

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5919192号
(P5919192)

(45) 発行日 平成28年5月18日(2016.5.18)

(24) 登録日 平成28年4月15日(2016.4.15)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 P 13/04 (2006.01)
C 12 N 9/86 (2006.01)
C 12 N 15/00 (2006.01)

C 12 P 13/04
C 12 N 9/86
C 12 N 15/00

請求項の数 17 (全 43 頁)

(21) 出願番号 特願2012-528394 (P2012-528394)
(86) (22) 出願日 平成22年9月15日 (2010.9.15)
(65) 公表番号 特表2013-504313 (P2013-504313A)
(43) 公表日 平成25年2月7日 (2013.2.7)
(86) 國際出願番号 PCT/EP2010/063558
(87) 國際公開番号 WO2011/032990
(87) 國際公開日 平成23年3月24日 (2011.3.24)
審査請求日 平成25年9月12日 (2013.9.12)
(31) 優先権主張番号 09170364.5
(32) 優先日 平成21年9月15日 (2009.9.15)
(33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)
(31) 優先権主張番号 61/245,303
(32) 優先日 平成21年9月24日 (2009.9.24)
(33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 508020155
ビーエーエスエフ ソシエタス・ヨーロピ
ア
B A S F S E
ドイツ連邦共和国 ルートヴィヒスハーフ
エン (番地なし)
D - 6 7 0 5 6 L u d w i g s h a f e
n, G e r m a n y
(74) 代理人 100091096
弁理士 平木 祐輔
(74) 代理人 100118773
弁理士 藤田 節
(74) 代理人 100122389
弁理士 新井 栄一

前置審査

最終頁に続く

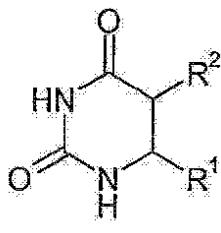
(54) 【発明の名称】 β アミノ酸の調製

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アミノ酸前駆体を生体触媒により生産するための方法であって、該方法は、少なくとも1つの一般式(I)、

【化 1】



10

[式中、R¹ およびR² が、互いに独立して、
水素、

置換されていてもよい、直鎖もしくは分岐鎖低級アルキル基、

置換されていてもよい、直鎖もしくは分岐鎖低級アルケニル基、

置換されていてもよい、環状アルキル基、

置換されていてもよい、単環式もしくは多環式アリール基、

置換されていてもよい、単環式もしくは多環式ヘテロアリール基、

置換されていてもよい、直鎖もしくは分岐鎖アルコキシ基、

20

アミノ基、

置換されていてもよい、直鎖もしくは分岐鎖アルキルアミノ基、

置換されていてもよい、直鎖もしくは分岐鎖アルキルチオ基、

置換されていてもよい、直鎖もしくは分岐鎖アシリル基、

カルボキシル基または

アルデヒド基

から選択される】

で表される基質、

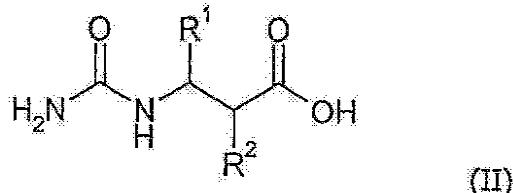
ここで該基質は立体異性として純粋な形態で、または立体異性体の混合物として存在しており、該立体異性として純粋な形態または立体異性体の混合物は塩であってもよい、

10

をヒダントインおよび/またはジヒドロピリミジン環の加水分解を触媒する、少なくとも1つの酵素の存在下で反応させ、

それにより、一般式(II)の アミノ酸前駆体、

【化2】



20

[式中、R¹ およびR² は上記と同一である]

を生成すること、

を含んでなる方法であり、

前記方法に使用される少なくとも1つの酵素が、

(a) ヒダントイナーゼおよび/もしくはジヒドロピリミジナーゼ活性を有し、アズキ (*Vigna angularis*) から得られ、配列番号5および配列番号7のアミノ酸配列の少なくとも1つを含み、SDS-PAGEによる測定で約55kDの分子量を示す酵素であって、「約」という用語は、示された値の±5%の変動を示す、酵素であるか、

または

(b)(a)の酵素に対して1~10アミノ酸の付加、置換、欠失および/もしくは逆位を有し、配列番号5もしくは配列番号7に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、ヒダントイナーゼおよび/もしくはジヒドロピリミジナーゼ活性を有する酵素である

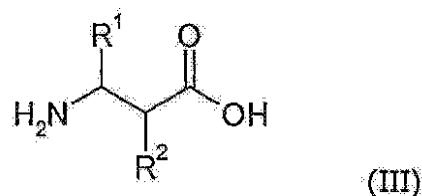
30

ことを特徴とする、前記方法。

【請求項2】

式(II)の前記 アミノ酸前駆体を、対応する式(III)の アミノ酸

【化3】



40

[式中R¹ およびR² は請求項1の記載と同じ意味を有する]

に変換することをさらに含んでなる、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

アミノ酸前駆体の変換が、酸性pHで、またはカルバモイラーゼの存在下で起こる、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

R²がHであり、R¹が置換されていてもよいアリール基である、請求項1~3のいずれか

50

1つに記載の方法。

【請求項 5】

反応がTris緩衝、またはホウ酸緩衝反応混合物中で行われる、請求項1～4のいずれか1つに記載の方法。

【請求項 6】

反応が約7.0から約11.0までのpHで実施され、ここで、「約」という用語は、示された値の±5%の変動を示す、請求項1～5のいずれか1つに記載の方法。

【請求項 7】

反応が、約1%から約20%までのジメチルスルホキシド存在下で実施され、ここで、「約」という用語は、示された値の±5%の変動を示す、請求項1～6のいずれか1つに記載の方法。 10

【請求項 8】

反応が、約30～約60の温度で実施され、ここで、「約」という用語は、示された値の±5%の変動を示す、請求項1～7のいずれか1つに記載の方法。

【請求項 9】

反応が、約1時間から約25時間まで行われ、ここで、「約」という用語は、示された値の±5%の変動を示す、請求項1～8のいずれか1つに記載の方法。

【請求項 10】

少なくとも1つの基質が、5位または6位で一置換されたジヒドロウラシルである、請求項1～9のいずれか1つに記載の方法。 20

【請求項 11】

少なくとも1つの酵素が、配列番号5のアミノ酸配列および配列番号7のアミノ酸配列を含む、請求項1～10のいずれか1つに記載の方法。

【請求項 12】

反応がTris緩衝反応混合物中で行われる、請求項1～11のいずれか1つに記載の方法。
。

【請求項 13】

反応が約7.5から約8.0までのpHで実施され、ここで、「約」という用語は、示された値の±5%の変動を示す、請求項1～12のいずれか1つに記載の方法。

【請求項 14】

反応が、約10%のジメチルスルホキシド存在下で実施され、ここで、「約」という用語は、示された値の±5%の変動を示す、請求項1～13のいずれか1つに記載の方法。 30

【請求項 15】

反応が、約40～約50の温度で実施され、ここで、「約」という用語は、示された値の±5%の変動を示す、請求項1～14のいずれか1つに記載の方法。

【請求項 16】

反応が、約4時間から約5時間まで行われ、ここで、「約」という用語は、示された値の±5%の変動を示す、請求項1～15のいずれか1つに記載の方法。

【請求項 17】

少なくとも1つの基質が、6-フェニルジヒドロウラシル、4-フルオロ-6-フェニルジヒドロウラシル、3-プロモ-6-フェニルジヒドロウラシル、5-メチルジヒドロウラシル、および6-メチルジヒドロウラシルからなる群より選択される、請求項1～16のいずれか1つに記載の方法。 40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、場合により置換されたまたはされていないジヒドロウラシルから、ヒダントイナーゼおよび/またはジヒドロピリミジナーゼを用いて、アミノ酸前駆体を生体触媒により生産するためのプロセス、前記の前駆体からアミノ酸を生産するためのプロセス、アミノ酸前駆体もしくはアミノ酸を生体触媒により生産するための前記プロセスに 50

おけるヒダントイナーゼおよびその使用、ならびに前記ヒダントイナーゼを取得する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

鏡像異性的に純粋な アミノ酸は、広範な生物活性を有する新規治療薬のために重要な構成要素である。これを調製するためにいくつかの生体触媒による経路が開発されているが、広く一般に適用できる単一の方法はまだない。同様に、化学触媒による アミノ酸への経路が少し開発されているが、ほとんどが化学量論的量のキラル補助基を必要とする。

【0003】

ジヒドロピリミジナーゼおよびヒダントイナーゼは、アミノ酸もしくはその前駆体の、生体触媒による合成のための、可能性のある候補である。GaeblerおよびKeltchは、1920年代にヒダントイナーゼの切断活性を最初に報告した (Gaebler, O. H.; Keltch, A. K. On the metabolism of hydantoins and hydantoic acid, 1926; Vol. 70)。1950年代にEadieらによって当初、示唆されたのは、微生物のヒダントイナーゼは動物のジヒドロピリミジナーゼと同じであるということであった (Eadie, G.; Bernheim, F.; Bernheim, M. Journal of Biological Chemistry 181: 449-458, 1949)。仔ウシ肝臓および植物から単離されたジヒドロピリミジナーゼ酵素は、ジヒドロウラシルおよびジヒドロチミンの加水分解を触媒して、それぞれN-カルバモイル- -アラニンおよびN-カルバモイル-2-メチル- -アラニンとした。前記酵素はまた、(R)-5-モノ置換ヒダントインを切断して(R)-N-カルバモイルアミノ酸とした。最近の文献は概して、微生物起源のD-ヒダントイナーゼが動物のジヒドロピリミジナーゼの同等物であると見なしうることを提唱しており、Nonakaおよびその共同研究者らは、これら2つの酵素の間に進化的な関連性を示唆している (Hamajima, N.; Matsuda, K.; Sakata, S.; Tamaki, N.; Sasaki, M.; Nonaka, M. Gene 180:15 7-163, 1996)。Syldatkらは、ジヒドロピリミジナーゼとヒダントイナーゼが必ずしも同じ酵素ではないと結論づけている (Syldatk, C.; May, O.; Altenbuchner, J.; Mattes, R.; Siemann, M. Applied Microbiology and Biotechnology 51:293-309, 1999)。ヒダントイナーゼのエナンチオ選択性の相違は、特異性にしたがってそれらを、D-、L-、もしくは非特異的として分類するのによく用いられる (Ogawa, J.; Shimizu, S. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 2:163-176, 1997)。

【0004】

ヒダントイナーゼおよびジヒドロピリミジナーゼ酵素について使用される命名システムに起因する問題は、特に初期の学術雑誌においてその用語が互いに区別されずに使用されたという事実によってさらに深刻化する。アミドヒドロラーゼは、環状アミダーゼとも呼ばれ [E.C.3.5.2]、15個以上の酵素からなる一群であるが、これらの酵素はいずれも環状アミド環に作用し、多くの高度に保存された領域、および不变のアミノ酸領域を有している (Kim, G. J.; Cheon, Y. H.; Kim, H. S. Biotechnology and Bioengineering 1998, 61, 1-13)。この酵素群にはカルボキシメチルヒダントイナーゼ [E.C.3.5.2.4]、アラントイナーゼ [E.C.3.5.2.5]、1-メチルヒダントイナーゼ [E.C.3.5.2.14]、およびカルボキシエチルヒダントイナーゼが含まれるが、これらはいずれも、基質が天然に存在するヒダントイン誘導体であるので、科学的にはただ1つのヒダントイナーゼである。

【0005】

環状アミダーゼのより広範な分類に入る他の酵素には、ジヒドロオロターゼ [E.C.3.5.2.3] およびジヒドロピリミジナーゼ [E.C.3.5.2.2] があるが、後者は(R)-5-モノ置換ヒダントイン誘導体を加水分解する能力から、通常D-ヒダントイナーゼと称される。このスーパーファミリーのタンパク質は、N-カルバモイルアミノ酸が前生物的ペプチドの最初のシントンであったと仮定すると、おそらく有史以前の地球において進化したのであろう。

【0006】

5-置換ヒダントイン(R)-1および(S)-1のラセミ混合物を、それに対応するN-カルバモイル誘導体(R)-2および(S)-2へと、エナンチオ選択性的に加水分解するためのヒダントイナーゼ

10

20

30

40

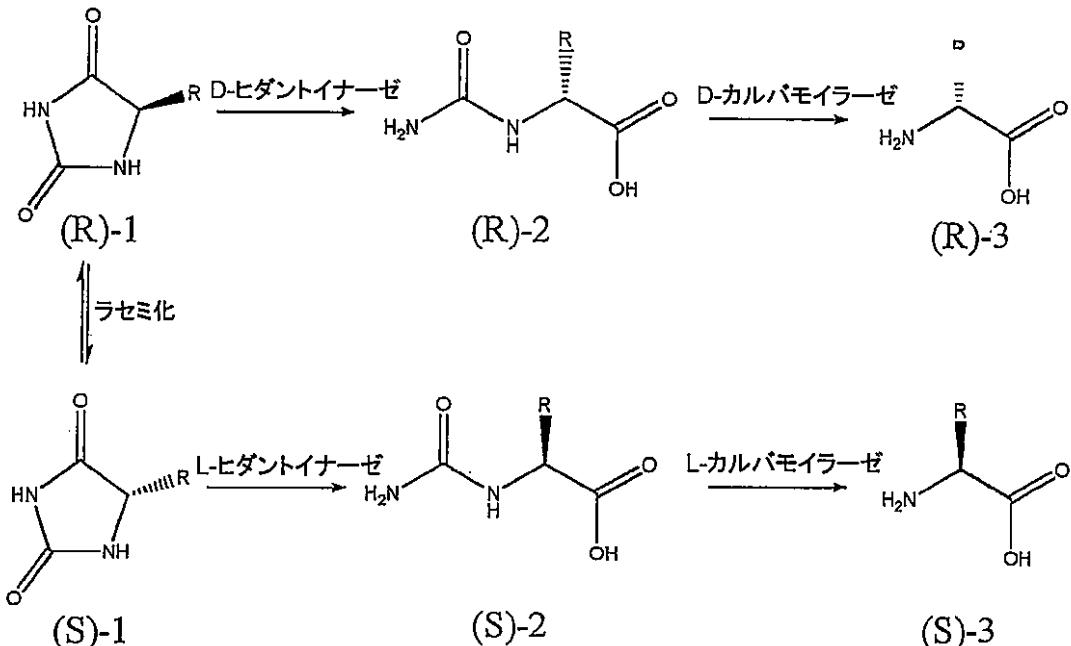
50

ゼの使用は、十分に確立されており（下記スキーム1参照）、文献に記載されている（Morin, Enzyme Microb. Technol. 15:208-214, 1993; Fan and Lee, Biochemical Engineering J. 8:157-164, 2001; Arcuri et al., J. Molecular Catalysis B 21:107-111, 2003; Arcuri et al., Amino Acids 19:477-482, 2000）。それは、この技術を用いて特定のD-(R)-アミノ酸(R)-3を生産するためのスケールで工業的プロセスが稼働するような段階に達している。これらのプロセスの重要な態様は、エナンチオマー(S)-1のin situラセミ化、ならびにカルバモイル化により触媒される(R)-2の加水分解であって、これは動的速度論的光学分割（DKR）反応をもたらす。

【0007】

(スキーム1)

【化1】



【0008】

酵素が一方のエナンチオマーをもう一方より早く反応回転させる場合、速度論的光学分割が生じる。しかしながら、このタイプの反応の最大収率は50%にすぎず、生成物を出発材料から分離する必要がある。動的速度論的光学分割において、エナンチオマーはラセミ化して、(R)-および(S)-エナンチオマーが化学平衡をなしており、容易に相互転換する。速く反応するエナンチオマーが対応する生成物に変換されると、ラセミ化によってそのエナンチオマーが補充されるので、最大100%までの収率が可能となる。

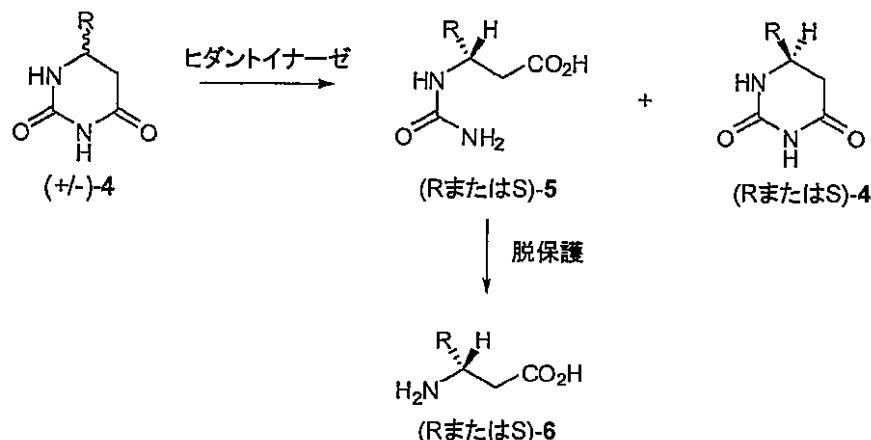
【0009】

ラセミ体5-置換ヒドントインのエナンチオ選択性加水分解とは対照的に、アミノ酸(RもしくはS)-6への経路として、6-置換ジヒドロウラシル(+/-)-4（スキーム2参照）の、対応するN-カルバモイル誘導体（RもしくはS）-5へのエナンチオ選択性加水分解を実行する可能性は、ほとんどまったく注目されなかった。Syldatkらは、1998年に（May, O.; Siemann, M.; Pietzsch, M.; Kiess, M.; Mattes, R.; Syldatk, C. J. Biotechnol. 61:1-13, 1998）、ジヒドロウラシル（(+/-)-4、このRはHを表す）の加水分解のためのArthrobacter aurescens由来ヒドントイナーゼの使用を報告し、その後2003年には、ポスターにおいて、5-フェニルヒドントイン（(R)-1および(S)-1、それぞれRはスキーム1においてPhを表す）と比べてエナンチオ選択性は弱く反応速度は低いことが認められたものの、このヒドントイナーゼを6-フェニルジヒドロウラシル（6-PDHU、(+/-)-4、ここではRはフェニルを表す）の分割に適用できることを記載した。

【0010】

(スキーム2)

【化2】



【0011】

日本特許出願JP06261787は、*Pseudomonas putida* IFO 12996を用いた6-PDHUの加水分解について最大51%の鏡像体過剰率を報告した；6-アルキル置換基を有する基質について、よりよい選択性（最大93%の鏡像体過剰）が得られた。アミノ酸前駆体もしくはアミノ酸を生体触媒により生産するための改良法が必要であるのは明白である。

【先行技術文献】

【特許文献】20

【0012】

【特許文献1】日本特許出願JP06261787

【非特許文献】

【0013】

【非特許文献1】Gaebler, O. H.; Kelch, A. K. On the metabolism of hydantoins and hydantoic acid, 1926; Vol. 70

