

(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
2024年1月4日(04.01.2024)



(10) 国際公開番号

WO 2024/005155 A1

(51) 国際特許分類:

C12P 13/00 (2006.01) C12N 1/21 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01) C12N 15/53 (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01) C12N 15/54 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01) C12N 9/10 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2023/024236

(22) 国際出願日: 2023年6月29日(29.06.2023)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2022-106294 2022年6月30日(30.06.2022) 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 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 キリンホールディングス株式会社内 Tokyo (JP). 額 額 健人 (KOUKETSU Kento); 〒1640001 東京都中野区中野四丁目10番2号 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 協和発酵バイオ株式会社内 Tokyo (JP). 渡邊 太郎 (WATANABE Taro); 〒1640001 東京都中野区中野四丁目10番2号 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,

(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 production method of one embodiment, said production method being for producing a 4-(aminomethyl)cyclohexane-1-carboxylic acid from 1,4-bis(aminomethyl)cyclohexane, comprises using a protein that comprises an amino acid sequence having 60% or more identity with an amino acid sequence represented by one of SEQ ID NOS: 1-4 and 103-105 and has aminotransferase activity, and a protein that comprises an amino acid sequences having 50% or more identity with an amino acid sequence represented by one of SEQ ID NOS: 19-22, 35-46 and 127-139 and has aldehyde dehydrogenase activity.

(57) 要約: 一実施形態の製造方法は、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と60%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ、アミノ基転移活性を有するタンパク質、および、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を用いることを含む、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-カルボン酸を製造するための製造方法である。

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）安息香酸を出発基質として、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

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

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明は、1, 4-ビス(アミノメチル)シクロヘキサンを基質として酵素反応に基づき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微生物由来の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] これまで、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-カルボン酸を生成する反応経路は知られていなかった。そのため、本発明者らは、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二段階の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。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、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。

[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)シクロヘキサン-1-カルバルデヒドを産生させるアミノ基転移活性を有し、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-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-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）シクロヘキサンから、シス体および／またはトランス体の4-（アミノメチル）シクロヘキサン-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）シクロヘキサンから4-（アミノメチル）シクロヘキサン-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)シクロヘキサン-1-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)シクロヘキサン-1-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、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] 又は [18] に記載のタンパク質。

[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] 又は [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。

発明の効果

[0011] 本発明のアミノ基転移活性を有するタンパク質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によれば、1, 4-ビス(アミノメチル)シクロヘキサン基質を用いて、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)シクロヘキサン-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。

[0012] 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)シクロヘキサン-1-カルボン酸を製造することができる。また、反応系にケト酸、および／または、補酵素も

しくはそれら再生系を導入することで、酵素反応をより効率化させ4-（アミノメチル）シクロヘキサン-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）シクロヘキサン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）シクロヘキサン-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デヒドロゲナーゼを用い、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）シクロヘキサン-カルボン酸（トラネキサム酸）を製造することができる。

図面の簡単な説明

[0013] [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）シクロヘキサンからシス体またはトランス体の4-（アミノメチル）シクロヘキサン-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）シクロヘキサン-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（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：142.10m/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（ALDH）共発現プラスミド（pET28a-PatA-XylC）の構築方法を示す模式図である。

[図5A]図5Aおよび図5Bは、実施例11における、アルデヒドデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列を、アライメントした結果を示す図である。

[図5B]図5Aおよび図5Bは、実施例11における、アルデヒドデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列を、アライメントした結果を示す図である。

発明を実施するための形態

[0014] 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)シクロヘキサノー1-カルボン酸(4-(aminomethyl)cyclohexanecarboxylic 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。4-(アミノメチル)シクロヘキサノー1-カルボン酸にはシス体であるシス-4-(アミノメチル)シクロヘキサノー1-カルボン酸(cis-4-(aminomethyl)cyclohexanecarboxylic acid)と、トランス体であるトランス-4-(アミノメチル)シクロヘキサノー1-カルボン酸(trans-4-(aminomethyl)cyclohexanecarboxylic acid)が存在する。このうちトランス-4-(アミノメチル)シクロヘキサノー1-カルボン酸は、トラネキサム酸(Tranexamic acid; 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)シクロヘキサノー1-カルボン酸を意味し、シス-4-(アミノメチル)シクロヘキサノー1-カルボン酸は、シストラネキサム酸またはシス-TXAという。

[0015] 本発明における酵素反応は、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(工程(i))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)は、カルボニル基を提供できる化合物であるケト酸(例えば、ピルビン酸)と反応し、アミノ基転移酵素(AT)によって、中間体である4-(アミノメチル)シクロヘキサノー1-カルバルデヒド(4-(aminomethyl)cyclohexane-1-carbaldehyde)、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(工程(ii))においては、中間体の4-(アミノメチル)シクロヘキサノー1-カルバルデヒドは、NAD(P)⁺を補酵素とするアルデヒドデヒドロゲナーゼ

(ALDH) によって、4-(アミノメチル)シクロヘキサノール-1-カルボン酸およびNAD(P)Hに変換される(図1)。

[0016] また、第1のステップで、カルボニル基を提供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)。

[0017] 基質化合物の1,4-ビス(アミノメチル)シクロヘキサノールは、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。中間体の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。

[0018] 2. 本発明のタンパク質およびDNA

(1) 本発明のアミノ基転移酵素およびそれをコードするDNA

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反応を触媒する活性をいう。

[0019] 本発明のアミノ基転移活性を有するタンパク質は、1,4-ビス(アミノメチル)シクロヘキサノール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活性を有するタンパク質である。すなわち、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-カルバルデヒドへの反応を媒介する活性を有するタンパク質であり、具体的に、1,4-ビス(アミノ

メチル) シクロヘキサンからアミノ基を取り除き、4-(アミノメチル) シクロヘキサノン-1-カルバルデヒドを産生させる活性を有するタンパク質である。本明細書において、これらのタンパク質は併せて「本発明のアミノ基転移酵素」または「本発明のAT」という。

[0020] 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、アミノ基転移活性を有する、タンパク質である。

[0021] 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る。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 MG1655由来アミノ基転移酵素PatA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（PpAT8またはPatA）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、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)シクロヘキサノン-1-カルバルデヒドを産生させる活性を有することは知られていない。

[0022] 別の実施形態のATは、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、アミノ基転移活性を有する、タンパク質である。

[0023] 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。

[0024] 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。

[0025] 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。

[0026] 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、t-ブチルグリシン、t-ブチルアラニン、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

[0027] 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。

[0028] 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。

[0029] アミノ基転移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1, 4-ビス（アミノメチル）シクロヘキサンおよびピルビン酸を添加し、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-カルバルデヒドを検出することにより、対象タンパク質がアミノ基転移活性を有していることを確認することができる。

[0030] 一実施形態のATをコードするDNA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い。

[0031] 本実施形態のATをコードするDNA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。

[0032] 別の実施形態のATをコードするDNA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。

[0033] 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。

[0034] 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。

[0035] 一実施形態のATをコードするDNAは、また、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D

NA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。

[0036] 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。

[0037] 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。

[0038] 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、ストリンジেন্ট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、ストリンジेंट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。

[0039] 上記のストリンジेंट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 (pH 7.6)、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℃でー

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。

[0040] 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。

[0041] 上記したストリンジেন্ট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。

[0042] (2) 本発明のアルデヒドデヒドロゲナーゼおよびそれをコードするDNA
アルデヒドデヒドロゲナーゼ (Aldehyde dehydrogenases; ALDH) 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。

[0043] 本発明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、4-(アミノメチル)シクロヘキサノー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1-カルボン酸を産生させる活性を有するタンパク質である。すなわち、4-(アミノメチル)シクロヘキサノー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1-カルボン酸への反応を触媒する活性を有するタンパク質である。本明細書において、これらのタンパク質は併せて「本発明のアルデヒドデヒドロゲナーゼ」または「本発明のALDH」という。

[0044] 一実施形態のALDHは、例えば、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、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。

[0045] 本実施形態のALDHは、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。これらのタンパク質は、これまで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活性を有することは知られていない。

