

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2006-503551

(P2006-503551A)

(43) 公表日 平成18年2月2日(2006.2.2)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 9/02 (2006.01)	C 1 2 N 9/02	4 B O 5 O
C 1 2 P 7/60 (2006.01)	C 1 2 P 7/60	4 B O 6 4
C 1 2 P 17/04 (2006.01)	C 1 2 P 17/04	
C 1 2 R 1/01 (2006.01)	C 1 2 N 9/02	
	C 1 2 R 1:01	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 20 頁)

(21) 出願番号	特願2003-586346 (P2003-586346)	(71) 出願人	503220392
(86) (22) 出願日	平成15年4月14日 (2003.4.14)		ディーエスエム アイビー アセツ ビー、ブイ、
(85) 翻訳文提出日	平成16年10月7日 (2004.10.7)		オランダ国, 6 4 1 1 ティーイー ヘーレン, ヘット オーバールーン 1
(86) 国際出願番号	PCT/EP2003/003862		
(87) 国際公開番号	W02003/089634	(74) 代理人	100078662
(87) 国際公開日	平成15年10月30日 (2003.10.30)		弁理士 津国 肇
(31) 優先権主張番号	02008919.9	(74) 代理人	100075225
(32) 優先日	平成14年4月22日 (2002.4.22)		弁理士 篠田 文雄
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(72) 発明者	星野 達雄
(31) 優先権主張番号	02012584.5		神奈川県鎌倉市笛田2-18-14
(32) 優先日	平成14年6月6日 (2002.6.6)	(72) 発明者	宮崎 太郎
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		神奈川県藤沢市亀井野2-14-8

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アルデヒド脱水素酵素 I I

(57) 【要約】

本発明は、以下の物理化学的性質：分子量 1 0 0 , 0 0 0 ± 1 0 , 0 0 0 Da (2 個の相同のサブユニットを含んでなる) または分子量 1 5 0 , 0 0 0 ± 1 5 , 0 0 0 Da (3 個の相同のサブユニットを含んでなる) であって、各々のサブユニットは分子量 5 5 , 0 0 0 ± 2 , 0 0 0 Da を有する ; L - ソルボソン、D - グルコソン、D - グルコースおよび D - キシロースに対して脱水素酵素活性 ; 補助因子として、ピロロキノリンキノンを利用 ; L - ソルボソンからの、ビタミン C の製造に対して至適 pH 6 . 5 ~ 8 . 0 および 2 - ケト - L - グロン酸の製造に対して至適 pH 約 9 . 0 を有する ; そして Co^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Ni^{2+} 、 Zn^{2+} 、およびモノヨード酢酸により阻害される、を有し、グルコノバクター (*Gluconobacter*) 属に属する微生物に由来する、新規アルデヒド脱水素酵素に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の物理化学的性質：

- a) 分子量 100,000 ± 10,000 Da (2 個の相同のサブユニットからなる) または分子量 150,000 ± 15,000 Da (3 個の相同のサブユニットからなる) であって、各々のサブユニットは分子量 55,000 ± 2,000 Da を有する；
- b) 基質特異性：アルデヒド化合物に対して活性、
- c) 補助因子：ピロロキノリンキノン (PQQ)、
- d) 至適 pH 約 6.5 ~ 約 8.0 (L-ソルボソンからのビタミン C の製造に対して) または至適 pH 約 9.0 (L-ソルボソンからの 2-ケト-L-グルン酸の製造に対して) 10
- e) 阻害物質： Co^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Ni^{2+} 、 Zn^{2+} 、およびモノヨード酢酸、を有する精製アルデヒド脱水素酵素。

【請求項 2】

アルデヒド脱水素酵素を産生することができるグルコノバクター (Gluconobacter) 属に属する微生物に由来する、請求項 1 記載のアルデヒド脱水素酵素。

【請求項 3】

微生物がグルコノバクター オキシダンス (Gluconobacter oxydans) DSM No. 4025 株 (FERM BP-3812) の同定特性をもつグルコノバクター オキシダンス (Gluconobacter oxydans)、その継代培養株または変異株である、請求項 2 記載のアルデヒド脱水素酵素。 20

【請求項 4】

微生物がグルコノバクター オキシダンス (Gluconobacter oxydans) DSM No. 4025 (FERM BP-3812)、その継代培養株または変異株である、請求項 3 記載のアルデヒド脱水素酵素。

【請求項 5】

以下の物理化学的性質：

- a) 分子量 100,000 ± 10,000 Da (2 個の相同のサブユニットからなる) または分子量 150,000 ± 15,000 Da (3 個の相同のサブユニットからなる) であって、各々のサブユニットは分子量 55,000 ± 2,000 Da を有する； 30
- b) 基質特異性：アルデヒド化合物に対して活性、
- c) 補助因子：ピロロキノリンキノン (PQQ)、
- d) 至適 pH 約 6.5 ~ 約 8.0 (L-ソルボソンからのビタミン C の製造に対して) または至適 pH 約 9.0 (L-ソルボソンからの 2-ケト-L-グルン酸の製造に対して) 40
- e) 阻害物質： Co^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Ni^{2+} 、 Zn^{2+} 、およびモノヨード酢酸、を有するアルデヒド脱水素酵素の製造方法であって、好気性条件下、水性栄養培地中で、上記の性質を有するアルデヒド脱水素酵素を産生することができるグルコノバクター属に属する微生物を培養し、その微生物の細胞を破碎し、そしてその微生物の破碎された細胞の無細胞抽出物からアルデヒド脱水素酵素を単離精製することを含んでなる方法。

