、配列番号206で表される塩基配列の5'末端は、配列番号205で表される塩基配列の5'末端に相補的な配列を含む。

[0398] 上記で得られたAcCOx2断片とpQE80L-PatA-XyIC2断片を、In-Fusion（商標）HD Cloning Kit（タカラバイオ社）を用いて連結することにより、発現プラスミドpQE80L-AcCOx-PatA-XyICを得た。上記で得られた発現プラスミドで*Escherichia coli* MG1655を形質転換し、MG1655/pQE80L-AcCOx-PatA-XyIC株を得た。また、ネガティブコントロールとして、市販ベクターpQE80L（キアゲン社製）で*Escherichia coli* MG1655を形質転換し、MG1655/pQE80L株を得た。

[0399] (2) OX、ATおよびALDH共発現株の静止菌体反応による、1, 4-シクロヘキサンジメタノールからの4-(アミノメチル)シクロヘキサノール-1-カルボン酸の生産

上記で造成したMG1655/pQE80L-AcCOx-PatA-XyIC株、および、ネガティブコントロールとしてMG1655/pQE80L株を用い、静止菌体反応による1, 4-シクロヘキサンジメタノールからの4-(アミノメチル)シクロヘキサノール-1-カルボン酸の生産性を評価した。

[0400] 各菌株を100mg/Lのアンピシリンを含む2mLのLB培地の入った試験管に接種し、30℃で16時間、振盪培養した。該培養液を100mg/Lのアンピシリンを含む40mLのLB培地の入った250mL容三角フラスコに接種し30℃で2時間振盪培養した後、終濃度が1mMとなるようにIPTGを添加し、さらに30℃で5時間振盪培養した。培養後の該培養

液を遠心分離して湿菌体を取得した。該湿菌体に終濃度 10 mL/L となるようキシレンを添加し、30℃で850 rpmのもと30分間の膜処理を行った。

[0401] 100 g/Lの上記膜処理後湿菌体、50 mM HEPES (pH 8.0)、50 mMの1, 4-シクロヘキサジメタノールのシス体およびトランス体混合物(トランス比率73.2%)、50 mMの塩化マグネシウム、50 mMのグルタミン酸、並びに、25 mMのNAD⁺を含有する0.2 mLの反応液を調製し、30℃、850 rpmの条件下で16時間反応を行った。

[0402] 反応終了後、実施例1と同様の方法により反応生成物を分析した。その結果、ネガティブコントロール株では0.8 μMのトランス-4-(アミノメチル)シクロヘキサノ-1-カルボン酸(TXA)および1.2 μMのシス-4-(アミノメチル)シクロヘキサノ-1-カルボン酸(cis-TXA)が検出されたが、OX、ATおよびALDHの共発現株においては19.3 μMのトランス-4-(アミノメチル)シクロヘキサノ-1-カルボン酸(TXA)および40.8 μMのシス-4-(アミノメチル)シクロヘキサノ-1-カルボン酸(cis-TXA)が生成した。したがって、OX、ATおよびALDHを共発現する微生物菌体を用いた静止菌体反応によって、1, 4-シクロヘキサジメタノールを基質化合物として4-(アミノメチル)シクロヘキサノ-1-カルボン酸を生成できることが分かった。

[0403] また、本実施例にて使用したアミノ基転移酵素は、1, 4-ビス(アミノメチル)シクロヘキサンのアミノ基を転移させ、4-(アミノメチル)シクロヘキサノ-1-カルバルデヒドを生成させるのみならず、アミノ基を有する化合物のアミノ基を他の化合物へ転移させる活性を有するタンパク質として、図6に示す反応経路による1, 4-シクロヘキサジメタノールからの4-(アミノメチル)シクロヘキサノ-1-カルボン酸の生産に使用できることが示された。また、本実施例にて使用したアルデヒドデヒドロゲナーゼも同様に、図6に示す反応経路による1, 4-シクロヘキサジメタノールからの4-(アミノメチル)シクロヘキサノ-1-カルボン酸の生産に使用

できることが示された。

[0404] [実施例14] 1, 4-ビス(アミノメチル)シクロヘキサンから4-(アミノメチル)シクロヘキサン-1-カルボン酸生成経路の推定

(1) 精製酵素反応およびLC-MS/MSによる分析

実施例1と同様の方法により取得した精製PatA、実施例3と同様の方法により取得した精製XylCを用い、PatAおよびXylC各0.07mg、50mMのMOPS(pH7.8)、10mMの塩化マグネシウム、1mMのピルビン酸、0.1mMのPLP、1mMのNAD⁺および1mMの1, 4-ビス(アミノメチル)シクロヘキサンのシス体およびトランス体混合物(トランス比率45.7%)を含む0.1mLの反応液を調製し、30℃、400rpmの条件で24時間反応を行った。また、精製酵素として、PatAのみ、またはXylCのみを添加したものも同様に反応させた。

[0405] 反応終了後、反応液を希釈した後、遠心分離し、上清に含まれる反応生成物および残存基質を実施例3と同様の方法でLCMS-8040にて分析した。結果を表26に示す。

[0406] [表26]

酵素		生成量(mM)		生成量(Area)		残存基質 (mM)
PatA	XylC	TXA	シス-TXA	14.58 分	15.16 分	
+	-	N.D.	N.D.	7602845	6684944	0.61
-	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.02
+	+	0.32	0.04	1755730	3124563	0.49

N. D. : 定性限界以下 (S/N<3)

[0407] 表26より、1, 4-ビス(アミノメチル)シクロヘキサンとPatAおよびXylCを反応させた場合、1, 4-ビス(アミノメチル)シクロヘキサンが消費され、4-(アミノメチル)シクロヘキサン-1-カルボン酸が生成し、溶出時間14.58分および15.16分において質量電荷比142.1の化合物のピークが生成した。また、1, 4-ビス(アミノメチル)シクロヘキサンとPatAのみを反応させた場合には、1, 4-ビス(アミノメチル)シクロヘキサンが消費されたものの、4-(アミノメチル)シク

ロヘキサンー１ーカルボン酸は生成せず、溶出時間１４．５８分および１５．１６分において質量電荷比１４２．１の化合物のピークが生成した。また、１，４ービス（アミノメチル）シクロヘキサンとX y l Cのみを反応させた場合には、１，４ービス（アミノメチル）シクロヘキサンが消費されず、４ー（アミノメチル）シクロヘキサンー１ーカルボン酸および質量電荷比１４２．１の化合物のピークは生成しなかった。

[0408] 以上のことから、１，４ービス（アミノメチル）シクロヘキサンとP a t AおよびX y l Cが反応液中に共存することで初めて４ー（アミノメチル）シクロヘキサンー１ーカルボン酸が生成することがわかった。P a t AおよびX y l Cの反応では、質量電荷比１４２．１の化合物のピークのエリア値がP a t Aのみの反応よりも小さくなり、４ー（アミノメチル）シクロヘキサンー１ーカルボン酸が生成している。したがって、１，４ービス（アミノメチル）シクロヘキサンとP a t AおよびX y l Cの反応においては、まず１，４ービス（アミノメチル）シクロヘキサン（すなわち化合物８）がP a t Aによって質量電荷比１４２．１の化合物に変換され、続いて、質量電荷比１４２．１の化合物がX y l Cによって４ー（アミノメチル）シクロヘキサンー１ーカルボン酸に変換されていると考えられる。すなわち、X y l Cは質量電荷比１４２．１の化合物を４ー（アミノメチル）シクロヘキサンー１ーカルボン酸に変換する活性を有すると考えられる。また、質量電荷比１４２．１の化合物はP a t AおよびX y l Cの性質に基づき、４ー（アミノメチル）シクロヘキサンー１ーカルバルデヒド（すなわち化合物７）と推定される。

[0409] [実施例１５] ４ー（アミノメチル）シクロヘキサンー１ーカルバルデヒドの生成確認

（１）精製酵素反応

実施例１と同様の方法により取得したP a t A、実施例３と同様の方法により取得したX y l Cを用い、P a t AおよびX y l C各０．０５ｍｇ、５０ｍＭのM O P S（p H 7．０）、１０ｍＭの塩化マグネシウム、１ｍＭの

ピルビン酸、0.1 mMのPLPおよび1 mMのNAD⁺に対し、1 mMの1,4-ビス（アミノメチル）シクロヘキサンのシス体、トランス体、または、シス体およびトランス体混合物（トランス比率45.7%）を含む0.1 mLの反応液を調製し、30℃、400 rpmの条件で24時間反応を行った。反応終了後、反応液を希釈した後、遠心分離し、上清に含まれる反応生成物および残存基質を実施例3と同様の方法でLCMS-8040にて分析した（以下の（2））。また、以下の（3）、（4）の分析に供した。