[0046] 別の実施形態のALDHは、上記配列番号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、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、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、および127～139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。

[0047] アルデヒドデヒドロゲナーゼ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NAD（P）⁺を添加し、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。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4-（アミノメチル）シクロヘキサン-1-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。

[0048] 別のさらなる実施形態のALDHは、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、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

このような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。

[0049] 更なる別の実施形態の 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。

[0050] *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。

[0051] 別の実施形態の ALDH は、ベンズアルデヒドデヒドロゲナーゼであって、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、タンパク質である。

[0052] 本実施形態のベンズアルデヒドデヒドロゲナーゼは、4-（アミノメチル

）シクロヘキサンー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）シクロヘキサンー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。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。

[0053] 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。

[0054] 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、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、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、および139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。

[0055] 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、4-（アミノメチル）シクロヘキサノン-1-カルバルデヒドから、4-（アミノメチル）シクロヘキサノン-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、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。

[0056] 別のさらなる実施形態のALDHは、4-(アミノメチル)シクロヘキサノン-1-カルバルデヒドから、4-(アミノメチル)シクロヘキサノン-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（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

[0057] 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。

[0058] 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)シクロヘキサン-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)シクロヘキサン-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)シクロヘキサン-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。

[0059] 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。

[0060] 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。

[0061] 本実施形態のアルデヒドデヒドロゲナーゼは、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。

[0062] 本実施形態のアルデヒドデヒドロゲナーゼ（ALDH）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、および127～139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、および140～152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。

[0063] 別の実施形態のALDHをコードするDNAは、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、および140～152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、および140～152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および140～152のいずれか1つで表される塩基配列からなる。

[0064] 一実施形態のALDHをコードするDNAは、配列番号23～26、47～58、および140～152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、および 140～152 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。

[0065] 3. 本発明の組換え体 DNA

本発明の組換え体 DNA は、本発明のアミノ基転移酵素をコードする DNA、および／または、本発明のアルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする DNA を含む。後述するアラニン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。

[0066] 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 DNA を転写できるベクターである。

[0067] 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。

[0068] 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。

[0069] 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、pCol d1、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。

[0070] 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、*let* *l*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。

[0071] 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 *Molecular and General Genetics*, 196, 175 (1984)] 等を挙げることができる。

[0072] 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。

[0073] 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。

[0074] 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。

[0075] 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。

[0076] 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を含んでもよい。

[0077] 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* NM522、*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*

ATCC 15354、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。

[0078] 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., 153, 163 (1983)]等の方法を挙げることができる。

[0079] 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。

[0080] 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。

[0081] 5. 本発明の製造方法

本発明の製造方法は、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）シクロヘキサノール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）シクロヘキサンから4-（アミノメチル）シクロヘキサノール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カルボン酸を製造する工程とを含む。

[0082] 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、および／または、NADHオキシダーゼを共存させることを含む。特に、第1のステップ（工程（i））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が好ましく、第2のステップ（工程（ii））において、NADHオキシダーゼを共存させることが好ましい。

[0083] 本発明の製造方法の各工程の基質物質（第1のステップで用いる1, 4-ビス（アミノメチル）シクロヘキサン、または、第2のステップで用いる4-（アミノメチル）シクロヘキサノールカルバルデヒド）が、各工程で目的とする生成物（第1のステップにおける4-（アミノメチル）シクロヘキサノールカルバルデヒド、または、第2のステップにおける4-（アミノ

メチル) シクロヘキサン-1-カルボン酸) 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、たとえば第1のステップの工程の一部または全部、および/または、第2のステップ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) シクロヘキサン-1-カルバルデヒド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。pH 9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。これにより、例えば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) シクロヘキサン-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、pH 4~6)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。

[0084] 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、6

0%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。

[0085] 本発明の製造方法の各工程の基質物質と目的とする生成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。

[0086] (1) 4-(アミノメチル)シクロヘキサノン-1-カルバルデヒドを製造する工程

本発明の製造方法は、(i) アミノ基転移酵素の存在下、1, 4-ビス(アミノメチル)シクロヘキサノンから4-(アミノメチル)シクロヘキサノン-1-カルバルデヒドを製造する工程(以下、第1のステップともいう)を含む。アミノ基転移酵素としては、好ましくは本発明のアミノ基転移酵素である。アミノ基転移酵素の存在下とは、(i)の反応系において、(i)の反応を触媒できるように、活性のあるアミノ基転移酵素が存在していることを意味する。例えば、本発明のアミノ基転移酵素を反応系に添加するか、あるいは、本発明のアミノ基転移酵素をコードするDNAを含み、当該アミノ基転移酵素を発現できる細胞、または本発明のアミノ基転移酵素をコードする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アミノ基転移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。

[0087] 第1のステップは、アミノ基転移活性を有するタンパク質を酵素源として用い、該酵素源および反応基質を水性媒体中に存在せしめ、4-(アミノメチル)シクロヘキサノン-1-カルバルデヒドを水性媒体中に生成、蓄積させてもよいし、アミノ基転移酵素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、蓄積させてもよい。

[0088] 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。

[0089] 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。

[0090] 第一のステップで上記酵素源を用いる方法において、酵素源として精製したタンパク質を用いる場合、アミノ基転移活性を有するタンパク質の量としては、1, 4-ビス(アミノメチル)シクロヘキサノンに対して、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、1, 4-ビス(アミノメチル)シクロヘキサノンに対して、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。

[0091] 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

ー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）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。

[0092] 上記1. で述べたとおり、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）シクロヘキサノ-1-カルバルデヒドを産生する反応は、カルボニル基を提供できる化合物の存在下で、アミノ基転移酵素（アミノ基転移活性を有するタンパク質）が触媒する酵素反応である。従って、第1のステップにおいては、カルボニル基を提供できる化合物を共存させることが望ましい。

[0093] カルボニル基を提供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。

[0094] ケト酸は、本発明のアミノ基転移酵素の基質とな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。

[0095] また、微生物を培地に培養し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、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与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（ここでは、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体の遺伝子）の発現量を低減させることを意味する。

[0096] 第1のステップにおいてケト酸を添加する場合、添加量としては、1, 4

ービス（アミノメチル）シクロヘキサンに対してモル比0.01～100であればよく、0.01～60であることが好ましい。

[0097] 第1のステップの反応工程において、ケト酸としてピルビン酸を用いる場合には、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）シクロヘキサノールカルバルデヒドを製造することができる。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。

[0098] 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+ NH_3 + $\text{NADH}+\text{H}^+$ ）との間の可逆反応を触媒する酸化還元酵素である。本発明のトラネキサム酸の製造方法の第1のステップにおいて、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。

[0099] 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。

[0100] AlaDHを共存させることとは、第1のステップの酵素反応において、AlaDH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、A l a D Hを発現する細胞を共培養してもよく、あるいは、A l a D HをコードするDNAを上記組換え細胞に含ませてもよい。

[0101] A l a D H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、1,4-ビス（アミノメチル）シクロヘキサンに対して、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。

[0102] 基質物質の1,4-ビス（アミノメチル）シクロヘキサンはトランス体、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、目的の4-（アミノメチル）シクロヘキサノン-1-カルバルデヒドは、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4-（アミノメチル）シクロヘキサノン-1-カルバルデヒドは、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。

[0103] (2) 4-（アミノメチル）シクロヘキサノン-1-カルボン酸を製造する工程

本発明の製造方法は、(i i) アルデヒドデヒドロゲナーゼの存在下、4-（アミノメチル）シクロヘキサノン-1-カルバルデヒドから4-（アミノメチル）シクロヘキサノン-1-カルボン酸を製造する工程（以下、第2のステップともいう）を含む。好ましくは、4-（アミノメチル）シクロヘキサノン-1-カルバルデヒドに、本発明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、本発明のアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパ

ク質をコードするDNAを含む細胞、または、本発明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を作用させる工程を含む。