【請求項 6】

反応が、pH 約 5.5 ~ 9.0 および温度約 20 ~ 約 50 で行われる、請求項 5 記載の方法。

【請求項 7】

電子受容体の存在下に、アルデヒドを、以下の物理化学的性質：

- a) 分子量 100,000 ± 10,000 Da (2 個の相同のサブユニットからなる) または分子量 150,000 ± 15,000 Da (3 個の相同のサブユニットからなる) であって、各々のサブユニットは分子量 55,000 ± 2,000 Da を有する；
- b) 基質特異性：アルデヒド化合物に対して活性、
- c) 補助因子：ピロロキノリンキノン (PQQ)、 50

d) 至適 pH 約 6.5 ~ 約 8.0 (L-ソルボソンからのビタミン C の製造に対して) または至適 pH 約 9.0 (L-ソルボソンからの 2-ケト-L-グルロン酸の製造に対して)

e) 阻害物質: Co^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Ni^{2+} 、 Zn^{2+} 、およびモノヨード酢酸、を有する精製アルデヒド脱水素酵素または上記の性質を有するアルデヒド脱水素酵素を産生することができるグルコノバクター属に属する微生物から調製された無細胞抽出物と接触させることを含んでなる、カルボン酸および/またはそのラクトンとその対応するアルドースから製造する方法。

【請求項 8】

微生物がグルコノバクター オキシダンス (*Gluconobacter oxydans*) DSM No. 4025 株 (FERM BP-3812) の同定特性をもつグルコノバクター オキシダンス (*Gluconobacter oxydans*)、その継代培養株または変異株である、請求項 5 ~ 7 のいずれか 1 項記載の方法。

10

【請求項 9】

微生物がグルコノバクター オキシダンス (*Gluconobacter oxydans*) DSM No. 4025 (FERM BP-3812)、その継代培養株または変異株である、請求項 8 記載の方法。

【請求項 10】

ラクトンがビタミン C であり、カルボン酸が 2-ケト-L-グルロン酸であり、そしてアルドースが L-ソルボソンである、請求項 7 記載の方法。

20

【請求項 11】

反応が、ビタミン C および 2-ケト-L-グルロン酸の製造に対して、それぞれ pH 約 5.5 ~ 約 9.0 および温度約 20 ~ 約 50 で行われる、請求項 7 ~ 10 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 12】

反応が、ビタミン C の製造に対して、pH 約 6.5 ~ 約 8.0 および温度約 20 ~ 約 40 で、そして、2-ケト-L-グルロン酸の製造に対して、pH 約 9.0 および温度約 20 ~ 約 30 で行われる、請求項 7 ~ 11 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 13】

電子受容体の存在下に、アルデヒドを、精製アルデヒド脱水素酵素またはアルデヒド脱水素酵素を産生することができるグルコノバクター属に属する微生物から調製された無細胞抽出物と接触させることを含んでなる、カルボン酸および/またはそのラクトンとその対応するアルドースから製造する方法における、請求項 1 の精製アルデヒド脱水素酵素の使用。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、新規な酵素、すなわち、中性 pH での L-ソルボソンから L-アスコルビン酸 (以下、ビタミン C と称する) への変換およびアルカリ性 pH での L-ソルボソンから 2-ケト-L-グルロン酸 (以下、2-KGA と称する) への変換の双方を引き起こす、アルデヒド脱水素酵素 (以下、SNDH II と称する) に関する。本発明は、また、その酵素の製造方法およびその酵素を用いる L-ソルボソンなどのアルドースからの直接的なビタミン C および/または 2-KGA の製造方法に関する。

40

【0002】

ビタミン C は、人間にとって、非常に重要で必須の栄養因子の一つである。ビタミン C を産生する代謝経路は、種々の生物で広く研究されている。しかしながら、L-ソルボソンのビタミン C への直接変換に関する精製酵素についての報告はない。したがって、本発明の酵素は、ライヒシュタイン法 (*Helvetica Chimica Acta* 17:311 (1934)) 等の現在の方法に代わる、新規なビタミン C 製造方法に対して非常に有用である。

【0003】

50

本発明は、以下の物理化学的性質：

a) 分子量 100,000 ± 10,000 Da (2 個の相同のサブユニットからなる) または分子量 150,000 ± 15,000 Da (3 個の相同のサブユニットからなる) であって、各々のサブユニットは分子量 55,000 ± 2,000 Da を有する；

b) 基質特異性：アルデヒド化合物に対して活性、

c) 補助因子：ピロロキノリンキノン (PQQ)、

d) 至適 pH 約 6.5 ~ 約 8.0 (L-ソルボソンからのビタミン C の製造に対して) または至適 pH 約 9.0 (L-ソルボソンからの 2-ケト-L-グルン酸の製造に対して)

e) 阻害物質： Co^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Ni^{2+} 、 Zn^{2+} 、およびモノヨード酢酸、
を有する精製アルデヒド脱水素酵素を提供する。

10

【0004】

一つの実施態様において、本発明は、上記の物理化学的性質を有する分子量 100,000 ± 10,000 Da のアルデヒド脱水素酵素に関する。

【0005】

さらなる実施態様において、本発明は、上記の物理化学的性質を有する分子量 150,000 ± 15,000 Da のアルデヒド脱水素酵素に関する。

【0006】

本発明の SNDH II 源は重要なことではない。そこで、本発明の SNDH II は、例えば、グルコノバクター (Gluconobacter) または上記の性質を有する脱水素酵素を
產生することができる他の生物から単離することにより製造することができ、あるいは遺
伝子組換えでまたは化学合成により製造することができる。

20

【0007】

本発明の他の目的は、好気性条件下、水性栄養培地中で、上記の性質を有するアルデヒド脱水素酵素を產生することができるグルコノバクター属に属する微生物を培養し、その微生物の細胞を破碎し、そしてその微生物の破碎された細胞の無細胞抽出物からアルデヒド脱水素酵素を単離精製することを含んでなる、上記の SNDH II の製造方法を提供する。

【0008】

本発明の一態様において、上記の SNDH II の製造方法は、上記の性質を有するアル
デヒド脱水素酵素を產生することができるグルコノバクター属に属する微生物を培養す
ることにより行われ、ここで、反応を pH 約 5.5 ~ 約 9.0 および温度約 20 ~ 約 50
、好ましくは温度約 20 ~ 約 40 、最も好ましくは温度約 20 ~ 約 30 で行う。こ
のように製造される SNDH II は、ビタミン C および 2-KGA の双方の製造に有用
である。

