(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3935224号
(P3935224)
(45)発行日　平成19年6月20日(2007.6.20)　(24)登録日　平成19年3月30日(2007.3.30)

(51)Int.Cl.　　F I
C12P 13/02 (2006.01)　　C12P 13/02
CO7F 9/32 (2006.01)　　CO7F 9/32

請求項の数 9　(全 14 頁)

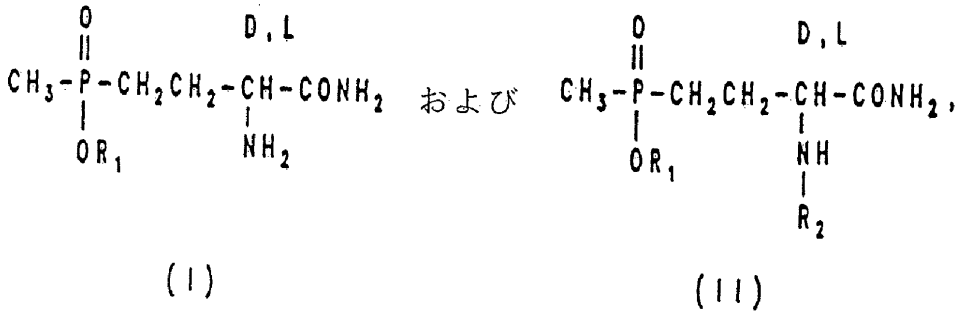
(21)出願番号　特願平7-158189
(22)出願日　平成7年6月23日(1995.6.23)
(65)公開番号　特開平8-53477
(43)公開日　平成8年2月27日(1996.2.27)
審査請求日　平成14年5月29日(2002.5.29)
(31)優先権主張番号　P44 22 045:6
(32)優先日　平成6年6月26日(1994.6.26)
(33)優先権主張国　ドイツ(DE)

(73)特許権者　594186511
ヘキスト・シエーリング・アグレボ・ゲゼルシヤフト・ミト・ベシユレンクテル・ハフツング
ドイツ連邦共和国、１３５０９　ベルリン、ミラウストラーセ、５４
(74)代理人　100069556
弁理士　江崎　光史
(74)代理人　100092244
弁理士　三原　恒男
(74)代理人　100093919
弁理士　奥村　義道

最終頁に続く

(54)【発明の名称】２－アミノ－４－メチルホスフィノブタンアミド誘導体の酵素切断方法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
式（Ｉ）および（ＩＩ）
【化１】



(I)　　(II)

〔式中
R_1 は枝分かれしていないまたは枝分かれした（C_1 ～C_{20}）－アルキル――これは置換されていないか、あるいは１個またはそれ以上のハロゲン、例えばフッ素、塩素、臭素またはヨウ素によって置換されているか、あるいは（C_1 ～C_8）－アルコキシによって一置換または多置換されている――であるか、または（C_3 ～C_8）－シクロアルキル――これは（C_1 ～C_4）－アルキル、（C_1 ～C_4）－アルコキシおよびハロゲンからなる群から選択される１個またはそれ以上の基によって置換されていることができる――であ

るか、または（C_3～C_{10}）－アルケニル、（C_3～C_{10}）－アルキニルまたはベンジルであり、そして
R_2はホルミル、枝分かれしていないまたは枝分かれした（C_1～C_{20}）－アルキルカルボニル――これは置換されていないかまたはアルキル部分でヒドロキシル、ハロゲン、（C_1～C_4）－アルコキシ、（C_1～C_4）－アルキルチオおよびフェニル｛これは（C_1～C_{12}）－アルキル、（C_1～C_{12}）－アルコキシ、ハロゲン、ニトロおよびCF_3からなる群から選択される３個までの基によって置換されていることができる｝からなる群から選択される１個またはそれ以上の基によって置換されている――であるか、またはベンゾイルまたは、（C_1～C_{12}）－アルキル、（C_1～C_{12}）－アルコキシ、ハロゲン、ニトロおよびCF_3からなる群から選択される１～３個の基によって置換されているベンゾイルである。〕
で表されるＤ－およびＬ－ＰＴＣ誘導体の混合物を水性媒体または水性－有機媒体中で加水分解活性酵素で処理し、その際、選択的に作用するＬ－アミノ酸アミド－切断酵素またはこの酵素を合成する微生物が使用されることを特徴とする、ＰＴＣ誘導体の酵素分離方法。

【請求項２】
選択的に作用するＬ－アミノ酸アミド－切断酵素またはこの酵素を合成する微生物が使用される、請求項１記載の方法。

【請求項３】
エンテロバクター・エロゲネス（ＤＳＭ９１６４）、クレブシエラ・オキシトカ（ＤＳＭ９１６２）、クレブシエラ・トレビサニイ（ＤＳＭ９１６３）、コリネバクテリウム・アクアチカム(Corynebacterium aquaticum)(ＤＳＭ９１７１）、ロドコッカス・ルブロパーティンクタス（ＡＴＣＣ２１９３０）、ロドコッカス・ロドクラウス（ＡＴＣＣ３３２７８）、アルスロバクターｓｐ．（ＡＴＣＣ３１６５２）およびコリネバクテリウムｓｐ．（ＡＴＣＣ３１６６２）からなる群から選択される少なくとも１種の微生物が使用される、請求項１記載の方法。

【請求項４】
式（Ｉ）または（ＩＩ）で表されるラセミアミノ酸アミド誘導体、またはＬ形が富化されたアミノ酸アミド誘導体が使用される、請求項１記載の方法。

【請求項５】
反応が、Ｄ－アミノ酸アミドラセマーゼの存在下に行なわれる、請求項１記載の方法。

【請求項６】
R_1が枝分かれしていないまたは枝分かれした（C_1～C_{10}）－アルキルまたは、ハロゲン、例えばフッ素、塩素によってもしくは（C_1～C_4）－アルコキシによって置換されている（C_1～C_{10}）－アルキルであるか、または（C_5～C_6）－シクロアルキルであり、そして
R_2が水素、ホルミル、枝分かれしていないまたは枝分かれした（C_1～C_{10}）－アルキルカルボニル――これは置換されていないかまたはアルキル部分がヒドロキシル、ハロゲン、（C_1～C_4）－アルコキシ、（C_1～C_4）－アルキルチオ、フェニルまたは、（C_1～C_4）－アルキル、（C_1～C_4）－アルコキシおよびハロゲンからなる群から選択される１～３個の基によって置換されているフェニルによって置換されている――であるか、またはベンゾイルまたは、C_1～C_4－アルキル、C_1～C_4－アルコキシおよびハロゲンからなる群から選択される１～３個の基によって置換されているベンゾイルである、請求項１記載の方法。

