(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
2013 年 12 月 12 日(12.12.2013)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2013/183610 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 1/20 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01) *C12P 7/24* (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01) *C12P 7/42* (2006.01)
C12N 9/04 (2006.01) *C12P 7/46* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2013/065414

(22) 国際出願日: 2013 年 6 月 3 日(03.06.2013)

(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 2012-127467 2012 年 6 月 4 日(04.06.2012) JP

(71) 出願人: 塩水港精糖株式会社(ENSUIKO SUGAR REFINING CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1030012 東京都中央区日本橋堀留町二丁目９番６号 Tokyo (JP). 地方独立行政法人大阪市立工業研究所(OSAKA MUNICIPAL TECHNICAL RESEARCH INSTITUTE) [JP/JP]; 〒5368553 大阪府大阪市城東区森之宮一丁目６番５０号 Osaka (JP).

(72) 発明者: 伊藤 哲也(ITO, Tetsuya); 〒1030012 東京都中央区日本橋堀留町二丁目９番６号 塩水港精糖株式会社内 Tokyo (JP). 田所 宏基(TADOKORO, Hiroki); 〒1030012 東京都中央区日本橋堀留町二丁目９番６号 塩水港精糖株式会社内 Tokyo (JP). 正木 久晴(MASAKI, Hisaharu); 〒1030012 東京都中央区日本橋堀留町二丁目９番６号 塩水港精糖株式会社内 Tokyo (JP). 三國克彦(MIKUNI, Katsuhiko); 〒1030012 東京都中央区日本橋堀留町二丁目９番６号 塩水港精糖株式会社内 Tokyo (JP). 村上 洋(MURAKAMI, Hiromi); 〒5368553 大阪府大阪市城東区森之宮一丁目６番５０号 地方独立行政法人大阪市立工業研究所内 Osaka (JP). 木曽 太郎(KISO, Taro); 〒5368553 大阪府大阪市城東区森之宮一丁目６番５０号 地方独立行政法人大阪市立工業研究所内 Osaka (JP). 桐生 高明(KIRYU, Takaaki); 〒5368553 大阪府大阪市城東区森之宮一丁目６番５０号 地方独立行政法人大阪市立工業研究所内 Osaka (JP).

(74) 代理人: 須藤 政彦(SUDO, Masahiko); 〒1300013 東京都墨田区錦糸３丁目２番１号 アルカイースト５階 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, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS,

[続葉有]

(54) **Title**: D-GLUCARIC ACID-PRODUCING BACTERIUM, AND METHOD FOR MANUFACTURING D-GLUCARIC ACID

(54) 発明の名称 : Ｄ－グルカル酸生産菌およびＤ－グルカル酸の製造方法

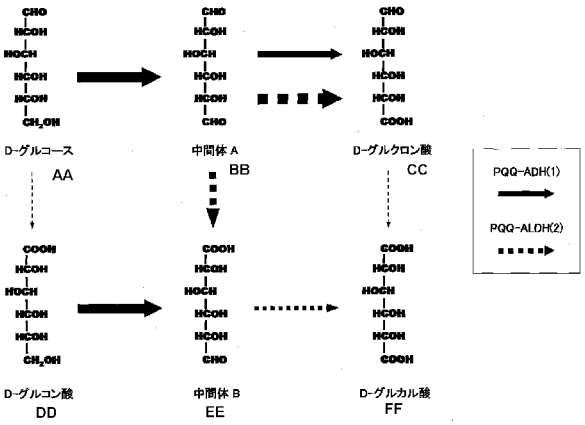


FIG. 1

AA D-glucose
BB Intermediate A
CC D-glucuronic acid
DD D-gluconic acid
EE Intermediate B
FF D-glucaric acid

(57) **Abstract**: The present invention provides a D-glucaric acid-producing bacterium, and a method for manufacturing D-glucaric acid. The invention is characterized in that: the D-glucaric acid, or a salt thereof, is manufactured from one or two glucides which are selected from a group comprising D-glucose, D-gluconic acid, and D-glucuronic acid, and the reaction is catalyzed by a specified alcohol dehydrogenase PQQ-ADH (1), and a specified aldehyde dehydrogenase PQQ-ALDH (2); and the D-glucaric acid, or the salt thereof, is manufactured, in the presence of the one or two glucides, using a microorganism having the PQQ-ADH (1) and PQQ-ALDH (2), or the substance obtained by processing the microorganism. This invention can provide a microscopic organism which has improved D-glucaric acid-producing properties for use in the manufacture of D-glucaric acid, and an effective method for manufacturing D-glucaric acid.

(57) 要約: 本発明は、Ｄ－グルカル酸生産菌およびＤ－グルカル酸の製造方法を提供する。本発明は、Ｄ－グルコース、Ｄ－グルコン酸、Ｄ－グルクロン酸からなる群から選択される１または２以上の糖質から、特定のアルコール脱水素酵素ＰＱＱ－ＡＤＨ（１）および特定のアルデヒド脱水素酵素ＰＱＱ－ＡＬＤＨ（２）により触媒されるＤ－グルカル酸またはその塩を製造すること、ならびに、上述の１または２以上の糖質の存在下、上記ＰＱＱ－ＡＤＨ（１）およびＰＱＱ－ＡＬＤＨ（２）を有する微生物またはその処理物を用いてＤ－グルカル酸またはその塩を製造すること、を特徴とする。 本発明により、Ｄ－グルカル酸を製造するために使用されるＤ－グルカル酸生産能が向上した微生物およびＤ－グルカル酸の効率的な製造法を提供することができる。

WO 2013/183610 A1

LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, 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 ：

Ｄ－グルカル酸生産菌およびＤ－グルカル酸の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、Ｄ－グルカル酸を製造するために使用されるＤ－グルカル酸生産能が向上した微生物およびＤ－グルカル酸の効率的な製造法に関するものであり、さらに詳しくは、特定のピロロキノリンキノン依存性アルコール脱水素酵素（ＰＱＱ－ＡＤＨ（以下、本酵素は、１と記す。））と、特定のピロロキノリンキノン依存性アルデヒド脱水素酵素（ＰＱＱ－ＡＬＤＨ（以下、本酵素は、２と記す。））の２種類の脱水素酵素活性を有し、さらに、ケト酸類の生成に関与する複数のＡＬＤＨ（以下、同様の性質を有する酵素は、３と記す。）活性が減弱または消失している反応条件下で安価かつ効率的にＤ－グルカル酸を製造する方法に関するものである。

背景技術

[0002] Ｄ－グルコースの代表的なカルボン酸として、アルデヒド基が酸化されたＤ－グルコン酸と、ヒドロキシメチル基が酸化されたＤ－グルクロン酸が知られている。また、アルデヒド基とヒドロキシメチル基の両方が酸化されたジカルボン酸は、Ｄ－グルカル酸と呼ばれ、天然には、リンゴ、グレープフルーツなどの果物や、ブロッコリー、芽キャベツなどのアブラナ科の野菜に含まれている。

[0003] Ｄ－グルカル酸は、β－グルクロニダーゼを強力に阻害することから、乳癌、大腸癌、肝臓癌、肺癌、皮膚癌の発癌リスクを抑える効果があり（非特許文献１）、米国では、Ｄ－グルカル酸カルシウムとして、健康補助食品に用いられている。また、Ｄ－グルカル酸は、キレート剤、セメント添加剤などの原料として利用されており、さらに、２００４年に、米国エネルギー省によってバイオリファイナリーの基幹物質に定められたことから（非特許文献２）、新規なポリマー原料としても期待されている。

[0004] Ｄ－グルカル酸の調製法については、これまでに、先行技術として、化学合成法、酵素法、発酵法による様々な方法が報告されている。化学合成法は、Ｄ－グルコースを出発原料として用いる方法が多く、硝酸を酸化剤として用いる方法（特許文献１）、プラチナを酸化触媒として用いる方法（特許文献２）、４－アセチルアミノ－２，２，６，６－テトラメチルピペリジン－１－オキシルを酸化剤として用いる方法（特許文献３）などが提案されている。

[0005] さらに、先行技術として、酸化反応時の選択性を高め、Ｄ－グルカル酸の収率を大幅に向上させた改良法（特許文献４、特許文献５）も開示されている。しかしながら、これらの化学合成法は、大量の薬品と特殊な設備を必要とするため製造コストが高くなり、かつ、窒素酸化物などの環境負荷物質を副次的に生成することが多いという欠点がある。

[0006] 一方、酵素法や発酵法は、化学合成法と比べ反応条件が穏和であり、地球環境に与える影響が少ないというメリットがある。酵素法としては、先行技術として、例えば、Ｄ－グルクロン酸にヘキソースオキシダーゼ、アルデヒドデヒドロゲナーゼ、アルデヒドオキシダーゼを作用させＤ－グルカル酸に変換させる方法（特許文献６）や、Ｄ－グルクロン酸にグルコースオキシダーゼを作用させる方法（特許文献７）が報告されているが、何れの方法も酵素の反応性が低く、実用化には至っていない。

[0007] 発酵法としては、先行技術として、例えば、サッカロマイセス・セレビシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）由来のミオイノシトール－１－リン酸シンテターゼ遺伝子、マウス由来のミオイノシトールオキシゲナーゼ遺伝子、シュードモナス・シリンガエ（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓｙｒｉｎｇａｅ）由来のウロン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子を大腸菌に導入し、Ｄ－グルコースからＤ－グルカル酸を生成させる方法（特許文献８、非特許文献３）が報告されているが、グルカル酸の生成量は最大でも２．５ｇ／Ｌと少なく、工業的に十分なレベルではない。

先行技術文献

特許文献

[0008] 特許文献1：米国特許第２，４３６，６５９号

特許文献2：米国特許第２，４７２，１６８号

特許文献3：米国特許第６，４９８，２６９号

特許文献4：米国特許第５，５９９，９７７号

特許文献5：米国特許第７，６９２，０４１号

特許文献6：ＷＯ０２／０７４９２６号

特許文献7：日本国特許第３７１３５３０号

特許文献8：ＷＯ／２００９／１４５８３８号

非特許文献

[0009] 非特許文献1：Ｃａｎｃｅｒ　Ｌｅｔｔｅｒｓ，５４，１－８（１９９０）

非特許文献2：Ｔｏｐ　ｖａｌｕｅ　ａｄｄｅｄ　ｃｈｅｍｉｃａｌｓ　ｆｒｏｍ　ｂｉｏｍａｓｓ，　Ｖｏｌｕｍｅ　１－Ｒｅｓｕｌｔｓ　ｏｆ　ｓｃｒｅｅｎｉｎｇ　ｆｏｒ　ｐｏｔｅｎｔｉａｌ　ｃａｎｄｉｄａｔｅｓ　ｆｒｏｍ　ｓｕｇａｒｓ　ａｎｄ　ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ　ｇａｓ．Ｕ．Ｓ．Ｄｅｐａｒｔｍｅｎｔ　ｏｆ　Ｅｎｅｒｇｙ，Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ，ＤＣ

非特許文献3：Ｍｅｔａｂ．Ｅｎｇ．，１２（３），２９８－３０５（２０１０）

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0010] このように、従来、様々なＤ－グルカル酸の調製法が報告されているが、工業的規模で安価に製造する技術は未だに確立できておらず、Ｄ－グルカル酸の市場価格は、他のＤ－グルコース酸化物であるＤ－グルコン酸やＤ－グルクロン酸に比べ、格段に高いのが現状である。そこで、本発明者らは、Ｄ－グルカル酸生産能が向上した微生物を用いて、安価かつ効率的にＤ－グルカル酸を製造する方法を確立することを目標として鋭意研究開発を積み重ねた。

[0011] すなわち、本発明者らは、上記研究開発の過程で、Ｄ－グルカル酸の生成能が異なるシュードグルコノバクター・サッカロケトゲネス（Ｐｓｅｕｄｏｇｌｕｃｏｎｏｂａｃｔｅｒ　ｓａｃｃｈａｒｏｋｅｔｏｇｅｎｅｓ）の菌株から、それぞれアルコール脱水素酵素（ＡＤＨ（１））とアルデヒド脱水素酵素（ＡＬＤＨ（２），ＡＬＤＨ（３））を分離、精製し、その性質を詳細に検討した。

[0012] その結果、Ｄ－グルカル酸を効率的に生産させるためには、特定のピロロキノリンキノン依存性アルコール脱水素酵素（ＰＱＱ－ＡＤＨ（１））と、特定のピロロキノリンキノン依存性アルデヒド脱水素酵素（ＰＱＱ－ＡＬＤＨ（２））の２種類の脱水素酵素活性を有し、さらに、ケト酸類の生成に関与する複数のＡＬＤＨ（３）活性が減弱または消失していることが必要であるとの新規知見を見出し、本発明を完成するに至った。

[0013] 本発明は、Ｄ－グルカル酸生産能が向上した微生物を用いて、安価かつ効率的にＤ－グルカル酸を製造する方法、並びに当該微生物を提供することを目的とするものである。

課題を解決するための手段

[0014] 上記課題を解決するための本発明は、以下の技術的手段から構成される。

（１）シュードグルコノバクター属に属し、以下の性質；（Ａ）、（Ｂ）、（Ｃ）を全て有することを特徴とする微生物。

（Ａ）Ｄ－グルカル酸の生成に関与する特定のアルコール脱水素酵素ＡＤＨ（１）活性を有する、

（Ｂ）Ｄ－グルカル酸の生成に関与する特定のアルデヒド脱水素酵素ＡＬＤＨ（２）活性を有する、

（Ｃ）ケト酸類の生成に関与するアルデヒド脱水素酵素ＡＬＤＨ（３）活性が減弱もしくは消失している。

（２）特定のアルコール脱水素酵素ＡＤＨ（１）が、ＳＤＳ－ＰＡＧＥで６４，０００±５，０００、ゲルろ過クロマトグラフィーで１２０，０００±１０，０００の分子量を示すピロロキノリンキノン依存性酵素であり、以下

のアミノ酸配列；（ａ）から（ｃ）のいずれかを有する、前記（１）に記載の微生物。

（ａ）配列番号１に記載のアミノ酸配列、

（ｂ）配列番号１に記載のアミノ酸配列においてその機能を保持しかつ１もしくは複数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列、

（ｃ）配列番号１に記載のアミノ酸配列と８０％以上の相同性を有しかつその機能を保持するアミノ酸配列。

（３）特定のアルデヒド脱水素酵素ＡＬＤＨ（２）が、ＳＤＳ－ＰＡＧＥで６１，０００±５，０００、ゲルろ過クロマトグラフィーで１８０，０００±１０，０００の分子量を示すピロロキノリンキノン依存性酵素であり、以下のアミノ酸配列；（ｄ）から（ｆ）のいずれかを有する、前記（１）に記載の微生物。

（ｄ）配列番号２に記載のアミノ酸配列、

（ｅ）配列番号２に記載のアミノ酸配列においてその機能を保持しかつ１もしくは複数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列、

（ｆ）配列番号２に記載のアミノ酸配列と８０％以上の相同性を有しかつその機能を保持するアミノ酸配列。

（４）ＳＤＳ－ＰＡＧＥで６４，０００±５，０００、ゲルろ過クロマトグラフィーで１２０，０００±１０，０００の分子量を示すピロロキノリンキノン依存性酵素であり、以下のアミノ酸配列；（ａ）から（ｃ）のいずれかを有することを特徴とするアルコール脱水素酵素ＡＤＨ（１）。

（ａ）配列番号１に記載のアミノ酸配列、

（ｂ）配列番号１に記載のアミノ酸配列においてその機能を保持しかつ１もしくは複数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列、

（ｃ）配列番号１に記載のアミノ酸配列と８０％以上の相同性を有しかつそ

の機能を保持するアミノ酸配列。

（５）ＳＤＳ－ＰＡＧＥで６１，０００±５，０００、ゲルろ過クロマトグラフィーで１８０，０００±１０，０００の分子量を示すピロロキノリンキノン依存性酵素であり、以下のアミノ酸配列；（ｄ）から（ｆ）のいずれかを有することを特徴とするアルデヒド脱水素酵素ＡＬＤＨ（２）。

（ｄ）配列番号２に記載のアミノ酸配列、

（ｅ）配列番号２に記載のアミノ酸配列においてその機能を保持しかつ１もしくは複数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列、

（ｆ）配列番号２に記載のアミノ酸配列と８０％以上の相同性を有しかつその機能を保持するアミノ酸配列。

（６）Ｄ－グルコース、Ｄ－グルコン酸、Ｄ－グルクロン酸からなる群から選択される１または２以上の糖質からＤ－グルカル酸を製造する方法であって、

これらの糖質からＤ－グルカル酸を生成する反応が、前記（４）に記載の特定のアルコール脱水素酵素ＡＤＨ（１）および前記（５）に記載の特定のアルデヒド脱水素酵素ＡＬＤＨ（２）により触媒されることを特徴とするＤ－グルカル酸またはその塩の製造方法。

（７）Ｄ－グルコース、Ｄ－グルコン酸、Ｄ－グルクロン酸からなる群から選択される１または２以上の糖質の存在下、前記（１）から（３）のいずれかに記載の微生物またはその処理物を用いてＤ－グルカル酸を生産することを特徴とするＤ－グルカル酸またはその塩の製造方法。

（８）Ｄ－グルコース、Ｄ－グルコン酸、Ｄ－グルクロン酸からなる群から選択される１または２以上の糖質の存在下、前記（２）に記載のアルコール脱水素酵素ＡＤＨ（１）の遺伝子および前記（３）に記載のアルデヒド脱水素酵素ＡＬＤＨ（２）の遺伝子を宿主に導入した遺伝子組み換え生物またはその処理物を用いてＤ－グルカル酸を生産することを特徴とするＤ－グルカル酸またはその塩の製造方法。

（９）アルコール脱水素酵素の遺伝子が、配列番号１の塩基配列を有し、アルデヒド脱水素酵素の遺伝子が配列番号２の塩基配列を有する、前記（８）に記載のＤ－グルカル酸またはその塩の製造方法。

（１０）処理物が、細胞破砕液、細胞抽出液、またはアセトン粉末である、前記（７）または（８）に記載のＤ－グルカル酸またはその塩の製造方法。

（１１）前記（１）または（２）に記載の微生物またはその処理物あるいは酵素ＡＤＨ（１）を用いてＤ－グルコースからＤ－グルカルアルデヒド（中間体Ａ）を生産することを特徴とするＤ－グルカルアルデヒドの製造方法。

（１２）Ｄ－グルコース、Ｄ－グルコン酸から選択される１または２の糖質の存在下、前記（１）から（３）のいずれかに記載の微生物またはその処理物、あるいは前記（４）および（５）に記載の酵素ＡＤＨ（１）、ＡＬＤＨ（２）を用いてＬ－グルロン酸（中間体Ｂ）を生産することを特徴とするＬ－グルロン酸またはその塩の製造方法。

[0015] 次に、本発明についてさらに詳細に説明する。

本発明は、（１）Ｄ－グルカル酸の生成に関与するＰＱＱ－ＡＤＨ（１）と、ＰＱＱ－ＡＬＤＨ（２）活性を有し、かつ、ケト酸類の生成に関与するＡＬＤＨ（３）活性が減弱もしくは消失することによって、Ｄ－グルカル酸の生産能が向上したシュードグルコノバクター属に属する微生物、ならびに、（２）Ｄ－グルコース、Ｄ－グルコン酸、Ｄ－グルクロン酸からなる群から選択される１または２以上の糖質からＤ－グルカル酸を生成する反応が、図１に示したＰＱＱ－ＡＤＨ（１）およびＰＱＱ－ＡＬＤＨ（２）の２種類の酵素により触媒されることを特徴とするＤ－グルカル酸またはその塩の製造方法、を提供するものである。

[0016] また、本発明は、（３）Ｄ－グルコース、Ｄ－グルコン酸、Ｄ－グルクロン酸からなる群から選択される１または２以上の糖質にＤ－グルカル酸生成能を向上させた細胞またはその処理物を接触させＤ－グルカル酸を生産することを特徴とするＤ－グルカル酸またはその塩の製造方法、ならびに、（４）Ｄ－グルカル酸を製造する際に中間物質として生成するＤ－グルカルアル