【非特許文献2】Eadie, G.; Bernheim, F.; Bernheim, M. Journal of Biological Chemistry 181: 449-458, 1949

【非特許文献3】Hamajima, N.; Matsuda, K.; Sakata, S.; Tamaki, N.; Sasaki, M.; Nonaka, M. Gene 180:157-163, 199630

【非特許文献4】Syldatk, C.; May, O.; Altenbuchner, J.; Mattes, R.; Siemann, M. Applied Microbiology and Biotechnology 51:293-309, 1999

【非特許文献5】Ogawa, J.; Shimizu, S. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 2:163-176, 1997

【非特許文献6】Kim, G. J.; Cheon, Y. H.; Kim, H. S. Biotechnology and Bioengineering 1998, 61, 1-13

【非特許文献7】Morin, Enzyme Microb. Technol. 15:208-214, 1993; Fan and Lee, Biotechnical Engineering J. 8:157-164, 2001;

【非特許文献8】Arcuri et al., J. Molecular Catalysis B 21:107-111, 2003;

【非特許文献9】Arcuri et al., Amino Acids 19:477-482, 200040

【非特許文献10】May, O.; Siemann, M.; Pietzsch, M.; Kiess, M.; Mattes, R.; Syldatk, C. J. Biotechnol. 61:1-13, 1998

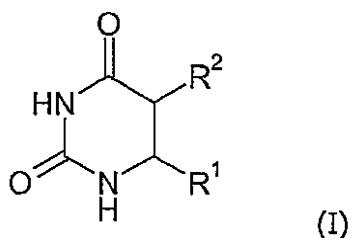
【発明の概要】

【0014】

(発明の簡単な説明)

第1の態様において、本発明の目的は、アミノ酸前駆体を、生体触媒によって立体特異的に、より詳細にはエナンチオ選択性的に生産するためのプロセスによって解決されたが、該プロセスは、少なくとも1つの一般式(1)

【化3】



【0015】

[式中、R¹ およびR² は、互いに独立して、水素；

10

置換されていてもよい、直鎖もしくは分岐鎖低級アルキル基；

置換されていてもよい、直鎖もしくは分岐鎖低級アルケニル基；

置換されていてもよい、環状アルキル基；

置換されていてもよい、単環式もしくは多環式アリール基；

置換されていてもよい、単環式もしくは多環式ヘテロアリール基；

置換されていてもよい、直鎖もしくは分岐鎖アルコキシ基；

アミノ基；

置換されていてもよい、直鎖もしくは分岐鎖アルキルアミノ基；

置換されていてもよい、直鎖もしくは分岐鎖アルキルチオ基；

置換されていてもよい、直鎖もしくは分岐鎖アシリル基；

20

カルボキシル基または

アルデヒド基

から選択される]

で表される基質であって、

立体異性として純粋な形態、たとえば(R)-もしくは(S)-異性体、または立体異性体の混合物、たとえばラセミ混合物、

または前記化合物の塩、たとえば酸付加塩；

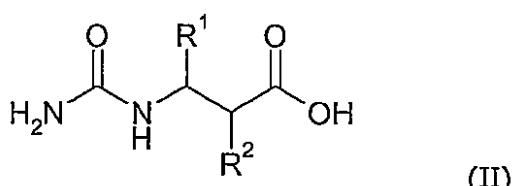
の形態をとる前記基質を、

ヒダントインおよび/またはジヒドロピリミジン環の加水分解を触媒する、少なくとも1つの酵素、具体的にはヒダントイナーゼおよびジヒドロピリミジナーゼから選択されるが、より詳細にはヒダントイナーゼであって、特に、変換すべき化合物の特定の異性体に優先傾向を有する酵素の存在下で；ならびに、必要に応じて、一般式(I)の前記化合物の立体異性体を相互転換する能力をもつ少なくとも1つの酵素の存在下で、反応させ、

30

その結果、一般式(II)の アミノ酸前駆体

【化4】



40

【0016】

[式中、R¹ およびR² は上記と同一である]

を生成すること；

を含んでなるプロセスであって、

前記プロセスは、ヒダントインおよび/またはジヒドロピリミジン環の加水分解を触媒する少なくとも1つの酵素、具体的にはヒダントイナーゼおよび/またはジヒドロピリミジナーゼが、アズキ (*Vigna angularis*) から得られること、および/または、下記の部分配列の少なくとも1つに対して約60から100%の同一性を有する、少なくとも1つの部分配列を含有すること、

IELGITGPEGQRLAGPTVL (配列番号1)
 IELGITGPEGQRLAGPVL (配列番号2)
 IELITGPEGQRLAGPTVL (配列番号3)
 IELITGPEGQRLAGPVL (配列番号4)
 EEIARARKSGQRVIGEPVAS (配列番号5)、

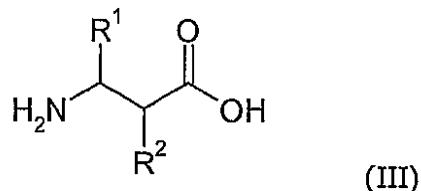
たとえば、配列番号5および7の部分配列の少なくとも1つに対して60%から100%までの同一性を有する、少なくとも1つの部分配列を含有することを特徴とする。

【0017】

ある実施形態によれば、プロセスはさらに、式(2)の前記 アミノ酸前駆体を、対応する式(III)の アミノ酸に変換することによる追加のステップを含んでいるが、

10

【化5】



【0018】

[式中、R¹ およびR² は、前記と同じ意味を有する]。

【0019】

20

他の実施形態によると、アミノ酸前駆体の変換は、酸性pHで、好ましくは亜硝酸の存在下で、またはカルバモイラーゼの存在下で起こる。

【0020】

他の実施形態によれば、少なくとも1つのヒダントイナーゼおよび/またはジヒドロピリミジナーゼ（特にE.C.3.5.2.2の酵素）は、アグロバクテリウム（Agrobacterium）、アルスロバクター（Arthrobacter）、シュードモナス（Pseudomonas）およびササゲ（Vigna）属の生物、特にアズキ（Vigna angularis）から得られる酵素である。

【0021】

他の態様によると、一般式(I)から(III)において、R²はHであり、R¹はHとは異なる。

【0022】

30

他の態様によれば、一般式(I)から(III)において、R²はHであり、R¹は、置換されてもよいアリール基である。

【0023】

特に、式(II)および(III)の化合物、ならびに式(I)の化合物も、R²はHであるだけであるが、R¹はHとは異なるので、(S)異性体として、立体異性の純粋な形態で、または立体異性体過剰（具体的には93%より高い、好ましくは95-99%の範囲内の、または99%を越えるee値を有する）の状態で存在することが好ましい。

【0024】

他の実施形態によれば、反応は、Trisバッファーまたはホウ酸バッファーで緩衝化された反応混合物中で実施されるが、Tris緩衝反応混合物が好ましい。

40

【0025】

他の実施形態によれば、反応は約7.0から約11.0までのpHで実施されるが、好ましくは約7.5から約10.0までのpHであり、約7.5から約8.0までのpHが特に好ましい。

【0026】

他の実施形態によると、反応は約1%から約20%までのジメチルスルホキシドの存在下で実施されるが、好ましくは約10% ジメチルスルホキシド存在下で行われる。

【0027】

他の実施形態によれば、反応は、約30 ~ 約60 の範囲の温度で、好ましくは約30 ~ 約50 、特に約40 ~ 約50 の範囲の温度で実施される。

【0028】

50

他の実施例によれば、反応は約1時間から約25時間まで実施されるが、好ましくは約3時間から約10時間まで、特に約4時間から約5時間まで実施される。

【 0 0 2 9 】

他の実施形態によると、少なくとも1つの基質は、5位または6位で一置換されたジヒドロウラシル、特に、6-フェニルジヒドロウラシル、6-(4-フルオロフェニル)-ジヒドロウラシル、6-(4-クロロフェニル)-ジヒドロウラシル、5-メチルジヒドロウラシル、および6-メチルジヒドロウラシルの中から選択される。

【 0 0 3 0 】

本発明のもう一つの態様は、加水分解に対して安定なペプチドである医薬活性薬剤、特に、抗生物質、抗がん薬、抗血栓薬、抗真菌薬、殺虫剤、駆虫薬、非ペプチド性インテグリンアンタゴニスト、アルカロイドおよび/または細胞毒性薬を製造するために、本発明のプロセスにより得られる アミノ酸前駆体または アミノ酸を使用することに関する。 10

【 0 0 3 1 】

本発明のもう一つの態様は、下記の部分配列の少なくとも1つ：

ITGPEGQRLAGP	(配列番号7)
IELGITGPEGQRLAGPTVL	(配列番号1)
IELGITGPEGQRLAGPVL	(配列番号2)
IELITGPEGQRLAGPTVL	(配列番号3)
IELITGPEGQRLAGPVL	(配列番号4)
EEIARARKSGQRVIGEPVAS	(配列番号5)、

20

たとえば、配列番号5および7の部分配列の少なくとも1つ、
に対して60パーセントから100パーセントの同一性を有する、少なくとも1つの部分配列を
含有するヒダントイナーゼおよび/またはジヒドロピリミジナーゼを、本発明のプロセス
のために使用することに関する。

【 0 0 3 2 】

本発明のもう一つの態様は、下記の部分配列の少なくとも1つ：

ITGPEGQRLAGP	(配列番号7)
IELGITGPEGQRLAGPTVL	(配列番号1)
IELGITGPEGQRLAGPVL	(配列番号2)
IELITGPEGQRLAGPTVL	(配列番号3)
IELITGPEGQRLAGPVL	(配列番号4)
EEIARARKSGQRVIGEPVAS	(配列番号5)、

30

たとえば、配列番号5および7の部分配列の少なくとも1つ、
に対して60パーセントから100パーセント、たとえば100パーセント、の同一性を有する少
なくとも1つの部分配列を含めて、上記部分配列の少なくとも1つを含有する、実質的に純
粋なヒダントイナーゼに関する。

【 0 0 3 3 】

本発明のもう一つの態様は、実質的に純粋なヒダントイナーゼに関するが、このヒダン
トイナーゼは、前記酵素活性を自然に発現する、または組換えによって発現する生物から
、細胞物質の粗抽出物を用意すること、ならびに前記粗抽出物を下記の連続精製ステップ
に供することによって得られる： 40

- a) イオン交換クロマトグラフィー
- b) 疎水性クロマトグラフィー
- c) ゲル濾過
- d) アフィニティクロマトグラフィー
- e) 陰イオン交換
- f) ゲル濾過。

【 0 0 3 4 】

本発明のもう一つの態様は、実質的に純粋なヒダントイナーゼに関するが、このヒダン
トイナーゼは、配列番号1から5、および7の少なくとも1つを含んでなり、ならびに/また 50

は前記方法に従って単離される。好ましくは、このヒダントイナーゼは、アグロバクテリウム (*Agrobacterium*) 属、アルスロバクター (*Arthrobacter*) 属、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属およびササゲ (*Vigna*) 属の生物、特にアズキ (*Vigna angularis*) から得られる。

【0035】

もう一つの態様は、ヒダントイナーゼに関するものであって、このヒダントイナーゼは、配列番号1から5、および7の少なくとも1つを含んでなり、特に上記精製ステップを任意の順序で実質的に含んでなる方法によって、アズキ (*Vigna angularis*) から得られ、前記方法に従って単離されて、特に還元条件下でSDS-PAGE後にタンパク質バンドを、 55 ± 10 、 55 ± 5 もしくは 55 ± 2 、または約55 kDに示す。

10

【0036】

本発明のもう一つの態様は、本発明にしたがって アミノ酸前駆体または アミノ酸を生体触媒により生産するプロセスのために、前記ヒダントイナーゼを使用することに関する。

【0037】

前記ヒダントイナーゼは、具体的には、アグロバクテリウム (*Agrobacterium*) 属、アルスロバクター (*Arthrobacter*) 属、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属およびササゲ (*Vigna*) 属の生物、特にアズキ (*Vigna angularis*) 由来のヒダントイナーゼとすることができる。

【0038】

20

本発明のもう一つの態様は、前記ヒダントイナーゼのうち任意のものを本発明の方法のために使用することに関する。

【図面の簡単な説明】

【0039】

下記において本発明はより詳細に説明され、ここに図に言及することができる。

【図1】アズキ (*Vigna angularis*) から精製されたヒダントイナーゼのSDS-PAGEゲルを示す。

【図2】ラセミ体6-置換ジヒドロウラシルを合成するための2つの方法例を示す。

【図3】陰イオン交換クロマトグラフィー (DEAEカラム) によるN-カルバモイル- -フェニルアラニン (NCBPA)、6-フェニルジヒドロウラシル (6-PDHU)、および酵素の分離を示す。

30

【図4】ヒダントイナーゼが6-PDHUの加水分解を触媒した後の逆相キラルHPLCの結果を示す。

【図5】6-PDHUのN-カルバモイル誘導体 (NCBPA) への経時的変換率、およびそれぞれの鏡像体過剰率を示す。

【図6】ヒダントイナーゼ存在下もしくは非存在下での、N-カルバモイル- -フェニルアラニンの環化を示す。

【図7】ヒダントイナーゼなしのTrisバッファー中における6-DPHUの化学的加水分解のpH依存性を示す。

【図8】6-DPHUのヒダントイナーゼによる酵素的変換のpH依存性を示す。

40

【図9】さまざまなpH値/バッファーの組み合わせにおける、ヒダントイナーゼの経時的変換率を示す。

【図10】アズキ (*Vigna angularis*) 由来D-ヒダントイナーゼ (Sigma) により触媒される反応を示す。

【図11】ヒダントイナーゼが触媒する6-PDHUの変換に及ぼす、有機共溶媒の影響を示す。

【図12】生成物の形成および鏡像体過剰率に及ぼす、さまざまなヒダントイナーゼ濃度の影響を示す。

【図13】25 mL反応液中のNCBPAの生産を示す。

【図14】25 mL反応液中のS-NCBPAの鏡像体過剰率を示す。

50

【発明を実施するための形態】

【0040】

(発明の詳細な説明)

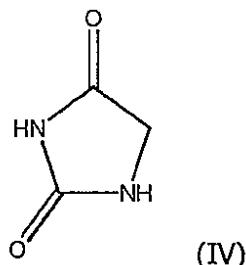
A. 定義

本発明の文脈において、置換されたヒダントインおよび/または置換されたジヒドロピリミジン環、たとえば5-フェニルヒダントインおよび6-フェニルジヒドロウラシルのような「ヒダントインおよび/またはジヒドロピリミジン環の加水分解を触媒する酵素」は、少なくとも1つの式(I)の化合物の加水分解を触媒して式(II)の化合物を生成する能力を示す必要がある。具体的には、このような酵素は、ヒダントイナーゼおよび/またはジヒドロピリミジナーゼと呼ばれることがあるが、天然基質がヒダントイン環である酵素はヒダントイナーゼと呼ばれるのが好ましく、天然基質がジヒドロウラシル環である酵素は、ジヒドロピリミジナーゼと称されるのが好ましいであろう。

【0041】

本発明の文脈において、ジヒドロピリミジナーゼは、ジヒドロピリミジン環を加水分解する能力を有し、加えて(式IVに示すように)ヒダントインを加水分解する能力、ならびにスキーム3に示すように(±)-5-モノ置換ヒダントインを分割する能力を有する酵素として特徴付けられる。

【化6】



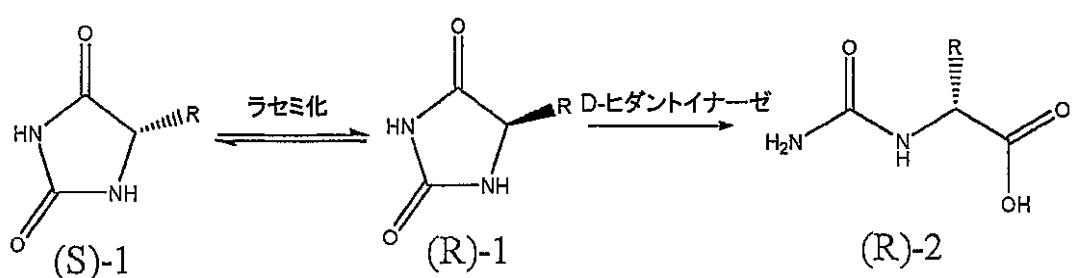
10

20

【0042】

スキーム3

【化7】



【0043】

一方、ヒダントイナーゼは概して、ジヒドロピリミジンに対してほとんど加水分解活性を示さないが、ヒダントインおよび(±)-5-モノ置換ヒダントインを加水分解することができる。ヒダントインまたはジヒドロピリミジンを加水分解するのに適したアッセイ、したがって本発明のプロセスに適用可能な酵素をさらに明らかにするのに適したアッセイは、たとえば実施例1で説明する。

40

【0044】

「約」という用語は、示された値について±25%変動する可能性、具体的には±15%、±10%、±5%もしくは±4%もしくは±3%もしくは±2%もしくは±1%変動する可能性を示す。

【0045】

本発明の文脈において、エナンチオ選択性は、Sエナンチオマーの鏡像体過剰率"ee"が、少なくとも50%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%であり、

50

具体的には93%を上回り、特に少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%であることを意味するが、前記鏡像体過剰率はパーセント(%)単位で表され、SエナンチオマーおよびRエナンチオマーのそれぞれの濃度に基づいて次のように計算される：

$$ee (\%) = [(S\text{エナンチオマー} - R\text{エナンチオマー}) / (S\text{エナンチオマー} + R\text{エナンチオマー})] \times 100.$$

【0046】

本明細書で使用される場合、「実質的に純粋な」タンパク質もしくは酵素とは、望ましい精製タンパク質が、ポリアクリルアミド-ドデシル硫酸ナトリウム ゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 後に単一バンドで証明される通り、基本的に夾雜細胞成分を含まない（たとえば、（乾重量の）90、92、93、94、95、96、97、98、99、または99.9%が前記タンパク質に相当する）ことを意味する。さらに「実質的に純粋」という表現は、当業者に使用される1つもしくは複数の、純度もしくは均一性の特徴に基づいて均一である、分子を説明するものである。たとえば、実質的に純粋なタンパク質は、次のようなパラメーターについて標準的な実験の逸脱の範囲内で、一定かつ再現性のある特性を示すものである：分子量、クロマトグラフィー移動、アミノ酸組成、アミノ酸配列、N末端ブロックもしくは非プロック、HPLC溶出プロフィール、生物活性、およびその他のパラメーター。しかしながら、この表現は、前記タンパク質と他の化合物との人工的もしくは合成の混合物を排除するものではない。加えて、この表現は、必要に応じて組換え宿主から単離される、前記タンパク質の融合タンパク質を排除するものではない。