[0104] 第2のステップは、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酵素源として用い、該酵素源および反応基質を水性媒体中に存在せしめ、4-(アミノメチル)シクロヘキサノール-1-カルボン酸を水性媒体中に生成、蓄積させてもよいし、アルデヒドデヒドロゲナーゼを生産する能力を有する微生物を培地に培養し、培養物中に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、蓄積させてもよい。

[0105] 上記1.で述べたとおり、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-カルボン酸を生成する反応は、補酵素であるNAD(P)⁺の存在下で、アルデヒドデヒドロゲナーゼ（アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質）が触媒する酵素反応である。アルデヒドデヒドロゲナーゼは、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、使用するアルデヒドデヒドロゲナーゼの利用性が高い補酵素を共存させることが好ましい。

[0106] NAD(P)⁺の量としては、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。

[0107] また、補酵素を供給する方法として、アルデヒドデヒドロゲナーゼ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4-(アミノメチル)シクロヘキサノール-1-カルボン酸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を欠失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、na

d R) を欠損あるいは弱化させた微生物、または NAD (P) + 分解に関与する遺伝子 (例えば、maz G、nud C) を欠損あるいは弱化させた微生物などが挙げられる。

[0108] アルデヒドデヒドロゲナーゼの量としては、1, 4-ビス (アミノメチル) シクロヘキサンに対して、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、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、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。

[0109] 第2のステップの工程において 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。

[0110] 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の第1および第2のステップにおいて產生される NAD (P) H を NAD (P) + に変換することができる。したがって、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) シクロヘキサノール-1-カルボン酸を製造することができる。

[0111] 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 L I N O X (アクセッション番号: C A L 9 7 0 1 2. 1)、E n t e r o c o c c u s f e a c a l i s 由来 N A D H オキシダーゼ E f N O X (アクセッション番号: W P _ 0 0 2 3 6 1 8 3 3. 1) が挙げられる。

[0112] N A D (P) H オキシダーゼを共存させることとは、N A D (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、N A D (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、N A D (P) H オキシダーゼをコードする D N A を上記組換え細胞に含ませてもよい。

[0113] N A D (P) H オキシダーゼの量としては、第 1 のステップでアラニンデヒドロゲナーゼを使用する場合に生成される N A D (P) H および第 2 のステップで A L D H によって生成される N A D (P) H の合計量に対して、0. 0 0 1 ~ 1 0 0 重量%であればよく、0. 0 1 ~ 5 0 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、1, 4 - ビス (アミノメチル) シクロヘキサンに対して、湿菌体重量として 0. 5 ~ 1 0 0 0 重量%であればよく、1 ~ 4 0 0 重量%であることが好ましい。

[0114] N A D (P) H オキシダーゼを共存させる代わりに、N A D (P) H を電氣的に酸化して N A D (P) ⁺ に再生させることもできる。

[0115] 基質物質の 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。基質と目的の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。基質と目的の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。

[0116] 上記の目的の 4 - (アミノメチル) シクロヘキサノール-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、第 2 のステップの A

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、第 2 のステップ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、および 139 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 および 133 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。

[0117] 本明細書において、トランス選択性が高い酵素（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）シクロヘキサノール-1-カルボン酸（AMCHA）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が高い酵素とする。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（ALDH）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。

- [0118] 第1のステップと第2のステップ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。
- [0119] 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出し、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。
- [0120] 発酵法による4-(アミノメチル)シクロヘキサノール-1-カルボン酸の製造方法においては、培地中に基質である1,4-ビス(アミノメチル)シクロヘキサノールを添加することが望ましい。1,4-ビス(アミノメチル)シクロヘキサノールは、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。
- [0121] また、1,4-ビス(アミノメチル)シクロヘキサノールを培地に添加する代わりに、1,4-ビス(アミノメチル)シクロヘキサノール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、1,4-ビス(アミノメチル)シクロヘキサノールを供給してもよい。
- [0122] 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。
- [0123] 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。
- [0124] 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。

[0125] 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、アミノ基転移酵素またはアルデヒドデヒドロゲナーゼの基質となるピルビン酸、 α -ケトグルタル酸、 α -ケト酪酸、 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。

[0126] 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。

[0127] 培養は、通常振盪培養または深部通気攪拌培養等の好氣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。

[0128] 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。

[0129] 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。

[0130] 上記の培養により、培養物中または菌体内に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、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、LCM

S（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。

[0131] 該培養物中からの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、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。

[0132] [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。

[0133] 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。

[0134] [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

[0135] 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

[0136] [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活性を有する酵素(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 PpAT8 (配列番号 1) および PpAT2 (配列番号 2) を選定した。さらに、PpAT8 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 AsAT5 (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 PatA (*Journal of Bacteriology*, 2012, 194, 15: 4080–4088) (配列番号 4) を評価対象とした。

[0137] (2) AT 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)

[0138] 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4.7kb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。

[0139] 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。

[0140] (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。

[0141] (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。

[0142] 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（A r e a 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(A r e a 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

[0143] P p A T 8、P p A T 2、A s A T 5 または P a t A 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、P a t A 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、E s c h e r i c h i a c o l i K 1 2 M G 1 6 5 5 由来プトレシンアミノトランスフェラーゼ P a t A 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活性を有することが分かった。

[0144] <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P p A T 8およびP a t Aのアミノ酸配列(配列番号5および8)をクエリーとして、N a t i o n a l C e n t e r f o r B i o t e c h n o l o g y I n f o r m a t i o n のタンパク質配列データベースであるB L A S T (<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

[0145] (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、PCR 反応を行った。各種染色体 DNA 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

[0146] 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 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。

[0147] (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。

[0148] 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。

[0149] 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

[0150] 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。

[0151] [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（pH 7.0またはpH 9.0）の影響を評価した。

[0152] 実施例1（3）で取得したP a t A精製酵素0.07mg、50mMのMOPS（pH 7.0）または50mMのCHES（pH 9.0）、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。

[0153] 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

[0154] 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)シクロヘキサン-1-カルバルデヒドが30%以上生成された。

[0155] 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。

[0156] 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。

[0157] (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 4.0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℃、400 rpmの条件で20時間反応させた。

[0158] 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

[0159] 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。

[0160] 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。

[0161] 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。

[0162] 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。

[0163] [実施例3] アルデヒドデヒドロゲナーゼ (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。

[0164] 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Pc

hA (Appl. Microbiol. Biotechnol., 2014, 98:1349-1356) を、評価対象のALDHとして選定した。

[0165] (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。

[0166] 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)

[0167] 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 9866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。

[0168] 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。

[0169] 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-XylC、pQE80L-StyDおよびpQE80L-PchAを造成した。

[0170] 上記で得られたALDH発現するプラスミド、pQE80L-PatD、pQE80L-XylC、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。

[0171] (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、XylC、StyDおよびPchAを取得した。

[0172] (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、XylC、StyDおよびPchA)0.07mg、実施例1(3)で取得したPatA0.07mg、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、3

0℃、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。

[0173] 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)シクロヘキサン-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)シクロヘキサン-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]

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

[0174] 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)

[0175] 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)シクロヘキサンを基質として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。

[0176] 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。

[0177] 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 ($S/N < 3$)

[0178] 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。

[0179] 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。

[0180] 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)

[0181] 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。

[0182] 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。

[0183] <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)シクロヘキサノール-1-カルバルデヒドのアルデヒド酸化活性を評価した。

[0184] 上記の反応液組成のうちNAD⁺に代替して1mM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。

[0185] 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)

[0186] 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)シクロヘキサノール-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。

[0187] [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

[0188] (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

[0189] 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。

[0190] 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。

[0191] 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。

[0192] 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。

[0193] (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。

[0194] 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

XyICを用いた反応液についても同様に反応を行った。

[0195] 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
XyIC	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
—	XyIC (ポジティブコントロール)	—	0.30	0.05	87

[0196] 表15より、PatD、XyIC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、XyIC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XyIC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。

[0197] [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。

[0198] 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。

[0199] 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。

[0200] (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。

[0201] 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。

[0202] 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。

[0203] （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。

[0204] （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。

[0205] 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

[0206] 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)シクロヘキサン-1-カルボン酸の生産性が向上した。

