(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
2006 年4 月13 日 (13.04.2006)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2006/038520 A1

(51) 国際特許分類:
C12P 13/04 (2006.01) *C12R 1/19* (2006.01)
C12P 13/22 (2006.01) *C12R 1/01* (2006.01)
C12R 1/185 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2005/017962

(22) 国際出願日: 2005 年9 月29 日 (29.09.2005)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2004-292987 2004 年10 月5 日 (05.10.2004) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 味の素株式会社 (AJINOMOTO CO., INC.) [JP/JP]; 〒1048315 東京都中央区京橋一丁目１５番１号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 杉山 雅一 (SUGIYAMA, Masakazu) [JP/JP]; 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町１－１ 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). 渡部 乙比古 (WATANABE, Kunihiko) [JP/JP]; 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町１－１ 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). 竹本 正 (TAKEMOTO, Tadashi) [JP/JP]; 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町１－１ 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). 森 健一 (MORI, Kenichi) [JP/JP]; 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町１－１ 味の素株式会社内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 酒井 宏明 (SAKAI, Hiroaki); 〒1006019 東京都千代田区霞が関三丁目２番５号 霞が関ビルディング 酒井国際特許事務所 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, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

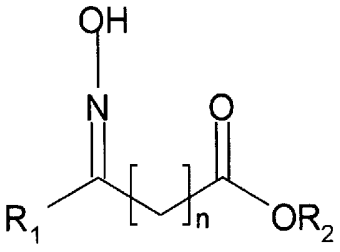
(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

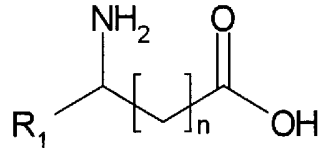
[続葉有]

(54) **Title:** PROCESS FOR PRODUCING AMINO ACID DERIVATIVE FROM HYDROXYIMINO ACID

(54) 発明の名称: ヒドロキシイミノ酸からのアミノ酸誘導体製造方法



(I)



(III)

(57) **Abstract:** An industrially advantageous process for producing an amino acid derivative. The process, which is for producing an amino acid derivative represented by the following general formula (III): (III) (wherein R_1 represents a given, optionally substituted, hydrocarbon group; and n is 0 or 1), is characterized by conducting a reaction in which the amino acid derivative is yielded from a hydroxyimino acid represented by the following general formula (I): (I) (wherein R_1 and n have the same meanings as in the general formula (III); and R_2 represents C_{1-3} alkyl or hydrogen), in the presence of a microorganism and/or enzyme which catalyzes the reaction.

[続葉有]

WO 2006/038520 A1

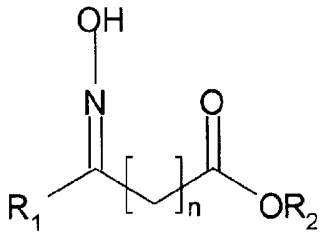
２文字コード及び他の略語については、定期発行される
各*PCT*ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約:

本発明は、工業的に有利なアミノ酸誘導体の製造方法を提供することを課題とする。

すなわち、本発明は、下記一般式(I)

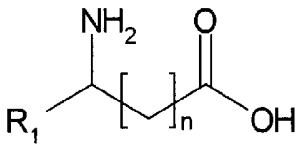
【化1】



・・・(I)

(一般式(I)において、R_1はそれぞれ置換基を有していてもよい所定の炭化水素基、
R_2は炭素数1～3のアルキル基または水素原子を表し、nは0または1である。)
で示されるヒドロキシイミノ酸から、
下記一般式(III)

【化2】



・・・(III)

(一般式(III)において、R_1およびnは、一般式(I)におけるR_1、nと同義である。)で示されるアミノ酸誘導体を生成する反応を触媒する微生物および／または酵素の存在下で、当該反応を実施することにより、前記一般式(III)のアミノ酸誘導体を生成することを特徴とするアミノ酸誘導体の製造方法を提供するものである。

明 細 書

ヒドロキシイミノ酸からのアミノ酸誘導体製造方法

技術分野

[0001] 本発明はヒドロキシイミノ酸からアミノ酸誘導体を製造する方法に関し、詳しくは、ヒドロキシイミノ酸から酵素的還元によりアミノ酸誘導体を製造する方法に関する。

背景技術

[0002] アミノ酸は医薬品、食品、試薬類、化学合成中間体等として、産業上極めて重要な成分である。アミノ酸の製造方法としては、抽出法、発酵法、酵素法、化学合成法の4つに大別される。このうち酵素法は、目的とするアミノ酸に構造の近い前駆体を原料として1～数段階の酵素反応で一気にアミノ酸に転換させる方法である。酵素法は、一般的に副生物が少なく、高純度のアミノ酸を得ることができる。また、酵素法は、基質となる前駆物質が安価に入手できる場合には極めて効率的な製造法である。

[0003] アミノ酸誘導体の1種であるモナティン(Monatin)は、南アフリカの灌木の根から単離・抽出された天然の甘味アミノ酸である。モナティンは、ショ糖の数十倍から数千倍に相当する強い甘味を有し、甘味剤として利用が期待されている。

[0004] モナティンの製造方法に関し化学合成法としては、例えば、インドール酢酸誘導体とアスパラギン酸の酸ハロゲン化物を原材料としてケトン誘導体を合成し、さらにシアノヒドリン誘導体を得て、これを塩基性条件下で加水分解する方法がある(例えば特許文献1)。また酵素法としては、例えば、インドール－3－ピルビン酸(IPA)から中間体として4－(インドール－3－イルメチル)－4－ヒドロキシ－2－オキソグルタル酸(4－(Indol－3－ylmethyl)－4－hydroxy－2－oxoglutarate;IHOGともいう)を生成し、さらに酵素存在下でモナティンを生成する方法がある(例えば特許文献2)。さらに、上記IHOGを酵素の存在下で生成する方法も知られている(例えば特許文献3)。

[0005] IHOGからモナティンを生成する他の方法として、例えば、IHOGから中間体としてIHOG－オキシム(IHOG－oximeまたは4－ヒドロキシ－4－(3－インドリルメチル)－2－ヒドロキシイミノグルタル酸)を生成し、さらにロジウムなどの還元触媒の存在下

でモナティンに変換する方法がある(例えば特許文献4)。しかし、IHOGより安定性の高いIHOG－オキシムから、微生物または酵素の存在下でモナティンを生成する方法については知られていない。

[0006] オキシム(ヒドロキシイミン)を微生物または酵素を用いて還元すること(酵素的還元)については、特許文献5、非特許文献1～4などに記載がある。例えば、特許文献5には、アセトフェノンオキシムからα－メチルベンジルアミンを製造する方法が記載されている。しかし、ヒドロキシイミノ酸を微生物または酵素の存在下で還元し、アミノ酸を生成する方法については全く知られていない。