デヒドおよびＬ－グルロン酸の製造方法、を提供するものである。

[0017] 本発明に係るＰＱＱ－ＡＤＨ（１）の性質は、次の通りである。

（１）作用：

２，６－ジクロロフェノールインドフェノール、フェリシアン化カリウム、フェナジンメタサルフェート、テトラゾリウム塩などの電子受容体の存在下、Ｄ－グルコースあるいはＤ－グルコン酸のヒドロキシメチル基をアルデヒド基に酸化するＡＤＨ活性およびＤ－グルカルアルデヒド（Ｄ－グルカル酸のジアルデヒド：中間体Ａ）の６位のアルデヒド基をカルボキシル基に酸化するＡＬＤＨ活性を有する。

[0018] （２）分子量：

ＳＤＳ－ＰＡＧＥで６４，０００±５，０００、ゲルろ過クロマトグラフィーで１２０，０００±１０，０００である。

（３）補欠分子族：

分子内にピロロキノリンキノン（ＰＱＱ）を含む。

（４）推定アミノ酸配列：

配列番号１に示されるアミノ酸配列からなる。なお、推定アミノ酸配列にはシグナル配列を含む。

[0019] これまでに、シュードグルコノバクター・サッカロケトゲネスの産生するＡＤＨとしては、分子中に希土類元素を含むアルコール脱水素酵素（酵素Ａ、特許第３０５６２９５号）と、ＰＱＱ依存性アルコール／アルデヒド脱水素酵素（酵素Ｂ、特開２００３－１５９０７９）が知られている。

[0020] 本発明に係るＰＱＱ－ＡＤＨ（１）は、酵素Ａと同様に、希土類元素の添加により発現誘導される特徴を有し、分子量も酵素Ａと同じであるが、酵素Ａでは、分子内にＰＱＱを有し、アルデヒド脱水素活性をも有するとの報告はない。また、本発明に係るＰＱＱ－ＡＤＨ（１）は、酵素Ｂと同様に、分子内にＰＱＱを含有し、アルデヒド脱水素酵素活性をも有しているが、酵素Ｂとは分子量が異なっている。

[0021] ＰＱＱ－ＡＤＨ（１）は、極僅かではあるが、中間体Ａの１位のアルデヒ

ド基を酸化してＬ－グルロン酸（Ｌ－グロースのウロン酸：中間体Ｂ）を、中間体Ｂのアルデヒド基を酸化してＤ－グルカル酸を生成するアルデヒド脱水素酵素活性も示す。しかし、これらの反応は非常に遅いので、ＰＱＱ－ＡＤＨ（１）の作用のみでＤ－グルコースやＤ－グルコン酸からＤ－グルカル酸を生成させることは困難である。

[0022] 一方、本発明に係るＰＱＱ－ＡＬＤＨ（２）の性質は、次の通りである。

（１）作用：

２，６－ジクロロフェノールインドフェノール、フェリシアン化カリウム、フェナジンメタサルフェート、テトラゾリウム塩などの電子受容体の存在下、Ｄ－グルコース、中間体Ａ、中間体Ｂ、Ｄ－グルクロン酸のアルデヒド基をカルボキシル基に酸化するＡＬＤＨ活性を有する。

[0023] （２）分子量：

ＳＤＳ－ＰＡＧＥで６１，０００±５，０００、ゲルろ過クロマトグラフィーで１８０，０００±１０，０００である。

（３）補欠分子族：

分子内にＰＱＱを含む。

（４）アミノ酸配列：

配列番号２に示されるアミノ酸配列からなる。

[0024] ＰＱＱ－ＡＬＤＨ（２）は、Ｄ－グルコースから中間体Ａを、Ｄ－グルコン酸から中間体Ｂを生成する反応は触媒しないため、ＰＱＱ－ＡＬＤＨ（２）のみでＤ－グルコースやＤ－グルコン酸からＤ－グルカル酸を生成させることはできない。また、ＰＱＱ－ＡＬＤＨ（２）は、Ｄ－グルクロン酸を酸化してＤ－グルカル酸に変換することはできるが、その酸化速度は遅い。

[0025] シュードグルコノバクター・サッカロケトゲネスは、ＰＱＱ－ＡＬＤＨ（２）の他にも、アルデヒド基の酸化を触媒するＡＬＤＨ（３）を複数生産する。ＡＬＤＨ（３）の内、最も活性が高いＰＱＱ／Ｈｅｍｅ－ＡＬＤＨ（以下、本酵素は、４と記す。）の性質は、次の通りである。

[0026] （１）作用：

２，６－ジクロロフェノールインドフェノール、フェリシアン化カリウム、フェナジンメタサルフェート、テトラゾリウム塩などの電子受容体の存在下、Ｄ－グルコース、Ｄ－グルコン酸を酸化して２－ケト－Ｄ－グルコン酸を、Ｄ－グルクロン酸を酸化してＤ－グルカル酸を生成する反応を主に触媒する。

[0027] （２）分子量：

ＳＤＳ－ＰＡＧＥで５９，０００±５，０００、ゲルろ過クロマトグラフィーで１３０，０００±１０，０００である。

（３）補欠分子族：

分子内にＰＱＱとヘムｃを含む。

（４）アミノ酸配列：

配列番号３に示されるアミノ酸配列からなる。

[0028] ＰＱＱ／Ｈｅｍｅ－ＡＬＤＨ（４）を代表とするＡＬＤＨ（３）は、Ｄ－グルコースやＤ－グルコン酸に作用させると副産物となるケト酸類を生成するものが多いため、Ｄ－グルカル酸の製造に用いる菌株では、これらのＡＬＤＨ（３）活性を減弱あるいは消失させる必要がある。

[0029] ＰＱＱ－ＡＤＨ（１）およびＰＱＱ－ＡＬＤＨ（２）活性を有し、複数のＡＬＤＨ（３）活性が減弱することにより、Ｄ－グルカル酸生産能が向上した微生物の具体例としては、シュードグルコノバクター・サッカロケトゲネスＲｈ４７－３株（ＦＥＲＭ　ＢＰ－１０８２０）が挙げられる。

[0030] Ｒｈ４７－３株は、Ｄ－グルクロン酸の製造に利用されている菌株（ＷＯ／２００８／１３９８４４）であり、Ｌ－ソルボースを２－ケト－Ｌ－グロン酸に酸化する能力を有するシュードグルコノバクター・サッカロケトゲネスＫ５９１ｓ株（特開昭６２－２２８２８８、ＦＥＲＭ　ＢＰ－１１３０）の変異株である。

[0031] Ｒｈ４７－３株とＫ５９１ｓ株でＤ－グルカル酸の生産能が大きく異なる理由は、次の通りである。Ｒｈ４７－３株は、Ｄ－グルカル酸の生成に関与するＰＱＱ－ＡＤＨ（１）およびＰＱＱ－ＡＬＤＨ（２）活性を有しており

、さらに、ケト酸類を生成するＡＬＤＨ（３）活性が低いため、Ｄ－グルコース、Ｄ－グルコン酸、Ｄ－グルクロン酸から効率的にＤ－グルカル酸を生成させることができる。

[0032] 一方、Ｋ５９１ｓ株は、ＰＱＱ－ＡＤＨ（１）活性は有しているが、ＰＱＱ－ＡＬＤＨ（２）活性はほとんど認められず、さらに、ＡＬＤＨ（３）活性（特に、ＰＱＱ／Ｈｅｍｅ－ＡＬＤＨ（４））が非常に強いため、Ｄ－グルコース、Ｄ－グルコン酸、Ｄ－グルクロン酸に作用させると、主にケト酸類が生成し、結果的に、Ｄ－グルカル酸を効率よく生成させることができない。

[0033] Ｋ５９１ｓ株と同様の性質を有する菌株としては、例えば、シュードグルコノバクター・サッカロケトゲネスＴＨ１４－８６株（ＦＥＲＭ ＢＰ－１１２８）、シュードグルコノバクター・サッカロケトゲネス１２－５株（ＦＥＲＭ ＢＰ－１１２９）、シュードグルコノバクター・サッカロケトゲネス１２－４株（ＦＥＲＭ ＢＰ－１１３１）、シュードグルコノバクター・サッカロケトゲネス１２－１５株（ＦＥＲＭ ＢＰ－１１３２）、シュードグルコノバクター・サッカロケトゲネス２２－３株（ＦＥＲＭ ＢＰ－１１３３）がある。

[0034] しかし、Ｄ－グルカル酸を生成し難いこれらの菌株にもＰＱＱ－ＡＬＤＨ（２）遺伝子は存在しているので、ＰＱＱ－ＡＬＤＨ（２）活性を発現させ、かつ、他のＡＬＤＨ（３）活性が低下または消失するように変異を施すことにより、Ｄ－グルカル酸生産に適した株に改変させることができる。

[0035] 変異処理する手法としては、特に限定されず、公知あるいは周知の手法を用いることができ、例えば、紫外線照射、放射線照射、Ｎ－メチル－Ｎ’－ニトロ－Ｎ－ニトロソグアニジンなどを用いる化学的変異誘導によるランダム変異法や、遺伝子組み換えなどによる部位特異的変異法を適用することができる。さらに、Ｒｈ４７－３株を公知あるいは周知の手法により変異処理し、ＰＱＱ－ＡＤＨ（１）やＰＱＱ－ＡＬＤＨ（２）活性を高める、あるいは、他のＡＬＤＨ（３）活性を消失させることにより、Ｄ－グルカル酸の生

産能をさらに向上させることもできる。

[0036] また、遺伝子操作により、ＰＱＱ－ＡＤＨ（１）遺伝子およびＰＱＱ－ＡＬＤＨ（２）遺伝子を導入した組み換え体を作製し、それを、Ｄ－グルカル酸の製造に用いることもできる。通常、組み換えＤＮＡは、目的の遺伝子が自律増殖可能な発現ベクターに組み込まれており、本発明に係るＰＱＱ－ＡＤＨ（１）遺伝子およびＰＱＱ－ＡＬＤＨ（２）遺伝子のＤＮＡを入手すれば、一般的に知られる公知又は周知の遺伝子操作技術により比較的容易に調製することができる。

[0037] ＰＱＱ－ＡＤＨ（１）遺伝子の塩基配列を配列番号１に、ＰＱＱ－ＡＬＤＨ（２）遺伝子の塩基配列を配列番号２にそれぞれ示した。発現ベクターの種類は、特に限定されず、例えば、自律的に増殖が可能なプラスミドでもよいし、宿主細胞に導入された際に宿主細胞の染色体に組み込まれ染色体と共に複製されるものであってもよい。

[0038] 宿主細胞としては、該当遺伝子を組み込んだ発現ベクターが適合し、形質転換されるものであれば特に限定されず、当技術分野で通常使用される細菌、酵母、カビ、動物細胞、植物細胞など、様々な細胞が利用できるが、基質となるＤ－グルコース、Ｄ－グルコン酸、Ｄ－グルクロン酸に作用する酵素を産生しないものが好ましい。

[0039] 変異処理あるいは遺伝子操作によって得られた細胞のＤ－グルカル酸生成能を確認する方法としては、特に限定されないが、例えば、同一条件下で培養した細胞を０．５％（ｗ／ｖ）の炭酸カルシウムを含む１．０％（ｗ／ｖ）グルコース溶液に添加し、振とうしながら酸化反応を行い、生成するＤ－グルカル酸を各種分析装置で定量すればよい。

[0040] 変異処理あるいは遺伝子操作によって得られた細胞の培養に用いる栄養培地としては、炭素源、窒素源、無機物、および必要に応じ使用する細胞が必要とする微量栄養素を含有するものであれば、天然培地、合成培地のいずれでもよい。

[0041] 栄養培地としては、細胞が利用できるものであればよく、炭素源は、例え

ば、グルコース、ショ糖、乳糖、澱粉などが使用できる。窒素源は、例えば、硫酸アンモニウム、尿素、硝酸ナトリウムなどの無機窒素化合物やコーンスティープリカー、酵母エキス、ペプトンなどの有機窒素化合物が使用できる。無機物としては、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、マグネシウム塩、鉄塩などが使用でき、具体的には塩化ナトリウム、リン酸水素二カリウム、硫酸マグネシウム、硫酸第一鉄などが用いられる。

[0042] さらに、必要に応じて、塩化ランタン、塩化セリウムなどの希土類元素を添加することもできる。特に、シュードグルコノバクター属菌を培養する際は、ＰＱＱ－ＡＤＨ（１）活性を誘導させるために、希土類元素の添加は必須となる。また、パントテン酸、ビオチン、チアミン、リボフラビンなどの微量栄養素や補酵素も適宜用いられる。

[0043] 培養法としては、液体培地を使用する振とう培養法もしくは通気撹拌培養法が好ましい。培養温度とｐＨは、使用する細胞の増殖に最も適した条件を選べばよい。例えば、シュードグルコノバクター属菌の場合、温度の範囲は１５～４５℃、好ましくは２０～４０℃、より好ましくは２５～３５℃、ｐＨの範囲は４～９、好ましくはｐＨ５～８、より好ましくはｐＨ６～７である。

[0044] 培養時間は細胞が増殖し始める時間以上であればよく、好ましくは細胞が生成するＰＱＱ－ＡＤＨ（１）活性およびＰＱＱ－ＡＬＤＨ（２）活性が最大に達する時間までである。培養時の溶存酸素濃度には特に制限はないが、通常は、０．５ｐｐｍ以上が好ましいため、通気量や撹拌速度を調節すればよい。培養方式は、回分培養、流加培養、連続培養のいずれでもよい。

[0045] Ｄ－グルカル酸を製造する場合は、基質となるＤ－グルコース、Ｄ－グルコン酸、Ｄ－グルクロン酸からなる群から選択される１または２以上の糖質に培養した細胞あるいはその処理物を添加して酸化反応を行う。Ｄ－グルクロン酸は、ＰＱＱ－ＡＬＤＨ（２）の作用によりＤ－グルカル酸に酸化されるが、その反応速度は遅く、かつ、Ｄ－グルクロン酸は、Ｄ－グルコースやＤ－グルコン酸に比べ価格が高いため、Ｄ－グルカル酸の出発原料としては

あまり適した基質ではない。また、中間体Ａを製造する場合にはＤ－グルコースを、中間体Ｂを製造する場合にはＤ－グルコースおよび／またはＤ－グルコン酸を出発原料として用いる。

[0046] 細胞の処理物とは、ホモジナイザーやガラスビーズなどを用い、物理的に破砕した細胞破砕液、界面活性剤や酵素などにより薬剤処理した細胞抽出液、これらのアセトン粉末のことである。また、細胞あるいは処理物を担体に固定化すれば、繰り返し使用することが可能となり、固定化の方法としては、セルロース担体、セラミック担体、ガラスビーズ担体などに吸着させる方法や、アルギン酸カルシウム、カラギーナンなどに包括する方法などが挙げられる。

[0047] 酸化反応時の基質濃度は、一般的には０．１～１０％（ｗ／ｖ）の範囲で、好ましくは１～５％（ｗ／ｖ）の範囲で該酸化反応を実施することが望ましい。しかし、Ｄ－グルコースを出発原料とする場合、基質濃度が低い時は、中間体Ｂを経由してＤ－グルカル酸が生成されやすく、基質濃度が高い時は、中間体Ａを経由してＤ－グルクロン酸が生成されやすいので、中間体Ｂあるいはグルカル酸を製造する場合には、Ｄ－グルコース濃度を１～２％（ｗ／ｖ）の範囲に、中間体Ａを製造する場合には、Ｄ－グルコース濃度を３～５％（ｗ／ｖ）の範囲に、それぞれ、調整することが好ましい。温度は、培養温度と同様に、１５～４５℃、好ましくは２０～４０℃、より好ましくは２５～３５℃の範囲である。ｐＨは、一般的にはｐＨ４～９の範囲で、特に５～８の範囲が好ましく、ｐＨを制御するために、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、炭酸カルシウムなどを添加してよい。

[0048] また、酸化反応時は、振とうや通気攪拌の手段が望ましく、反応時間は、Ｄ－グルカル酸を製造する場合には、反応液中の中間体Ｂが全て酸化された時を、中間体Ａを製造する場合には、Ｄ－グルコースが全て酸化された時を、中間体Ｂを製造する場合には、中間体ＡまたはＤ－グルコン酸が全て酸化された時を、それぞれ、終点とすることが好ましい。

[0049] 反応終了後、反応液からＤ－グルカル酸またはその塩を採取する方法につ

いては、本発明において特別な方法が必要とされることはない。すなわち、従来公知あるいは周知のイオン交換樹脂法、沈殿法、結晶化法などを組み合わせることにより実施することができる。また、中間体Ａや中間体Ｂまたはその塩の採取についても、特別な方法が必要とされることはない。

発明の効果

[0050] 本発明により、次のような効果が奏される。

１）Ｄ－グルカル酸生産能が向上した微生物を提供することができる。

２）Ｄ－グルカル酸生産能が向上した微生物を用いて、安価かつ効率的にＤ－グルカル酸を製造し、提供することができる。

３）Ｄ－グルカル酸の生成に関与するＰＱＱ－ＡＤＨ（１）とＰＱＱ－ＡＬＤＨ（２）の活性を有し、かつ、ケト酸類の生成に関与するＡＬＤＨ（３）活性が減弱もしくは消失することによってＤ－グルカル酸の生性能が向上したシュードグルコノバクター属に属する微生物を提供することができる。

４）Ｄ－グルコース、Ｄ－グルコン酸、Ｄ－グルクロン酸からなる群より選択される１または２以上の糖質からＰＱＱ－ＡＤＨ（１）およびＰＱＱ－ＡＬＤＨ（２）の２種類の酵素により触媒される反応によりＤ－グルカル酸またはその塩を製造する方法を提供することができる。

５）上記糖質にＤ－グルカル酸生成能を向上させた細胞またはその処理物を接触させＤ－グルカル酸を生産するＤ－グルカル酸またはその塩を製造する方法を提供することができる。

６）Ｄ－グルカル酸を製造する際に中間物質として生成するＤ－グルカルアルデヒド（中間体Ａ）およびＬ－グルロン酸（中間体Ｂ）を製造する方法を提供することができる。

７）配列番号１のアミノ酸配列またはそれと８０％以上の相同性を有するアミノ酸配列を有するアルコール脱水素酵素ＡＤＨ（１）、および、配列番号２のアミノ酸配列またはそれと８０％以上の相同性を有するアミノ酸配列を有するアルデヒド脱水素酵素ＡＬＤＨ（２）を提供することができる。

８）配列番号１のアミノ酸配列またはそれと８０％以上の相同性を有するア

ミノ酸配列を有するアルコール脱水素酵素ＡＤＨ（１）の遺伝子、および、配列番号２のアミノ酸配列またはそれと８０％以上の相同性を有するアミノ酸配列を有するアルデヒド脱水素酵素ＡＬＤＨ（２）の遺伝子の一方あるいは両方を宿主細胞に導入し、Ｄ－グルカル酸生産能を付与せしめた形質転換体を提供することができる。

９）Ｄ－グルカルアルデヒド（中間体Ａ）および／またはＬ－グルロン酸(中間体Ｂ)からＰＱＱ－ＡＬＤＨ（２）の反応によりＤ－グルカル酸またはその塩を生産する方法を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0051] [図1]ＰＱＱ－ＡＤＨ（１）およびＰＱＱ－ＡＬＤＨ（２）の反応特性を示した図である。矢印が大きいほど反応性が高いことを表している。

