



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201137125 A1

(43)公開日：中華民國 100 (2011) 年 11 月 01 日

(21)申請案號：100109653

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 03 月 22 日

(51)Int. Cl. : *C12P17/14 (2006.01)*

(30)優先權：2010/03/26 日本

2010-071808

(71)申請人：住友化學股份有限公司 (日本) SUMITOMO CHEMICAL COMPANY, LIMITED
(JP)

日本

(72)發明人：朝子弘之 ASAKO, HIROYUKI (JP)

(74)代理人：洪武雄；陳昭誠

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：6 項 圖式數：0 共 73 頁

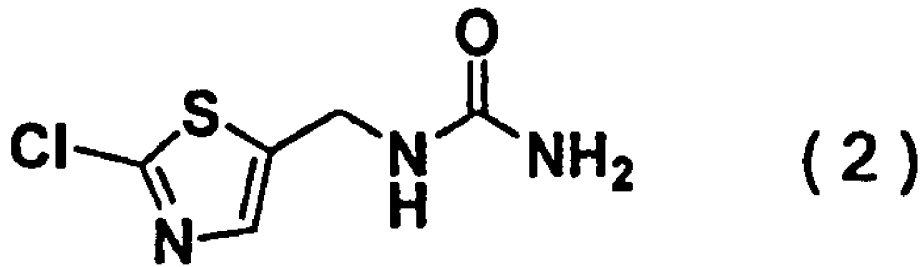
(54)名稱

5-(胺基甲基)-2-氯噻唑的製造方法

METHOD FOR MAKING 5-(AMINOMETHYL)-2-CHLOROTHIAZOLE

(57)摘要

本發明係提供一種 5-(胺基甲基)-2-氯噻唑的製造方法等，其包含下述步驟：反應步驟，係對於 N-胺甲醯基胺基化合物，使藉由將聚核苷酸導入微生物細胞內所得之轉形體的培養物或其處理物進行作用之步驟；其中，該聚核苷酸包含編碼具有將 N-胺甲醯基胺基化合物轉換為相對應之 5-(胺基甲基)-2-氯噻唑的能力之酵素之胺基酸序列的鹼基序列。





(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201137125 A1

(43)公開日：中華民國 100 (2011) 年 11 月 01 日

(21)申請案號：100109653

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 03 月 22 日

(51)Int. Cl. : *C12P17/14 (2006.01)*

(30)優先權：2010/03/26 日本

2010-071808

(71)申請人：住友化學股份有限公司 (日本) SUMITOMO CHEMICAL COMPANY, LIMITED
(JP)

日本

(72)發明人：朝子弘之 ASAKO, HIROYUKI (JP)

(74)代理人：洪武雄；陳昭誠

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：6 項 圖式數：0 共 73 頁

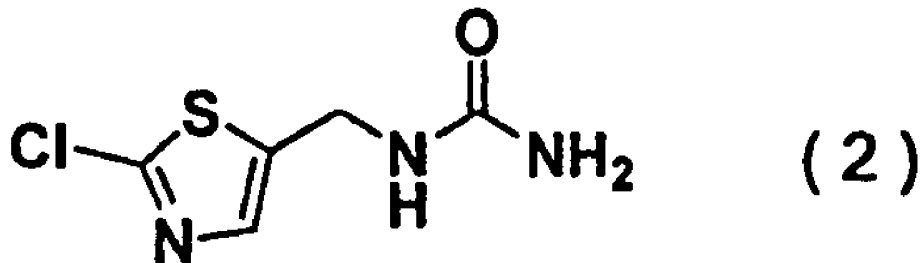
(54)名稱

5-(胺基甲基)-2-氯噻唑的製造方法

METHOD FOR MAKING 5-(AMINOMETHYL)-2-CHLOROTHIAZOLE

(57)摘要

本發明係提供一種 5-(胺基甲基)-2-氯噻唑的製造方法等，其包含下述步驟：反應步驟，係對於 N-胺甲醯基胺基化合物，使藉由將聚核苷酸導入微生物細胞內所得之轉形體的培養物或其處理物進行作用之步驟；其中，該聚核苷酸包含編碼具有將 N-胺甲醯基胺基化合物轉換為相對應之 5-(胺基甲基)-2-氯噻唑的能力之酵素之胺基酸序列的鹼基序列。



六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於 5-(胺基甲基)-2-氯噻唑之製造方法等。

【先前技術】

5-(胺基甲基)-2-氯噻唑已知為醫藥品、農藥品等之合成中間體(可參照例如 US5180833 A)。

關於該化合物之製造方法，在 US5180833 A 中記載將異硫氰酸烯丙酯衍生物經氯化劑反應後，再經氨水(aqueous ammonia)或六亞甲四胺進行反應之方法。

N-胺甲醯基胺基化合物可作為 5-(胺基甲基)-2-氯噻唑之前驅物。

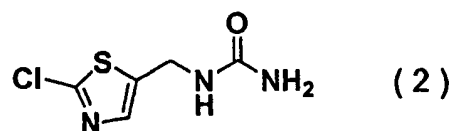
【發明內容】

本發明之目的係提供作為合成中間體有用之 5-(胺基甲基)-2-氯噻唑之製造方法等。

本發明係提供以下者：

1. 一種 5-(胺基甲基)-2-氯噻唑之製造方法(以下亦稱為本發明之製造方法)，其包含下述步驟：

反應步驟，係對於式(2)所示之 N-胺甲醯基胺基化合物(以下亦稱為化合物(2))，使藉由將聚核苷酸(以下亦稱為本聚核苷酸)導入微生物細胞內所成之轉形體(以下亦稱為本轉形體)的培養物或其處理物進行作用之步驟；



其中，該聚核苷酸包含編碼具有將該 N-胺甲醯基胺基化合物轉換為相對應之 5-(胺基甲基)-2-氯噻唑的能力之酵素（以下亦稱為本酵素）之胺基酸序列的鹼基序列；

2. 如前述第 1 項所述之製造方法，其中，前述酵素係具有下述任一胺基酸序列之酵素：

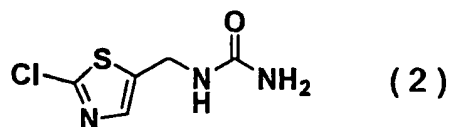
a) 序列編號 1 所示的胺基酸序列；

b) 一種胺基酸序列，其係與由序列編號 2 所示之鹼基序列所構成之 DNA 在嚴苛(stringent)條件下進行雜合

(hybridize)的 DNA 鹼基序列所編碼之胺基酸序列，且為具有將前述 N-胺甲醯基胺基化合物轉換為相對應之 5-(胺基甲基)-2-氯噻唑的能力之酵素之胺基酸序列；或

c) 一種胺基酸序列，其係在序列編號 1 所示的胺基酸序列中缺失、取代或加成 1 個或複數個胺基酸之胺基酸序列，且為具有將前述 N-胺甲醯基胺基化合物轉換為相對應之 5-(胺基甲基)-2-氯噻唑的能力之酵素之胺基酸序列；

3. 一種藉由將聚核苷酸導入微生物細胞內所成之轉形體的培養物或其處理物的用途（以下亦稱為本發明用途），係用於作為將式(2)所示之 N-胺甲醯基胺基化合物轉換為相對應之 5-(胺基甲基)-2-氯噻唑的催化劑；



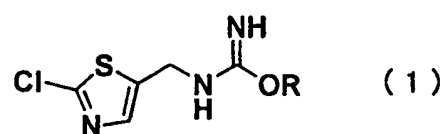
其中，該聚核苷酸包含編碼具有將該 N-胺甲醯基胺基化合物轉換為相對應之 5-(胺基甲基)-2-氯噻唑的能力之酵素

之胺基酸序列的鹼基序列；

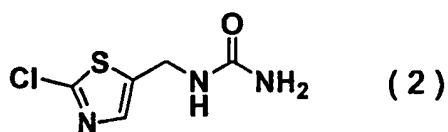
4. 如前述第 3 項所述之用途，其中，前述酵素係具有編碼序列編號 1 所示的胺基酸序列之鹼基序列的酵素；

5. 一種 5-(胺基甲基)-2-氯噻唑之製造方法，其包含下述步驟：

前步驟，係對於式(1)所示之異尿素(isourea)化合物，使具有將該異尿素化合物轉換為相對應之 N-胺甲醯基胺基化合物的能力之酵素或具有產生該酵素的能力之微生物的培養物或其處理物進行作用，而獲得式(2)所示之 N-胺甲醯基胺基化合物之步驟；



[式中，R 表示直鏈狀或環狀之烷基，該烷基亦可具有取代基，且該烷基之碳原子數為 1 至 6]



以及

反應步驟，係對於前步驟中所得之 N-胺甲醯基胺基化合物，使藉由將聚核苷酸導入微生物細胞內所成之轉形體的培養物或其處理物進行作用之步驟；其中，該聚核苷酸包含編碼具有將該 N-胺甲醯基胺基化合物轉換為相對應之 5-(胺基甲基)-2-氯噻唑的能力之酵素之胺基酸序列的

鹼基序列；

6. 如前述第 5 項所述之製造方法，其中，該具有將前述 N-胺甲醯基胺基化合物轉換為相對應之 5-(胺基甲基)-2-氯噻唑的能力之酵素，為具有序列編號 1 所示的胺基酸序列之酵素。

依本發明可提供一種 5-(胺基甲基)-2-氯噻唑之新穎之製造方法等。

【實施方式】

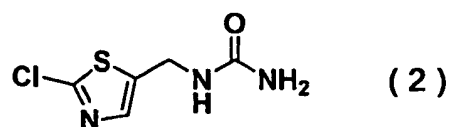
本說明書中所載之發明並未限定特定之方法論、協定(protocol)、及試劑，而為可變更者。並且，本說明書中所使用之用語並非僅用以記載特定之實施形態，對本發明之範圍並無任何之限定。

除非特別限定，本說明書中所使用之所有技術用語、及化學用語，均具有本發明所屬技術範疇之熟諳者所共同可理解之相同意義者。在本發明之實施或試驗方面，可使用與本說明書中所載者相同或同等之方法及材料之任一者，惟以下所載為其中較佳之方法、裝置、及材料。

以下再更詳細地說明本發明。

本發明之製造方法，係包含下述步驟：

反應步驟，係對於式(2)所示之 N-胺甲醯基胺基化合物(即化合物(2))，使藉由將聚核苷酸導入微生物細胞內所成之轉形體(即本轉形體)的培養物或其處理物進行作用之步驟；



其中，該聚核苷酸包含編碼具有將該 N-胺甲醯基胺基化合物轉換為相對應之 5-(胺基甲基)-2-氯噻唑的能力之酵素(即本酵素)之胺基酸序列的鹼基序列。

本發明之製造方法中所使用之作為催化劑之本轉形體的培養物或其處理物，只要使包含編碼具有將化合物(2)轉換為相對應之 5-(胺基甲基)-2-氯噻唑的能力之酵素(即本酵素)之胺基酸序列的鹼基序列的聚核苷酸(即本聚核苷酸)，以一般之基因工程方法導入至微生物細胞內，即可製備之。

以下再對本轉形體之關於導入外來基因之製備方法加以說明。

本酵素可舉例如具有下述任一胺基酸序列之酵素。

- a) 序列編號 1 所示的胺基酸序列；
- b) 一種胺基酸序列，其係與由序列編號 2 所示之鹼基序列所構成之 DNA 在嚴苛條件下進行雜合的 DNA 鹼基序列所編碼之胺基酸序列，且為具有將前述 N-胺甲醯基胺基化合物轉換為相對應之 5-(胺基甲基)-2-氯噻唑的能力之酵素之胺基酸序列；或
- c) 一種胺基酸序列，其係在序列編號 1 所示的胺基酸序列中缺失、取代或加成 1 個或複數個胺基酸之胺基酸序列，且為具有將前述 N-胺甲醯基胺基化合物轉換為相對應之

5-(胺基甲基)-2-氯噻唑的能力之酵素之胺基酸序列。

本聚核苷酸可為天然之聚核苷酸，或亦可為在天然之聚核苷酸中導入變異(位置專一性(site-specific)導入變異法、突變處理等)而製備之聚核苷酸。篩檢天然之聚核苷酸時，可以具備會產生「具有將化合物(2)轉換為5-(胺基甲基)-2-氯噻唑之能力之酵素」的能力之微生物、或具備會產生「具有編碼序列編號1所示的胺基酸序列之鹼基序列的酵素」的能力之微生物作為對象。

篩檢此等微生物時，具體而言，係在試管中加入5mL已滅菌之培養基，於其中將由各菌種保存機構購得之菌體或由土壤中經純種分離所製備之菌體予以接種。將其於30°C、好氧(aerobic)之條件下振盪培養。培養終了後，以離心分離回收菌體，製成生菌體。在製成之生菌體中加入1.5mL之0.2M磷酸鉀緩衝溶液(pH7)，將其懸浮後，加入1.5mg之已溶於15 μ l之二甲基亞砷中之N-(2-氯噻唑-5-基甲基)-尿素後，將該混合物於30°C下振盪培養2至3日。