【0047】

B. 本発明の方法のための基質

一般式(I)の基質の残基R¹および/またはR²は、直鎖もしくは分岐鎖低級アルキル基から選択することができるが、これは一箇所もしくは複数箇所で置換されていてもよい。残基R¹およびR²は、具体的には、1から10炭素原子、特に2から6炭素原子を含有する直鎖もしくは分岐アルキル基、たとえば、メチル基、エチル基、i-もしくはn-プロピル基、sec-もしくはtert-ブチル基、n-ペンチル基、2-メチルブチル基、n-ヘキシリル基、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基からなる基とすることができます。分岐アルキル基の例には、イソプロピル、イソブチル、イソペンチル、2,2-ジメチルプロピル、イソヘキシリル、3-メチルペンチル、2,2-ジメチルブチル、2,3-ジメチルブチル、イソヘブチル、2-エチルブチル、3-メチルヘキシリル、2,2-ジメチルペンチル、2,3-ジメチルペンチル、2,4-ジメチルペンチル、2,2,3-トリメチルブチル、イソオクチル、3-メチルヘブチル、4-メチルヘブチル、2,2-ジメチルヘキシリル、2,4-ジメチルヘキシリル、2,5-ジメチルヘキシリル、2,2,3-トリメチルペンチル、2,2,4-トリメチルペンチル、2,2,5-トリメチルペンチル、およびイソノニル基がある。

【0048】

一般式(I)の基質の残基R¹および/またはR²はさらに、直鎖もしくは分岐鎖低級アルケニル基から選択することができるが、これは一箇所もしくは複数箇所で置換されていてもよい。例として、低級アルキル基の不飽和アナログがあるが、これは1つもしくは複数の炭素-炭素二重結合を炭素鎖の任意の可能な位置に含んでいる。例を挙げると、ビニル基、アリル基 (2-プロペニル)、ブタ-1-エニル基、cis-ブタ-2-エニル基、trans-ブタ-2-エニル基、ペンタ-1-エニル基、cis-ペンタ-2-エニル基、trans-ペンタ-2-エニル基、2-メチルブタ-1-エニル基、2-メチルブタ-2-エニル基、3-メチルブタ-1-エニル基、ヘキサ-1-エニル基、ヘキサ-2-エニル基 (cis-異性体、trans異性体とも)、ヘキサ-3-エニル基、2-メチルペンタ-1-エニル基、2-メチルペンタ-2-エニル基、3-メチルペンタ-2-エニル基、4-メチルペンタ-1-エニル基、4-メチルペンタ-2-エニル基、2-エチルブタ-1-エニル基、2,3-ジメチルブタ-1-エニル基、2,3-ジメチルブタ-2-エニル基、3,3-ジメチルブタ-1-エニル基である。

【0049】

一般式(I)の基質の残基R¹および/またはR²はさらに、環状アルキル基から選択すること

10

20

30

40

50

ができるが、これは、環状炭素骨格を有する化合物、具体的には3から10炭素原子からなる環状炭素骨格を有する化合物、すなわちシクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、シクロノニルを含んでいる。さらに、環状アルキル基の単不飽和もしくは多不飽和アナログ、たとえば、シクロブテニル基、シクロペンテニル基、シクロペンタジエニル基、シクロヘキセニル基、シクロヘブテニル基、シクロヘキサジエニル基、およびシクロヘプタジエニル基が含まれる。環状アルキル基、またはその単不飽和もしくは多不飽和アナログは、一箇所もしくは複数箇所で置換されていてもよい。一般式(I)の基質の残基R¹および/またはR²はさらに、単環式もしくは多環式アリール基から選択することができるが、これは一箇所もしくは複数箇所で置換されていてもよい。アリール基の例としては、単環式もしくは多環式（特に二環式）芳香族基、具体的には、環の任意の炭素原子を介して結合されるフェニル基もしくはナフチル基、たとえば1-ナフチルおよび2-ナフチルがある。

【0050】

一般式(I)の基質の残基R¹および/またはR²はさらに、単環式もしくは多環式ヘテロアリール基から選択することができるが、これは一箇所もしくは複数箇所で置換されていてもよい。たとえば、ヘテロアリール基は、ピロリジン、テトラヒドロフラン、テトラヒドロチオフェン、ピペリジン、テトラヒドロピラン、テトラヒドロチオピラン、ピリニド、モルホリン、ピロール、フラン、チオフェン、ピラゾール、イミダゾール、オキサゾール、チオアゾール、ピラン、ピリミジン、ピリダジン、およびピラジンから誘導することができる。二環式の基の例は、前記アリール基もしくはヘテロアリール基またはそれらの各誘導体と、追加のアリール基、ヘテロアリール基またはそれらの誘導体との縮合物、たとえば、クマロール、インドール、キノリン、プリンおよびナフタレンから誘導される基である。単環式もしくは多環式ヘテロアリール基は一箇所もしくは複数箇所で置換されていてもよく、任意の環員原子、好ましくは環員炭素原子を介して一般式(I)のそれぞれの炭素原子に結合することができる。適当な基の例には、2-チエニル基、3-チエニル基、2-フラニル基、3-フラニル基、2-ピリジル基、3-ピリジル基、4-ピリジル基、2-チアゾリル基、4-チアゾリル基、5-チアゾリル基、4-メチル-2-チエニル基、3-エチル-2-チエニル基、2-メチル-3-チエニル基、4-プロピル-3-チエニル基、5-n-ブチル-2-チエニル基、4-メチル-3-チエニル基、3-メチル-2-チエニル基、3-クロロ-2-チエニル基、4-ブロモ-3-チエニル基、2-ヨード-3-チエニル基、5-ヨード-3-チエニル基、4-フルオロ-2-チエニル基、2-ブロモ-3-チエニル基、および4-クロロ-2-チエニル基がある。

【0051】

一般式(I)の基質の残基R¹および/またはR²はさらに、直鎖もしくは分岐アルコキシ基から選択することができるが、これは一箇所もしくは複数箇所で置換されていてもよい。この場合、一般式(I)の化合物は、前記定義のいずれかによる基と、酸素原子を介して連結されており、こうした基は、たとえば、直鎖もしくは分岐鎖の、置換されていてもよい低級アルキル基；直鎖もしくは分岐鎖の、置換されていてもよい低級アルケニル基；置換されていてもよい環状アルキル基；単環式もしくは多環式の、置換されていてもよいアリール基（アリールオキシ基とも称される）；または単環式もしくは多環式の、置換されていてもよいヘテロアリール基である。アルコキシ基の例は、メトキシ基 (-O-CH₃)、エトキシ基 (-O-C₂H₅) および一般式 -O-C_nH_{2n+1} の基であって、このnは、好ましくは1から10までの整数である。

【0052】

一般式(I)の基質の残基R¹および/またはR²はさらに、アミノ基および直鎖もしくは分岐アルキルアミノ基から選択することができるが、これらは一箇所もしくは複数箇所で置換されていてもよい。この場合、一般式(I)の化合物は、窒素原子を介して連結されるが、この窒素原子はそれ自体2つの水素原子（一级アミン、アミノ基）、1つの水素および1つの有機残基（二级アミン、-NHR¹）、または2つの有機残基（三级アミン、-NR¹R²）と結合しており、この有機残基R¹およびR²は互いに独立して、前記定義による任意の基、たとえば、直鎖もしくは分岐鎖の、置換されていてもよい低級アルキル基；直鎖もしくは分岐

10

20

30

40

50

鎖の、置換されていてもよい低級アルケニル基；置換されていてもよい環状アルキル基；単環式もしくは多環式の、置換されていてもよいアリール基；および単環式もしくは多環式の、置換されていてもよいヘテロアリール基から選択することができる。アミノ基の例は、一級アミノ基(-NH₂)である。二級アミノ基の例は、メチルアミノ基(-NH-CH₃)、エチルアミノ基(-NH-C₂H₅)、および一般式-NH-C_nH_{2n+1}の基であるが、このnは1から10までの整数であることが好ましい。三級アミノ基の例は、ジメチルアミノ基(-N(CH₃)₂)、ジエチルアミノ基(-N(CH₂CH₃)₂)、ジプロピルアミノ基(-N(CH₂CH₂CH₃)₂)、ジブチルアミノ基(-N(CH₂CH₂CH₂CH₃)₂)、メチルエチルアミノ基、メチルプロピルアミノ基などである。

【0053】

一般式(I)の基質の残基R¹および/またはR²はさらに、直鎖もしくは分岐アルキルチオ基から選択することができるが、これは一箇所もしくは複数箇所で置換されていてもよい。この場合、一般式(I)の化合物は、硫黄原子を介して前記定義のいずれかによる基と連結されており、こうした基はたとえば、直鎖もしくは分岐鎖の、置換されていてもよい低級アルキル基；直鎖もしくは分岐鎖の、置換されていてもよい低級アルケニル基；置換されていてもよい環状アルキル基；単環式もしくは多環式の、置換されていてもよいアリール基(チオアリール基とも称される)；または単環式もしくは多環式の、置換されていてもよいヘテロアリール基である。アルキルチオ基の例は、チオメチル基(-S-CH₃)、チオエチル基(-S-C₂H₅)および一般式-S-C_nH_{2n+1}の基であって、このnは、好ましくは1から10までの整数である。

【0054】

一般式(I)の基質の残基R¹および/またはR²はさらに、直鎖もしくは分岐アシル基から選択することができるが、これは一箇所もしくは複数箇所で置換されていてもよい。アシル基は一般式-C-C(O)-Rを有し、このRは、本明細書に記載のアルキル基、アリール基、またはヘテロアリール基とすることができます。Rが水素またはOHである場合、-C(O)-Rはそれぞれアルデヒド基またはカルボキシル基となる。

【0055】

前記の基は一箇所もしくは複数箇所で適宜置換されていてもよい。炭素原子についた水素原子は、たとえば互いに独立して、他の炭素化合物、たとえば、直鎖もしくは分岐鎖の低級アルキルもしくはアルケニル基、環状アルキル基、アリールまたはヘテロアリール基；ハロゲン、たとえばフッ素、塩素、臭素およびヨウ素；またはヘテロ原子もしくはヘテロ原子含有化合物で置換されていてもよい。ヘテロ原子含有化合物の例は、-OH、-SH、-NO₂、-NH₂、-SO₃、-SO₄基、アルコキシ基およびNR³R⁴であるが、ここでR³およびR⁴は互いに独立してH、メチル基またはエチル基を表す。

【0056】

本発明の方法の特定の実施形態において、R²はHである。さらに好ましい実施形態において、R²はHであり、R¹は付随してH、メチル基、置換されていてもよいアリール基、特に置換されていてもよい単環式アリール基から選択される。好ましい例は、フェニル基、一置換もしくは多置換フェニル基であって、その置換基は相互に独立して、たとえば、ハロゲン、メチル、エチル、-OH、-NH₂、-NO₂および-SO₃Hから選択することができる。置換されたフェニル基は、たとえば、2-F-C₆H₄、3-F-C₆H₄、4-F-C₆H₄、2-Cl-C₆H₄、3-Cl-C₆H₄、4-Cl-C₆H₄、2,3-F-C₆H₃、2,4-F-C₆H₃、2,5-F-C₆H₃、2,3-Cl-C₆H₃、2,4-Cl-C₆H₃、2,5-Cl-C₆H₃などとすることができます。

【0057】

さらに特定の実施形態において、R²はHであり、R¹は、H、-CH₃、-CH₂CH₂CH₂NH-C(NH)NH₂、-CH₂CONH₂、-CH₂COOH、-CH₂SH、-CH₂CH₂CONH₂、-CH₂CH₂COOH、-CH₂(C₃H₃N₂)、このC₃H₃N₂はイミダゾール基を表す、-CH(CH₃)CH₂CH₃、-CH₂CH(CH₃)₂、-CH₂CH₂CH₂NH₂、-CH₂CH₂SCH₃、-CH₂(C₆H₅)、-CH₂OH、-CH(OH)CH₃、-CH₂(C₈H₆N)、このC₈H₆Nはインドール残基を表す、-CH₂(C₆H₄)OH、-CH(CH₃)₂、-CH₂-SeH、-CH₂-CH₂-SeCH₃(セレノメチオニン)、-(C₆H₅)、p-F-C₆H₄、およびp-Cl-C₆H₄からなる一群から選択される。

【0058】

10

20

30

40

50

C. プロセス条件

アミノ酸前駆体を生産するための方法に際して存在する、ヒダントイナーゼおよびジヒドロピリミジナーゼから選択された、少なくとも1つの酵素は、その酵素（1つもしくは複数）を自然に產生する、または組換え生産する、生きた細胞中に存在していてもよく、収集された細胞、死んだ細胞、透過性細胞、細胞粗抽出物、精製抽出物中に、または基本的に純粋な形態で、もしくは完全に純粋な形態で存在することもできる。少なくとも1つの酵素は、溶液中に存在していてもよく、担体上に固定化された酵素であってもよい。1つもしくは複数の酵素は、同時に可溶型および固定化型として存在してもよい。

【0059】

本発明の方法は、当業者に知られている通常の反応器内で、さまざまな規模、たとえば実験室規模（数ミリリットルから数十リットルまでの反応容積）から工業規模（数リットルから数千立方メートルまでの反応容積）までの規模で実施することができる。ヒダントイナーゼおよび/またはジヒドロピリミジナーゼが、非生存の透過性細胞により封入された形で、ほぼ精製された細胞抽出物の形で、または精製型で使用されるならば、化学反応器を使用することができる。化学反応器は通常、少なくとも1つの酵素の量、少なくとも1つの基質の量、pH、温度、および反応液の循環の制御を可能にする。少なくとも1つの酵素が生きた細胞中に存在する場合、プロセスは発酵となる。この場合、生体触媒による生産は、バイオリアクター（発酵槽）内で行われるが、生きた細胞に適した生存条件に必要なパラメーター（たとえば、栄養物を含む培地、温度、通気、酸素もしくは他の気体の有無、抗生物質など）は、制御可能である。当業者は、化学反応器またはバイオリアクターに精通しており、たとえば、化学的もしくはバイオ技術的方法を、実験室規模から工業規模へスケールアップするための手順、またはプロセスパラメーターを最適化するための手順を熟知しているが、これらは文献にも幅広く記載されている（バイオ技術的方法については、たとえば、Crueger und Crueger, Biotechnologie - Lehrbuch der angewandten Mikrobiologie, 2. Ed., R. Oldenbourg Verlag, Munchen, Wien, 1984を参照されたい）。

【0060】

少なくとも1つのヒダントイナーゼおよび/またはジヒドロピリミジナーゼを含有する細胞は、物理的あるいは機械的手段、たとえば、超音波もしくは高周波パルス、フレンチプレス；もしくは化学的手段、たとえば、低浸透圧培地、溶解酵素、および培地中に存在する界面活性剤；またはそうした手法の組み合わせによって透過性にすることができる。界面活性剤の例は、ジギトニン、n-ドデシルマルトシド、オクチルグリコシド、Triton（登録商標）X-100、Tween（登録商標）20、デオキシコール酸、CHAPS（3-[(3-コールアミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホン酸）、Nonidet（登録商標）P40（エチルフェノールポリ(エチレングリコールエーテル)）などである。

【0061】

少なくとも1つの酵素が固定化されているならば、それは不活性担体に付着している。適當な担体材料は、当技術分野において公知であり、たとえば、EP-A-1149849、EP-A-1069 183およびDE-OS 100193773、ならびにそれに引用された参考文献に記載されている（それらはすべて、特に担体材料について本明細書に含められる）。適當な担体材料の例は、粘土、粘土鉱物たとえばカオリナイト、珪藻土、パーライト、シリカ、アルミナ、炭酸ナトリウム、炭酸カルシウム、セルロース粉末、陰イオン交換物質、合成ポリマー、たとえばポリスチレン、アクリル樹脂、フェノールホルムアルdehyド樹脂、ポリウレタン、およびポリオレフィン、たとえばポリエチレンおよびポリプロピレンである。担体に結合した酵素を調製するために、担体材料は通常、微粉末の形で使用するが、多孔質状が好ましい。担体材料の粒子サイズは通常5 mmを越えないが、特に2 mm以下である。少なくとも1つの酵素が、ホールセル標品中に存在する場合、前記ホールセル標品は、遊離した状態、または固定化された形で存在することができる。適當な担体材料はたとえば、アルギン酸カルシウムまたはカラギーナンである。酵素も細胞も、グルタルアルdehydによって直接、連結することができる。当技術分野ではさまざまな固定化法が知られている（たとえば

10

20

30

40

50

、J. Lalonde and A. Margolin "Immobilization of Enzymes" in K. Drauz und H. Waldmann, Enzyme Catalysis in Organic Synthesis 2002, Vol.III, 991-1032, Wiley-VCH, Weinheim)。

【0062】

D. 酵素

アミノ酸前駆体を生体触媒により生産する、特に、アミノ酸前駆体を生体触媒によりエナンチオ選択的に生産するためのプロセスに使用される少なくとも1つの酵素は、ヒダントイナーゼおよびジヒドロピリミジナーゼから選択されるが、好ましくは、アズキ(*Vigna angularis*)から得られる任意のヒダントイナーゼもしくは任意のジヒドロピリミジナーゼから選択される。アミノ酸前駆体の生体触媒による生産中に、1つもしくは複数のヒダントイナーゼ、1つもしくは複数のジヒドロピリミジナーゼ、またはそれらの任意の組み合わせが存在していてもよい。少なくとも1つのヒダントイナーゼが存在することが好ましい。少なくとも1つの酵素は、好ましくはエナンチオ選択性酵素であり、D-ジヒドロピリミジナーゼおよび/またはD-ヒダントイナーゼが好ましい。特にその酵素は、D-ヒダントイナーゼである。少なくとも1つの酵素は、(±)-6-モノ置換ジヒドロウラシルを加水分解することによって、対応する(S)-N-カルバモイル-アミノ酸を生成する能力、たとえば(±)-6-フェニルジヒドロウラシルから(S)-N-カルバモイル-フェニルアラニンを生成する能力、を有することが好ましい。10

