

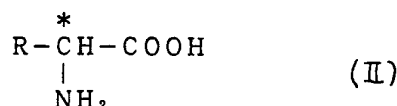
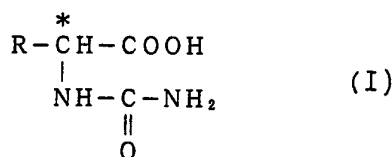


特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 5 C12P 13/04, C12N 9/80//C12N 1/20 (C12P 13/04, C12R 1:01) (C12P 13/04 C12R 1:05)(C12P 13/04 C12R 1:06)(C12P 13/04, C12R 1:41) (C12N 9/80, C12R 1:01)(C12N 9/80 C12R 1:05)(C12N 9/80, C12R 1:06) (C12N 9/80, C12R 1:41)(C12N 1/20 C12R 1:01)(C12N 1/20, C12R 1:05) (C12N 1/20, C12R 1:06)(C12N 1/20 C12R 1:41)	A1	(11) 国際公開番号 WO 94/08030 (43) 国際公開日 1994年4月14日 (14.04.1994)
(21) 国際出願番号 PCT/JP93/01408 (22) 国際出願日 1993年10月1日 (01. 10. 93) (30) 優先権データ 特願平4/265914 1992年10月5日 (05. 10. 92) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 鐘淵化学工業株式会社 (KANEGAFUCHI CHEMICAL INDUSTRY CO., LTD.) [JP/JP] 〒530 大阪府大阪市北区中之島三丁目2番4号 Osaka, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 山田秀明 (YAMADA, Hideaki) [JP/JP] 〒606 京都府京都市左京区松ヶ崎木ノ本町19番地の1 Kyoto, (JP) 清水 昌 (SHIMIZU, Sakae) [JP/JP] 〒604 京都府京都市中京区西ノ京伯楽町14番地 Kyoto, (JP) 池中原裕 (IKENAKA, Yasuhiro) [JP/JP] 〒673 兵庫県明石市川崎町2-13-1037 Hyogo, (JP) 矢島麗嘉 (YAJIMA, Kazuyoshi) [JP/JP] 〒673 兵庫県明石市小久保120-55-A804 Hyogo, (JP)	山田勇喜雄 (YAMADA, Yukio) [JP/JP] 〒675 兵庫県加古川市加古川町美乃利34-6 Hyogo, (JP) 難波弘憲 (NANBA, Hirokazu) [JP/JP] 〒676 兵庫県高砂市高砂町沖浜町2-63 光雲寮 Hyogo, (JP) 高野昌行 (TAKANO, Masayuki) [JP/JP] 〒674 兵庫県明石市二見町東二見299-3-106 Hyogo, (JP) 高橋里美 (TAKAHASHI, Satomi) [JP/JP] 〒655 兵庫県神戸市垂水区神和台1-13-13 Hyogo, (JP) (74) 代理人 弁理士 青山 保, 外 (AOYAMA, Tamotsu et al.) 〒540 大阪府大阪市中央区城見2丁目1番61号 ツイン21 MIDタワー内 Osaka, (JP) (81) 指定国 KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書	

(54) Title : PROCESS FOR PRODUCING D-α-AMINO ACID

(54) 発明の名称 D-α-アミノ酸の製造法

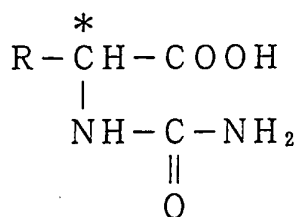


(57) Abstract

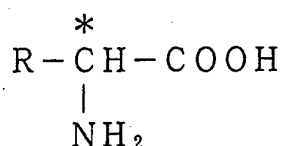
A process for producing a D-α-amino acid represented by general formula (I), (wherein R represents phenyl, hydroxylated phenyl, substituted or unsubstituted alkyl, or thienyl) by treating an N-carbamyl-D-α-amino acid represented by general formula (II), (wherein R is as defined above) in an aqueous medium with an enzyme produced by a microorganism, wherein use is made of a decarbamylase which can be produced by a microorganism belonging to the genus *Comamonas*, *Blastobacter*, *Alkaligenes*, *Sporosarcina*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, or *Arthrobacter*. The D-α-amino acid can be produced from the N-carbamyl-D-α-amino acid under neutral to alkaline conditions.