[0207] [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)シクロヘキサン-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。

[0208] 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。

[0209] 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)シクロヘキサンカルボン酸を生成できることを確認した。

[0210] [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)シクロヘキサン-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。

[0211] 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。

[0212] 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。

[0213] 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)。

[0214] 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。

[0215] 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。

[0216] 上記で得られたXy I C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、Xy I C-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。

[0217] 上記で得られたXy I C-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-Xy I C-Pat Aを得た。

[0218] 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-Xy I C-Pat A株を得た。

[0219] ウ) BL21（DE3）／pUC19-Pat A-Xy I C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、Xy I C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。

[0220] 上記で得られたPat A断片およびXy I C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。

[0221] 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。

[0222] 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。

[0223] 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。

[0224] 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。

[0225] 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。

[0226] 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、In-Fusion (商標) HD Cloning Kit (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。

[0227] 上記で得られた発現プラスミドを用いて *Escherichia coli* BL 21 (DE 3) を形質転換し、BL 21 (DE 3) / p U C 19 - X y l C - P a t A 株を得た。

[0228] (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 BL 21 (DE 3) / p E T 28 a - P a t A - X y l C 株、BL 21 (DE 3) / p E T 28 a - X y l C - P a t A 株、BL 21 (DE 3) / p U C 19 - P a t A - X y l C 株および BL 21 (DE 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 BL 21 (DE 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。

[0229] 各菌株を 30 mg / L のカナマイシンまたは 100 mg / 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。該培養液を 30 mg / L のカナマイシンまたは 100 mg / L のアンピシリンを含む 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 IPTG 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 BL 21 (DE 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。

[0230] 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。

[0231] 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。

[0232] 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)

[0233] 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。

[0234] 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 ($S/N < 3$)

[0235] 反応液から NAD^+ を除いた場合、4-（アミノメチル）シクロヘキサノール-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）シクロヘキサノール-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。

[0236] [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）シクロヘキサノール-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）シクロヘキサノール-1-カルボン酸の生産性を評価した。

[0237] 各菌株を100 mg/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。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30 mg/Lの100 mg/Lのアンピシリンを含む4 mL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1 mM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。

[0238] 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

[0239] 表 1 9 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。

[0240] [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

[0241] 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。

[0242] (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

[0243] 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。

[0244] 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。

[0245] (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。

[0246] 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。

[0247] 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

[0248] 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。

[0249] [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。

[0250] 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。

[0251] 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 4.7 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。

[0252] 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。

[0253] 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。

[0254] 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。

[0255] 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4.7kb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。

[0256] 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。

[0257] *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。

[0258] 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。

[0259] 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。

[0260] 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。

[0261] 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。

[0262] 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。

[0263] 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。

[0264] 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。

[0265] 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。

[0266] 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。

[0267] ＜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	

[0268] 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。

[0269] 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。

[0270] 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、 Δ aceEという。）断片を得た。

[0271] 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。

[0272] $\Delta aceE$ 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。

[0273] <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。

[0274] 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。

[0275] 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。

[0276] 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。

[0277] (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。

[0278] 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。

[0279] 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。

[0280] 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。

[0281] 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)

[0282] 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。

[0283] 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。

[0284] [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。

[0285] 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。

[0286] 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。

[0287] 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	

[0288] 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。

請求の範囲

- [請求項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。
- [請求項2] 請求項1に記載のタンパク質をコードするDNA。
- [請求項3] 請求項2に記載のDNAを含む組換え体DNA。
- [請求項4] 請求項2に記載のDNAを含むか、または、請求項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。
- [請求項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。
- [請求項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および35～46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。
- [請求項7] 請求項6に記載のタンパク質をコードするDNA。
- [請求項8] 請求項7に記載のDNAを含む組換え体DNA。
- [請求項9] 請求項7に記載のDNAを含むか、または、請求項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。
- [請求項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）シクロヘキサンから、シス体および／またはトランス体の4-（アミ

ノメチル) シクロヘキサン-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) シクロヘキサンから4-(アミノメチル) シクロヘキサン-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-カルボン酸を製造する工程とを含む、製造方法。

[請求項11] 前記アミノ基転移酵素が請求項1に記載のタンパク質であり、前記アルデヒドデヒドロゲナーゼが請求項6に記載のタンパク質である、請求項10に記載の製造方法。

[請求項12] 前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、請求項10または11に記載の製造方法。

[請求項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) シクロヘキサン-1-カルボン酸を製造する、請求項10または11に記載の製造方法。

[請求項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) シクロヘキサン-1-カルボン酸を製造する、請求項10または11に記載の製造方法。

[請求項15] 前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、請求項10または11に記載の製造方法。

[請求項16] 前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、請求項15に記載の製造方法。

[請求項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、タンパク質。

[請求項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、請求項17に記載のタンパク質。

[請求項19] 前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、請求項17に記載のタンパク質。

[請求項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、請求項17に記載のタンパク質。

[請求項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] 1 1 7 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] 1 2 2 位相当位置のアミノ酸残基がアラニン残基 (A) である

[9] 1 2 4 位相当位置のアミノ酸残基がロイシン残基 (L) である

[1 0] 1 3 4 位相当位置のアミノ酸残基がバリン残基 (V) である

[1 1] 1 4 4 位相当位置のアミノ酸残基がバリン残基 (V) である

[1 2] 1 6 0 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

[1 3] 2 7 1 位相当位置のアミノ酸残基がグリシン残基 (G) である

[1 4] 2 9 0 位相当位置のアミノ酸残基がアラニン残基 (A) である

[1 5] 3 1 9 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

[1 6] 3 3 3 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

[1 7] 3 6 5 位相当位置のアミノ酸残基がグルタミン残基 (Q) である

[1 8] 3 9 0 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

[1 9] 4 2 0 位相当位置のアミノ酸残基がアラニン残基 (A) である

[2 0] 4 2 3 位相当位置のアミノ酸残基がロイシン残基 (L) である

[2 1] 4 3 4 位相当位置のアミノ酸残基がバリン残基 (V) である

[2 2] 4 4 0 位相当位置のアミノ酸残基がプロリン残基 (P) である

[2 3] 4 4 3 位相当位置のアミノ酸残基がシステイン残基 (C) である

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

[請求項22] 請求項5、および17～21のいずれか一項に記載のタンパク質をコードするDNA。

[請求項23] 請求項22に記載のDNAを含む組換え体DNA。

[請求項24] 請求項22に記載のDNAを含む、組換え細胞。

[請求項25] 請求項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。

[請求項26] 前記アミノ基転移酵素が請求項1に記載のタンパク質であり、前記アルデヒドデヒドロゲナーゼが請求項5、および17～21のいずれか一項に記載のタンパク質である、請求項10に記載の製造方法。