30

【0009】

本発明のさらなる目的は、電子受容体の存在下に、アルデヒドを、上記の性質を有する
精製 SNDH II または上記の性質を有するアルデヒド脱水素酵素を產生することがで
きるグルコノバクター属に属する微生物から調製された無細胞抽出物と接触させること
を含んでなる、カルボン酸および / またはそのラク톤をその対応するアルドースから製造
する方法を提供する。

40

【0010】

ここで使用されるアルドースは、L-ソルボソン、D-グルコソン、D-グルコース、
および D-キシロースを含むが、ただしそれらに限定されない。

【0011】

好ましいラク톤はビタミン C であり、好ましいカルボン酸は 2-KGA であり、そし
て好ましいアルドースは L-ソルボソンである。

【0012】

一つの実施態様において、カルボン酸および / またはそのラク톤をその対応するアル
ドースから製造する方法は、アルデヒドを、上記の性質を有する精製 SNDH II また

50

は上記のグルコノバクター属に属する微生物から調製された無細胞抽出物と接触させることを含んでなり、ここでSNDH IIの分子量は100,000 ± 10,000 Daである。

【0013】

一つの実施態様において、カルボン酸および/またはそのラク톤をその対応するアルドースから製造する方法は、アルデヒドを、上記の性質を有する精製SNDH IIまたは上記のグルコノバクター属に属する微生物から調製された無細胞抽出物と接触させることを含んでなり、ここでSNDH IIの分子量は150,000 ± 15,000 Daである。

【0014】

一態様において、本発明は、アルデヒドを、上記の性質を有する精製SNDH IIまたは上記の性質を有するアルデヒド脱水素酵素を産生することができるグルコノバクター属に属する微生物から調製された無細胞抽出物と接触させることを含んでなる、カルボン酸および/またはそのラク톤をその対応するアルドースから製造する方法であって、反応をpH約5.5～約9.0および温度約20～約50、好ましくは温度約20～約40、最も好ましくは温度約20～約30で行う方法に関する。ビタミンCを製造する場合には、反応は、好ましくはpH約6.5～約8.0および温度約20～約40で行われる。2-KGAを製造する場合には、反応は、好ましくはpH約9.0および温度約20～約30で行われる。

【0015】

本発明はまた、電子受容体の存在下に、アルデヒドを、精製アルデヒド脱水素酵素または上記のアルデヒド脱水素酵素を産生することができるグルコノバクター属に属する微生物から調製された無細胞抽出物と接触させることを含んでなる、カルボン酸および/またはそのラク톤をその対応するアルドースから製造する方法における、上記の性質を有する精製アルデヒド脱水素酵素の使用を提供する。

【0016】

以下に記載の実施例にしたがって調製されるSNDH IIの精製試料の物理化学的性質は、次のとおりである。

【0017】

1) 酵素活性

本発明のSNDH IIは、電子受容体の存在下に、L-ソルボソンのビタミンCおよび/または2-KGAへの酸化を、以下の反応式にしたがって触媒する：

L-ソルボソン + 電子受容体 ビタミンCおよび/または2-KGA + 還元された電子受容体

【0018】

この酵素は、電子受容体としての酸素とは作用しない。このことは、この酵素が、酸素を可能な電子受容体として用いたとき、L-ソルボソンのビタミンCおよび/または2-KGAへの変換を行わないことにより、確認された。さらに、溶存酸素プローブでの検出で、反応混合物中での酸素の消費は検出されなかった。その上、NADおよびNADPは適切な電子受容体ではない。しかしながら、他の従来の電子受容体は、本発明の酵素と一緒に用いることができる。好ましい電子受容体は、フェナジン、メトサルファート(PMS)、2,6-ジクロロフェノールインドフェノール(DCIP)、フェリシアニド、およびチトクロームcである。少なくともいくつかのアルデヒド基質がその対応する酸に変換されるために存在すべき電子受容体の最小量はない。しかしながら、酸化することができる基質の量は、特定の電子受容体の量およびその電子受容特性に依存する。

【0019】

酵素アッセイは以下のように行った：

【0020】

a) L-ソルボソンからの各々の生成物、ビタミンCまたは2-KGAへの変換に対する酵素活性を決定するアッセイ

10

20

30

40

50

反応混合物は、最終容量が水 100 μ l で、1.0 mM PMS、25 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0)、1.0 μ M PQQ、1.0 mM CaCl_2 、50 mM L-ソルボソンおよび酵素溶液からなり、この反応混合物はアッセイの直前に調製した。他に特記しない限り、反応は 30 で 60 分間行った。酵素活性の指標となるビタミン C の量は、高速液体クロマトグラフィーシステム (HPLC) により、264 nm で測定したが、そのシステムは、UV 検出器 (東ソー UV 8000; 東ソー株式会社、東京都中央区京橋 3-2-4、日本)、ジュアルポンプ (東ソー CCE; 東ソー株式会社)、積分器 (島津 CR6A; 島津製作所、京都市中京区西ノ京桑原町 1、日本) およびカラム (YMC-Pack ポリアミン II; YMC 社、3233 Burnt Mill Drive Wilimington, NC28403, USA) よりなる。酵素活性の他の指標である、製造された 2-KGA の量は、上記の HPLC により測定された。各々の製造に対する酵素活性の 1 単位は、反応混合物中に、ビタミン C および 2-KGA をそれぞれ 1 mg 製造する酵素の量として定義した。

10

【0021】

b) SNDH II の光度測定アッセイ

反応混合物は、最終容量が水 100 μ l で、0.1 mM DCIP、1.0 mM PMS、50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0)、1.0 μ M PQQ、2~100 mM 基質 (L-ソルボソン、D-グルコソン、D-グルコース、など) および酵素溶液からなり、この反応混合物はアッセイの直前に調製した。反応は 25 で L-ソルボソンと共に開始し、酵素活性は、600 nm での DCIP の初期還元速度として測定した。酵素活性の 1 単位は、1 分間あたり 1 μ mol の DCIP の還元を触媒する酵素の量として定義した。DCIP の吸光係数は pH 7.0 で 14.2 mM^{-1} であった。対照キュベットは、L-ソルボソンを除く全ての上記の成分を含んでいた。