【請求項７】
R_1が枝分かれしていないまたは枝分かれした（C_1～C_{10}）－アルキルであり、そして
R_2が水素、（C_1～C_{10}）－アルキルカルボニル――これはフェニルによって、または一置換～三置換されているフェニル（その１～３個の置換基は（C_1～C_4）－アルキル、（C_1～C_4）－アルコキシおよびハロゲンから選択される）によって置換されている

――、好ましくはフェナセチルであるか、またはベンゾイルである、請求項１記載の方法。

【請求項８】

（C_1～C_6）－アルキルが、メチル、エチル、１－プロピルまたは２－プロピル、ｎ－、ｉ－、ｔ－または２－ブチル、３－メチル－ブト－２―イル、ｎ－、ｉ－、ｔ－、２－または３－ペンチル、ｎ－ヘキシルあるいは立体異性ヘキシル基である、請求項１記載の方法。

【請求項９】

ハロゲンが、フッ素、塩素、臭素またはヨウ素、好ましくはフッ素または塩素、特に塩素である、請求項１記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【０００１】

【産業上の利用分野】

Ｌ－２－アミノ－４－メチルホスフィニルブタン酸――以下Ｌ－ホスフィノトリシンまたはＬ－ＰＴＣと称す――またはその塩基または酸との塩は、ドイツ連邦共和国特許出願公開第２９３９２６９号明細書に記載されているように、化学的に容易に入手できるラセミ化合物、すなわち２－アミノ－４－メチルホスフィニルブタン酸の活性成分である。ドイツ連邦共和国特許出願公開第２７１７４４０号明細書に記載されている試験は、Ｌ－ホスフィノトリシンが、多様な雑草に対する顕著な除草活性を有することを示す。一方、Ｄ－形は不活性である。このため、Ｌ形を経済的方法によって容易に入手できる、使用に適した方法を開発する必要があった。

【０００２】

【従来の技術および発明が解決しようとする課題】

文献から公知の微生物源の抗生物質であるＬ－ＰＴＣ－アラニル－アラニンを、酸加水分解することによって（特開昭４８－８５５３８号公報）または酵素分解することによって（特開昭４９－３１８９０号公報）Ｌ－ＰＴＣを得ることができることが既に開示されている。

【０００３】

さらに、化学的に合成された、ラセミＰＴＣ前駆体の酵素分割に基づく方法が知られている。ドイツ連邦共和国特許出願公開第２９３９２６９号明細書には、Ｎ－アシル－ＰＴＣ、特にＮ－アセチル－ＰＴＣを、シュードモナス属、ストレプトマイセス属またはアスペルギルス属の特に培養した微生物菌株から得ることができるアシラーゼを用いて切断することが記載されている。

【０００４】

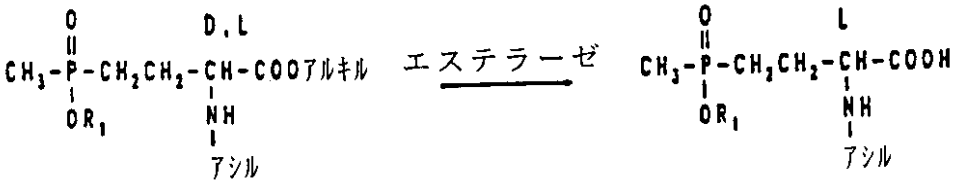
ヨーロッパ特許出願第０３８２１１３号明細書には、ラセミ２－アシルアミノ－４－（アルコキシ－メチルホスフィニル）ブタンカルボン酸エステルを、エステラーゼにより、また２－アシルアミノ－４－（アルコキシ－メチルホスフィニル）－ブタン酸エステルおよび－ブタンアミドを、アシラーゼにより、酵素切断する種々の方法が記載されている。

【０００５】

式１：

【０００６】

【化２】

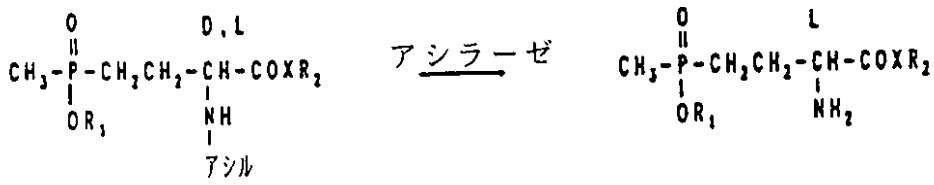


【０００７】

および

【０００８】

【化３】



【０００９】

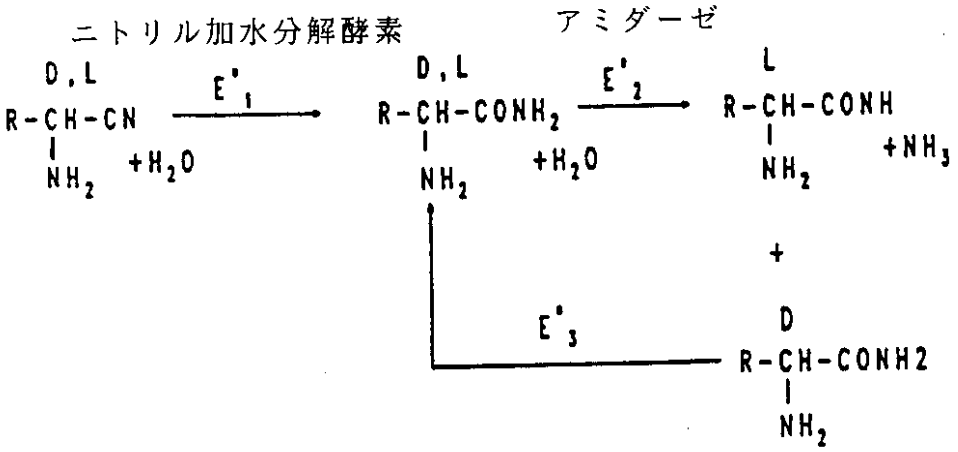
国際公開第８９１０９６９号パンフレットには、特にアリール置換されたラセミアミノニトリルを先ずアシネトバクター・カルコアチエンス(Acinetobacter calcoatiens)(ＤＳＭ３８７５）培養株と共にインキュベーションすることによって対応するＤ，Ｌ－アミノ酸アミドに変換しそしてこの生成物を別の工程でＬ－アミノ酸アミダーゼ、例えばアルスロバクターＡＴＣＣ３１６５２によって切断してＬ－アミノ酸を得、その際残ったＤ－アミノ酸アミドを同時にアミドラセマーゼによってラセミ化する方法が記載されている（式２）。