反應終了後，由該反應液取樣，並以液相層析法等分析反應液中生成之5-(胺基甲基)-2-氯噻唑之量。

以如此操作，可選拔出具備會產生「具有將N-胺甲醯基胺基化合物轉換為相對應之5-(胺基甲基)-2-氯噻唑的能力之酵素」的能力之微生物。

在本發明之製造方法所使用之作為催化劑之酵素或具有產生該酵素之能力之轉形體的培養物或其處理物，可列舉如源自由下述微生物群A中選出之1種以上之微生物

者。

<微生物群 A>

乳酪短桿菌(*Brevibacterium casei*)、密西根棒狀短桿菌(*Corynebacterium michiganense*)、莢膜黃桿菌(*Flavobacterium capsulatum*)、法爾皮有孢漢生酵母菌(*Hanseniaspora valbyensis*)、泡狀枝動菌(*Mycoplasma bullata*)、螢光假單胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)、類產鹼假單胞菌(*Pseudomonas pseudoalcaligenes*)、紅串紅球菌(*Rhodococcus erythropolis*)、華根黴(*Rhizopus chinensis*)、鞘氨醇單胞菌屬(*Sphingomonas* sp.)、微嗜酸寡養單胞菌(*Stenotrophomonas acidaminiphila*)、朝鮮寡養單胞菌(*Stenotrophomonas koreensis*)、硝基還原寡養單胞菌(*Stenotrophomonas nitritireducens*)、嗜根寡養單胞菌(*Stenotrophomonas rhizophila*)、寡養單胞菌屬(*Stenotrophomonas* sp.)、爭論多噬菌(*Variovorax paradoxus*)、及嗜麥芽黃單胞菌(*Xanthomonas maltophilia*)。

再者，本發明之製造方法中所用的較佳之作為催化劑之酵素或由具有產生該酵素之能力之轉形體的培養物或其處理物，可舉例如源自由下述微生物群 B 中選出之 1 種以上之微生物者。

<微生物群 B>

乳酪短桿菌(*Brevibacterium casei*) JCM 2594t、密西根棒狀短桿菌(*Corynebacterium michiganense*) ATCC 10202、

莢膜黃桿菌(*Flavobacterium capsulatum*)JCM 7452t、法爾皮有孢漢生酵母菌(*Hanseniaspora valbyensis*) IFO 1758、泡狀枝動菌(*Mycoplana bullata*) IFO 132090t、螢光假單胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)Biotype F ATCC 17513、螢光假單胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)IFO 3903、類產鹼假單胞菌(*Pseudomonas pseudoalcaligenes*)JCM 5968t、紅串紅球菌(*Rhodococcus erythropolis*) IFO 12320、華根黴(*Rhizopus chinensis*)IFO 4768、鞘氨醇單胞菌屬(*Sphingomonas* sp.)IFO 15164、鞘氨醇單胞菌屬(*Sphingomonas* sp.)JCM 7514、微嗜酸寡養單胞菌(*Stenotrophomonas acidaminiphila*)JCM 13310、朝鮮寡養單胞菌(*Stenotrophomonas koreensis*)JCM 13256、硝基還原寡養單胞菌(*Stenotrophomonas nitritireducens*)JCM 13311、嗜根寡養單胞菌(*Stenotrophomonas rhizophila*) JCM 13333、寡養單胞菌屬(*Stenotrophomonas* sp.)SC-1(FERM-BP 10785)、爭論多噬菌(*Variovorax paradoxus*) IFO 15149t、及嗜麥芽黃單胞菌(*Xanthomonas maltophilia*)JCM 1975t。

此等菌株可由天然分離，亦可容易地由例如下述之菌種保存機構購得。

1. IFO(Institute of Fermentation Osaka：財團法人 日本醱酵研究所)菌種保存中心(culture collection)

目前已移管至獨立行政法人 日本製品評價技術基盤機構 生物遺傳資源部門(NBRC)。欲取得時，可向 NBRC 申

請購入，亦可連結至 NBRC 之網站

(<http://www.nbrc.nite.go.jp/NBRC2/NBRCDispSearchServlet?lang=jp>)。

2. ATCC(American Type Culture Collection；美國菌種保存中心)

可透過日本住商藥品國際股份有限公司 ATCC 事業集團取得，欲購入時，亦可連結至該集團之網站

(http://www.summitpharma.co.jp/japanese/service/s_ATCC.html)。亦可直接由 ATCC 購入。

3. IAM 菌種保存中心

目前，IAM 菌種保存中心之保存菌株中，細菌、酵母菌、絲狀菌已移管至獨立行政法人 日本理化學研究所 生物資源中心微生物材料開發室(JCM)，此外，微細之藻類已移管至獨立行政法人 日本國立環境研究所微生物系統保存設施(NIES)。欲取得時，可向此等機關申請購入，亦可連結至此等機關之網站中關於菌種保存之網頁

(http://www.jcm.riken.go.jp/JCM/aboutJCM_J.shtml、或 <http://mcc.nies.go.jp/aboutOnlineOrder.do>)。

4. JCM(日本理化學研究所微生物系統保存設施(Japan Collection of Microorganisms, JCM))

目前，已移管至獨立行政法人 日本理化學研究所生物資源中心(RIKEN BRC)微生物材料開發室。欲取得時，可向該機關申請購入，亦可連結至該機關之網站中關於菌種保存之網頁

(http://www.jcm.riken.go.jp/JCM/aboutJCM_J.shtml)。

本發明之製造方法中所使用的更佳之作為催化劑之酵素或具有產生該酵素之能力之轉形體的培養物或其處理物，可列舉如源自由假單孢菌屬 (*Pseudomonas*) 及寡養單胞菌屬 (*Stenotrophomonas*) 所成群組中選出之 1 種以上之微生物者。此外，寡養單胞菌屬 (*Stenotrophomonas* sp.) 以寄存號碼 FERM-BP 10785 登錄在獨立行政法人日本產業技術綜合研究所 專利生物寄存中心中之菌株為更佳。再更佳者可舉例如紅球菌屬 R312 (*Rhodococcus* R312)

(*Brevibacterium* R312(CBS 717-73)) 等源自屬於紅球菌屬 (*Rhodococcus*) 之微生物者。可購入紅球菌屬 R312

(*Rhodococcus* R312) 之菌種保存機構，可列舉如荷蘭真菌中心 (Centralalbureau voor Schimmelcultures)。紅球菌屬 R312 (*Rhodococcus* R312) (短桿菌屬 R312

(*Brevibacterium* R312)(CBS 717-73)) 目前以「*Rhodococcus* sp. Zopf 1891 AL」之菌株名稱保存，欲取得時，可向上述機關申請購入，亦可連結至該機關之網站

(http://www.cbs.knaw.nl/databases/nccb/search_bac_plas.aspx) 等。

本聚核苷酸包含：編碼具有將化合物(2)轉換為 5-(胺基甲基)-2-氯嘧啶的能力之酵素之胺基酸序列的鹼基序列。

本聚核苷酸中之「與由序列編號 2 所示之鹼基序列所構成之 DNA 在嚴苛條件下進行雜合的 DNA」之例，係指在

「選殖與定序(cloning and sequence)」(渡邊格監修，杉浦昌弘編集，1989年，農村文化社發行)、「Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed.」(Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989))、「Current Protocols in Molecular Biology」(John Wiley & Sons (1987-1997))等所載之南方雜合法(Southern hybridization)中，(1)在高離子濃度下[可舉例如 6×SSC(900mM 之氯化鈉、90mM 之檸檬酸鈉)]於 65°C 下進行雜合，而由編碼序列編號 1 所示的胺基酸序列之鹼基序列所構成之 DNA；或是與由序列編號 2 所示之鹼基序列所構成之 DNA 形成 DNA-DNA 雜合，並且(2)在低離子濃度下[可舉例如 0.1×SSC(15mM 之氯化鈉、1.5mM 之檸檬酸鈉)]於 65°C 下保溫 30 分鐘後亦可維持該雜合之 DNA。

具體之例，可列舉如：由編碼序列編號 1 所示的胺基酸序列之鹼基序列所構成之 DNA；或在由序列編號 2 所示之鹼基序列所構成之 DNA 中，由缺失、取代或加成一部份鹼基之鹼基序列所構成之 DNA；與由編碼序列編號 1 所示的胺基酸序列之鹼基序列所構成之 DNA 的序列相同性為 80%以上、90%以上、95%以上、98%以上或 99%以上之 DNA 等。此等 DNA，可為從自然界中存在之 DNA 中所選殖之 DNA，亦可為在該等選殖之 DNA 鹼基序列中以人工方式導入部份之鹼基缺失、取代或加成的 DNA，或人工合成之 DNA。

在序列編號 2 所示之鹼基序列中缺失、取代或加成 1 個或複數個鹼基之鹼基序列，可例舉如：(i)在序列編號 2

所示之鹼基序列中，缺失 1 至 10 個(例如 1 至 5 個，以 1 至 3 個更佳，以 1 至 2 個又更佳)鹼基之鹼基序列；(ii) 序列編號 2 所示之鹼基序列中之 1 至 10 個(例如 1 至 5 個，以 1 至 3 個更佳，以 1 至 2 個又更佳)鹼基經其他鹼基取代之鹼基序列；(iii)在序列編號 2 所示之鹼基序列中加成 1 至 10 個(例如 1 至 5 個，以 1 至 3 個更佳，以 1 至 2 個又更佳)鹼基之鹼基序列；或(iv)將上述(i)至(iii)予以組合之鹼基序列。

具有在序列編號 2 所示之鹼基序列中有 1 個或複數個核酸發生缺失、取代或加成等變異之鹼基序列的聚核苷酸，可依照「Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed.」(Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989))、「Current Protocols in Molecular Biology」(John Wiley & Sons (1987-1997))、Kunkel (1985), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 488-92、Kunkel (1988), Method Enzymol., 85: 2763-6 等所載之位置專一性誘發突變法等方法而製備。

此外，欲在聚核苷酸中導入變異時，可依據 Kunkel 法及 Gapped duplex 法等一般已知之方法，以利用位置專一性誘發突變法之導入變異用套組，例如 QuikChangeTM Site-Directed Mutagenesis Kit(Stratagene 公司製造)、Gene TailorTM Site-Directed Mutagenesis System (Invitrogen 公司製造)、TaKaRa Site-Directed Mutagenesis System(Mutan-K、Mutan-Super Express Km

等：TaKaRaBio 公司製造)等而進行操作。

本聚核苷酸可如下製備。

由紅球菌屬 R312(*Rhodococcus* R312)(短桿菌屬 R312 (*Brevibacterium* R312)(CBS 717-73))等屬於紅球菌屬 (*Rhodococcus*)之微生物等，依照一般基因工程之方法(如「新細胞工學實驗協定」(東京大學醫科學研究所制癌研究部編，秀潤社，1993年)中所載之方法)製備 DNA 基因庫 (DNA library)，再以該製備成之 DNA 基因庫作為模版 (template)，並以適當之引子(primer)進行 PCR，而製備：由編碼序列編號 1 所示的胺基酸序列之鹼基序列所構成之 DNA，由編碼在序列編號 1 所示的胺基酸序列中缺失、取代或加成 1 個或複數個胺基酸之胺基酸序列之鹼基序列所構成之 DNA，及/或將具有序列編號 2 所示之鹼基序列的 DNA 等予以擴增(amplification)而製備成本聚核苷酸之 DNA。

此外，使用以前述 DNA 基因庫為模版且含有序列編號 3 所示之鹼基序列之寡核苷酸、與含有序列編號 4 所示之鹼基序列之寡核苷酸作為引子進行 PCR，即可將由序列編號 2 所示之鹼基序列所構成之 DNA 予以擴增，而製備本聚核苷酸之 DNA。

該 PCR 之條件，可列舉如：將以 4 種之 dNTP 各 20 μ M、2 種之寡核苷酸引子各 15pmol、1.3U 之 Taq polymerase 與作為模版之 cDNA 基因庫予以混合而製成反應液，將該反應液在 97 $^{\circ}$ C (2分鐘)下加熱後，以 97 $^{\circ}$ C (0.25分鐘)-50 $^{\circ}$ C (0.5分鐘)-72 $^{\circ}$ C (1.5分鐘)之循環操作 10 次，其次以 97 $^{\circ}$ C (0.25

分鐘)-55°C (0.5 分鐘)-72°C (2.5 分鐘)之循環操作 20 次，再於 72°C 下維持 7 分鐘之條件。

又，該 PCR 中所使用之引子之 5' 末端亦可加成限制酶辨識序列等。

具有編碼序列編號 1 所示的胺基酸序列之鹼基序列之寡核苷酸，亦可依據將序列編號 1 所示的胺基酸序列所相對應之 forward 引子與 reverse 引子以各切成約 40bp 長之狀態而合成，再使此等引子群以互相連接之方法(Assembly PCR 法)合成。

即使是將以前述之 DNA 基因庫為模版並含有選自編碼序列編號 1 所示的胺基酸序列之鹼基序列中之部份鹼基序列的寡核苷酸等(例如由編碼序列編號 1 所示的胺基酸序列之 5' 末端側之約 14 個鹼基左右以上之鹼基序列所構成之寡核苷酸)、以及由與建構 DNA 基因庫時所使用之載體之 DNA 插入部位附近之鹼基序列為互補的鹼基序列所構成之約 14 個鹼基左右之以上之寡核苷酸，作為引子使用而進行 PCR，亦可將含有編碼序列編號 1 所示的胺基酸序列之鹼基序列之 DNA、及編碼在序列編號 1 所示的胺基酸序列中缺失、取代或加成 1 個或複數個胺基酸之胺基酸序列之鹼基序列之 DNA 等予以擴增，而製備本聚核苷酸之 DNA。

如上述操作而擴增之 DNA，可依照「Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd edition」(1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press、「Current Protocols in Molecular Biology」(1987), John Wiley & Sons Inc.,

ISBN0-471-50338-X 等所載之方法選殖至載體而獲得基因重組載體(recombinant vector)。其中使用之載體，具體例可列舉如 pUC119(寶酒造公司製造)、pTV118N(寶酒造公司製造)、pBluescriptII(東洋紡公司製造)、pCR2.1-TOPO (Invitrogen 公司製造)、pTrc99A(Pharmacia 公司製造)、pKK223-3(Pharmacia 公司製造)等。