20

【0022】

タンパク質濃度は、タンパク質アッセイ CBB 溶液 (半井テスク社、京都、日本) を用いて測定した。

【0023】

2) 基質特異性

酵素の基質特異性は、100 mM リン酸カリウム (pH 7.5) または 100 mM トリス-HCl (pH 9.0) を緩衝液として用いた以外は、上記 1b) に記載したのと同じ酵素アッセイ法を用いて測定した。pH 7.5 および 9.0 の双方において、D-グルコソン (2 mM)、D-グルコース (100 mM)、および D-キシロース (100 mM) に対する SNDH II の相対活性は、L-ソルボソン (2 mM) に対するそれより高かった。しかしながら、pH 7.5 および 9.0 の双方において、L-ソルボース (100 mM)、D-ソルビトール (100 mM)、および L-グルノ- -ラクトン (100 mM) に対する相対活性は、L-ソルボソンに対する活性の 1% より低かった。これらの結果を表 1A に示す。

30

【0024】

【表 1】

表 1 A

精製酵素の基質特異性

基質	相対活性 (%)	
	pH 7.5	pH 9.0
L-ソルボソン	100	100
D-グルコソン	483	1591
D-グルコース	1769	1519
L-ソルボース	<1	<1
D-ソルビトール	<1	<1
D-キシロース	2123	1323
L-グルノ-γ-ラクトン	<1	<1

10

20

【0025】

b) 表 1 A で示された基質の酸化の推定生成物を、下記の表 1 B に示す。

【0026】

【表 2】

30

表 1 B

基質	生成物
L-ソルボソン	ビタミン C / 2-KGA
D-グルコソン	D-イソ-アスコルビン酸 / 2-ケト-D-グルコナート
D-グルコース	D-グルコナート
D-キシロース	D-キシロン酸

40

【0027】

3) 至適 pH

SNDH II の反応速度と反応混合液の pH 値との間の相関関係を、種々の pH 値および 100 mM 濃度の緩衝液を用いた以外は、上記 1 a) に記載したのと同じアッセイ方法により測定した。

この酵素は、ビタミン C の製造に対して、pH 約 6.5 ~ 約 8.0 で比較的高い活性を

50

示し、そして 2 - K G A の製造に対して、p H 約 9 . 0 で、高い活性を示した。

【 0 0 2 8 】

4) 温度の影響

酵素反応に対する温度の影響を、種々の温度を用いた以外は、上記 1 a) に記載したのと同じアッセイ方法により試験した。ビタミン C と 2 - K G A の双方の製造において、酵素反応は、少なくとも 4 0 まで安定に行われた。

【 0 0 2 9 】

5) 金属イオンと阻害剤の影響

この酵素の L - ソルボソン脱水素酵素活性に対する金属イオンと阻害剤の影響は、上記 1 b) に記載したのと同じアッセイ方法を用いて活性を測定することにより調べた。各化合物の溶液を、基本となる反応混合物に攪拌して入れ、反応を酵素の添加により開始した。結果を表 2 に示す。

【 0 0 3 0 】

【表 3】

表 2

精製酵素の活性に対する阻害剤と金属の影響

化合物	相対活性 (%)
なし	100.0
EDTA	97.9
NaN ₃	98.4
モノヨード酢酸	34.7
CaCl ₂ •2H ₂ O	94.7
CoCl ₂ •6H ₂ O	60.8
CuSO ₄	<1
Fe ₂ (SO ₄) ₃ •xH ₂ O	73.2
NiSO ₄ •6H ₂ O	82.9
TiCl ₄	95.9
ZnCl ₂	64.9
MgCl ₂	88.5

【 0 0 3 1 】

各々の化合物は、E D T A、N a N₃およびモノヨード酢酸の濃度が 5 . 0 m M であることを除いて、1 . 0 m M の濃度で反応混合物に加えた。

【 0 0 3 2 】

表 2 に示されたように、C o ²⁺、C u ²⁺、F e ³⁺、N i ²⁺、および Z n ²⁺ は酵素活性を阻害した。5 . 0 m M モノヨード酢酸の添加は、酵素活性を強く阻害した。

【 0 0 3 3 】

6) 分子量

酵素の分子量は、サイズ排除ゲルカラム (T S K - ゲル G 3 0 0 0 S W X L ; 東ソー

株式会社、東京都港区赤坂 1 - 7 - 7、日本)で測定した。酵素は、クロマトグラフィーで見かけの分子量が約 100,000 ± 10,000 Da および約 150,000 ± 15,000 に相当する 2 つのピークを示した。この酵素を CBB で染色した 10% SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分析することにより、精製酵素が、各々分子量約 55,000 ± 2,000 Da の 2 ~ 3 個の均一なサブユニットからなることが示された。この酵素の二量体型および三量体型の双方が活性である。

【0034】

7) 補欠分子族

100 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{HCl}$ (pH 約 1.0) 50 μl 中の精製 SNDH II (0.1 mg) を等容量のメタノールで添加し、よく混合した。試料を遠心分離して、析出物を除去した。得られた上清を、補欠分子族の分析に使用した。抽出物の吸収スペクトルは、PQQ (三菱ガス化学、日本) の標準試料とほとんど同一であった。その吸収ピークは、251 および 348 nm に見出された。さらに、逆相カラム (YMC-Pack Pro C18 AS-312; YMC 株式会社) を用いる 313 nm の波長での HPLC 分析により、メタノールでの SNDH II 抽出物は、標準 PQQ のそれと同じ保持時間を示した。

【0035】

精製酵素のヘム c の検出は、UV-VIS 記録分光光度計 (島津 UV-2200; 島津製作所) によって得られた、酸化・還元差スペクトルにより試みられた。酵素を 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) 中に 50 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で懸濁し、そして亜ジチオン酸塩で還元した形態の酵素および過硫酸アンモニウムで酸化した形態の酵素を調製して、差スペクトルを測定した。しかしながら、得られたスペクトルは、450 と 650 nm の間の波長で、明白なピークを示さなかった。