【００１０】

式２：

【００１１】

【化４】



【００１２】

Ｒ＝例えば－ＣＨ$_2$ Ｃ$_6$ Ｈ$_5$ ；

Ｅ$_1$* ＝アミノニトリル加水分解酵素

Ｅ$_2$* ＝Ｌ－アミノ酸アミドアミダーゼ

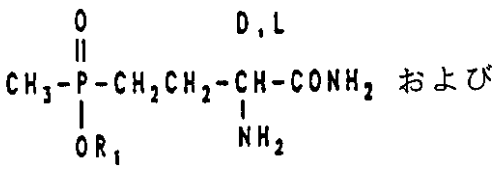
Ｅ$_3$* ＝Ｄ－アミノ酸アミドラセマーゼ

たとえこれら全ての合成工程が連続してまたは同時に行なわれ得るとしても、この方法は、部分方法の複雑さのために、３つの異なる酵素を用いてＬ－アミノ酸の工業的規模での生産を実現するためにはあまり有望でない。

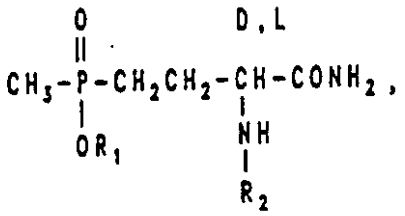
【００１３】

リン含有基を有するアミノ酸を切断できることは示唆されていない。これはおそらく、Ｐ（Ｖ）－含有化合物、特に式Ｒ' Ｒ''Ｐ（Ｏ）ＯＲ''' で表される誘導体が、その立体配置のために酵素加水分解されたカルボン酸エステルの遷移状態に似ていて(M. Dixon, E. Webb, Enzymes, e. 版, Longmans, Green & Co LTD, London 1964, pp.346-352)、従って、失活効果を有し得るためであろう。

【００１４】
J. Org. Chem. 53, 1826 (1988) にはさらに、ミクロバクテリウム・ネサウラム(Microbacterium nesaurum)(ＡＴＣＣ２５７２５）を用いてラセミα－アルキル化アミノ酸アミドを酵素分離してα－アルキル化Ｌ－アミノ酸および相当するＤ－アミノ酸アミドにする方法が記載されているが、その際得られるエナンチオマー過剰は普通の程度でしかない。
【００１５】
ヨーロッパ特許出願公開第１９３１１３号明細書には、ラセミα－アミノ酸アミド、例えば、Ｄ，Ｌ－フェニルアラニンアミドを微生物、例えばシュードモナスによって加水分解してＬ－アミノ酸とすることが記載されている。残るＤ－アミノ酸アミドは強塩基、例えばＮａＯＨによってラセミ化されそしてこの方法に再循環される。この特許明細書にも、リン含有アミノ酸誘導体の使用に関する示唆はない。
【００１６】
最後に、Bull. Chem. Soc. Japan 61, 3599 (1988)には、Ｌ－２－アセトアミド－４－（メチルホスフィニル）－ブタンアミドまたはＬ－２－アセトアミド－４－（エトキシメチルホスフィニル）ブタンアミドを酵素グルタミナーゼによって加水分解してＬ－２－アセトアミド－４－（メチルホスフィニル）ブタン酸およびＬ－２－アセトアミド－４－（エトキシメチルホスフィニル）ブタン酸とすることが記載されている。しかし、これらのアミダーゼ反応は問題のＬ－立体配置ホスフィノトリシンアミド誘導体を用いてしか明確に行なわれず、従ってＬ－ホスフィノトリシンを安価なラセミ前駆体から経済的に合成する経路を提供しない。
【００１７】
上記先行技術に基づいて、Ｌ－ホスフィノトリシンが、ホスフィン酸部分上で修飾されている容易に入手できるホスフィノトリシンアミドを用いて酵素により効果的に合成され得ることは予期され得なかった。
【００１８】
【課題を解決するための手段】
本発明は、式（Ｉ）および（ＩＩ）
【００１９】
【化５】



および



(I) (II)

【００２０】
〔式中
R_1 は枝分かれしていないまたは枝分かれした（C_1 ～C_{20}）－アルキル――これは置換されていないか、あるいは１個またはそれ以上のハロゲン、例えばフッ素、塩素、臭素またはヨウ素によって置換されているか、あるいは（C_1 ～C_8）－アルコキシによって一置換または多置換されている――であるか、または（C_3 ～C_8）－シクロアルキル――これは（C_1 ～C_4）－アルキル、（C_1 ～C_4）－アルコキシおよびハロゲンからなる群から選択される１個またはそれ以上の基によって置換されていることができる――であるか、または（C_3 ～C_{10}）－アルケニル、（C_3 ～C_{10}）－アルキニルまたはベンジルであり、そして
R_2 はホルミル、枝分かれしていないまたは枝分かれした（C_1 ～C_{20}）－アルキルカルボニル――これは置換されていないかまたはアルキル部分でヒドロキシル、ハロゲン、