此外，亦可藉由在經插入源自微生物或噬菌體(phage)之載體中之 DNA 基因庫，將由具有從編碼序列編號 1 所示的胺基酸序列之鹼基序列中選出之部份鹼基序列的約 15 個鹼基序列左右以上之鹼基序列所構成之 DNA 作為探針(probe)，以後述之條件進行雜合，篩選該探針會專一地結合之 DNA，而製備本聚核苷酸之 DNA。

在染色體 DNA 或 DNA 基因庫中使探針進行雜合之方法，可舉例如菌落雜合法(colony hybridization)及溶菌斑雜合法(plaque hybridization)，並可依照基因庫之製作所使用之載體之種類而選擇方法。

當使用之 DNA 基因庫係使用質體載體(plasmid vector)而製作時，以利用菌落雜合法為佳。具體而言，係藉由將基因庫之 DNA 導入宿主微生物中而製備轉形體，並將所得之轉形體稀釋後，將該稀釋物塗佈在洋菜培養基上，培養至菌落出現為止。

當使用之基因庫係使用噬菌體載體而製作時，以利用溶菌斑雜合法為佳。具體而言，係將宿主微生物與基因庫之噬菌體在可感染之條件下混合，並將其與軟洋菜培養基

混合後，再將該混合物塗佈在洋菜培養基上，培養至溶菌斑出現為止。

其次，在使用任一雜合法時，均係在前述進行培養之洋菜培養基上置放薄膜，使轉形體或噬菌體吸附/轉印至該薄膜。該薄膜經鹼處理後，再進行中和處理，其次再進行將 DNA 固定在該薄膜之處理。更具體而言，例如在使用溶菌斑雜合法時，係在前述洋菜培養基上置放硝化纖維素膜或尼龍膜(例如 Hybond-N+(Amersham 公司註冊商標))，放置約 1 分鐘而使噬菌體粒子吸附/轉印至薄膜。之後，將該薄膜於鹼溶液(例如 1.5M 氯化鈉、0.5M 氫氧化鈉)中浸漬約 3 分鐘，使噬菌體粒子溶解，以使噬菌體 DNA 溶出在該薄膜上後，於中和溶液(例如 1.5M 氯化鈉、0.5M Tris-鹽酸緩衝溶液 pH7.5)中浸漬約 5 分鐘。其次將該薄膜以洗淨液(例如 0.3M 氯化鈉、30mM 檸檬酸、0.2 M Tris-鹽酸緩衝溶液 pH7.5)洗淨約 5 分鐘後，於約 80°C 加熱約 90 分鐘，使噬菌體 DNA 固定在該薄膜。

使用如此製備之薄膜，以上述 DNA 為探針而進行雜合。雜合可依據 J. Sambrook, E. F. Frisch, T. Maniatis 著「Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd edition (1989)」 Cold Spring Harbor Laboratory Press 等之記載而進行。

探針所使用之 DNA，可為經放射線同位素所標識者、或經螢光色素所標識者。

將探針所使用之 DNA 以放射線同位素標識之方法，可

列舉如利用 Random Primer Labeling Kit(寶酒造公司製造)等，將 PCR 反應液中之 dCTP 以(α -³²P)dCTP 取代，並將探針所使用之 DNA 作為模版而進行 PCR 之方法。

此外，將探針所使用之 DNA 以螢光色素標識時，可利用如 Amersham 公司製造之 ECL Direct Nuclear Acid Labeling and Detection System 等。

雜合可如下進行。

準備含有 450 至 900mM 之氯化鈉及 45 至 90mM 之檸檬酸鈉、並以濃度 0.1 至 1.0 重量%含有十二碳烷基硫酸鈉(SDS)、且以濃度 0 至 200 μ l/mL 含有已變性之非專一性 DNA、依情形可再各以濃度 0 至 0.2 重量%含有白蛋白(albumin)、Ficoll、聚乙烯吡咯啶酮等的前雜合溶液(prehybridization solution)(較佳係含有 900mM 之氯化鈉、90mM 之檸檬酸鈉、1.0 重量%之 SDS 及 100 μ l/mL 之變性 Calf-thymus DNA 的前雜合溶液)，使其相對於如上述操作而製備之薄膜每 1cm²，為 50 至 200 μ l 之比例，然後在該前雜合液中浸漬前述薄膜，並在 42 至 65°C 保溫 1 至 4 小時。

其次，準備含有 450 至 900mM 之氯化鈉及 45 至 90mM 之檸檬酸鈉、並以濃度 0.1 至 1.0 重量%含有 SDS、且以濃度 0 至 200 μ g/mL 含有已變性之非專一性 DNA、依情形可再各以濃度 0 至 0.2 重量%含有白蛋白、Ficoll、聚乙烯吡咯啶酮等的雜合溶液(hybridization solution)(較佳係含有 900mM 之氯化鈉、90mM 之檸檬酸鈉、1.0 重量%之 SDS

及 $100 \mu\text{g/mL}$ 之變性 Calf-thymus DNA 的雜合溶液)與以如上述方法製得之探針(相對於每 1cm^2 薄膜，為相當於 1.0×10^4 至 2.0×10^5 cpm 之量)混合的溶液，使其相對於每 1cm^2 薄膜而為 50 至 $200 \mu\text{l}$ 之比例，然後在該雜合溶液中浸漬並在 42 至 65°C 保溫 12 至 20 小時。

在該雜合後，取出薄膜，並以含有 15 至 300mM 之氯化鈉、1.5 至 30mM 之檸檬酸鈉及 0.1 至 1.0 重量%之 SDS 等的 42 至 65°C 之洗淨液(較佳係含有 15mM 之氯化鈉、 1.5mM 之檸檬酸鈉及 1.0 重量%之 SDS 的 65°C 之洗淨液)等洗淨。該經洗淨之薄膜再以 $2 \times \text{SSC}$ (300mM 之氯化鈉、 30mM 之檸檬酸鈉)輕緩沖洗後，加以乾燥。將該薄膜供於例如自動放射攝影術(autoradiography)等，藉由檢測該薄膜上之探針之位置，而在原先之洋菜培養基上辨識出相當於與所用之探針進行雜合之 DNA 之在薄膜上之位置的選殖體(clone)，藉由將其取菌，即分離含有該 DNA 之選殖體。

將如此操作而得到之選殖體經培養後，即可由培養之菌體製備本聚核苷酸。

若欲使本聚核苷酸在宿主細胞中表現，例如將由在宿主細胞中可表現機能之啟動子(promoter)與本聚核苷酸以可表現機能之形態而連接成之 DNA 導入宿主細胞中。

其中之「可表現機能之形態」，意指將該 DNA 導入宿主細胞中而使宿主細胞轉形時，本聚核苷酸係在啟動子之調控下以會表現之方式與啟動子連接的狀態。其中之啟動子，可列舉如大腸菌之乳糖操縱子(lactose operon)之 *lac*

啟動子、大腸菌之色胺酸操縱子(Tryptophan operon)之 *trp* 啟動子、或 *tac* 啟動子、*trc* 啟動子等經獨自改變/設計而可在大腸菌內表現機能之合成啟動子等。此外，可列舉如源自 λ -噬菌體之 *PL* 啟動子及 *PR* 啟動子、源自枯草菌之葡萄糖酸合成酶啟動子(*gnt*)、鹼性蛋白酶啟動子(*apr*)、中性蛋白酶啟動子(*npr*)、 α -澱粉酶啟動子(*amy*)等。此外，在紅球菌屬(*Rhodococcus*) R312 等中亦可使用調控本聚核苷酸表現之啟動子。

一般而言，與在宿主細胞中可表現機能之啟動子以可表現機能之形態連接而成之 DNA，可依照「Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition」(1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press、「Current Protocols in Molecular Biology」(1987), John Wiley & Sons Inc., ISBN0-471-50338-X 等所載之方法選殖在載體而製備基因重組載體。

其中使用之載體，只要為可保持本聚核苷酸，且可進行複製(例如包含在宿主細胞中為了使質體增殖而需要之 DNA 序列、啟動子、核糖體(ribosome)結合序列、轉錄終止子(transcription terminator)(轉錄終止序列)、選擇性標識基因)者即可，並無特別之限定，可使用適合各宿主之載體。可舉例如質體 DNA、噬菌體等。

質體 DNA 之例，可列舉如源自大腸菌之質體(pBR322、pUC18、pUC19、pUC118、pUC119(寶酒造公司製造)、pTV118N(寶酒造公司製造)、pBluescriptII(東洋紡公司製

造)、pCR2.1-TOPO(Invitrogen 公司製造)、pTrc99A (Pharmacia 公司製造)、pKK223-3(Pharmacia 公司製造) 等 ColE 系質體等)、源自放線菌之質體(pIJ486 等)、源自酵母菌之質體(YEp13、YEp24、Ycp50 等)。噬菌體 DNA 之例可列舉如 λ -噬菌體(Charon4A、Charon21A、EMBL3、EMBL4、 λ gt10、 λ gt11 等)、反轉錄轉位子 (retrotransposon)DNA、人工染色體 DNA 等。

當載體係使用含有選擇性標識基因(例如二氫葉酸還原酶基因、及康黴素(kanamycin)耐性基因、安比西林(ampicillin)耐性基因、新黴素(neomycin)耐性基因、殺稻瘟菌素(blasticidin)耐性基因等賦予抗生物質耐性之基因等)之載體時,導入該載體之轉形體可將該選擇性標識基因之表現型等作為指標而進行篩選。此外,核糖體結合序列係以 SD 序列及 Kozak 序列為已知者,可將此等序列插入變異基因之上游。在使用原核生物作為宿主時可將 SD 序列藉由 PCR 法等予以加成,在使用真核生物作為宿主時可將 Kozak 序列藉由 PCR 法等予以加成。SD 序列可例舉如源自大腸菌、源自紅球菌屬(*Rhodococcus*)細菌或枯草菌之序列等,但只要為可在期望之宿主內表現機能之序列即可,並無特別之限定。可藉由 DNA 合成而製作由與 16S 核糖體 RNA 之 3' 末端區域為互補之序列之 4 個鹼基以上所連續接成之共有序列(consensus sequence),並利用該共有序列。轉錄終止序列未必為必須者,可使用 ρ 因子非依存性者,例如脂蛋白(lipoprotein)終止子、*trp* 操縱子終止

子等。

若欲在此等載體中插入本聚核苷酸，則可將含有本聚核苷酸之 DNA 以適當之限制酶切斷，再依照需要而加成適當之連接序列(linker)後，與經適當之限制酶切斷之載體連接，藉此而進行之。此外，亦可將含有本聚核苷酸之 DNA 使用含有適當之限制酶辨識序列之引子進行 PCR 擴增，該擴增產物再經限制酶處理後，使其與經適當之限制酶切斷之載體連接，藉此而進行之。

將與在宿主細胞中可表現機能之啟動子以可表現機能之形態連接之本聚核苷酸或保有該本聚核苷酸之基因重組載體等導入宿主細胞之方法，只要為因應所使用之宿主細胞且一般可用之導入方法即可，可舉例如「Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition」(1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press、「Current Protocols in Molecular Biology」(1987), John Wiley & Sons Inc., ISBN0-471-50338-X 等所載之氯化鈣法、及在「Methods in Electroporation: Gene Pulser/ *E. coli* Pulser System」Bio-Rad Laboratories, (1993)等所載之電穿孔法(electroporation)等。

在此，「宿主細胞」可列舉如大腸菌(具體例為 K12 株、B 株、JM109 株、XL1-Blue 株、C600 株、W3110 株)、枯草菌、酵母菌、真菌、紅球菌屬細菌等微生物。其中，較佳者可列舉如屬於大腸桿菌屬(*Escherichia*)、芽孢桿菌屬(*Bacillus*)、棒狀短桿菌屬(*Corynebacterium*)、葡萄球菌

屬 (*Staphylococcus*)、鏈黴菌屬 (*Streptomyces*)、酵母菌屬 (*Saccharomyces*) (具體例為啤酒酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*))、裂殖酵母菌屬 (*Schizosaccharomyces*) (具體例為粟酒裂殖酵母菌 (*Schizosaccharomyces pombe*))、畢赤酵母菌屬 (*Pichia*) (具體例為巴斯德畢赤酵母菌 (*Pichia pastoris*))、克魯維酵母菌屬 (*Kluyveromyces*)、麴菌屬 (*Aspergillus*) 及紅球菌屬 (*Rhodococcus*) (具體例為玫瑰紅球菌 (*Rhodococcus rhodochrous*) ATCC 12674 株、玫瑰紅球菌 (*Rhodococcus rhodochrous*) J-1 株 (FERM BP-1478) 之微生物等。

其次，使本轉形體之培養物作用於化合物(2)。可藉由分析反應生成物中之 5-(胺基甲基)-2-氯噻唑之量，而確認所得之 DNA 已編碼具有該能力之酵素之胺基酸序列。

此外，DNA 之鹼基序列可以一般慣用之方法決定其序列，藉此而進行確認。例如，可藉由二去氧核苷酸鏈終止法 (dideoxynucleotide chain termination method) (參考例如 F. Sanger, S. Nicklen, A. R. Coulson 著, *Proceeding of National Academy of Science U.S.A.* (1977), 74: 5463-5467 頁) 等進行解析。鹼基序列分析用之試樣之製備，亦可使用 Perkin Elmer 公司之 ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit 等市售之試劑。此外，亦可利用適當之 DNA 定序器 (DNA sequencer) 解析鹼基序列。

將前述表現載體導入宿主細胞中之方法，只要為可將

DNA 導入之方法即可，並無特別之限定。可列舉如使用鈣離子之方法、電穿孔法等。

對大腸菌導入表現載體之方法，可列舉如使用熱休克 (heat shock) 之方法，此時亦可使用預先製備之勝任細胞 (competent cell)。對酵母菌導入表現載體之方法，只要為可將 DNA 導入酵母菌之方法即可，並無特別之限定，可列舉如電穿孔法、原生質球狀體 (spheroplast) 法、乙酸鋰法等。