[図2]中間体Ａの質量分析結果を示した図である。

[図3]中間体Ｂの質量分析結果を示した図である。

[図4]中間体Ｂの^{1}Ｈ－ＮＭＲの測定結果を示した図である。

[図5]中間体Ｂの^{13}Ｃ－ＮＭＲの測定結果を示した図である。

[図6]中間体ＢのＨ，Ｈ－ＣＯＳＹ　ＮＭＲの測定結果を示した図である。

[図7]中間体ＢのＣ，Ｈ－ＣＯＳＹ　ＮＭＲの測定結果を示した図である。

[図8]イオン交換クロマトグラフィーの溶出パターンを示した図である。Ａ：Ｒｈ４７－３株、Ｂ：Ｋ５９１ｓ株

[図9]Ｄ－グルコースを基質とした場合の酸化反応の経時変化を示した図である。

[図10]Ｄ－グルコン酸ナトリウムを基質とした場合の酸化反応の経時変化を示した図である。

[図11]配列番号１の塩基配列およびアミノ酸配列を開示した図である。

[図12]配列番号１のつづきを開示した図である。

[図13]配列番号２の塩基配列およびアミノ酸配列を開示した図である。

[図14]配列番号２のつづきを開示した図である。

[図15]配列番号３の塩基配列およびアミノ酸配列を開示した図である。

[図16]配列番号３のつづきを開示した図である。

[図17]配列番号４～９の塩基配列を開示した図である。

発明を実施するための形態

[0052] 次に、実施例に基づいて本発明を具体的に説明するが、本発明は、以下の実施例によって何ら限定されるものではない。

実施例 1

[0053] 本実施例では、シュードグルコノバクター・サッカロケトゲネスによるＤ－グルカル酸生成能の比較を行った。

（１）シュードグルコノバクター・サッカロケトゲネスの培養

菌株として、シュードグルコノバクター・サッカロケトゲネスＲｈ４７－３株、シュードグルコノバクター・サッカロケトゲネスＴＨ１４－８６株、シュードグルコノバクター・サッカロケトゲネス１２－５株、シュードグルコノバクター・サッカロケトゲネスＫ５９１ｓ株、シュードグルコノバクター・サッカロケトゲネス１２－４株、シュードグルコノバクター・サッカロケトゲネス１２－１５株、シュードグルコノバクター・サッカロケトゲネス２２－３株を用いた。

[0054] これらの各菌株の寒天斜面培養菌を、１．０％乳糖、１．０％酵母エキス、２．０％コーンスティープリカー、０．３％硫酸アンモニウム（ｐＨ７．０）からなる前培養培地１０ｍＬを含む試験管にそれぞれ１白金耳植菌し、３０℃で７２時間振とう培養を行って前培養液を調製した。次に、２．０％乳糖、０．５％酵母エキス、１．０％コーンスティープリカー、０．５％硫酸アンモニウム、０．１％硫酸第一鉄、０．０１％塩化ランタン（ｐＨ７．０）からなる本培養培地１００ｍＬを含む坂口フラスコに、前培養液を１ｍＬ植菌し、３０℃で７２時間振とう培養を行った。

[0055] （２）ＡＤＨ（１）活性およびＡＬＤＨ（２および３）活性の測定

培養菌体のＡＤＨ（１）活性およびＡＬＤＨ（２および３）活性は、以下の方法により測定した。

１）ＡＤＨ（１）の活性測定方法

＜試薬＞

基質溶液：０．２Ｍグルコース溶液

緩衝液：ＭｃＩｌｖａｉｎｅ緩衝液（ｐＨ５．０）

フェリシアン化カリ溶液：０．１Ｍフェリシアン化カリウム溶液

反応停止液：硫酸第二鉄５ｇ、リン酸９５ｍＬを純水で溶解し、１Ｌにした。

[0056] ＜測定手順＞

培養液１ｍＬを１０，０００ｒｐｍで５分間遠心分離して菌体を回収した後、０．９％生理食塩水を１ｍＬ加え、菌体を懸濁した。この菌体懸濁液を０．９％生理食塩水で適宜希釈し、粗酵素液とした。試験管に緩衝液２５０μＬ、基質溶液５００μＬ、粗酵素液５０μＬを加え、３０℃で５分間予備加温した。

[0057] これに、フェリシアン化カリ溶液２００μＬを加え、酸化反応を開始させ、１０分後に反応停止液５００μＬを加え、反応を停止した。３．５ｍＬの純水を添加し、室温暗所に２０分間放置した後、６６０ｎｍにおける吸光度を測定した。対照としては、基質溶液の代わりに純水を用いた。なお、本測定法では、１分間に１μＭの基質を酸化するのに要する酵素量を１Ｕとして定義した。

[0058] ２）ＡＬＤＨ（２および３）の活性測定方法

＜試薬＞

基質溶液：０．２Ｍグリオキシル酸ナトリウム塩溶液（水酸化ナトリウムでｐＨ８．０に調整した）

緩衝液：ＭｃＩｌｖａｉｎｅ緩衝液（ｐＨ８．０）

その他の試薬の調製方法や測定手順は、ＡＤＨ（１）の活性測定方法に準じた。

[0059] 各菌株の酵素活性の結果を表１に示す。何れの菌株も、ＡＤＨ（１）活性は、同程度であったが、ＡＬＤＨ（２および３）活性は、Ｒｈ４７－３株は、他の菌株に比べ低い値を示した。

[0060] [表1]

表１ 各菌株のADH(1)活性とALDH(2および3)活性

菌株名	ADH(1)活性（U/mL）	ALDH(2および3)活性（U/mL）
Rh47-3株	3.8	27.3
TH14-86株	4.1	278.8
12-5株	4.3	170.0
K591s株	3.6	286.6
12-4株	4.0	118.6
12-15株	4.3	115.0
22-3株	3.7	143.3

[0061] （３）Ｄ－グルカル酸の生成反応

培養液１０ｍＬを、１０，０００ｒｐｍで５分間遠心分離し、菌体を回収した。得られた菌体に、等量の炭酸カルシウムを含む基質溶液（６０ｍＭ Ｄ－グルコース、１００ｍＭ Ｄ－グルコン酸ナトリウム、５０ｍＭ Ｄ－グルクロン酸ナトリウム）を、それぞれ１０ｍＬずつ添加し、３０℃で６０時間振とうしながら酸化反応を行った。反応生成物の分析は、反応液２０μＬに０．２Ｎ塩酸９８０μＬを添加して炭酸カルシウムを溶解させた後、以下の条件で分析した。

[0062] ＜反応生成物の分析方法＞

装置：ＤＩＯＮＥＸ社製 糖分析システムＩＣＳ－３０００

分析カラム：ＣａｒｂｏＰａｃ ＰＡ－１（内径４ｍｍ×２５０ｍｍ）

検出器：パルスドアンペロメトリー検出器

溶離液Ａ：１００ｍＭ水酸化ナトリウム

溶離液Ｂ：１Ｍ酢酸ナトリウムを含む１００ｍＭ水酸化ナトリウム

分析時間：１２分

グラジェント条件：分析開始から１２分間で溶離液Ｂの濃度を０％から１００％まで直線的に上昇させた。

カラム温度：３５℃

流速：１．０ｍＬ／分

[0063] 標準物質として、Ｄ－グルコース（和光純薬工業株式会社）、Ｄ－グルコン酸ナトリウム塩（和光純薬工業株式会社）、Ｄ－グルクロン酸ナトリウム塩一水和物（和光純薬工業株式会社）、２－ケト－Ｄ－グルコン酸ヘミカルシウム塩（和光純薬工業株式会社）、Ｄ－グルカル酸一カリウム塩（ＳＩＧＭＡ社）を用い、中間体Ａおよび中間体Ｂナトリウム塩は、実施例２および実施例３のようにして調製した。

[0064] Ｄ－グルコースに作用させた時の各生成物のモル収率をＲｈ４７－３株以外の菌株の場合と合わせて表２に示した。さらに、Ｄ－グルコン酸ナトリウムに作用させた時の各生成物のモル収率を表３に、Ｄ－グルクロン酸ナトリウムに作用させた時の各生成物のモル収率を表４に、それぞれ、示した。何れの基質に作用させた場合も、Ｒｈ４７－３株が最もＤ－グルカル酸を生成した。Ｒｈ４７－３株以外の菌株では、Ｄ－グルコースやＤ－グルコン酸ナトリムに作用させた場合には、２－ケト－Ｄ－グルコン酸を、Ｄ－グルクロン酸ナトリウムに作用させた場合には、２種類の未知物質を、それぞれ、主に生成した。

[0065] [表2]

表２ D-グルコースに作用させた時の各生成物のモル収率（%）

菌株名	D-グルクロン酸	D-グルカル酸	2-ケト-D-グルコン酸	その他
Rh47-3 株	25.6	50.3	1.3	22.8
TH14-86 株	6.7	12.9	60.8	19.6
12-5 株	18.2	10.4	49.5	21.9
K591s 株	9.4	19.1	53.7	17.8
12-4 株	16.3	8.4	57.0	18.3
12-15 株	12.1	11.0	61.2	15.7
22-3 株	11.5	13.1	55.5	19.9

[0066]

[表3]

表３　D-グルコン酸ナトリウム塩に作用させた時の各生成物のモル収率（%）

菌株名	中間体B	D-グルカル酸	2-ケト-D-グルコン酸	その他
Rh47-3株	1.6	81.2	2.8	14.4
TH14-86株	0	9.7	61.3	29.0
12-5株	0	22.3	53.7	24.0
K591s株	0	27.2	47.3	25.5
12-4株	0	6.4	65.9	27.7
12-15株	0	22.1	51.6	26.3
22-3株	0	16.2	55.3	28.5

[0067] [表4]

表４　D-グルクロン酸ナトリウム塩に作用させた時の各生成物のモル収率（%）

菌株名	D-グルクロン酸	D-グルカル酸	その他
Rh47-3株	58.6	36.1	5.3
TH14-86株	32.1	12.4	55.5
12-5株	41.2	16.5	42.3
K591s株	20.8	21.3	57.9
12-4株	42.5	18.8	38.7
12-15株	39.3	11.7	49.0
22-3株	37.7	10.9	51.4

実施例 2

[0068] 本実施例では、シュードグルコノバクター・サッカロケトゲネスによるＤ－グルカル酸生成時の中間体Ａの調製と構造確認を行った。

（１）中間体Ａの調製方法

５％（ｗ／ｖ）　Ｄ－グルコース溶液５００ｍＬに、上記の方法に従って培養したシュードグルコノバクター・サッカロケトゲネスＲｈ４７－３株の洗浄菌体（本培養５００ｍＬ分）を添加し、３０℃、１５０ｒｐｍ、通気量０．２Ｌ／分で酸化反応を開始した。

[0069] １Ｍ水酸化ナトリウム溶液で、ｐＨを７．０に調整しながら、経時的に分析を行い、Ｄ－グルコースが完全に酸化された時点で、１０，０００ｒｐｍ、１０分間遠心分離し、反応液（中間体Ａ：１７．８％、中間体Ｂ：２．８％、Ｄ－グルクロン酸：７５．２％、Ｄ－グルカル酸：１．９％、その他：

２．３％）を回収した。

[0070] 回収した反応液の一部（固形分５．０ｇ）を１Ｌの強酸性イオン交換樹脂ＰＫ－２１６（三菱化学株式会社）を充填したカラムと３Ｌの弱塩基性イオン交換樹脂ＩＲＡ－９６ＳＢ（オルガノ株式会社）を充填したカラムに連続して供し、中間体Ａのみを溶出した。溶出液は、１％（ｗ／ｗ）活性炭を添加し、脱色した後、凍結乾燥を行い、純度９８．０％の中間体Ａ粉末を０．８ｇ得た。

[0071] （２）中間体Ａの構造確認

中間体Ａのメタノール溶液を用い、以下の分析条件下、質量分析を行った。

装置：Ｔｈｅｒｍｏ Ｑｕｅｓｔ社製ＦＩＮＮＩＧＡＮ ＬＣＱ－ＤＥＣＡ質量分析装置

イオン源：ＥＳＩ

スプレー電圧：７ｋＶ

キャピラリー電圧：－１１Ｖ

キャピラリー温度：１５０℃

試料濃度：５０μｇ／ｍＬ

試料導入速度：１０μＬ／ｍｉｎ

[0072] 中間体Ａの質量分析結果を、図２に示す。その結果、［Ｍ－Ｈ］$^{-}$１７６．９および［$Ｍ_{2}$－Ｈ］$^{-}$３５４．８の負イオンピークを検出した。また、蟻酸の存在下、［Ｍ＋ＨＣＯＯ］$^{-}$２２２．８および［$Ｍ_{2}$＋ＨＣＯＯ］$^{-}$４００．７の２種類の負イオンピークを検出した。ピーク強度から、蟻酸との複合体は、脱プロトンにより生じる負イオンよりも容易に生じるものと推定され、ジカルボン酸ではなく、分子質量１７８のジアルデヒドであることが確認された。

[0073] また、中間体Ａ試料水溶液を用いて、ソモギ・ネルソン法による還元力測定、およびフェノール硫酸法による全糖量測定を行った。その結果、（還元糖量）／（全糖量）の比は８．０２となり、強い還元性を有していることが

確認された。これらの結果から、中間体Ａの構造は、Ｄ－グルコースの Ｃ１位およびＣ６位の両方がアルデヒドとなった、Ｄ－グルカルアルデヒドと推定された。

実施例 3

[0074] 本実施例では、シュードグルコノバクター・サッカロケトゲネスによるＤ－グルカル酸生成時の中間体Ｂの調製と構造確認を行った。

（１）中間体Ｂナトリウム塩の調製方法

３％（ｗ／ｖ） Ｄ－グルコン酸ナトリウム溶液５００ｍＬに、上記の方法に従って培養したシュードグルコノバクター・サッカロケトゲネスＲｈ４７－３株の遠心菌体（本培養５００ｍＬ分）を添加し、３０℃、１５０ｒｐｍ、通気量０．２Ｌ／分で酸化反応を開始した。１Ｍ水酸化ナトリウム溶液で、ｐＨを７．０に調整しながら、経時的に分析を行い、Ｄ－グルコン酸が完全に酸化された時点で、１０，０００ｒｐｍ、１０分間遠心分離し、反応液（中間体Ｂ：７１．４％、Ｄ－グルカル酸：２６．０％、その他：２．６％）を回収した。

[0075] 回収した反応液の一部（固形分５．０ｇ）を固形分が７０％になるまで濃縮した後、２０℃まで冷却し、中間体Ｂナトリウム塩を結晶化した。３０％（ｖ／ｖ）エタノールで結晶を洗浄した後、３０℃で３時間減圧乾燥し、純度９９．５％の中間体Ｂナトリウム塩結晶を１．３ｇ得た。

[0076] （２）中間体Ｂの構造確認

中間体Ｂのメタノール溶液を用い、以下の分析条件下、質量分析を行った。

装置：Ｔｈｅｒｍｏ Ｑｕｅｓｔ社製ＦＩＮＮＩＧＡＮ ＬＣＱ－ＤＥＣＡ質量分析装置

イオン源：ＥＳＩ

スプレー電圧：５ｋＶ

キャピラリー電圧：－１１Ｖ

キャピラリー温度：２５０℃

試料濃度：５０μｇ／ｍＬ

試料導入速度：１０μＬ／ｍｉｎ

[0077] 中間体Ｂの質量分析結果を、図３に示す。

その結果、［M_2－Ｈ］$^-$１９３．０および［M_2－Ｈ］$^-$３８６．８、Ｎａ［M_2－H_2］$^-$４０８．９の負イオンピークを検出し、中間体Ｂの分子質量は、１９４と推定された。

また、中間体Ｂの^{1}Ｈ－ＮＭＲ（３００ＭＨｚ，D_2O）測定結果を、図４に、^{13}Ｃ－ＮＭＲ（７５ＭＨｚ，D_2O）測定結果を図５に、Ｈ，Ｈ－ＣＯＳＹ（３００ＭＨｚ，D_2O）測定結果を図６に、Ｃ，Ｈ－ＣＯＳＹ（７５ＭＨｚ，D_2O）測定結果を図７に、それぞれ、示す。

[0078] ^{1}Ｈ－ＮＭＲおよび^{13}Ｃ－ＮＭＲの測定結果から、各スペクトルを下記のように帰属した。^{1}Ｈ－ＮＭＲ（３００ＭＨｚ，D_2O）δ４．８６（ｄ，１Ｈ，$^3J_{1,2}$＝８．６Ｈｚ，Ｈ１），４．３３（ｓ，１Ｈ，Ｈ５），４．０８（ｓ，２Ｈ，Ｈ３ ａｎｄ Ｈ４），３．６３（ｄ，１Ｈ，$^3J_{1,2}$＝８．６Ｈｚ，Ｈ１）．^{13}Ｃ－ＮＭＲ（７５ＭＨｚ，D_2O）δ１７８．６（Ｃ６），９６．２（Ｃ１），７７．１（Ｃ５），７４．０（Ｃ３ ｏｒ Ｃ４），７３．８（Ｃ４ ｏｒ Ｃ３），７１．５（Ｃ２）。

[0079] 以上の結果から、中間体Ｂの構造は、Ｄ－グルコースの両端にカルボキシル基およびアルデヒド基を１残基ずつ有する構造であって、かつＤ－グルクロン酸とは異なることから、Ｌ－グルロン酸（Ｌ－グロースのウロン酸）と推定された。

実施例 4

[0080] 本実施例では、ＡＤＨ（１）、ＡＬＤＨ（２）およびＡＬＤＨ（３）の精製を行った。

（１）シュードグルコノバクター・サッカロケトゲネスの培養

シュードグルコノバクター・サッカロケトゲネスＲｈ４７－３株およびシュードグルコノバクター・サッカロケトゲネスＫ５９１ｓ株の寒天斜面培養

菌を、１．０％乳糖、１．０％酵母エキス、２．０％コーンスティープリカー、０．３％硫酸アンモニウム（ｐＨ７．０）からなる種培養培地１０ｍＬを含む試験管にそれぞれ１白金耳植菌し、３０℃で７２時間、振とう培養を行った。

[0081] 次に、１．０％乳糖、１．０％酵母エキス、２．０％コーンスティープリカー、０．３％硫酸アンモニウム（ｐＨ７．０）からなる前培養培地１００ｍＬを含む坂口フラスコ３本に、それぞれ、種培養菌液を１ｍＬずつ植菌し、３０℃で７２時間、振とう培養を行った。

[0082] 最後に、２．０％乳糖、０．５％酵母エキス、１．０％コーンスティープリカー、０．５％硫酸アンモニウム、０．１％硫酸第一鉄、０．０１％塩化ランタン（ｐＨ７．０）からなる本培養培地３０Ｌを含む発酵槽に、前培養菌液を全量植菌し、３０℃、通気１０Ｌ／分、撹拌２５０ｒｐｍの条件で７２時間本培養を行った。培養液は、１０，０００ｒｐｍで１０分間遠心分離を行い、回収した菌体は、０．９％生理食塩水で２回洗浄した。この様にして、３０Ｌの培養液から、それぞれ、約９０ｇの湿潤菌体を得た。

[0083] （２）菌体抽出画分の調製

回収した湿潤菌体３０ｇを、１０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ６．５）１００ｍＬに懸濁した後、フレンチプレスで菌体を破砕した。破砕液は、１８，０００ｒｐｍにて１５分間遠心を行い、上清を回収した。得られた上清は、さらに、３０，０００ｒｐｍにて６０分間遠心し、上清を菌体抽出画分として回収した。

[0084] （３）イオン交換クロマトグラフィー

Ｒｈ４７－３株およびＫ５９１ｓ株の菌体抽出画分を、それぞれ、１００ｍＭグリセロールを含む１０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ６．５）（以後、緩衝液と略す。）で平衡化したＴＯＹＯＰＥＡＲＬ　ＤＥＡＥ－６５０Ｍ（東ソー株式会社）充填カラム（内径５．６ｃｍ×５ｃｍ）に供した。