[0007] 特許文献1:特開2003－171365号公報

特許文献2:国際公開第2003／056026号パンフレット

特許文献3:国際公開第2004／018672号パンフレット

特許文献4:国際公開第2003／059865号パンフレット

特許文献5:特開平4－23499号公報

非特許文献1:Pharmacology, 13, 234(1975)

非特許文献2:Clement et al., Arch. der Parmazie, 321, 955(1988)

非特許文献3:Clement et al., JBC, 272, 19615(1997)

非特許文献4:Gibbs et al., Tetrahedron Lett., 31, 555(1990)

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0008] 化学合成によるアミノ酸誘導体の製造方法は、単離・抽出が困難なアミノ酸誘導体である場合などに有用であるが、反面、設備費が高くなりやすいことや高価な触媒を用いなければならないなど、工業的生産レベルではコスト面で不利な場合も多い。これに対して、アミノ酸誘導体の製造にあっては微生物または酵素を用いた方法は工業的に有用な場合が多い。上記のような状況の下、本発明は、工業的に有利なアミノ酸誘導体の製造方法を提供することを課題とする。

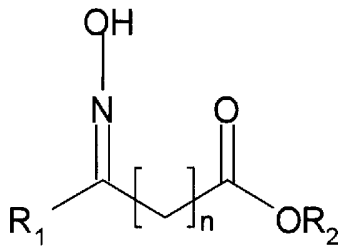
課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らは、モナティン等のアミノ酸誘導体の新たな製法について鋭意研究を進めたところ、ヒドロキシイミノ酸を微生物および／または酵素を用いて還元し、アミノ

酸誘導体を生成する方法を見出し、本発明を完成させた。すなわち、本発明は、下記アミノ酸誘導体の製造方法を提供するものである。

[0010] 〔1〕下記一般式(I)

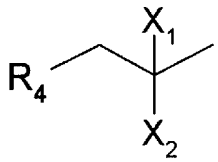
[化1]



・・・(I)

(一般式(I)において、R_1はそれぞれ置換基を有していてもよい炭素数2～6のアルキル基、炭素数6～14のアリール基、炭素数6～10のシクロアルキル基、炭素数7～19のアラルキル基、炭素数2～10のアルコキシアルキル基、またはこれらの炭素骨格中にヘテロ原子を含む基、および下記一般式(II)

[化2]



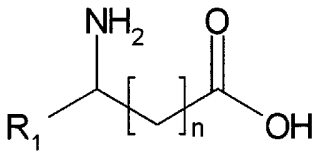
・・・(II)

で示される置換基R_3から選択される置換基を表す。ここに、R_4はそれぞれ置換基を有していてもよい炭素数2～6のアルキル基、炭素数6～14のアリール基、炭素数6～10のシクロアルキル基、炭素数7～19のアラルキル基、炭素数2～10のアルコキシアルキル基、またはこれらの炭素骨格中にヘテロ原子を含む基から選択される置換基を表す。X_1およびX_2は相互に独立して水酸基またはカルボニル基を表す。R_2は炭素数1～3のアルキル基または水素原子を表す。nは0または1である。)

で示されるヒドロキシイミノ酸から、

下記一般式(III)

[化3]



・・・(III)

(一般式(III)において、R_1およびnは、一般式(I)におけるR_1、nと同義である。)

で示されるアミノ酸誘導体を生成する反応を触媒する微生物および／または酵素の存在下で、当該反応を実施することにより、前記一般式(III)のアミノ酸誘導体を生成することを特徴とするアミノ酸誘導体の製造方法。

〔2〕前記nが0であり、生成するアミノ酸誘導体がα－アミノ酸誘導体である上記〔1〕に記載の製造方法。

〔3〕生成するアミノ酸誘導体が、α－L－アミノ酸である上記〔1〕または〔2〕に記載の製造方法。

〔4〕生成するアミノ酸誘導体が、α－D－アミノ酸である上記〔1〕または〔2〕に記載の製造方法。

〔5〕前記nが1であり、生成するアミノ酸誘導体がβ－アミノ酸誘導体である上記〔1〕に記載の製造方法。

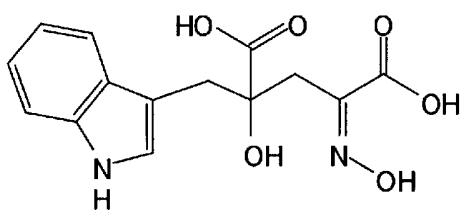
〔6〕前記アリール基が、置換基を有していてもよいフェニル基またはナフチル基である、上記〔1〕から〔5〕のいずれか一項に記載の製造方法。

〔7〕前記アラルキル基が、置換基を有していてもよいフェニルアルキル基またはナフチルアルキル基である、上記〔1〕から〔5〕のいずれか一項に記載の製造方法。

〔8〕前記炭素骨格にヘテロ原子を含む基が、置換基を有していてもよいピリジル基またはインドイル基である、上記〔1〕から〔5〕のいずれか一項に記載の製造方法。

〔9〕下記一般式(IV)

[化4]

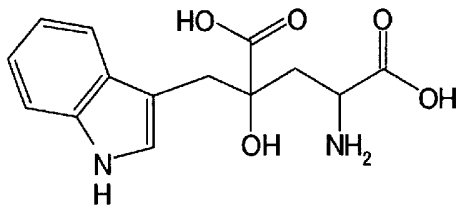


・・・(IV)

で示されるIHOG－オキシムから、

下記一般式(V)

[化5]

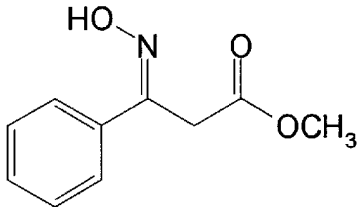


・・・(V)

で示されるモナティンを生成する反応を触媒する微生物および／または酵素の存在下で、当該反応を実施することによりモナティンを生成することを特徴とする、モナティンの製造方法。

〔10〕下記一般式(VI)

[化6]

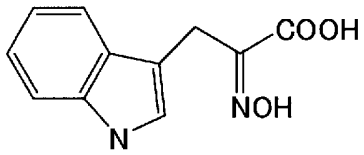


・・・(VI)

で示されるBAE－オキシムからβ－フェニルアラニンを生成する反応を触媒する微生物および／または酵素の存在下で、当該反応を実施することによりβ－フェニルアラニンを生成することを特徴とする、β－フェニルアラニンの製造方法。

〔11〕下記一般式(VII)

[化7]



・・・(VII)