(57) 要約

一般式：



[式中、Rはフェニル基、水酸基で置換されたフェニル基、置換または未置換アルキル基、もしくはチエニル基を示す。] で表わされるN-カルバミル-D- α -アミノ酸に、水性媒体中で、微生物の産生する酵素を作用させ、一般式：



[式中、Rは前記と同意義である。]

で表わされるD- α -アミノ酸を製造する方法において、N-カルバミル-D- α -アミノ酸をD- α -アミノ酸に変換する酵素デカルバミラーゼとして、コマモナス属、ブラストバクター属、アルカリゲネス属、スピロサルシナ属、リゾビウム属、ブラディリゾビウム属またはアルスロバクター属に属する微生物が産生することのできる酵素を用いる。

中性ないしアルカリ性においてN-カルバミル-D- α -アミノ酸からD- α -アミノ酸を製造することができる。

情報としての用途のみ

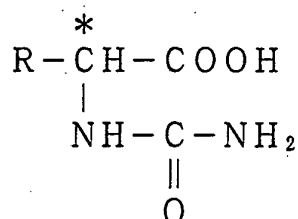
PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AT	オーストリア	CS	チェッコスロヴァキア	KR	大韓民国	PL	ポーランド
AU	オーストラリア	CZ	チェッコ共和国	KZ	カザフスタン	PT	ポルトガル
BB	バルバドス	DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	RO	ルーマニア
BE	ベルギー	DK	デンマーク	LK	スリランカ	RU	ロシア連邦
BF	ブルキナ・ファソ	ES	スペイン	LU	ルクセンブルグ	SD	スーダン
BG	ブルガリア	FI	フィンランド	LV	ラトヴィア	SE	スウェーデン
BJ	ベナン	FR	フランス	MC	モナコ	SI	スロヴェニア
BR	ブラジル	GA	ガボン	MG	マダガスカル	SK	スロヴァキア共和国
BY	ベラルーシ	GB	イギリス	ML	マリ	SN	セネガル
CA	カナダ	GN	ギニア	MN	モンゴル	TD	チャード
CF	中央アフリカ共和国	GR	ギリシャ	MR	モーリタニア	TG	トーゴ
CG	コンゴ	HU	ハンガリー	MW	マラウイ	UA	ウクライナ
CH	スイス	IE	アイルランド	NE	ニジェール	US	米国
CI	コート・ジボアール	IT	イタリア	NL	オランダ	UZ	ウズベキスタン共和国
CM	カメルーン	JP	日本	NO	ノルウェー	VN	ヴェトナム
CN	中国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NZ	ニュージーランド		

明 細 書

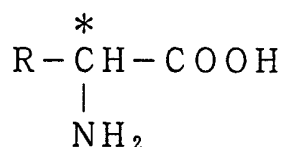
D- α -アミノ酸の製造法産業上の利用分野

本発明は、一般式：



[式中、Rはフェニル基、水酸基で置換されたフェニル基、置換または未置換の、好ましくは炭素数1～5のアルキル基またはチエニル基を示す。]

で表わされるD-N-カルバミル- α -アミノ酸に、カルバミル基を除去する能力を有する酵素（以下、「デカルバミラーゼ」と言う。）を作用させ、一般式：



[式中、Rは前記と同意義である。]

で表わされるD- α -アミノ酸を製造する方法に関する。

このような光学活性なD- α -アミノ酸類は、医薬中間体として重要な化合物であり、特に半合成ペニシリン、半合成セファロスポリンの製造中間体としての、D-フェニルグリシンやD-(4-ヒドロキシフェニル)グリシン（以下、「D-HPG」と言う。）等が工業的に有用な化合物として挙げられる。