[請求項27] 前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、請求項26に記載の製造方法。

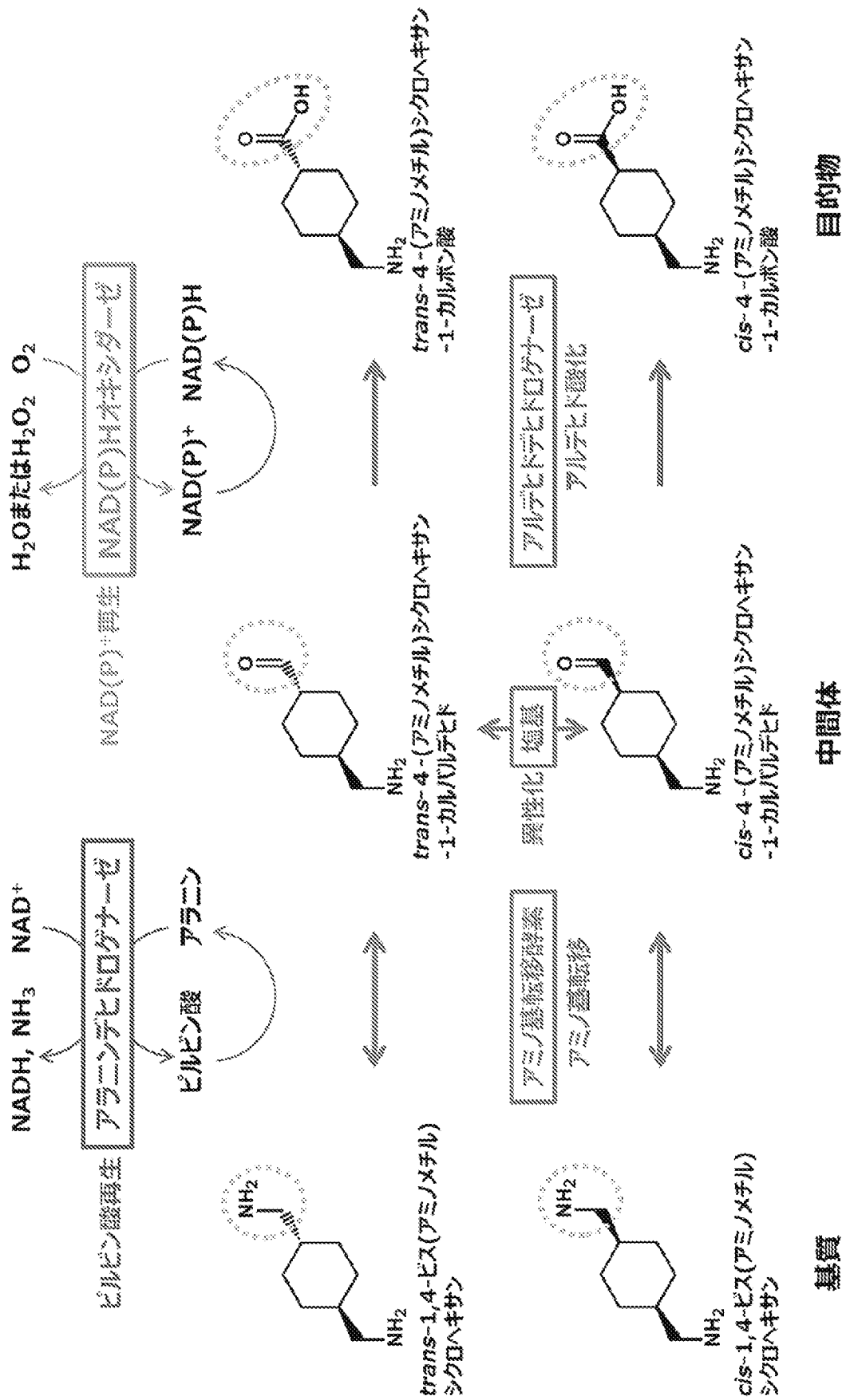
[請求項28] シス体および／またはトランス体の1,4-ビス(アミノメチル)シクロヘキサンから、トランス-4-(アミノメチル)シクロヘキサノン-1-カルボン酸を製造する、請求項26に記載の製造方法。

[請求項29] 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)シクロヘキサノン-1-カルボン酸を製造する、請求項26に記載の製造方法。

[請求項30] 前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、請求項26に記載の製造方法。

[請求項31] 前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、請求項26に記載の製造方法。

[図1]