（C_1 ～C_4 ）－アルコキシ、（C_1 ～C_4 ）－アルキルチオおよびフェニル｛これは（C_1 ～C_{12}）－アルキル、（C_1 ～C_{12}）－アルコキシ、ハロゲン、ニトロおよびCF_3 からなる群から選択される３個までの基によって置換されていることができる｝からなる群から選択される１個またはそれ以上の基によって置換されている――であるか、またはベンゾイルまたは、（C_1 ～C_{12}）－アルキル、（C_1 ～C_{12}）－アルコキシ、ハロゲン、ニトロおよびCF_3 からなる群から選択される１～３個の基によって置換されているベンゾイルである。〕
で表されるＤ－およびＬ－ＰＴＣ誘導体の混合物を水性媒体または水性－有機媒体中で加水分解活性酵素で処理し、その際、選択的に作用するＬ－アミノ酸アミド－切断酵素またはこの酵素を合成する微生物が使用されることを特徴とする、ＰＴＣ誘導体の酵素分離方法を提供する。

【００２１】
式（Ｉ）および（ＩＩ）で表されるラセミアミノ酸アミド誘導体またはＬ－形が豊化されたアミノ酸アミド誘導体を使用することができる。残るＤ－ホスフィノトリシンアミド誘導体は、例えば塩基の作用によってラセミ化され、この方法に再循環され得る。

【００２２】
反応は、Ｄ－アミノ酸アミドラセマーゼの存在下に行なうこともでき、その結果純粋なＬ－ホスフィノトリシン誘導体が最後に得られる。
R_1 が枝分かれしていないまたは枝分かれした（C_1 ～C_{10}）－アルキルまたは、ハロゲン、例えばフッ素、塩素によってもしくは（C_1 ～C_4 ）－アルコキシによって置換されている（C_1 ～C_{10}）－アルキルであるか、または（C_5 ～C_6 ）－シクロアルキルであり、そして
R_2 が水素、ホルミル、枝分かれしていないまたは枝分かれした（C_1 ～C_{10}）－アルキルカルボニル――これは置換されていないかまたはアルキル部分がヒドロキシル、ハロゲン、（C_1 ～C_4 ）－アルコキシ、（C_1 ～C_4 ）－アルキルチオ、フェニルまたは、（C_1 ～C_4 ）－アルキル、（C_1 ～C_4 ）－アルコキシおよびハロゲンからなる群から選択される１～３個の基によって置換されているフェニルによって置換されている――であるか、またはベンゾイルまたは、C_1 ～C_4 －アルキル、C_1 ～C_4 －アルコキシおよびハロゲンからなる群から選択される１～３個の基によって置換されているベンゾイルである
上記式（Ｉ）および（ＩＩ）で表されるＤ－およびＬ－ＰＴＣ誘導体の混合物を用いることを包含する本発明による方法が特に重要である。

【００２３】
R_1 が枝分かれしていないまたは枝分かれした（C_1 ～C_{10}）－アルキルであり、そして
R_2 が水素、（C_1 ～C_{10}）－アルキルカルボニル――これはフェニルによってまたは一置換～三置換されているフェニル｛その１～３個の置換基は（C_1 ～C_4 ）－アルキル、（C_1 ～C_4 ）－アルコキシおよびハロゲンから選択される｝によって置換されている――、好ましくはフェナセチルであるか、またはベンゾイルである
上記式（Ｉ）および（ＩＩ）で表されるＤ－およびＬ－ＰＴＣ誘導体の混合物を用いることを包含する本発明による方法が好ましい。

【００２４】
（C_1 ～C_6 ）－アルキルは、特に、メチル、エチル、１－プロピルまたは２－プロピル、ｎ－、ｉ－、ｔ－または２－ブチル、３－メチル－ブト－２－イル、ｎ－、ｉ－、ｔ－、２－または３－ペンチル、ｎ－ヘキシルあるいはヘキシル立体異性体である。C_1 ～C_6 －アルコキシは、特に、（C_1 ～C_6 －アルキル）－オキシであり、その際アルキル基は上記意味を有する。

【００２５】
より詳細に定義するとは言えないが、ハロゲンは基フッ素、塩素、臭素およびヨウ素、好ましくはフッ素および塩素、特に塩素である。
本発明による切断は、R_1 およびR_2 が上で定義された通りである式（Ｉ）おおよび（Ｉ

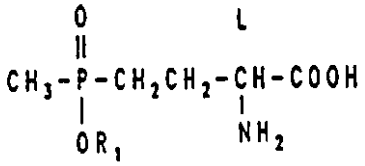
Ｉ）で表されるＤ，Ｌ－ＰＴＣ誘導体のＮ－アシル切断により行なわれ得る。

【００２６】

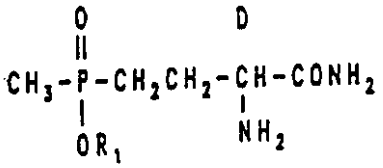
式（Ｉ）で表されるアミノ酸アミド誘導体のこのアミダーゼ開裂により、式（ＩＩＩ）

【００２７】

【化６】



(III)



(IV)

【００２８】

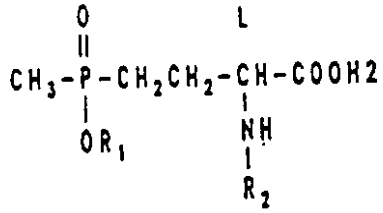
で表される対応するホスフィンエステル保護Ｌ－ホスフィノトリシンが得られ、これはそれ自体公知の方法で、公知の経路によって、例えば未反応のＤ－ＰＴＣ誘導体を酸性範囲のｐＨで切断された酸から抽出により除去することによって、式ＩＶで表される未反応のアミドから単離され得、この方法においてＬ－ＰＴＣ誘導体は水溶液中にアンモニウム塩の形で残り次いで水溶液を乾燥するまで蒸発することによって単離され得る。さらに、特に、晶出、蒸留またはクロマトグラフィーによる分離が可能である。