従来技術

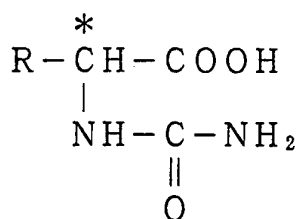
D- α -アミノ酸類の製造法としては、対応するD-N-カルバミル- α -アミノ酸類のカルバミル基を除去して、これを得る方法が知られており、この際のカルバミル基の除去は、化学的方法（特公昭58-4707号公報参照）や微生物の酵素反応を利用する方法（特公昭57-18793号公報、特公昭63-20520号公報および特公平1-48758号公報参照）によって行われている。

しかし、これらの微生物の酵素は、中性付近に至適pHをもつものが多い。D- α -アミノ酸に対応するDL-5-置換ヒダントインを、酵素の作用によりD-体を選択的に加水分解してN-カルバミル-D- α -アミノ酸を得、続いてデカルバミラーゼを作用させてD- α -アミノ酸を得る反応では、第1段階のヒダントイン水解酵素の至適pHがpH8~9にあるため、第2段階のデカルバミラーゼとは異なる反応系で行う必要があった。

発明の要約

本発明者らは、D-N-カルバミル- α -アミノ酸類に作用して酵素的にカルバミル基を除去してD- α -アミノ酸類に変換させる（以下、「脱カルバミル」と言う。）能力を有する微生物について、従来デカルバミラーゼの存在が知られていない属を中心に種々検討した結果、コマモナス（Comamonas）属、ブラストバクター（Blastobacter）属、アルカリゲネス（Alcaligenes）属、スポロサルシナ（Sporosarcina）属、リゾビウム（Rhizobium）属、ブラディリゾビウム（Bradyrhizobium）属またはアルスロバクター（Arthrobacter）属に属する細菌類に脱カルバミル活性が存在することを見出し、本発明を完成するに至った。

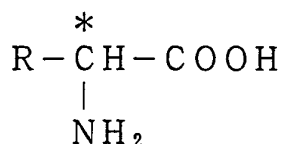
すなわち、本発明は、一般式（I）：



[式中、Rはフェニル基、水酸基で置換されたフェニル基、置換または未置換の、好ましくは炭素数1～5のアルキル基、もしくはチエニル基を示す。]

で表わされるN-カルバミル-D- α -アミノ酸に、水性媒体中で、微生物の産生する酵素を作用させ、

一般式 (II) :



[式中、Rは前記と同意義である。]

で表わされるD- α -アミノ酸を製造する方法において、

N-カルバミル-D- α -アミノ酸をD- α -アミノ酸に変換する酵素デカルバミラーゼとして、コマモナス (Comamonas) 属、ブラストバクター (Blastobacter) 属、アルカリゲネス (Alcaligenes) 属、スポロサルシナ (Sporosarcina) 属、リゾビウム (Rhizobium) 属、ブラディリゾビウム (Bradyrhizobium) 属またはアルスロバクター (Arthrobacter) 属に属する微生物が産生することのできる酵素を用いることを特徴とするD- α -アミノ酸の製造法を提供する。

図面の簡単な説明

図1は、新規スクリーニングによって取得した株の50℃と30℃での脱カルバミル反応の結果を示すグラフである。

図2は、コマモナスsp. E 2 2 2 Cの培養時に添加した化合物のデカルバミラーゼの生産に及ぼす影響を示すグラフである。

図3は、コマモナスsp. E 2 2 2 Cの精製デカルバミラーゼをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分析した結果を示す。

図4は、コマモナスsp. E 2 2 2 Cの精製デカルバミラーゼを、セファデックスG-150カラムによって、ゲル濾過した結果を示すグラフである。

図5は、コマモナスsp. E 2 2 2 Cの精製デカルバミラーゼを用いて反応時のpHの影響を調べた結果を示すグラフである。

図6は、コマモナスsp. E 2 2 2 Cの精製デカルバミラーゼを用いて、反応時の温度の影響を調べた結果を示すグラフである。

図7は、ブラストバクターsp. A 1 7 p-4の培養時に添加した化合物のデカルバミラーゼ生産に及ぼす影響を示すグラフである。

図8は、ブラストバクターsp. A 1 7 p-4の培養時に添加した金属イオンのデカルバミラーゼ生産に及ぼす影響を示すグラフである。

図9は、ブラストバクターsp. A 1 7 p-4の精製デカルバミラーゼをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分析した結果を示す。