で示されるインドール－3－ピルビン酸－オキシムからトリプトファンを生成する反応を触媒する微生物および／または酵素の存在下で、当該反応を実施することによりトリプトファンを生成することを特徴とする、トリプトファンの製造方法。

〔12〕微生物が、シトロバクター(Citrobacter)属、エシェリヒア(Escherichia)属、およびロドコッカス(Rhodococcus)属からなる群より選ばれるいずれかの属に属ずる

細菌の1種または2種以上であることを特徴とする、上記〔1〕から〔11〕のいずれか一項に記載の製造方法。

〔13〕微生物が、Citrobacter freundii(シトロバクター フルーンジ)、Escherichia intermedia(エシェリヒア インターメディア)、Escherichia coli(エシェリヒア コリ)、およびRhodococcus marinonascens(ロドコッカス マリノナシーンズ)からなる群から選ばれることを特徴とする、上記〔1〕から〔12〕のいずれか一項に記載の製造方法。

〔14〕一般式(I)で示される化合物から一般式(III)で示される化合物を生成する反応を行う反応液中に、NADH、NADPH、ピリドキサール－5'－リン酸、および$MgCl_2$からなる群から選ばれる化合物のうち、少なくとも一つを添加することを特徴とする上記〔1〕から〔13〕のいずれか一項に記載の製造方法。

発明の効果

[0011] 本発明によれば、簡便で、コスト的にも有利なアミノ酸の製造方法が提供される。

発明を実施するための最良の形態

[0012] 本発明のアミノ酸誘導体の製造方法は、所定の微生物および／または酵素の触媒作用により上記一般式(I)のヒドロキシイミノ酸を上記一般式(III)の化合物に変換する。本明細書においてアミノ酸誘導体には、アミノ酸そのものおよびその誘導体を含む。

[0013] 本発明で用いられるこの反応を触媒する能力を有する微生物としては、好ましくは、シトロバクター(Citrobacter)属、エシェリヒア(Escherichia)属、コリネバクテリウム(Corynebacterium)属、ロドコッカス(Rhodococcus)属、サルモネラ(Salmonella)属、およびアーウィニア(Erwinia)属からなる群より選ばれるいずれかの属に属する細菌などが挙げられる。より具体的には好ましい微生物として、Citrobacter freundii(シトロバクター フルーンジ)、Citrobacter intermedius(シトロバクター インターメディアス)、Escherichia intermedia(エシェリヒア インターメディア)、Escherichia coli(エシェリヒア コリ)、Corynebacterium equi(コリネバクテリウム エクイ)、Rhodococcus marinonascens(ロドコッカス マリノナシーンズ)、Salmonella sp.(サルモネラ エスピー.)、Erwinia amylovora(アーウィニア アミロボラ)

、およびSalmonella enteritidis(サルモネラ エンテリチヂス)などが挙げられる。

[0014] さらに具体的には、好ましい微生物として次の菌株が例示される。下記に菌株名およびその寄託先等について示す。

[0015] (1)Citrobacter freundii IFO 13546

(i)受託番号:IFO 13546

(iii)寄託先(住所):独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジー本部生物遺伝資源部門(〒292−0818 日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2−5−8)

[0016] (2)Escherichia intermedia AJ 2607

(i)受託番号:FERM BP−10401(FERM P−20215より移管)

(ii)原寄託日:2004年9月8日

(iii)寄託先(住所):独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター(〒305−8566 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6)

[0017] (3)Escherichia coli ATCC 13070

(i)受託番号:ATCC 13070

(iii)寄託先(住所):アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(American Type Culture Collection, P. O. Box 1549 Manassas, VA 20110, USA)

[0018] (4)Escherichia coli ATCC 12814

(i)受託番号:ATCC 12814

(iii)寄託先(住所):アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(P. O. Box 1549 Manassas, VA 20110, USA)

[0019] (5)Rhodococcus marinonascens AJ110354

(i)受託番号:FERM BP−10400(FERM P−20213より移管)

(ii)原寄託日:2004年9月8日

(iii)寄託先(住所):独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター(〒305−8566 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6)

[0020] 本発明で用いられる酵素は、上記微生物などから単離・精製することができる。また、「微生物および/または酵素の存在下で」とは、一般式(I)で示されるヒドロキシイミノ酸を一般式(III)で示されるアミノ酸誘導体に変換する反応系に微生物および/ま

たは酵素を存在させることを意味する。「微生物および／または酵素」は、本発明の所望の活性を有する限り、その由来及び調製方法等に特に制限はない。微生物としては、前述した本発明の反応を媒介する微生物に加え、反応を媒介する酵素をコードする遺伝子（組み換え遺伝子を含む）により形質転換された宿主微生物、あるいは該宿主微生物が生産する酵素を使用することもできる。すなわち、一般式（I）で示されるヒドロキシイミノ酸を一般式（III）で示されるアミノ酸誘導体に変換する限りいかなる形態で微生物および／または酵素を反応系に存在させてもよい。また、微生物および酵素はいずれか一方を単独で用いてもよいし、双方が混在してもよい。

[0021] 本発明の製法で用いられる「微生物および／または酵素」としては次のような形態をとり得る。具体的形態としては、上記微生物の培養物、当該培養物から分離された微生物菌体、菌体処理物などが含まれる。微生物の培養物とは、微生物を培養して得られる物のことであり、より具体的には、微生物菌体、その微生物の培養に用いた培地および培養された微生物により生成された物質の混合物などのことをいう。また、微生物菌体は洗浄し、洗浄菌体として用いてもよい。また、菌体処理物には、菌体を破砕、溶菌、凍結乾燥したものなどが含まれ、さらに菌体などを処理して回収される粗精製酵素、さらに精製した精製酵素なども含まれる。精製処理された酵素としては、各種精製法によって得られる部分精製酵素等を使用してもよいし、これらを共有結合法、吸着法、包括法等によって固定化した固定化酵素を使用してもよい。また、使用する微生物によっては、培養中に一部、溶菌するものもあるので、この場合には培養液上清も上述の「微生物および／または酵素」として利用できる。

[0022] また、本発明の製法で用いられる「微生物および／または酵素」としては、上記一般式（I）で示されるヒドロキシイミノ酸を一般式（III）で示されるアミノ酸誘導体に変換する酵素を発現した遺伝子組換え株を用いてもよいし、アセトン処理菌体、凍結乾燥菌体等の菌体処理物を使用してもよいし、これらを共有結合法、吸着法、包括法等によって固定化した固定化菌体、固定化菌体処理物を使用してもよい。

[0023] 本発明の製造方法では、一般式（I）で示されるヒドロキシイミノ酸を出発物質とする反応を行う。一般式（I）におけるR_1はより具体的には下記のものが例示される。