【００２９】

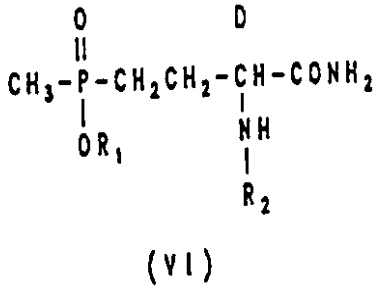
式（ＩＩ）で表されるこれらのＮ－アシル－アミノ酸誘導体のアミダーゼ切断によって、式Ｖで表される対応するホスフィンエステル保護Ｌ－Ｎ－アシルホスフィノトリシンが式ＶＩで表される未反応のＤ－Ｎ－アシルアミノ酸との混合物の形で得られる。

【００３０】

【化７】



(V)



(VI)

【００３１】

酵素的に加水分解されたＬ－ＰＴＣ誘導体Ｖは、慣用の方法でまたは原理的に知られている方法で、例えば晶出、蒸留、カラムまたはイオン交換クロマトグラフィーによって、特に未反応のＤ－ＰＴＣ誘導体を水相（ｐＨは好ましくは９～１１、特に９．５～１０．５）から適当な有機溶剤を用いて、好ましくは０～１０℃の減ぜられた温度で素早く抽出することによって、首尾よく単離され得、その際アミド切断から生じるＬ－ＰＴＣ誘導体はカルボン酸塩の形で水相中に残る。

【００３２】

Ｄ－誘導体を分離した後、Ｌ－ＰＴＣ誘導体を慣用の方法と同様に、例えば２０℃～溶液の沸点までの温度で希鉱酸水を用いて、化学加水分解し、その際反応時間は１～２４時間である。適当な鉱酸は、例えば、ハロゲン化水素酸または硫酸、特に希～濃塩酸である。

【００３３】

しかし、有機酸もまたそれぞれの場合に非常に適している。化学的全加水分解により、Ｌ

－ＰＴＣだけでなくアシル基R_2に対応するカルボン酸も生じ、その際このカルボン酸を酸性水溶液から蒸留によってまたは適当な有機溶剤での抽出によって除去できる。

【００３４】

残るＤ－ＰＴＣ誘導体は、酵素加水分解の副産物から抽出方法、蒸留、晶出またはクロマトグラフィーによって精製され得そして再度Ｄ，Ｌ－混合物の形で、場合によりラセミ化後、例えば熱でまたは塩基、例えばアルコール性溶液中のアルコラートの作用によって、酵素加水分解される。一般に、このような塩基を用いたラセミ化は特に穏やかな方法である。

【００３５】

上記酵素は遊離形で、あるいは慣用の方法または専門家に知られている方法で固定化した後に使用され得る。問題の基質は溶液または懸濁液の形で水性媒体中で使用される。０．１％～飽和溶液（その際この方法は懸濁状態で行なわれる）までの濃度が可能である。水に溶解しない有機溶剤の添加下での２相混合物中での方法と同様に、水溶性溶剤、例えばメタノールの添加も、それぞれの場合に同様に行い得る。

【００３６】

一般に、酵素切断の際の反応温度は１０～６０℃、好ましくは２０～４０℃である。例えば、本方法は、バッチ式でまたはカラム方法として連続的に行なわれ得る。

【００３７】

酵素加水分解は好ましくは５～１２のｐＨで、特にｐＨ６～１０で行なわれ、その際本方法はそれぞれの場合にカルボン酸エステルまたはカルボキサミドの非特異的な加水分解を抑えるようにｐＨ５～７で行なうこともできる。

【００３８】

反応の過程は例えばＨＰＬＣによって基質の減量を監視することによって監視され得る。それぞれの場合において、特にカルボン酸エステルが切断される時に、反応の過程は他の簡単な方法によって、例えばｐＨが一定になるまで配量しなければならない塩基の量を監視することによっても監視され得る。

【００３９】

酵素切断生成物中のＬ－化合物含有率は、化合物をアルカリ性または酸性加水分解してＬ－ＰＴＣとし、次いで誘導体化した後に、根本において知られている方法で(D. Asward, Analytical Biochemistry 137, 405-409 (1984))、ＨＰＬＣを用いて、測定され得る。

【００４０】

式ＩＩで表される出発原料は公知であるかまたはそれ自体公知の方法によって製造され得る（ヨーロッパ特許出願第０３８２１１４号参照）。

式Ｉで表される出発材料は、これまで知られておらず、それ故本特許出願の主題でもある。この化合物の合成は実験部で例によって記載されている。

【００４１】

場合により誘導体化されているＰＴＣ誘導体中の術語ＤまたはＬは、カルボキシル基に対してα位にあって場合により保護されているアミノ基に連結している炭素原子上の立体配置を示している。一般に、これらのＤ－またはＬ－ＰＴＣ誘導体は、R_1保護ＰＴＣ誘導体中のリン原子上の付加的なキラル中心のために、純粋なエナンチオマーではなくジアステレオマー混合物である。

【００４２】

驚くべきことに、酵素切断には実質的に上記α－炭素原子上の立体配置だけが重要であることが明らかとなった。基R_1の加水分解後、リン原子上のキラル中心は、ＯＨとＯの間の素早いプロトン交換のために実質的に失われる。

【００４３】

Ｄ，Ｌ－ＰＴＣ誘導体の分割のためのまたＬ－ＰＴＣの製造のための本発明による方法は、基質／生成物混合物の効率的な分離の際に生じる塩が少量であることによって特徴づけられる。酵素分離後に得られるＤ－ＰＴＣ誘導体が望まれない場合には、それは容易にかつ穏和な条件下で、場合により事前に単離せずにラセミ化され得、従って酵素分離に再使