図10は、ブラストバクターsp. A 1 7 p-4精製デカルバミラーゼを、セファデックスG-150カラムによってゲル濾過した結果を示すグラフである。

図11は、ブラストバクターsp. A 1 7 p-4精製デカルバミラーゼを用いて、反応時のpHの影響を調べた結果を示すグラフである。

図12は、ブラストバクターsp. A 1 7 p-4精製デカルバミラーゼを用いて、反応時の温度の影響を調べた結果を示すグラフである。

発明の詳細な説明

本発明で使用するデカルバミラーゼは、D-異性体に特異的に作用するものであっても、D-体、L-体いずれに作用する酵素であっても、實際上差し支えない。なお、D-N-カルバミル- α -アミノ酸に対する立体選択性の厳しい酵素は、D-N-カルバミル- α -アミノ酸アミドヒドロラーゼと呼ばれることがある。

これらの微生物の中で脱カルバミル活性が比較的高い菌株としては、コマモナスsp. E 2 2 2 C (FERM BP第4 4 1 1号, 通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所, 日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号(郵便番号3 0 5), 平成4年9月18日)、コマモナスsp. E 2 0 6 a、コマモナスsp. E 2 1 7 a、ブラストバクターsp. NA 8 8 -b、ブラストバクターsp. A 1 7 p-4 (FERM BP第4 4 1 0号, 通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所, 平成4年9月18日)、アルカリゲネスsp. E 2 1 5 (FERM BP第4 4 0 9号, 通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所, 平成4年9月18日)、アルカリゲネス・キシロソキシダンスsubsp. デニトリフィカンス (*Alcaligenes xylosoxidans* subsp. *denitrificans*) CL 6 6 -2 a、スポロサルシナsp. NCA 2 8 -b (FERM BP第4 4 0 8号, 通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所, 平成4年9月24日)、リゾビウスsp. KNK 1 4 1 5 (FERM BP第4 4 1 9号, 通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所, 平成5年9月22日)、ブラディリゾビウム・ジャポニカム (*Bradyrhizobium japonicum*) IFO 1 4 7 8 3、ブラディリゾビウムsp. IFO 1 5 0 0 3、アルスロバクターsp. CA 1 7 -2 (FERMBP第4 4 2 0号, 通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所, 平成5年9月22日) などがある。

上記細菌の代表例として、コマモナスsp. E 2 2 2 C、ブラストバクテ

—sp. A 17p-4、アルカリゲネスsp. E 215、スポロサルシナsp. NCA 28-b、リゾビウムsp. KNK 1415およびアルスロバクターsp. CA 17-2の菌学的性質を次に示す。

コマモナスsp. E 2 2 2 C

(a) 形態的性質

- ・桿菌（曲がっている）
- ・グラム染色性 バリエابل（Variable）
- ・孢子の有無 なし
- ・コロニー形態 淡黄色、やや半透明、丸い、規則的な、真円の、
輝きのある、低い凸面の、滑らかな、直径1mm（48hr）
- ・各温度での生育 37℃ +
- 41℃ -
- 45℃ -

(b) 生理学的性質

- | | |
|----------------------|-------|
| ・カタラーゼ | + |
| ・オキシダーゼ | — |
| ・グルコース発酵性 | — |
| ・NO ₃ 還元性 | — |
| ・インドール生成 | — |
| ・グルコースからの酸生成 | — |
| ・アルギニンデヒドロラーゼ | — |
| ・ウレアーゼ | — |
| ・エスクリン(Aesculin)加水分解 | — |
| ・ゼラチン加水分解 | — |
| ・β-ガラクトシダーゼ | — |
| ・チトクロムオキシダーゼ | +(弱い) |