【0063】

この少なくとも1つの酵素を精製すべきであるならば、当業者に公知の一般的な方法を用いることができる。細胞を破碎した後、具体的には細胞片、膜断片または細胞ゴーストからタンパク質を分離するための、遠心分離もしくは濾過によって、粗抽出物を得ることができる。追加の、または代わりとなる、精製ステップには、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー(たとえばQ-Sepharoseによる)、疎水性クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、限外濾過、結晶化、塩析、透析、未変性ゲル電気泳動、免疫沈降、アフィニティクロマトグラフィーなどがある。適当な方法は、たとえば、Cooper, F. G., Biochemische Arbeitsmethoden, Verlag Walter de Gruyter, Berlin, New York, or in Scope s, R., Protein Purification, Springer Verlag, New York, Heidelberg, Berlinに記載されている。好ましい実施形態によれば、少なくとも1つの酵素は、少なくとも部分精製された形、または基本的に精製された形で存在する。本発明の文脈において、酵素源として使用された細胞もしくは生物中に普通に存在する他のタンパク質が、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)後にCoomassie染色によって明らかに検出されなければ、その酵素は基本的に精製された形となっているが、銀染色後、SDS-PAGEゲル上にバンドとしてまだ識別される可能性がある。他のタンパク質のバンドがSDS-PAGE後に識別できない、またはかすかにしか識別できないならば、酵素は完全に純粋な形態で存在している。ヒダントイナーゼの単離は文献に記載されている(たとえば、Morin, Enzyme Microb. Technol. 15:208-214, 1993; Fan and Lee, Biochemical Engineering J. 8:157-164, 2001)。好ましい抽出法には、少なくとも3つの、特に、少なくとも4つの、少なくとも5つの、または下記のすべてのステップが含まれており、下記の順序で行うことが好ましい:30

- イオン交換クロマトグラフィー(たとえば、Q-Sepharose FF-クロマトグラフィーカラムを使用)
- 疎水性クロマトグラフィー(たとえば、フェニルセファロースカラムを使用)
- ゲル濾過(たとえば、Superdex Prep Grade 200ゲル濾過カラムを使用)
- アフィニティクロマトグラフィー(たとえば、Blue HiTrap 5 mlアフィニティクロマトグラフィーカラム使用)
- 陰イオン交換クロマトグラフィー(たとえば、Mono Q HR 5/5 陰イオン交換カラムを使用)および
- ゲル濾過(たとえばSuperose 6 prep gradeゲル濾過カラムを使用)。

【0064】

5020304050

少なくとも1つのヒダントイナーゼおよび/またはジヒドロピリミジナーゼに適した起源は、微生物および高等生物、たとえば細菌および古細菌、酵母、真菌、植物および動物である。細菌の例は、*Acidovorax* (たとえば*A. avenae*) ; *Agrobacterium* (たとえば*A. radiobacter*、*A. tumefaciens*、*A. sp* IP I-671、*A. tumefaciens* RU-OR、および*A. tumefaciens* NRRL B 11291) ; *Arthrobacter* (たとえば*A. crystallopoetes* AM2)、*Aurantimonas* (たとえば *A. sp.* SI85-9A1) ; *Brucella* (たとえば *B. canis*、*B. ceti*、*B. ovis*、*B. pinnipedialis*、*B. suis*) ; *Burckholderia* (たとえば*B. sp.* H160、*B. phymatum*、*B. phytofirmans*) ; *Dickeya* (たとえば*D. dadantii*) ; *Jannaschia* (たとえば*J. sp.* CCS1) ; *Mesorhizobium* (たとえば*M. loti*) ; *Oceanicola* (たとえば*O. batsensis*) ; *Ochrobactrum* (たとえば*O. intermedium*、*O. sp.* G21、*O. anthropi*) ; *Polaromonas* (たとえば*P. naphthalenivorans*)、*Reinekea* (たとえば*R. sp.* MED297) ; *Rhizobium* (たとえば*R. leguminosarum*) ; *Verminephrobacter* (たとえば*V. eiseniae*) ; *Rhodobacter* (たとえば*R. sphaeroides*) ; *Vibrio* (たとえば*V. cholerae*) ; *Fulvimarina* (たとえば*F. pelagi*)である。単純な後生動物亜界の生物の例は、センモウヒラムシ (*Trichoplax adherens*) であり、下等植物および高等植物の例は、シロイスナズナ属 (*Arabidopsis*) (たとえばシロイスナズナ (*A. thaliana*)) ; ダイズ根粒菌属 (*Bradyrhizobium*) (たとえば*B. sp.* ORS278; *B. japonicum*、*B. sp.* BTAl1) ; クラミドモナス属 (*Chlamydomonas*) (たとえばコナミドリムシ (*C. reinhardtii*)) ; ダイズ属 ((*Glycine*) (ダイズ(*Glycine max*))) ; ウマゴヤシ属 (*Medicago*) (*M. trunculata*) ; イネ属 (*Oryza*) (たとえばイネ (*O. sativa*)) ; ニセツリガネゴケ属 (*Physcomitrella*) (たとえばヒメツリガネゴケ (*P. patens*)) ; トウヒ属 (*Picea*) (たとえばシトカトウヒ (*P. sitchensis*)) ; ヤマナラシ属 (*Populus*) (たとえば*P. trichocarpa*) ; トウゴマ属 (*Ricinus*) (たとえばトウゴマ (*R. communis*)) ; モロコシ属 (*Sorghum*) (たとえば*S. bicolor*) ; ブドウ属 (*Vitis*) (たとえばヨーロッパブドウ (*V. vinifera*)) ; トウモロコシ属 (*Zea*) (たとえばトウモロコシ))である。動物の例は、ヤケイ属 (*Gallus*) (たとえばセキショクヤケイ (*G. gallus*)) ; ヒト (*Homo sapiens*) ; マカク属 (*Macaca*) (たとえばアカゲザル (*M. mulatta*)) ; チンパンジー属 (*Pan*) (たとえばチンパンジー (*P. troglodytes*)、およびクセノプス属 (*Xenopus*) (たとえばアフリカツメガエル (*X. laevis*)、*X. tropicalis*)である。

【0065】

少なくとも1つのヒダントイナーゼおよび/またはジヒドロピリミジナーゼの特に好ましい起源は、ササゲ属 (特にアズキ (*Vigna angularis*)) 、アグロバクテリウム属 (*Agrobacterium*) 、アルスロバクター属 (*Arthrobacter*) およびシュードモナス属 (*Pseudomonas*) (特に最近の分類法によればバークホルデリア属 (*Burckholderia*)) である。アズキ由来のヒダントイナーゼはSigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) から購入可能である。

【0066】

特に好ましいのは、次の部分配列のうち少なくとも1つに対して60パーセントから100パーセントの同一性を有する、少なくとも1つの部分配列を含有する、ヒダントイナーゼおよび/またはジヒドロピリミジナーゼである :

IELGITGPEGQRLAGPTVL	(配列番号1)
IELGITGPEGQRLAGPVL	(配列番号2)
IELITGPEGQRLAGPTVL	(配列番号3)
IELITGPEGQRLAGPVL	(配列番号4)
EEIARARKSGQRVIGEPVAS	(配列番号5)
ITGPEGQRLAGP	(配列番号7)。

【0067】

配列番号1-5または7のいずれかに関する同一性の程度は、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、または少なくとも90%とすることができる。特に、配列番号1-5または7のいずれかに関する同一性の程度は、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくと

も95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%とすることができる。なかでも、配列番号1-5または7のいずれかは、ヒダントイナーゼおよび/またはジヒドロピリミジナーゼに含まれる配列と同一であると測定することができる(100%同一)。与えられた任意のタンパク質の、ヒダントイナーゼおよび/またはジヒドロピリミジナーゼ特性は、本明細書に記載のヒダントイナーゼおよび/またはジヒドロピリミジナーゼアッセイによって、容易に測定することができる。

【0068】

生物もしくは微生物中に存在する、またはそれらから抽出されたヒダントイナーゼおよび/またはジヒドロピリミジナーゼに加えて、またはそうしたヒダントイナーゼおよび/またはジヒドロピリミジナーゼの代わりに、そうしたヒダントイナーゼおよび/またはジヒドロピリミジナーゼと機能的に同等なものを使用することができる。

10

【0069】

機能的同等物は、少なくとも1カ所で天然のアミノ酸配列と異なっているが、ヒダントイナーゼおよび/またはジヒドロピリミジナーゼの酵素活性は少なくとも部分的にまだ保持している変異体である。機能的同等物は、1つもしくは複数の、たとえば1から20、1から15、または1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10アミノ酸の付加、置換、欠失および/または逆位を含んでいる可能性があるが、これは、前記同等物が触媒活性を完全になくさない限り、いかなる配列位置で起こってもよい。機能的同等物はまた、基質および/もしくは生成物のターンオーバー速度が変化し、および/または特定の基質の選択性が変化した酵素であってもよい(たとえば、より大きい、または疎水性の高い、R¹および/またはR²基を有する基質を受け入れる機能的同等物)。少なくとも部分的に酵素活性を保存する可能性の高い置換の、限定的でない例を下記に記載する:

20

元のアミノ酸残基

起こりうる置換

Ala	Ser; Gly; Val
Arg	Lys
Asn	Gln; His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn; Gln
Ile	Leu; Val
Leu	Ile; Val
Lys	Arg; Gln ; Glu
Met	Leu; Ile
Phe	Met; Leu; Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp; Phe
Val	Ile; Leu

30

40

【0070】

機能的同等物には、さらに、成熟ヒダントイナーゼおよび/またはジヒドロピリミジナーゼタンパク質の前駆体、ならびにその塩が含まれる。塩は、カルボキシル基の塩、およびアミノ基の酸付加塩を含む。カルボキシル基の塩は、当技術分野で公知の方法によって作成することができるが、この塩には、無機塩、たとえば、ナトリウム、カルシウム、ア

50

ンモニア、鉄および亜鉛塩、ならびに有機塩基、たとえば、トリエタノールアミンなどのアミン類、アルギニン、リジン、ピペリジンなどで形成される塩がある。酸付加塩には、無機酸、たとえば、塩酸もしくは硫酸との塩、ならびに有機酸、たとえば酢酸およびシウ酸で形成される塩がある。

【0071】

機能的同等物はまた、天然に存在するヒダントイナーゼおよび/またはジヒドロピリミジナーゼを、1つもしくは複数のアミノ酸側鎖、またはN末端もしくはC末端で修飾することによっても得ることができる。こうした誘導体にはたとえば、カルボキシリ基の脂肪族エステル、カルボキシリ基のアミド（アンモニアまたは一級もしくは二級アミンとの反応により得られる）、遊離アミン基のN-アシル誘導体（アシル基との反応により得られる）、または遊離ヒドロキシ基のO-アシル誘導体（アシル基との反応により得られる）を含めることができる。（たとえば人為的グリコシル化もしくは脱グリコシル化の後）天然のグリコシル化パターンと異なるグリコシル化パターンによって得られる機能的同等物も含まれる。10

【0072】

機能的同等物にはさらに、他の生物もしくは微生物から得られる酵素、ならびに関連酵素の天然に存在するバリアントも含まれる。

【0073】

機能的同等物には、ヒダントイナーゼおよび/またはジヒドロピリミジナーゼの望ましい活性を有する、單ードメインもしくは配列モチーフも含まれる。20

【0074】

その上、機能的同等物は、天然に存在する配列もしくはその機能的同等物を、少なくとも1つの機能的に異なる配列と組み合わせて、N末端もしくはC末端で結合した状態で含んでなる融合タンパク質であってもよいが、これはタンパク質のヒダントイナーゼおよび/またはジヒドロピリミジナーゼ活性を消失させない。こうした機能的に異なる配列の例は、シグナルペプチド（たとえば、融合タンパク質の排出を指示する）、酵素（たとえば、他の酵素的活性を追加するため）、または免疫グロブリンの一部（たとえば、融合タンパク質を固定化するため）である。

【0075】

機能的同等物には、天然に存在するタンパク質のホモログも含まれる。前記ホモログは、天然に存在するアミノ酸配列に対して、少なくとも60%の相同性、好ましくは少なくとも75%、および特に少なくとも85%、たとえば90%、95%、または99%の相同性（Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85(8), 1988, 2444-2448のアルゴリズムによって計算される）を有する。所与のポリペプチドの「%相同性」は、具体的には、基準となる酵素もしくは酵素サブユニットの全長に関する、アミノ酸残基の同一性パーセンテージを表す。30

【0076】

機能的同等物は、当業界で公知の方法によって作製することもできる。遺伝子を改変する方法、さらにその結果として、こうした遺伝子にコードされるタンパク質を目的とする方法は、以前から知られており、たとえば、遺伝子の1つもしくは複数のヌクレオチドが特異的に交換される、部位特異的変異誘発（Trower MK (Hrsg.) 1996; *In vitro mutagenesis protocols*. Humana Press, New Jersey）、遺伝子の任意の位置で任意のアミノ酸に対するコドンを交換もしくは付加することができる、飽和突然変異誘発（Kegler-Ebo DM, Docktor CM, DiMaio D (1994) Nucleic Acids Res 22:1593; Barettono D, Feigenbutz M, Valcarel R, Stunnenberg HG (1994) Nucleic Acids Res 22:541; Barik S (1995) *Mol Biotechnol* 3:1）、エラーなしでは作動しないDNAポリメラーゼによって、ヌクレオチド配列が変異する、エラープローンポリメラーゼ連鎖反応（エラープローンPCR）（Eckert KA, Kunkel TA (1990) Nucleic Acids Res 18:3739）；たとえば欠損DNA修復機構に起因して、変異率の増加が観察される、突然変異誘発株の遺伝子の継代（Greener A, Callahan M, Jerpseth B (1996) *An efficient random mutagenesis technique using an E.co* 40

li mutator strain. In: Trower MK (Hrsg.) *In vitro mutagenesis protocols*. Humana Press, New Jersey)、または、はじめに、密接に関連する遺伝子のプールを作製して消化した後、得られた断片をポリメラーゼ連鎖反応のテンプレートとして使用して、鎖分離およびアニーリングを繰り返すことにより全長モザイク遺伝子を作製する、DNAシャフリング (Stemmer WPC (1994) *Nature* 370:389; Stemmer WPC (1994) *Proc Natl Acad Sci U SA* 91:10747) がある。

【0077】

使用される方法に応じて、当業者は、純粹にランダムな変異、またはより定方向の変異を遺伝子もしくは非コード領域（発現制御に関連する可能性がある）内に導入した後、遺伝子バンクを作製することができる。必要な方法は、当業者に知られており、たとえば、
Sambrook und Russell, *Molecular Cloning*. 3. Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press 2001に記載されている。
10

【0078】

いわゆる「定方向進化」の方法（特に、Reetz MT und Jaeger K-E (1999), *Topics Curr Chem* 200:31; Zhao H, Moore JC, Volkov AA, Arnold FH (1999), *Methods for optimizing industrial enzymes by directed evolution*: Demain AL, Davies JE (Hrsg.) *Manual of industrial microbiology and biotechnology*. American Society for Microbiologyより、に記載の）が用いられる場合、（完全にランダム、とは対照的に）方向付けられたアプローチで、しかも大規模に機能的同等物を作製することができる。第1段階で、各タンパク質（たとえばヒダントイナーゼおよび/またはジヒドロピリミジナーゼ）の遺伝子バンクが、たとえば前記方法を適用することによって、作製される。遺伝子バンクは、適当な方法で、たとえば、細菌もしくはファージディスプレイ系によって発現される。さらに、適当な発現ベクターを選択することにより宿主におけるタンパク質の局在化を制御するための方法が、当技術分野で知られている。タンパク質は、細胞内で細胞質内に局在したり、膜アンカーの付加で膜内に局在する可能性があるが、シグナルペプチダーゼの認識配列を含有するシグナルペプチドの付加によって細胞外に局在することもある。次の第2ステップにおいて、望ましい特性を有するタンパク質を発現するクローニングを選択もしくはスクリーニングする。選択法を用いる場合、望ましい特性を有するタンパク質を発現するクローニングは、そうしたタンパク質が宿主細胞の生存を促進もしくは保証するので、生存することになる（たとえば、特定の基質の使用、または特定の温度での増殖を可能にする酵素）。スクリーニング法を用いる場合、全クローニングが生存する。望ましい特性を有するタンパク質を発現するクローニングは、当業者が容易に考案することができる適当なアッセイによって同定される。たとえば特定の結合特性を有するタンパク質を探索する場合、望ましい結合能力にふさわしい基質でコーティングした表面に付着する宿主細胞を、スクリーニングすることができる。このようなタンパク質を発現する宿主細胞は、発現されたタンパク質を介して基質に付着することができるが、機能しないタンパク質を発現する宿主細胞はそのようになり得ない。特定の触媒特性を有する機能的同等物を探索する場合、宿主細胞は、基質含有培地、または基質含有寒天プレートで培養することができる。機能的同等物の存在は、たとえば、そうした機能的同等物による基質修飾後の色の変化によって指示される（機能的同等物と基質含有培地との接触を可能にするために、必要に応じて、宿主細胞を溶解した後）。ヒダントイナーゼまたはジヒドロピリミジナーゼの機能的同等物は、目的の置換を有するジヒドロウラシルを含有する培地でスクリーニングすることができる。
20
30
40

【0079】

これに関連して、ハイスループットスクリーニングを可能にするために、自動システム（たとえば、マイクロタイタープレート用ピペットティングロボット、スクリーニングロボット、寒天プレート上のコロニーを識別するための画像処理システム）を使用することもできる。大部分または少なくとも一部が望ましい特性に相当する特徴を有する、機能的同等物を発現する宿主細胞の各遺伝子を、1回または複数回の変異に供する。変異および選択もしくはスクリーニングのステップは、機能的同等物が満足できる程度の望ましい特性
50

を有するまで、反復プロセスで繰り返すことができる。

【0080】

多数の変異をタンパク質配列に挿入することによって、一定の特性（たとえば酵素の回転率）を改善したり、新たな特性（新たな基質クラスを受容する）を獲得したりするよりも、機能の喪失のほうが起こりやすいが、反復アプローチを適用することによって、方向付けされたやり方で望ましい特性を有するタンパク質をスクリーニングすることができる。反復アプローチを実施する場合、野生型タンパク質などの基準となるタンパク質（たとえば、個別のヒダントイナーゼまたはジヒドロピリミジナーゼ）のヌクレオチド配列に基づいて、変異を有する遺伝子ライブラリーが作製される。これに関連して、選択された又クレオチドレベルでの変異率は、対応する翻訳されたペプチドもしくはタンパク質において比較的少數のアミノ酸、たとえば1から3アミノ酸に変異を起こさせる。結果として得られたペプチドもしくはタンパク質は、その後、望ましい特徴（たとえば、1つもしくは複数の基質に対する触媒活性の高まり、基質範囲の拡大もしくは変化、上昇もしくは変化した温度もしくはpH値における、または特定の溶媒存在下での、安定性の増大）を目的としてスクリーニングする。こうした望ましい特性を有するタンパク質もしくはペプチドの配列に基づいて（少ししか確認できなくてもよい）、第2の遺伝子ライブラリーを作製し、再び低率の変異を導入する。その後、翻訳されたタンパク質を、望ましい特性でスクリーニングする。変異した遺伝子ライブラリーを作製し、そのライブラリーに基づいて発現されるペプチドもしくはタンパク質をスクリーニングするサイクルは、必要と見なされる回数、繰り返すことができる。サイクルごとに低い変異率を選択することは、あまりに多くの変異が累積することによってほとんどすべてのタンパク質が機能しないような状況を回避する。低い変異率（ならびに、付随して、望ましい特性の低い、もしくはゆっくりした発現）は、（機能的同等物をもたらすかもしれない）変異および（望ましい機能的同等物の）選択を反復して繰り返すことで埋め合わせることが可能であり、それによって有用な変異の蓄積をもたらし、最終的には、望ましい改善された特性を有する成功タンパク質を高率で提供することができる。改善された特性を有する機能的同等物の配列分析により、望ましい特性のために重要な、ペプチドもしくはタンパク質内の配列位置もしくは配列領域を特定する、配列情報が得られる。望ましい特性を有するタンパク質の作製に関する例は、Zhao und Arnold, Protein Engineering 12:47-53 (1999)、またはMay et al., Nature Biotechnology 18:317-320 (2000)に記載されており、変異を導入するための他の方法もそれから明らかになる。