[0024] R_1が炭素数が2～6のアルキル基である場合とは、具体例を示すと、エチル基、nプ

ロピル基、イソプロピル基、nブチル基、イソブチル基、secブチル基、tertブチル基、nペンチル基、イソペンチル基、ネオペンチル基、nヘキシル基、イソヘキシル基などが含まれる。

[0025] また、R_1が炭素数6～14のアリール基である場合とは、具体例を示すと、フェニル基、トリル基、キシリル基、ビフェニリル基、ナフチル基、アントリル基、フェナントリル基などが含まれ、好適なものとしてはフェニル基、ナフチル基などが挙げられる。

[0026] R_1が炭素数6～10のシクロアルキル基である場合とは、具体例を示すと、シクロヘキシル基、シクロヘプタニル基、シクロオクタニル基、シクロノナニル基、シクロデカニル基などが含まれる。

[0027] R_1が炭素数が7～19のアラルキル基である場合とは、具体例を示すと、ベンジル基、ベンズヒドリル基、フェネチル基、トリチル基などのフェニルアルキル基、シンナミル基、スチリル基、並びにナフチルアルキル基などが含まれ、好適なものとしてはフェニルアルキル基、ナフチルアルキル基などが挙げられる。

[0028] R_1が炭素数2～11のアルコキシアルキル基である場合とは、具体例を示すと、炭素数1～10のアルキル基に、メトキシ基、エトキシ基、プロポキシ基、イソプロポキシ基、ブトキシ基、ペンチルオキシ基、フェノキシ基、ヘプトキシ基、オクトキシ基、ノナノキシ基、デカノキシ基、およびウンデコキシ基から選ばれる基が置換されたものを含む。

[0029] R_1が炭素骨格中にヘテロ原子を含む基の一形態には、複素環含有炭素水素基が含まれる。複素環含有炭化水素基とは、環式化合物の環にヘテロ原子を含む環系炭化水素基である。複素環含有炭化水素基としてはヘテロアリール基などが含まれ、芳香族性の有無には限定されず、また単環式であっても多環式であってもよい。複素環含有炭化水素基として具体的には、フリル基、チエニル基、ピリジル基、ピペリジル基、ピペリジノ基、モルホリノ基、インドリル基、さらには、これらの複素環基により置換されたアルキル基等が含まれ、好適なものとしてはピリジル基、インドイル基などが挙げられる。

[0030] 上記R_1は、さらに、ハロゲン原子、水酸基、炭素数3までのアルキル基、炭素数3までのアルコキシル基、およびアミノ基から選ばれる少なくとも一種の置換基などにより置換されていてもよい。

[0031] R_2は、炭素数1～3のアルキル基または水素原子を表し、炭素数1～3のアルキル基にはエチル基、メチル基、nプロピル基、イソプロピル基が含まれる。

[0032] R_4のアルキル基、アリール基、シクロアルキル基、アラルキル基、アルコキシアルキル基、これらの炭素骨格中にヘテロ原子を含む基、およびさらにこれらが有していてもよい置換基は上記R_1の場合と同様である。

[0033] 一般式(I)で示される化合物は、ヒドロキシイミノ基に対応するCO基をCNOH基に変換する各種のオキシム化反応等によって得られる。より具体的には、例えば、国際公開第2003／056026号パンフレット、国際公開第2004／018672号パンフレット、国際公開第2003／059865号パンフレットなどに記載の方法によって得ることができる。

[0034] オキシム化(ヒドロキシイミノ化)の方法としては、中性又はアルカリ性条件下において、対応するケト体に対して、下記一般式(VIII)

[0035] [化8]

$$H_2N-OR_5 \quad \cdots (VIII)$$

[0036] (上記一般式(VIII)において、R_5は水素原子、アルキル基、アリール基又はアラルキル基を表す。)

に表されるアミン化合物又はその塩とを反応せしめることによって行う。ここに、R_5がアルキル基、アリール基又はアラルキル基である場合、R_5は炭素原子を1－3有するアルキル基、アリール基またはアラルキル基が好ましく、結晶化の観点からより好ましくは、R_5はメチル、ベンジル基から選択される。

[0037] より簡便には、一般式(VIII)においてR_5が水素原子であるヒドロキシアミンを用いてオキシム化反応を行うことができる。一例を挙げると、ヒドロキシルアミン塩酸塩を中性から弱アルカリ条件下でケト体を含む溶液に添加し、室温から10℃程度の条件で0.5～60時間攪拌することにより、オキシム化することができる。オキシム化反応のpHは好ましくは6～10、より好ましくはpH7～9で行うことができる。ケト体のオキシム化反応の条件には特段の制限は無く、当該業者であれば簡単な予備検討によって、オキシム化反応条件を決定することができる。

[0038] 本発明の製造方法においては、上記一般式(I)で示される化合物が変換されて上

記一般式(III)で示される化合物を得る。R_1等およびnの定義は一般式(III)についても上記一般式(I)と同様である。

[0039] 一般式(I)において、nが0である場合には一般式(III)の化合物としてα－アミノ酸誘導体が得られる。また、nが1である場合には、β－アミノ酸誘導体が得られる。また、一般式(I)の化合物についてL体またはD体を選択すること等の手法により、一般式(III)の化合物についてもL体またはD体を生成し得る。またL体およびD体の混合物として得られる場合には、混合物からいずれか一方を単離・精製してもよい。

[0040] 微生物および／または酵素を用いる反応系の条件は、用いる微生物、酵素および原材料の具体的な種類などによって適宜調整してよい。微生物および／または酵素の使用量は、目的とする効果を発揮する量(有効量)であればよく、この有効量は当業者であれば簡単な予備実験により容易に求められるが、例えば酵素を用いる場合には、0．01から100ユニット(U)程度、洗浄菌体を用いる場合は0．1～500g／L程度が好適である。反応温度については、通常、利用する酵素が活性を有する範囲内、即ち好ましくは10～50℃で行われるが、より好ましくは20～40℃、更に好ましくは25～37℃の範囲で行われる。酵素反応液のpH値については、通常、2～12、好ましくは7～11、より好ましくは8～9の範囲で調節される。

[0041] また、本発明の製造方法の好ましい一実施形態として、反応液中にNADH、NADPH、ピリドキサール－5'－リン酸(以下、PLPとも記す)、$MgCl_2$からなる群から選ばれる化合物のうち、少なくとも一つを添加することができる。これらの添加物を加えることにより、一般式(III)で示されるアミノ酸誘導体の生成量を増加させることができる。