[0085] 緩衝液１５０ｍＬでカラムを洗浄した後、緩衝液中の塩化ナトリウム濃度が５００ｍＬで０．３５Ｍになるような直線グラジェントにて酵素を溶出し

た。５ｍＬずつ分取し、各フラクションのＡＤＨ（１）活性およびＡＬＤＨ（２および３）活性を実施例１に示した活性測定法に従って測定した。

[0086] 図８（Ａ：Ｒｈ４７－３株、Ｂ：Ｋ５９１ｓ株）に、溶出パターンを示した。ＡＤＨ（１）活性を有するピークは、Ｒｈ４７－３株、Ｋ５９１ｓ株ともほぼ同じ位置に溶出した。このＡＤＨ（１）活性画分を、それぞれ回収し、分画分子量１０，０００の限外濾過膜で濃縮・脱塩を行った。

[0087] 一方、ＡＬＤＨ（Ｒｈ４７－３株は２、Ｋ５９１ｓ株は３）活性を有するピークは、Ｒｈ４７－３株では、ＡＤＨ（１）活性画分の前に、Ｋ５９１ｓ株では、ＡＤＨ（１）活性画分の前後に、２種類確認された。これらの活性ピークのうち、活性が高いピークＡ（Ｒｈ４７－３株）とピークＢ（Ｋ５９１ｓ株）の画分をそれぞれ回収し、分画分子量１０，０００の限外濾過膜で濃縮・脱塩を行った。なお、Ｒｈ４７－３株、Ｋ５９１ｓ株ともに非吸着画分にもＡＬＤＨ（３）活性が認められたが、これらの酵素は活性が低いため精製は行わなかった。

[0088] （４）疎水クロマトグラフィー

イオン交換クロマトグラフィーで得られた各画分約３ｍＬに３Ｍ硫酸アンモニウムを含む緩衝液を等量加えた後、１０，０００ｒｐｍで２０分間遠心し不溶物を除去した。得られた上清は、１．５Ｍ硫酸アンモニウムを含む緩衝液で平衡化したＴＯＹＯＰＥＡＲＬ　Ｂｕｔｙｌ－６５０（東ソー株式会社）充填カラム（内径３．０ｃｍ×１０ｃｍ）に供した。

[0089] １．５Ｍ硫酸アンモニウム含む緩衝液１００ｍＬでカラムを洗浄した後、硫酸アンモニウム濃度が３００ｍＬで０Ｍになるような直線グラジェントにて吸着した酵素を溶出させた。ＡＤＨ（１）活性およびＡＬＤＨ（Ｒｈ４７－３株は２、Ｋ５９１ｓ株は３）活性の各画分を回収し、分画分子量１０，０００の限外濾過膜で濃縮・脱塩を行った。なお、Ｋ５９１ｓ株では、非吸着画分にもＡＬＤＨ（３）活性が認められたが、この酵素は活性が低いため、これ以上の精製は行わなかった。

[0090] （５）ゲルろ過クロマトグラフィー

疎水クロマトグラフィーで得られた各画分を、０．１Ｍ塩化ナトリウムを含んだ１０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ６．５）で平衡化したＴＳＫ－ｇｅｌＧ３０００ＳＷカラム（内径６．０ｍｍ×４０ｃｍ、東ソー株式会社）に供した。流速０．６ｍＬ／分で溶出させ、検出はＵＶ検出器（２８０ｎｍ）を用いた。

[0091] このようにして、Ｒｈ４７－３株およびＫ５９１ｓ株からＡＤＨ（１）活性を有するＰＱＱ－ＡＤＨ（１）を、Ｒｈ４７－３株からＡＬＤＨ（２）活性を有するＰＱＱ－ＡＬＤＨ（２）を、Ｋ５９１ｓ株からＡＬＤＨ（３）活性を有するＰＱＱ／Ｈｅｍｅ－ＡＬＤＨ（４）をそれぞれ精製した。精製酵素の総活性、総タンパク質量、比活性は、表５の通りであった。

[0092] [表5]

表５ 精製酵素の総活性、総タンパク質量、比活性

酵素の種類		総活性（U）	総タンパク質量（mg）	比活性（U/mg）
Rh47-3株	PQQ-ADH(1)	2,054	53.2	38.6
	PQQ-ALDH(2)	22,320	2.5	8,928
K591s株	PQQ-ADH(1)	1,408	39.1	36.0
	PQQ/Heme-ALDH(4)	132,775	4.8	27,661

実施例 5

[0093] 本実施例では、ＰＱＱ－ＡＤＨ（１）の特性解析を行った。

シュードグルコノバクター・サッカロケトゲネスＲｈ４７－３株およびシュードグルコノバクター・サッカロケトゲネスＫ５９１ｓ株から精製したＡＤＨ（１）は、同一の性質を示し、ＰＱＱ－ＡＤＨ（１）と同定された。

[0094] （１）分子量

精製酵素を、ＳＤＳ－ＰＡＧＥで解析した結果、本酵素の分子量は、６４，０００±５，０００と算出された。次に、実施例４の（５）に記載したゲルろ過クロマトグラフィーで分子量を求めたところ、分子量は、１２０，０００±１０，０００と算出された。従って、本酵素は、単一サブユニットからなる２量体であると推定された。

[0095] （２）Ｎ末端アミノ酸配列

精製酵素を、ＰＶＤＦ膜に転写させた後、本酵素のＮ配列アミノ酸配列を

全自動タンパク質一次構造分析装置ＰＰＳＱ－２１Ａ（株式会社島津製作所）で解析したところ、アミノ酸配列は、Ａｌａ－Ｇｌｕ－Ｔｈｒ－Ｔｈｒ－Ｓｅｒ－Ｇｌｕ－Ａｒｇ－Ｌｅｕ－Ｌｅｕ－Ａｓｎであった。

[0096] （３）補欠分子族

精製酵素溶液５０μＬ（３６０．０μｇ）に、１Ｎ塩酸を５０μＬ、メタノールを２５０μＬ加えてよく混和した後、１２，０００ｒｐｍで５分間遠心した。上清液２０μＬを、下記の条件にて、ＨＰＬＣ分析を行った。また、上清液５０μＬに、２ｍＭジチオトレイトール（ＤＴＴ）を１０μＬ加えた後、同様に、ＨＰＬＣにて分析を行い、酵素にピロロキノリンキノン（ＰＱＱ）が含まれているかを調べた。

[0097] カラム：Ｃａｄｅｎｚａ　ＣＤ－Ｃ１８（内径４．６ｍｍ×７．５ｃｍ、インタクト株式会社）

移動相：１％（ｖ／ｖ）８５％リン酸を含む３０％（ｖ／ｖ）メタノール

流速：１．０ｍＬ／分

温度：３５℃

検出器：ＵＶ（２５４ｎｍ）

[0098] その結果、酵素抽出物液とＰＱＱ標品（ピロロキノリンキノン二ナトリウム塩、関東化学株式会社）は、同じ保持時間を示した。また、酵素抽出液をＤＴＴで還元させた後の保持時間は、ＰＱＱ標品をＤＴＴで還元させた保持時間と一致した。以上の結果から、ＰＱＱ－ＡＤＨ（１）は、ＰＱＱを構成成分として有することが示唆された。

[0099] （４）至適ｐＨ

ｐＨ３．０～１０．０の０．１５Ｍ　ＧＴＡ緩衝液を用いて、酸化活性を測定した結果、ＰＱＱ－ＡＤＨ（１）の至適ｐＨは、５．０～５．５であった。

[0100] （５）基質特異性

各基質（Ｄ－グルコース、Ｄ－グルコン酸ナトリウム、Ｄ－グルクロン酸ナトリウム、中間体Ａ、中間体Ｂナトリウム）を、Ｍｃｌｌｖａｉｎｅ緩衝

液（ｐＨ５．０）で溶解し、実施例１に示したＡＤＨの活性測定法に従って、ＰＱＱ－ＡＤＨ（１）の基質特異性を測定した。結果を、表６に示す。なお、各基質に対する酵素活性は、Ｄ－グルコースを基質とした場合の酵素活性を１００とした相対活性で示した。

[0101] [表6]

表 6 PQQ-ADH(1)の基質特異性

基質	相対活性(%)
0.2M D-グルコース	100
0.2M D-グルコン酸ナトリウム	88.6
0.2M D-グルクロン酸ナトリウム	＜1
0.02M 中間体 A	59.1
0.2M 中間体 B ナトリウム	2.7

[0102] （６）反応生成物の解析

５０ｍＭ 炭酸カルシウムを含む基質溶液（５０ｍＭ Ｄ－グルコース、５０ｍＭ Ｄ－グルコン酸ナトリウム、５０ｍＭ Ｄ－グルクロン酸ナトリウム、５０ｍＭ 中間体Ａ、５０ｍＭ 中間体Ｂナトリウム）１００μＬに、１００ｍＭフェリシアン化カリウム溶液９０μＬ、精製ＰＱＱ－ＡＤＨ（１）溶液１０μＬ（４６Ｕ）を加え、３０℃で酸化反応を開始した。反応生成物は、実施例１に示した糖分析システムにて定量した。反応開始１６時間後の反応生成物のモル収率の結果を、表７に示す。

[0103] [表7]

表 7 反応生成物のモル収率(%)

基質	D-グルコース	D-グルコン酸	中間体 A	中間体 B	D-グルクロン酸	D-グルカル酸
D-グルコース	1.3	0	68.8	0	29.9	0
D-グルコン酸ナトリウム	−	22.6	−	77.4	−	0
D-グルクロン酸ナトリウム	−	−	−	−	100.0	0
中間体 A	−	−	32.7	0.8	66.5	0
中間体 B ナトリウム	−	−	−	97.9	−	2.1

実施例 6

[0104] 本実施例では、ＰＱＱ－ＡＬＤＨ（２）の特性解析を行った。

シュードグルコノバクター・サッカロケトゲネスＲｈ４７－３株から精製したＰＱＱ－ＡＬＤＨ（２）は、以下の性質を示した。

[0105] （１）分子量

精製酵素溶液を、ＳＤＳ－ＰＡＧＥで解析した結果、本酵素の分子量は、６１，０００±５，０００と算出された。次に、実施例４の（５）に記載した条件のゲルろ過クロマトグラフィーで、分子量を求めたところ、分子量は、１８０，０００±１０，０００と算出された。従って、本酵素は、単一サブユニットからなる３量体であると推定された。

[0106] （２）Ｎ末端アミノ酸配列

精製酵素溶液を、ＰＶＤＦ膜に転写させた後、本酵素のＮ末端アミノ酸配列を全自動タンパク質一次構造分析装置で解析したが、Ｎ末端はブロックされており、アミノ酸配列を決定することができなかった。

[0107] （３）内部アミノ酸配列

精製酵素溶液１００μＬ（２２０．８μｇ）に、Ｖ８プロテアーゼ溶液（０．１ｍｇのＶ８プロテアーゼを０．１Ｍ　トリス塩酸緩衝液（ｐＨ８．０）１ｍＬに溶解したもの）　１０μＬを加え、３０℃で１６時間反応を行った。ペプチド断片は、ＳＤＳ－ＰＡＧＥにて分離した後、ＰＶＤＦ膜に転写させた。

[0108] 本酵素の内部アミノ酸配列を全自動タンパク質一次構造分析装置で解析したところ、分子量１７ｋＤａのペプチド断片のアミノ酸配列は、Ｐｈｅ－Ｘａａ－Ｓｅｒ－Ａｓｎ－Ｔｈｒ－Ａｓｐ－Ｖａｌ－Ａｓｎ－Ｐｒｏ－Ｌｅｕであった。

[0109] （４）補欠分子族

実施例５の（３）に記載の方法で分析を行った結果、ＰＱＱ－ＡＬＤＨ（２）は、ＰＱＱを構成成分として有することが示唆された。

[0110] （５）至適ｐＨ

ｐＨ４．０～１０．０のＧＴＡ緩衝液を用いて、酸化活性を測定した結果、ＰＱＱ－ＡＬＤＨ（２）の至適ｐＨは、７．５～８．０であった。

[0111] （６）基質特異性

各基質（Ｄ－グルコース、Ｄ－グルコン酸ナトリウム、Ｄ－グルクロン酸

ナトリウム、中間体Ａ、中間体Ｂナトリウム、グリオキシル酸ナトリウム）を、Ｍｃｌｖａｉｎｅ緩衝液（ｐＨ８．０）で溶解し、実施例１に示したＡＬＤＨの活性測定法に従って、ＰＱＱ－ＡＬＤＨ（２）の基質特異性を測定した。その結果を、表８に示す。各基質に対する酵素活性は、中間体Ｂナトリウムを基質とした場合の酵素活性を１００とした相対活性で示した。

[0112] [表8]

表 8 PQQ-ALDH(2)の基質特異性

基質	相対活性(%)
0.2M D-グルコース	11.8
0.2M D-グルコン酸ナトリウム	<1
0.2M D-グルクロン酸ナトリウム	18.6
0.02M 中間体 A	476
0.2M 中間体 B ナトリウム	100
0.2M グリオキシル酸ナトリウム	3,050

[0113] （７）反応生成物の解析

５０ｍＭ 炭酸カルシウムを含む基質溶液（５０ｍＭ Ｄ－グルコース、５０ｍＭ Ｄ－グルコン酸ナトリウム、５０ｍＭ Ｄ－グルクロン酸ナトリウム、５０ｍＭ 中間体Ａ、５０ｍＭ 中間体Ｂナトリウム）１００μＬに、１００ｍＭフェリシアン化カリウム溶液９０μＬ、精製ＰＱＱ－ＡＬＤＨ（２）溶液１０μＬ（１８８Ｕ）を加え、３０℃で酸化反応を開始した。反応生成物は、実施例１に示した糖分析システムにて定量した。反応開始１６時間後の反応生成物のモル収率の結果を、表９に示す。

[0114] [表9]

表 9 反応生成物のモル収率(%)

基質	D-グルコース	D-グルコン酸	中間体 A	中間体 B	D-グルクロン酸	D-グルカル酸
D-グルコース	97.8	2.2	0	0	0	0
D-グルコン酸ナトリウム	−	100.0	−	0	−	0
D-グルクロン酸ナトリウム	−	−	−	−	93.5	6.5
中間体 A	−	−	0.8	23.4	59.8	16.0
中間体 B ナトリウム	−	−	−	67.7	−	32.3

実施例 7

[0115] 本実施例では、ＰＱＱ／Ｈｅｍｅ－ＡＬＤＨ（４）の特性解析を行った。シュードグルコノバクター・サッカロケトゲネスＫ５９１ｓ株から精製し

たＰＱＱ／Ｈｅｍｅ－ＡＬＤＨ（４）は、以下の性質を示した。

[0116] （１）分子量

精製酵素溶液を、ＳＤＳ－ＰＡＧＥで解析した結果、本酵素の分子量は、５９，０００±５，０００と算出された。次に、実施例４の（５）に記載した条件のゲルろ過クロマトグラフィーで分子量を求めたところ、分子量は、１３０，０００±１０，０００と算出された。従って、本酵素は、単一サブユニットからなる２量体であると推定された。

[0117] （２）Ｎ末端アミノ酸配列

精製酵素溶液を、ＰＶＤＦ膜に転写させた後、本酵素のＮ末端アミノ酸配列を全自動タンパク質一次構造分析装置で解析したが、Ｎ末端はブロックされており、アミノ酸配列を決定することができなかった。

[0118] （３）内部アミノ酸配列

精製酵素溶液１００μＬ（２００．５μｇ）に、Ｖ８プロテアーゼ溶液（０．１ｍｇのＶ８プロテアーゼを０．１Ｍ　トリス塩酸緩衝液（ｐＨ８．０）１ｍＬに溶解したもの）　１０μＬを加え、２７℃で１６時間反応を行った。ペプチド断片は、ＳＤＳ－ＰＡＧＥにて分離した後、ＰＶＤＦ膜に転写させた。本酵素の内部アミノ酸配列を全自動タンパク質一次構造分析装置で解析したところ、分子量３７ｋＤａのペプチド断片のアミノ酸配列は、Ａｌａ－Ｓｅｒ－Ｔｒｐ－Ａｓｎ－Ｇｌｙ－Ｖａｌ－Ｐｒｏ－Ｐｒｏ－Ｇｌｕ－Ａｓｎであった。

[0119] （４）補欠分子族

実施例５の（３）に記載の方法で分析を行った結果、ＰＱＱ／Ｈｅｍｅ－ＡＬＤＨ（４）は、ＰＱＱを構成成分として有することが示唆された。また、精製酵素溶液（１００．４μｇ／ｍＬ）に、１Ｍ　トリス塩酸緩衝液（Ｈ９．０）を１／２０量添加した後、終濃度が５ｍＭになるよう亜ジチオン酸ナトリウムを加えた溶液の吸収スペクトルを測定した。その結果、５２２および５５０ｎｍに吸収極大が認められたことから、ＰＱＱ／Ｈｅｍｅ－ＡＬＤＨ（４）は、ＰＱＱの他にヘムｃを補欠分子族として有することが示唆さ

れた。

[0120] （５）至適ｐＨ

ｐＨ４．０～１０．０のＧＴＡ緩衝液を用いて、酸化活性を測定した結果、ＰＱＱ－ＡＬＤＨ（４）の至適ｐＨは、７．５～８．０であった。

[0121] （６）基質特異性

各基質（Ｄ－グルコース、Ｄ－グルコン酸ナトリウム、Ｄ－グルクロン酸ナトリウム、中間体Ａ、中間体Ｂナトリウム、グリオキシル酸ナトリウム）を、ＭｃＩｌｖａｉｎｅ緩衝液（ｐＨ８．０）で溶解し、実施例１に示したＡＬＤＨの活性測定法に従って、ＰＱＱ／Ｈｅｍｅ－ＡＬＤＨ（４）の基質特異性を測定した。その結果を、表１０に示す。各基質に対する酵素活性は、Ｄ－グルコン酸ナトリウムを基質とした場合の酵素活性を１００とした相対活性で示した。

[0122] [表10]

表 10 PQQ/Heme-ALDH(4)の基質特異性

基質	相対活性(%)
0.2M D-グルコース	35.1
0.2M D-グルコン酸ナトリウム	100
0.2M D-グルクロン酸ナトリウム	2.9
0.02M 中間体 A	11.6
0.2M 中間体 B ナトリウム	21.1
0.2M グリオキシル酸ナトリウム	20,260

[0123] （７）反応生成物の解析

５０ｍＭ　炭酸カルシウムを含む基質溶液（５０ｍＭ　Ｄ－グルコース、５０ｍＭ　Ｄ－グルコン酸ナトリウム、５０ｍＭ　Ｄ－グルクロン酸ナトリウム、５０ｍＭ　中間体Ａ、５０ｍＭ　中間体Ｂナトリウム）１００μＬに、１００ｍＭフェリシアン化カリウム溶液９０μＬ、精製ＰＱＱ／Ｈｅｍｅ－ＡＬＤＨ（４）溶液１０μＬ（１，６８０Ｕ）を加え、３０℃で酸化反応を開始した。反応生成物は、実施例１に示した糖分析システムにて定量した。反応開始１６時間後の反応生成物のモル収率の結果を、表１１に示す。Ｄ－グルクロン酸ナトリウムを基質にした場合のみ、僅かにＤ－グルカル酸が

生成した。

[0124] [表11]

表 11 反応生成物のモル収率(%)

基質	D-グルコース	D-グルコン酸	中間体A	中間体B	2-ケト-D-グルコン酸	D-グルクロン酸	D-グルカル酸	その他
D-グルコース	22.4	0.8	0	0	72.1	0	0	4.7
D-グルコン酸ナトリウム	−	0	−	0	84.8	−	0	15.2
D-グルクロン酸ナトリウム	−	−	−	−	−	94.1	5.3	0.6
中間体A	−	−	69.6	12.0	−	0	0	18.4
中間体Bナトリウム	−	−	−	58.1	−	0	0	41.9

実施例 8

[0125] 本実施例では、精製酵素によるＤ－グルカル酸の生成反応を行った。

５０ｍＭ 炭酸カルシウムを含む基質溶液（５０ｍＭ Ｄ－グルコース、５０ｍＭ Ｄ－グルコン酸ナトリウム、５０ｍＭ Ｄ－グルクロン酸ナトリウム）１００μＬに、１００ｍＭフェリシアン化カリウム溶液９０μＬ、精製酵素溶液（ＰＱＱ－ＡＤＨ（１）：２３Ｕ、ＰＱＱ－ＡＬＤＨ（２）：９４Ｕ、ＰＱＱ／Ｈｅｍｅ－ＡＬＤＨ（４）：８４０Ｕ）または純水を各５μＬ加え、３０℃で３６時間反応を行い、実施例１に示した糖分析システムにて、生成したＤ－グルカル酸あるいは２－ケト－Ｄ－グルコン酸を定量した。