【0081】

機能的同等物は、上記タンパク質の根本となる核酸配列から誘導された核酸配列によっても得ることができる。他に指定のない限り、誘導された核酸配列は、元の核酸に対して少なくとも80%の同一性、または少なくとも90%、具体的には約91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の同一性を有する核酸を意味する。100%の同一性は、核酸の全長にわたって2つの核酸配列のヌクレオチドが同一であることを意味するが、具体的には、同一性は、Infomax (USA) のVector NTI Suite 7.1ソフトウェアおよびClustal法を用いて、二つの核酸配列の比較により決定される。

【0082】

誘導された核酸（一本鎖もしくは二本鎖DNAまたはRNA配列、たとえばcDNAまたはmRNA）は、当技術分野で公知の方法により、構成単位であるヌクレオチドから化学合成することができるが、たとえば、構成単位であるヌクレオチドもしくはオリゴマーの縮合によって化学合成することができる。たとえば、化学合成は、ホスホアミダイト法によって行うことができる（(Voet, Voet, 2. Ed., Wiley Press, New York, p. 896-897)）。合成オリゴヌクレオチドのアニーリング、およびDNAポリメラーゼのKlenow断片によるギャップの充填、ライゲーション反応、ならびに一般的なクローニング法は、当技術分野で知られており、たとえば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989に記載されている。

【0083】

10

20

30

40

50

誘導された核酸は、データベースで同定することができるが、遺伝子バンクもしくは生物から単離することもできる。具体的には、誘導された核酸は、配列番号1-5または7に記載のペプチド配列に対応する核酸を、ハイブリダイゼーション用のプローブとして、またはポリメラーゼ連鎖反応(PCR)のプライマーとして用いることによって、単離することができる。プローブもしくはプライマーは通常、ストリンジエントな条件下で、元の核酸に由来する可能性のある核酸配列のセンス鎖もしくはアンチセンス鎖の少なくとも12、好ましくは少なくとも25、たとえば約40または約75個の連續したヌクレオチドとハイブリダイズする、ヌクレオチド配列領域を含んでいる。可能性のある誘導された核酸配列は、遺伝子バンク、標的生物の細胞性物質、たとえば細胞(好ましくは透過性細胞)もしくはそれから抽出された細胞成分(好ましくは、少なくとも部分精製された核酸)、の中には存在しうるが、この標的生物は、誘導された核酸の存在を調べられるべき生物である。細胞性物質は、アガロースゲル上で分離することができ、使用されたプローブと結合する核酸断片の存在を検出する目的で、標準条件下でノーザンプロットもしくはサザンプロットハイブリダイゼーションを行うために、膜に転写することができるが、その代わりに、PCR反応のプライマー用のテンプレートとなることもあり、このプローブもしくはプライマーは、配列番号1-5または7に記載のペプチド配列のいずれかに基づく核酸配列から得ることができる。プロット膜もしくはゲル上の、ハイブリダイズした核酸バンド、またはPCR反応においてハイブリダイズしたテンプレート核酸(元の核酸に由来するフォワードもしくはリバースプライマー、またはランダムプライマーを用いて増幅されていてもよい)を単離して、当技術分野で公知の方法(たとえば、Sambrook et al., 1989)により適当なベクターにクローニングした後、配列決定するか、または、遺伝子バンクもしくは細胞性物質から、より長い、好ましくは全長遺伝子を含有する核酸断片を単離するために、さらにストリンジエントな条件下でハイブリダイゼーションプローブとして使用することができる。
。

【0084】

標準的なハイブリダイゼーション条件は、それぞれの核酸に応じてさまざまであるが、概して、0.1 x SSCから5 x SSCまでの水性バッファー溶液中で(この1 x SSCは0.15 M NaCl、14 mM クエン酸ナトリウム、pH 7.2に相当する)、または追加して50% ホルムアミドの存在下で、42 ~ 58 の温度であって、たとえば50% ホルムアミド含有5 x SSC中42である。DNA:DNAハイブリッドのハイブリダイゼーション条件は、好ましくは0.1 x SSCで約20 ~ 約45 の温度を含んでいるが、特に30 ~ 45 である。DNA:RNAハイブリッドのハイブリダイゼーション条件は、好ましくは0.1 x SSCで約30 ~ 約55 の温度を含んでいるが、特に45 ~ 55 である。前記の温度は、ホルムアミドを含まないSSCバッファー中の、約100ヌクレオチドを含有する、G+C含量50%の核酸のハイブリダイゼーション温度の例である。DNAハイブリダイゼーションの実験条件および他の分子生物学の技術は、分子生物学の教科書もしくは実験マニュアルに記載されている(たとえば、Sambrook et al., 1989, Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, 1985; Hames and Higgins (eds.), Nucleic Acid Hybridisation: A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, Oxford, 1985; Brown (ed.), Essential Molecular Biology: A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, Oxford, 1991))が、当業者は、核酸の長さ、ハイブリッドの種類、およびG+C含量などのパラメーターを考慮して、当技術分野で公知の公式に従って計算することができる。たとえばノーザンプロットにおける、ストリンジエントな条件の例は、0.1% SDS含有0.1 x SSC(20 x SSC: 3 M NaCl、0.3 M クエン酸ナトリウム、pH 7.0)の使用、および50 ~ 70 の温度が含まれるが、非特異的に結合したプローブもしくはオリゴヌクレオチドを溶出するために60 ~ 65 が好ましい。ストリンジエントな条件の選択および適応は当技術分野で知られており、文献に記載されている(たとえばSambrook et al., 1989)。

【0085】

誘導された核酸は、当技術分野で知られている方法にしたがって単離することができる

10

20

30

40

50

。単離された核酸分子は、逸脱した配列を含む他の核酸分子から、基本的に分離された核酸分子であると理解されるべきである。単離された核酸分子は、基本的に核酸以外の細胞物質もしくは培地を含まないことが好ましく、化学合成により作製された場合には、化学的前駆体もしくは他の化学薬品が基本的に存在しないことが好ましい。

【0086】

誘導された核酸は、適宜、制限酵素により切断し、リンカー分子でライゲートした後、発現構築物に導入することができる。発現構築物において、誘導された核酸は、その核酸配列からの、対応するポリペプチドもしくはタンパク質配列の発現を制御する調節エレメントに、機能しうるよう連結されており、前記核酸配列は、有用なヒダントイナーゼまたはジヒドロピリミジナーゼをコードする配列である。発現構築物は、誘導された核酸の上流にプロモーターを含み、その下流に転写終結配列を含んでいることが好ましい。機能しうる連結は、プロモーター、コード配列、ターミネーター、さらに必要に応じて、追加の調節エレメントが、コード配列の発現について前記調節エレメントのそれぞれの適正な機能を可能にするように、順次、配置されていると理解されるべきである。機能しうるよう連結されるべきエレメントの例には、ターゲティング配列、エンハンサー、ポリアデニル化シグナルなどがある。他に有用なエレメントとしては、選択可能なマーカー、增幅シグナル、複製開始点などがある。有用な調節エレメントは、当技術分野で知られており、たとえば、Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)に記載されている。人工調節エレメントもしくは配列に加えて、またはその代わりに、天然調節配列が、ヒダントイナーゼもしくはジヒドロピリミジナーゼの構造遺伝子の上流に存在してもよい。天然の調節は遺伝子改変によって、スイッチオフにしたり、発現が低下もしくは上昇するように改変することができる。同様に、遺伝子構築物は、人工エレメントを挿入することなく天然調節エレメントだけを保存することによって、より単純化された構造を有することもある。天然調節エレメントは、調節が生じず、遺伝子発現が低下、または好ましくは増加するように、変異させることができる。ヒダントイナーゼもしくはジヒドロピリミジナーゼの構造遺伝子は、單一コピーまたは複数コピーとして存在しうるが、場合によっては混合コピーとして、すなわちヒダントイナーゼおよびジヒドロピリミジナーゼが遺伝子構築物中に同時に存在してもよい。

【0087】

有用なプロモーターの例は、cos-、tac-、trp-、tet-、trp-tet-、Ipp-、lac-、Ipp-lac-、lacIq-、T7-、T5-、T3-、gal-、trc-、ara-、SP6-、lambda-PR-またはlambda-PL-プロモーター（これらは好ましくは、グラム陰性細菌において使用される）；ならびにプロモーター amyおよびSP02、または酵母プロモーター ADC1、MFalpha、AC、P-60、CYC1、GAPDHである。細胞増殖および適当な細胞密度の蓄積後にヒダントイナーゼもしくはジヒドロピリミジナーゼ発現の誘導を可能にする誘導プロモーター、たとえば温度または化合物によって誘導されるプロモーター（たとえばメタロチオネインプロモーター）を使用してもよい。同様に、人工プロモーターも使用できる。

【0088】

組換え発現構築物は、適当なベクター、たとえばプラスミドに挿入されることが好ましく、これは次に適当な宿主細胞に導入される。ベクターは、当技術分野で知られており、たとえば、Pouwels et al. (eds.), Cloning Vectors, Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985に記載されている。プラスミドに加えて、ベクターは、当技術分野で知られているあらゆる他のベクターであってもよく、たとえば、ファージ、ウイルス、たとえばSV40、CMV、バキュロウイルスおよびアデノウイルス、トランスポゾン、ISエレメント、ファスミド、コスミド、ならびに線状もしくは環状DNAとすることができる。ベクターは宿主において自律的に複製することができるが、染色体に組み込まれた後、染色体性に複製されることもある。非融合タンパク質発現ベクターの例は、pTrc (Amann et al., (1988) Gene 69:301-315)、およびpET 11d (Studier et al. Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Kalifornien (1990) 60-89)である。たとえば、*Saccharomyces cerevisiae*で発現するための、酵母発現ベクターの例は

10

20

30

40

50

、pYEPsec1 (Baldari et al., (1987) *Embo J.* 6:229-234), pMFa (Kurjan und Herskowitz (1982) *Cell* 30:933-943)、pJRY88 (Schultz et al. (1987) *Gene* 54:113-123)、およびpYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA)である。真菌、特に糸状菌に有用なベクターを構築するための、ベクターおよび方法は、van den Hondel, C.A.M.J.J. & Punt, P.J. (1991) "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi, in: Applied Molecular Genetics of Fungi, J.F. Peberdy et al., Hrsg., S. 1-28, Cambridge University Press: Cambridgeに記載されている。Sf9細胞などの昆虫細胞においてタンパク質を発現するためのバキュロウイルスベクターの例には、pAcシリーズ (Smith et al., (1983) *Mol. Cell Biol.* 3:2156-2165) およびpVLシリーズ (Lucklow und Summers (1989) *Virology* 170:31-39)があり、哺乳動物細胞ベクターの例としては、pCDM8 (Seed, B. (1987) *Nature* 329:840) およびpMT2PC (Kaufman et al. (1987) *EMBO J.* 6:187-195)がある。原核および真核細胞のための他の発現系が、Sambrook, Fritsch, and Maniatis, *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989の第16章および第17章に記載されている。
10

【0089】

前記ベクターを用いて、それらのベクターの少なくとも1つで形質転換され、本発明の方法に有用なヒダントイナーゼもしくはジヒドロピリミジナーゼを発現する、組み換え生物を作製することができる。組換え構築物は、適当な宿主系に導入された後、発現が可能となる。導入のために、当技術分野で公知の方法、たとえば共沈殿、プロトプラスト融合、エレクトロポレーション、化学的形質転換、レトロウイルス形質転換などを使用することができます。適当な方法はたとえば、*Current Protocols in Molecular Biology*, F. Ausubel et al., ed., Wiley Interscience, New York 1997, oder Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989に記載されている。
20

【0090】

適当な宿主生物または宿主細胞は、ヒダントイナーゼもしくはジヒドロピリミジナーゼをコードする核酸、またはそれらに由来する核酸の発現を可能にする生物または細胞である。宿主細胞には、細菌、真菌、酵母、植物または動物細胞がある。細菌の例は、エシエリキア (*Escherichia*) 属、たとえば大腸菌 (*Escherichia coli*)、ストレプトミセス (*Streptomyces*) 属、バシラス (*Bacillus*) 属、シュードモナス (*Pseudomonas*) もしくはバークホルデリア (*Burkholderia*) 属であり、真核微生物の例は、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、コウジカビ (*Aspergillus*) 属であり、動物もしくは植物由来の高等真核細胞はたとえば、Sf9-、CHO- またはHEK293細胞であるが、動物もしくは植物のような高等真核生物の、単個細胞または凝集した細胞は、本明細書では微生物と称することもある。
30

【0091】

形質転換に成功した細胞の選択は、それぞれのベクターまたは発現力セットに含まれるマーカー遺伝子に基づいて行うことができる。マーカー遺伝子の例には、抗生物質耐性遺伝子または発色反応を触媒する酵素の遺伝子があり、この発色反応は、形質転換細胞の染色または蛍光をもたらす。前記細胞は、自動細胞選別によって選択することができる。たとえばG418もしくはハイグロマイシンに対する、抗生物質耐性遺伝子を保持する、形質転換に成功した細胞は、抗生物質含有培地もしくは寒天プレートで選択することができる。細胞表面上に発現されるマーカータンパク質は、アフィニティクロマトグラフィーによる選択に使用することができる。
40

【0092】

細胞は、上記C項に記載のように培養され、ヒダントイナーゼもしくはジヒドロピリミジナーゼを培地中に分泌することができるので、細胞の増殖もしくは生存、ならびに同時に、一般式(1)の少なくとも1つの基質から アミノ酸前駆体を生体触媒により生産することが可能になる。ヒダントイナーゼもしくはジヒドロピリミジナーゼが培地中に分泌され
50

ない場合、アミノ酸前駆体の生体触媒による生産を引き起こすために、増殖および/またはヒダントイナーゼもしくはジヒドロピリミジナーゼ発現の誘導後に、細胞を透過性にすることができる。あるいはまた、増殖および/またはヒダントイナーゼもしくはジヒドロピリミジナーゼ発現の誘導後に、ヒダントイナーゼもしくはジヒドロピリミジナーゼを部分精製または完全に精製するために、細胞を収集してもよく、その結果、アミノ酸前駆体の生体触媒による生産のために、精製されたヒダントイナーゼもしくはジヒドロピリミジナーゼを使用することができる。

【0093】

E. 追加的プロセスステップ

アミノ酸前駆体もしくはアミノ酸を得るために方法の際に、1つもしくは複数の追加の酵素が、必要に応じて反応中に存在していてもよい。こうした酵素は一般式(I)のジヒドロウラシル基質のD-およびL-エナンチオマー間の変換を触媒する。適当な酵素の例は、ジヒドロウラシルデヒドロゲナーゼ(たとえば、哺乳動物起源)、ジヒドロウラシルオキシダーゼ(*Rhodotorula glutinis*)およびエノエートレダクターゼ(旧黄色酵素)などである。

【0094】

一般式(II)のアミノ酸前駆体(アミノ酸カルバモイル誘導体)は、本発明の方法によって作製されるが、これは、反応混合物中に残存したまま、対応するアミノ酸およびN-カルバモイル部分に切断することができる。あるいはまた、アミノ酸前駆体は、一般式(I)の基質、および少なくとも1つのヒダントイナーゼおよび/またはジヒドロピリミジナーゼを含有する反応混合物から分離して切断しアミノ酸を生成することができる。切断は、化学的または酵素的に行うことができる。化学的切断は、(たとえばFan and Lee, Biochemical Engineering Journal 8: 157-164, 2001に記載のように)酸性pH、たとえば1.0で、等モル量のNaNO₃を一般式(II)のアミノ酸前駆体に加えることによって達成することができる。酸性pHは、たとえば硫酸によって達成することができる。切断反応は低温で、たとえば氷上で行うことができる。一般式(II)のアミノ酸前駆体の切断が化学的に達成される場合、一般式(I)の基質からアミノ酸前駆体に至る酵素反応とは別に、この反応を行うことが好ましい。切断は、酵素的変換が完了した後、または平衡に達した後に、行うことができる(時間的分離)が、アミノ酸前駆体を含有する反応媒体を除去した後、別の反応容器内で行うこともできる(空間的分離)。このバッチ法に代わる方法として、一般式(I)の基質分子を含有する反応媒体を、固定化酵素(ヒダントイナーゼおよび/またはジヒドロピリミジナーゼ)と接触させることによって、連続生産を達成することができるが、酵素はしたがって反応容器内に保持されており、その一方で、基質を消費し尽くした反応媒体は、アミノ酸前駆体の切断のために分離され、同時に新しい反応媒体で置き換えることができる。カルバモイラーゼ(たとえばE.C.3.5.1.77もしくはE.C.3.5.1.87)またはウレイドプロピオナーゼ(E.C.3.5.1.6)などの酵素によって酵素的切断を行うことができる。前記酵素は、市販品供給業者から(たとえば、カルバモイラーゼはJulich Chiral Solutions, Julich, Germanyから)入手することができる。

【0095】

F. pH値およびバッファー系

一般式(I)の基質を一般式(II)のアミノ酸前駆体に変換するための本発明の方法は、好ましくは約7.0から約11.0までのpHで実施されるが、約7.5から10.0までのpHが好ましい。具体的には、pHは7.5から8.5までの範囲にあり、より詳細には約7.5から8.0までの範囲にある。特に好ましいpH値は約7.5、7.6、7.7、7.8、7.9および8.0である。

【0096】

前記pH値またはpH範囲に適した任意のバッファー、たとえばリン酸バッファー、ホウ酸バッファー、およびTrisバッファーを使用することができる。7.5から9.0までのpH範囲では、Trisバッファーが好ましいが、6.0から8.0までのpH範囲ではリン酸バッファーが有用である。特に好ましいのは、Trisで緩衝化された反応溶液である。バッファーの濃度は、使用する基質の濃度に応じて決定されるが、好ましくは1 mMから200 mMまでの範囲であり

10

20

30

40

50

、たとえば、1 mMから100 mMまで、1 mMから50 mMまでである。具体的には、バッファー濃度は、2 mMから25 mMまで、または3 mMから10 mMまで、たとえば5 mMとすることができます。