[0042] 上記4種の添加物の組み合わせは微生物等の種類により適宜調整してよく、より好ましくは少なくともNADH、NADPHおよびPLPの3種を含む形態が挙げられ、さらに好ましくは上記の4種の添加物をすべて含む形態が挙げられる。また、反応液中における各添加物の好ましい配合量は次の通りである。NADHについては、好ましくは0.01～200mM、より好ましくは0.1～50mMである。NADPHについては、好ましくは0.01～200mM、より好ましくは0.1～50mMである。$MgCl_2$については、好ましくは0.01～10mM、より好ましくは0.1～1mMである。PLPについては、好ましくは0.01～10mM、より好ましくは0.1～1mMである。

[0043] 本発明の製造方法は、R_1が芳香環または複素環を含む基であるアミノ酸誘導体の製造に好適であり、より好ましくはモナティン、トリプトファン、フェニルアラニンなどの製造に適用される。モナティンの製造の場合、一般式(I)で示される化合物は、IHOG－オキシムである。トリプトファンの製造の場合、一般式(I)で示される化合物は、IPA－オキシム(インドール－3－ピルビン酸－オキシム)である。また、フェニルアラニンの製造の場合、一般式(I)で示される化合物は、BAE－オキシム(3－ヒドロキシイミノ－3－フェニルプロピオン酸メチルエステル、3－hydroxyimino－3－phenyl－propionic acid methyl ester)である。なお、BAEは、ベンゾイルアセタートエチルエステル(benzoyl acetate ethyl ester)の略称である。

実施例

[0044] 以下、本発明の実施例について説明するが、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

本実施例において、モナティンの定量は、ジーエルサイエンス社製「Inertsil ODS－80A」(5μm、6×150mm)を利用した高速液体クロマトグラフィーにより行った。分析条件は、以下に示す通りである。

[0045] 移動相:12%(v／v)アセトニトリル／0.05%(v／v)トリフルオロ酢酸水溶液;

流速:1.5ml／min;

カラム温度:30℃;および

検出:UV210nm

[0046] 本分析条件により、(2S, 4S)－モナティンおよび(2R, 4R)－モナティンは12.1分に、(2S, 4R)－モナティンおよび(2R, 4S)－モナティンは9.7分のリテンションタイムにて分別定量ができる。

[0047] また、必要に応じて、ダイセル化学工業製光学分割カラム「CROWNPAK CR(＋)」(4.6×150mm)を利用した高速液体クロマトグラフィーによる分析も行った。分析条件は以下に示す通りである。

[0048] 移動相:過塩素酸水溶液(pH1.5)／10%(v／v)メタノール;

流速:0.5ml／min;

カラム温度:30℃;および

検出:UV210nm

[0049] 本条件によりモナティン光学異性体は(2R, 4S)、(2R, 4R)、(2S, 4R)、および(2S, 4S)の順に42分、57分、64分、および125分のリテンションタイムにて分別定量ができる。

[0050] 製造例1 IHOG－オキシム 2アンモニウム塩(4－ヒドロキシ－4－(3－インドリルメチル)－2－ヒドロキシイミノグルタル酸2アンモニウム塩)の製造

1．6wt%水酸化ナトリウム水溶液917gに、インドール－3－ピルビン酸73．8g(352ミリモル)を加えて溶解した。反応溶液を35℃とし、30%水酸化ナトリウム水溶液を用いてpH値を11．1に保ちながら、50%ピルビン酸水溶液310．2g(1761ミリモル)を2時間かけて滴下した。更に4．5時間反応させて、4－ヒドロキシ－4－(3－インドリルメチル)－2－ケトグルタル酸を含有する反応溶液を得た。これに、30%水酸化ナトリウム水溶液にてpH値を7に保ちながら、40%ヒドロキシルアミン塩酸塩水溶液367．2g(2114ミリモル)を加え、5℃にて17．5時間攪拌した。濃塩酸を用いて反応液のpH値を2にし、有機物を酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、濃縮して残渣を得た。残渣に28%アンモニア水60mlと2－プロパノール1350mlから再結晶を行い、4－ヒドロキシ－4－(3－インドリルメチル)－2－ヒドロキシイミノグルタル酸の2アンモニウム塩43．4g(142ミリモル:収率40% 対インドール－3－ピルビン酸)を結晶として得た。

[0051] 製造例2 IHOG－オキシム 2カリウム塩(4－ヒドロキシ－4－(3－インドリルメチル)－2－ヒドロキシイミノグルタル酸2カリウム塩)の製造

製造例1に従って製造した4－ヒドロキシ－4－(3－インドリルメチル)－2－ヒドロキシイミノグルタル酸2アンモニウム塩10gを水20mlに溶解し、100mlの陽イオン交換樹脂 DIAION PK228(カリウム型、三菱化学製)を充填したカラムに通液して所望のイオンに交換した後、溶離液を20gまで濃縮し4－ヒドロキシ－4－(3－インドリルメチル)－2－ヒドロキシイミノグルタル酸2カリウム塩水溶液を得た。

[0052] 製造例3 インドールピルビン酸オキシムの製造

インドールピルビン酸4．06g(0．02モル)及び85%水酸化カリウム1．32g(0．02モル)を水50mlに溶解し、これに塩酸ヒドルキシルアミン1．53g(0，022モル)を加

えた。さらに85％水酸化カリウム1．45g（0．022モル）を加え、室温下に1夜攪拌した。反応液に塩酸を加えpH2に調整し、析出した結晶を濾取した。得られた湿結晶を乾燥しインドールピルビン酸オキシム3．34gを得た。インドールピルビン酸に対する収率は76．5％であり、ESI－MS：219．1[M＋H]$^+$のシグナルが得られた。

[0053] 製造例4 ベンゾイル酢酸エチルエステルオキシムの製造

ベンゾイル酢酸エチルエステル3．84g（0．02モル）をMeOH50mlに溶解し、これに塩酸ヒドロキシルアミン1．53g（0．022モル）を加えた。トリエチルアミン2．23g（0．022モル）を加え、室温下に1夜攪拌した。反応液を減圧下に濃縮し、残渣に水を加え析出した結晶を濾取した。乾燥しベンゾイル酢酸エチルエステルオキシム3．27gを得た。ベンゾイル酢酸エチルエステルに対する収率は78．9％であり、ESI－MS：208．2[M＋H]$^+$のシグナルが得られた。

[0054] （分析条件）

ガードカラム：Shodex IC YK－G（昭和電工製）

カラム ：Shodex IC YK－421（昭和電工製）

検出 ：電気伝導度検出器

溶離液 ：4mM燐酸＋5mM18－Crown－6

流速 ：0．6ml／min

分析温度 ：40℃

[0055] 実施例1 IHOG－オキシム還元活性菌の採取

4－ヒドロキシ－4－（3－インドリルメチル）－2－ヒドロキシイミノグルタル酸（IHOG－オキシム：IHOG－oxime）を基質としてモナティンを生成するIHOG－オキシム還元活性菌株の採取を実施した。