若欲篩選與在宿主細胞中可表現機能之啟動子以可表現機能之形態連接之本聚核苷酸、或經導入保有該本聚核苷酸之基因重組載體等的轉形體，則可將前述包含在載體中之選擇性標識基因之表現型作為指標而進行篩選。

在該轉形體中保有本聚核苷酸時，可依照「Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition」(1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press 等所載之一般方法，進行限制酶部位之確認、鹼基序列之解析、南方雜合、西方雜合 (Western hybridization) 等而予以確認。

將如此製備之表現載體導入宿主細胞中，即可得到高度表現本酵素之轉形體。藉由培養該轉形體，即可表現本酵素。

其次，再說明本轉形體之培養之製備方法。

本轉形體可使用適當地含有碳源、氮源、有機鹽、無機鹽等之用以培養各種微生物之培養基而進行培養。

碳源可例舉如葡萄糖、糊精、蔗糖等糖類，甘油等醣

醇，反丁烯二酸、檸檬酸、丙酮酸等有機酸，動物油、植物油及糖蜜。此等碳源在培養基中之添加量，相對於培養液一般係 0.1%(w/v)至 30%(w/v)左右。

氮源可例舉如肉萃提取物、蛋白胨(peptone)、酵母萃提取物、麥芽萃提取物、大豆粉、玉米浸液(Corn Steep Liquor)、綿籽粉、乾燥酵母、酪蛋白胺基酸(casamino acid)等天然有機氮源，胺基酸類、硝酸鈉等無機酸之銨鹽，氯化銨、硫酸銨、磷酸銨等無機酸之銨鹽，反丁烯二酸銨、檸檬酸銨等有機酸之銨鹽及尿素。其中之有機酸之銨鹽、天然有機氮源、胺基酸類等係在許多情形下亦可作為碳源使用。此等氮源在培養基中之添加量，相對於培養液一般係 0.1%(w/v)至 30%(w/v)左右。

有機鹽及無機鹽可例舉如鉀、鈉、鎂、鐵、錳、鈷、鋅等之氯化物，硫酸鹽、乙酸鹽、碳酸鹽及磷酸鹽。其具體之例可列舉如氯化鈉、氯化鉀、硫酸鎂、硫酸亞鐵、硫酸錳、氯化鈷、硫酸鋅、硫酸銅、乙酸鈉、碳酸鈣、磷酸氫一鉀及磷酸氫二鉀。此等有機鹽及/或無機鹽在培養基中之添加量，相對於培養液一般係 0.0001%(w/v)至 5%(w/v)左右。

在培養經導入由作為啟動子之誘導性啟動子與本聚核苷酸以可表現機能之形態連接而成之 DNA 的轉形體時，可依照需要而在培養基中加入誘導物(inducer)。例如在培養經導入由 *tac* 啟動子、*trc* 啟動子及 *lac* 啟動子等被異乳糖(allolactose)誘導之類型之啟動子與本聚核苷酸以

可表現機能之形態連接而成之 DNA 的轉形體時，亦可在培養基中添加少量之異丙基硫化- β -D-半乳糖苷(isopropyl thio- β -D-galactoside, IPTG)，以作為用於誘導產生本酵素之誘導劑。此外，在培養經導入由 *trp* 啟動子等被吲哚乙酸(IAA)誘導之類型之啟動子與本聚核苷酸以可表現機能之形態連接而成之 DNA 的轉形體時，亦可在培養基中添加少量之 IAA，以作為用於誘導產生本酵素之誘導劑。

培養方法可列舉如固體培養、液體培養(試管培養、燒瓶培養、缸式醱酵槽(jar fermenter)培養等)。

培養溫度及培養液之 pH，只要在本轉形體可生長之範圍即可，並無特別之限定，可列舉如培養溫度為約 15°C 至約 45°C，更好是 10°C 至約 37°C 之範圍；培養液之 pH 為約 4 至約 8 之範圍。培養時間可依照培養條件適當選擇，惟一般為約 1 日至約 7 日。並且，屬於紅球菌屬(*Rhodococcus*)之微生物之較佳之培養操作，可於 4°C 至 36°C，更好是 20°C 至 30°C 進行 18 小時至 96 小時。

本轉形體之培養物，可直接作為本發明之製造方法之催化劑使用。使用本轉形體之培養物之方法中，關於直接使用本轉形體之菌體之方法，可列舉如(1)直接使用培養液之方法、(2)使用將培養液經離心分離等而回收之菌體(依照需要，使用經緩衝液或水洗淨後之濕菌體)之方法等。

本發明之製造方法之催化劑，亦可使用本轉形體的培養物之處理物。該處理物可列舉如：將培養而得之菌體再經有機溶劑(丙酮、乙醇等)處理者、經冷凍乾燥處理者或

經驗處理者、或是將菌體經物理性或酵素性破碎處理者、或從此等中經分離/萃取而得之粗酵素等。並且，前述處理物中，亦包含經前述處理後再以一般所知之方法進行固定化處理者。

由本轉形體之培養物精製本酵素之方法，可使用一般蛋白質之精製中所使用之方法。可列舉如以下之方法。

首先，從本轉形體之培養物以離心分離等而收集菌體後，將其以超音波處理、微粉碎機(Dyno-mill)處理、法式壓碎機(French Press)處理等物理性破碎法或是以使用界面活性劑或溶菌酶(lysozyme)等溶菌酵素之化學性破碎法等進行破碎。從所得之破碎液中經離心分離、過濾膜過濾等而去除其中之雜質，製備成無細胞萃取液，將其適當地使用陽離子交換層析法、陰離子交換層析法、疏水性層析法、膠體過濾層析法、或金屬螯合層析法等分離精製方法區分，即可精製本酵素。

層析中所使用之擔體，可例舉如經導入羧甲基(CM)、二乙基胺基乙基(DEAE)、苯基或丁基之纖維素、糊精或洋菜糖(agarose)等不溶性高分子擔體。亦可使用市售之已充填擔體之管柱，該市售之已充填擔體之管柱可舉例如 Q-Sepharose FF、Phenyl-Sepharose HP(商品名，均為 Amersham Pharmacia Biotech 公司製造)、TSK-gel G3000SW(商品名，東曹公司製造)等。

此外，若欲篩選含有本酵素之區分(fraction)，可根據本發明中之「將式(2)所示之 N-胺甲醯基胺基化合物轉

換為相對應之 5-(胺基甲基)-2-氯噻唑之能力」之存在與否或其程度而進行篩選。

其具體之形態，可列舉如本轉形體之培養物、該培養物之處理物(例如無細胞萃取液、粗精製蛋白質、精製蛋白質及此等之固定化物等)。在此，培養物之處理物可列舉如冷凍乾燥微生物、有機溶劑處理微生物、乾燥微生物、微生物磨碎物、微生物之自溶物(autolysate)、微生物之超音波處理物、微生物萃取物或微生物之鹼處理物。又，製備固定化物之方法，可例舉如擔體結合法(使本酵素等吸附於矽膠及陶瓷等無機擔體、纖維素、離子交換樹脂等之方法)及捕獲(entrapment)法(將本酵素等關在聚丙烯醯胺、含硫多醣膠體(例如紅藻膠膠體(carrageenan gel))、褐藻酸膠體、洋菜膠體(agar gel)等高分子之網狀構造中之方法)。

在考慮使用本轉形體之工業生產性時，相較於使用未處理狀態之微生物之方法，以使用將該微生物經滅絕化之處理物之方法在製造設備之限制等方面上有較佳的情況。用於此處之滅菌化處理方法，可列舉如物理性殺菌法(加熱、乾燥、冷凍、光線、超音波、過濾、通電)、及使用化學藥品之殺菌法(鹼、酸、鹵素、氧化劑、硫、硼、砷、金屬、醇、酚、胺、硫化物、醚、醛、酮、氰、抗生素)。一般而言，以選擇此等殺菌法中儘可能使本酵素之前述「將式(2)所示之 N-胺甲醯基胺基化合物轉換為相對應之 5-(胺基甲基)-2-氯噻唑之能力」不致失活，且對反應系之

殘留、污染等影響少之處理方法為佳。

以下再更具體地說明。

1. 培養物之處理物(其之 1)

若欲從本轉形體之培養物中回收菌體，可使用離心分離法和膜過濾法。離心分離並無特別之限定，可在例如 3,000 至 4,500×g、5 至 20 分鐘、4°C 之條件進行。可將所回收之本轉形體依照需要以磷酸鈉緩衝液、磷酸緩衝液等洗淨，懸浮。以如此操作即製備菌體懸浮液。

菌體之破碎方法，可利用超音波處理、以法式壓碎機和均質機進行之高壓處理、以玻璃珠等進行之磨碎處理、使用溶菌酶、纖維素酶、果膠酶等之酵素處理、凍結融解處理、低滲透壓溶液處理、以噬菌體進行之誘導溶菌處理等。破碎處理係依照需要而在冰冷卻下進行。例如，可將菌體懸浮液使用超音波破碎機 VP-15S(Taitec 公司，日本)，並以輸出功率調整旋鈕 4、DUTY CYCLE 40%、PULS、TIMER=B 模式 10s 之條件在冰冷卻下進行破碎 1 至 5 分鐘，更好是 3 分鐘。此外，亦可將菌體懸浮液在 100MPa 之加壓條件下以 Niro Soavi 公司製造之均質機 PANDA2K 型進行破碎。

進行破碎後，從本轉形體之破碎物中，可依照需要而去除菌體之破碎殘渣。去除殘渣之方法可舉例如離心分離及過濾等。亦可依照需要而使用凝集劑及過濾輔助劑等以提高去除殘渣之效率。離心分離並無特別之限定，可在例如 4,000 至 25,000×g、3 至 45 分鐘、4°C 之條件下進行。

以如此操作即可從破碎物中去除殘渣。

2. 培養物之處理物(其之 2)

可藉由將前述本轉形體之破碎物及無細胞萃取液予以加熱處理，使本酵素以外之多數蛋白質變性。因此，即可藉由將本轉形體之破碎物或無細胞萃取液予以加熱處理，而以可溶性區分形式獲得本酵素液。本酵素中，包含如上述所獲得之本酵素液。

在此，「加熱處理」係指為了使源自本轉形體之本酵素以外之蛋白質進行變性所進行之加熱失活操作，該加熱處理之溫度較佳為 50°C 以上 75°C 以下，更好是 60°C 以上 70°C 以下。加熱處理之時間並無特別之限定，惟以使本轉形體之破碎物及無細胞萃取液在達設定溫度後歷經 10 分鐘以上為佳。以歷經 1 小時以上 5 小時以下更佳。

例如，可藉由將本轉形體之破碎物等置入試管中，於設定為預定溫度之水浴(water bath)中培養預定時間，而進行加熱處理。此外，亦可在附有溫度計之三口燒瓶中將本轉形體之破碎物等置入，加熱至預定溫度後，再以預定時間進行加熱處理。

此外，本發明中，亦可在將本轉形體之破碎物加熱處理(前加熱)後，去除破碎殘渣，然後再次進行加熱處理。再加熱時，亦可存在有鋅鹽。

去除由加熱處理所產生之不溶性物之方法，可列舉如離心分離及過濾等，亦可依照需要而使用凝集劑及過濾輔助劑等以提高其去除效率。必要時，亦可再使用各種層析

法等(膠體過濾、離子交換層析法、親和層析法等)進一步精製。

本發明之製造方法一般係在水存在下進行。該情形下之水，亦可為緩衝液之形態。該緩衝液中所使用之緩衝劑，可列舉如磷酸鈉、磷酸鉀等磷酸之鹼金屬鹽，乙酸鈉、乙酸鉀等乙酸之鹼金屬鹽等。

本發明之製造方法，亦可更進一步使用疏水性有機溶劑，並在水與疏水性有機溶劑之存在下進行。此時所使用之疏水性有機溶劑，可列舉如甲酸乙酯、乙酸乙酯、乙酸丙酯、乙酸丁酯、丙酸乙酯、丙酸丁酯等酯類，正丁醇、正戊醇、正辛醇等醇類，苯、甲苯、二甲苯等芳族烴類，二乙基醚、二異丙基醚、甲基第三丁基醚等醚類，氯仿、1,2-二氯乙烷等鹵化烴類及此等之混合物。

本發明之製造方法亦可更進一步使用親水性有機溶劑，並在水與水性媒質之存在下進行。此時所使用之親水性有機溶劑，可列舉如甲醇、乙醇等醇類，丙酮等酮類，二甲氧基乙烷、四氫吡喃、二噁烷等醚類，二甲基亞砷及此等之混合物。

本發明之製造方法一般係在水層之 pH 為 3 至 10 之範圍內進行，惟亦可在反應會進行之範圍內適當地變化。

本發明之製造方法一般係在約 0°C 至約 60°C 之範圍內進行，惟亦可在反應會進行之範圍內適當地變化。

本發明之製造方法一般係在約 0.5 小時至約 10 日之範圍內進行。關於反應之終點，可藉由在作為原料化合物

之式(2)所示之 N-胺甲醯基胺基化合物(即化合物(2))添加終了後，將反應液中之該式(2)所示之 N-胺甲醯基胺基化合物之量以液相層析法、氣相層析法等進行測定而確認。

本發明之製造方法中，作為原料化合物之式(2)所示之 N-胺甲醯基胺基化合物(即化合物(2))之濃度，一般為 50%(w/v)以下，為了使反應系中之該式(2)所示之 N-胺甲醯基胺基化合物之濃度保持大致一定，亦可將該式(2)所示之 N-胺甲醯基胺基化合物(即化合物(2))連續或逐次添加至反應系中。