【0036】

これらの結果は、この酵素は PQQ を有するが、ヘム c を補欠分子族として有しないことを強く示唆する。

【0037】

8) 基質濃度の影響

1 mM ~ 8 mM までの種々の濃度の L - ソルボソンでの酸化反応の速度を測定して、L - ソルボソンの K_m 値を決定した。ミカエリス定数は、DCIP を反応の電子受容体として用いた場合の反応速度に基づくラインウィーバー・バーク (Lineweaver-Burk) プロットから、pH 7.5 および 9.0 で、それぞれ 14.7 mM および 20.0 mM であると計算された。

【0038】

9) 精製方法

酵素の精製は、公知の精製法の任意の組み合わせ、例えば、イオン交換カラムクロマトグラフィー、疎水性カラムクロマトグラフィー、塩析および透析により行う。

【0039】

本発明により提供される酵素は、適切な微生物を水性栄養培地中、好気性条件下で培養し、その微生物の細胞を破碎し、そしてその微生物の破碎された細胞の無細胞抽出物から脱水素酵素を単離精製することにより調製することができる。

【0040】

本発明の方法に用いられる微生物は、上記の脱水素酵素を産生することのできるグルコノバクター (*Gluconobacter*) 属に属する微生物である。

【0041】

好ましい株はグルコノバクター オキシダンス (*Gluconobacter oxydans*) である。本発明において用いられる最も好ましい株は、グルコノバクター オキシダンス DSM 4025 であり、Deutsche Sammlung von Mikroorganismen in Gottingen (ドイツ国) に、ブダペスト条約の規定に基づいて、DSM No. 4025 で 1987 年 3 月 17 日に寄託された。寄託者は The Oriental Scientific Instruments Import and Export Corpor

ation for Institute of Microbiology, Academia Sinica, 52 San-Li-He Rd., Beijing, Peoples Republic of Chinaであった。事実上の寄託者は該機関であり、その完全なアドレスは、The Institute of Microbiology, Academy of Sciences of China, Haidian, Zhongguancun, Beijing 100080, People's Republic of Chinaである。

【0042】

また、この株の継代培養物もまた、産業技術総合研究所(AIST)にブダペスト条約の規定に基づいて、受託番号グルコノバクター オキシダンス DSM No. 4025 (FERM BP-3812)で1992年3月30日に寄託された。寄託者は、日本ロシュ株式会社(東京都港区芝2丁目6-1、日本)であった。この継代培養物もまた本発明に最も好ましく用いられる。

10

【0043】

そこで、グルコノバクター オキシダンス (Gluconobacter oxydans) DSM No. 4025株 (FERM BP-3812)の同定性質をもつグルコノバクター オキシダンス (Gluconobacter oxydans)、その継代培養株または変異株に由来する、上記のアルデヒド脱水素酵素を提供することは、本発明の目的である。

【0044】

G. oxydans DSM 4025 (FERM BP-3812)またはグルコノバクター (Gluconobacter) 属に属し、G. oxydans DSM 4025 (FERM BP-3812)の同定性質をもつ微生物の変異株は、例えば、紫外線もしくはX線照射、またはナイトロジェン・マスタードもしくはN-メチル-n-ニトロ-N-ニトロソグアニジン等の化学的突然変異原で細胞を処理することにより得られる。

20

【0045】

全てのタイプの微生物、例えば、静止細胞、アセトン処理細胞、凍結乾燥細胞、固定化細胞などが、基質に直接作用するために用いられる。微生物のインキュベーション法に関連する方法としてそれ自体公知のすべての手段が、エアレーションの使用を通して採用され、そして、攪拌式液中発酵槽が特に好ましい。反応を行うための好ましい細胞濃度範囲は、1mlあたりの湿潤細胞重量で、約0.01g~0.7g、好ましくは1mlあたりの湿潤細胞重量で、0.03g~0.5gである。

【0046】

微生物「グルコノバクター オキシダンス」はまた、原核生物命名の国際コードにより定義される、同じ物理化学的性質を有するそのような種の異名物またはバソニムを包含する。

30

【0047】

G. oxydans DSM No. 4025 (FERM BP-3812)の性質は、以下のとおりである：

- a) ソルボースから2-KGAを産生、
- b) エタノールは酢酸に酸化される、
- c) D-グルコースはD-グルコン酸と2-ケト-D-グルコン酸に酸化される、
- d) ポリアルコールのケトン体生成能、
- e) pH4および5のマンニトール培養液(24時間培養)中で外皮および環生長、およびpH4.5のグルコース培養液中で外皮生長、
- f) グリセリンは実質的にはジヒドロキシアセトンに酸化されない、
- g) ソルビトールおよびグルカル酸から2-ケト-D-グルカル酸を産生、ただし、グルコース、フルクトース、グルコン酸、マンニトールまたは2-ケト-D-グルコン酸からは非産生、
- h) 多形、外見上、鞭毛なし、
- i) 褐色色素がフルクトースから産生される、
- j) バチルス メガテリウム (Bacillus megaterium) またはその細胞抽出物の存在下に共培養すると、良好に生長、
- k) ストレプトマイシン感受性。

40

50

【 0 0 4 8 】

この微生物は、適切な栄養を補充した水性培地中、好気性条件下で培養しうる。培養は、約 pH 4 . 0 ~ 約 9 . 0、好ましくは約 6 . 0 ~ 約 8 . 0 で行いうる。培養期間は、用いられる pH、温度および栄養培地に応じて変化し、好ましくは約 1 ~ 5 日である。培養を行うのに好ましい温度範囲は、約 1 3 ~ 約 3 6、より好ましくは 1 8 ~ 3 3 である。約 5 0 までの温度が、同様に、その微生物の培養に好適でありうる。