[0126] その結果を、表１２に示す。ＰＱＱ－ＡＤＨ（１）とＰＱＱ－ＡＬＤＨ（２）を組み合わせることにより、Ｄ－グルコースや Ｄ－グルコン酸からＤ－グルカル酸が生成した。一方、ＰＱＱ－ＡＤＨ（１）とＰＱＱ／Ｈｅｍｅ－ＡＬＤＨ（４）の組み合わせでは、Ｄ－グルコースや Ｄ－グルコン酸からＤ－グルカル酸は全く生成せず、２－ケト－Ｄ－グルコン酸が主に生成した。

[0127]

[表12]

表 12 精製酵素による D-グルカル酸、2-ケト-D-グルコン酸の生成反応

基質	反応条件	生成量（mM）	
		D-グルカル酸	2-ケト-D-グルコン酸
D-グルコース	PQQ-ADH(1) ＋ 純水	0	0
	PQQ-ALDH (2)＋ 純水	0	0
	PQQ-ADH(1) ＋ PQQ-ALDH(2)	12.8	0
	PQQ-ADH(1) ＋ PQQ/Heme-ALDH(4)	0	18.3
D-グルコン酸ナトリウム	PQQ-ADH(1) ＋ 純水	0	0
	PQQ-ALDH(2) ＋ 純水	0	0
	PQQ-ADH(1) ＋ PQQ-ALDH(2)	21.7	0
	PQQ-ADH(1) ＋ PQQ/Heme-ALDH(4)	0	24.1
D-グルクロン酸ナトリウム	PQQ-ADH(1) ＋ 純水	0	0
	PQQ-ALDH(2) ＋ 純水	2.8	0
	PQQ-ADH(1) ＋ PQQ-ALDH(2)	2.5	0
	PQQ-ADH(1) ＋ PQQ/Heme-ALDH(4)	3.3	0

実施例 9

[0128] 本実施例では、シュードグルコノバクター・サッカロケトゲネスＲｈ４７－３株のゲノムドラフト解析を行った。

シュードグルコノバクター・サッカロケトゲネスＲｈ４７－３株の培養菌体からＧｅｎＥｌｕｔｅ ＴＭ Ｂａｃｔｅｒｉａｌ Ｇｅｎｏｍｉｃ ＤＮＡ ｋｉｔ（ＳＩＧＭＡ社）を用いて、ゲノムＤＮＡを回収した。ゲノムＤＮＡは、５００ｂｐ程度のサイズに断片化した後、ビオチン付きアダプターをライゲーションした。ストレプトアビシン磁気ビーズを用いて、一本鎖ＤＮＡを回収し、バイオアナライザー２１００（Ａｇｉｌｅｎｔ社）にてＤＮＡのサイズおよび濃度を確認した。

[0129] 一本鎖ＤＮＡとアダプター相補配列が固定化されたビーズを混合後、エマルジョンＰＣＲを行った。ＰＣＲ後、適正量のビーズをプレートに添加し、ＧＳ Ｔｉｔａｎｉｕｍ Ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ ｋｉｔ ＸＬＲ７０およびＧｅｎｏｍｅ Ｓｅｑｕｅｎｃｅｒ ＦＬＸ Ｓｙｓｔｅｍ（ロシュ・ダイアグノスティクス社）を用いたピロシーケンス法により、塩基配列を解析した。

[0130] その結果、解析総塩基数は、１０６，７３７，１８１ｂａｓｅ、４ｋｂａｓｅ以上のコンティグ数は、２０、４ｋｂａｓｅ以上の総コンティグ塩基数

は、３，８７５，２２７ｂａｓｅであった。

[0131] 解析した塩基配列中には、推定されるアミノ酸翻訳領域が４，３４５箇所存在し、相同性検索の結果、脱水素酵素と相同性が認められた配列が２７３個確認された。これらの推定アミノ酸配列には、実施例５、６、７で解読したＰＱＱ－ＡＤＨ（１）のＮ－末端アミノ酸配列、ＰＱＱ－ＡＬＤＨ（２）の内部アミノ酸配列、ＰＱＱ／Ｈｅｍｅ－ＡＬＤＨ（４）の内部アミノ酸配列と一致する配列が含まれていた。

実施例 10

[0132] 本実施例では、ＰＱＱ－ＡＤＨ（１）、ＰＱＱ－ＡＬＤＨ（２）、ＰＱＱ／Ｈｅｍｅ－ＡＬＤＨ（４）遺伝子の塩基配列の決定を行った。

シュードグルコノバクター・サッカロケトゲネスＲｈ４７－３株およびＫ５９１ｓ株のゲノムＤＮＡを鋳型とし、実施例９で得られたドラフト解析の塩基配列情報を基にして、プライマーを設計した。

[0133] 設計したプライマー（ＰＱＱ－ＡＤＨ（１）フォワードプラーマー：配列番号４、ＰＱＱ－ＡＤＨ（１）リバースプライマー：配列番号５、ＰＱＱ－ＡＬＤＨ（２）フォワードプラーマー：配列番号６、ＰＱＱ－ＡＬＤＨ（２）リバースプライマー：配列番号７、ＰＱＱ／Ｈｅｍｅ－ＡＬＤＨ（４）フォワードプラーマー：配列番号８、ＰＱＱ／Ｈｅｍｅ－ＡＬＤＨ（４）リバースプライマー：配列番号９）およびＰｆｘ５０　ＤＮＡ　ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社）を用いてＰＣＲを行い、Ｒｈ４７－３株およびＫ５９１ｓ株のＰＱＱ－ＡＤＨ（１）、ＰＱＱ－ＡＬＤＨ（２）、ＰＱＱ／Ｈｅｍｅ－ＡＬＤＨ（４）の各遺伝子領域の塩基配列を決定した。

[0134] Ｒｈ４７－３株由来ＰＱＱ－ＡＤＨ（１）遺伝子の塩基配列および推定されるアミノ酸配列を配列番号１に示す。ＰＱＱ－ＡＤＨ（１）遺伝子は、１，８００ｂｐ（５９９個のアミノ酸残基）によって構成され、そのアミノ酸配列は、Ｂｒａｄｙｒｈｉｚｏｂｉｕｍ　ｓｐ．由来のｑｕｉｎｏｐｒｏｔｅｉｎ　ｅｔｈａｎｏｌ　ｄｅｈｙｄｒｏｇｅｎａｓｅと４２％の相同性を

示した。なお、Ｋ５９１ｓ株由来のＰＱＱ－ＡＤＨ（１）遺伝子は、Ｒｈ４７－３株由来ＰＱＱ－ＡＤＨ（１）遺伝子と同一の配列であった。

[0135] Ｒｈ４７－３株由来ＰＱＱ－ＡＬＤＨ（２）遺伝子の塩基配列および推定されるアミノ酸配列を配列番号２に示す。ＰＱＱ－ＡＬＤＨ（２）遺伝子は、１，７６１ｂｐ（５８６個のアミノ酸残基）によって構成され、そのアミノ酸配列は、Ｐｅｌａｇｉｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｈａｌｏｔｏｌｅｒａｎｓ由来のｍｅｔｈａｎｏｌ ｄｅｈｙｄｒｏｇｅｎａｓｅ ｌａｒｇｅ ｓｕｂｕｎｉｔ ｐｒｏｔｅｉｎと３５％の相同性を示した。

[0136] なお、Ｋ５９１ｓ株由来のＰＱＱ－ＡＬＤＨ（２）遺伝子は、Ｒｈ４７－３株由来ＰＱＱ－ＡＬＤＨ（２）遺伝子の１５３３番目のＡがＧであったが、翻訳されるアミノ酸は、何れもロイシン（Ｌｅｕ）であった。

[0137] Ｒｈ４７－３株由来ＰＱＱ／Ｈｅｍｅ－ＡＬＤＨ（４）の塩基配列および推定されるアミノ酸配列を配列番号３に示す。ＰＱＱ／Ｈｅｍｅ－ＡＬＤＨ（４）遺伝子は、１７８５ ｂｐ（５９４個のアミノ酸残基）によって構成され、そのアミノ酸配列は、Ｐｅｌａｇｉｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｈａｌｏｔｏｌｅｒａｎｓ由来のｍｅｔｈａｎｏｌ ｄｅｈｙｄｒｏｇｅｎａｓｅ ｌａｒｇｅ ｓｕｂｕｎｉｔ ｐｒｏｔｅｉｎと４１％の相同性を示した。

[0138] なお、Ｋ５９１ｓ株由来のＰＱＱ／Ｈｅｍｅ－ＡＬＤＨ（４）遺伝子は、Ｒｈ４７－３株由来ＰＱＱ／Ｈｅｍｅ－ＡＬＤＨ（４）遺伝子の２２４番目のＴがＣであり、アミノ酸は、イソロイシン（Ｉｌｅ）がスレオニン（Ｔｈｒ）であった。

実施例 11

[0139] 本実施例では、Ｄ－グルコースからＤ－グルカル酸の大量調製を行った。

実施例４に記載した方法に従って、シュードグルコノバクター・サッカロケトゲネスＲｈ４７－３株を３０Ｌスケールで培養した。遠心分離（６，０００ｒｐｍ、２０分間）にて回収した菌体を、１０ｇ／Ｌ濃度のＤ－グルコース溶液３０Ｌに添加し、温度３０℃、撹拌速度１５０ｒｐｍ、通気量１０Ｌ／分の条件で反応を行った。反応中は１２％（ｗ／ｖ）水酸化ナトリウム

溶液にてｐＨを７．０に調整した。

[0140] 経時的に、サンプリングを行い、生成したＤ－グルカル酸を、実施例１に示した糖分析システムにて定量した。その結果、図９に示すように、反応６８時間後に、最大７．０ｇ／Ｌ（モル収率６０．３％）のＤ－グルカル酸を生成した。

実施例 12

[0141] 本実施例では、Ｄ－グルコン酸ナトリウムからＤ－グルカル酸の大量調製を行った。

実施例２に記載した方法に従って、シュードグルコノバクター・サッカロケトゲネスＲｈ４７－３株を３０Ｌスケールで培養した。遠心分離（６，０００ｒｐｍ、２０分間）にて回収した菌体を、３０ｇ／Ｌ濃度のＤ－グルコン酸ナトリウム溶液３０Ｌに添加し、温度３０℃、撹拌速度１５０ｒｐｍ、通気量１０Ｌ／分の条件で反応を行った。

[0142] 反応中は１２％（ｗ／ｖ）水酸化ナトリウム溶液にてｐＨを７．０に調整した。経時的に、サンプリングを行い、生成したＤ－グルカル酸を、実施例１に示した糖分析システムにて定量した。その結果、図１０に示すように、反応８２時間後に、最大２２．５ｇ／Ｌ（モル収率７８．６％）のＤ－グルカル酸を生成した。

実施例 13

[0143] 本実施例では、精製酵素によるＤ－グルカルアルデヒド（中間体Ａ）の生成反応を行った。

５０ｍＭ 炭酸カルシウムを含む基質溶液（５０ｍＭ Ｄ－グルコース）１００μＬに、１００ｍＭフェリシアン化カリウム溶液９０μＬ、精製ＰＱＱ－ＡＤＨ（１）溶液１０μＬ（４６Ｕ）を加え、３０℃で酸化反応を開始した。反応生成物は、実施例１に示した糖分析システムにて定量した。反応開始１６時間後に、モル収率６８．８％のＤ－グルカルアルデヒド（中間体Ａ）を生成した。

実施例 14

[0144] 本実施例では、精製酵素によるＬ－グルロン酸（中間体Ｂ）の生成反応を行った。

５０ｍＭ 炭酸カルシウムを含む基質溶液（５０ｍＭ Ｄ－グルコン酸ナトリウム）１００μＬに１００ｍＭフェリシアン化カリウム溶液９０μＬ、精製ＰＱＱ－ＡＤＨ（１）溶液１０μＬ（４６Ｕ）を加え、３０℃で酸化反応を開始した。反応生成物は、実施例１に示した糖分析システムにて定量した。反応開始１６時間後に、モル収率７７．４％のＬ－グルロン酸（中間体Ｂ）ナトリウムを生成した。

実施例 15

[0145] 本実施例では、Ｄ－グルコースからＬ－グルロン酸（中間体Ｂ）の大量調製を行った。

実施例４に記載した方法に従って、シュードグルコノバクター・サッカロケトゲネスＲｈ４７－３株を３０Ｌスケールで培養した。遠心分離（６，０００ｒｐｍ、２０分間）にて回収した菌体を、１０ｇ／Ｌ濃度のＤ－グルコース溶液３０Ｌに添加し、温度３０℃、撹拌速度１５０ｒｐｍ、通気量１０Ｌ／分の条件で反応を行った。

[0146] 反応中は１２％（ｗ／ｖ）水酸化ナトリウム溶液にてｐＨを７．０に調整した。経時的に、サンプリングを行い、生成したＬ－グルロン酸を、実施例１に示した糖分析システムにて定量した。その結果、反応１２時間後に、最大２．２ｇ／Ｌ（モル収率１８．３％）のＬ－グルロン酸（中間体Ｂ）ナトリウムを生成した。

実施例 16

[0147] 本実施例では、Ｄ－グルコン酸ナトリウムからＬ－グルロン酸（中間体Ｂ）の大量調製を行った。

実施例４に記載した方法に従って、シュードグルコノバクター・サッカロケトゲネスＲｈ４７－３株を３０Ｌスケールで培養した。遠心分離（６，０００ｒｐｍ、２０分間）にて回収した菌体を、３０ｇ／Ｌ濃度のＤ－グルコン酸ナトリウム溶液３０Ｌに添加し、温度３０℃、撹拌速度１５０ｒｐｍ、

通気量１０Ｌ／分の条件で反応を行った。

[0148] 反応中は１２％（ｗ／ｖ）水酸化ナトリウム溶液にてｐＨを７．０に調整した。経時的に、サンプリングを行い、生成したＬ－グルロン酸を、実施例１に示した糖分析システムにて定量した。その結果、反応２４時間後に最大１４．９ｇ／Ｌ（モル収率４１．３％）のＬ－グルロン酸（中間体Ｂ）ナトリウムを生成した。

産業上の利用可能性

[0149] 以上詳述した通り、本発明は、Ｄ－グルカル酸生産菌およびＤ－グルカル酸の製造方法に係るものであり、本発明により、Ｄ－グルカル酸生産能が向上した微生物を提供することができる。また、Ｄ－グルカル酸生産能が向上した微生物を用いて、安価かつ効率的にＤ－グルカル酸を製造し、提供することができる。また、Ｄ－グルカル酸を製造する際に中間物質として生成するＤ－グルカルアルデヒド（中間体Ａ）およびＬ－グルロン酸（中間体Ｂ）を製造する方法を提供することができる。さらに、配列番号１のアミノ酸配列またはそれと８０％以上の相同性を有するアミノ酸配列を有するアルコール脱水素酵素ＡＤＨ（１）、および、配列番号２のアミノ酸配列またはそれと８０％以上の相同性を有するアミノ酸配列を有するアルデヒド脱水素酵素ＡＬＤＨ（２）を提供することができる。本発明は、Ｄ－グルカル酸を製造するために使用されるＤ－グルカル酸生産能が向上した微生物およびＤ－グルカル酸の効率的な製造方法に関する新技術を提供するものとして有用である。

微生物の寄託についての言及

国際受託当局の名称：独立行政法人製品評価技術基盤機構　特許生物寄託センター

あて名：日本国千葉県木更津市かずさ鎌足２－５－８　１２０号室（郵便番号２９２－０８１８）

受託した日付：２００７年４月２６日

受託番号：ＦＥＲＭ　ＢＰ－１０８２０

微生物の表示：Ｒｈ４７－３

請求の範囲

［請求項1］ シュードグルコノバクター属に属し、以下の性質；

（Ａ）Ｄ－グルカル酸の生成に関与する特定のアルコール脱水素酵素ＡＤＨ（１）活性を有する、

（Ｂ）Ｄ－グルカル酸の生成に関与する特定のアルデヒド脱水素酵素ＡＬＤＨ（２）活性を有する、

（Ｃ）ケト酸類の生成に関与するアルデヒド脱水素酵素ＡＬＤＨ（３）活性が減弱もしくは消失している、

を全て有することを特徴とする微生物。

［請求項2］ 特定のアルコール脱水素酵素ＡＤＨ（１）が、ＳＤＳ－ＰＡＧＥで６４，０００±５，０００、ゲルろ過クロマトグラフィーで１２０，０００±１０，０００の分子量を示すピロロキノリンキノン依存性酵素であり、以下の（ａ）から（ｃ）のいずれかのアミノ酸配列；

（ａ）配列番号１に記載のアミノ酸配列、

（ｂ）配列番号１に記載のアミノ酸配列において１もしくは複数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列、

（ｃ）配列番号１に記載のアミノ酸配列と８０％以上の相同性を有するアミノ酸配列、

を有する、請求項１に記載の微生物。

［請求項3］ 特定のアルデヒド脱水素酵素ＡＬＤＨ（２）が、ＳＤＳ－ＰＡＧＥで６１，０００±５，０００、ゲルろ過クロマトグラフィーで１８０，０００±１０，０００の分子量を示すピロロキノリンキノン依存性酵素であり、以下の（ｄ）から（ｆ）のいずれかのアミノ酸配列；

（ｄ）配列番号２に記載のアミノ酸配列、

（ｅ）配列番号２に記載のアミノ酸配列において１もしくは複数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列、

（ｆ）配列番号２に記載のアミノ酸配列と８０％以上の相同性を有するアミノ酸配列、

を有する、請求項１に記載の微生物。

[請求項4] ＳＤＳ－ＰＡＧＥで６４，０００±５，０００、ゲルろ過クロマトグラフィーで１２０，０００±１０，０００の分子量を示すピロロキノリンキノン依存性酵素であり、以下の（ａ）から（ｃ）のいずれかのアミノ酸配列；

（ａ）配列番号１に記載のアミノ酸配列、

（ｂ）配列番号１に記載のアミノ酸配列において１もしくは複数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列、

（ｃ）配列番号１に記載のアミノ酸配列と８０％以上の相同性を有するアミノ酸配列、を有することを特徴とするアルコール脱水素酵素ＡＤＨ（１）。

[請求項5] ＳＤＳ－ＰＡＧＥで６１，０００±５，０００、ゲルろ過クロマトグラフィーで１８０，０００±１０，０００の分子量を示すピロロキノリンキノン依存性酵素であり、以下の（ｄ）から（ｆ）のいずれかのアミノ酸配列；

（ｄ）配列番号２に記載のアミノ酸配列、

（ｅ）配列番号２に記載のアミノ酸配列において１もしくは複数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列、

（ｆ）配列番号２に記載のアミノ酸配列と８０％以上の相同性を有するアミノ酸配列、を有することを特徴とするアルデヒド脱水素酵素ＡＬＤＨ（２）。

[請求項6] Ｄ－グルコース、Ｄ－グルコン酸、Ｄ－グルクロン酸からなる群から選択される１または２以上の糖質からＤ－グルカル酸を製造する方法であって、

これらの糖質からＤ－グルカル酸を生成する反応が、請求項４に記載の特定のアルコール脱水素酵素および請求項５に記載の特定のアルデヒド脱水素酵素により触媒されることを特徴とするＤ－グルカル酸またはその塩の製造方法。

［請求項7］ Ｄ－グルコース、Ｄ－グルコン酸、Ｄ－グルクロン酸からなる群から選択される１または２以上の糖質の存在下、請求項１から３のいずれかに記載の微生物またはその処理物を用いてＤ－グルカル酸を生産することを特徴とするＤ－グルカル酸またはその塩の製造方法。