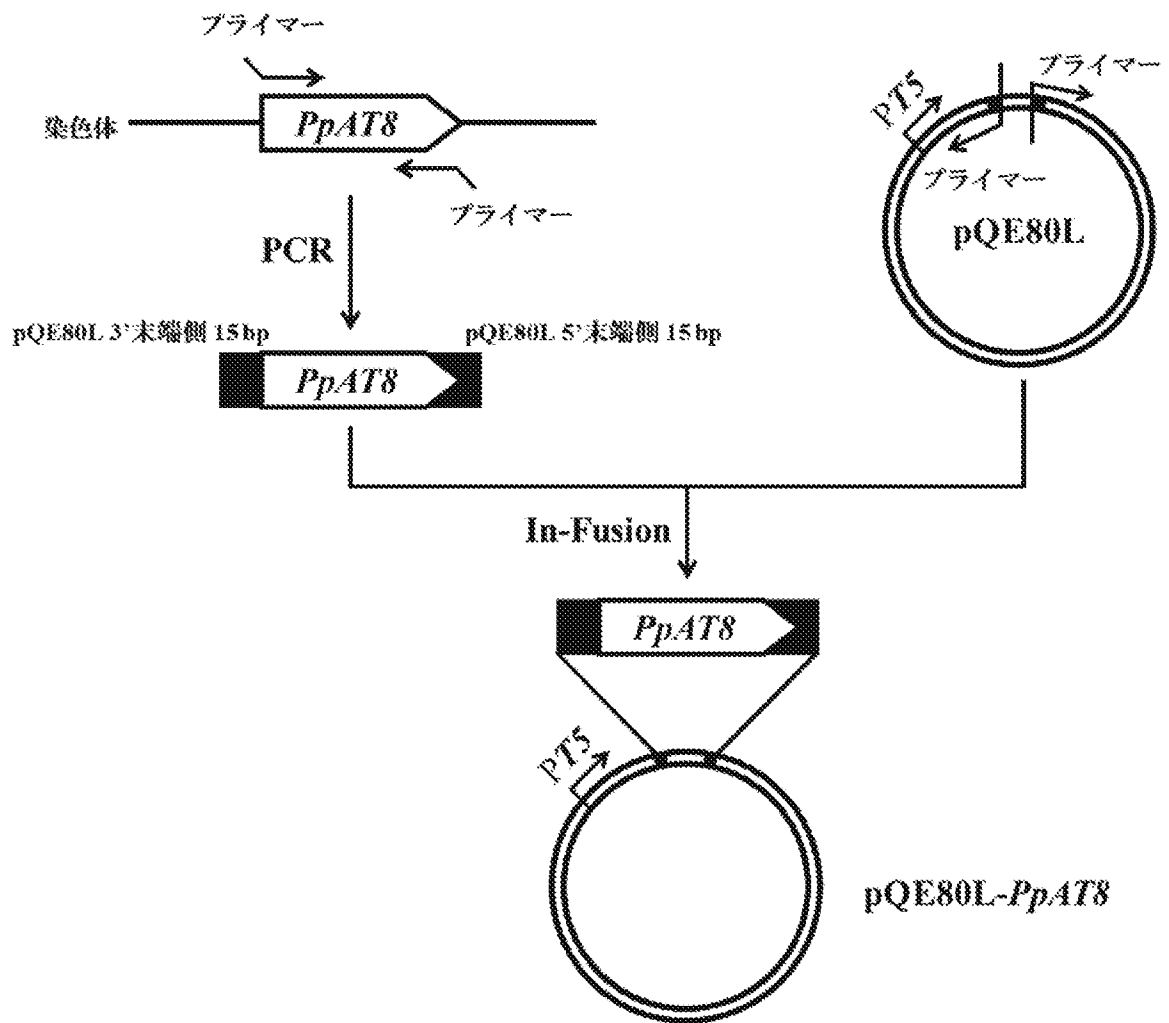


基質

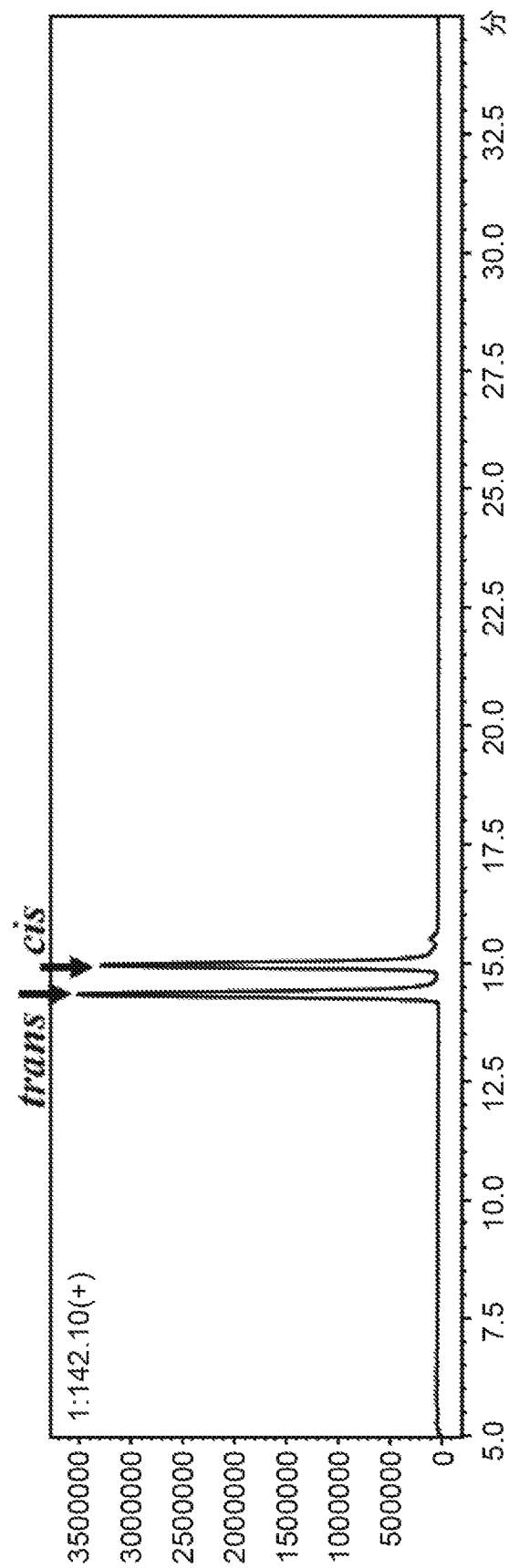
中間体

目的物

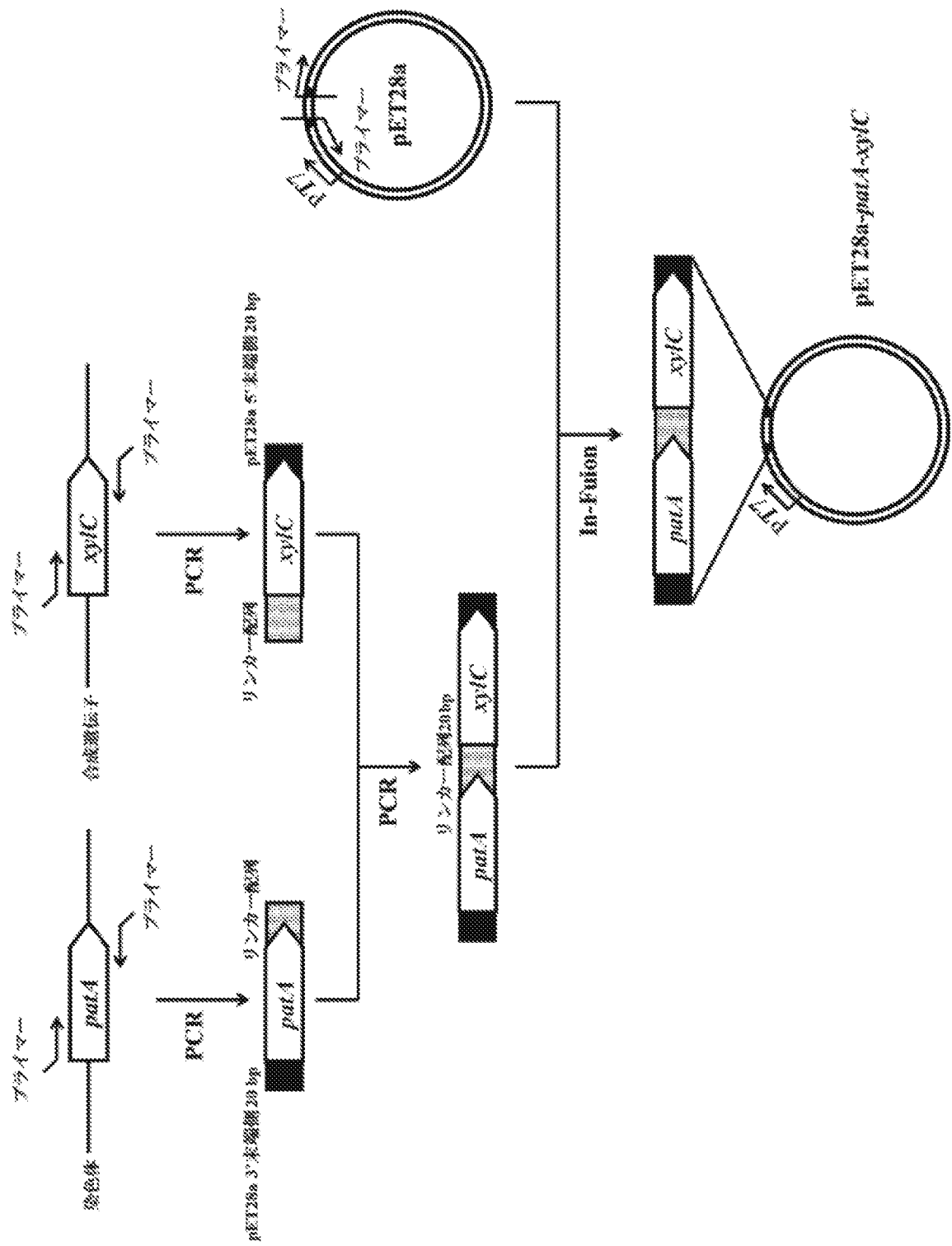
[図2]



[図3]



[図4]



[図5A]