【 0 0 4 9 】

培養培地は、同化できる炭素源、例えば、グリセリン、D - マンニトール、D - ソルビトール、エリスリトール、リビトール、キシリトール、アラビトール、イノシトール、ズルシトール、D - リボース、D - フルクトース、D - グルコースおよびスクロース、好ましくは D - ソルビトール、D - マンニトールおよびグリセリン；および有機物質のような消化できる窒素源、例えば、ペプトン、酵母エキス、パン酵母、尿素、アミノ酸、コーンステイープリカーのような栄養物を含有することが、通常必要とされる。種々の無機物、例えば、硝酸塩およびアンモニウム塩もまた窒素源として用いることができる。さらに、培養培地は、通常、無機塩、例えば、硫酸マグネシウム、リン酸カリウムおよび炭酸カルシウムを含有する。

10

【 0 0 5 0 】

培養後の微生物からの S N D H I I の単離および精製の実施態様を、以下に簡単に記載する。

(1) 細胞を液体培養液から遠心分離または濾過により採取する。

20

(2) 採取した細胞を水、生理食塩水または適切な pH の緩衝溶液で洗浄する。

(3) 洗浄した細胞を緩衝溶液に懸濁し、ホモジナイザー、ソニケーター、またはフレンチプレスにより、あるいはリゾチームなどでの処理により破碎して、破碎した細胞の溶液を得る。

(4) 破碎細胞の無細胞抽出物から、好ましくは微生物の可溶性画分から、S N D H I I を単離して精製する。

【 0 0 5 1 】

無細胞抽出物は、遠心分離を含むがそれに限定されない任意の従来法により、破碎細胞から得ることができる。

【 0 0 5 2 】

30

本発明により提供される S N D H I I は、L - ソルボソンからのビタミン C および / または 2 - K G A の製造のための触媒として有用である。反応は、ビタミン C および 2 - K G A の製造に対して約 5 . 5 ~ 約 9 . 0 の pH で、電子受容体（例えば、D C I P、P M S など）の存在下、リン酸緩衝液、トリス緩衝液などのような溶媒中で行うことができる。ビタミン C の製造に対しては、pH が約 6 . 5 ~ 約 8 . 0 そして温度が約 2 0 ~ 約 4 0 に設定される場合、通常、最良の結果が達成される。2 - K G A の製造に対しては、pH が約 9 . 0 そして温度が約 2 0 ~ 約 3 0 に設定される場合、通常、最良の結果が達成される。

【 0 0 5 3 】

反応混合物中の L - ソルボソンの濃度は、他の反応条件に応じて変化しうるが、一般に、約 0 . 5 ~ 約 5 0 g / l、最も好ましくは約 1 ~ 約 3 0 g / l である。

40

【 0 0 5 4 】

この反応で、S N D H I I はまた、適切な担体に、固定状態で用いることもできる。当該分野で一般に公知の酵素を固定する任意の手段のいずれを用いてよい。例えば、酵素を、1 以上の官能基を有する樹脂の膜、または粒状物などに直接結合させるか、または 1 以上の官能基を有する架橋性化合物、例えばグルタルアルデヒドを介して樹脂に結合させてもよい。

【 0 0 5 5 】

上記に加えて、培養細胞はまた、それらの対応するアルドースからのカルボン酸および / またはそのラクTONの製造、特に、L - ソルボソンからの 2 - K G A および / またはビ

50

タミンCの製造に有用である。それらの対応するアルドースからの他のカルボン酸および/またはそのラク톤の製造は、上記のL-ソルボソンの2-KGAおよび/またはピタミンCへの変換と、基質濃度を含めて、同じ条件下に行われる。

【0056】

以下の実施例は本発明をさらに例示する。

【0057】

実施例1

SNDH IIの調製

すべての操作は8で行い、他に明記しない限り、緩衝液は0.05Mリン酸カリウム(pH7.0)であった。

(1)グルコノバクター オキシダンス DSM No. 4025 (FERM BP-3812)の培養

グルコノバクター オキシダンス DSM No. 4025 (FERM BP-3812)を、5.0% D-マンニトール、0.25% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、1.75% コーンステープリカー、5.0% パン酵母、0.5% 尿素、0.5% $CaCO_3$ および2.0% 寒天を含有する寒天プレート上で27、4日間育成させた。一白金耳の細胞を、2% L-ソルボース、0.2% 酵母エキス、0.05% グリセリン、0.25% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、1.75% コーンステープリカー、0.5% 尿素および1.5% $CaCO_3$ を含有する、500mlの三角フラスコ中の50mlの種母培養培地に接種し、30で180rpmで1日、回転振盪器で培養した。このようにして調製した種母培養物を2Lの培地に接種するために用いたが、この培地は3Lのジャーファーマンター中で、8.0% L-ソルボース、0.05% グリセリン、0.25% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、3.0% コーンステープリカー、0.4% 酵母エキスおよび0.15% 消泡剤を含んでいた。発酵パラメーターは、攪拌速度800rpmおよび30の温度で通気量0.5vvm(空気の容量/培地の容量/分)であった。pHは、発酵の間、水酸化ナトリウムで7.0に維持した。3セットのファーマンターを用いることにより、培養48時間後、グルコノバクター オキシダンス DSM No. 4025 株 (FERM BP-3812)の細胞を含む培養液6Lを、連続遠心分離により採取した。細胞を含むペレットを回収し、適当量の食塩水に懸濁した。懸濁液を2,500rpm(1,000×g)で遠心分離した後、わずかに赤味があった細胞を含む上清を回収して、培地の成分であったコーンステープリカーおよび酵母エキス由来の不溶物質を除去した。次いで、上清を8,000rpm(10,000×g)で遠心分離して細胞ペレットを得た。その結果、湿潤重量38.4gのグルコノバクター オキシダンス DSM No. 4025 (FERM BP-3812)の細胞を6Lの培養液から得た。