［請求項8］ Ｄ－グルコース、Ｄ－グルコン酸、Ｄ－グルクロン酸からなる群から選択される１または２以上の糖質の存在下、請求項２に記載のアルコール脱水素酵素の遺伝子および請求項３に記載のアルデヒド脱水素酵素の遺伝子を導入した遺伝子組み換え生物またはその処理物を用いてＤ－グルカル酸を生産することを特徴とするＤ－グルカル酸またはその塩の製造方法。

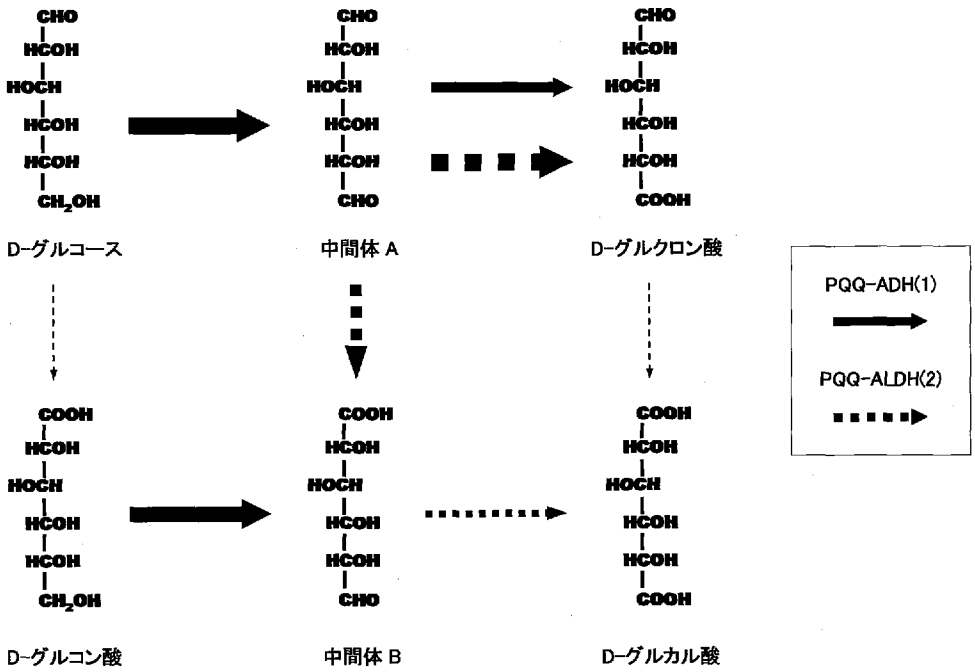
［請求項9］ アルコール脱水素酵素の遺伝子が、配列番号１の塩基配列を有し、アルデヒド脱水素酵素の遺伝子が配列番号２の塩基配列を有する、請求項８に記載のＤ－グルカル酸またはその塩の製造方法。

［請求項10］ 処理物が、細胞破砕液、細胞抽出液、アセトン粉末である、請求項７または８に記載のＤ－グルカル酸またはその塩の製造方法。

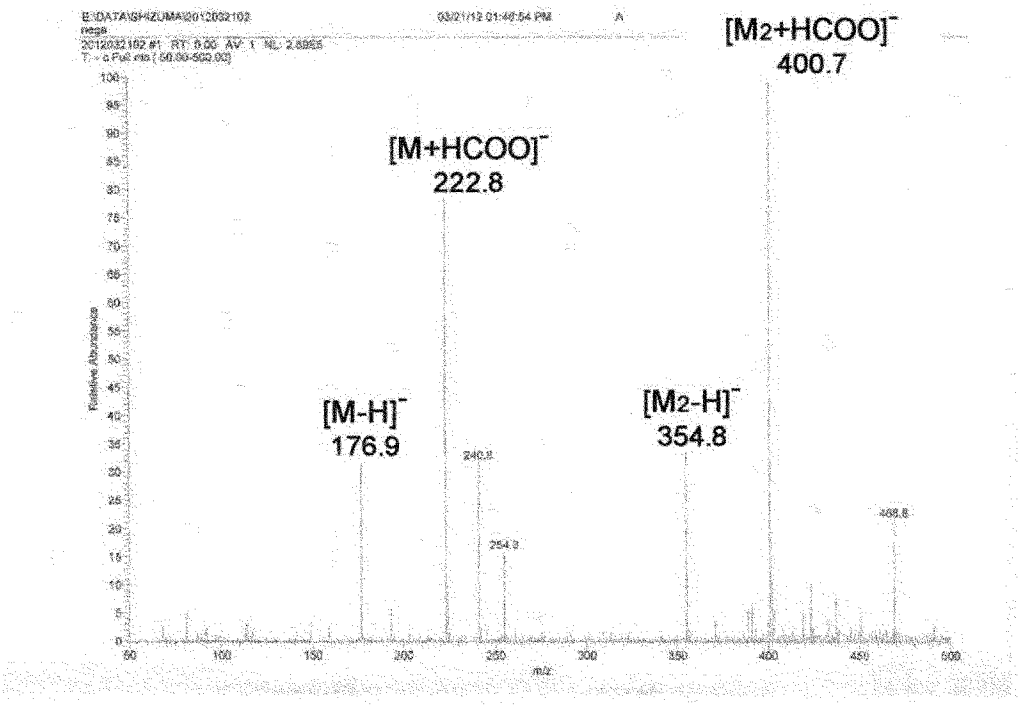
［請求項11］ 請求項１または２に記載の微生物またはその処理物あるいは酵素を用いてＤ－グルコースからＤ－グルカルアルデヒド（中間体Ａ）を生産することを特徴とするＤ－グルカルアルデヒドの製造方法。

［請求項12］ Ｄ－グルコース、Ｄ－グルコン酸から選択される１または２の糖質の存在下、請求項１から３のいずれかに記載の微生物またはその処理物、あるいは請求項４および５に記載の酵素を用いてＬ－グルロン酸（中間体Ｂ）を生産することを特徴とするＬ－グルロン酸またはその塩の製造方法。

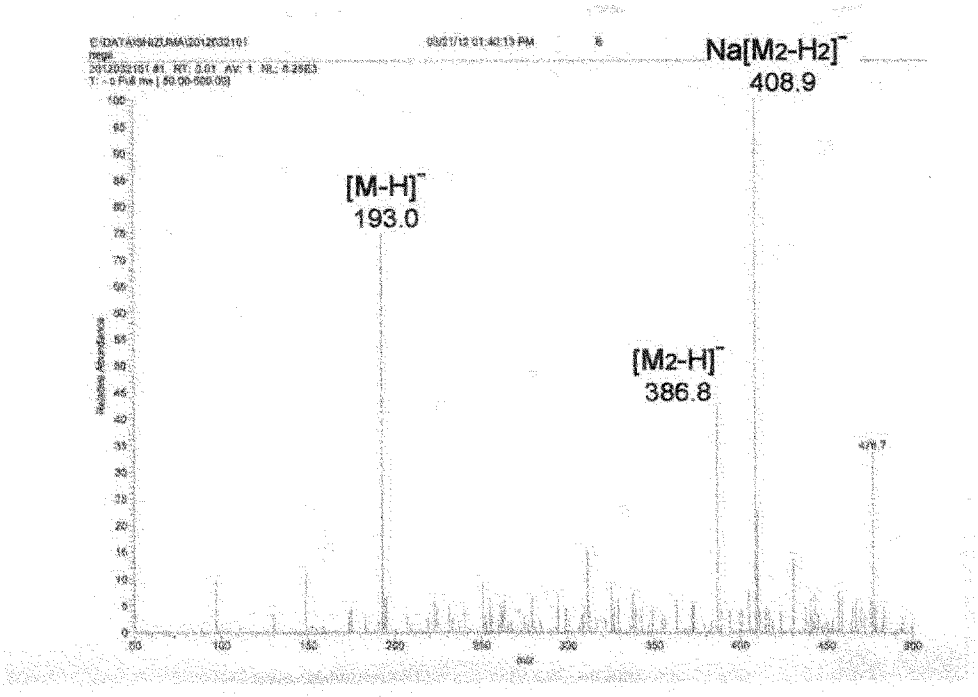
[図1]


D-グルコース
中間体 A
D-グルクロン酸
D-グルコン酸
中間体 B
D-グルカル酸
PQQ-ADH(1)
PQQ-ALDH(2)

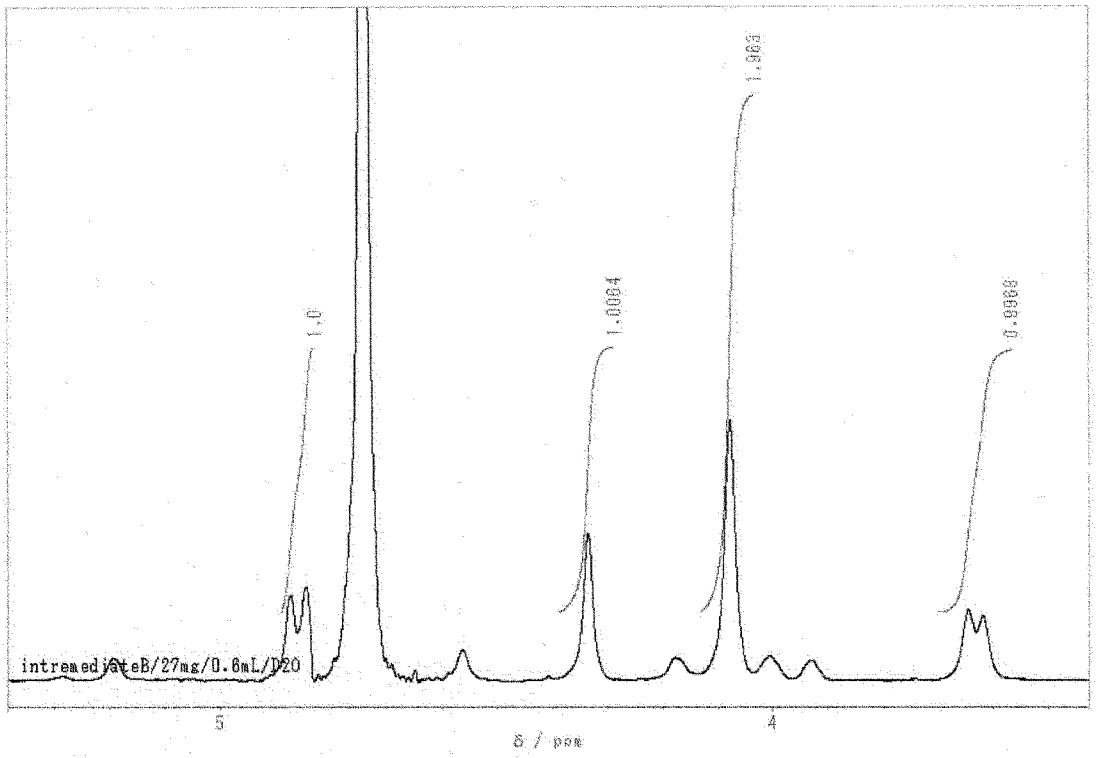
[図2]


[M2+HCOO]-
400.7
[M+HCOO]-
222.8
[M-H]-
176.9
[M2-H]-
354.8

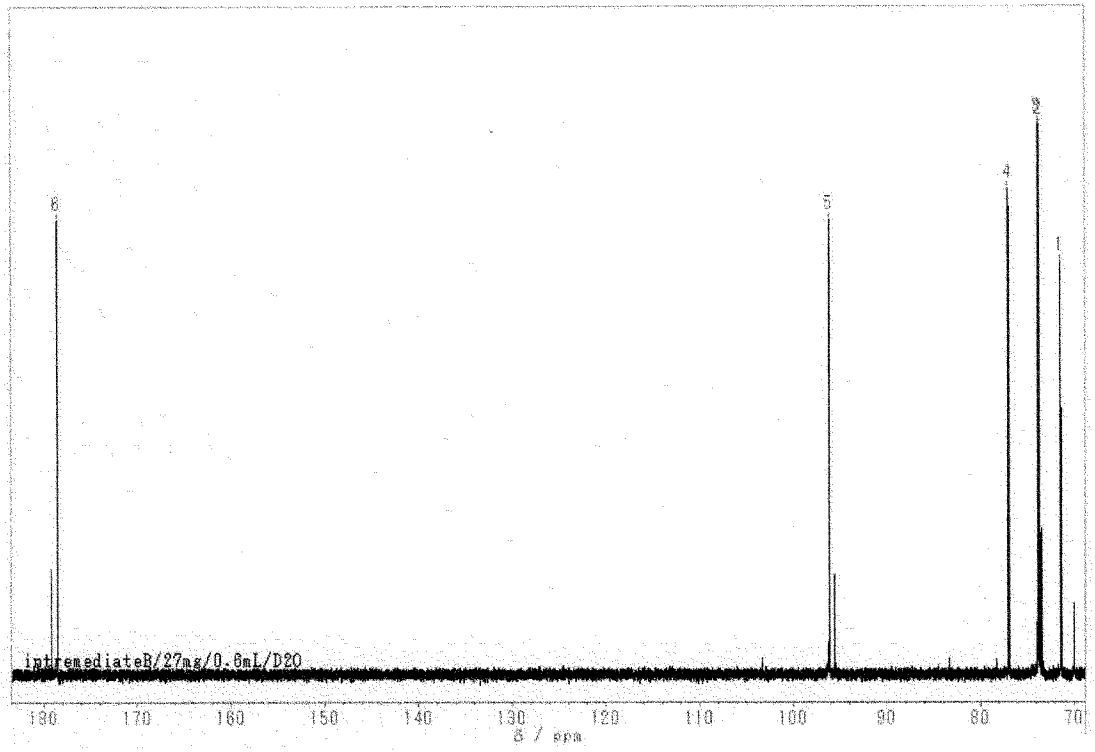
[図3]


Na[M2-H2]-
408.9
[M-H]-
193.0
[M2-H]-
386.8

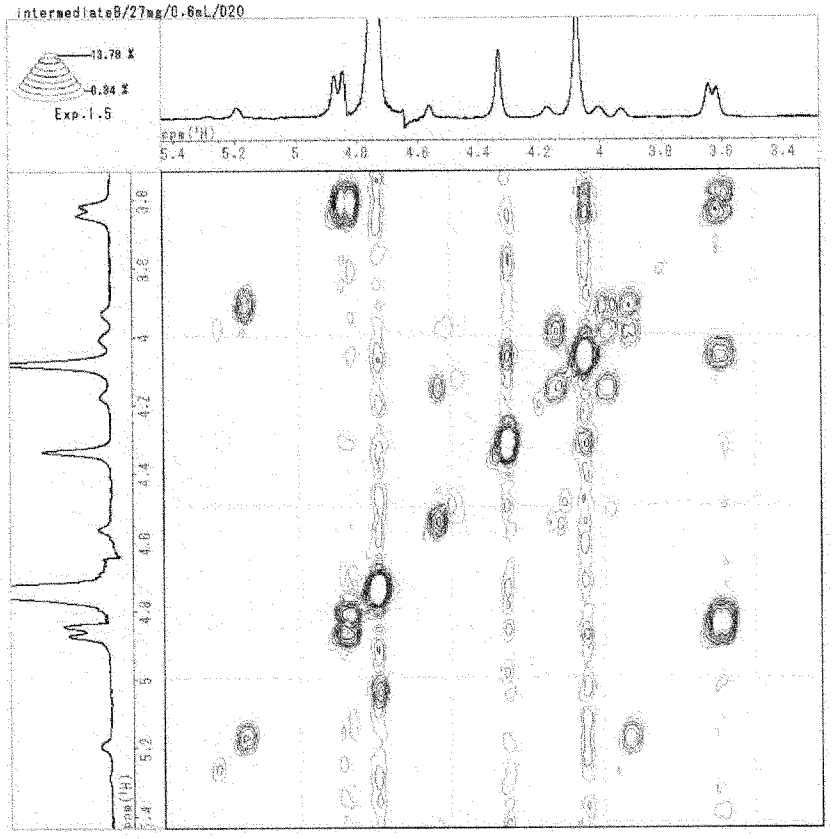
[図4]


1.0
1.0004
1.963
0.9968
intremediateB/27mg/0.6mL/D2O
5
4
δ / ppm

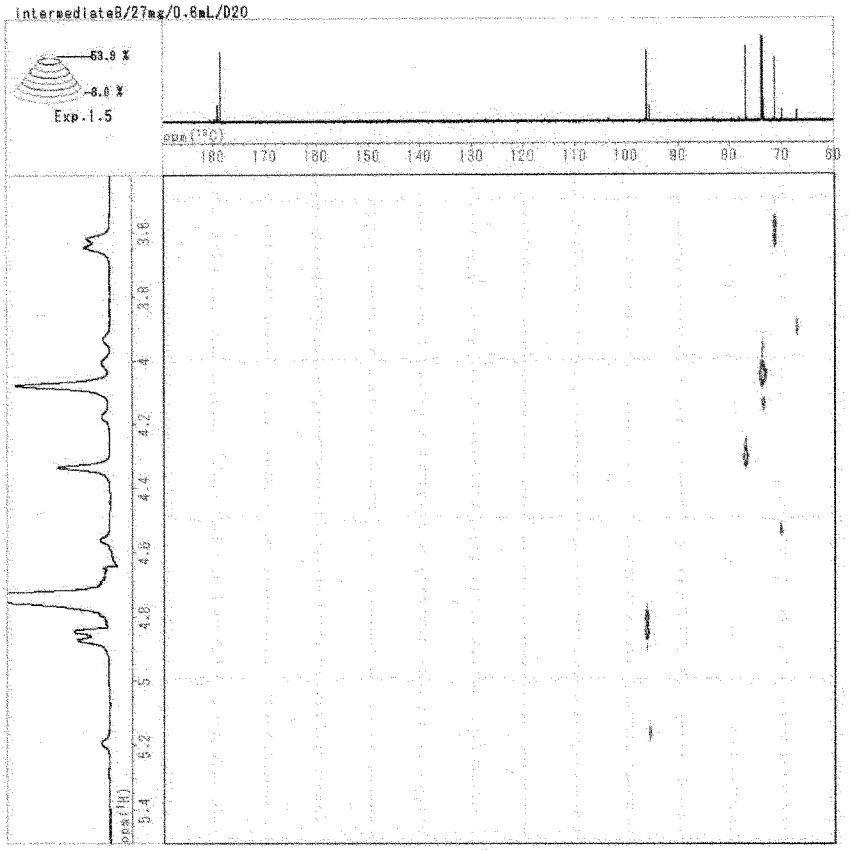
[図5]


6
5
4
2
1
IntermediateB/27mg/0.6mL/D2O
190
170
160
150
140
130
120
110
100
90
80
70
δ / ppm