[0410] （2）LC-MS/MS分析

Pat AおよびXy I Cと1,4-ビス（アミノメチル）シクロヘキサンのトランス体を反応させた場合には溶出時間14.50分に、シス体を反応させた場合には溶出時間15.07分において、質量電荷比142.1の特徴的なピークが検出された。これらは、Pat AおよびXy I Cと1,4-ビス（アミノメチル）シクロヘキサンのシス体およびトランス体混合物を反応させた場合においても検出された。このことから、溶出時間14.50分の化合物はトランス体基質と、溶出時間15.07分の化合物はシス体基質と酵素とが反応して生じた化合物であると考えられ、これらは分子量141の化合物である。これは、1,4-ビス（アミノメチル）シクロヘキサンのひとつのアミノ基が転移された生成物として考えられる4-（アミノメチル）シクロヘキサノン-1-カルバルデヒドの分子量141.2と一致する。したがって、溶出時間14.50の化合物はトランス-4-（アミノメチル）シクロヘキサノン-1-カルバルデヒドであり、溶出時間溶出時間15.07分の化合物はシス-4-（アミノメチル）シクロヘキサノン-1-カルバルデヒドであると推察される。

[0411] （3）オーフタルアルデヒド（OPA）によるポストカラム誘導体化分析

酵素反応液に含まれるアミノ基を有する化合物を検出するため、第一級アミンを検出可能であるOPA誘導体化を行った。

[0412] HPLCにおいてカラム分離後に、誘導体化のための反応液を合流させることで、カラムオープン内で誘導体化し、誘導体化された化合物を検出器へ

導入するポストカラム誘導体化システムを用い、サンプル中のアミノ基を有する化合物の検出を試みた。分析条件は以下のとおりである。

[分析条件]

- ・カラム：SUMIPAX ODS Z-CLUE 3 μ m 4.6 $\times$ 250 mm（住化分析センター社）
- ・カラムオープン温度：50℃
- ・移動相：10 mMクエン酸三ナトリウム二水和物、10 mM無水硫酸ナトリウムおよび10 mMドデシル硫酸ナトリウムを精製水に溶解し、希硫酸でpH 3.2に調整したもの
- ・移動相流速：0.7 mL/min
- ・反応液：18.5 g/Lホウ酸、11.0 g/L水酸化ナトリウム、30% Brij-35 3.0 mL/L、0.6 g/L α -フタルアルデヒドおよび4.66 g/L N-アセチル-L-システインを精製水に溶解したもの
- ・反応液流速：0.3 mL/min
- ・分析時間：70分
- ・検出器：RF-20A（島津製作所製）
- ・励起/蛍光波長：350 nm/450 nm

[0413] 分析の結果、各化合物の標品の溶出時間は表27に示す通りとなった。また、各サンプルのクロマトグラムを重ねて表示すると図8のようになった。

[0414] [表27]

化合物	溶出時間(分)
TXA	11.75
cis-TXA	13.80
trans-1,4-ビス(アミノメチル)シクロヘキサン	56.30
cis-1,4-ビス(アミノメチル)シクロヘキサン	60.92

[0415] 図8より、Pat AおよびXy I Cと1,4-ビス(アミノメチル)シクロヘキサンのトランス体を反応させた場合、溶出時間12.66分に、シス体を反応させた場合、溶出時間13.37分に特徴的なピークが検出された

。これらは、Pat AおよびXy I Cと1, 4-ビス（アミノメチル）シクロヘキサンのシス体およびトランス体混合物を反応させた場合においても検出された。このことから、溶出時間12.66分の化合物はトランス体基質と、溶出時間13.37分の化合物はシス体基質と酵素とが反応して生じた化合物であると考えられ、いずれもアミノ基を有する化合物である。1, 4-ビス（アミノメチル）シクロヘキサンのひとつのアミノ基が転移された生成物として考えられる4-（アミノメチル）シクロヘキサノール-1-カルバルデヒドはアミノ基を有する。したがって、溶出時間12.66分の化合物はトランス-4-（アミノメチル）シクロヘキサノール-1-カルバルデヒド（すなわち化合物7のトランス体）であり、溶出時間溶出時間13.37分の化合物はシス-4-（アミノメチル）シクロヘキサノール-1-カルバルデヒド（すなわち化合物7のシス体）であると推察される。

[0416] (4) ジニトロフェニルヒドラジン（DNPH）によるプレカラム誘導体化分析

酵素反応液に含まれるアルデヒド基を有する化合物を検出するため、アルデヒドを検出可能であるDNPH誘導体化を行った。

[0417] 酵素反応後の反応液を精製水にて10倍希釈およびフィルターろ過した。ろ液100 μ Lに対し、20%リン酸水溶液を2 μ L添加して混和し、さらに0.1% DNPHアセトニトリル溶液を5 μ L添加して混和後、室温で20分間静置し、誘導体化した。

[0418] 誘導体化後の試料を、PDA検出器（SPD-M20A）とMS検出器（LCMS8040）を順に接続したHPLCシステムを用いて測定し、DNPH誘導体の紫外吸収と質量電荷比を測定した。また、未反応DNPHによるMSイオン源の汚染を防ぐため、MSには分析開始8分後から試料を導入した。分析条件は以下のとおりである。

[分析条件]

・カラム：YMC-Triart Bio C4 3 μ m 4.6 $\times$ 150 mm（ワイエムシ社）

- ・ カラム温度：40℃
- ・ 移動相：水70%アセトニトリル30%
- ・ 分析時間：30分
- ・ 流速：0.5 mL/min
- ・ PDA検出波長：360 nm
- ・ MS検出イオン：
 - ポジティブモード： $[M+H]^+ = 322.10 \text{ m/z}$
 - ネガティブモード： $[M-H]^- = 320.10 \text{ m/z}$

[0419] 分析の結果、いずれの酵素反応液においても、DNPH誘導体の特徴的な360 nmの吸収と、ポジティブイオンモードにおける質量電荷比322.10およびネガティブイオンモードにおける質量電荷比320.10のピークが同じ溶出時間（PDAでは10.58分、MSでは10.98分）で検出された（図9）。

[0420] このことから、酵素反応液のDNPH誘導体化により、分子量321のDNPH誘導体が生成しているといえる。分子量321からDNPH誘導体化前の分子量は141と推定され、これは4-（アミノメチル）シクロヘキサノン-1-カルバルデヒドの分子量141.2と一致する。

[0421] 上記の（2）～（4）の結果から、1,4-ビス（アミノメチル）シクロヘキサノンとPatAおよびXyICの酵素反応において、分子量141であり、かつ、アミノ基およびアルデヒド基を有する化合物が生じていることが示された。これは4-（アミノメチル）シクロヘキサノン-1-カルバルデヒドと一致する。したがって、1,4-ビス（アミノメチル）シクロヘキサノンとPatAおよびXyICの酵素反応においては、まずPatAにより4-（アミノメチル）シクロヘキサノン-1-カルバルデヒドが生成し、4-（アミノメチル）シクロヘキサノン-1-カルバルデヒドに対してXyICが作用することで、4-（アミノメチル）シクロヘキサノン-1-カルボン酸が生成していることを示唆している。すなわち、XyICは4-（アミノメチル）シクロヘキサノン-1-カルバルデヒド（すなわち化合物7）を4-（アミノ

メチル) シクロヘキサン-1-カルボン酸に変換する活性を有すると考えられる。

[0422] [実施例 16] ベンズアルデヒドデヒドロゲナーゼ (B Z D H) を用いた 4- (アミノメチル) シクロヘキサンカルボン酸の生産

(1) 評価株の造成

配列番号 207 に示す *Xanthomonas campestris* 由来の公知のベンズアルデヒドデヒドロゲナーゼ *XcBZDH* を評価した。*XcBZDH* をコードする塩基配列を配列番号 208 に示す。配列番号 208 で表される DNA を鋳型とし、配列番号 209 および 210 で表される塩基配列からなる DNA をプライマーセットとして、PCR 反応を行い、DNA 断片を増幅した。なお、鋳型として *Xanthomonas campestris* の染色体 DNA を用い、染色体 DNA は常法により調製した。

[0423] このとき、配列番号 9 および配列番号 209 で表される塩基配列、配列番号 10 および配列番号 210 で表される塩基配列は、それぞれの 5' 末端に相補な塩基配列を含む。すなわち、配列番号 9 で表される塩基配列の 5' 末端は配列番号 209 で表される塩基配列の 5' 末端に相補な塩基配列を含み、配列番号 10 で表される塩基配列の 5' 末端は配列番号 210 で表される塩基配列の 5' 末端に相補な塩基配列を含む。

[0424] 上記 PCR によって得られた増幅 DNA 断片と実施例 1 で調製した pQE80L のベクター断片をそれぞれ *In-Fusion* (商標) HD Cloning Kit (タカラバイオ社) を用いて連結することにより、*XcBZDH* 発現プラスミドを造成した。

[0425] 上記で得られた各発現プラスミドを用い、*Escherichia coli* BL21 (DE3) を形質転換することで、*XcBZDH* 発現プラスミドを有する大腸菌を造成した。