【0058】

(2)細胞質ゾル画分の調製

細胞ペーストの一部(19.2g)を100mlの緩衝液で懸濁し、フレンチ加圧細胞プレスを通した。損傷していない菌体を除去するために遠心分離した後、上清を無細胞抽出物とし、この無細胞抽出物を100,000×gで60分間遠心分離した。得られた上清(112ml)をグルコノバクター オキシダンス DSM No. 4025 (FERM BP-3812)の可溶性画分とした。この画分を緩衝液に対して透析した後、L-ソルボソンからのピタミンC製造に対する比活性が0.172単位/mgタンパク質である透析画分112mlを次の精製工程に用いた。

【0059】

(3)ジエチルアミノエチル(DEAE)-セルロースカラムクロマトグラフィー

透析物(112ml)を、緩衝液で平衡化したDEAE-セルロースのカラム(Whatman DE-52, 3×50cm; Whatman BioSystems Ltd., Springfield Mill, James Whatman Way, Maidstone, Kent, U.K.)にのせ、緩衝液で洗浄して副次的なタンパク質を溶出させた。次いで、緩衝液中0.28~0.58MのNaClによる直線勾配溶出を行った。主たる酵素活性は、0.36MのNaClで溶出した。活性画分(97.5ml)を集めた。

【 0 0 6 0 】

(4) D E A E - セファロースカラムクロマトグラフィー

前の工程からの透析活性画分の一部 (9 7 ml) を、緩衝液で平衡化した D E A E - セファロース C L - 6 B のカラム (Pharmacia、3 . 0 × 2 5 cm) にのせた。0 . 3 M の N a C l を含む緩衝液でカラムを洗浄した後、0 . 3 ~ 0 . 4 5 M の N a C l の直線勾配を緩衝液に加えた。活性画分は、0 . 4 4 ~ 0 . 4 7 M の範囲の N a C l 濃度で溶出した。活性画分 (4 0 ml) を集め、緩衝液に対して透析した。

【 0 0 6 1 】

(5) Q - セファロースカラムクロマトグラフィー (第一段階)

透析した活性画分 (4 0 ml) を、緩衝液で平衡化した Q - セファロース (Pharmacia、1 . 5 × 2 5 cm) のカラムにのせた。0 . 3 M の N a C l を含む緩衝液でカラムを洗浄した後、0 . 3 ~ 0 . 5 M の N a C l の直線勾配を緩衝液に加えた。活性画分は、0 . 4 4 ~ 0 . 4 6 M の範囲の N a C l 濃度で溶出した。

10

【 0 0 6 2 】

(6) Q - セファロースカラムクロマトグラフィー (第二段階)

前工程からのプールした活性画分 (1 7 ml) を緩衝液に対して透析した。透析試料 (1 7 ml) を、緩衝液で平衡化した Q - セファロースのカラム (Pharmacia、1 . 5 × 2 5 cm) にのせた。このカラムを 0 . 3 3 M の N a C l を含む緩衝液で洗浄した後、0 . 3 3 ~ 0 . 4 8 M の N a C l の直線勾配を緩衝液に加えた。活性画分は、0 . 4 5 ~ 0 . 4 8 M の範囲の N a C l 濃度で溶出した。

20

【 0 0 6 3 】

(7) 疎水性カラムクロマトグラフィー

前工程からの活性画分を、限外濾過装置 (Centriprep-10) で濾過して、脱塩および濃縮した。脱塩および濃縮試料 (7 8 0 μ l) の一部 (7 5 0 μ l) を、3 M 硫酸アンモニウム (最終濃度 : 1 . 5 M) を含む等量 (7 5 0 μ l) の緩衝液に加えた。試料を遠心分離 (1 5 , 0 0 0 × g) した後、上清を、1 . 5 M 硫酸アンモニウムを含む緩衝液で平衡化した疎水性カラム R E S O U R C E I S O (Pharmacia、ベッド容量 : 1 . 0 ml) にのせた。カラムを、1 . 5 M 硫酸アンモニウムを含む緩衝液で洗浄した後、タンパク質を、1 . 5 ~ 0 . 7 5 M の硫酸アンモニウムの直線勾配を含む緩衝液で溶出した。S N D H I I に相当する活性は、1 . 0 4 ~ 1 . 0 0 M の範囲の硫酸アンモニウム濃度で溶出した。活性画分を、透析カップ (透析カップ M W C O 8 0 0 0、第一純薬、東京都中央区日本橋 3 - 1 3 - 5、日本) を用いて、緩衝液に対して透析した。その後、画分を集め、- 2 0 で保存した。

30

【 0 0 6 4 】

酵素の精製工程の要約を表 3 に示す。

【 0 0 6 5 】

【表 4】

表 3

グルコノバクター オキシダンス DSM No. 4025 (FERM BP-3812)
からのアルデヒド脱水素酵素の精製

工程	全活性 (単位)	全タンパク質 (mg)	比活性 (単位*/mgタンパク質)
可溶性画分	151.4	879.3	0.172
DEAE-セルロースDE52	173.0	37.73	4.584
DEAE-セファロースCL-6B	45.07	10.63	4.242
Q-セファロース (第一段階)	23.65	1.462	16.17
Q-セファロース (第二段階)	13.70	0.527	26.03
RESOURCE-ISO	4.84	0.099	48.90

10

20

【0066】

酵素の1単位*は、1a)に記載された反応混合物中に1時間あたりビタミンC 1mgを産生する酵素の量として定義した。

【0067】

(8) 単離した酵素の純度

ビタミンCに対する比活性48.9単位/mgタンパク質および2-KGAに対する比活性12.3単位/mgタンパク質の精製酵素(0.039mg/ml)を以下の分析に用いた：

30

【0068】

未変性酵素の分子量を、0.3MのNaClを含む0.1Mのリン酸カリウム緩衝液(pH7.0)で平衡化したサイズ排除ゲルカラム(TSKゲルG3000 SWXLカラム、7.8×300mm)を用いる高速液体クロマトグラフィーにより、280nmで流速1.5ml/分で測定した。シアノコバラミン(1.35kDa)、ミオグロビン(17kDa)、オボアルブミン(44kDa)、 α -グロブリン(158kDa)およびチログロブリン(670kDa)を分子量標準として用いた。精製酵素は、それぞれ分子量100,000±10,000Daと150,000±15,000Daを有する2つのピークを示した。