[0056] ブイヨン平板培地（栄研化学製）に供試微生物（細菌または酵母）を接種し、30℃で24時間培養した。得られた培養物をグリセロール0．5g／dl、フマル酸0．5g／dl、酵母エキス0．3g／dl、ペプトン0．2g／dl、硫安0．5g／dl、K_2HPO_4 0．3g／dl、KH_2PO_4 0．1g／dl、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0．05g／dl、IHOG－オキシム・2アンモニウム塩 0．2g／dl、寒天末2g／dl（pH6．5）を含むプレートに接種し、30℃で24時間培養した。得られた菌体を湿菌体重量で約1％（w／v）となるように、以下の2種類

の反応液にそれぞれ接種し、30℃で24時間反応させた。

[0057] 反応液1:100mM Tris－HCl(pH 8.0)、50mM IHOG－オキシム・2アンモニウム塩、1mM $MgCl_2$、1mM ピリドキサール－5'－リン酸(PLP)、20mM NADH、20mM NADPH、1%(v/v) トルエン

[0058] TLCを用いて生成モナティンの定性分析を行った。反応液1μlをTLCプレートシリカゲル60F254(Merck製)にスポットし、n－ブタノール:酢酸:水＝4:1:2に混合した溶液を用いて展開後、ニンヒドリン発色を行った。モナティンはおおよそRf＝0.39の位置にピンク色のスポットとして検出できる。

[0059] モナティンの生成が認められた反応液をHPLC分析に供して、生成モナティンを定量分析した。その結果、表1に示す菌株においてモナティンの生成が認められ、即ちIHOG－オキシムから微生物変換にてモナティンを生成せしめることが出来た。

[0060] [表1]

表1 IHOG－オキシムからの生成モナティン

反応溶液1			
菌株			生成モナティン(mM)
Citrobacter	*freundii*	IFO 13546	3.2
Escherichia	*intermedia*	AJ 2607	3.2
Escherichia	*coli*	ATCC 13070	2.1
Rhodococcus	*marinonascens*	AJ 110354	1.2
Escherichia	*coli*	ATCC 12814	0.8

[0061] 実施例2 IHOG－オキシム・2カリウム塩を基質としたモナティンの生成

表2に示す菌株を用いて、IHOG－オキシム・2カリウム塩を基質とした変換反応を実施した。菌体の調製方法は実施例1記載の方法と同様に行い、反応液は以下に示す反応液2および反応液3を用いた。30℃で24時間反応させた後にHPLCにて生成モナティン量を定量した。その結果、表2に示す通り、IHOG－オキシム・2カリウム塩からもモナティンが生成した。また、反応液3と4の比較から、反応液中にNADH、NADPH、$MgCl_2$、ピリドキサール－5'－リン酸(PLP)などを添加することにより生成モナティン量が増加した。

[0062] 反応液2:100mM Glycine－NaOH(pH9.0)、50mM IHOG－オキシム・2カリウム塩、1mM $MgCl_2$、1mM ピリドキサール－5'－リン酸(PLP)、25mM NA

DH、25mM NADPH、1%(v／v)トルエン

[0063] 反応液3:100mM Glycine－NaOH(pH9.0)、50mM IHOG－オキシム・2カリウム塩、1%(v／v)トルエン

[0064] [表2]

表2 IHOG－オキシム 2カリウム塩を基質とした生成モナティン量（mM）

菌株			反応液2	反応液3
Citrobacter	*freundii*	IFO 13546	11.30	6.47
Escherichia	*intermedia*	AJ 2607	11.65	6.79
Escherichia	*coli*	ATCC 13070	1.01	0.54

[0065] 実施例3 PLP、$MgCl_2$、NAD(P)Hの添加効果

Citrobacter freundii IFO13546、Escherichia intermedia AJ2607によるIHOG－オキシム還元反応におけるPLP、$MgCl_2$、NAD(P)Hの添加効果を検討した。

[0066] 表3に示す組成の反応液(反応液4～9)をそれぞれ調製し、実施例1に示す方法と同様にIHOG－オキシム還元反応を実施し、生成したモナティンを定量した。

その結果(表4)、それぞれの菌株において、PLP、$MgCl_2$、あるいはNAD(P)Hを添加することにより生成モナティン量が増加した。

[0067] さらに、反応液4を用いて生成したモナティンについて、光学分割カラム「CROWN PAK CR(＋)」を用いて光学異性体を同定したところ、これらのモナティンは(2S,4S)体であることが明らかとなった。

[0068] [表3]

表3 反応溶液組成（単位：mM）

	反応液4	反応液5	反応液6	反応液7	反応液8	反応液9
Glycine－NaOH(9.0)	100	100	100	100	100	100
IHOG－oxime・2K	50	50	50	50	50	50
NADH	25	25	25	25	0	0
NADPH	25	25	25	25	0	0
$MgCl_2$	1	0	1	0	1	0
PLP	1	1	0	0	1	0

[0069] [表4]

表４　生成モナティン量（mM）

	E. intermedia	*C. freundii*
反応液4	11.6	11.3
反応液5	10.9	5.7
反応液6	1.2	5.2
反応液7	0.4	7.8
反応液8	6.8	6.5
反応液9	2.5	5.8

[0070] 実施例4　IPA－オキシム（インドール－3－ピルビン酸－オキシム）からのトリプトファン（Trp）の生成

ブイヨン平板培地（栄研化学）にCitrobacter freundii IFO 13546、Escherichia intermedia AJ 2607を接種し、30℃で24時間培養した。これをグリセロール0.5g／dl、フマル酸0.5g／dl、酵母エキス0.3g／dl、ペプトン0.2g／dl、硫安0.5g／dl、K_2HPO_4 0.3g／dl、KH_2PO_4 0.1g／dl、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05g／dl、IHOG－オキシム・2アンモニウム塩 0.2g／dl、寒天末2g／dl（pH6.5）を含むプレートに接種し、30℃で24時間培養した。得られた菌体を湿菌体重量で約1%（w／v）となるように、以下の反応液10に接種し、30℃で24時間反応させた。

[0071] 反応液10：100mM Glycine－NaOH（pH9.0）、50mM IPA－オキシム、1mM $MgCl_2$、1mM ピリドキサール－5'－リン酸（PLP）、25mM NADH、25mM NADPH、1%（v／v）トルエン

[0072] TLCを用いて生成トリプトファンの定性分析を行った。反応液1μlをTLCプレートシリカゲル60F254（Merck製）にスポットし、n－ブタノール：酢酸：水＝4：1：2に混合した溶液を用いて展開後、ニンヒドリン発色を行った。トリプトファンはおおよそRf＝0.52の位置に紫色のスポットとして検出できる。