(c) 資化性

- ・グルコース —
- ・アラビノース —
- ・マンノース —
- ・マンニトール —
- ・N-アセチル・グルコサミン —
- ・マルトース —
- ・グルコン酸 +
- ・カプロン酸 +

・アジピン酸	—
・リンゴ酸	+
・クエン酸	+
・フェニルアセテート	+

ブラストバクターsp. A 17p-4

(a) 形態的性質

・桿菌（卵型）	
・グラム染色性	陰性
・胞子の有無	なし
・コロニー形態	白、やや半透明、丸い、規則的な、真円の、輝きのある、低い凸面の、平滑な、ムコイド生成、直径1.0～1.5mm（48hr）

・各温度での生育	37℃	+
（48hr）	41℃	—
	45℃	—

(b) 生理学的性質

・カタラーゼ	+
・オキシダーゼ	+（弱い）
・グルコース発酵性	—
・NO ₃ 還元性	—
・インドール生成	—
・グルコースからの酸生成	—
・アルギニンデヒドロラーゼ	—
・ウレアーゼ	+
・エスクリン(Aesculin)加水分解	+
・ゼラチン加水分解	—
・β-ガラクトシダーゼ	+
・チトクロムオキシダーゼ	+

(c) 資化性

・グルコース	+
・アラビノース	+
・マンノース	+
・マンニトール	+
・N-アセチルグルコサミン	+
・マルトース	+
・グルコン酸	—
・カプロン酸	—

- ・アジピン酸 —
- ・リンゴ酸 —
- ・クエン酸 —
- ・フェニルアセテート —

アルカリゲネス sp. E 2 1 5

(a) 形態的性質

- ・桿菌
- ・グラム染色性 バリアブル (Variable)
- ・胞子の有無 なし
- ・運動性 あり
- ・コロニー形態 淡黄色、やや半透明、丸い、規則的な、真円の、低い凸面の、輝きのある、滑らかな、直径 1 mm (4 8 hr)
- ・各温度での生育

3 7 °C	+
(4 8 hr) 4 1 °C	—
4 5 °C	—

(b) 生理学的性質

- ・カタラーゼ +
- ・オキシダーゼ —
- ・グルコース醗酵性 —

スポロサルシナ sp. N C A 2 8 - b

(a) 形態的性質

- ・球菌
- ・グラム染色性 バリアブル (Variable)
- ・胞子の有無 あり
- ・運動性 なし
- ・コロニー形態 丸い、規則的な、真円の、クリーム色又は白色、やや半透明、直径 0. 5 mm 以下 (4 8 hr)
- ・各温度での生育

3 7 °C	—
4 5 °C	—

(b) 生理学的性質

- ・カタラーゼ +
- ・オキシダーゼ +
- ・グルコース発酵性 —

リゾビウム sp. K N K - 1 4 1 5 (F E R M B P - 4 4 1 9)

(a) 形態的性質

- ・桿菌（やや棍棒状の短桿菌）
- ・グラム染色性 陰性
- ・胞子の有無 なし
- ・ベン毛 極付近又は周生
- ・コロニーの形態 やや黄色かかった白色、光沢のない、真円の、
大きさのそろった滑らかな、やや凸面の、
直径5mm（5日）、ムコイド生成
- ・各温度での成育 30℃ +
37℃ (±)

(b) 生理学的性質

- ・カタラーゼ +
- ・オキシダーゼ +
- ・グルコース発酵性 -
- ・NO₃還元性 +
- ・インドール生成 -
- ・グルコースからの酸生成 -
- ・アルギニンデヒドロラーゼ -
- ・ウレアーゼ +
- ・エスクリン(Aesculin)加水分解 +
- ・ゼラチン加水分解 -
- ・β-ガラクトシダーゼ +
- ・チトクロムオキシダーゼ +
- ・3-ケトラクトース生成 -
- ・H₂S生成 -