【0069】

40

ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)より、この酵素は分子量55,000±2,000Daのサブユニットを示した。したがって、精製酵素は2または3個の相同のサブユニットからなると推定された。

【0070】

(9) 反応生成物の同定

精製酵素(0.39μg)、L-ソルボソン(50mM)、PMS(1mM)、CaCl₂(1mM)およびPQQ(1μM)を含む反応混合液を緩衝液100μl中で、1時間、30℃でインキュベーションした。反応生成物を薄層クロマトグラフィー(シリカゲル60F²⁵⁴, MERCK, 64271 Darmstadt, ドイツ)およびHPLCで分析した。2種類の生成物、ビタミンCと2-KGAが酵素反応から得られた。ビタミンCに

50

ついては、試料を、HPLCシステムで、アミノ-カラム（YMCパック ポリアミン-I I、YMC社）によりアッセイした。2-KGAについては、試料を、HPLCシステムで、C-18カラム（YMCパック Pro C18、YMC社）によりアッセイした。

【0071】

実施例 2

SNDH I IによるL-ソルボソンからのビタミンCまたは2-KGAの製造に対するpHの影響

酵素反応に対するpHの影響を試験した。緩衝液（100mM）100μl中の精製酵素（273ng）、L-ソルボソン（50mM）、PMS（1mM）、CaCl₂（1mM）およびPQQ（1μM）を含む反応混合液を、1時間、30℃でインキュベーションした。反応生成物をHPLCで分析した。結果を表4に示す。

10

【0072】

【表5】

表4

SNDH I IによるL-ソルボソンからのビタミンCまたは2-KGAの製造に対するpHの影響

緩衝液	pH	生成ビタミンC (mg/l)	生成 2-KGA (mg/l)
クエン酸塩-NaOH	4.50	0.0	0.0
クエン酸塩-NaOH	5.50	3.8	27.7
クエン酸塩-NaOH	6.50	64.7	21.2
リン酸カリウム	6.76	7.8	生成なし
リン酸カリウム	7.15	64.4	生成なし
リン酸カリウム	7.55	76.3	1.0
リン酸カリウム	7.97	49.6	19.5
トリス-HCl	7.86	70.7	117.8
トリス-HCl	8.34	18.5	124.0
トリス-HCl	8.83	7.2	170.7

20

30

【0073】

実施例 3

SNDH I IによるL-ソルボソンからのビタミンCまたは2-KGAの製造に対する温度の影響

酵素活性に対する温度の影響を試験した。25mMリン酸カリウム緩衝液（pH7.0）100μl中の精製酵素（390ng）、L-ソルボソン（50mM）、PMS（1mM）、CaCl₂（1mM）およびPQQ（1μM）を含む反応混合液を、1時間、種々の温度（20～60℃）でインキュベーションした。反応生成物をHPLCで分析した。結果を表5に示す。

40

【0074】

【表 6】

表 5

SNDH I IによるL-ソルボソンのビタミンCまたは2-KGAの製造に対する温度の影響

温度 (°C)	生成ビタミンC (mg/l)	生成 2-KGA (mg/l)
20	187.4	50.6
25	218.8	53.5
30	190.7	48.1
35	196.4	40.3
40	176.7	37.2
50	138.0	32.8
60	47.3	4.3

10

20

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 03/03862
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N9/02 C12P7/40 C12F7/60 C12P17/04		
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) IPC 7 C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) WPI Data, EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 790 301 A (HOFFMANN LA ROCHE) 20 August 1997 (1997-08-20) the whole document	1-13
X	SAITO Y ET AL: "Direct fermentation of 2-Keto-L-gulononic acid in recombinant Gluconobacter oxydans" BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING. INCLUDING: SYMPOSIUM BIOTECHNOLOGY IN ENERGY PRODUCTION AND CONSERVATION, JOHN WILEY & SONS, NEW YORK, US, vol. 58, no. 2-3, 20 April 1998 (1998-04-20), pages 309-315, XP002204789 ISSN: 0006-3592 the whole document	1,2,5-7, 10-13
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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 document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 12 August 2003		Date of mailing of the international search report 22/08/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Bilang, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 03/03862

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 606 621 A (HOFFMANN LA ROCHE) 20 July 1994 (1994-07-20) the whole document ----	1-13
A	EP 0 922 759 A (HOFFMANN LA ROCHE) 16 June 1999 (1999-06-16) the whole document -----	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/EP 03/03862

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
EP 0790301	A	20-08-1997	EP	0790301 A2		20-08-1997
			AT	231183 T		15-02-2003
			CN	1171441 A ,8		28-01-1998
			DE	69718360 D1		20-02-2003
			DK	790301 T3		05-05-2003
			ES	2188808 T3		01-07-2003
			JP	9224660 A		02-09-1997
			US	5776742 A		07-07-1998
EP 0606621	A	20-07-1994	EP	0606621 A2		20-07-1994
			AT	224949 T		15-10-2002
			DE	69332331 D1		31-10-2002
			DE	69332331 T2		22-05-2003
			DK	606621 T3		06-01-2003
			ES	2181681 T3		01-03-2003
			JP	7000182 A		06-01-1995
			US	5437989 A		01-08-1995
			US	5932463 A		03-08-1999
			US	5916785 A		29-06-1999
EP 0922759	A	16-06-1999	EP	0922759 A2		16-06-1999
			BR	9805685 A		11-04-2000
			CN	1225390 A		11-08-1999
			JP	11225754 A		24-08-1999
			US	6242233 B1		05-06-2001
			US	2001026933 A1		04-10-2001

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA, GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ, EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,M W,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 杉澤 輝秀

スイス国、ツェーハー - 4 1 2 5 ライヒェン、インツリンゲルシュトラッセ 8 0

Fターム(参考) 4B050 CC01 DD02 FF05E FF09E FF11E FF12E LL05

4B064 AE45 AF17 CA21 CB13 CD09 DA01 DA10