[0073] トリプトファンの生成が認められた反応液をHPLC分析に供して、生成トリプトファンを定量分析した。その結果、トリプトファンの生成が認められ、即ちIPA－オキシムから微生物変換にてトリプトファンを生成せしめることが出来た。

[0074] （分析条件）

カラム　：Inertsil ODS－80A（ジーエルサイエンス製）

検出　　：UV210nm

溶離液 :12%(v／v)アセトニトリル／0．05% トリフルオロ酢酸水溶液

流速 :1．5ml／min

分析温度:30℃

[0075] [表5]

表５ 生成Ｔｒｐ量

	E. intermedia	*C. freundii*
生成Trp (mM)	2．0	2．2

[0076] 実施例5 BAE－オキシムからのβ－フェニルアラニン(β－Phe)の生成

Citrobacter freundii IFO 13546、Escherichia intermedia AJ2607を供試菌株とし、実施例4と同様に培養して得られた菌体を湿菌体重量で約1%(w／v)となるように、以下の反応液11に接種し、30℃で24時間反応させた。

[0077] 反応液11:100mM Glycine－NaOH(pH9．0)、50mM BAE－オキシム、1mM $MgCl_2$、1mM ピリドキサール－5'－リン酸(PLP)、25mM NADH、25mM NADPH、1%(v／v) トルエン

[0078] TLCを用いて生成物の定性分析を行った。反応液1μlをTLCプレートシリカゲル60F254(Merck製)にスポットし、n－ブタノール:酢酸:水＝4:1:2に混合した溶液を用いて展開後、ニンヒドリン発色を行った。β－フェニルアラニンエチルエステルはおおよそRf＝0．72の位置に黄色のスポットとして、β－フェニルアラニンはおおよそRf＝0．51の位置に茶色のスポットとして、それぞれ検出できる。その結果、これら反応液においてはβ－フェニルアラニンと同一のRf付近にスポットの生成を認めた。

[0079] β－フェニルアラニンスポットの生成が認められた反応液をHPLC分析に供して分析した。その結果、β－フェニルアラニンの生成が認められ、即ちBAEオキシムから微生物変換にてβ－フェニルアラニンを生成せしめることが出来た。

[0080] (分析条件)

カラム :Inertsil ODS－80A(ジーエルサイエンス製)

検出 :UV210nm

溶離液 :12%(v／v)アセトニトリル／0．05% トリフルオロ酢酸水溶液

流速 :1．5ml／min

分析温度:30℃

[0081] [表6]

表6 生成β－フェニルアラニン量

	E. intermedia	*C. freundii*
生成β－Ｐｈｅ (mM)	1．3	4．4

[0082] 実施例6 ^{15}Nラベル化IPA－オキシム(^{15}N同位体でラベルしたインドール－3－ピルビン酸オキシム)からのトリプトファン(Trp)の生成

実施例4と同様の方法によりEscherichia intermedia AJ 2607を培養し、湿菌体を得た。得られた菌体を湿菌体重量で約1%(w／v)となるように、以下の反応液12に接種し、30℃で24時間反応させた。

[0083] 反応液12:100mM Glycine－NaOH(pH9．0)、50mM ^{15}Nラベル化IPA－オキシム、1mM $MgCl_2$、1mM ピリドキサール－5'－リン酸(PLP)、25mM NADH、25mM NADPH、1%(v／v)トルエン

[0084] ^{15}Nラベル化IPA－オキシムは、以下のようにして調製した。アルゴン気流下、25℃で水60mlにインドールピルビン酸1．413g(6．95ミリモル)及び8NNaOH0．913mlを加えて溶解した。その溶解液に$^{15}NH_2OH$塩酸塩0．5g(7．09ミリモル)及び8NNaOH0．913mlを添加し、25℃で一時間攪拌した。1N塩酸4．9mlで反応液のpHを3に調整し25℃で一晩攪拌した。析出結晶を濾別し、湿結晶2．07gを40℃で減圧乾燥することにより、^{15}Nラベル化IPA－オキシム0．81g(3．58ミリモル エリア純度97．5%)を得た。

[0085] 反応液をLC－MSで分析した結果、^{15}Nラベル区では＋206(^{15}N相当)のピークが検出され、オキシムが酵素的に還元されていることが示された。

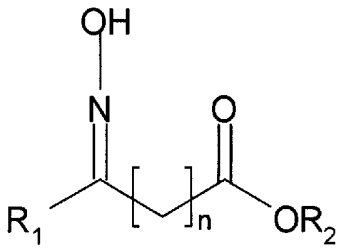
産業上の利用可能性

[0086] 本発明は、各種アミノ酸誘導体の生産において有用である。

請求の範囲

[1] 下記一般式(I)

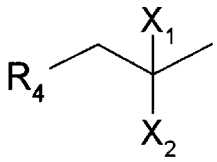
[化1]



・・・(I)

(一般式(I)において、R_1はそれぞれ置換基を有していてもよい炭素数2～6のアルキル基、炭素数6～14のアリール基、炭素数6～10のシクロアルキル基、炭素数7～19のアラルキル基、炭素数2～10のアルコキシアルキル基、またはこれらの炭素骨格中にヘテロ原子を含む基、および下記一般式(II)

[化2]



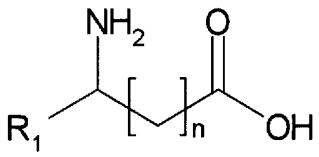
・・・(II)

で示される置換基R_3から選択される置換基を表す。ここに、R_4はそれぞれ置換基を有していてもよい炭素数2～6のアルキル基、炭素数6～14のアリール基、炭素数6～10のシクロアルキル基、炭素数7～19のアラルキル基、炭素数2～10のアルコキシアルキル基、またはこれらの炭素骨格中にヘテロ原子を含む基から選択される置換基を表す。X_1およびX_2は相互に独立して水酸基またはカルボニル基を表す。R_2は炭素数1～3のアルキル基または水素原子を表す。nは0または1である。)

で示されるヒドロキシイミノ酸から、

下記一般式(III)

[化3]



・・・(III)

(一般式(III)において、R_1およびnは、一般式(I)におけるR_1、nと同義である。)
で示されるアミノ酸誘導体を生成する反応を触媒する微生物および／または酵素の存在下で、当該反応を実施することにより、前記一般式(III)のアミノ酸誘導体を生成することを特徴とするアミノ酸誘導体の製造方法。