用され得る。
【００４４】
本発明による方法は好ましくはアミダーゼを合成する微生物を用いて行なわれ得る。このような微生物の例は、エンテロバクター・エロゲネス（ＤＳＭ９１６４）、クレブシエラ・オキシトカ（ＤＳＭ９１６２）、クレブシエラ・トレビサニイ（ＤＳＭ９１６３）、コリネバクテリウム・アクアチカム(Corynebacterium aquaticum（ＤＳＭ９１７１）、ロドコッカス・ルブロパーティンクタス（ＡＴＣＣ２１９３０）、ロドコッカス・ロドクラウス（ＡＴＣＣ３３２７８）、アルスロバクターｓｐ．（ＡＴＣＣ３１６５２）およびコリネバクテリウムｓｐ．（ＡＴＣＣ３１６６２）である。
【００４５】
【発明の効果】
本発明によりエステルが保護されたＰ－Ｏ酸官能基を持ったＰＴＣ誘導体を使用する時、特別な予期されない利点は、ＰＴＣ誘導体のエナンチオ選択的切断に市販のアミダーゼさえ使用できることである。一般に、ホスフィン酸エステルによる加水分解活性の阻害、またはホスフィン酸エステルの加水分解の副反応さえ、本方法において観察されず、このことは驚くべきことである。この酵素アミド切断において、エステルの形でホスフィン酸を保護することは、変換率に正の効果を及ぼすかまたは、それぞれの場合に、まず第一に酵素により基質を受容させる。
【００４６】
【実施例】
Ａ）出発原料
例Ａ１
Ｄ，Ｌ－２－アミノ－４－（１－ブトキシ－（メチル）ホスフィニル）ブタンアミド（式Ｉ：R_1 ＝ｎ－C_4H_9 ）
ａ）Ｄ，Ｌ－２－アミノ－４－（１－ブトキシ－（メチル）ホスフィノイル）ブタノニトリル（米国特許第５，０５１，５２５号またはヨーロッパ特許出願第０３８２１１４号と同様に製造）
５２．２５ｇ（０．２００モル）のＤ，Ｌ－２－アセトキシ－４－（１－ブトキシ－（メチル）ホスフィノイル）ブチロニトリルを３０℃で６０ｍｌのアンモニア溶液（２５％）に２時間にわたって添加する。
【００４７】
次いで反応混合物をジクロロメタンを用いて抽出し、そして抽出物を硫酸ナトリウムで乾燥させそしてロータリーエバポレーター中で蒸発させる。これによって、３２．１ｇ（理論量の７３．５％）の帯黄色の油状物が得られ、これは精製することなく次の合成工程に使用される。
【００４８】
ｂ）Ｄ，Ｌ－２－アミノ－４－（１－ブトキシ－（メチル）ホスフィノイル）ブタンアミド
１６．１４ｇのＤ，Ｌ－２－アミノ－４－（１－ブトキシ－（メチル）ホスフィノイル）－ブタノニトリル（０．０７５モル）を室温で１００ｍｌのギ酸中で６０ｇのＨＣｌガスで飽和させる。２時間後、反応混合物を濃縮し、残留物を水に溶解させ、そして混合物を飽和重炭酸ナトリウム溶液を用いてｐＨ８にする。次いでこの溶液を２回ジクロロメタンを用いて洗浄し、次いで水相をロータリーエバポレーター中で蒸発させ、そして繰り返しメタノールを用いて煮詰める。メタノール抽出物を濃縮した後、残った油状物をシリカゲル上でメタノール／ジクロロメタン（３：７）中でクロマトグラフィーで分離する。
【００４９】
これによって１４．７ｇ（理論量の８３．１％）のＤ，Ｌ－２－アミノ－４－（１－ブトキシメチル）ホスフィノイル）ブタンアミドが無色の油状物の形で得られる。
【００５０】
^{1}Ｈ　ＮＭＲ（$CDCl_3$ ）：０．９４（ｔ，Ｊ＝Ｈｚ，３Ｈ）；１．４８（ｄ，Ｊ＝１

４Ｈｚ，３Ｈ），１．３２～１．４８（ｍ，２Ｈ）、１．６４（ｍ，２Ｈ），１．８～２．１（ｎ，４Ｈ）と重複；２．５（ｓ，NH_2）；３．５２（ｔ，Ｊ＝．．Ｈｚ）、３．９６（ｍ，２Ｈ）；６．３８（ｓ，１Ｈ）；７．４２（ｇ，１Ｈ）。^{21}ｐ　ＮＭＲ（D_2．．）：６２．４（ｓ）ｐｐｍ。

【００５１】

生物学的例

物質：

Ｄ，Ｌ－２－アミノ－４－（メチル）（ｎ－ブトキシ）ホスフィノイルブタンアミド＝ＰＰＴ－ＡＭ

Ｄ，Ｌ－Ｎ－アセチル－４－（メチル）（ｎ－ブトキシ）ホスフィノイル－２－アミノブタンアミド＝ＰＰＴ－Ａｃ

例１：土壌中でのＰＰＴ－ＡＭおよびＰＰＴ－Ａｃの分解

種々の源（砂を含んだ、堤防砂利、森林地帯腐食土、牧草地、庭腐食土、ローム）からの土壌の１０ｇ試料を乾燥させ、スクリーニングしそして１．２ｍｌの２つの試験物質の中の１つの１００ｍＭ溶液，ｐＨ＝７．０で処理した。バッチを暗がりで室温で１４日間インキュベーションした。

【００５２】

分解挙動を分析するために、０．５ｇの試料を１、２、４、６、８、１２および１４日後に採取して６０℃で２×０．５ｍｌの水を用いて２×３０分間抽出した。合わせた上清をアミノ酸分析計中でニンヒドリンポストカラム誘導体化（Biotronic LC5001)(ＰＰＴ－ＡＭの場合）でまたはＨＰＬＣ（カラム：Aminex HPX-87H／溶離液：０．０１　H_2SO_4、１０％のアセトニトリル、または０．１％のトリフルオロアセテート、１０％のアセトニトリル／溶離：無勾配検出：それぞれ１９５ｎｍおよび２１０ｎｍ１）（ＰＰＴ－Ａｃの場合）によって試験した。

【００５３】

無菌土壌上での対照実験を行なった（２００℃で４時間のインキュベーション）。両方の試験物質が微生物活性土壌中で、約１～２日の半減期で分解されることが明らかになった。それぞれの場合において、１つの代謝生成物が出発材料に対してほぼ等モル比で蓄積する。しかし、試験化合物のさらなる分解は２週間の実験時間中で見出されなかった。無菌土壌中で上記両アミドの変換は検出され得なかった。

【００５４】

例２：ＰＰＴ－ＡＭまたはＰＰＴ－Ａｃを唯一の窒素源として用いた土壌微生物の増菌培養株(enrichment cultures)