[0426] (2) *XcBZDH* の 4- (アミノメチル) シクロヘキサンカルボン酸の生産性評価

上記 (1) で得た *XcBZDH* 発現プラスミドを有する大腸菌を用いて、

実施例 1 と同様の方法で H i s タグ付加組換え型の X c B Z D H 精製酵素を取得した。

[0427] 取得した X c B Z D H 0.07 mg、実施例 1 で取得した P a t A 0.07 mg、50 mM の M O P S (pH 7.8)、10 mM の塩化マグネシウム、1 mM のピルビン酸、0.1 mM の P L P、1 mM の N A D⁺、および、1 mM の 1,4-ビス(アミノメチル)シクロヘキサンのシス体およびトランス体混合物(トランス比率 45.7%)を含む 0.1 mL の反応液を調製し、30℃、400 rpm の条件で 24 時間反応を行った。また、ポジティブコントロールとして精製酵素 X y l C を用いた反応液についても同様に反応を行った。

[0428] 反応終了後、実施例 1 と同様の方法により反応生成物を分析した。結果を表 28 に示す。

[0429] [表28]

BZDH	生成量(mM)		AMCHA トランス比率(%)
	TXA	シス-TXA	
XylC	0.318	0.036	89.79
XcBZDH	0.089	0.008	91.90

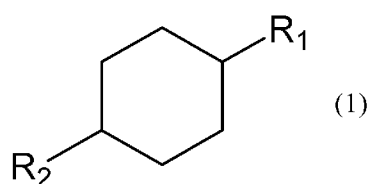
[0430] 表 28 より、公知のベンズアルデヒドデヒドロゲナーゼのひとつである X c B Z D H および P a t A を組み合わせることで、1,4-ビス(アミノメチル)シクロヘキサン(すなわち化合物 8)を基質として 4-(アミノメチル)シクロヘキサン-1-カルボン酸を生成蓄積できることが分かった。

[0431] また、X c B Z D H を用いた場合に生成した 4-(アミノメチル)シクロヘキサン-1-カルボン酸のトランス比率が 50% を大きく上回っており、本酵素(X c B Z D H)は、X y l C と同様にトランス体の 4-(アミノメチル)シクロヘキサン-1-カルバルデヒドに対する特異性(トランス選択性)が高い酵素であることが分かった。

請求の範囲

[請求項1] 下記一般式（１）で表される化合物を基質化合物または中間体化合物として、ヒドロキシ基をアルデヒド基に変換する活性を有するタンパク質、アルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有するタンパク質、およびアルデヒド基とアミノ基を可逆的に変換する活性を有するタンパク質から選択される少なくとも一つの酵素の存在下で、シス体および／またはトランス体の４－（アミノメチル）シクロヘキサン－１－カルボン酸を製造する方法。

[化1]



[式中、 R_1 および R_2 は、それぞれ独立して CH_2OH 、 CHO 、 $COOH$ 、または CH_2NH_2 である（但し、 R_1 と R_2 の一方が $COOH$ であり、他方が CH_2NH_2 である場合、および R_1 と R_2 が共に $COOH$ である場合を除く）]

[請求項2] 前記ヒドロキシ基をアルデヒド基に変換する活性を有するタンパク質、前記アルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有するタンパク質、および前記アルデヒド基とアミノ基を可逆的に変換する活性を有するタンパク質の存在下で製造する、請求項１に記載の方法。

[請求項3] R_1 と R_2 の一方が CH_2OH であり、他方が CH_2OH 、 CHO 、または CH_2NH_2 である、前記一般式（１）で表される化合物を基質化合物または中間体化合物とする場合、前記ヒドロキシ基をアルデヒド基に変換する活性を有するタンパク質、前記アルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有するタンパク質、および前記アルデヒド基とアミノ基を可逆的に変換する活性を有するタンパク質の存在下で製造する、請求項２に記載の方法。

[請求項4] R_1 と R_2 の一方が CH_2NH_2 であり、他方が CHO である、一般

式（１）で表される化合物を基質化合物または中間体化合物とする場合、前記アルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有するタンパク質の存在下で製造する、請求項１に記載の方法。

[請求項5] R_1 と R_2 の一方が CHO であり、他方が $COOH$ である、一般式（１）で表される化合物を基質化合物または中間体化合物とする場合、前記アルデヒド基とアミノ基を可逆的に変換する活性を有するタンパク質の存在下で製造する、請求項１に記載の方法。

[請求項6] R_1 と R_2 の一方が CHO であり、他方が CH_2NH_2 、もしくは CHO である、または R_1 と R_2 が共に CH_2NH_2 である、一般式（１）で表される化合物を基質化合物または中間体化合物とする場合、前記アルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有するタンパク質、および前記アルデヒド基とアミノ基を可逆的に変換する活性を有するタンパク質の存在下で製造する、請求項１に記載の方法。

[請求項7] R_1 と R_2 の一方が CH_2OH であり、他方が CH_2NH_2 である、一般式（１）で表される化合物を基質化合物または中間体化合物とする場合、前記ヒドロキシ基をアルデヒド基に変換する活性を有するタンパク質、および前記アルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有するタンパク質の存在下で製造する、請求項１に記載の方法。

[請求項8] R_1 と R_2 の一方が CH_2OH であり、他方が $COOH$ である、一般式（１）で表される化合物を基質化合物または中間体化合物とする場合、前記ヒドロキシ基をアルデヒド基に変換する活性を有するタンパク質、および前記アルデヒド基とアミノ基を可逆的に変換する活性を有するタンパク質の存在下で製造する、請求項１に記載の方法。

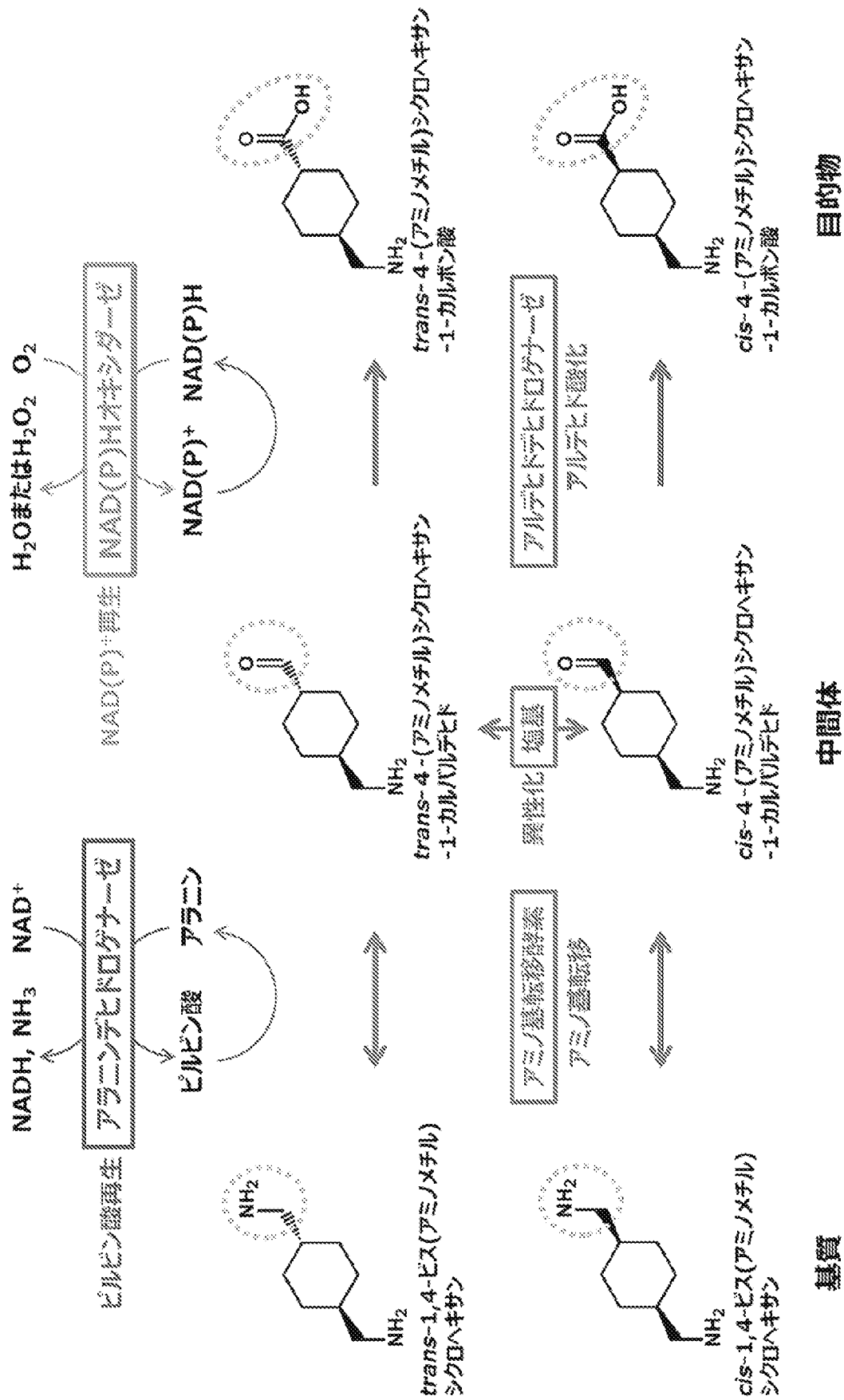
[請求項9] 前記ヒドロキシ基をアルデヒド基に変換する活性を有するタンパク質が、オキシダーゼ活性を有するタンパク質、デヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質およびアルデヒドレダクターゼ活性を有するタンパク質から選択される少なくとも１つであり、前記アルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有するタンパク質が、アルデヒドデヒド