[2] 前記nが0であり、生成するアミノ酸誘導体がα－アミノ酸誘導体である請求項1に記載の製造方法。

[3] 生成するアミノ酸誘導体が、α－L－アミノ酸である請求項1に記載の製造方法。

[4] 生成するアミノ酸誘導体が、α－D－アミノ酸である請求項1に記載の製造方法。

[5] 前記nが1であり、生成するアミノ酸誘導体がβ－アミノ酸誘導体である請求項1に記載の製造方法。

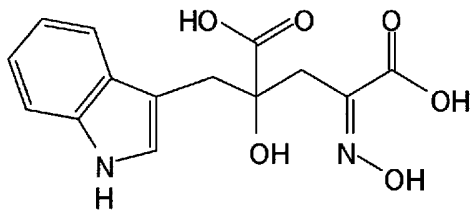
[6] 前記アリール基が、置換基を有していてもよいフェニル基またはナフチル基である、請求項1に記載の製造方法。

[7] 前記アラルキル基が、置換基を有していてもよいフェニルアルキル基またはナフチルアルキル基である、請求項1に記載の製造方法。

[8] 前記炭素骨格にヘテロ原子を含む基が、置換基を有していてもよいピリジル基またはインドイル基である、請求項1に記載の製造方法。

[9] 下記一般式(IV)

[化4]

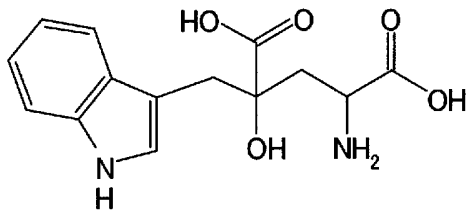


・・・(IV)

で示されるIHOG－オキシムから、

下記一般式(V)

[化5]

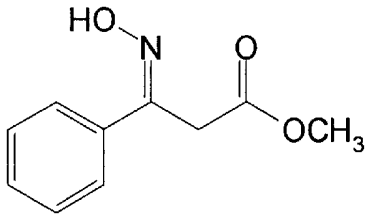


・・・(V)

で示されるモナティンを生成する反応を触媒する微生物および／または酵素の存在下で、当該反応を実施することによりモナティンを生成することを特徴とする、モナティンの製造方法。

[10] 下記一般式(VI)

[化6]

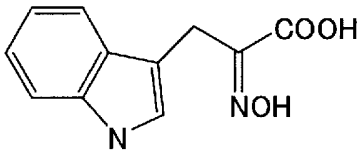


・・・(VI)

で示されるBAE－オキシムからβ－フェニルアラニンを生成する反応を触媒する微生物および／または酵素の存在下で、当該反応を実施することによりβ－フェニルアラニンを生成することを特徴とする、β－フェニルアラニンの製造方法。

[11] 下記一般式(VII)

[化7]



・・・(VII)

で示されるインドール－3－ピルビン酸－オキシムからトリプトファンを生成する反応を触媒する微生物および／または酵素の存在下で、当該反応を実施することによりトリプトファンを生成することを特徴とする、トリプトファンの製造方法。

[12] 微生物が、シトロバクター(Citrobacter)属、エシェリヒア(Escherichia)属、およびロドコッカス(Rhodococcus)属からなる群より選ばれるいずれかの属に属ずる細菌の1種または2種以上であることを特徴とする、請求項1，9，10または11に記載の製造方法。

[13] 微生物が、Citrobacter freundii(シトロバクター フルーンジ)、Escherichia intermedia(エシェリヒア インターメディア)、Escherichia coli(エシェリヒア コリ)、およびRhodococcus marinonascens(ロドコッカス マリノナシーンズ)からなる群から選ばれることを特徴とする、請求項1, 9, 10または11に記載の製造方法。

[14] 一般式(I)で示される化合物から一般式(III)で示される化合物を生成する反応を行う反応液中に、NADH、NADPH、ピリドキサール－5'－リン酸、および$MgCl_2$からなる群から選ばれる化合物のうち、少なくとも一つを添加することを特徴とする請求項1, 9, 10または11に記載の製造方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2005/017962

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12P13/04 (2006.01), ***C12P13/22*** (2006.01), *C12R1/185* (2006.01), *C12R1/19* (2006.01), *C12R1/01* (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12P13/04 (2006.01), ***C12P13/22*** (2006.01), *C12R1/185* (2006.01), *C12R1/19* (2006.01), *C12R1/01* (2006.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2005
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2005 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CA(STN), CASREACT(STN), BIOSIS/WPI(DIALOG), JSTPlus(JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 03/059865 A1 (Ajinomoto Co., Inc.), 24 July, 2003 (24.07.03), Particularly, Claims 15, 17 to 18, 22 & EP 1466890 A1 & JP 2003-559970 A	1-14
A	JP 2003-171365 A (Ajinomoto Co., Inc.), 20 June, 2003 (20.06.03), Full text (Family: none)	1-14
A	Clement B. et al., Isolation and characterization of the protein components of the liver microsomal 02-insensitive NADH-benzamidoxime reductase. J.Biol.Chem., 1997, 272(31), p.19615-20	1-14

☒ 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	Date of mailing of the international search report
17 October, 2005 (17.10.05)	25 October, 2005 (25.10.05)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2005/017962

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Gibbs D.E. et al., Asymmetric synthesis of amines by action of baker's yeast on oximes. Tetrahedron Letters, 1990, 31(39), pages 5555 to 5558	1-14

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２００５／０１７９６２

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.[7] ***C12P13/04*** (2006.01), ***C12P13/22*** (2006.01), *C12R1/185* (2006.01), *C12R1/19* (2006.01), *C12R1/01* (2006.01)

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.[7] ***C12P13/04*** (2006.01), ***C12P13/22*** (2006.01), *C12R1/185* (2006.01), *C12R1/19* (2006.01), *C12R1/01* (2006.01)

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２００５年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２００５年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２００５年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CA(STN), CASREACT(STN), BIOSIS/WPI(DIALOG), JSTPlus(JOIS)

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
A	WO 03/059865 A1(味の素株式会社)2003.07.24 特に,請求項15,17-18,22参照 & EP 1466890 A1 & JP 2003-559970 A	1-14
A	JP 2003-171365 A(味の素株式会社)2003.06.20 全文(ファミリーなし)	1-14

☑ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。　　☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 １７．１０．２００５	国際調査報告の発送日 ２５．１０．２００５
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 郵便番号１００－８９１５ 東京都千代田区霞が関三丁目４番３号	特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｂ　３１３１ 渡邉　潤也 電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
A	Clement B. et al., Isolation and characterization of the protein components of the liver microsomal 02-insensitive NADH-benzamidoxime reductase. J. Biol. Chem., 1997, 272(31), p. 19615-20	1-14
A	Gibbs D. E. et al., Asymmetric synthesis of amines by action of baker's yeast on oximes. Tetrahedron Letters, 1990, 31(39), p. 5555-5558	1-14