本發明之製造方法中，亦可依照需要而在反應系中添加如葡萄糖、蔗糖、果糖等糖類，或 Triton X-100 或 Tween 60 等界面活性劑等。

從反應液回收 5-(胺基甲基)-2-氯噻唑，可依照一般所知之任意方法進行。

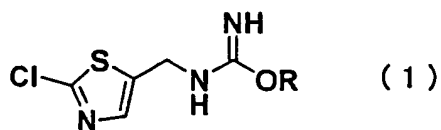
例如，可列舉如將反應液之有機溶劑萃取操作、濃縮操作等後處理，依照需要而與管柱層析法、蒸餾等組合，並進行精製之方法。

其具體例較佳可列舉如在反應液中加入鹽酸等無機酸，以 5-(胺基甲基)-2-氯噻唑之無機酸鹽的形式進行結晶精製之方法。

本發明之製造方法，亦可再包含下述步驟做為前步驟：作為原料化合物之式(2)所示之 N-胺甲醯基胺基化合物(即化合物(2))之製造步驟。

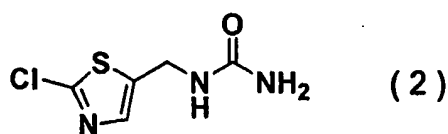
此前步驟係包含下述步驟：

對於式(1)所示之異尿素化合物(以下亦稱為化合物(1))，



[式中，R表示直鏈狀或環狀之烷基，該烷基亦可具有取代基，該烷基之碳原子數為1至6]

使具有將該異尿素化合物轉換為相對應之N-胺甲醯基胺基化合物的能力之酵素(以下亦稱為前步驟酵素)或具有產生該酵素之能力之微生物(以下亦稱為前步驟微生物)之培養物或其處理物進行作用，而獲得式(2)所示之N-胺甲醯基胺基化合物之步驟。



在此，化合物(1)中之「直鏈狀或環狀之烷基」可例舉如甲基、乙基、正丙基或正丁基等直鏈狀烷基，或例如環戊基或環己基等環狀烷基等。該烷基亦可具有取代基，該取代基可列舉如碳原子數1至4左右之直鏈狀烷基、鹵素原子、或碳原子數1至4左右之直鏈狀烷氧基等，具有取代基之(直鏈狀或環狀)烷基可例舉如異丙基或第三丁基等支鏈狀烷基，如氟化甲基、氯化甲基、三氟甲基、或三氯甲基等鹵化烷基，或如甲氧甲基等烷氧基烷基等。

R以甲基或乙基等較佳。

前述之前步驟中，所使用之作為催化劑之酵素或具有

產生該酵素之能力之微生物的培養物或其處理物，係具有將化合物(1)轉換為化合物(2)之能力者。具有該能力之微生物(即前步驟微生物)可例舉如由假單胞菌屬(*Pseudomonas*)及寡養單胞菌屬(*Stenotrophomonas*)所成群組中選出之1種以上之微生物。

此外，具有此能力之微生物(即前步驟微生物)，可列舉如由下述微生物群C中選出之1種以上之微生物。

<微生物群C>

猶他游動放線菌(*Actinoplanes utahensis*)、液化產氣單胞菌(*Aeromonas liquefaciens*)、節桿菌屬(*Arthrobacter* sp.)、出芽短梗黴(*Aureobasidium pullulans*)、短芽孢桿菌(*Bacillus brevis*)、森田芽孢桿菌(*Bacillus moritai*)、土生隱球酵母菌(*Cryptococcus humicolus*)、馬克斯克魯維酵母菌(*Kluyveromyces marxianus*)、迪爾諾弗分枝桿菌(*Mycobacterium diernhoferi*)、異常畢赤酵母菌(*Pichia anomala*)、異常畢赤酵母菌(*Pichia anomala*)、惡臭假單胞菌(*Pseudomonas putida*)、稻草假單胞菌(*Pseudomonas straminea*)、自營假放射菌(*Pseudonocardia autotrophica*)、紅球菌屬(*Rhodococcus* sp.)、硝基還原寡養單胞菌(*Stenotrophomonas nitritireducens*)、嗜根寡養單胞菌(*Stenotrophomonas rhizophila*)、寡養單胞菌屬(*Stenotrophomonas* sp.)、肉質鏈黴菌(*Streptomyces carnosus*)、絲孢酵母菌(*Trichosporon aquatile*)。

再者，具有此能力之較佳微生物，可列舉如由下述微

生物群 D 中選出之 1 種以上之微生物。

<微生物群 D>

猶他游動放線菌(*Actinoplanes utahensis*)IFO 13244t、
 液化產氣單胞菌(*Aeromonas liquefaciens*)IFO 12978、節
 桿菌屬(*Arthrobacter* sp.)ATCC 27778、出芽短梗黴
 (*Aureobasidium pullulans*)IFO 6353、短芽孢桿菌
 (*Bacillus brevis*)IFO 3331、森田芽孢桿菌(*Bacillus*
moritai)ATCC 21282、土生隱球酵母菌(*Cryptococcus*
humicolus)IFO 1527、馬克斯克魯維酵母菌
 (*Kluyveromyces marxianus*)IFO 0541、迪爾諾弗分枝桿菌
 (*Mycobacterium diernhoferi*)IFO 3707、異常畢赤酵母菌
 (*Pichia anomala*)IFO 0963、異常畢赤酵母菌(*Pichia*
anomala)IFO 1181、惡臭假單胞菌(*Pseudomonas putida*)
 IAM 1002、惡臭假單胞菌(*Pseudomonas putida*)IFO 14671、
 惡臭假單胞菌(*Pseudomonas putida*) IFO 14796、惡臭假
 單胞菌(*Pseudomonas putida*)JCM 6156、惡臭假單胞菌
 (*Pseudomonas putida*)JCM 6157、稻草假單胞菌
 (*Pseudomonas straminea*)JCM 2783t、自營假放射菌
 (*Pseudonocardia autotrophica*)IFO 12743T、紅球菌屬
 (*Rhodococcus* sp.)ATCC 19148、硝基還原寡養單胞菌
 (*Stenotrophomonas nitritireducens*)JCM 13311、嗜根寡
 養單胞菌(*Stenotrophomonas rhizophila*)JCM 13333、寡
 養單胞菌屬(*Stenotrophomonas* sp.)SC-1(FERM-BP 10785)、
 肉質鏈黴菌(*Streptomyces carnosus*)IFO 13025t、及絲孢

酵母菌(*Trichosporon aquatile*) ATCC 22310。

此等菌株可由天然分離，亦可容易地由各菌種保存機構購得。此外，寡養單胞菌屬(*Stenotrophomonas* sp.)係以寄存號碼 FERM-BP 10785 登錄在獨立行政法人 日本產業技術綜合研究所 專利生物寄存中心之菌株更佳。

關於可購得此等菌株之菌種保存機構，可列舉如下述之菌種保存機構。

1. IFO(Institute of Fermentation Osaka：財團法人 日本醱酵研究所)菌種保存中心

目前，已移管至獨立行政法人 日本製品評價技術基盤機構 生物遺傳資源部門(NBRC)。欲取得時，可向 NBRC 申請購入，亦可連結至 NBRC 之網站

(<http://www.nbrc.nite.go.jp/NBRC2/NBRCDispSearchServlet?lang=jp>)。

2. ATCC(American Type Culture Collection；美國菌種保存中心)

可透過日本住商藥品國際公司 ATCC 事業集團取得，欲購入時，可連結至如該集團之網址

(<http://www.summitpharma.co.jp/japanese/service/sATCC.html>)。亦可直接從 ATCC 購入。

3. IAM 菌種保存中心

目前，IAM 菌種保存中心之保存菌株中，細菌、酵母菌、絲狀菌已移管至獨立行政法人 日本理化學研究所生物資源中心微生物材料開發室(JCM)，此外，微細之藻類已移

管至獨立行政法人 日本國立環境研究所微生物系統保存設施(NIES)。欲取得時，可向此等機關申請購入，亦可連結至此等機關之網站中關於菌種保存之網頁

(http://www.jcm.riken.go.jp/JCM/aboutJCM_J.shtml、或 <http://mcc.nies.go.jp/aboutOnlineOrder.do>)。

4. JCM(日本理化學研究所微生物系統保存設施(Japan Collection of Microorganisms, JCM))

目前，已移管至獨立行政法人 日本理化學研究所生物資源中心(RIKEN BRC)微生物材料開發室。欲取得時，可向該機關申請購入，亦可連結至該機關之網站中關於菌種保存之網頁

(http://www.jcm.riken.go.jp/JCM/aboutJCM_J.shtml)。

前步驟中所使用之作為催化劑之酵素或具有產生該酵素之能力之微生物的培養物或其處理物，亦可藉由搜索具有將化合物(1)轉換為化合物(2)的能力之酵素或微生物而獲得並製備。具體而言，例如在試管中加入已滅菌之培養基 5mL，再於其中將由各菌種保存機構購得之菌體或由土壤中經純種分離而製備之菌體予以接種。將其於 30℃ 在好氧條件下進行振盪培養。培養終了後，經離心分離而回收菌體，獲得生菌體。於所得之生菌體中加入 1.5mL 之 0.2M 之磷酸鉀緩衝液(pH7)，經懸浮後，於其中加入 1.5mg 之已溶於 15 μ l 之二甲基亞砷中之 N-(2-氯噻唑-5-基甲基)-O-甲基異尿素，使所得之混合物在 30℃ 下振盪 2 至 3 日。

反應終了後，將反應液予以取樣，並以液相層析法等分析反應液中所生成之 N-(2-氯噻唑-5-基甲基)-尿素之量。

以如此操作，而篩選具備會產生「具有將異尿素化合物轉換為相對應之 N-胺甲醯基胺基化合物之能力之酵素」的能力之微生物。

其次，說明前步驟微生物之製備方法。

前步驟微生物可使用適當地含有碳源、氮源、有機鹽、無機鹽等之用以培養各種微生物的培養基而進行培養。

碳源可例舉如葡萄糖、糊精、蔗糖等糖類，甘油等醣醇，反丁烯二酸、檸檬酸、丙酮酸等有機酸，動物油、植物油及糖蜜。此等碳源在培養基中之添加量，相對於培養液一般係 0.1%(w/v)至 30%(w/v)左右。

氮源可例舉如肉萃取物、蛋白朮、酵母萃取物、麥芽萃取物、大豆粉、玉米浸液、綿籽粉、乾燥酵母、酪蛋白胺基酸等天然有機氮源，胺基酸類、硝酸鈉等無機酸之銨鹽，氯化銨、硫酸銨、磷酸銨等無機酸之銨鹽，反丁烯二酸銨、檸檬酸銨等有機酸之銨鹽及尿素。其中之有機酸之銨鹽、天然有機氮源、胺基酸類等係在許多情形下亦可作為碳源使用。此等氮源在培養基中之添加量，相對於培養液一般係 0.1%(w/v)至 30%(w/v)左右。

有機鹽及無機鹽可例舉如鉀、鈉、鎂、鐵、錳、鈷、鋅等之氯化物，硫酸鹽、乙酸鹽、碳酸鹽及磷酸鹽。具體之例，可列舉如氯化鈉、氯化鉀、硫酸鎂、硫酸亞鐵、硫

酸錳、氯化鈷、硫酸鋅、硫酸銅、乙酸钠、碳酸鈣、磷酸氫一鉀及磷酸氫二鉀。此等有機鹽及/或無機鹽在培養基中之添加量，相對於培養液一般係 0.0001%(w/v)至 5%(w/v)左右。

培養方法可列舉如固體培養、液體培養(試管培養、燒瓶培養、缸式醱酵槽培養等)。

培養溫度及培養液之 pH，只要是在前步驟微生物可生長之範圍即可，並無特別之限定，可列舉如培養溫度為約 15°C 至約 45°C 之範圍、培養液之 Ph 為約 4 至約 8 之範圍。培養時間可依照培養條件而適當選擇，惟一般為約 1 日至約 7 日。

前步驟微生物之培養物，可直接作為前步驟之催化劑使用。使用前步驟微生物之培養物之方法中，關於直接使用前步驟微生物之菌體之方法，可列舉如(1)直接使用培養液之方法、(2)使用將培養液經離心分離等而回收之菌體(依照需要而使用經緩衝液或水洗淨後之濕菌體)之方法等。

前步驟之催化劑，亦可使用前步驟微生物之培養物之處理物。該處理物之例可列舉如：將培養所得之菌體再經有機溶劑(丙酮、乙醇等)處理者、經冷凍乾燥處理者或經鹼處理者，或是將菌體經物理性或酵素性破碎處理者，或是將此等物再經分離/萃取而得之粗酵素等。並且，前述處理物中，亦包含經前述處理後再以一般所知之方法進行固定化處理者。

從前步驟微生物之處理物精製本酵素之方法，可使用一般蛋白質之精製所使用之方法。例如可列舉如以下之方法。

首先，從前步驟微生物之處理物中以離心分離等而收集菌體後，將其以超音波處理、微粉碎機處理、法式壓碎機處理等物理性破碎法或是以使用界面活性劑或溶菌酶等溶菌酵素之化學性破碎法等進行破碎。從所得之破碎液中經離心分離、過濾膜過濾等而去除其中之雜質，以製備無細胞萃取液，將其適當地使用陽離子交換層析法、陰離子交換層析法、疏水性層析法、膠體過濾層析法、或金屬螯合層析法等分離精製方法進行區分，即可精製前步驟酵素。

層析中所使用之擔體，可例舉如經導入羧甲基(CM)、二乙基胺基乙基(DEAE)、苯基或丁基之纖維素、糊精或洋菜糖等不溶性高分子擔體。亦可使用市售之已充填擔體之管柱，該市售之已充填擔體之管柱可舉例如 Q-Sepharose FF、Phenyl-Sepharose HP(商品名，均為 Amersham Pharmacia Biotech 公司製造)、TSK-gel G3000SW(商品名，東曹公司製造)等。