ロゲナーゼ活性を有するタンパク質、および／またはアルデヒドオキシダーゼ活性を有するタンパク質であり、前記アルデヒド基とアミノ基を可逆的に変換する活性を有するタンパク質が、アミノ基転移酵素活性を有するタンパク質、アミンデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質およびアミノオキシダーゼ活性を有するタンパク質から選択される少なくとも1つである、請求項1～8のいずれか一項に記載の方法。

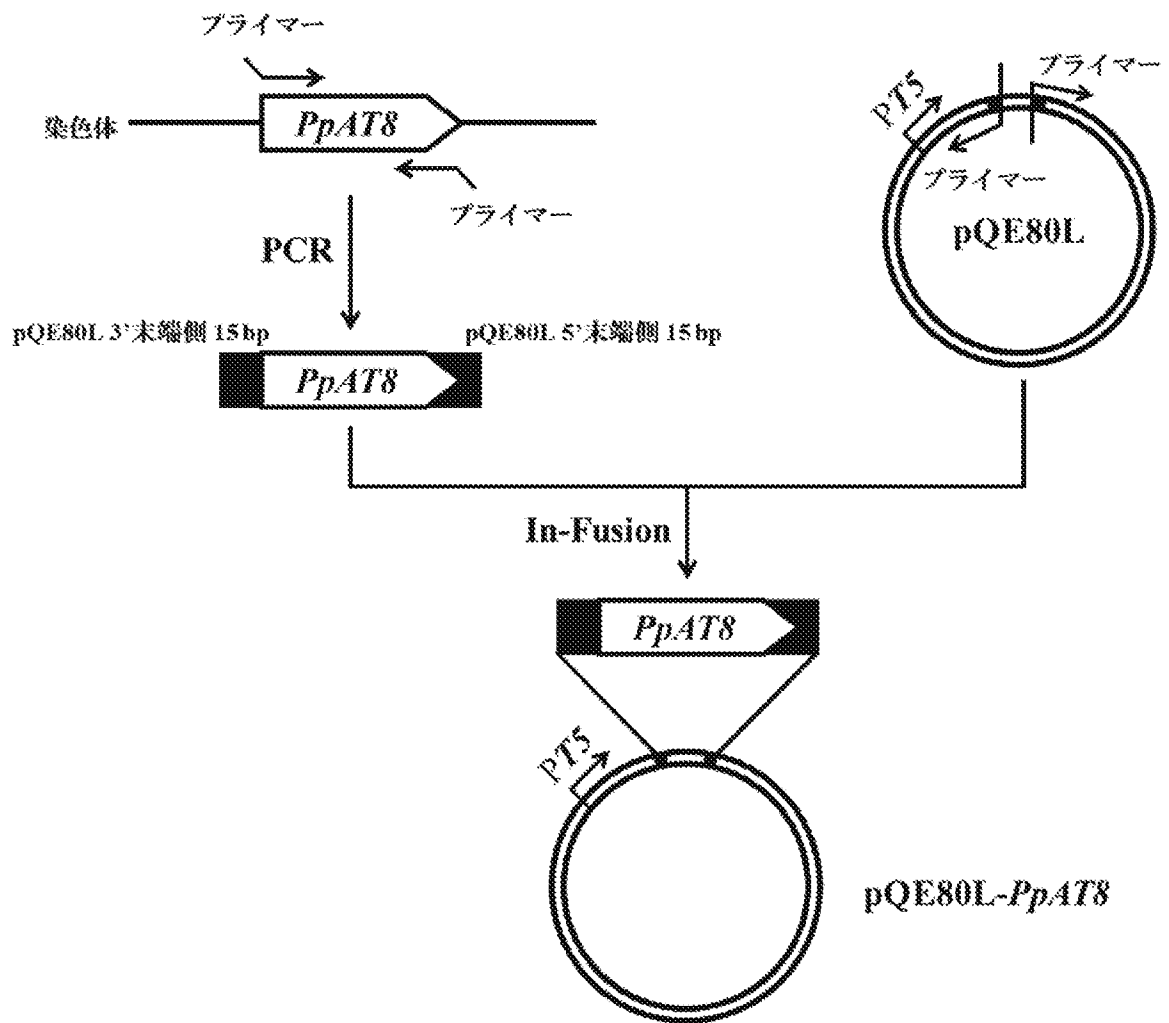
[請求項10] 前記ヒドロキシ基をアルデヒド基に変換する活性を有するタンパク質が、コリンオキシダーゼ活性を有するタンパク質であり、前記アルデヒド基をカルボキシ基に変換する活性を有するタンパク質が、アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質であり、前記アルデヒド基とアミノ基を可逆的に変換する活性を有するタンパク質が、アミノ基転移酵素活性を有するタンパク質である、請求項1～8のいずれか一項に記載の方法。

[請求項11] 前記コリンオキシダーゼ活性を有するタンパク質が、配列番号201で示されるアミノ酸配列と60%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質であり、前記アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質が、配列番号19～22、35～46および127～139のいずれか1つで表されるアミノ酸配列と50%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質であり、前記アミノ基転移酵素活性を有するタンパク質が、配列番号1～4および103～105のいずれか1つで表されるアミノ酸配列と60%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるタンパク質である、請求項10に記載の方法。

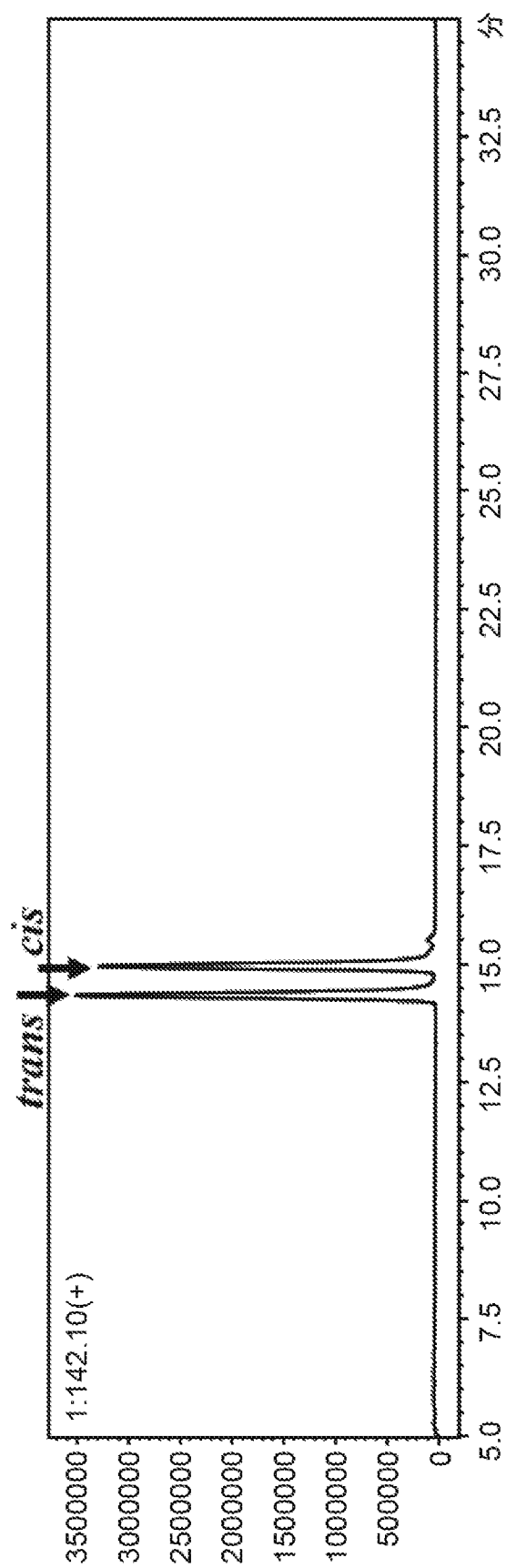
[図1]