【0097】

G. 反応の温度および継続時間

一般式(I)の基質の生体触媒による変換のためのプロセスは、使用するヒダントイナーゼおよび/またはジヒドロピリミジナーゼに耐えられる、任意の温度で行うことができる。通常、温度は、酵素を内包する、または酵素抽出の起源として使用される、生物または微生物の増殖至適温度と相關しているが、当業者は容易に確定することができる。概して、プロセスは30 ~ 60 、特に40 ~ 50 の温度で実施することができる。反応温度の例は、約30 、約35 、約37 、約40 、約45 、約50 、約55 、および約60 である。10

【0098】

プロセスは、一般式(I)の基質と一般式(II)の アミノ酸前駆体との平衡が達成されるまで進行しうるが、もっと早く止めることもできる。通常のプロセスの時間は、1分から25時間までの範囲内であるが、特に10分から6時間までである。好ましい反応時間は、1時間から4時間までの範囲内であるが、特に1.5時間から3.5時間までである。

【0099】

H. 反応媒体中の追加成分

基本的に疎水性のR¹および/またはR²を有する基質の溶解性を高めるために、1つもしくは複数の有機共溶媒が反応媒体中に含まれていてもよい。20

【0100】

あるいはまた、反応は、水相および非水相からなる二相系で行うこともできる。非水相に適した溶媒の例は、好ましくは5から8個の炭素原子を有する、脂肪族炭化水素、たとえばペンタン、シクロペンタン、ヘキサン、シクロヘキサン、ヘプタン、オクタン、もしくはシクロオクタン；好ましくは1または2個の炭素原子を有するハロゲン化脂肪族炭化水素、たとえばジクロロメタン、クロロホルム、テトラクロロメタン、ジクロロエタン；芳香族炭化水素、たとえばベンゼン、トルエン、キシレン、クロロベンゼン、もしくはジクロロベンゼン；好ましくは4から8個の炭素原子を有する、脂肪族非環式または環状エーテル、たとえばジエチルエーテル、メチル-tert-ブチルエーテル、エチル-tert-ブチルエーテル、ジプロピルエーテル、ジイソプロピルエーテル、テトラヒドロフラン；またはエステル、たとえば酢酸エチルもしくは酢酸n-ブチル；またはケトン、たとえばメチル-イソブチルケトンもしくはジオキサン、またはそれらの混合物である。30

【0101】

特定の実施形態において、反応媒体は、特に単相系として有機共溶媒を含有する、水性反応媒体である。適当な共溶媒の例は、ブタン-2-オール、メチル-tert-ブチルエーテル(MTBE) およびジメチルスルホキシド(DMSO)である。MTBEを用いる場合、水性媒体における飽和状態(約12容量%)より低い濃度が好ましく、たとえば約6%、約5%、約4%、約3%、約2%、約1%、または1%未満である。MTBEは、水性媒体中での飽和濃度(約6容量%)まで使用することができるが、一方DMSOは、基本的にプロセスの収率を妨害することなしに基質の溶解性を高めるために、約2容量%の濃度まで使用することができる。40

【0102】

I. N-カルバモイル アミノ酸または アミノ酸の回収

反応媒体からアミノ酸およびN-カルバモイルアミノ酸を単離する方法は、当技術分野で知られており、たとえば、ゲル濾過、HPLC、逆相クロマトグラフィーおよびイオン交換クロマトグラフィーなどの技術が含まれる。イオン交換クロマトグラフィー、特に陰イオン交換クロマトグラフィーは、好ましい方法である。適当なイオン交換マトリックスには、強イオン交換体(たとえば、四級アンモニウムに基づくQ Sepharose)および弱陰イオン交換体(たとえば、ジエチルアミノエチルに基づくDEAE Sepharose)がある。好ましい方法の例は、DEAEカラムを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー、または有機溶媒による抽出であるが、これは、生物学的変換系から基質を抽出するために酢酸エチルを、次に生50

成物を抽出するために2-ブタノールを使用する。

【0103】

ここで、本発明を例証する以下の実施例によって、本発明を詳細に示すこととするが、この実施例は、本発明を限定するものではない。

【0104】

(実施例)

化学的実験

厚さ0.2 mmのシリカゲル60F254 (Mackerey-Nagel) でコーティングしたプラスチック支持プレートを用いてTLCを行った。プレートをUV光 (254 nm) または過マンガン酸塩浸漬によって可視化した。化学物質は、特に指示しない限りSigma-Aldrich、AcrosまたはFlukaから購入した。特に明記しない限り、試薬はすべて標準的な研究室グレードとし、溶媒は無水であり、供給時に使用される。1H-NMRおよび13C-NMRは、Bruker AC300 またはAC400スペクトロメータで記録した。次の略号を使用した： s、化学シフト； bs、ブロード・シングレット (broad singlet) ; d、ダブルett (doublet) ; dd、ダブル・ダブルett (doublet of doublets) ; J、カップリング定数； m、マルチプレット (multiplet) ; q、カルテット (quartet) ; qui、クインテット (quintet) ; s、シングレット (singlet) ; sep、セプテット (septet) 。化学シフト () は、100万分の1の単位 (ppm) で記録され、カップリング定数 (J) はHz単位で記録される。残留プロトン性溶媒、DMSO-d6 (H 2.50, qui) は、1H NMRスペクトルの内部標準として使用し、13C NMRシフトは、プロードなバンドをデカップリングしたDMSO-d6 (C 39.5, sep) を標準として用いた。

【0105】

生物学的変換実験

特に明記しない限り、すべての実験は、15 mL Falconチューブ内で、5 mL Trisバッファー (0.1M pH 7.5) 中5 mM 6-PDHU (4.75 mg) のスケールで、1Uの市販のアズキ (Vigna angularis) 由来ヒダントイナーゼ (35 mg, Sigma, St.Louis, USAより購入) を用いて行われ、サーモミキサー (Falcon) 内で、750 rpm、温度50 °C にて、インキュベートした。

【0106】

生物学的変換は、「1ユニット/反応」を用いて実施したが、ここで1ユニットは、ヒダントインから、1分あたり1 μモルのN-カルバモイルグリシンの生成を触媒する量と定義される。

【実施例1】

【0107】

5-置換ヒダントインまたは6-フェニルジヒドロウラシルの加水分解に関するアッセイ

ヒダントイナーゼ活性を測定するために、ホウ酸バッファー (1.5 mL, 0.1M, pH 9.0) に溶解した5-フェニルヒダントイン (1.32 mg) にD-ヒダントイナーゼ (10.5 mg) を添加した。生物学的変換は、Eppendorf “Themomixer comfort”, (40 °C, 1400 rpm) においてインキュベートした。定められた時点で、混合物の一定分量 (100 μL) を採り、TCA (12 %w/v, 175 μL) の添加により酵素を変性させて可溶性タンパク質を沈殿させることによって、反応を終了させた。遠心分離後、上清を集め、HPLCで分析したが、そこで下記のパラメーターを使用した：

カラム : Agilent Zorbax XBD-C18 4.6 mm x 50 mm, 3.5 μm。

条件 : 25 °C, H₂O:アセトニトリル、85:15 (+0.1% TFA) を1 mL/分。

【0108】

保持時間は5-フェニルヒダントイン (3.6) 、N-カルバモイル フェニルグリシン (2.7) 。このアッセイステップは、D-ヒダントイナーゼを、ヒダントイナーゼ活性を有するかもしれない酵素で置き換えることにより、そうした酵素のヒダントイナーゼ活性を測定するために使用することができる。

【0109】

ジヒドロピリミジナーゼ活性を測定するために、D-ヒダントイナーゼ (10.5 mg) を、Trisバッファー (300 μL, 0.1 M, pH 7.5) に溶解した6-フェニルジヒドロウラシル (1.1

10

20

30

40

50

4 mg)に添加した。生物学的変換は、Eppendorf "Themomixer comfort", (40 、1400 rpm)においてインキュベートした。定められた時点で、混合物の一定分量 (100 μ L)を取り、酵素を変性させて (95 、5分)、メタノール (300 μ L) の添加で可溶性タンパク質を沈殿させることによって、反応を終了させた。遠心分離後、上清を集め、HPLCで分析したが、そこで下記のパラメーターを使用した：

c-18 rpHPLC: 均一濃度移動相、25 、H₂O: ACN, 90:10 + 0.1 % TFA

保持時間：6-フェニルジヒドロウラシル (12.6)、N-カルバモイル フェニルアラニン(NCBPA, 4, 9.6) TCA (4.3) DMSO (1.6)

Astec Chirobiotic T カラム、25 cm x 4.6 mm、5 μ m: 均一濃度移動相、5 、20 mM 酢酸アンモニウム(pH 6.5) : MeOH、70:30

保持時間：6PDHU (15.9, 27.5)、NCBPA (7.8, 6.8)。

10

【実施例 2】

【0110】

アズキ (*Vigna angularis*) からのヒダントイナーゼの単離

ヒダントイナーゼ活性を有するタンパク質を次のように、アズキ (*Vigna angularis*) から単離した。

【0111】

2.1 豆の抽出

885 gのアズキ(健康食品店より購入)を、2分割量として通常のミキサーを用いてドライアイスとともに粉碎した。アズキ粉末を得るために、4Lの抽出バッファー (20 mM Tris 、10 mM アスコルビン酸、10 mM リジン、pH 7.5) を加え、懸濁液を4 にて一晩攪拌し、ガーゼで濾過して遠心分離した。タンパク質含量9.5 mg/mlの粗抽出液2500 mLが得られ、次のクロマトグラフィーステップ (Amersham PharmaciaまたはGE Healthcare製クロマトグラフィーカラムを使用)を行うままで-20 で保存した。

20

【0112】

2.2 イオン交換クロマトグラフィー (Q-Sepharose Fast Flow)

Q-Sepharose FFクロマトグラフィーカラム(直径5 cm; 長さ21 cm)を200 mM Tris/HCl (pH 7.5)で洗浄し、ランニングバッファーA (20 mM Tris/HCl、1 mM アスコルビン酸、1 mM L-リジン塩酸塩、pH 7.5)で平衡化して、粗抽出物(総タンパク質5 g)をロードした。バッファーAからバッファーB (20 mM Tris/HCl、750 mM NaCl、1 mM アスコルビン酸、1 mM L-リジン塩酸塩、pH 7.5)への直線濃度勾配を適用し、活性画分を集めた。

30

【0113】

Ehrlich試薬を用いて、画分の活性を次のように測定した：50 mLタンパク質サンプルを、50 μ L 5-ヒダントイン (100 mM、100 mMホウ酸バッファー、pH 9、中)とともに室温にて10-60分間(酵素含量によって決まる)インキュベートした。サンプル中に存在するタンパク質を、150 μ Lの12%トリクロロ酢酸(TCA)添加により完全に沈殿させて、遠心分離により除去した。50 μ L 4-(ジメチルアミノ)-ベンズアルデヒド (10%、6 M HCl中)を200 μ L上清に添加し、光度計で450 nmにて測定した。

【0114】

2.3. 疎水性クロマトグラフィー (Phenyl Sepharose Fast Flow)

40

直径5 cm、長さ21 cmのPhenyl Sepharoseカラムを使用した。水を加えて、プールしたイオン交換クロマトグラフィーの活性画分 (280 ml) を500 mlに希釈し、67 g (NH₄)₂SO₄を添加して25%飽和として、その結果得られた混合物をカラムにかけた。ランニングバッファーA (20 mM Tris、(NH₄)₂SO₄で25%飽和、1 mM リジン、1 mM アスコルビン酸、pH 7.5; 洗浄バッファーとしても使用) を15 mL/分の低流速で加えた。カラム体積の2倍量のランニングバッファーB (20 mM Tris、1 mM リジン、1 mM アスコルビン酸、pH 7.5) の添加によりカラム環境をランニングバッファーBへと直線的に変化させた後、カラム体積の2倍量のバッファーBを溶出のために添加した。その後洗浄のためにバッファーC (10 mM Tris/HCl、pH 7.5、10% 2-propanol) を使用した。Ehrlich試薬を用いたヒダントイナーゼアッセイによる測定で最大の吸収を示す活性画分をプールした。

50

【0115】

2.4 分子ふるいクロマトグラフィー (Superdex Prep Grade 200 ゲル濾過)

次の精製ステップのために、Superdex 200カラム（直径2.6 cm、長さ60 cm）を4 mL/分の流速で稼働させた。疎水性クロマトグラフィーから得られた、プールされた活性画分に、70.2 gの $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を添加して80%飽和とし、得られた混合物を遠心分離（20分、12,000 rpm）してペレットを得た。得られたペレットを10 mLの均一濃度ランニングバッファー（20 mM Tris/HCl、pH 7.5）に溶解し、カラムに加えた。

【0116】

2.5 Blue HiTrap 5 mLアフィニティクロマトグラフィー

Blue HiTrap 5 mLアフィニティクロマトグラフィーカラムを、バッファーA（20 mM Tris/HCl、pH 7.5）で平衡化した。分子ふるいクロマトグラフィーから、Ehrlich試薬を用いたヒダントイナーゼアッセイにより測定され（確認されたい）、プールされた活性画分をロードした後、カラムを、均一濃度で5カラム容のバッファーB（20 mM Tris/HCl、500 mM NaCl、pH 7.5）を用いて作動させ、次に2カラム容のバッファーC（20 mM Tris/HCl、pH 7.5、500 mM NaCl、1 mM NAD、1 mM NADP）で作動させた。このアフィニティクロマトグラフィーステップを用いて、カラムへの結合によりグルコースデヒドロゲナーゼ（グルコースおよびNAD/NADPに関して活性を示さない）を除去した。

【0117】

2.6 陰イオン交換クロマトグラフィー (Mono Q HR 5/5)

前のアフィニティクロマトグラフィーから得られた素通り画分をMono Qカラム（直径0.5 cm）に、流速1 mL/分でロードした。ランニングバッファーA（20 mM Tris/HCl、pH 7.5）からランニングバッファーB（20 mM Tris/HCl、750 mM NaCl、pH 7.5）への直線濃度勾配を適用した。画分のプールは、それぞれの画分の活性およびタンパク質ゲル中のバンドの存在に基づいて行った。

【0118】

2.7 Superose 6 Prep Grade 125 mLゲル濾過

先行の陰イオン交換クロマトグラフィーから得られた、プールされた活性画分を1 mLの容積まで濃縮し（分子量カットオフ10 kDのCentriprepデバイスを使用）、1 mL/分の流速でSuperoseカラムにロードした。ランニングバッファーとして20 mM Tris/HCl（pH 7.5）を使用した。

【0119】

上記のさまざまな精製ステップから分け取った一定量をゲルにロードして、SDSポリアクリルアミド電気泳動（SDS PAGE）に供した。その結果得られたゲルをCoomassie Blueで染色し、それを図1に示すが、レーンは左から右へ向かって下記に対応する：

- 1) 分子量標準（Precision Plus Protein Marker from BioRad、それぞれ10、15、20、25、37、50、75、100、150および250 kDに対応する）
- 2) 精製前の無細胞抽出液
- 3) Q-Sepharose FF陰イオン交換画分
- 4) Phenyl sepharose FF HIC画分
- 5) Superdex Prep Grade 200ゲル濾過画分
- 6) Blue HiTrap 5 ml アフィニティクロマトグラフィー画分
- 7) Mono Q HR 5/5 陰イオン交換画分
- 8) Superose 6 prep grade 125 mLゲル濾過画分
- 9) 分子量標準（レーン1と同様）
- 10) 別個の標品（Mono Q HR 陰イオン交換画分に相当）。

【0120】

約55 kDの分子量を有する部分精製タンパク質が得られた（図1において上の矢印で示す）。約35 kDの第2のタンパク質（図1において下の矢印で示す）はグルコースデヒドロゲナーゼである。

【0121】

10

20

30

40

50

Superose 6 Prep Gradeゲル濾過から得られたプール画分をクロロホルム/メタノールで沈殿させて、その沈殿に500 μLギ酸(70%)を加えた。臭化シアン切断を実施するために、1-2 BrCN結晶を添加した。ウシ血清アルブミン溶液(BSA、2 mg/mL)を切断の対照として使用した。これら2つの溶液を2-3時間室温にてインキュベートした後、ギ酸および臭化シアンを窒素気流により除去した。残渣を1%メルカプトエタノール含有トリシングルサンプルバッファー中に溶解し、95 °Cにて5分間インキュベートした。得られたサンプルをトリシングルにロードし(10-20%勾配)、PVDF膜にプロットした。プロット上のペプチド断片を染色により識別し、N-末端配列決定法に供した。

【0122】

次の可能性のあるペプチド配列が同定された：

10

IELGITGPEGQRLAGPTVL	(配列番号1)
IELGITGPEGQRLAGPVL	(配列番号2)
IELITGPEGQRLAGPTVL	(配列番号3)
IELITGPEGQRLAGPVL	(配列番号4)
EEIARARKSGQRVIGEPVAS	(配列番号5)
ITGPEGQRLAGP	(配列番号7)

得られた部分配列は、Genbankアクセション番号ACU20291(配列番号6)のダイズ(Glycine max)由来配列に対して高い相同意を有するが、このダイズ由来配列はD-ヒダントイナーゼに帰せられるので、単離されたタンパク質のヒダントイナーゼ性を裏付ける。配列番号6を下記に示し、相同意を有する領域に下線を付す。

20

【0123】

mqfsitsqflhifsltifiiitsslsqssqfcdagteipsskllikggtvvnaghqia
 dvyvedgiivavnpnimvgddvtvidatgkyvmpggidphthldmdvgftatvddffsgqaaal
 aggttihidfviplngsntagfedyekkakkscmdygfhmvitkwdetvsremelmvkekgins
 fkffmaykgilmindelllegfkckkslgavamvhaengdavyegqrkm*ielgitgpeghalsr*
pavlegeatarairladfvntplyvvhvmsidamee*iakarkagqr*vige*piasgl*adeswlw
 hpdfeiaakyvmsppirkrghdkalqaalstgvlqlvgtdhcafns*tqkargiddfrkmpngvn*
 gieermhilvwdimvesgqisvtdyvritstecakifniyprkgavlpgsdadiiilnpsnfem
 sakshhsrltdtnvyegrrgkkgkievtiaggrvvennelkvtpgtgryiqmppsylfdgldkk
 daiylnslqapvkarakas

30

【実施例3】

【0124】

市販のヒダントイナーゼと単離されたヒダントイナーゼとの活性比較

Sigmaから購入したヒダントイナーゼ、および実施例2で単離されたヒダントイナーゼの活性を比較した。

【0125】

Sigmaの酵素と精製ヒダントイナーゼ(BP)の比活性を測定して比較するために、50 mM Tris HCl pH 7.5中に溶解した5 mMヒダントイン、5-フェニルヒダントイン、または6-フェニルジヒドロウラシルのそれぞれを、さまざまな量の酵素とともに40 °Cにて30分間インキュベートした。