(c) 資化性

- ・グルコース +
- ・アラビノース +
- ・マンノース +
- ・マンニトール +
- ・N-アセチルグルコサミン +
- ・マルトース +
- ・グルコン酸 -
- ・カプロン酸 -
- ・アジピン酸 -
- ・リンゴ酸 +
- ・クエン酸 -
- ・フェニルアセテート -

GC含量	63.4%	
キノン分析	Q-10	95.7%
	Q-9	3.3%
	Q-11	0.6%
	Q-8	0.4%

菌体脂肪酸分析

(全菌体脂肪酸)

成分名	面積比 (%)
3-OH C14:0	4.6
C16:1	5.9
C16:0	14.0
3-OH C16:0	0.1
C18:1	70.7
C18:0	3.3
不明	1.4

(3-OH脂肪酸)

成分名	面積比 (%)
3-OH C14:0	88.8
3-OH C16:0	6.6
3-OH C18:0	4.6

(2-OH脂肪酸)

検出されず

アルスロバクターsp. CA17-2 (FERM BP-4420)

(a) 形態的性質

- ・桿菌又は球菌
- ・グラム染色性 陽性
- ・胞子の有無 なし
- ・運動性 有り
- ・コロニー形態 やや黄色かかった白色、光沢のない、丸い、
大きさのそろった、凸面の、滑らかな、
直径約0.5mm (2日)
- ・各温度での生育 30℃ +
 37℃ (+)
 45℃ -

(b) 生理学的性質

- ・カタラーゼ +
- ・オキシダーゼ -
- ・グルコース発酵性 -

(c) 化学分類学的分析

- ・ペプチドグリカンのアミノ酸 L-Lysine
- ・ミコール酸 -
- ・脂肪酸組成
 - anteiso C_{15:0}(12-メチルテトラデカン酸) 58%
 - iso C_{15:0}(13-メチルテトラデカン酸) 5.5%
 - iso C_{16:0}(14-メチルペンタデカン酸) 8%
 - anteiso C_{17:0}(14-メチルヘキサデカン酸) 25%

これらの脱カルバミル活性を示す酵素系は、微生物を通常の方法で培養することにより調製することができる。培養は、通常液体栄養培地で行われるが、固体表面培養によっても行うことができる。培地には、通常資化し得る炭素源、窒素源、各微生物の生育に必須の無機塩栄養素を含有させる。更にD-p-ヒドロキシフェニルグリシン、D-フェニルグリシン等のD-アミノ酸；N-カルバミル-DL-メチオニン、N-カルバミル-D-フェニルアラニン等のN-カルバミル- α -アミノ酸類；DL-5-p-ヒドロキシフェニルヒダントイン、DL-5-フェニルヒダントイン等の5置換ヒダントイン類；ウラシル、ジヒドロウラシル、 β -ウレイドプロピオン酸等のピリミジン代謝物；Fe²⁺、Fe³⁺、Be²⁺、Co²⁺、Al³⁺、Li⁺、Mn²⁺、Mg²⁺、Cs⁺等の金属イオン類；尿素などを少量添加してデカルバミラーゼを増強蓄積させることが好ましい。これらデカルバミラーゼ生産増強物質の培地中濃度は、金属イオン類で0.1~10mM、その他の基質で0.01~1重量%の範囲から選ばれる。

培養時の温度としては20~85℃の範囲、pHとしては4~11の範囲が用いられ、通気攪拌によって微生物の生育を促進することもできる。

D-N-カルバミル- α -アミノ酸の脱カルバミル反応においては、前記のようにして得ることのできる微生物の培養液、菌体または菌体処理物

を酵素源として使用する。菌体は、生菌体のままで用い得ることは勿論であるが、凍結乾燥菌体のような乾燥菌体、また、菌体破砕物や菌体抽出物や、界面活性剤や超音波で処理した菌体処理物を微生物酵素源として本発明の反応に利用することができる。さらに、これら菌体の破砕物、抽出物や処理物より酵素を精製または部分精製した酵素または粗酵素の状態で使用することができる。また、これら酵素または粗酵素を固定化し、固定化酵素として使用できる。固定化方法としては、例えば、国際特許出願 PCT/J P 91/01696 の固定法が使用できる。