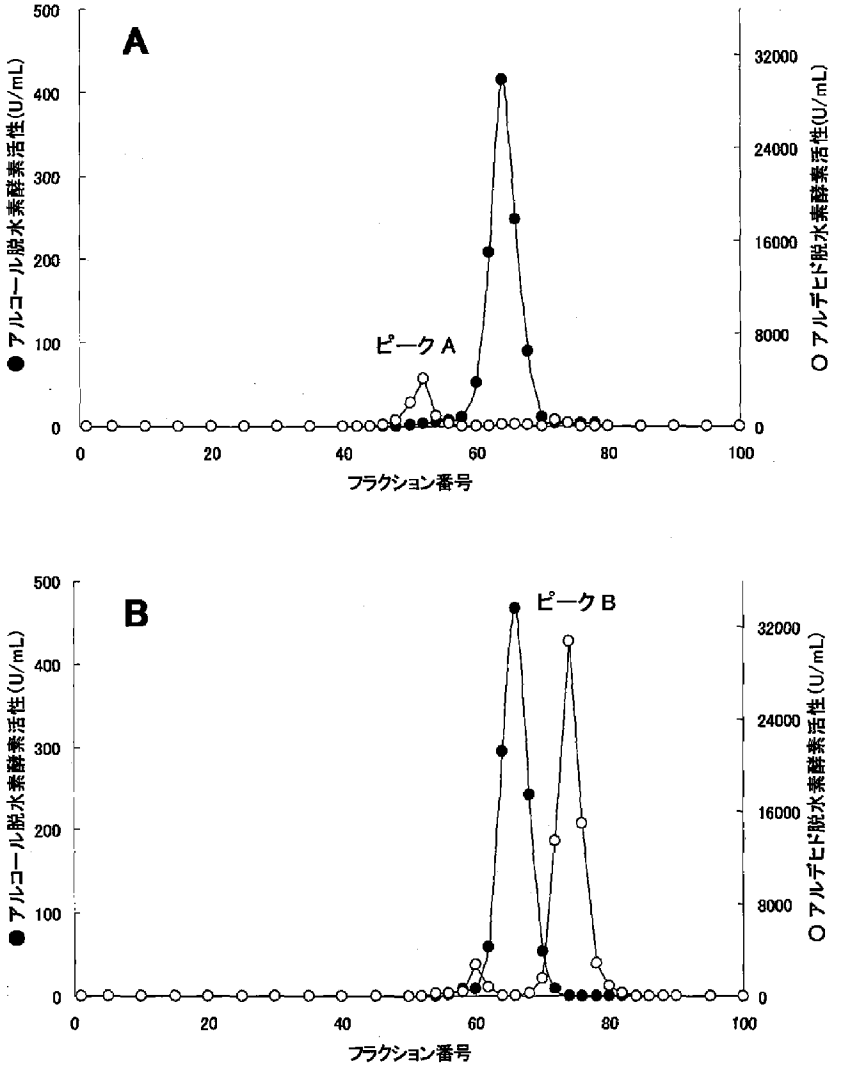
[図6]


intermediateB/27mg/0.6mL/D2O
13.78
0.34
Exp.1.5
ppm(¹H)
5.4
5.2
5
4.8
4.6
4.4
4.2
4
3.8
3.6
3.4

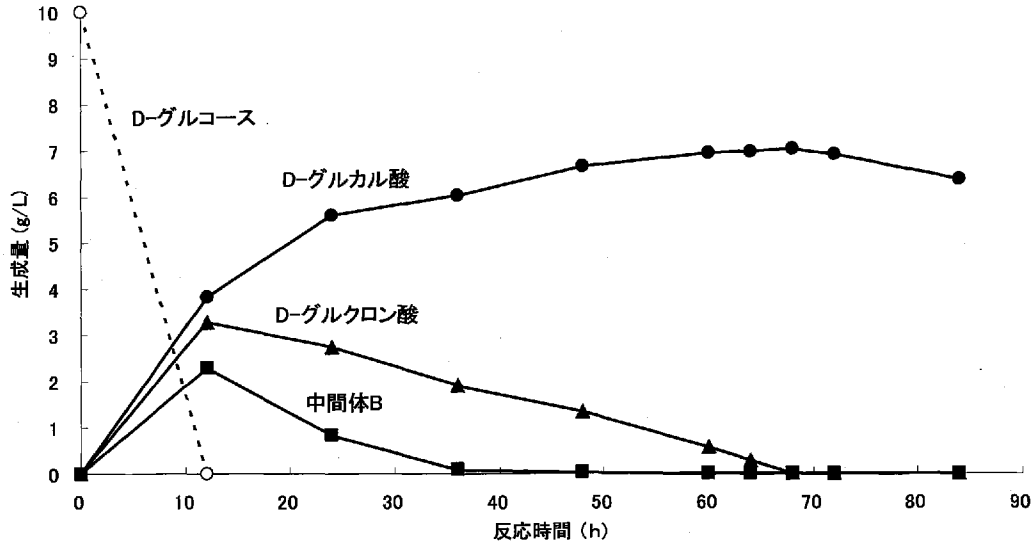
[図7]


intermediate8/27mg/0.8mL/D2O
63.0 %
8.0 %
Exp.1.5
ppm(13C)
180
170
160
150
140
130
120
110
100
90
80
70
60
3.6
3.8
4
4.2
4.4
4.6
4.8
5
5.2
5.4
ppm(1H)

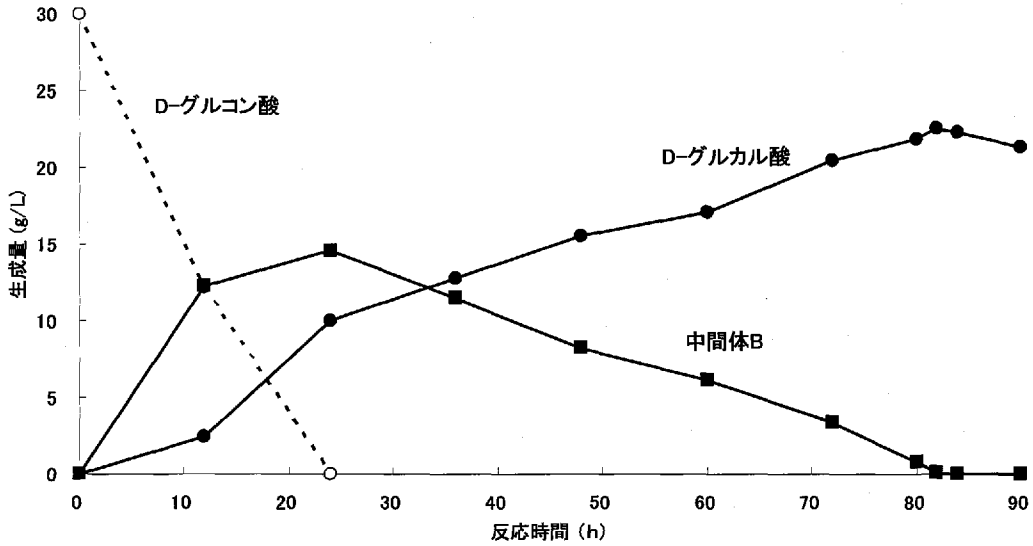
[図8]


A
ピークA
● アルコール脱水素酵素活性(U/mL)
○ アルデヒド脱水素酵素活性(U/mL)
フラクション番号
B
ピークB
● アルコール脱水素酵素活性(U/mL)
○ アルデヒド脱水素酵素活性(U/mL)
フラクション番号

[図9]


D-グルコース
D-グルカル酸
D-グルクロン酸
中間体B
生成量 (g/L)
反応時間 (h)

[図10]


30
25
20
15
10
5
0
生成量（g/L）
D-グルコン酸
D-グルカル酸
中間体B
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
反応時間（h）

[図11]

【配列番号１】

```
1    ATG CTG AAA CAA AGC CTG TTA GCA TCA GGT TTA GCG GCG CTC TGT GTC GCC GCC ATG GGC   60
1    Met Leu Lys Gln Ser Leu Leu Ala Ser Gly Leu Ala Ala Leu Cys Val Ala Ala Met Gly   20

61   AGC TTG TCG CTG GCT GCC GAA ACG ACG AGC GAG CGC CTG CTC AAT GCC GGC AGC GAG GCC  120
21   Ser Leu Ser Leu Ala Ala Glu Thr Thr Ser Glu Arg Leu Leu Asn Ala Gly Ser Glu Ala   40

121  GAG AAT GGC AAC TGG CTC ATG GTG CAC CGC ACC TAT GAC AGC CAT CGC TTC AGC CCG CTC  180
41   Glu Asn Gly Asn Trp Leu Met Val His Arg Thr Tyr Asp Ser His Arg Phe Ser Pro Leu   60

181  TCC GAG ATC AAC AAG GAC ACC ATC AAG GAC CTT GGC CTG GCC TCC GTG ACC ATT CTG GAT  240
61   Ser Glu Ile Asn Lys Asp Thr Ile Lys Asp Leu Gly Leu Ala Ser Val Thr Ile Leu Asp   80

241  AAT GCC TCG CGC GGC GGC CGC TAT GCC AGC GCC CGC AAC GAA GGC ACG CCG CTG GTC GAA  300
81   Asn Ala Ser Arg Gly Gly Arg Tyr Ala Ser Ala Arg Asn Glu Gly Thr Pro Leu Val Glu  100

301  GAC GGC TTC ATG TAC CTG CAA TCC GGC TGG TCC GTA GTC TAT AAG CTC GAC GTC CGC GAC  360
101  Asp Gly Phe Met Tyr Leu Gln Ser Gly Trp Ser Val Val Tyr Lys Leu Asp Val Arg Asp  120

361  GGC AAG ACC GCC AAG GTG GTC TGG AAG TAC GAT CCG GAA GTC GAT CGC CAG TGG GTT TCC  420
121  Gly Lys Thr Ala Lys Val Val Trp Lys Tyr Asp Pro Glu Val Asp Arg Gln Trp Val Ser  140

421  GAC GCC ACC TGC TGC GGC GCC GAG AAC CGC GGT ATC GGC CTG TGG AAC GAC GAC GTG GTc  480
141  Asp Ala Thr Cys Cys Gly Ala Glu Asn Arg Gly Ile Gly Leu Trp Asn Asp Asp Val Val  160

481  GCC CTG ACC ATG GAT GGC CGC GTC ATG TCC ATC AAC AAG GAC ACC GGC GAG CTC AAC TGG  540
161  Ala Leu Thr Met Asp Gly Arg Val Met Ser Ile Asn Lys Asp Thr Gly Glu Leu Asn Trp  180

541  GAA AAG CAG CG GCT GAC AAG GCG CGT GCC GAA AGC TTC ACC GGC GCC CCG CTC ATC ATC  600
181  Glu Lys Gln Arg Ala Asp Lys Ala Arg Ala Glu Ser Phe Thr Gly Ala Pro Leu Ile Ile  200

601  GGC GAC ACC GCC GTT TAT GGT CCG GCT GGT GGC GAA TAC GGC ATC CGC GGC TGG CTC GAA  660
201  Gly Asp Thr Ala Val Tyr Gly Pro Ala Gly Gly Glu Tyr Gly Ile Arg Gly Trp Leu Glu  220

661  GCC ATC GAC CTC AAG ACC GGC GAT GTG GCC TGG CGT ACC TAT ACC GTG CCC GGA CCG GGC  720
221  Ala Ile Asp Leu Lys Thr Gly Asp Val Ala Trp Arg Thr Tyr Thr Val Pro Gly Pro Gly  240

721  GAG CCC GGC AAT GAT ACC TGG CAG GGC AAT GCC TGG GAA ACC GGC GGC GCT TCC ATC TGG  780
241  Glu Pro Gly Asn Asp Thr Trp Gln Gly Asn Ala Trp Glu Thr Gly Gly Ala Ser Ile Trp  260

781  CAG ACG GGT TCC TAC GAC CCC GAT ACC GGC ATG ACC TAT TGG GGC ACG GGT AAC CCG GCT  840
261  Gln Thr Gly Ser Tyr Asp Pro Asp Thr Gly Met Thr Tyr Trp Gly Thr Gly Asn Pro Ala  280

841  CCG CAG ATC GAC GCC GAA TAC CGT CCG GGC GAC AAC CTC TAT GCT TCG AGC CTG CTC GCG  900
281  Pro Gln Ile Asp Ala Glu Tyr Arg Pro Gly Asp Asn Leu Tyr Ala Ser Ser Leu Leu Ala  300
```

[図12]

【配列番号１】（つづき）

```
901  CTC GAC GCC AAG GAT GGT GCT CTC AAG TGG CAC TTC CAG TTC ACC CCG AAC GAT CCG TAC  960
301  Leu Asp Ala Lys Asp Gly Ala Leu Lys Trp His Phe Gln Phe Thr Pro Asn Asp Pro Tyr  320

961  GAC TAT GAC GAA ATC GGC GAC AAC CAG CTC CTG GAT GTG AGC GTG GAT GGC AAG CCG TCC 1020
321  Asp Tyr Asp Glu Ile Gly Asp Asn Gln Leu Leu Asp Val Ser Val Asp Gly Lys Pro Ser  340

1021 AAG ATG GTC GTC CGC GCT GCC CGT AAC GGT TTC ATG TAT GGC TTC AAC CGT CTC GAC GGC 1080
341  Lys Met Val Val Arg Ala Ala Arg Asn Gly Phe Met Tyr Gly Phe Asn Arg Leu Asp Gly  360

1081 GCC ATG ACC TAT GCC AAG CAG TAT GTG GAA GAC CTG ACC TGG ACC ACC GGC ATC GAC CCG 1140
361  Ala Met Thr Tyr Ala Lys Gln Tyr Val Glu Asp Leu Thr Trp Thr Thr Gly Ile Asp Pro  380

1141 AAG ACC GGC AAG CCG CTC GAA TAC GAT CCG AAG GCC CAG CTC CAG AAG TAC GTC GCC GGC 1200
381  Lys Thr Gly Lys Pro Leu Glu Tyr Asp Pro Lys Ala Gln Leu Gln Lys Tyr Val Ala Gly  400

1201 ACC GTT GGC TCG CGT GAA GGC AAT CCG GGC ATC TAC TGC CCG ACG CTG GGT GGC GGC AAG 1260
401  Thr Val Gly Ser Arg Glu Gly Asn Pro Gly Ile Tyr Cys Pro Thr Leu Gly Gly Gly Lys  420

1261 AAC TGG CAG CCT GCT GCC TAT AGC CCG AAC ACC AAG CTC CTC TAC GTG ACC TCG GCT GAA 1320
421  Asn Trp Gln Pro Ala Ala Tyr Ser Pro Asn Thr Lys Leu Leu Tyr Val Thr Ser Ala Glu  440

1321 GGC TGC TCG GCC TAT GTG CCC GAG GCT GCT CCC AAT CCG ACG ACC ACC GGC GGT GAA TAC 1380
441  Gly Cys Ser Ala Tyr Val Pro Glu Ala Ala Pro Asn Pro Thr Thr Thr Gly Gly Glu Tyr  460

1381 GAC GTG GTC AAG GCT CAG CGC GAA TGG AAC GGC CGT CTG CCG GCT CCT GAA GGC ACC AAG 1440
461  Asp Val Val Lys Ala Gln Arg Glu Trp Asn Gly Arg Leu Pro Ala Pro Glu Gly Thr Lys  480

1441 CTG CCG GAC GTC TTC AAC GGC GGC TCG GTC AAG GCC ATC GAC CCG CTC ACC GGC GAA ACC 1500
481  Leu Pro Asp Val Phe Asn Gly Gly Ser Val Lys Ala Ile Asp Pro Leu Thr Gly Glu Thr  500

1501 AAG GCC AAG GTC CTG GTG CCC CGC CGC CTG AAC GGC ATG CTC GCC ACC GGT GGC GAC CTG 1560
501  Lys Ala Lys Val Leu Val Pro Arg Arg Leu Asn Gly Met Leu Ala Thr Gly Gly Asp Leu  520

1561 GTC TGG AGC TCG GGC ACG GAT GGT AAC CTC TAT GCC TAT GAC GCC AAC ACT CTG GAA ACC 1620
521  Val Trp Ser Ser Gly Thr Asp Gly Asn Leu Tyr Ala Tyr Asp Ala Asn Thr Leu Glu Thr  540

1621 GTG TGG ACC TTC AAC GTC GGC ACC GCC CTT GGT GGC CCG CCG ATG AGC TAC TCG GTC GAC 1680
541  Val Trp Thr Phe Asn Val Gly Thr Ala Leu Gly Gly Pro Pro Met Ser Tyr Ser Val Asp  560

1681 GGC AAG CAG TAC GTC GCG GTT CTC GCC GGT GCT GCC GCC TCC GCT GCC GAC AAG AAG GTT 1740
561  Gly Lys Gln Tyr Val Ala Val Leu Ala Gly Ala Ala Ala Ser Ala Ala Asp Lys Lys Val  580

1741 GCG CCG CAG TCC GAG TTC TTC GTG CCG GCT GAT GCG CTC TAC ATC TTC GCG CTG AAG TAA 1800
581  Ala Pro Gln Ser Glu Phe Phe Val Pro Ala Asp Ala Leu Tyr Ile Phe Ala Leu Lys End  599
```

[図13]

【配列番号２】

```
1    ATG TAC AGG AAA GGC AGT GTG CTG ACC GTG TCA GCA CTC GTC TTG GGG CTT TGC ACA TCG   60
1    Met Tyr Arg Lys Gly Ser Val Leu Thr Val Ser Ala Leu Val Leu Gly Leu Cys Thr Ser   20

61   TCT GTG TGG GCC CAG CAG GCG CCG ACG ACC AAC GCT CTC GAC AAC CTC ACT CCC GTC ACC  120
21   Ser Val Trp Ala Gln Gln Ala Pro Thr Thr Asn Ala Leu Asp Asn Leu Thr Pro Val Thr   40

121  GAC GAC GTT CTC AAG AAC CCT GCC GAT GGC GAC TGG CTG ATG GCC CGC CGA ACT TAT AAC  180
41   Ser Val Trp Ala Gln Gln Ala Pro Thr Thr Asn Ala Leu Asp Asn Leu Thr Pro Val Thr   60

181  GGC TGG GGC TAC AGC CCC CTC GAT CAG ATC AAC AAG GAC AAC GTC GAC AAG CTT CAA CTC  240
61   Gly Trp Gly Tyr Ser Pro Leu Asp Gln Ile Asn Lys Asp Asn Val Asp Lys Leu Gln Leu   80

241  GTT TGG TCG TGG GGT CTG TCA CCC GGC GGC ACG ACG CAG GAG ACG CCG CTC GTT CAT GAT  300
81   Val Trp Ser Trp Gly Leu Ser Pro Gly Gly Thr Thr Gln Glu Thr Pro Leu Val His Asp  100

301  GGC GTC ATG TTC GTT CAG AAT TCG AGC CAC CTC ATT CAG GCG CTC GAT GCG GGC ACT GGC  360
101  Gly Val Met Phe Val Gln Asn Ser Ser His Leu Ile Gln Ala Leu Asp Ala Gly Thr Gly  120

361  GAA CTG CTG TGG CAG TAC CAG TAT TCC CTC CCC ACC GGC GTC AAT CCG GCC GGC CAG CGC  420
121  Glu Leu Leu Trp Gln Tyr Gln Tyr Ser Leu Pro Thr Gly Val Asn Pro Ala Gly Gln Arg  140

421  TCC AAG GCG CTC TAT GGT GAC AAC CTG ATC TTT GCG ACC CGC GAT GCC CAT ATC GTC GCC  480
141  Ser Lys Ala Leu Tyr Gly Asp Asn Leu Ile Phe Ala Thr Arg Asp Ala His Ile Val Ala  160

481  GTC AAC GCC AAG ACC GGC AAG CTG GCC TGG GAC CAG CAG GTC GCC GAC TAC AAG AAG GGC  540
161  Val Asn Ala Lys Thr Gly Lys Leu Ala Trp Asp Gln Gln Val Ala Asp Tyr Lys Lys Gly  180

541  TGG GGC TAT TCC TCG GGG CCG CTG GTA GCC GAC GGC ACC ATC ATC CAG GGC ATG ACC AAT  600
181  Trp Gly Tyr Ser Ser Gly Pro Leu Val Ala Asp Gly Thr Ile Ile Gln Gly Met Thr Asn  200

601  TGC GGC AAC GGC GAA CCC GGC GGC TGC TTC ATC ACC GGC CAC GAC CCA GCG ACC GGT AAG  660
201  Cys Gly Asn Gly Glu Pro Gly Gly Cys Phe Ile Thr Gly His Asp Pro Ala Thr Gly Lys  220

661  GAA TTG TGG CGG CTC AAC ACC ATC GCG TCC GGC GAC ACG CCC GAA GGC AAT AGC TGG AAC  720
221  Glu Leu Trp Arg Leu Asn Thr Ile Ala Ser Gly Asp Thr Pro Glu Gly Asn Ser Trp Asn  240

721  GGC CTG CCG CAG ATG TCG CGC TAT GGC GCT TCG GCC TGG ATC ACC GGC TCC TAC GAT CCC  780
241  Gly Leu Pro Gln Met Ser Arg Tyr Gly Ala Ser Ala Trp Ile Thr Gly Ser Tyr Asp Pro  260

781  GAC CAG AAC ATC GTC TTC GCC GGC GTC GGC CAG CCG TAT CCG TGG CCG GCG GTG TTG AAC  840
261  Asp Gln Asn Ile Val Phe Ala Gly Val Gly Gln Pro Tyr Pro Trp Pro Ala Val Leu Asn  280

841  GGG CTT CTC CCG AAG AGC ACG GAT TCG AAG TAC ACC AAC AAT GCG GCT TAT ACC GAT TCC  900
281  Gly Leu Leu Pro Lys Ser Thr Asp Ser Lys Tyr Thr Asn Asn Ala Ala Tyr Thr Asp Ser  300
```