40

【0126】

濃塩酸の添加により反応を終了させたのち、HPLCにより測定した。

【0127】

下記の表1は、Sigmaの酵素、および実施例2で単離された酵素の比活性を示す。2つの酵素はいずれも、5-フェニルヒダントインに対してもっとも高い活性を示し、ヒダントインがこれに次いだ。

【表1】

基質	Sigma から購入した酵素	実施例2から得られた酵素
ヒダントイン	217	425
5-フェニルヒダントイン	261	557
6-フェニルジヒドロウラシル	6	72

【実施例4】

10

【0128】

ラセミ体6-置換ジヒドロウラシルの合成（全体構想）

必要とされる6-置換ジヒドロウラシル4a-i(図2)は、2つの選択可能な経路の1つによって調製した。方法A(Cabaleiro, M. C., Journal of Chemical Research 7:318-320, 2000)では、尿素を適当なケイ皮酸誘導体7とともに、190℃で2-4時間加熱した後、生成物を再結晶し、4a-iを45%の収率で得た。方法Bは、対応するラセミ体 アミノ酸をシアノ酸カリウムとともに処理し、続けて加熱して環化を生じさせ、高い収率で4a-iを与えた。方法Bはラセミ化なしで進行することが知られており、エナンチオマーとして純粋な(S)-6aを出発物質として使用することによりエナンチオマーとして純粋な(S)-4aおよび(S)-5aを調製するためにも用いられた。

20

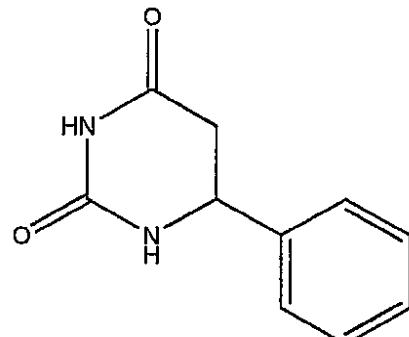
【実施例5】

【0129】

ラセミ体6-置換ジヒドロウラシルまたは前駆体分子の合成（個別の合成）

a) 下記の式の(±)-6-フェニルジヒドロウラシルの合成

【化8】



30

【0130】

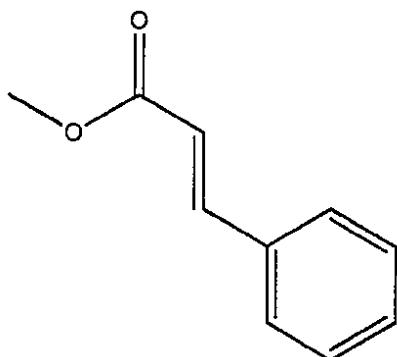
trans-ケイ皮酸(10.00 g, 67.5 mmol)および尿素(20.25 g, 337.5 mmol)の混合物を30分以上210℃に加熱した。この結果、均一な黄色液体が形成された。反応の進行する1時間ごとに尿素(2.03 g, 33.8 mmol)を添加した。4時間攪拌後、沸騰水(80 mL)を加え、反応混合物はさらに1時間95℃で攪拌しておいた。熱濾過により反応混合物から残存する固体を除去した後、生成した白色沈殿を濾過によって分離し、白色固体が与えられた(6.0 g、収率46%)。R_f 0.3(EtOAc); ¹H(400 MHz, DMSO-d₆) 2.61(1H, dd, J = 6.8, 16.1, CH₂), 2.83(1H, dd, J = 5.8, 16.1, CH₂), 4.64-4.70(1H, m, CHPh), 7.27-7.41(5H, m, Ph), 8.01(1H, bs, CHNHCO), 10.18(1H, br. s, CONHCO); ¹³C(100 MHz, DEPT, DMSO-d₆) 38.6(CH₂), 50.4(CHPh), 126.4(Ph), 128.0(Ph), 129.0(Ph), 141.5(CPh), 154.2(NHCONH), 170.2(NHCOCH₂); R_t 9.6および14.8分(Chirobiotic T、酢酸アンモニウムバッファーpH 5.5:メタノール 7:3, 1 mL/分)。

40

【0131】

b) 下記の式のtrans-ケイ皮酸メチルの合成

【化9】



10

【0132】

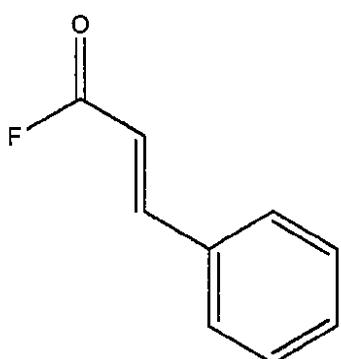
trans-ケイ皮酸 (500 mg、3.4 mmol) のメタノール溶液 (5 mL) に濃硫酸 (100 μ L) を加えた。マイクロ波 (300 W、200 μ J) で10分照射後、溶媒を減圧除去した。白色固体沈殿を酢酸エチル (10 mL) に溶解し、有機層を炭酸水素ナトリウム (5 mL) およびブライン (5 mL) で2回洗浄してから、溶媒を減圧除去して、白色結晶固体 (468 mg、86%) が与えられた。 ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) 3.73 (3H, s, CH_3), 6.65 (1H, d, J = 16.1, CHCHPh), 7.40-7.46 (3H, m, Ph), 7.67 (2H, d, J = 16.1, CHCHPh), 7.70-7.76 (2H, m, Ph)。

【0133】

20

c) 下記の式のフッ化ヒドロキシシンナモイルの合成

【化10】



30

【0134】

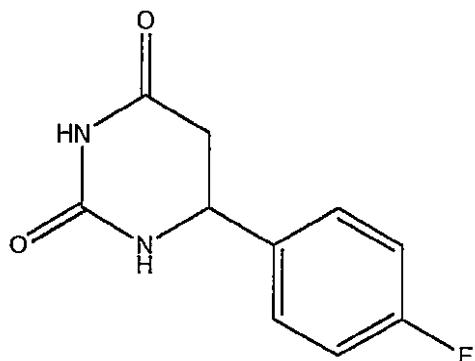
窒素気流下で搅拌した室温の、*trans*-ケイ皮酸 (500 mg、3.4 mmol) の無水DCM (5 mL) 溶液に、三フッ化ジメチルアミノ硫黄 (0.31 mL、2.4 mmol) を添加した。2時間搅拌した後、氷冷した水 (5 mL) を加えた。有機層を分離し、水層をDCM (5 mL) で抽出した。DCM層を合わせて、氷冷した水 (5 mL) で洗浄し、乾燥し (MgSO_4)、溶媒を減圧除去して褐色油状物 (451 mg、88%) が与えられたが、これを、それ以上精製することなくその後の反応に使用した。 ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): 6.78 (1H, dd, J = 8.0, 16.1 CHC(O)F), 7.45-7.55 (3H, m Ph), 7.81-7.86 (1H, m, Ph), 7.97 (1H, d, J = 16.0, CHPh). ^{13}C (100 MHz, DEPT, DMSO- d_6) 112.6 (CHCHPc), 129.4 (Ph), 129.6 (Ph), 132.3 (Ph), 133.5 (Ph), 152.2 (CHPh), 159.1 (C(O)F)。

40

【0135】

d) 下記の式の(±)-3-フルオロ-6-フェニルジヒドロウラシルの合成

【化11】



10

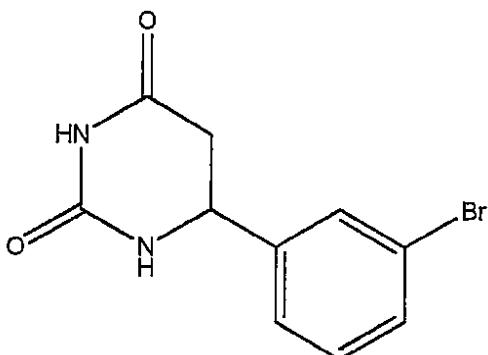
【0136】

p-フルオロ-trans-ケイ皮酸(1.00 g、6.67 mmol)および尿素(2.00 g、33.5 mmol)の混合物を30分以上210[°]Cに加熱した。この結果、均一な黄色液体が生成した。反応の進行する1時間ごとに、追加の尿素(0.40 g、6.67 mmol)を添加した。4時間攪拌後、沸騰水(20 mL)を加え、反応混合物はさらに1時間95[°]Cにて攪拌しておいた。熱濾過によって反応混合物から残存する固体を除去した後、生成した白色沈殿を濾過により分離し、黄色固体(0.75 g、収率60%)が与えられた。¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.61 (1H, dd, J = 6.8, 16.4, CH₂), 2.84 (1H, dd, J = 5.8, 16.4, CH₂), 4.64-4.70 (1H, m, CHPh), 7.27-7.42 (4H, m, Ph), 8.02 (1H, bs, CHNHCO), 10.19 (1H, br. s, CONHCO); ¹³C (100 MHz, DEPT, DMSO-d₆) δ 38.2 (CH₂), 50.0 (CHPh), 126.0 (Ph), 127.6 (Ph), 128.5 (Ph), 141.1 (Ph), 153.8 (NHCONH), 169.7 (NHCOCH₂); R_t 10.5および15.1分 (Chirobiotic T、酢酸アンモニウムバッファー、pH 5.5:メタノール 7:3、1.0 mL/分)。

【0137】

e) 下記の式の(±)-3-ブロモ-6-フェニルジヒドロウラシルの合成

【化12】



30

【0138】

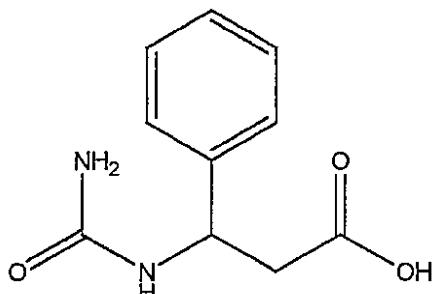
m-ブロモ-trans-ケイ皮酸(0.80 g、3.5 mmol)および尿素(1.26 g、21 mmol)の混合物を210[°]Cに加熱した。この結果、均一な黄色液体が生成した。反応が進行している1時間ごとに、追加の尿素(0.25 g、4.2 mmol)を添加した。4時間攪拌した後、沸騰水(20 mL)を加え、反応混合物はさらに1時間95[°]Cにて攪拌しておいた。熱濾過により反応混合物から残存する固体を除去した後、生成した白色沈殿を濾過により分離し、黄色固体(0.30 g、収率32%)が与えられた。¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.66 (1H, dd, J = 6.8, 17.4, CH₂), 2.84 (1H, dd, J = 5.6, 16.3, CH₂), 4.64-4.74 (1H, m, CHPh), 7.29-7.59 (4H, m, Ph), 8.04 (1H, br. s, CHNHCO), 10.23 (1H, br. s, CONHCO); ¹³C (100 MHz, DEPT, DMSO-d₆) δ 37.8 (CH₂), 49.5 (CHPh), 121.1 (Ph), 125.2 (Ph), 129.0 (Ph), 130.5 (Ph), 130.8 (Ph), 143.9 (Ph), 153.7 (NHCONH), 169.6 (NHCOCH₂); R_t 16.3および25.1分 (Chirobiotic T、酢酸アンモニウムバッファー、pH 5.5:メタノール 7:3、1.0 mL/分)。

【0139】

f) (±)-N-カルバモイル- -フェニルアラニンの合成

50

【化13】



【0140】

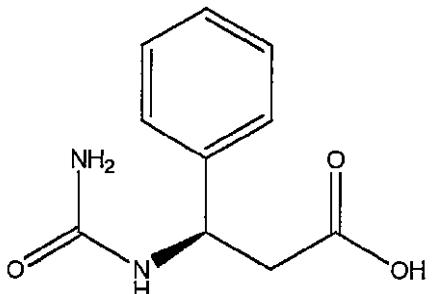
(\pm)-N-(6-aminohexyl)benzylamine-2-carboxylic acid (0.80 g, 4.85 mmol)を熱水(20 mL)中に入れて攪拌した溶液に、シアノ酸カリウム(0.60 g, 7.40 mmol)水溶液(2 mL)を添加した。90にて1時間攪拌した後、反応混合物を室温に冷却しておいてから、濃塩酸を用いて酸性とした($\text{pH} > 1$)。静置するとすぐに白色沈殿が生成し、それを濾過によって分離して、沸騰水から再結晶し、白色結晶固体(0.71 g, 71%)が与えられた。 ^1H (400 MHz, DMSO-d_6) 2.63 (2H, $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$), 5.00 (1H, dd, $J = 7.2, 8.7$, CHNH), 5.56 (2H, s, NH_2), 6.57 (1H, d, 8.7, CHNH), 7.18-7.34 (5H, m, Ph); ^{13}C (100 MHz, DEPT, DMSO-d_6) 41.4 (CH_2), 50.0 (CHPh), 126.3 (Ph), 126.7 (Ph), 128.1 (Ph), 143.4 (Ph), 157.8 (NHCONH), 172.0 (NHCOCH₂); R_t 3.1および3.4分 (Chirobiotic T、酢酸アンモニウムバッファー、pH 5.5:メタノール 7:3、1.0 mL/分)。

10

【0141】

g) 下記の式の(R)-カルバモイル- α -フェニルアラニンの合成

【化14】



【0142】

(R)-N-(6-aminohexyl)benzylamine-2-carboxylic acid (0.4 g, 2.43 mmol)を熱水(10 mL)中に入れて攪拌した溶液に、シアノ酸カリウム(0.3 g, 3.70 mmol)水溶液(1 mL)を添加した。90にて1時間攪拌した後、反応混合物を室温に冷却しておいてから、濃塩酸を用いて酸性とした($\text{pH} > 1$)。静置するとすぐに白色沈殿が生成し、それを濾過によって分離して、沸騰水から再結晶し、白色結晶固体(0.30 g, 60%)が与えられた。 ^1H および ^{13}C 解析は(\pm)-46と同一; R_t 3.4分 (Chirobiotic T、酢酸アンモニウムバッファー、pH 5.5:メタノール 7:3、1.0 mL/分)。

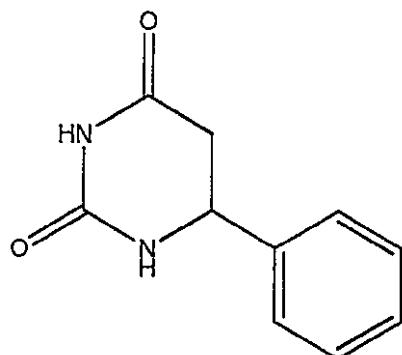
30

【0143】

h) (\pm)-N-カルバモイル- α -フェニルアラニンからの(下記の式の)(\pm)-6-フェニルジヒドロウラシルの合成

40

【化15】



10

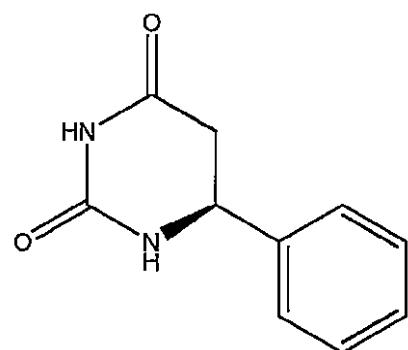
【0144】

(\pm)-N-カルバモイル- α -フェニルアラニン (100 mg、0.48 mmol) を濃塩酸 (5 mL) に溶解した溶液を135 度で4時間攪拌した。その時間の後、反応混合物の容積は75% 減少していたが、その反応混合物を室温に冷却した。静置すると白色沈殿が生成し、それを濾過により分離して、白色結晶固体 (50 mg、55%) が与えられた：分析は(\pm)-45と同一。

【0145】

i) 下記の式の(S)-6-フェニルジヒドロウラシルの合成

【化16】



20

【0146】

30

(S)- α -フェニルアラニン (100 mg、0.60 mmol) を熱水 (2 mL) 中に入れて攪拌した溶液に、シアノ酸カリウム (75 mg、0.93 mmol) 水溶液 (0.5 mL) を添加した。90 度にて1時間攪拌した後、濃塩酸 (2 mL) を添加し、反応液は135 度にて2時間攪拌した。その後、混合物の容積は75% 減少していたが、その反応混合物を室温に冷却した。静置すると白色沈殿が生成し、それを濾過により分離して、白色結晶固体 (55 mg, 48%) が与えられた； R_H および R_C の解析は(\pm)-45と同一； R_t 9.6 分 (Chirobiotic T、酢酸アンモニウムバッファー pH 5.5 : メタノール 7:3、1 mL/分)。

【実施例6】

【0147】

析出物およびヒダントイナーゼ反応生成物の分離

40

6-PDHUおよびNCBPAの、Q SepharoseおよびDEAE Sepharoseへの結合はマイクロキャップ (Eppendorf) 内でテストした。1 mL Q SepharoseまたはDEAE Sepharose (市販のエタノール懸濁液) を水 (3×1 mL) で洗浄した後、2.5 mM NCBPAおよび2.5 mM 6-PDHUを含有する溶液 (1 mL) を添加し、マイクロキャップをボルテックスしてから上清の一定分量を取り出した。上清中のNCBPAおよび6PDHUのパーセンテージをrpHPLCで測定し、それを表2に示す。

【表2】

樹脂の種類	上清中のパーセント(%)	
	NCBPA	6PDHU
Q	38	58
DEAE	22	67

【0148】

2つの樹脂への結合は迅速であり、Q SepharoseのN-カルバモイル- -フェニルアラニンとの結合はDEAEより少なく6-フェニルジヒドロウラシルとの結合はDEAEより多いので、DEAEのほうが分離のためにより好ましい陰イオン交換樹脂となる。 10

【実施例7】

【0149】

キラル逆相HPLC

キラルrpHPLCのために、下記のカラム、バッファーおよびランニング条件を使用した：
Astec Chirobiotic™ T 25 cm x 4.6 mm, 5 μm (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
酢酸アンモニウムバッファー(pH 5.5)：メタノール、70:30、25 °C、0.5 mL/分。

【実施例8】

【0150】

酵素、基質および生成物のDEAEクロマトグラフィーによる分離

カラムは、逆さにしたシリングから調製したが、グラスワールで塞いで、10カラム容のdH₂Oで洗浄済みのDEAE (4 mL) を充填した。200 mM酢酸アンモニウムバッファー (pH 4) で平衡化後、H₂O中NCBPA (2.5 mM)、6PDHU (2.5 mM) および酵素 (7 mg/mL) の合成混合物をカラムにかけ、素通り画分をrpHPLC (6PDHU/NCBPA検出) およびBradfordアッセイ (酵素検出) で分析した。6PDHUをカラムからすべて洗い流した後、200 mM酢酸アンモニウムバッファー (pH 8.17) を用いてNCBPAをカラムから溶出した。結果を図3に示す (四角は6-PDHUを表す；菱形はNCBPAを表し、三角は酵素を表す；6-PDHUおよびNCBPAはmM単位、酵素はmg/Lの単位で示す)。pH 4で、NCBPAと6PDHUとの明確な分離がみられ、NCBPAの収率90%が可能となった。 30