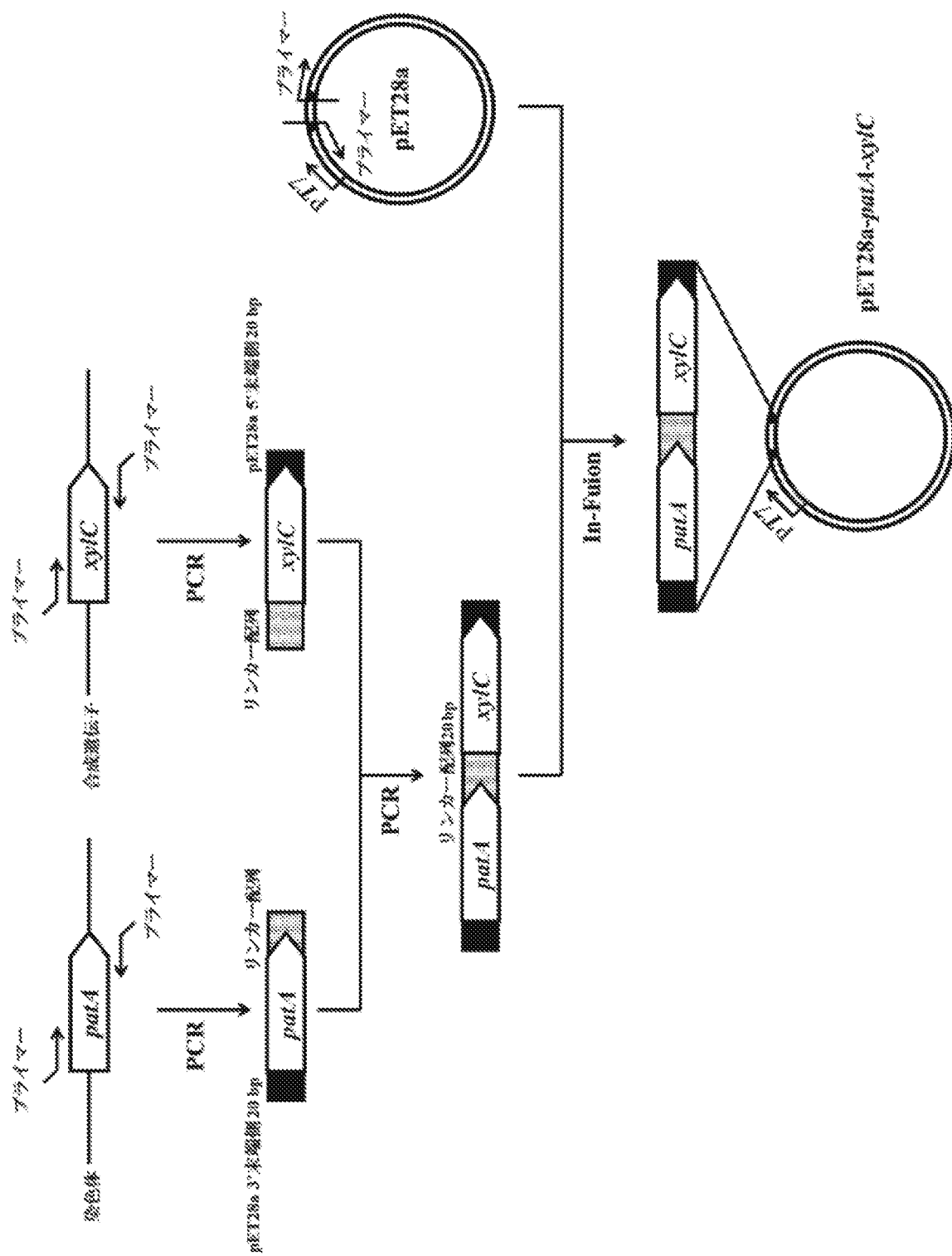
[図2]



[図3]



[図4]



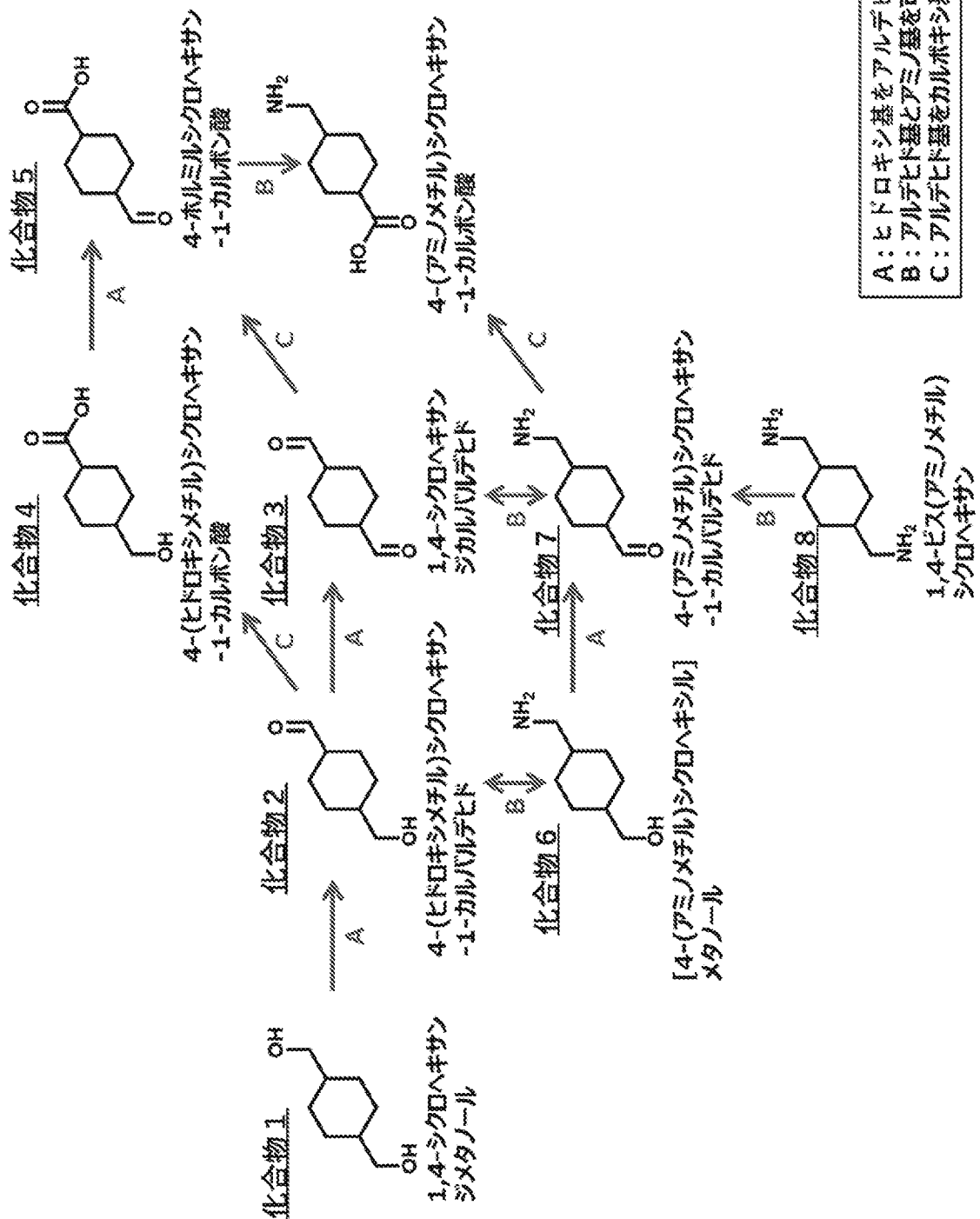
[図5A]