さらに、これらの微生物から遺伝子操作により産生させた酵素も、基本的には該微生物の産生することの出来る酵素と等価である。

脱カルバミル反応は、水性媒体中で行われ、そのpHとしては6～11の範囲が用いられるが、特に好ましくは、pH 7～9.5である。さらに、pH 8～9に至適pHを持つ酵素もある。脱カルバミル反応の温度としては、通常20～85℃の範囲が用いられるが、使用する菌株の酵素系に適した温度が採用される。

本発明において、デカルバミラーゼの基質となるN-カルバミル-D- α -アミノ酸化合物の例としては、D-N-カルバミルアラニン、D-N-カルバミルメチオニン、D-N-カルバミルバリン、D-N-カルバミルロイシン、D-N-カルバミルフェニルグリシン、D-N-カルバミル-(4-ヒドロキシフェニル)グリシン、D-N-カルバミル-(2-チエニル)グリシン、D-N-カルバミルフェニルアラニンなどが挙げられる。一般式中のRとしては、置換アルキル基の場合の置換基としてはフェニル基、インドリル基、アルキルチオ基、ヒドロキシル基、アミノ基、カルボキシル基などがある。

前述したような微生物酵素による脱カルバミル反応によって生成したD

α -アミノ酸類の単離は、濃縮、中和、イオン交換樹脂処理などの公知の方法により行うことができる。すなわち、D-フェニルグリシン、D-(4-ヒドロキシフェニル)グリシン、D-ロイシンやD-フェニルアラニンなどの比較的疎水性のD- α -アミノ酸類の場合は、酸性またはアルカリ性での不溶物を除去後、濃縮、中和等により目的のD- α -アミノ酸を沈澱として得ることができる。また、D-チエニルグリシン、D-セリンやD-アラニンなどのように比較的親水性である場合には、イオン交換樹脂により目的物を吸着させ、これをアンモニア水等で溶出し、ついで中和し濃縮することにより目的物を取得することができる。

ところで、これらデカルバミラーゼの基質となるN-カルバミル-D-アミノ酸化合物は、多種の種属の微生物の培養液、菌体、菌体処理物または菌体から抽出した酵素を5-置換ヒダントイン類に作用させて、製造することができる。このような製造方法は、特開昭53-44690号公報、特開昭53-69884号公報、特開昭53-91189号公報、特開昭53-133688号公報、特開昭54-84086号公報および特開昭55-7001号公報等に記述されている。

これらのD-カルバミル- α -アミノ酸類を、本発明の方法によって対応する光学活性のD- α -アミノ酸類に変換する。

実施例

以下、実施例を示し、本発明を具体的に説明する。

実施例 1

土壌試料（採取地名：日本各地より採取）を、2mlの培地A（1g/1 KH_2PO_4 、1g/1 K_2HPO_4 、0.3g/1 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.1g/1酵母エキス、1g/1 NH_4Cl 、1.5g/1炭素源として用い以下に記載の化合物（pH 7.0））、または培地B（1g/1 KH_2PO_4 、1g/1 K_2HPO_4 、0.3g/1 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.5g/1グルコース、0.1g/1酵母エキス、1.5g/1窒素源として用いる以下に記載の化合物（pH 7.0））に接種し、28℃で好氣的に振盪培養し、同様の培地に継植して微生物の増殖が認められるまで培養した。その後、平板培地（2%寒天を含む同様の培地）に広げ、28℃で2～6日培養して微生物を分離した。

炭素源または窒素源として用いる化合物

N-カルバミル-D-p-ヒドロキシフェニルグリシン(C-D-HPG)

N-カルバミル-D-フェニルグリシン(C-D-PG)

N-カルバミル-D-アラニン(C-D-Ala)

DL-5-メチルヒダントイン(DL-Ala-hyd)

DL-5-フェニルヒダントイン(DL-PG-hyd)