20	1	--MRETK--EQPIWYGKVFSSNWVEARGGVANVVDPSNGDILGITGVANGEDVDAAVNAAKR	58
128	1	--MRETK--EQPIWYGKVFSSNWVEARGGVANVVDPSNGDILGITGVANGEDVDAAVNAAKR	58
40	1	MQQERR--EASIWSGKVFSSGWVEARGGVCDVTDPSNGDILGVTGIANGEDVAAAQQTARR	59
130	1	MQQERRKEVPIWSGKVFSSGWVEARGGVASDVTDPSNGDILGVVGIANGEDVAAAQQSARR	60
131	1	MNWNCK--LPIWHGKVFSSGWVVRGGVADVVDPSNGDILGVTGIANGEDIATAASAARKE	58
41	1	MNTPIK--SNAMTGKVFSSGWSAGSGGVAEVIEPATGEVLGQIGIADVDDVDAAVASARS	58
127	1	MNTPVK--TERWSGKIETGSSNVAARGGVAPVLEAATGAALGEVGVASPEDVDAAARSQA	58
134	1	MNTSTV--TNIWDSKIYSGGWIAAEGGTAAIIEPATGEVLGHIGIGATQDVDRAVQIASH	58
135	1	MTGTGS--EGQWTGKIETLGENVKGVTGATAPVMEPATDNQIGTIALASREDVDITATERAVV	58
20	59	AQKEWAAIPFSERAAIVRKAAEKLRERENEFADWNVRECGAIRPKGLWEAGIAYEQMHQA	118
128	59	AQKEWAAIPFSERAAIVRKAAEKLRERENEFADWNVRECGAIRPKGLWEAGIAYEQMHQA	118
40	60	AQKGWAAIPFSERAAIVRKAAEKLRERENEFADWNVRECGAIRPKGLWEAGITYEQMHQA	119
130	61	AQKEWAAIPFSERAAIVRKAAEKLRERENEFADWNVRECGAIRPKGLWEAGITYEQMHQA	120
131	59	AQKEWAAIPFSERAAIVRKAAEKLRERENEFADWNVRECGAIRPKGLWEAGITYEQMHQA	118
41	59	ACEWAAIPFDCRAAIVRKAAEKLRERENEFADWNVRECGAIRPKGLWEAGITYEQMHQA	118
127	59	AQKEWAAIPFDCRAAIVRKAAEKLRERENEFADWNVRECGAIRPKGLWEAGITYEQMHQA	118
134	59	AQKEWAAIPFDCRAAIVRKAAEKLRERENEFADWNVRECGAIRPKGLWEAGITYEQMHQA	118
135	59	AQKEWAAIPFDCRAAIVRKAAEKLRERENEFADWNVRECGAIRPKGLWEAGITYEQMHQA	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	KPDLCQAVTGGALIAEIESEAGLPDGVHLVLPFGGAEAGESMVANSGINMISFTGSTQVGR	238
128	179	KPDLCQAVTGGALIAEIESEAGLPDGVHLVLPFGGAEAGESMVANSGINMISFTGSTQVGR	238
40	180	KPDLCQAVTGGALIAEIESEAGLPDGVHLVLPFGGAEAGESMVANSGINMISFTGSTQVGR	239
130	181	KPDLCQAVTGGALIAEIESEAGLPDGVHLVLPFGGAEAGESMVANSGINMISFTGSTQVGR	240
131	179	KPDLCQAVTGGALIAEIESEAGLPDGVHLVLPFGGAEAGESMVANSGINMISFTGSTQVGR	238
41	179	KPDLCQAVTGGALIAEIESEAGLPDGVHLVLPFGGAEAGESMVANSGINMISFTGSTQVGR	238
127	179	KPDLCQAVTGGALIAEIESEAGLPDGVHLVLPFGGAEAGESMVANSGINMISFTGSTQVGR	238
134	179	KPDLCQAVTGGALIAEIESEAGLPDGVHLVLPFGGAEAGESMVANSGINMISFTGSTQVGR	238
135	179	KPDLCQAVTGGALIAEIESEAGLPDGVHLVLPFGGAEAGESMVANSGINMISFTGSTQVGR	238
20	239	LIGKCGRMMLKKVALELGNNVHIVLPDADLDGAASCAAWGTFHQQGVCMAGRHVHR	298
128	239	LIGKCGRMMLKKVALELGNNVHIVLPDADLDGAASCAAWGTFHQQGVCMAGRHVHR	298
40	240	LIGKCGRMMLKKVALELGNNVHIVLPDADLDGAASCAAWGTFHQQGVCMAGRHVHR	299
130	241	LIGKCGRMMLKKVALELGNNVHIVLPDADLDGAASCAAWGTFHQQGVCMAGRHVHR	300
131	239	LIGKCGRMMLKKVALELGNNVHIVLPDADLDGAASCAAWGTFHQQGVCMAGRHVHR	298
41	239	LIGKCGRMMLKKVALELGNNVHIVLPDADLDGAASCAAWGTFHQQGVCMAGRHVHR	298
127	239	LIGKCGRMMLKKVALELGNNVHIVLPDADLDGAASCAAWGTFHQQGVCMAGRHVHR	298
134	239	LIGKCGRMMLKKVALELGNNVHIVLPDADLDGAASCAAWGTFHQQGVCMAGRHVHR	298
135	239	LIGKCGRMMLKKVALELGNNVHIVLPDADLDGAASCAAWGTFHQQGVCMAGRHVHR	298

[図5B]

20	299	DVACQYAEKLALRAKNLVVGDENSDRVHLGPLINDKQVVRVHALVESACSAGAKVLAGGT	358
128	299	DVACQYAEKLALRAKNLVVGDENSDRVHLGPLINDKQVVRVHALVESACSAGAKVLAGGT	358
40	300	DIAQCYAEKLALRAKNLVVGDENSDRVHLGPLINDKQVVRVHALVESACSAGAKVLAGGA	359
130	301	DIAQCYAEKLALRAKNLVVGDENSDRVHLGPLINDKQVVRVHALVESACSAGAKVLAGGT	360
131	299	DVACQYAEKLALRAKNLVVGDENSDRVHLGPLINDKQVVRVHALVESACSAGAKVLAGGT	358
41	299	SVVDEYAEKLALRAKNLVVGDENAGPCHLGPLINDKQVVRVHVEVVTGSIEAGAEVLTGGV	358
127	299	SVADAYAEKLALRAKNLVVGDENAGPCHLGPLINDKQVVRVHVEVVTGSIEAGAEVLTGGV	358
134	299	SVADQYAEKLALRAKNLVVGDENAGPCHLGPLINDKQVVRVHVEVVTGSIEAGAEVLTGGV	358
135	299	SVAESYAEKLALRAKNLVVGDENAGPCHLGPLINDKQVVRVHVEVVTGSIEAGAEVLTGGV	358
20	359	YQDRYYQATVIMDVKEEVEVFKSEIFGVPVAPITVFDSTEEAIELANCSSEYGLAASIHTRA	418
128	359	YQDRYYQATVIMDVKEEVEVFKSEIFGVPVAPITVFDSTEEAIELANCSSEYGLAASIHTRA	418
40	360	YQDRYYQATVIMDVTPKMDVETKLEIFGVPVAPITVFDSTEEAIELANCSSEYGLAASIHTRK	419
130	361	YQDRYYQATVIMDVTPKMDVETKLEIFGVPVAPITVFDSTEEAIELANCSSEYGLAASIHTRK	420
131	359	HQGRFYQPTVIMDVTPKMDVETKLEIFGVPVAPITVFDSTEEAIELANCSSEYGLAASIHTR	418
41	359	HEGRFYQPTVIMDVTPKMDVETKLEIFGVPVAPITVFDSTEEAIELANCSSEYGLAASIHTR	418
127	359	HEGRFYQPTVIMDVTPKMDVETKLEIFGVPVAPITVFDSTEEAIELANCSSEYGLAASIHTR	418
134	359	HERLFYQPTVIMDVTPKMDVETKLEIFGVPVAPITVFDSTEEAIELANCSSEYGLAASIHTR	418
135	359	RRGRFFETVIMDVTPKMDVETKLEIFGVPVAPITVFDSTEEAIELANCSSEYGLAASIHTR	418
20	419	LATGLDIAFLNLTGMVHINDQPINCEPHVPFGGMGASGSGGRFGGPASIDEFTQSQWISM	478
128	419	LATGLDIAFLNLTGMVHINDQPINCEPHVPFGGMGASGSGGRFGGPASIDEFTQSQWISM	478
40	420	LATGLDIAFLNLTGMVHINDQPINCEPHVPFGGMGASGSGGRFGGPASIDEFTQSQWISM	479
130	421	LATGLDIAFLNLTGMVHINDQPINCEPHVPFGGMGASGSGGRFGGPASIDEFTQSQWISM	480
131	419	LATGLDIAFLNLTGMVHINDQPINCEPHVPFGGMGASGSGGRFGGPASIDEFTQSQWISM	478
41	419	AAAGLALALFLNLTGMVHINDQPINCEPHVPFGGMGASGSGGRFGGPASIDEFTQSQWISL	478
127	419	TAAGLALALFLNLTGMVHINDQPINCEPHVPFGGMGASGSGGRFGGPASIDEFTQSQWISV	478
134	419	IFRAVALSQPLNLTGMVHINDQPINCEPHVPFGGMGASGSGGRFGGPANVHEFTQSQWLSI	478
135	419	MSAAMSVARLKSGLNLTGMVHINDQPINCEPHVPFGGMGASGSGGRFGGPANVHEFTQSQWISA	478
20	479	VEKEPANYPF	487
128	479	VEKSASYPF	487
40	480	VEKPSIYPF	488
130	481	VEKPATYPF	489
131	479	VEKEPNYPF	487
41	479	VEKEVIYPF	487
127	479	SEKAACYPF	487
134	479	MEKEVIYPF	487
135	479	MDAETIYPF	487

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/024236

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P 13/00(2006.01)i; **C12N 5/10**(2006.01)i; **C12N 1/15**(2006.01)i; **C12N 1/19**(2006.01)i; **C12N 1/21**(2006.01)i;
C12N 15/53(2006.01)i; **C12N 15/54**(2006.01)i; **C12N 9/10**(2006.01)i
 FI: C12N15/54; C12N15/53; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C12P13/00; C12N9/10 ZNA

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; C12N5/10; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N15/53; C12N15/54; C12N9/10

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 1971-2023
 Registered utility model specifications of Japan 1996-2023
 Published registered utility model applications of Japan 1994-2023