20	1	--MRETK--EQPIWYGKVFSSNWVEARGGVANVVDPSNGDILGITGVANGEDVDAAVNAAKR	58
128	1	--MRETK--EQPIWYGKVFSSNWVEARGGVANVVDPSNGDILGITGVANGEDVDAAVNAAKR	58
40	1	MQQERR--EASIWSGKVFSSGWVEARGGVCDVTDPSNGDILGVTGIANGEDVAAAQQTARR	59
130	1	MQQERRKEVPIWYGKVFSSGWVEARGGVASDVTDPSNGDILGVVGIANGEDVAAAQQSARR	60
131	1	MNWNCK--LPIWHGKVFSSGWVVRGGVADVVDPSNGDILGVTGIANGEDIATAASAARKE	58
41	1	MNTPIK--SNAMTGKVFSSGWSAGSGGVAEVIEPATGEVLGQIGIADVDDVDAAVASARS	58
127	1	MNTPVK--TERWSGKIETGSSNVAARGGVAPVLEAATGAALGEVGVASPEDVDAAARSQA	58
134	1	MNTSTV--TNIWDSKIYSGGWIAAEGGTAAIIEPATGEVLGHIGIGATQDVDRAVQIASH	58
135	1	MTGTGS--EGQWTGKIETLGENVKGVTGATDPMEEPATDNQISTIALASREDVDITATERAVV	58
20	59	AQKEWAAIPFSERAAIVRKAAEKLREREFADWNVRECGAIRPKGLWEAGIAYEQMHQA	118
128	59	AQKEWAAIPFSERAAIVRKAAEKLREREFADWNVRECGAIRPKGLWEAGIAYEQMHQA	118
40	60	AQKGWAAIPFSERAAIVRKAAEKLREREFADWNVRECGAIRPKGLWEAGITYEQMHQA	119
130	61	AQKEWAAIPFSERAAIVRKAAEKLREREFADWNVRECGAIRPKGLWEAGITYEQMHQA	120
131	59	AQKEWAAIPFSERAAIVRKAAEKLREREFADWNVRECGAIRPKGLWEAGITYEQMHQA	118
41	59	ACEWAAIPFDCRAAIVRKAAEKLREREFADWNVRECGAIRPKGLWEAGITYEQMHQA	118
127	59	AQKEWAAIPFDCRAAIVRKAAEKLREREFADWNVRECGAIRPKGLWEAGITYEQMHQA	118
134	59	AQKEWAAIPFDCRAAIVRKAAEKLREREFADWNVRECGAIRPKGLWEAGITYEQMHQA	118
135	59	AQKEWAAIPFDCRAAIVRKAAEKLREREFADWNVRECGAIRPKGLWEAGITYEQMHQA	118
20	119	AGLAYLNGTLFPPSAVPGRNLCQRPVGVGVGVIAFWNFPLFLAMRSVAPALALGNAVIL	178
128	119	AGLAYLNGTLFPPSAVPGRNLCQRPVGVGVGVIAFWNFPLFLAMRSVAPALALGNAVIL	178
40	120	ASLAFLEPSTLFPSSVPGRNLCQRPVGVGVGVIAFWNFPLFLAMRSVAPALALGNAVIL	179
130	121	ASLAFLEPSTLFPSSVPGRNLCQRPVGVGVGVIAFWNFPLFLAMRSVAPALALGNAVIL	180
131	119	ASLAFLEPSTLFPSSVPGRNLCQRPVGVGVGVIAFWNFPLFLAMRSVAPALALGNAVIL	178
41	119	ASLAFLEPSTLFPSSVPGRNLCQRPVGVGVGVIAFWNFPLFLAMRSVAPALALGNAVIL	178
127	119	ASLAFLEPSTLFPSSVPGRNLCQRPVGVGVGVIAFWNFPLFLAMRSVAPALALGNAVIL	178
134	119	ASLAFLEPSTLFPSSVPGRNLCQRPVGVGVGVIAFWNFPLFLAMRSVAPALALGNAVIL	178
135	119	ASLAFLEPSTLFPSSVPGRNLCQRPVGVGVGVIAFWNFPLFLAMRSVAPALALGNAVIL	178
20	179	KPDLCQAVTGGALIAEIESDAGMPDGVLVHLPFGGADVGESEMVANSGINMISFTGSTQVGR	238
128	179	KPDLCQAVTGGALIAEIESDAGMPDGVLVHLPFGGADVGESEMVANSGINMISFTGSTQVGR	238
40	180	KPDLCQAVTGGALIAEIESDAGMPDGVLVHLPFGGADVGESEMVANSGINMISFTGSTQVGR	239
130	181	KPDLCQAVTGGALIAEIESDAGMPDGVLVHLPFGGADVGESEMVANSGINMISFTGSTQVGR	240
131	179	KPDLCQAVTGGALIAEIESDAGMPDGVLVHLPFGGADVGESEMVANSGINMISFTGSTQVGR	238
41	179	KPDLCQAVTGGALIAEIESDAGMPDGVLVHLPFGGADVGESEMVANSGINMISFTGSTQVGR	238
127	179	KPDLCQAVTGGALIAEIESDAGMPDGVLVHLPFGGADVGESEMVANSGINMISFTGSTQVGR	238
134	179	KPDLCQAVTGGALIAEIESDAGMPDGVLVHLPFGGADVGESEMVANSGINMISFTGSTQVGR	238
135	179	KPDLCQAVTGGALIAEIESDAGMPDGVLVHLPFGGADVGESEMVANSGINMISFTGSTQVGR	238
20	239	LIGKCGRMMLKKVALELGNNVHIVLPDADLDGAVSCAANGTFLHQGQVCMAGRHVHR	298
128	239	LIGKCGRMMLKKVALELGNNVHIVLPDADLDGAVSCAANGTFLHQGQVCMAGRHVHR	298
40	240	LIGKCGRMMLKKVALELGNNVHIVLPDADLDGAVSCAANGTFLHQGQVCMAGRHVHR	299
130	241	LIGKCGRMMLKKVALELGNNVHIVLPDADLDGAVSCAANGTFLHQGQVCMAGRHVHR	300
131	239	LIGKCGRMMLKKVALELGNNVHIVLPDADLDGAVSCAANGTFLHQGQVCMAGRHVHR	298
41	239	LIGKCGRMMLKKVALELGNNVHIVLPDADLDGAVSCAANGTFLHQGQVCMAGRHVHR	298
127	239	LIGKCGRMMLKKVALELGNNVHIVLPDADLDGAVSCAANGTFLHQGQVCMAGRHVHR	298
134	239	LIGKCGRMMLKKVALELGNNVHIVLPDADLDGAVSCAANGTFLHQGQVCMAGRHVHR	298
135	239	LIGKCGRMMLKKVALELGNNVHIVLPDADLDGAVSCAANGTFLHQGQVCMAGRHVHR	298

[図5B]

20	299	DVACQVAEKLAIRAKNLVVGDENSDRVHLGPLINDKQVVRVHALVESACQAGAKVLAGGT	358
128	299	DVACQVAEKLAIRAKNLVVGDENSDRVHLGPLINDKQVVRVHALVESACQAGAKVLAGGT	358
40	300	DIACEVAEKLAIRAKNLVVGDPKTDQVHLGPLINDKQVAHVHALVESACQAGAKVLAGGA	359
130	301	DIACEVAEKLAIRAKNLVVGDPKTDQVHLGPLINDKQVAHVHALVESACQAGAKVLAGGT	360
131	299	DVACQVAQELAKRAKNLVVGDPKTDQVHLGPLINDKQVVRVHALVESACQAGAKVLAGGT	358
41	299	SVVDEYAKKLATRAGALVVGDENAGPCHLGPLINDKQVVRVHEVVTGSIETAGAEVLTGGV	358
127	299	SVADAYAKKLVERAKNLVVGDENAGPCHLGPLINDKQVVRVHEVVTGSIETAGAEVLTGGV	358
134	299	SVADQVAEKLAIRAKNLVVGDENAGPCHLGPLINDKQVVRVHEVVTGSIETAGAEVLTGGV	358
135	299	SVAESVAKLAIRAKNLVVGDENAGPCHLGPLINDKQVVRVHEVVTGSIETAGAEVLTGGV	358
20	359	YQDRVYQPTVIMDVTEEMEVFKSEIFGVPVAPITVFDSEIEAIELANCSSEYGLAASIHTRA	418
128	359	YQDRVYQPTVIMDVTEEMEVFKSEIFGVPVAPITVFDSEIEAIELANCSSEYGLAASIHTRA	418
40	360	YQDRVYQPTVIMDVTEEMEVFKSEIFGVPVAPITVFDSEIEAIELANCSSEYGLAASIHTRA	419
130	361	YQDRVYQPTVIMDVTEEMEVFKSEIFGVPVAPITVFDSEIEAIELANCSSEYGLAASIHTRA	420
131	359	HQGRFYQPTVIMDVTEEMEVFKSEIFGVPVAPITVFDSEIEAIELANCSSEYGLAASIHTRA	418
41	359	HEGRFYQPTVIMDVTEEMEVFKSEIFGVPVAPITVFDSEIEAIELANCSSEYGLAASIHTRA	418
127	359	HEGRFYQPTVIMDVTEEMEVFKSEIFGVPVAPITVFDSEIEAIELANCSSEYGLAASIHTRA	418
134	359	HERLFYQPTVIMDVTEEMEVFKSEIFGVPVAPITVFDSEIEAIELANCSSEYGLAASIHTRA	418
135	359	RRGRFYQPTVIMDVTEEMEVFKSEIFGVPVAPITVFDSEIEAIELANCSSEYGLAASIHTRA	418
20	419	LAITGLDIARLNTGMVHINDQPINCEPHVFPFGGMCSSGSGGRFGGPASIIDEFTQSQWISM	478
128	419	LAITGLDIARLNTGMVHINDQPINCEPHVFPFGGMCSSGSGGRFGGPASIIDEFTQSQWISM	478
40	420	LAITGLDIARLNTGMVHINDQPINCEPHVFPFGGMCSSGSGGRFGGPASIIDEFTQSQWISM	479
130	421	LAITGLDIARLNTGMVHINDQPINCEPHVFPFGGMCSSGSGGRFGGPASIIDEFTQSQWISM	480
131	419	LAITGLDIARLNTGMVHINDQPINCEPHVFPFGGMCSSGSGGRFGGPASIIDEFTQSQWISM	478
41	419	AAITGLDIARLNTGMVHINDQPINCEPHVFPFGGMCSSGSGGRFGGPASIIDEFTQSQWISM	478
127	419	TAITGLDIARLNTGMVHINDQPINCEPHVFPFGGMCSSGSGGRFGGPASIIDEFTQSQWISM	478
134	419	IPRAVALSRLNTGMVHINDQPINCEPHVFPFGGMCSSGSGGRFGGPASIIDEFTQSQWISM	478
135	419	MSAAMSRLNTGMVHINDQPINCEPHVFPFGGMCSSGSGGRFGGPASIIDEFTQSQWISM	478
20	479	VEKPANYPF	487
128	479	VEKSASYPF	487
40	480	VEKPSIYPF	488
130	481	VEKPATYPF	489
131	479	VEKETNYPF	487
41	479	VEKEPIYPF	487
127	479	SEKAAQYPF	487
134	479	MEKPIIYPF	487
135	479	MDAETIYPF	487