含有前步驟酵素之區分，可根據前步驟中之「將異尿素化合物轉換為相對應之 N-胺甲醯基胺基化合物之能力」之存在與否或其程度而進行篩選。

其具體之形態，可列舉如前步驟微生物之培養物、該培養物之處理物(如無細胞萃取液、粗精製蛋白質、精製蛋白質及此等之固定化物等)。在此，培養物之處理物可列舉

如冷凍乾燥微生物、有機溶劑處理微生物、乾燥微生物、微生物磨碎物、微生物之自溶物、微生物之超音波處理物、微生物萃取物、微生物之鹼處理物。又，獲得固定化物之方法，可例舉如擔體結合法(使本酵素等吸附於矽膠及陶瓷等無機擔體、纖維素、離子交換樹脂等之方法)及捕獲法(將本酵素等關在聚丙烯醯胺、含硫多醣膠體(例如紅藻膠膠體)、褐藻酸膠體、洋菜膠體等高分子之網狀構造中之方法)。

在考慮使用前步驟微生物之工業生產性時，相較於使用未處理狀態之微生物之方法，以使用使該微生物滅絕化之處理物之方法在製造設備之限制等方面上有更佳之情形。用於此處之滅菌化處理方法，可列舉如物理性殺菌法(加熱、乾燥、冷凍、光線、超音波、過濾、通電)、及使用化學藥品之殺菌法(鹼、酸、鹵素、氧化劑、硫、硼、砷、金屬、醇、酚、胺、硫化物、醚、醛、酮、氰、抗生素)。一般而言，以選擇此等殺菌法中儘可能使前步驟酵素之前述「將異尿素轉換為相對應之 N-胺甲醯基胺基化合物之能力」不致失活，且對反應系之殘留、污染等影響少之處理方法為佳。

前步驟一般係在水存在下進行。該情形下之水，亦可為緩衝液之形態。該緩衝液中所使用之緩衝劑，可列舉如磷酸鈉、磷酸鉀等磷酸之鹼金屬鹽，乙酸鈉、乙酸鉀等乙酸之鹼金屬鹽等。

前步驟亦可更進一步使用疏水性有機溶劑，並在水與

疏水性有機溶劑之存在下進行。此時所使用之疏水性有機溶劑，可列舉如甲酸乙酯、乙酸乙酯、乙酸丙酯、乙酸丁酯、丙酸乙酯、丙酸丁酯等酯類，正丁醇、正戊醇、正辛醇等醇類，苯、甲苯、二甲苯等芳族烴類，二乙基醚、二異丙基醚、甲基第三丁基醚等醚類，氯仿、1,2-二氯乙烷等鹵化烴類及此等之混合物。

前步驟亦可更進一步使用親水性有機溶劑，並在水與水性媒質之存在下進行。此時所使用之親水性有機溶劑，可列舉如甲醇、乙醇等醇類，丙酮等酮類，二甲氧基乙烷、四氫吡喃、二噁烷等醚類，二甲基亞砷及此等之混合物。

前步驟一般係在水層之 pH 為 3 至 10 之範圍內進行，惟亦可在反應會進行之範圍內適當地變化。

前步驟一般係在約 0°C 至約 60°C 之範圍內進行，惟亦可在反應會進行之範圍內適當地變化。

前步驟一般係在約 0.5 小時至約 10 日之範圍內進行。關於反應之終點，可藉由在作為原料化合物之式(1)所示之異尿素化合物(即化合物(1))添加終了後，以液相層析法、氣相層析法等測定反應液中之該式(1)所示之異尿素化合物之量，而予以確認。

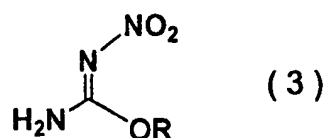
前步驟中之作為原料化合物之式(1)所示之異尿素化合物(即化合物(1))之濃度，一般為 50%(w/v)以下，為了使反應系中之該式(1)所示之異尿素化合物之濃度保持大致一定，亦可將該式(1)所示之異尿素化合物(即化合物(1))連續或逐次添加至反應系中。

前步驟中，亦可依照需要而在反應系中添加葡萄糖、蔗糖、果糖等糖類，或 Triton X-100 或 Tween 60 等界面活性劑等。

從反應液回收式(2)所示之 N-胺甲醯基胺基化合物，可依照一般所知之任意之方法進行。

可列舉如將反應液之有機溶劑萃取操作、濃縮操作等後處理，依照需要而與管柱層析法、蒸餾等組合，並進行精製之方法。

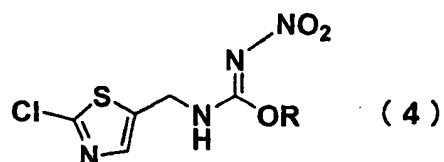
作為原料化合物之式(1)所示之異尿素化合物(即化合物(1))之製造方法，可藉由將 5-(胺基甲基)-2-氯噻唑與式(3)所示之化合物(以下亦稱為化合物(3))混合，再依如下之操作而製備。



[式中，R 表示與前述相同之意義]。

化合物(3)可例舉如 O-甲基-N-硝基異尿素、O-乙基-N-硝基異尿素等。

依照日本特開平 10-120666 號公報之實施例 1 至 16 之方法，首先，使 5-(胺基甲基)-2-氯噻唑與化合物(3)在水中於室溫下反應，而主要製造式(4)所示之化合物(以下亦稱為化合物(4))，



[式中，R 所表與前述之意相同]

其次，再將所得之化合物(4)進行脫硝基化，而可製成化合物(1)。

上述方法中，在主要製造化合物(4)時，由於亦會直接製造出作為副產物之化合物(1)，故亦可將其回收利用。

更具體而言，使 5-(胺基甲基)-2-氯噻唑與化合物(3)反應而製成作為中間體為有用之化合物(4)之方法，可列舉如：將化合物(3)依照需要而溶解在水中後，於 10°C 至 35°C 左右之溫度下與 5-(胺基甲基)-2-氯噻唑混合，而製成含有化合物(4)及化合物(1)之混合物，並將作為結晶而析出之化合物(4)經過濾、離心分離等而固液分離，以取出化合物(4)之方法等。該已以結晶之形式取出化合物(4)之濾液，則可製備成含有化合物(1)之水溶液。

實施例

其次列舉實施例，更詳細說明本發明。

實施例 1 (含有本聚核苷酸之質體之合成法(其之 1))

從依照下述參考例 3 所載之方法所篩選的具有將 N-胺甲醯基胺基化合物轉換為相對應之 5-(胺基甲基)-2-氯噻唑之能力之微生物(紅球菌屬，*Rhodococcus* sp.)，使用 QIAGEN Genomic-tip(Qiagen 公司製造)製備染色體 DNA(A)。

依照紅球菌屬 R312 (*Rhodococcus* R312)(短桿菌屬

R312(*Brevibacterium* R312)(CBS 717-73))之醃胺酶基因序列，合成含有序列編號 3 所示之鹼基序列的寡核苷酸引子及含有序列編號 4 所示之鹼基序列的寡核苷酸引子。

以合成之 2 種寡核苷酸引子作為 1 組之引子組，並以前述製備之染色體 DNA(A)作為模版，以下述之反應液組成、反應條件進行 PCR(使用 Roche Diagnostics 公司製造之 Expand High Fidelity PCR System)。

[反應液組成]

染色體 DNA 溶液(A)	20 μ l
dNTP(各 2.5mM-mix)	1 μ l
引子(20pmol/ μ l)	各 0.4 μ l
5xbuffer(with MgCl)	10 μ l
enz. expand HiFi(5U/ μ l)	0.5 μ l
超純水	17.7 μ l

[反應條件]

將已置入上述組成之反應液之容器裝設在 PERKIN ELMER-GeneAmp PCR System2400，加熱至 94°C (2 分鐘)後，再以 94°C (10 秒鐘)-60°C (0.5 分鐘)-72°C (1.5 分鐘)之循環進行操作 30 次，之後再於 72°C 下保持 7 分鐘。

之後，取出部份之 PCR 反應液，進行洋菜糖膠體電泳，檢測到約 1.6kbp 之 DNA 片段之色帶。

直接使用各個檢測到約 1.6kbp 之 DNA 片段之色帶的 PCR 反應液，將上述約 1.6kbp 之 DNA 片段連接(ligation)至 pCR2.1-TOPO 載體之已存在之「PCR Product 插入部位」

(使用 Invitrogen 公司製造之 TOPOTMTA cloning 套組)，以所得之連接液將大腸菌 DH5 α 株進行轉形。

於含有 50 μ g/mL 安比西林之 LB(1%之 Bacto-胰化蛋白胨(Bacto-tryptone)、0.5%之 Bacto-酵母萃取物、1%之氯化鈉)洋菜培養基上塗佈 30 μ l 之 5-溴-4-氯-3-吡啶基- β -D-半乳糖苷(以下稱為 X-gal)之 4%水溶液及 30 μ l 之 0.1M IPTG，再於其上接種所得之轉形體並進行培養。在已形成之菌落中，各取 1 個白色菌落，將各菌落接種於含有 50 μ g/mL 安比西林之已滅菌 LB 培養基(2mL)，並在試管中振盪培養(30°C，24 小時)。從各培養菌體中使用 QIAprep Spin Miniprep Kit(Qiagen 公司製造)取出質體。

以下，源自所得之 DNA 片段的質體亦稱為質體 pCRami。

分析插入質體 pCRami 中之 DNA 片段的鹼基序列，可知插入之 DNA 片段的鹼基序列具有序列編號 2 所示之鹼基序列。

插入質體中之 DNA 片段之鹼基序列之分析，係使用 Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit(Perkin Elmer 公司製造)，以各質體作為模版而進行定序反應(sequence reaction)，並將所得之 DNA 之鹼基序列以 DNA 定序器-373A(Perkin Elmer 公司製造)進行分析。

將所得之質體 pCRami 以 2 種限制酶(SacI 及 KpnI)進行 2 重切斷(double-digestion)，其次將如此經 2 重切斷之約 1.6kbp 的 DNA 片段予以精製。

另一方面，將質體載體 pTV118N(寶酒造公司製造)並

以 2 種限制酶(SacI 及 KpnI)進行 2 重切斷，其次再將如此經 2 重切斷之 DNA 片段予以精製。

將所得之 2 種已精製之 DNA 片段混合，並以 T4 DNA 連接酶進行連接反應後，其次以所得之連接液將大腸菌 DH5 α 株進行轉形。

將所得之轉形體於含有 50 μ g/mL 安比西林之 LB 洋菜培養基上進行培養，並隨機地從生長之菌落中選取 3 個菌落。將所選取之菌落各自接種於含有 50 μ g/mL 安比西林之滅菌 LB 洋菜培養基(2mL)，並在試管中進行振盪培養(30 $^{\circ}$ C，24 小時)。從各培養菌體中，使用 QIAprep Spin Miniprep Kit(Qiagen 公司製造)取出質體。

將取出之質體之各一部份，以 SacI 及 KpnI 之 2 種限制酶進行 2 重切斷後，將經 2 重切斷之 DNA 片段進行膠體電泳，而確認取出之質體整體中已插入有前述約 1.6kbp 之 DNA 片段(以下亦將該質體稱為質體 pTVami)。

使用以如此操作而獲得之質體 pTVami，將大腸菌 DH5 α 株進行轉形。將所得之轉形體接種於含有 50 μ g/mL 安比西林之滅菌 LB 培養基(100mL)，進行振盪培養(30 $^{\circ}$ C，26 小時)。藉由將所得之培養液予以離心分離，而獲得本轉形體。

實施例 2(使用生產本酵素之大腸菌重組體，由 N-胺甲醯基胺基化合物製造 5-(胺基甲基)-2-氯噻唑之製造例)

將實施例 1 所得之本轉形體(亦即含有質體 pTVami 之大腸菌 DH5 α 株)接種於含有 50 μ g/mL 安比西林之滅菌 LB

培養基(100mL)，並進行振盪培養(30°C，26小時)。將所得之培養液予以離心分離，獲得約0.6g之濕菌體。於所得之濕菌體中，混合5mg之N-(2-氯嘧啶-5-基甲基)-尿素、50 μ l之二甲基亞碸、5mL之0.2M磷酸緩衝液(pH7.0)，並於37°C下攪拌144小時。

反應終了後，將反應液予以取樣0.6mL。從該試樣溶液中去除菌體後，以液相層析法分析所生成之5-(胺基甲基)-2-氯嘧啶之量。結果可知，相對於反應中所使用之N-(2-氯嘧啶-5-基甲基)-尿素之量，生成91.6%之5-(胺基甲基)-2-氯嘧啶。

<含量分析條件>

管柱：Cadenza CD-C18(4.6mm Φ ×15cm，3 μ m)(Imtakt公司製造)

移動相：A液(5 mmol/L 辛烷磺酸鈉+50 mmol/L 磷酸二氫鉀水溶液)

B液 乙腈

時間(分鐘)	A液(%)：B液(%)
0	90：10
5	90：10
25	50：50
40	50：50
40.1	90：10

流量：1mL/分鐘

管柱溫度：40°C

檢測：254nm

實施例 3(本酵素之製備)

從依照參考例 3 所載之方法而篩選的具有將 N-胺甲醯基胺基化合物轉換為相對應之 5-(胺基甲基)-2-氯噻唑的能力之微生物(紅球菌屬, *Rhodococcus* sp.) 製備約 2.2g 之濕菌體, 使其懸浮於 20mL 之 20mM 磷酸鉀緩衝液(pH7.0) 中, 並以 Multi-Beads Shocker(安井器械公司製造, 玻璃珠為 0.1mm Φ , 2500rpm, 20 分鐘)進行破碎。將所得之破碎液進行離心分離(10000rpm, 10 分鐘), 於所得之上清液中加入魚精蛋白硫酸鹽(protamine sulfate)後, 再度離心分離(10000rpm, 10 分鐘), 獲得離心上清液。