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAPplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); SwissProt/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2018/190398 A1 (KYOUWA HAKKO BIO CO., LTD.) 18 October 2018 (2018-10-18)	1-4
A	claims, SEQ ID NO. 2	5-31
X	LI, S. et al, 'aminotransferase [Pseudomonas putida ND6]', GenBank [online], 30 January 2014, Accession No. AFK66983.1, [retrieved on 05 September 2023], Internet: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/388557842>	1-4
A	entire text	5-31
X	UHRYNOWSKI, W. et al., 'Omega-amino acid--pyruvate aminotransferase [Aeromonas salmonicida]', GenBank [online], 08 June 2017, Accession No. ARW84612.1, [retrieved on 05 September 2023], Internet: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/arw84612.1>	1-4
A	entire text	5-31



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

08 September 2023

Date of mailing of the international search report

19 September 2023

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/JP2023/024236

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ASHTON, P. M. et al., 'putrescine aminotransferase [Shigella boydii]', GenBank [online], 02 September 2020, Accession No. EGE3747071.1, [retrieved on 05 September 2023], Internet: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/eg3747071.1>	1-4
A	entire text	5-31
X	DURFEE, T. et al., 'medium chain aldehyde dehydrogenase [Escherichia coli str. K-12 substr. DH10B]', GenBank [online], 31 January 2014, Accession No. ACB02660.1, [retrieved on 05 September 2023], Internet: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/acb02660.1>	5-9, 17-20, 22-25
A	entire text	1-4, 10-16, 21, 26-31
X	MARTINEZ, J. M. et al., 'Benzaldehyde dehydrogenase [NAD(+)] [Stutzerimonas stutzeri]', GenBank [online], 18 August 2020, Accession No. CAD2266443.1, [retrieved on 05 September 2023], Internet: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/cad2266443.1>	5-9, 17-25
A	entire text	1-4, 10-16, 26-31
X	VELASCO, A. et al., 'phenylacetaldehyde dehydrogenase [Pseudomonas sp. Y2]', GenBank [online], 15 April 2005, Accession No. CAA04003.1, [retrieved on 05 September 2023], Internet: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/caa04003.1>	5-9, 17-20, 22-25
A	entire text	1-4, 10-16, 21, 26-31
X	CRONIN, C. N., 'p-hydroxybenzaldehyde dehydrogenase (plasmid) [Pseudomonas putida]', GenBank [online], 26 July 2016, Accession No. AAA75634.2, [retrieved on 05 September 2023], Internet: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/aaa75634.2>	5-9, 17-20, 22-25
A	entire text	1-4, 10-16, 21, 26-31
A	JP 63-152991 A (IDEMITSU KOSAN CO., LTD.) 25 June 1988 (1988-06-25)	1-31
A	CN 103131649 A (ZHEJIANG UNIVERSITY OF TECHNOLOGY) 05 June 2013 (2013-06-05)	1-31
A	CN 103114122 A (ZHEJIANG UNIVERSITY OF TECHNOLOGY) 22 May 2013 (2013-05-22)	1-31
A	JP 55-076846 A (TAKEDA PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 10 June 1980 (1980-06-10)	1-31

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/024236

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:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

“In the form of an Annex C/ST.25 text file” above should be understood as “in ST.26 format”.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2023/024236

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO	2018/190398	A1	18 October 2018	US 2020/0131546 A1 claims, SEQ ID NO. 2 EP 3611253 A1	
JP	63-152991	A	25 June 1988	(Family: none)	
CN	103131649	A	05 June 2013	(Family: none)	
CN	103114122	A	22 May 2013	(Family: none)	
JP	55-076846	A	10 June 1980	(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; C12N 5/10(2006.01)i; C12N 1/15(2006.01)i; C12N 1/19(2006.01)i; C12N 1/21(2006.01)i; C12N 15/53(2006.01)i; C12N 15/54(2006.01)i; C12N 9/10(2006.01)i FI: C12N15/54; C12N15/53; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C12P13/00; C12N9/10 ZNA		
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; C12N5/10; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N15/53; C12N15/54; C12N9/10		
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 1971-2023年 日本国実用新案登録公報 1996-2023年 日本国登録実用新案公報 1994-2023年		
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTplus/JMEDplus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); SwissProt/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 A	WO 2018/190398 A1（協和発酵バイオ株式会社）18.10.2018（2018-10-18） 特許請求の範囲、配列番号2	1-4 5-31
X A	LI, S. et al, 'aminotransferase [Pseudomonas putida ND6]', GenBank [online], 2014年1月30日, Accession No.AFK66983.1, [2023年9月5日検索], インターネット< https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/388557842 > 全文	1-4 5-31
X A	UHRYNOWSKI, W. et al., 'Omega-amino acid--pyruvate aminotransferase [Aeromonas salmonicida]', GenBank [online], 2017年6月8日, Accession No.ARW84612.1, [2023年9月5日検索], インターネット< https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/arw84612.1 > 全文	1-4 5-31
☒ 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、一般的な技術水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と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 08.09.2023		国際調査報告の発送日 19.09.2023
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） 松田 芳子 4B 3126 電話番号 03-3581-1101 内線 3448

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	ASHTON, P. M. et al., 'putrescine aminotransferase [Shigella boydii]', GenBank [online], 2020年9月2日, Accession No.EGE3747071.1, [2023年9月5日検索], インターネット< https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/eg3747071.1 >	1-4
A	全文	5-31
X	DURFEE, T. et al., 'medium chain aldehyde dehydrogenase [Escherichia coli str. K-12 substr. DH10B]', GenBank [online], 2014年1月31日, Accession No.AC02660.1, [2023年9月5日検索], インターネット< https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/ac02660.1 >	5-9, 17-20, 22-25
A	全文	1-4, 10-16, 21, 26-31
X	MARTINEZ, J. M. et al., 'Benzaldehyde dehydrogenase [NAD(+)] [Stutzerimonas stutzeri]', GenBank [online], 2020年8月18日, Accession No.CAD2266443.1, [2023年9月5日検索], インターネット< https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/cad2266443.1 >	5-9, 17-25
A	全文	1-4, 10-16, 26-31
X	VELASCO, A. et al., 'phenylacetaldehyde dehydrogenase [Pseudomonas sp. Y2]', GenBank [online], 2005年4月15日, Accession No.CAA04003.1, [2023年9月5日検索], インターネット< https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/caa04003.1 >	5-9, 17-20, 22-25
A	全文	1-4, 10-16, 21, 26-31
X	CRONIN, C. N., 'p-hydroxybenzaldehyde dehydrogenase (plasmid) [Pseudomonas putida]', GenBank [online], 2016年7月26日, Accession No. AAA75634.2, [2023年9月5日検索], インターネット< https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/aaa75634.2 >	5-9, 17-20, 22-25
A	全文	1-4, 10-16, 21, 26-31
A	JP 63-152991 A (出光興産株式会社) 25.06.1988 (1988 - 06 - 25)	1-31
A	全文	
A	CN 103131649 A (ZHEJIANG UNIVERSITY OF TECHNOLOGY) 05.06.2013 (2013 - 06 - 05)	1-31
A	全文	
A	CN 103114122 A (ZHEJIANG UNIVERSITY OF TECHNOLOGY) 22.05.2013 (2013 - 05 - 22)	1-31
A	全文	
A	JP 55-076846 A (武田薬品工業株式会社) 10.06.1980 (1980 - 06 - 10)	1-31
A	全文	

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

☒ 附属書C/ST.25テキストファイル形式

☐ 紙形式又はイメージファイル形式

b. ☐ 国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表

c. ☐ 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表

☐ 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))

☐ 紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)

2. ☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:

上記「附属書 C/ST.25テキストファイル形式」は「ST.26形式」と読み替える。

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/JP2023/024236

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
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	
JP	63-152991	A	25.06.1988	(ファミリーなし)	
CN	103131649	A	05.06.2013	(ファミリーなし)	
CN	103114122	A	22.05.2013	(ファミリーなし)	
JP	55-076846	A	10.06.1980	(ファミリーなし)	