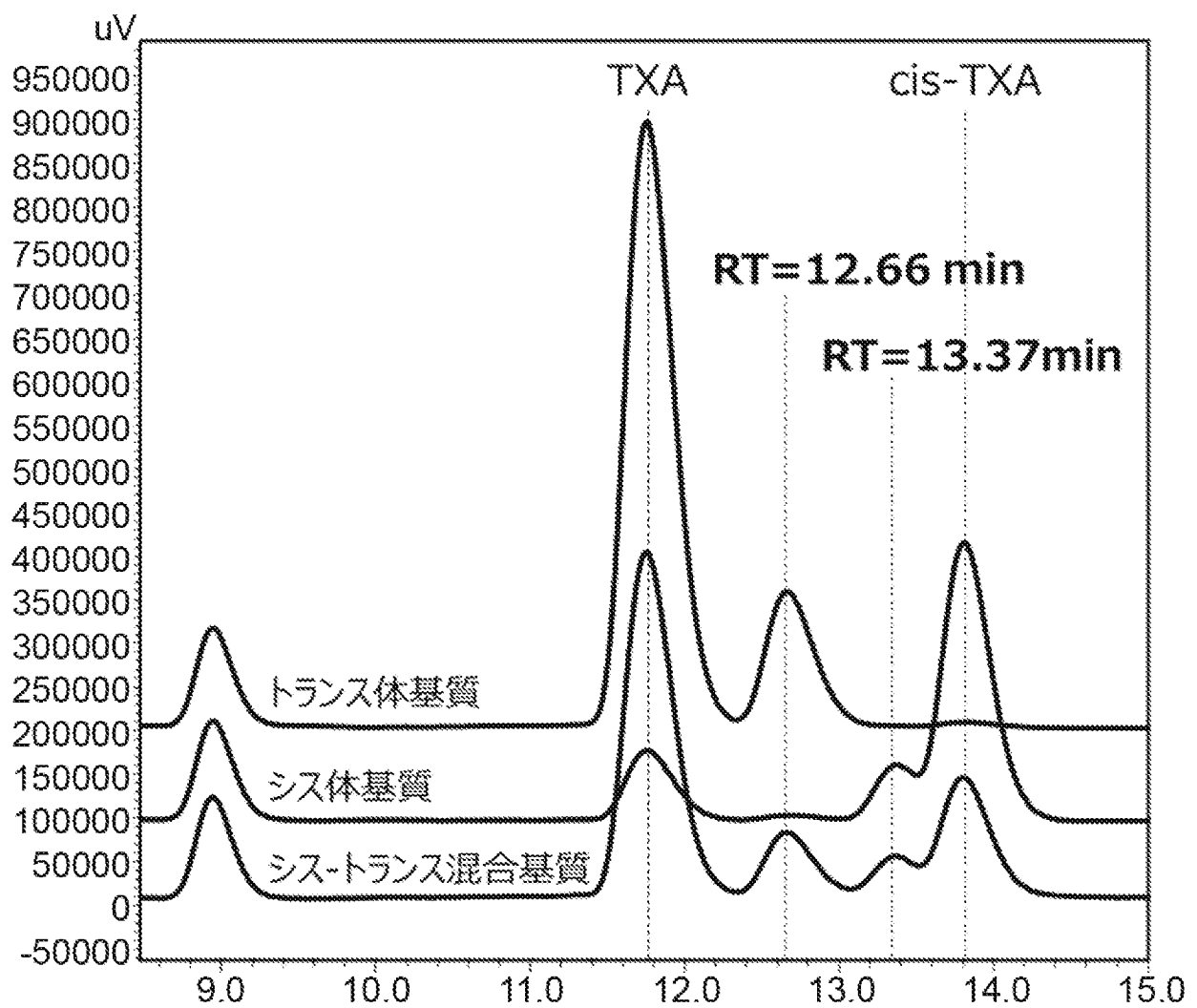
[図6]



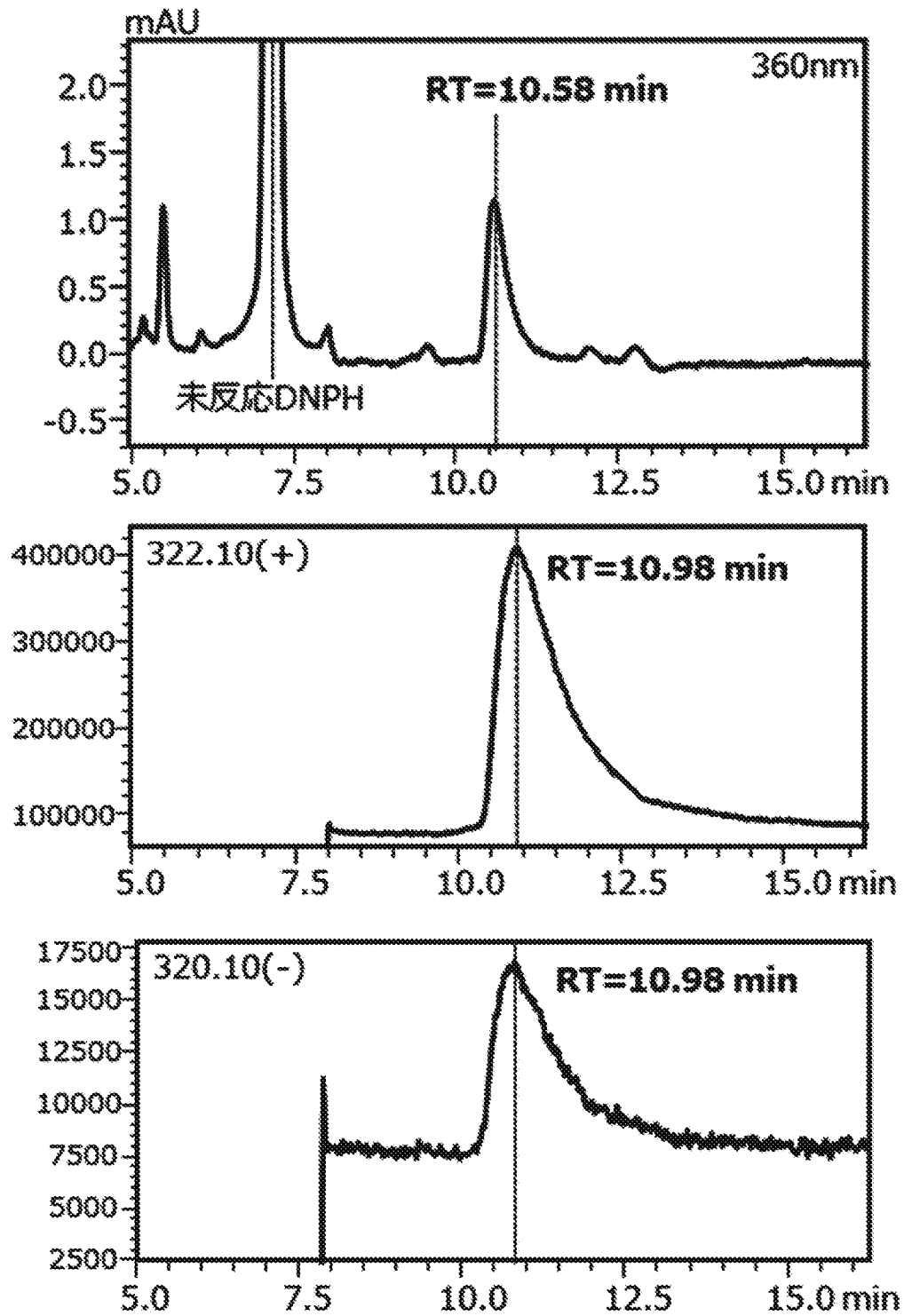
[図7]

	R ₁ とR ₂ の 一方	R ₁ とR ₂ の 他方	予想合成経路	酵素
化合物1	CH ₂ OH	CH ₂ OH	化合物1→化合物2→化合物4→化合物5→目的化合物 化合物1→化合物2→化合物3→化合物5→目的化合物 化合物1→化合物2→化合物3↔化合物7→目的化合物 化合物1→化合物2↔化合物6→化合物7→目的化合物 化合物1→化合物2↔化合物6→化合物7↔化合物3→化合物5→目的化合物	A→C→A→B A→A→C→B A→A→B→C A→B→A→C A→B→A→B→C→B
化合物2	CH ₂ OH	CHO	化合物2→化合物4→化合物5→目的化合物 化合物2→化合物3→化合物5→目的化合物 化合物2→化合物3↔化合物7→目的化合物 化合物2↔化合物6→化合物7→目的化合物 化合物2↔化合物6→化合物7↔化合物3→化合物5→目的化合物	C→A→B A→C→B A→B→C B→A→C B→A→B→C→B
化合物3	CHO	CHO	化合物3→化合物5→目的化合物 化合物3↔化合物7→目的化合物	C→B B→C
化合物4	CH ₂ OH	COOH	化合物4→化合物5→目的化合物	A→B
化合物5	CHO	COOH	化合物5→目的化合物	B
化合物6	CH ₂ OH	CH ₂ NH ₂	化合物6→化合物7→目的化合物 化合物6→化合物7↔化合物3→化合物5→目的化合物 化合物6↔化合物2→化合物4→化合物5→目的化合物 化合物6↔化合物2→化合物3→化合物5→目的化合物	A→C A→B→C→B B→C→A→B B→A→C→B
化合物7	CHO	CH ₂ NH ₂	化合物7→目的化合物 化合物7↔化合物3→化合物5→目的化合物	C B→C→B
化合物8	CH ₂ NH ₂	CH ₂ NH ₂	化合物8→化合物7→目的化合物 化合物8→化合物7↔化合物3→化合物5→目的化合物	B→C B→B→C→B