將 20mL 之所得之離心上清液以超濾膜(30kNMWL)濃縮至 2mL。將所得之濃縮物於離子交換層析管柱[HiTrap Q FF(Amersham Bioscience 公司製造)][經磷酸鉀緩衝液(20mM, pH7)平衡者]中展開, 以已溶解有氯化鈉之磷酸鉀緩衝液(氯化鈉濃度 0 \rightarrow 1.0M 之濃度梯度)作為移動層, 進行溶出, 而獲得 4mL 之氯化鈉濃度為 0.14 至 0.65M 之區分, 其係具有還原酶活性之區分。

將所得之 4mL 之活性區分以超濾膜(30kNMWL)濃縮至 2mL 後, 於所得之濃縮物中緩緩加入硫酸銨直到其濃度成為 1.5M 為止。將其於疏水性交互作用層析管柱[HiTrap Butyl FF(Amersham Bioscience 公司製造)][經含有 1.5M 硫酸銨之磷酸鉀緩衝液(20mM, pH7)平衡者]中展開, 並以已溶解有硫酸銨之磷酸鉀緩衝液(硫酸銨濃度 1.5M \rightarrow 0M 之

濃度梯度)作為移動層，進行溶出，而獲得 1mL 之硫酸銨濃度為 0.25 至 0.47M 之溶出區分，其係具有還原酶活性之區分。

將所得之 4mL 之活性區分，以超濾膜(30kNMWL)而在含有 0.15M NaCl 之磷酸鈉緩衝液(50mM, pH7)中進行脫鹽，以交換其中之緩衝液後，再將其濃縮至約 0.1mL。將所得之濃縮物經膠體過濾[管柱：Superdex 200(10/300GL)(Amersham Bioscience 公司製造)][移動層：含有 0.15M NaCl 之磷酸鈉緩衝液(50mM, pH7)]，而獲得含有分子量為約 98000 道耳頓(dalton)之本酵素的 1mL 之活性區分，其係具有將 N-胺甲醯基胺基化合物水解成相對應之 5-(胺基甲基)-2-氯噻唑的活性之區分。

此外，對於經層析等而製成之區分，係依據如下之操作而測定水解酵素之活性。添加 1.5mg 之已溶解於 15 μ l 之二甲基亞砷中的 N-(2-氯噻唑-5-基甲基)-尿素後，添加經由層析等而製成之溶出區分及 0.2M 磷酸鉀緩衝液(pH7)，並使總量成為 1.5mL，將所得之混合物於 30°C 下振盪反應 1 至 2 日。

反應終了後，將反應液予以取樣 0.6mL，以液相層析法測定反應液中所生成之 5-(胺基甲基)-2-氯噻唑之量，求出區分中之水解酵素活性。

<含量分析條件>

管柱：Cadenza CD-C18(4.6mm Φ × 15cm, 3 μ m)(Imtakt 公司製造)

移動相：A 液(5 mmol/L 辛烷磺酸鈉+50 mmol/L 磷酸二氫
鉀水溶液)

B 液 乙腈

時間(分鐘)	A 液(%) : B 液(%)
0	90 : 10
5	90 : 10
25	50 : 50
40	50 : 50
40.1	90 : 10

流量：1mL/分鐘

管柱溫度：40°C

檢測：254nm

實施例 4(含有本聚核苷酸之質體之合成法(其之 2))

將對應於序列編號 1 所示的胺基酸序列之 forward 引子與 reverse 引子以切成各約 40bp 長度之形態，而各自合成 39 個引子。將此等引子依以下之條件進行 Assembly PCR 法。

[反應液組成]

dNTP(各 2.5mM-mix)	1 μ l
引子 mix(250 μ M)	0.5 μ l
5xbuffer(with MgCl)	10 μ l
enz. expand HiFi(5U/ μ l)	0.5 μ l
超純水	38 μ l

將已置入上述組成之反應液之容器裝設在 PERKIN

ELMER-GeneAmp PCR System 9700 之後，以 94°C (30 秒鐘)-52°C (30 秒鐘)-68°C (30 秒鐘)之循環進行操作 55 次。

反應終了後，以反應液作為模版，再度依以下述之反應條件進行 PCR。加熱至 94°C (2 分鐘)後，以 94°C (30 秒鐘)-53°C (30 秒鐘)-68°C (1.5 分鐘)之循環進行操作 30 次。此時，係使用具有序列編號 3 所示之鹼基序列的寡核苷酸引子及序列編號 4 所示之寡核苷酸引子。

[反應液組成]

模版	1 μ l
dNTP(各 2.5mM-mix)	1 μ l
引子(250 μ M)	各 0.5 μ l
5xbuffer(with MgCl)	10 μ l
enz. expand HiFi(5U/ μ l)	0.5 μ l
超純水	36.5 μ l

之後，取部份之 PCR 反應液以洋菜糖膠體進行精製，加入 2 種限制酶(SacI 及 KpnI)，將約 1500bp 之 DNA 片段進行 2 重切斷，之後再精製該經酵素切斷之 DNA 片段。

另一方面，將質體載體 pTV118N(TaKaRa 公司製造)以 2 種限制酶(SacI 及 KpnI)進行 2 重切斷，並精製該經酵素切斷之 DNA 片段。

將此等 2 種經酵素切斷之 DNA 片段混合，並以 T4 DNA 連接酶進行連接反應，再以所得之連接液將大腸菌 DH5 α 株進行轉形。

將所得之轉形體以含有 50 μ g/mL 安比西林之 LB 洋菜

培養基進行培養，並將生長之菌落各接種於含有 50 $\mu\text{g/mL}$ 安比西林之滅菌 LB 培養基(2mL)，在試管中進行振盪培養(37°C，17 小時)。以如此操作，即可製備含有質體 pTVami 之大腸菌 DH5 α 株(亦即本轉形體)。

從上述之培養菌體，使用 QIAprep Spin Miniprep Kit(Qiagen 公司製造)而取出質體，以獲得質體 pTVami。
參考例 1 (化合物(1)之製造方法)

一邊將 50g 之 N-(2-氯嘧啶-5-基甲基)-O-甲基-N'-硝基異尿素(化合物(4)中之 R 為甲基之化合物)於 400mL 之乙腈中攪拌，一邊在該混合物中於 25 至 30°C 下滴入 58.6g 之 28% 氨水。

將所得之混合物經保溫 1 小時後，在減壓下蒸餾去除乙腈。將所得之殘渣以 120mL 之乙酸乙酯稀釋，並以 5g 之無水硫酸鎂脫水，過濾其不溶成分後，減壓濃縮。

對於如此所得之油狀物質加入 50mL 之甲苯、30mL 之正己烷而溶解，於所得之溶解物中緩緩加入正己烷而析出結晶。將其過濾後，同樣地以甲苯/正己烷進行再結晶並過濾之，之後再經減壓乾燥，即獲得 18g 之 N-(2-氯嘧啶-5-基甲基)-O-甲基異尿素之白色結晶。所得之白色結晶之物理性質如下。

<白色結晶之物理性質>

依液相層析法之面積百分率之純度：98.3%

熔點：71 至 72°C

$^1\text{H-NMR}$ ：3.7(s, 3H)、4.4(s, 2H)、4.9(s, 2H)、7.4(s, 1H)

參考例 2 (化合物(2)之製造方法)

將 24.3g 之氰酸鉀溶解於 340mL 之水中，於 50°C 下在該溶解物中滴入 135g 之 5-(胺甲基)-2-氯噻唑鹽酸鹽水溶液(含量 35wt%)。

將所得之混合物經保溫 1 小時，而析出結晶。將其冷卻至室溫後，加以過濾並以溫水洗淨，其次再減壓乾燥，即獲得 45g 之 N-(2-氯噻唑-5-基甲基)-尿素之白色結晶。所得之白色結晶之物理性質如下。

<白色結晶之物理性質>

依液相層析法之面積百分率之純度：98.6%

熔點：173°C

¹H-NMR：4.3(s, 2H)、5.7(s, 2H)、6.6(s, 1H)、7.5(s, 1H)

參考例 3 (搜索具備會產生「具有將 N-胺甲醯基胺基化合物轉換為相對應之 5-(胺基甲基)-2-氯噻唑的能力之酵素」的能力之微生物)

在試管中加入 5mL 之已滅菌之培養基(在 1L 之水中加入 20g 之葡萄糖、5g 之聚蛋白腴(polypeptone)、3g 之酵母萃取物、3g 之肉萃取物、2g 之硫酸銨、1g 之磷酸二氫鉀及 0.5g 之硫酸鎂 7 水合物後，調整 pH 為 7.0)，再於其中接種由各菌株保存機構購得之菌體或由土壤中經純種分離而製備之菌體。將其於 30°C 在好氧條件下振盪培養。於培養終了後，以離心分離回收菌體，製備生菌體。在旋口試管中加入 1.5mL 之 0.2M 磷酸鉀緩衝液(pH7)，於其中添加上述生菌體後，使其懸浮。在所得之懸浮液中，加入

1.5mg 之已溶解於 15 μ l 之二甲基亞砷中之 N-(2-氯噻唑-5-基甲基)-尿素後，將所得之混合物於 30°C 下振盪培養 2 至 3 日。

在反應終了後，將反應液予以取樣 0.6mL。從經取樣之反應液中去除菌體後，以液相層析法分析反應液中所生成之 5-(胺基甲基)-2-氯噻唑之量。

以如此之操作，而篩選具備會產生「具有將 N-胺甲醯基胺基化合物轉換為相對應之 5-(胺基甲基)-2-氯噻唑的能力之酵素」的能力之微生物。

<含量分析條件>

管柱：Cadenza CD-C18(4.6mm Φ ×15cm，3 μ m)(Imtakt 公司製造)

移動相：A 液(5 mmol/L 辛烷磺酸鈉+50 mmol/L 磷酸二氫鉀水溶液)

B 液 乙腈

時間(分鐘)	A 液(%)：B 液(%)
0	90：10
10	90：10
30	50：50
45	50：50
45.1	90：10

流量：1mL/分鐘

管柱溫度：40°C

檢出：254nm

參考例 4 (由異尿素化合物製造 N-胺甲醯基胺基化合物之製造例)

在試管中加入 5mL 之已滅菌之培養基(在 1L 之水中，加入 20g 之葡萄糖、5g 之聚蛋白脲、3g 之酵母萃取物、3g 之肉萃取物、2g 之硫酸銨、1g 之磷酸二氫鉀及 0.5g 之硫酸鎂 7 水合物後，調整 pH 為 7.0)，於其中接種表 1 所示之各種菌體。將其於 30°C 在好氧條件下振盪培養。於培養終了後，以離心分離回收菌體，製備生菌體。在旋口試管中加入 1.5mL 之 0.2M 磷酸鉀緩衝液(pH7)，於其中添加上述生菌體後，使其懸浮。在所得之懸浮液中，加入 1.5mg 之已溶解於 15 μ l 之二甲基亞碲中之 N-(2-氯嘧啶-5-基甲基)-O-甲基異尿素後，將所得之混合物於 30°C 下振盪培養 2 至 3 日。

在反應終了後，將該反應液予以取樣 0.6mL。從經取樣之反應液中去除菌體後，以液相層析法分析反應液中所生成之 N-(2-氯嘧啶-5-基甲基)-尿素之量。其結果如表 2 所示。

<含量分析條件>

管柱：Cadenza CD-C18(4.6mm Φ ×15cm，3 μ m)(Imtakt 公司製造)

移動相：A 液(5 mmol/L 辛烷磺酸鈉+50 mmol/L 磷酸二氫鉀水溶液)

B 液 乙腈

時間(分鐘) A 液(%)：B 液(%)

201137125

0	90 : 10
10	90 : 10
30	50 : 50
45	50 : 50
45.1	90 : 10

流量：1mL/分鐘

管柱溫度：40℃

檢出：254nm

[表 1]

菌株	N-(2-氯噻唑 -5-基甲基)-尿 素的產率(%)
猶他游動放線菌(<i>Actinoplanes utahensis</i>)IFO 13244t	0.3
液化產氣單胞菌(<i>Aeromonas liquefaciens</i>)IFO 12978	1.8
節桿菌屬(<i>Arthrobacter</i> sp.)ATCC 27778	1.9
出芽短梗黴(<i>Aureobasidium pullulans</i>)IFO 6353	0.8
短芽孢桿菌(<i>Bacillus brevis</i>)IFO 3331	5.6
森田芽孢桿菌(<i>Bacillus moritai</i>)ATCC 21282	0.6
土生隱球酵母菌(<i>Cryptococcus humicolus</i>)IFO 1527	2.4
馬克斯克魯維酵母菌(<i>Kluyveromyces marxianus</i>)IFO 0541	1.3
迪爾諾弗分枝桿菌(<i>Mycobacterium diernhoferi</i>)IFO 3707	3.0
異常畢赤酵母菌(<i>Pichia anomala</i>)IFO 0963	0.7
異常畢赤酵母菌(<i>Pichia anomala</i>)IFO 1181	0.6
惡臭假單胞菌(<i>Pseudomonas putida</i>)IAM 1002	1.0
惡臭假單胞菌(<i>Pseudomonas putida</i>)IFO 14671	1.3
惡臭假單胞菌(<i>Pseudomonas putida</i>)IFO 14796	1.2
惡臭假單胞菌(<i>Pseudomonas putida</i>)JCM 6156	1.1
惡臭假單胞菌(<i>Pseudomonas putida</i>)JCM 6157	1.6
稻草假單胞菌(<i>Pseudomonas straminea</i>)JCM 2783t	1.9
自營假放射菌(<i>Pseudonocardia autotrophica</i>) IFO 12743T	0.7
紅球菌屬(<i>Rhodococcus</i> sp.)ATCC 19148	0.7
硝基還原寡養單胞菌(<i>Stenotrophomonas nitritireducens</i>)JCM 13311	0.6
嗜根寡養單胞菌(<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>)JCM 13333	1.1
寡養單胞菌屬(<i>Stenotrophomonas</i> sp.)SC-1	1.4
肉質鏈黴菌(<i>Streptomyces carnosus</i>)IFO 13025t	0.3
絲孢酵母菌(<i>Trichosporon aquatile</i>)ATCC 22310	0.4