例１に記載した土壌の１ｇのバッチを１０ｍＭのＮａＣｌ、１０ｍＭのリン酸ナトリウム緩衝液，ｐＨ＝７．０で、室温で抽出し、そして上清を次の培地中への接種に使用した。

【００５５】

グルコース	０．２％
スクシネート	５ｍＭ
グリセロール	１０ｍＭ
NH_4Cl	１ｇ／ｌ
K_2HPO_4，ｐＨ＝７．２	２．５ｇ／ｌ
$MgSO_4$	０．０６ｇ／ｌ
ＮａＣｌ	０．０１ｇ／ｌ
微量元素溶液	１ｍｌ／ｌ
ＰＰＴ－ＡＭまたはＰＰＴ－Ａｃ	１０ｍＭ

微量元素溶液：

$FeSO_4\times7H_2O$	１ｇ／ｌ
$MnSO_4\times H_2O$	０．２２ｇ／ｌ
H_3BO_3	０．１ｇ／ｌ
$Na_2MoO_4\times2H_2O$	０．１ｇ／ｌ

$ZnSO_4 \times 7H_2O$　　０．１８ｇ／ｌ
$CuSO_4 \times 5H_2O$　　０．１６ｇ／ｌ
$CoCl_2 \times 6H_2O$　　０．１ｇ／ｌ
１Ｎ　ＨＣｌ　　１ｍｌ／ｌ
これらの培養株の２ｍｌのバッチを２８℃で２００ｒｐｍで２～３日間インキュベートしそして、増殖が起こった後、窒素源NH_4Clを段階的に減らしながら（１ｇ／ｌ ---> ０．５ ---> ０．１ｇ／ｌ ---> ０ｇ／ｌ）さらに継代した。これにより、いくつかの増菌培養株が得られ、これらは、唯一の窒素源として、それぞれＰＰＴ－ＡＭおよびＰＰＴ－Ａｃを用いて増殖することが可能である。

【００５６】

純粋な培養株を得るために、単コロニーを、適当な寒天培地上にプレーティングした後に増菌培養株から単離し、次いでこれらの単コロニーを液体培地中で増殖させ再度寒天プレート上に画線して純度を評価した。得られた純粋な培養株は次のように同定された：
－唯一の窒素源としてＰＰＴ－ＡＭおよびＰＰＴ－Ａｃの利用：
エンテロバクター・エロゲネス（ＤＳＭ寄託番号：ＤＳＭ９１６４）
－唯一の窒素源としてＰＰＴ－Ａｃの利用：
クレブシエラ・オキシトカ（ＤＳＭ寄託番号：ＤＳＭ９１６２）
クブシエラ・トレビサニイ（ＤＳＭ寄託番号：ＤＳＭ９１６３）
コリネバクテリウム・アクアチカム（ＤＳＭ寄託番号：ＤＳＭ９１７１）
例３：唯一の窒素源としてＰＰＴ－ＡＭまたはＰＰＴ－Ａｃの利用に関する他の微生物のスクリーニング
例２に記載した手順を使って、菌株コレクションからの一連の微生物を、唯一の窒素源として上記両アミドの利用についてスクリーニングした。次の菌株が、基質として専らＰＰＴ－ＡＭを利用できることが見出された：
ロドコッカス・ルブロペルティンクタス，ＡＴＣＣ２１９３０
ロドコッカス・ロドクラウス，ＡＴＣＣ３３２７８
アルスロバクターｓｐ．，ＡＴＣＣ３１６５２
コリネバクテリウムｓｐ．，ＡＴＣＣ３１６６２
例４：分解反応の性質：
例２および例３に記載した菌株の１０ｍｌの培養株を例２の最小培地中で唯一の窒素源として関連のアミド基質を用いて２８℃で２００ｒｐｍで２～３日間増殖した。細胞が対数増殖の後期に達した時に、細胞を遠心分離しそして培養上清をアミノ酸分析計で（ＰＰＴ－ＡＭ培養株の場合）またはＨＰＬＣによって（ＰＰＴ－Ａｃ培養株の場合）例１に概説したように分析した。

【００５７】

両方のアミド基質で、代謝生成物の形成が観察され、それは未反応出発化合物に対してほぼ等モル比である（図１および２参照）。
培地中の炭素源の過剰にもかかわず、ラセミアミドＰＰＴ－ＡＭおよびＰＰＴ－Ａｃのさらなる反応は観察されず、このことは分解反応が立体選択的であることを示唆した。さらに、アンモニアの豊富化が培地上清中で検出され（図１参照）、その際アンモニアは、アミダーゼ反応における生産物として形成された。

【００５８】

例５：ＰＰＴ－Ａｃ代謝生成物の同定、およびエナンチオマー比の測定：
例４（ＰＰＴ－Ａｃ）からの培養上清を、凍結乾燥によって１０倍に濃縮した。それぞれ約１０ｍｇの代謝生成物および未反応の出発化合物をこれらの溶液から次のように単離した：
－ＰＰＴ－Ａｃおよび代謝生成物Ｍ：調製に関するＨＰＬＣ，条件は例１を参照、溶離：０．１％のトリフルオロアセテート、１０％のアセトニトリル、検出：２１０ｎｍ。

【００５９】

単離した物質は凍結乾燥によって濃縮し次いで質量分析によって分析した。これによって

代謝生成物の分子構造を決定した。この物質は：
－Ｍ＝Ｎ－アセチル－４－（メチル）（ｎ－ブトキシ）ホスフィノイル－２－アミノブタン酸
と同定された。
【００６０】
エナンチオマー純度を調べるために、代謝生成物および未反応のアミドをＨＣｌで加水分解して遊離ホスフィノトリシン（ＰＰＴ）とした。得られるＰＰＴ試料のエナンチオマー比を、キラルＨＰＬＣによる誘導体化後に測定した（D. Aswad, Analytical Biochemistry, 137, 405-409, 1984)。
【００６１】
結果を菌株エンテロバクター・エロゲネス（ＤＳＭ寄託番号：ＤＳＭ９１６４）についてここに示す。