[図8]



[図9]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/023249

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*C12P 13/00*(2006.01)i

FI: C12P13/00

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)

C12P13/00

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

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2024
Registered utility model specifications of Japan 1996-2024
Published registered utility model applications of Japan 1994-2024

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

Cplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); UniProt/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 55-77894 A (TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED.) 12 June 1980 (1980-06-12)	1, 6
Y	claim 1, p. 2, upper left column, lines 3-14, p. 3, upper left column, lines 1-9, examples 1-5	1-11
Y	CN 114231507 A (WUXI ACHIEC SCIENCE AND TECH CO., LTD.) 25 March 2022 (2022-03-25)	1-11
	claims, particularly, claims 6, 10, examples 1-5, fig. 1	
Y	CN 115960854 A (JIANGNAN UNIVERSITY) 14 April 2023 (2023-04-14)	1-11
	claims, particularly, claims 9, 10, examples 1-5, fig. 1	
Y	IN 2014CH5323 A. DR. REDDY'S LABORATORIES LIMITED. 26 August 2016	1-11
	claims 1, 2, pp. 3-6, examples 1-7	
Y	WO 2018/190398 A1 (KYOWA HAKKO BIO CO., LTD.) 18 October 2018 (2018-10-18)	11
	claims, SEQ ID NO: 2	



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
“D” document cited by the applicant in the international application
“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

09 September 2024

Date of mailing of the international search report

17 September 2024

Name and mailing address of the ISA/JP

Japan Patent Office (ISA/JP)
3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915
Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/023249

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LI, S. et al. aminotransferase [<i>Pseudomonas putida</i> ND6]. GenBank [online].30 January 2014, Accession No. AFK66983.1, [retrieved on 05 September 2023] entire text	11
Y	UHRYNOWSKI, W. et al. Omega-amino acid--pyruvate aminotransferase [<i>Aeromonas salmonicida</i>]. GenBank [online]. 08 June 2017, Accession No. ARW84612.1, [retrieved on 05 September 2023] entire text	11
Y	ASHTON, P. M. et al. putrescine aminotransferase [<i>Shigella boydii</i>]. GenBank [online]. 02 September 2020, Accession No. EGE3747071.1, [retrieved on 05 September 2023] entire text	11
Y	DURFEE, T. et al. medium chain aldehyde dehydrogenase [<i>Escherichia coli</i> str. K- 12substr. DH10B]. GenBank [online]. 31 January 2014, Accession No. ACB02660.1, [retrieved on 05 September 2023] entire text	11
Y	VELASCO, A. et al. phenylacetaldehyde dehydrogenase [<i>Pseudomonas</i> sp. Y2]. GenBank [online]. 15 April 2005, Accession No. CAA04003.1, [retrieved on 05 September 2023] entire text	11
Y	CRONIN, C. N. p-hydroxybenzaldehyde dehydrogenase (plasmid) [<i>Pseudomonas putida</i>]. GenBank [online]. 26 July 2016, Accession No. AAA75634.2, [retrieved on 05 September 2023] entire text	11
Y	MARTINEZ, J. M. et al. Benzaldehyde dehydrogenase [NAD(+)] [<i>Stutzerimonas stutzeri</i>]. GenBank [online]. 18 August 2020, Accession No. CAD2266443.1, [retrieved on 05 September 2023] entire text	11
P, X	WO 2024/005155 A1 (KIRIN HOLDINGS KK) 04 January 2024 (2024-01-04) claims, examples	1, 4-6, 9-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/023249

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2024/023249

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP	55-77894	A	12 June 1980	(Family: none)	
CN	114231507	A	25 March 2022	(Family: none)	
CN	115960854	A	14 April 2023	(Family: none)	
WO	2018/190398	A1	18 October 2018	US 2020/0131546 A1 claims, SEQ ID NO. 2 EP 3611253 A1 CN 110494553 A	
WO	2024/005155	A1	04 January 2024	(Family: none)	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

C12P 13/00(2006.01)i

FI: C12P13/00

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））

C12P13/00

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 - 2024年

日本国実用新案登録公報

1996 - 2024年

日本国登録実用新案公報

1994 - 2024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）

CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); UniProt/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	JP 55-77894 A（武田薬品工業株式会社）12.06.1980（1980 - 06 - 12） 請求項 1、第 2 頁左上欄第 3 - 1 4 行、第 3 頁左上欄第 1 - 9 行、実施例 1 - 5	1, 6
Y		1-11
Y	CN 114231507 A（WUXI ACHIEC SCIENCE AND TECH CO LTD）25.03.2022（2022 - 03 - 25） 特許請求の範囲、特に請求項 6、10、実施例 1 - 5、図 1	1-11
Y	CN 115960854 A（UNIV JIANGNAN）14.04.2023（2023 - 04 - 14） 特許請求の範囲、特に請求項 9、10、実施例 1 - 5、図 1	1-11
Y	IN 2014CH5323 A, DR. REDDY'S LABORATORIES LIMITED, 2016.08.26 請求項 1、2、第 3 - 6 頁、実施例 1 - 7	1-11
Y	WO 2018/190398 A1（協和醗酵バイオ株式会社）18.10.2018（2018 - 10 - 18） 請求の範囲、配列番号 2	11

☒ 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、一般的技术水準を示すもの

“D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献

“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抵触するものではなく、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

09.09.2024

国際調査報告の発送日

17.09.2024

名称及びあて先

日本国特許庁(ISA/JP)

〒100-8915

日本国

東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

権限のある職員（特許庁審査官）

齊藤 貴子 4N 4509

電話番号 03-3581-1101 内線 3891

様式 PCT/ISA/210（第 2 ページ）（2022 年 7 月）

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
Y	LI, S. et al., 'aminotransferase [<i>Pseudomonas putida</i> ND6]', GenBank [online], 2014 年1月30日, Accession No.AFK66983.1, [2023年9月5日検索] 全文	11
Y	UHRYNOWSKI, W. et al., 'Omega-amino acid--pyruvate aminotransferase [<i>Aeromonas salmonicida</i>]', GenBank [online], 2017年6月8日, Accession No.ARW84612.1, [2023年9月5日検索] 全文	11
Y	ASHTON, P. M. et al., 'putrescine aminotransferase [<i>Shigella boydii</i>]', GenBank [online], 2020年9月2日, Accession No.EGE3747071.1, [2023年9月5日検索] 全文	11
Y	DURFEE, T. et al., 'medium chain aldehyde dehydrogenase [<i>Escherichia coli</i> str. K- 12substr. DH10B]', GenBank [online], 2014年1月31日, Accession No.ACB02660.1, [2023年9月5日検索] 全文	11
Y	VELASCO, A. et al., 'phenylacetaldehyde dehydrogenase [<i>Pseudomonas</i> sp. Y2]', GenBank [online], 2005年4月15日, Accession No.CAA04003.1, [2023年9月5日検索] 全文	11
Y	CRONIN, C. N., 'p-hydroxybenzaldehyde dehydrogenase (plasmid) [<i>Pseudomonas putida</i>]', GenBank [online], 2016年7月26日, Accession No. AAA75634.2, [2023年9月5日検索] 全文	11
Y	MARTINEZ, J. M. et al., 'Benzaldehyde dehydrogenase [NAD(+)] [<i>Stutzerimonas stutzeri</i>]', GenBank [online], 2020年8月18日, Accession No.CAD2266443.1, [2023年9月5日検索] 全文	11
P, X	WO 2024/005155 A1 (キリンホールディングス株式会社) 04.01.2024 (2024 - 01 - 04) 請求の範囲、実施例	1, 4-6, 9-11

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。
- a. ☒ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
- b. ☐ 国際出願日後に、国際調査のために提出された配列表（PCT規則13の3.1(a)）
- ☐ 配列表が出願時の国際出願の開示の範囲を超えるものではない旨の陳述書が添付されていた。
2. ☐ この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、この国際調査報告は、WIPO標準ST.26に準拠する配列表なしで有意義な国際調査をすることができる限度において作成された。
3. 補足意見：

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2024/023249

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 55-77894 A	12.06.1980	(ファミリーなし)	
CN 114231507 A	25.03.2022	(ファミリーなし)	
CN 115960854 A	14.04.2023	(ファミリーなし)	
WO 2018/190398 A1	18.10.2018	US 2020/0131546 A1 特許請求の範囲、配列番号 2 EP 3611253 A1 CN 110494553 A	
WO 2024/005155 A1	04.01.2024	(ファミリーなし)	