[產業上之可利用性]

依本發明，可提供一種 5-(胺基甲基)-2-氯噻唑之新

穎之製造方法等。

[序列表之非關鍵詞文字(free text)]

序列編號 3：用於 PCR 之引子

序列編號 4：用於 PCR 之引子

【圖式簡單說明】無

【主要元件符號說明】無

201137125

Ala Asp Glu Ala Thr Pro Pro Thr Thr Ser Arg Glu His Ala Val Pro
50 55 60

Ser Ala Ser Glu Asn Pro Leu Ser Ala Trp Tyr Val Thr Thr Ser Ile
65 70 75 80

Pro Pro Thr Ser Asp Gly Val Leu Thr Gly Arg Arg Val Ala Ile Lys
85 90 95

Asp Asn Val Thr Val Ala Gly Val Pro Met Met Asn Gly Ser Arg Thr
100 105 110

Val Glu Gly Phe Thr Pro Ser Arg Asp Ala Thr Val Val Thr Arg Leu
115 120 125

Leu Ala Ala Gly Ala Thr Val Ala Gly Lys Ala Val Cys Glu Asp Leu
130 135 140

Cys Phe Ser Gly Ser Ser Phe Thr Pro Ala Ser Gly Pro Val Arg Asn
145 150 155 160

Pro Trp Asp Arg Gln Arg Glu Ala Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser Ala
165 170 175

201137125

Ala Leu Val Ala Asn Gly Asp Val Asp Phe Ala Ile Gly Gly Asp Gln
180 185 190

Gly Gly Ser Ile Arg Ile Pro Ala Ala Phe Cys Gly Val Val Gly His
195 200 205

Lys Pro Thr Phe Gly Leu Val Pro Tyr Thr Gly Ala Phe Pro Ile Glu
210 215 220

Arg Thr Ile Asp His Leu Gly Pro Ile Thr Arg Thr Val His Asp Ala
225 230 235 240

Ala Leu Met Leu Ser Val Ile Ala Gly Arg Asp Gly Asn Asp Pro Arg
245 250 255

Gln Ala Asp Ser Val Glu Ala Gly Asp Tyr Leu Ser Thr Leu Asp Ser
260 265 270

Asp Val Asp Gly Leu Arg Ile Gly Ile Val Arg Glu Gly Phe Gly His
275 280 285

Ala Val Ser Gln Pro Glu Val Asp Asp Ala Val Arg Ala Ala Ala His
290 295 300

201137125

Ser Leu Thr Glu Ile Gly Cys Thr Val Glu Glu Val Asn Ile Pro Trp
305 310 315 320

His Leu His Ala Phe His Ile Trp Asn Val Ile Ala Thr Asp Gly Gly
325 330 335

Ala Tyr Gln Met Leu Asp Gly Asn Gly Tyr Gly Met Asn Ala Glu Gly
340 345 350

Leu Tyr Asp Pro Glu Leu Met Ala His Phe Ala Ser Arg Arg Ile Gln
355 360 365

His Ala Asp Ala Leu Ser Glu Thr Val Lys Leu Val Ala Leu Thr Gly
370 375 380

His His Gly Ile Thr Thr Leu Gly Gly Ala Ser Tyr Gly Lys Ala Arg
385 390 395 400

Asn Leu Val Pro Leu Ala Arg Ala Ala Tyr Asp Thr Ala Leu Arg Gln
405 410 415

Phe Asp Val Leu Val Met Pro Thr Leu Pro Tyr Val Ala Ser Glu Leu
420 425 430

201137125

Pro Ala Lys Asp Val Asp Arg Ala Thr Phe Ile Thr Lys Ala Leu Gly
435 440 445

Met Ile Ala Asn Thr Ala Pro Phe Asp Val Thr Gly His Pro Ser Leu
450 455 460

Ser Val Pro Ala Gly Leu Val Asn Gly Leu Pro Val Gly Met Met Ile
465 470 475 480

Thr Gly Arg His Phe Asp Asp Ala Thr Val Leu Arg Val Gly Arg Ala
485 490 495

Phe Glu Lys Leu Arg Gly Ala Phe Pro Thr Pro Ala Glu Arg Ala Ser
500 505 510

Asn Ser Ala Pro Gln Leu Ser Pro Ala
515 520

<210> 2

<211> 1566

<212> DNA

<213> Rhodococcus

<400> 2

atggcgacaa tccgaccta cgacaaagca atagacgccg ccgcaaggca ttacggcatc 60
actctcgaca aaacagcccg gctcgagtgg ccggcactga tcgacggagc actgggctcc 120
tacgacgtcg tcgaccagtt gtacgccgac gaggcgaccc cgccgaccac gtcacgcgag 180
cacgcggtgc caagtgcgag cgaaaatcct ttgagcgctt ggtatgtgac caccagcatc 240
ccgccgacgt cggacggcgt cctgaccggc cgacgcgtgg cgatcaagga caacgtgacc 300
gtggccggag ttccgatgat gaacggatct cggacggtag agggatttac tccgtcacgc 360
gacgcgactg tggtcactcg actactggcg gccggtgcaa ccgtcgcggg caaagctgtg 420
tgtgaggacc tgtgtttctc cggttcgagc ttcacaccgg caagcggacc ggtccgcaat 480
ccatgggacc ggcagcgcga agcaggtgga tcatccggcg gcagtgcagc actcgtcgca 540
aacggtgacg tcgattttgc catcggcggg gatcaaggcg gatcgatccg gatcccggcg 600
gcattctgcg gcgtcgtcgg gcacaagccg acgttcgggc tcgtcccgta taccggtgca 660
tttcccatcg agcgaacaat cgaccatctc ggcccgatca cacgcacggt ccacgatgca 720
gcactgatgc tctcggatc cgccggccgc gacggtaacg acccagcca agccgacagt 780
gtcgaagcag gtgactatct gtccaccctc gactccgatg tggacggcct gcgaatcgga 840
atcgttcgag agggattcgg gcacgcggtc tcacagcccg aggtcgacga cgcagtccgc 900
gcagcggcac acagtctgac cgaaatcggg tgcacggtag aggaagtaaa catcccgtgg 960

catctgcatg ctttccacat ctggaacgtg atcgccacgg acggtggtgc ctaccagatg 1020
 ttggacggca acggatacgg catgaacgcc gaaggtttgt acgatccgga actgatggca 1080
 cactttgctt ctcgacgcat tcagcacgcc gacgctctgt ccgaaaccgt caaactggtg 1140
 gccctgaccg gccaccacgg catcaccacc ctcgggcgcg cgagctacgg caaagcccgg 1200
 aacctcgtac cgcttgcccg cgccgcctac gacactgcct tgagacaatt cgacgtcctg 1260
 gtgatgcaa cgctgcccta cgtcgcattc gaattgccgg cgaaggacgt agatcgtgca 1320
 accttcatca ccaaggctct cgggatgacg gccaacacgg caccattcga cgtgaccgga 1380
 catccgtccc tgtccgttcc ggccggcctg gtgaacgggc ttccggtcgg aatgatgacg 1440
 accggcagac acttcgacga tgcgacagtc cttcgtgtcg gacgcgcatt cgaaaagctt 1500
 cgcggcgcgt ttccgacgcc ggccgaacgc gctccaact ctgcaccaca actcagcccc 1560
 gcctag 1566

<210> 3

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for PCR

<400> 3

cgagctcgat ggcgacaatc cgacctg

27

<210> 4

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for PCR

<400> 4

gggtaccctcct aggcggggct gagttg

26

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：100109653

※申請日：100.3.22 ※IPC 分類：

C12P 17/14 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

5-(胺基甲基)-2-氯噻唑的製造方法

METHOD FOR MAKING 5-(AMINOMETHYL)-2-CHLOROTHIAZOLE

二、中文發明摘要：

本發明係提供一種 5-(胺基甲基)-2-氯噻唑的製造方法等，其包含下述步驟：

反應步驟，係對於 N-胺甲醯基胺基化合物，使藉由將聚核苷酸導入微生物細胞內所得之轉形體的培養物或其處理物進行作用之步驟；其中，該聚核苷酸包含編碼具有將 N-胺甲醯基胺基化合物轉換為相對應之 5-(胺基甲基)-2-氯噻唑的能力之酵素之胺基酸序列的鹼基序列。

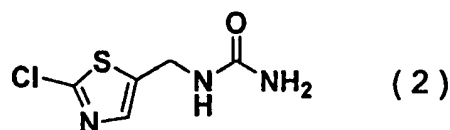
三、英文發明摘要：

This invention provides a method for making 5-(aminomethyl)-2-chlorothiazole, the method including a reaction process for causing an N-carbamoylamino compound to react with a culture of transformant or its treated matter, the transformant being obtained by introducing a polynucleotide in a cell of microorganism, the polynucleotide having a base sequence for coding an amino acid sequence of an enzyme having a capability of transferring the N-carbamoylamino compound to a corresponding 5-(aminomethyl)-2-chlorothiazole.

七、申請專利範圍：

1. 一種 5-(胺基甲基)-2-氯噻唑之製造方法，其包含下述步驟：

反應步驟，係對於如式(2)所示之 N-胺甲醯基胺基化合物，使藉由將聚核苷酸導入微生物細胞內所得之轉形體的培養物或其處理物進行作用之步驟；

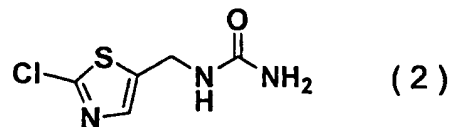


其中，該聚核苷酸包含編碼具有將該 N-胺甲醯基胺基化合物轉換為相對應之 5-(胺基甲基)-2-氯噻唑的能力之酵素之胺基酸序列的鹼基序列。

2. 如申請專利範圍第 1 項所述之製造方法，其中，前述酵素係具有下述任一胺基酸序列之酵素：
 - a) 如序列編號 1 所示的胺基酸序列；
 - b) 一種胺基酸序列，其係與由序列編號 2 所示之鹼基序列所構成之 DNA 在嚴苛條件下進行雜合的 DNA 鹼基序列所編碼之胺基酸序列，且為具有將前述 N-胺甲醯基胺基化合物轉換為相對應之 5-(胺基甲基)-2-氯噻唑的能力之酵素之胺基酸序列；或
 - c) 一種胺基酸序列，其係在序列編號 1 所示的胺基酸序列中缺失、取代或加成 1 個或複數個胺基酸之胺基酸序列，且為具有將前述 N-胺甲醯基胺基化合物轉換為相對應之 5-(胺基甲基)-2-氯噻唑的能力之酵素之胺基

酸序列。

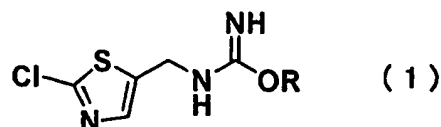
3. 一種藉由將聚核苷酸導入微生物細胞內所成之轉形體的培養物或其處理物的用途，係用於作為將式(2)所示之 N-胺甲醯基胺基化合物轉換為相對應之 5-(胺基甲基)-2-氯噻唑的催化劑；



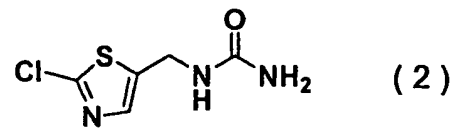
其中，該聚核苷酸包含編碼具有將該 N-胺甲醯基胺基化合物轉換為相對應之 5-(胺基甲基)-2-氯噻唑的能力之酵素之胺基酸序列的鹼基序列。

4. 如申請專利範圍第 3 項所述之用途，其中，前述酵素係具有編碼序列編號 1 所示的胺基酸序列之鹼基序列的酵素。
5. 一種 5-(胺基甲基)-2-氯噻唑之製造方法，其包含下述步驟：

前步驟，係對於式(1)所示之異尿素化合物，使具有將該異尿素化合物轉換為相對應之 N-胺甲醯基胺基化合物的能力之酵素或具有產生該酵素的能力之微生物的培養物或其處理物進行作用，而獲得式(2)所示之 N-胺甲醯基胺基化合物之步驟；



[式中，R 表示直鏈狀或環狀之烷基，該烷基亦可具有取代基，且該烷基之碳原子數為 1 至 6]



以及

反應步驟，係對於前步驟所得之 N-胺甲醯基胺基化合物，使藉由將聚核苷酸導入微生物細胞內所得之轉形體的培養物或其處理物進行作用之步驟；其中，該聚核苷酸包含編碼具有將該 N-胺甲醯基胺基化合物轉換為相對應之 5-(胺基甲基)-2-氯噻唑的能力之酵素之胺基酸序列的鹼基序列。

6. 如申請專利範圍第 5 項所述之製造方法，其中，具有將前述 N-胺甲醯基胺基化合物轉換為相對應之 5-(胺基甲基)-2-氯噻唑的能力之酵素，係具有序列編號 1 所示的胺基酸序列之酵素。

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 () 圖。(本案無圖式)

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：(無)

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