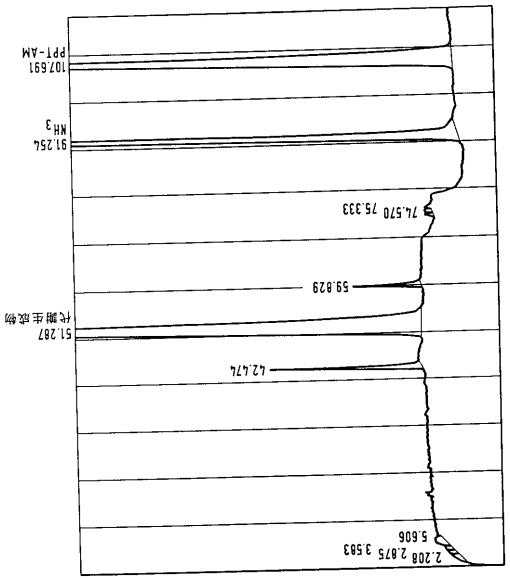
－代謝生成物：Ｌ－ＰＰＴ　９５．７％
Ｄ－ＰＰＴ　４．３％
－未反応のＰＰＴ－ＡＭ：Ｌ－ＰＰＴ　３．３％
Ｄ－ＰＰＴ　９６．７％

本明細書中に記載した他の菌株についても同等の結果が得られた。
【００６２】
これらの試験から、見出された反応型が、使用したラセミアミドを立体選択的に加水分解して対応するＬ－カルボン酸とし、これはＬ－特異的アミダーゼによって触媒されることがわかった。
【００６３】
例６：バイオ形質転換(biotransformation) によるＰＰＴ－Ａｃのエナンチオ選択的アミド切断：
クレブシエラ・オキシトカ（ＤＳＭ寄託番号：ＤＳＭ９１６２）をエレンマイエルフラスコ中で例２の培地１００ｍｌ中で２８℃で２００ｒｐｍで２日間唯一の窒素源として１０ｍＭのＰＰＴ－Ａｃを用いて培養した。次いで細胞を５００ｒｐｍで１０分間遠心分離し、５０ｍｌの１０ｍＭ　ＮａＣｌ、１０ｍＭ　リン酸ナトリウム緩衝液，ｐＨ７．０中で１回洗浄し、そして同一の緩衝液中に、３０ｍｇ／ｍｌのＤ，Ｌ－ＰＰＴ－Ａｃを用いてｃ＝５０ｍｇ／ｍｌの濃度で再懸濁した。
【００６４】
バイオ形質転換バッチ（全容積１２ｍｌ）をエレンマイヤーフラスコ中で２８℃で２００ｒｐｍで１５時間インキュベーションし、次いで反応上清をＨＰＬＣで分析した（例１参照）。
【００６５】
Ｎ－アセチル－４－（メチル）（ｎ－ブトキシ）ホスフィノイル－２－アミノブタン酸の含量は１４．５ｍｇ／ｍｌであった。形成される生成物のエナンチオマー純度は、図５に示された図に対応していた。
【図面の簡単な説明】
【図１】　唯一の窒素源として１０ｍＭのＰＰＴ－ＡＭを含む最小培地中で増殖したエンテロバクター・エロゲネス（ＤＳＭ寄託番号：ＤＳＭ９１６４）の培養上清のアミノ酸プロフィール（例２参照）。試料は、アミノ酸分析計，モデルBiotronic LC5001で、ニンヒドリンポストカラム誘導体化を用いて分析した。図は、関連ピークの保持時間（単位：分）を示している。
５１．２８７分＝２－アミノ－４－（メチル）（ｎ－ブトキシ）－ホスフィノイルブタン酸
９１．２５４分＝アンモニア
１０７．６９１分＝ＰＰＴ－ＡＭ

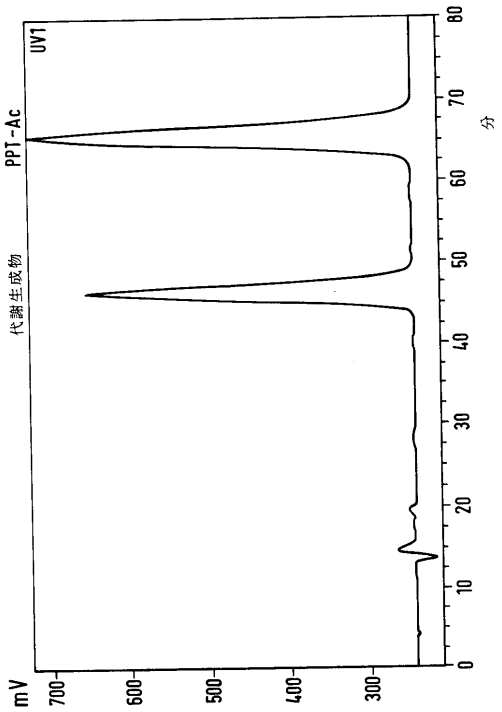
他のピークは、測定装置の内部ピークである。

【図２】　唯一の窒素源として１０ｍＭのＰＰＴ－Ａｃを含む最小培地中で増殖したエンテロバクター・エロゲネス（ＤＳＭ寄託番号：ＤＳＭ９１６４）の培養上清のＨＰＬＣプロフィール（例２参照）。試料は、Aminex HPX-87Hカラム、０．１％のトリフルオロアセテート、１０％のアセトニトリルでの無勾配溶離、検出：２１０ｎｍを用いて分析した。Ｍ２＝Ｎ－アセチル－４－（メチル）（ｎ－ブトキシ）－ホスフィノイル－２－アミノブタン酸。

【図１】



【図２】



フロントページの続き

(72)発明者　ロタール・ウイルムス
ドイツ連邦共和国、６５７１９　ホーフハイム、ケーニッヒシユタイネル・ストラーセ、５９
(72)発明者　クラウス・バルチユ
ドイツ連邦共和国、６１４６２　ケーニッヒシユタイン、イム・クラインフエルト、５４

審査官　前田　憲彦

(56)参考文献　特開平０２－２４００８９（ＪＰ，Ａ）
特開平０２－２４５１９７（ＪＰ，Ａ）
特開平０２－０１９３９０（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
C12P 13/00
C07F　9/00
CA(STN)
REGISTRY(STN)