[図14]

【配列番号２】（つづき）

```
901  ACG CTG GCG ATC GAG CCG AAG ACC GGC GCG CTG AAG TGG TAT CAT CAG TAC CTG GCC ACC  960
301  Thr Leu Ala Ile Glu Pro Lys Thr Gly Ala Leu Lys Trp Tyr His Gln Tyr Leu Ala Thr  320

961  GAT ACG CTC GAC CTC GAC TAT GTG TAT GAG CGT CTG CTC GTC GAT CTG CCC GTC AAG GGC 1020
321  Asp Thr Leu Asp Leu Asp Tyr Val Tyr Glu Arg Leu Leu Val Asp Leu Pro Val Lys Gly  340

1021 GAG GCG ACC AAG CAG GTG ATT ACT GCC GGC AAG CTC GCC ATC ATC GAG TCG CTC GAC CGG 1080
341  Glu Ala Thr Lys Gln Val Ile Thr Ala Gly Lys Leu Ala Ile Ile Glu Ser Leu Asp Arg  360

1081 ACC TCG GGC AAG TGG CTC TGG GCG CAC GAA ACG GTA CCG CAG AAC GTG GTG TCG GCC ATC 1140
361  Thr Ser Gly Lys Trp Leu Trp Ala His Glu Thr Val Pro Gln Asn Val Val Ser Ala Ile  380

1141 GAT CCG GTC ACC GGC GAG AAG ACC ATC AAT CCC GAT GTG ATC CCG CAG GTG GGC AAG ACC 1200
381  Asp Pro Val Thr Gly Glu Lys Thr Ile Asn Pro Asp Val Ile Pro Gln Val Gly Lys Thr  400

1201 ACG GTC AAC TGC CCT GCC GAC CCG GGC GGC CGC GCC TGG CAG GCG ACT TCG TTC AGC CCG 1260
401  Thr Val Asn Cys Pro Ala Asp Pro Gly Gly Arg Ala Trp Gln Ala Thr Ser Phe Ser Pro  420

1261 AAG ACG CAA ATG ATG TAT ATG CCC ACT GTC GAG TTC TGC TCG AAT ACC GAC GTC AAC CCG 1320
421  Lys Thr Gln Met Met Tyr Met Pro Thr Val Glu Phe Cys Ser Asn Thr Asp Val Asn Pro  440

1321 CTC GAT CCG GGC CAG GTC TAT ACC GGT GGC GGT CTT GCG ACC TTC AAC CGC GTG CCG CGG 1380
441  Leu Asp Pro Gly Gln Val Tyr Thr Gly Gly Gly Leu Ala Thr Phe Asn Arg Val Pro Arg  460

1381 CCG GAT AGC GAT GGC AAT ATC GGT CAG GTG CGC GCC ATC AAT CTT GCC GAC CAG ACG GAT 1440
461  Pro Asp Ser Asp Gly Asn Ile Gly Gln Val Arg Ala Ile Asn Leu Ala Asp Gln Thr Asp  480

1441 GCC TGG ATG TAT CGC CAG CAC GCT CCG GTC ACC ACC TCG ACG CTG CCG ACC GGT GGC GGC 1500
481  Ala Trp Met Tyr Arg Gln His Ala Pro Val Thr Thr Ser Thr Leu Pro Thr Gly Gly Gly  500

1501 CTG GTG TTC GTC GGT ACG CTC GAC CGC AAG TTA ATT GCG TTC GAT GAC ACC ACG GGC AAG 1560
501  Leu Val Phe Val Gly Thr Leu Asp Arg Lys Leu Ile Ala Phe Asp Asp Thr Thr Gly Lys  520

1561 ATC CTG TGG ACC AGC CCG AAG CTC GAC AAC GCG ATC GAG TCC TTC CCG GTG ACC TTC ACG 1620
521  Ile Leu Trp Thr Ser Pro Lys Leu Asp Asn Ala Ile Glu Ser Phe Pro Val Thr Phe Thr  540

1621 GCG GGC GAC AAG CAG TAC GTG GCC GTC GTC ACC AAT TGG TCG TCG GGC CTC GGC CGC CTG 1680
541  Ala Gly Asp Lys Gln Tyr Val Ala Val Val Thr Asn Trp Ser Ser Gly Leu Gly Arg Leu  560

1681 AAG TCG ATC ACG CCG GAT GTG CAG CTT CCG CAG GAT AAC CCG CAT ACG GTG TAC GTC TTC 1740
561  Lys Ser Ile Thr Pro Asp Val Gln Leu Pro Gln Asp Asn Pro His Thr Val Tyr Val Phe 580

1741  GCG CTG CCC GAC ACC AAG TAA  1761
581   Ala Leu Pro Asp Thr Lys End   586
```

[図15]

【配列番号３】

```
1    ATG ACT ATC CGT CTC AAG ACC CTG CTG GCA TTC ACC GCG ATA ACC ACT CTC GCC CTG CCT   60
1    Met Thr Ile Arg Leu Lys Thr Leu Leu Ala Phe Thr Ala Ile Thr Thr Leu Ala Leu Pro   20

61   GCC TTC GCG CAG GAT GCG GCT GCC CCC GCC GCC CCG GCG GCG CGC ACC TAC AAG CCC GTG   120
21   Ala Phe Ala Gln Asp Ala Ala Ala Pro Ala Ala Pro Ala Ala Arg Thr Tyr Lys Pro Val    40

121  ACC AAC GAC ATG ATC CTC AAT CCG CCT GCC GAG GAA TGG ATC AGT TGG CGC CGC ACC GTC   180
41   Thr Asn Asp Met Ile Leu Asn Pro Pro Ala Glu Glu Trp Ile Ser Trp Arg Arg Thr Val    60

181  GAC AAC CAG GGC TAT AGT CCG CTC GAT CTC ATC AAC AAG GAT ATC GTC AAG AAC CTC GAG   240
61   Asp Asn Gln Gly Tyr Ser Pro Leu Asp Leu Ile Asn Lys Asp Ile Val Lys Asn Leu Glu    80

241  CTC GCC TGG GCC TGG CCG ATG GCC GCC GAC GGC CAG CAG GAG GCC GCT CCG CTC GTC CAT   300
81   Leu Ala Trp Ala Trp Pro Met Ala Ala Asp Gly Gln Gln Glu Ala Ala Pro Leu Val His   100

301  GAC GGC ATC ATG TTC CTG TCG ACC AAC CAG AAC ATC ATC CAG GCG CTC GAC GCC AAG ACC   360
101  Asp Gly Ile Met Phe Leu Ser Thr Asn Gln Asn Ile Ile Gln Ala Leu Asp Ala Lys Thr   120

361  GGC GAC CTC ATC TGG GAA TAC CGG CAC GTC CTG CCC GAA TTG CCC ACC TCC TGG GGC TAC   420
121  Gly Asp Leu Ile Trp Glu Tyr Arg His Val Leu Pro Glu Leu Pro Thr Ser Trp Gly Tyr   140

421  CAG CTC AAC CAG GCC CGT CGG CAG AAG AAC TCC ATC GCC CTC TAC GAC GAC AAG GTG ATC   480
141  Gln Leu Asn Gln Ala Arg Arg Gln Lys Asn Ser Ile Ala Leu Tyr Asp Asp Lys Val Ile   160

481  GTG GCC ACC GCC GAC GCC AAG CTG GTG GCG CTC GAT GCG GCC ACC GGC AAG GTC GCC TGG   540
161  Val Ala Thr Ala Asp Ala Lys Leu Val Ala Leu Asp Ala Ala Thr Gly Lys Val Ala Trp   180

541  GAA ACG CAG GTC TAT GAC ACC CAG AAG GGC TAC AGC TAT ACC GTC GGC CCG CTG ATC GTG   600
181  Glu Thr Gln Val Tyr Asp Thr Gln Lys Gly Tyr Ser Tyr Thr Val Gly Pro Leu Ile Val   200

601  AAC GAC AAG GTC ATC TCG GCC ATT TCC GGC TGC TCG ATC GCC GGC ACG GCG GGC GGC TGC   660
201  Gly Asp Thr Ala Val Tyr Gly Pro Ala Gly Gly Glu Tyr Gly Ile Arg Gly Trp Leu Glu   220

661  TTC ATC GCT GCG CAC GAT GCC AAG ACC GGC AAG GAA ATC TGG CGC TTC AAC ACC ATC GAT   720
221  Phe Ile Ala Ala His Asp Ala Lys Thr Gly Lys Glu Ile Trp Arg Phe Asn Thr Ile Asp   240

721  GAT CCC AAG AAC CCC GAG CAG GAA GCC TCC TGG AAC GGC GTC CCG CCG GAA AAC CGC TGG   780
241  Asp Pro Lys Asn Pro Glu Gln Glu Ala Ser Trp Asn Gly Val Pro Pro Glu Asn Arg Trp   260

781  GGC GGC ACG CCC TGG ACC ACG GGC TCC TAT GAT CCG CGC ACC AAT ACC ACC TTC TGG GGC   840
261  Gly Gly Thr Pro Trp Thr Thr Gly Ser Tyr Asp Pro Arg Thr Asn Thr Thr Phe Trp Gly   280

841  GTG GGC ATG CCC GGC CCC TAT TCC CAG CTC ATC CGC GGC TCG GGC GAG GGG CCG GTG CTC   900
281  Val Gly Met Pro Gly Pro Tyr Ser Gln Leu Ile Arg Gly Ser Gly Glu Gly Pro Val Leu   300
```

[図16]

【配列番号３】（つづき）

```
901  TAT ACC AAC AAC ACT CTG GCG CTC GAC GCC GAT ACC GGC GAG CGC AAG TGG AAC TTC TCG  960
301  Tyr Thr Asn Asn Thr Leu Ala Leu Asp Ala Asp Thr Gly Glu Arg Lys Trp Asn Phe Ser  320

961  CAC CTG CCC GCC GAT AAC TGG GAC CTG GAC AGC CCG TTC GAG CGC ATC CTC GTC GAT GAG 1020
321  His Leu Pro Ala Asp Asn Trp Asp Leu Asp Ser Pro Phe Glu Arg Ile Leu Val Asp Glu  340

1021 GGC CAG GGT GAC GCC GCC AAG CAC CTG CTC GTG ACG GTA CCC GGC AAG GAC GGC ATC GCC 1080
341  Gly Gln Gly Asp Ala Ala Lys His Leu Leu Val Thr Val Pro Gly Lys Asp Gly Ile Ala  360

1081 TTC GGG CTC GAT CGT GAT ACC GGC AAA TAT CTC TGG TCG CGC GAC ACG GTC TAT CAG AAC 1140
361  Phe Gly Leu Asp Arg Asp Thr Gly Lys Tyr Leu Trp Ser Arg Asp Thr Val Tyr Gln Asn  380

1141 GTC GTC AAG AAC ATC GAT GCC GAA GGC AAG GTG ACG CTC AAC AGC GAT CTG GTG CCT ACC 1200
381  Val Val Lys Asn Ile Asp Ala Glu Gly Lys Val Thr Leu Asn Ser Asp Leu Val Pro Thr  400

1201 GCG GTC AAC CAG GAG GTC TTC GTC TGC ACC TCG GTT TCG GGC GGC AAG CTC TGG ATG ACC 1260
401  Ala Val Asn Gln Glu Val Phe Val Cys Thr Ser Val Ser Gly Gly Lys Leu Trp Met Thr  420

1261 GGC GCC TAT AGC CCC AAG ACG CAG ACC TAT TAC GTG CCG CTG GCC GAG GCC TGC AAC ACC 1320
421  Gly Ala Tyr Ser Pro Lys Thr Gln Thr Tyr Tyr Val Pro Leu Ala Glu Ala Cys Asn Thr  440

1321 GTG ACC CCG ACC GTC ACC GAG TTC ACC GCC GGT AAC GCC GTG GGC GCC ACC AAG TTC GGG 1380
441  Val Thr Pro Thr Val Thr Glu Phe Thr Ala Gly Asn Ala Val Gly Ala Thr Lys Phe Gly  460

1381 CCG CGC GTG CTG CCG CCC AAC ATC ACC AAT GGC GGC GTG GTC GAA GCC ATC AAC GTT GCC 1440
461  Pro Arg Val Leu Pro Pro Asn Ile Thr Asn Gly Gly Val Val Glu Ala Ile Asn Val Ala  480

1441 GAT GGC GCC CGC AAG TGG CGG CTC GAA CAG CGC CCG ACC TTC AGC TCC TCG CTG CTG GCG 1500
481  Asp Gly Ala Arg Lys Trp Arg Leu Glu Gln Arg Pro Thr Phe Ser Ser Ser Leu Leu Ala  500

1501 ACC GCT GGC GGC CTG GTC TTC GGC GGC GAT GCC GGA CGC TTC CTC ATG GCC ATC GAC GAC 1560
501  Lys Ala Lys Val Leu Val Pro Arg Arg Leu Asn Gly Met Leu Ala Thr Gly Gly Asp Leu  520

1561 GAG ACC GGC CAG GTG GTG TGG AAG ACC CGC CTC AAC GCT CCG ATC GGC GGC TAT CCG ATG 1620
521  Glu Thr Gly Gln Val Val Trp Lys Thr Arg Leu Asn Ala Pro Ile Gly Gly Tyr Pro Met  540

1621 ACC TAT GAA ATC GAC GGC GAG CAA TAT CTG GCT GTA CCG ACC GGC TTC TCG GCC CAG GCC 1680
541  Thr Tyr Glu Ile Asp Gly Glu Gln Tyr Leu Ala Val Pro Thr Gly Phe Ser Ala Gln Ala  560

1681 AGC AGC TCC GCC TCG ATG TTC CCG GAA ATC CCG GTG CCC TCG GGC TCG GGC AAT TCG CTC 1740
561  Ser Ser Ser Ala Ser Met Phe Pro Glu Ile Pro Val Pro Ser Gly Ser Gly Asn Ser Leu  580

1741 TTC GTC TTC AAG CTG CGC AAC GAT ACC CAG ACC GCC AGC AAA TAG  1785
581  Phe Val Phe Lys Leu Arg Asn Asp Thr Gln Thr Ala Ser Lys End   594
```

[図17]

【配列番号４】
GGCGAATGCATGTCCATAACTG

【配列番号５】
CGGAAGACTGGGAATTCCG

【配列番号６】
CACGTTGACACGCGTTCGTA

【配列番号７】
GCATCAATACCGGGAGCAGG

【配列番号８】
GGCCAAAACCCTTTGGGAGACCCCTGATG

【配列番号９】
GTTCCGCGGCAGACGGAATCTTGCGTC

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2013/065414

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N1/20(2006.01)i, *C12N1/21*(2006.01)i, *C12N9/02*(2006.01)i, *C12N9/04*(2006.01)i, *C12N15/09*(2006.01)i, *C12P7/24*(2006.01)i, *C12P7/42*(2006.01)i, *C12P7/46*(2006.01)i
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)
C12N1/20, C12N1/21, C12N9/02, C12N9/04, C12N15/09, C12P7/24, C12P7/42, C12P7/46

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 1996-2013
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2013 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2013

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, PubMed, Thomson Innovation

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y/A	WO 2008/139844 A1 (Ensuiko Sugar Refining Co., Ltd.), 20 November 2008 (20.11.2008), & JP 5118132 B & US 2010/0075381 A1 & EP 2143785 A1 & CN 101679936 A & AU 2008249370 A & KR 10-2010-0019419 A & AT 528388 T	1-3/7,10/4-6,8,9,11,12
X/A	JP 05-068542 A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 23 March 1993 (23.03.1993), (Family: none)	4/1-3,5-12

☒ 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
02 August, 2013 (02.08.13)	13 August, 2013 (13.08.13)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2013/065414

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2011-516063 A (Massachusetts Institute of Technology), 26 May 2011 (26.05.2011), & US 2011/0124065 A1 & EP 2274417 A & WO 2009/145838 A2 & CA 2720526 A & KR 10-2011-0027652 A & CN 102066552 A	7,10
A	JP 2003-159079 A (Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd.), 03 June 2003 (03.06.2003), (Family: none)	1-12
A	JP 07-000182 A (F. Hoffmann-La Roche AG.), 06 January 1995 (06.01.1995), & US 5437989 A & EP 606621 A2 & DE 69332331 D & AT 224949 T & DK 606621 T & ES 2181681 T	1-12
A	JP 62-228287 A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 07 October 1987 (07.10.1987), & US 4876195 A & EP 228274 A2 & DE 3684434 A & SU 1753949 A & CA 1276122 A & DK 617386 A & AT 73850 T & KR 10-1995-0005132 B & CN 86108590 A & AT 73850 E	1-12
A	ROPER, H., Selective Oxidation of D-Glucose: Chiral Intermediates for Industrial Utilization., Starch, 1990, Vol. 42, No. 9, P. 342-349	1-12

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１３／０６５４１４

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N1/20(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N9/02(2006.01)i, C12N9/04(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12P7/24(2006.01)i, C12P7/42(2006.01)i, C12P7/46(2006.01)i

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.　C12N1/20, C12N1/21, C12N9/02, C12N9/04, C12N15/09, C12P7/24, C12P7/42, C12P7/46

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　１９７１－２０１３年
日本国実用新案登録公報　１９９６－２０１３年
日本国登録実用新案公報　１９９４－２０１３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), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, PubMed, Thomson Innovation

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/ Y/ A	WO 2008/139844 A1 (塩水港精糖株式会社) 2008.11.20, & JP 5118132 B & US 2010/0075381 A1 & EP 2143785 A1 & CN 101679936 A & AU 2008249370 A & KR 10-2010-0019419 A & AT 528388 T	1-3/ 7, 10/ 4-6, 8, 9, 11, 12
X/ A	JP 05-068542 A (武田薬品工業株式会社) 1993.03.23, (ファミリーなし)	4/ 1-3, 5-12

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願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	国際調査報告の発送日
０２．０８．２０１３	１３．０８．２０１３

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　４１５２
鈴木　崇之
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	関連する請求項の番号
Y	JP 2011-516063 A (マサチューセッツ　インスティテュート　オブ　テクノロジー) 2011.05.26, & US 2011/0124065 A1 & EP 2274417 A & WO 2009/145838 A2 & CA 2720526 A & KR 10-2011-0027652 A & CN 102066552 A	7, 10
A	JP 2003-159079 A (藤沢薬品工業株式会社) 2003.06.03, (ファミリーなし)	1-12
A	JP 07-000182 A (エフ・ホフマンーラ　ロシユ　アーゲー) 1995.01.06, & US 5437989 A & EP 606621 A2 & DE 69332331 D & AT 224949 T & DK 606621 T & ES 2181681 T	1-12
A	JP 62-228287 A (武田薬品工業株式会社) 1987.10.07, & US 4876195 A & EP 228274 A2 & DE 3684434 A & SU 1753949 A & CA 1276122 A & DK 617386 A & AT 73850 T & KR 10-1995-0005132 B & CN 86108590 A & AT 73850 E	1-12
A	RÖPER, H., Selective Oxidation of D-Glucose: Chiral Intermediates for Industrial Utilization., Starch, 1990, Vol. 42, No. 9, P. 342-349	1-12