【実施例9】

【0151】

ヒダントイナーゼにより触媒されるラセミ体6-置換ジヒドロウラシルの加水分解

はじめに、ヒダントイナーゼ (Sigma, St. Louis, USAより購入) により触媒される(±)-6-PDHU (ラセミ体6-フェニルジヒドロウラシル) の加水分解 (図2の4a : R = Ph) をモデル系として検討した。反応はTrisバッファー [pH 7.5] 中5 mMの基質濃度で行い、実施例7に記載の逆相キラルHPLCでモニターしたが、これにより、反応における変換の程度、ならびに未反応ジヒドロウラシル4aおよびN-カルバモイル誘導体5の鏡像体過剰率の両者の同時測定が可能となった (図4、スキーム2も参照されたい)。 40

【0152】

以下の観察結果に注目した：

- (i) ヒダントイナーゼ酵素は、6-PDHU (4a)の(S)-エナンチオマーに対して高度に選択性であって、E値 > 100であることが判明した。生成物(S)-N-カルバモイル- -フェニルアラニン[(S)-NCBPA]および未反応基質(R)-6-PDHUの絶対配置は標準品と比較して決定した；
- (ii) 高い(S)エナンチオ選択性が観察されたにもかかわらず、反応時間を延長した後でも、変換は50%まで進行しなかった。すべての反応は、6-PDHU : (S)-NCBPA = 51:49の平衡濃度を与えた。(S)-NCBPAの鏡像体過剰率は全観察期間の間、96%を越えた。図5は小さい反応器内で25 mL反応から得られた結果を示すが、ここで菱形はNCBPAの濃度[mM]、四角は6-PDHUの濃度[mM]を表し、×印は鏡像体過剰率[%]を表す。

【0153】

10

20

30

40

50

(iii) 逆反応、すなわちN-カルバモイル- -フェニルアラニンの環化は、加水分解に対してかなりの比率を有することが判明し、これも高度に(S)-選択性であって(R)-エナンチオマーの環化はあまり見られなかった。図6は、酵素あり、および酵素なしでの、(+/-)-、(S)-および(R)-NCBPAの変換を示し、実線でつながれた黒菱形もしくは白抜き菱形はそれぞれ、+/-NCBPA（酵素なし）、もしくは+/-NCBPA（酵素あり）を表し、実線で結ばれた黒四角もしくは白抜き四角はそれぞれ、(S)-NCBPA（酵素なし）もしくは(S)-NCBPA（酵素あり）を表し、さらに実線で結ばれた黒三角もしくは白抜き三角はそれぞれ、(R)-NCBPA（酵素なし）もしくは(R)-NCBPA（酵素あり）を表す。

【実施例10】

【0154】

10

6-PDHUのキラル加水分解のpH依存性

6-PDHUは、さまざまなpH値のTrisバッファー中で、50℃にて24時間インキュベートした。6-PDHUの相当なバックグラウンド加水分解は、pHおよびバッファーに強く依存して生じた。pH 7.0のTrisバッファー中で、0.5%のバックグラウンド加水分解が認められた。pH 9では、バックグラウンド加水分解は約20%に達した（図7）。

【実施例11】

【0155】

ヒダントイナーゼ活性のpH依存性

6-PDHUをリン酸バッファー（0.1M、リン酸二水素カリウムおよびリン酸水素二カリウム、適当なpHに調整された量）またはTrisバッファー中で、さまざまなpH値にてインキュベートした（8時間まで、Sigma製D-ヒダントイナーゼ7 g/Lを使用）。約pH 7.5から約pH 9.0までの範囲で、もっとも高い変換率が観察された（図8、四角はリン酸バッファーを、菱形はTrisバッファーを表す）。

20

【0156】

追加の実験において、リン酸もしくはTrisバッファーについて、さまざまなpHで、経時的に変換率を測定した。5 mM 6-PDHUをリン酸バッファー（pH 6.0, 7.0, 7.5, 8.0）およびTrisバッファー（pH 7.5）中で22時間インキュベートした。結果を図9（菱形、四角、三角および×印はそれぞれpH 6, pH 7, pH 7.5またはpH 8のリン酸バッファーを表し、黒丸はpH 7.5のTrisバッファーを表す）および表3（ee = 鏡像体過剰率[%]）に示す。

【表3】

30

バッファー	pH	ee
リン酸	6.00	>99.90
リン酸	7.00	>99.90
リン酸	7.50	96.62
リン酸	8.00	92.73
Tris	7.50	>99.90

【0157】

40

変換は、リン酸バッファー中pH 6.0で望ましい基質の高い鏡像体過剰率で進行するが、変換率は7.00から8.00までのpH値での変換率と比較してかなり低い。

【実施例12】

【0158】

アズキ(*Vigna angularis*)ヒダントイナーゼの基質特異性

実施例4に記載のように、さまざまな基質を合成し、ヒダントイナーゼが触媒する変換反応に供した[Trisバッファー（pH 7.5, 0.1M, 1.0 mL）、D-ヒダントイナーゼ（Sigma, 7 g/L）、基質（5mM溶液、芳香族置換基(4a, 4b, 4c)でなければバッファー中にあらかじめ溶解、芳香族置換基の場合、基質は100 μL DMSOに溶解して900 μLバッファーに加えた）]。反応は図10に示し、結果は表4に示すが、このE値は下記のように定義される：

50

$$E\text{ 値} = (\ln(1 - [\text{生成物}]^*(1+ee))) / (\ln(1 - [\text{生成物}]^*(1-ee)))$$

【表4】

基質	R ¹	R ²	合成法	収率 NCBAA/%	収率 DHU/%	酵素的加水 分解の相対 的比率	E 値
4a	C ₆ H ₅	H	A & B	88	77-82	7	>200
4b	p-F-C ₆ H ₄	H	B	56	67	15	>100
4c	p-Cl-C ₆ H ₄	H	B	71	75	41	>100
4d	ベンジル	H	B	87	58	79	0
4e	H	H	B	55	-	100	-
4f	i-Pr	H	B	80	24	46	3
4g	i-Bu	H	B	68	67	55	2
4h	Me	H	-	-	-	52	5
4i	(Me) ₂	H	B	20	100	0	-
8	H	Me	-	-	-	23	-

【実施例13】

【0159】

ヒダントイナーゼが触媒する変換に及ぼす有機共溶媒の影響

5 mM 6-PDHUの生物学的変換は、2% DMSO含有バッファー、およびMTBE（約5容量%）またはブタン-2-オール（約15容量%）で飽和したバッファー中に、5 mLスケールで実施した。結果を図11に示すが、そこで菱形はバッファーを表し、四角は2% DMSO含有バッファー、三角はMTBE含有バッファー、そして×印はブタン-2-オール含有バッファーを表す。DMSOもMTBEも変換にあまり影響を及ぼさなかったが、ブタン-2-オールは使用した濃度でNCBPAの量を減少させた。

【実施例14】

【0160】

変換および鏡像体過剰率に及ぼす酵素量の影響

5 mM 6-PDHUを含有するそれぞれ5 mL Trisバッファー、pH 7.5の全反応容量で、温度50にて、3つの反応設定を並行して実施した。1つの反応では、通常の酵素量（7 g/L）を用いたが、他の設定は0.25倍相当量（1.75 g/L）および4倍相当量（28 g/L）をそれぞれ含有した。N-カルバモイル- -フェニルアラニン（NCBPA）の生成、およびS-エナンチオマーの鏡像体過剰率をさまざまな時点で測定した。結果を図12に示すが、この縦線、斜線、または横線で網掛けされた柱状図はそれぞれ、0.25倍、1倍、または4倍相当量の酵素の存在下で得られたNCBPAの濃度を表し、菱形、四角および三角はそれぞれ、0.25倍、1倍、

10

20

30

40

50

または4倍相当量の酵素の存在下での対応する鏡像体過剰率を表す。

【実施例 15】

【0161】

ヒダントイナーゼにより触媒される反応のスケールアップ

3つの独立して行われた生物学的変換において、20 mM 6-PDHUを、25 mM バッファー (Trisバッファー pH 7.5) の全反応容量で、175 mg ヒダントイナーゼの存在下50 にてインキュベートした。バッファーのpHは6-PDHUの添加後に調整し、NaOHの自動滴定により反応過程のあいだ一定に保った。NCBPAの濃度、およびS-エナンチオマーの鏡像体過剰率を測定するために、さまざまな時点で一定量を分け取った。結果をそれぞれ図13および図14に示す。図13において、菱形、四角および三角はそれぞれリアクターラン1、リアクターラン2 10 およびリアクターラン3を表す。図14において、菱形、四角および三角はそれぞれリアクターラン1、リアクターラン2、およびリアクターラン3で観察された鏡像体過剰率を表し、実線、破線、および点線はそれぞれリアクターラン1、リアクターラン2、およびリアクターラン3で観察された鏡像体過剰率の、もっとも当てはまる曲線を表す。

【0162】

配列番号のまとめ

配列番号1 - 単離されたヒダントイナーゼから得られたペプチド配列

配列番号2 - 単離されたヒダントイナーゼから得られたペプチド配列

配列番号3 - 単離されたヒダントイナーゼから得られたペプチド配列

配列番号4 - 単離されたヒダントイナーゼから得られたペプチド配列

配列番号5 - 単離されたヒダントイナーゼから得られたペプチド配列

配列番号6 - 配列基準としてダイズ (Glycine max) 由来のヒダントイナーゼ

配列番号7 - 単離されたヒダントイナーゼから得られた部分的ペプチド配列

略号

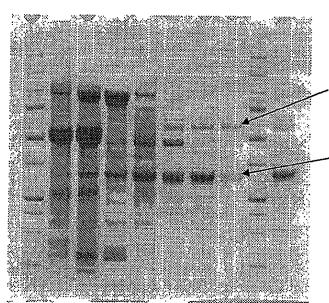
NCBPA - N-カルバモイル- -フェニルアラニン

6PDHU - 6-フェニルジヒドロウラシル

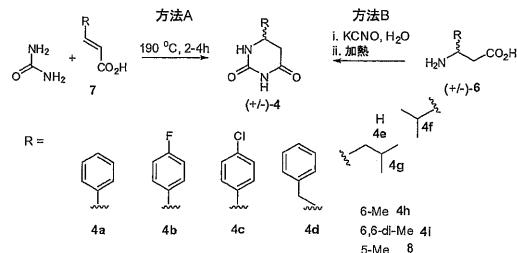
10

20

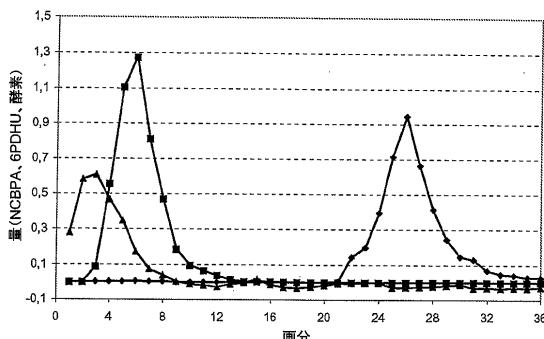
【図1】



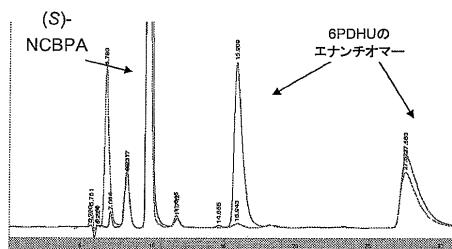
【図2】



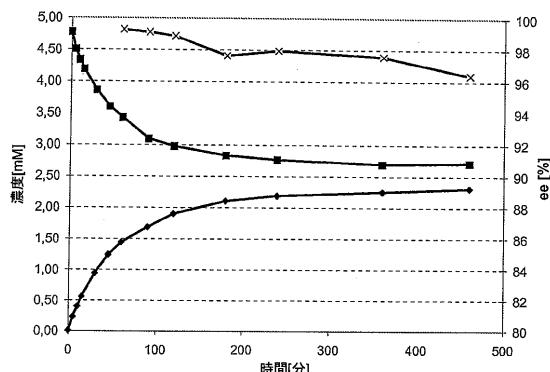
【図3】



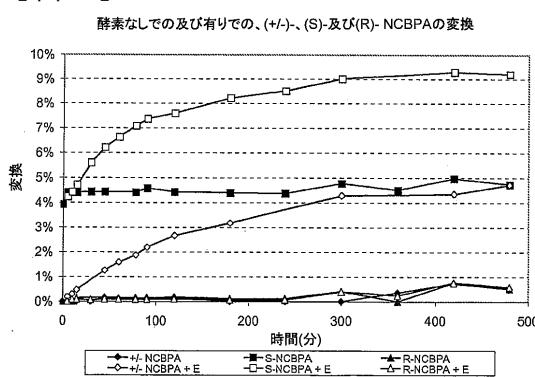
【図4】



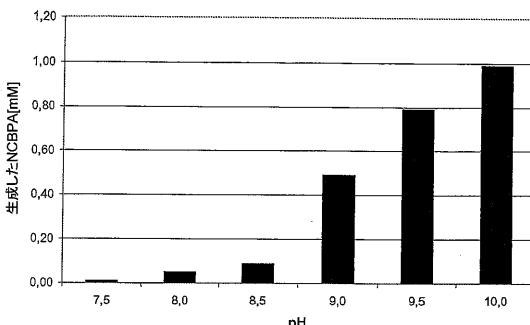
【図5】



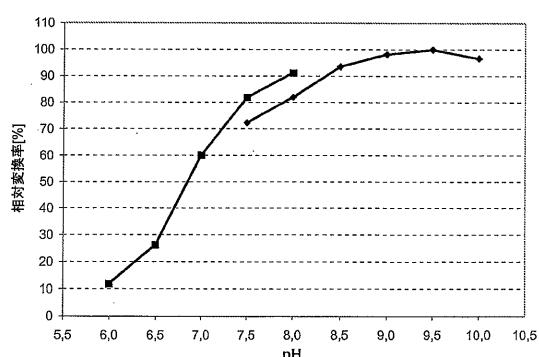
【図6】



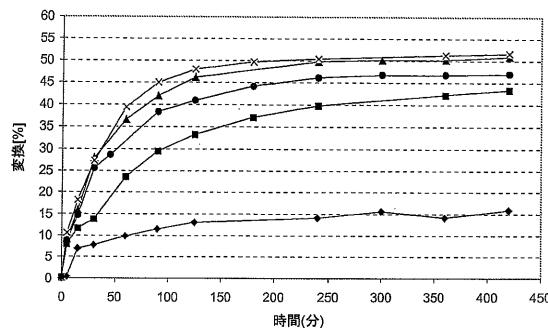
【図7】



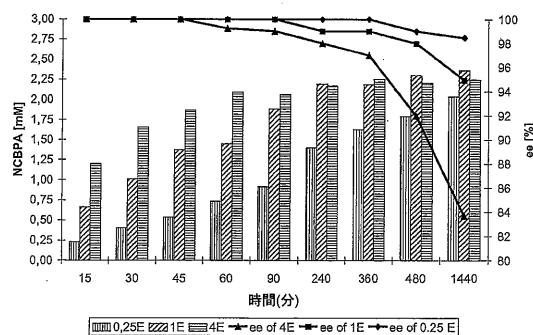
【図8】



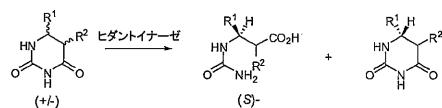
【図9】



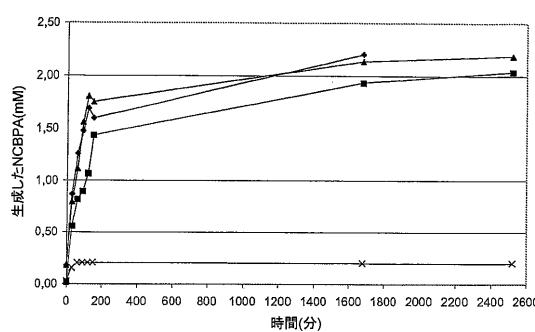
【図12】



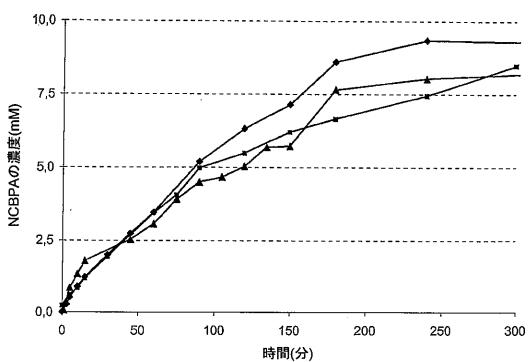
【図10】



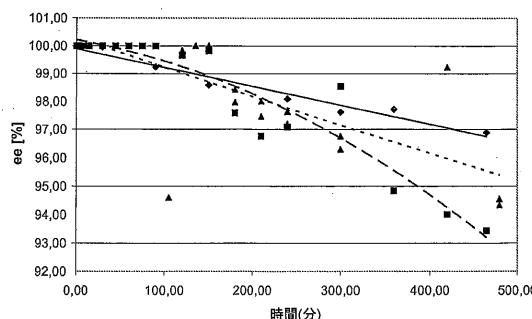
【図11】



【図13】



【図14】



【配列表】

0005919192000001.app

フロントページの続き

(74)代理人 100111741
弁理士 田中 夏夫
(72)発明者 シュナイダー , ニーナ
ドイツ連邦共和国 77654 オッフェンブルク , カール - プロス - シュトラーセ 3
(72)発明者 ハウアー , ベルンハルト
ドイツ連邦共和国 67136 フースゲンハイム , メロヴィンガー シュトラーセ 1
(72)発明者 ディトリッヒ , クラウス
ドイツ連邦共和国 67161 ゲーンハイム , ヘルマン - ジンスハイマー - ヴェーク 11
(72)発明者 オニール , メーヴ
アイルランド国 ピーティー 49 オーピーディー , リナラディ , ドラムサーン ロード 24
(72)発明者 ターナー , ニック
イギリス国 エムアイ 70エヌ マンチェスター , ブリンセス ストリート 131 , エムアイ
ビー

審査官 小金井 悟

(56)参考文献 特開平06-261787 (JP, A)
Chemie Ingenieur Technik , 2009年 8月 , Vol.81, No.8 , p.1255
Catalysis Letters , 2002年 4月 , Vol.79, No.1-4 , p.17-19
Biochemical Engineering Journal , 2001年 9月 , Vol.8, No.2 , p.157-164

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)
C12N 15/00 - 15/90
C12P 1/00 - 41/00
PubMed
JST Plus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamIII)
Caplus / REGISTRY (STN)