DL-5-p-ヒドロキシフェニルヒダントイン(DL-HPG-hyd)

シトルリン

フェニルウレア

カルバミン酸-n-ブチルエステル

それぞれの平板培地上の株を100μlの反応液（35mM C-D-HPG、200mMリン酸カリウム緩衝液（pH 7.0））に懸濁し、28℃で

1～3日間反応させた後、薄層クロマトグラフィーによりカルバミルD-HPG及びD-HPGの分析を行なった。薄層クロマトグラフィーは、メルク社製60F₂₅₄プレートを使用し、ブタノール:酢酸:水、3:3:1 (v/v/v) で展開し、紫外線ランプ(254nm)またはp-(ジメチルアミノ)シナムアルデヒドとニンヒドリンのスプレーによって検出した。その結果、1868株が上記の炭素源または窒素源化合物を資化する微生物として分離でき、その内37株がD-HPGを生産しており、その16株が良好なD-HPG生産性(2mM以上のD-HPGを生産)を示した。

実施例2

実施例1で得られた16株のデカルバミラーゼ生産株については、2次スクリーニングの為に、1mlの培地C(1.5g/l C-D-HPG、1g/l KH₂PO₄、1g/l K₂HPO₄、0.3g/l MgSO₄·7H₂O、3g/l酵母エキス、3g/l肉エキス、10g/lグリセロール、2g/lポリペプトン(pH7.0))により、28℃で3日間培養した。培養液1mlを遠心分離し、菌体を実施例で使用したのと同じ反応液100μlに懸濁し、30℃または50℃で24時間反応させて、生成したD-HPGの定量を行なった。

D-HPGの定量は、コスモシル(Cosmosil)5C18カラム(φ4.6×250mm、ナカライテスク社製)を用い、水:アセトニトリル:リン酸(95:5:0.01(v/v/v))を溶離液として、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によって分離し、254nmの吸光度を測定することにより行なった。その結果を図1に示す。

16株のうちの3株、E206a、E222CおよびE215は、C-D-Alaを単一炭素源として生育し、30℃で高い活性を示した。E222Cでは、30℃で30.8mMのD-HPGが生成していたが、50℃

では3.5mMのD-HPGしか生成していなかった。また他の3株、A17p-1、A17p-3およびA17p-4は、C-D-HPGを単一炭素源として生育し、50℃で高い活性を示した。A17p-4では、50℃で28.8mMのD-HPGが生成していたが、30℃では2.5mMのD-HPGしか生成していなかった。

実施例3

得られたデカルバミラーゼの基質特異性

コマモナスsp. E222Cおよびブラストバクターsp. A17p-4が生産するデカルバミラーゼの基質特異性を調べるため、実施例2に記載の培地Cを用い、28℃で、コマモナスsp. E222Cを1日間、またはブラストバクターsp. A17P-4を7日間振とう培養した。培養液3mlを遠心分離し、この菌体を300 μ lの反応液（200mMリン酸カリウム緩衝液、1%(w/v)の種々の反応基質）に懸濁し、コマモナスsp. E222Cでは30℃で、ブラストバクターsp. A17P-4では50℃でそれぞれ24時間反応させた。

表1に示すように、両菌体とも、脂肪族および芳香族D-アミノ酸のN-カルバミル体に対する強い加水分解活性を示したが、極性基を持つアミノ酸のN-カルバミル体に対する活性は低かった。またコマモナスsp. E222Cでは β -ウレイドプロピオン酸を加水分解でき、ブラストバクターsp. A17P-4ではヒダントイナーゼ活性も有することがわかった。

表 1

新規デカルバミラーゼの基質特異性

化合物	基質転換率	
	コマモナス sp. E222c	ブラストバクター sp. A17p-4
N-カルバミル-		
D-アラニン	++++	+++
D-バリン	++++	+++
D-ロイシン	++++	+++
D-セリン	+	-
D-フェニルアラニン	++++	+++
D-フェニルグリシン	+++	+++
D-p-ヒドロキシ フェニルグリシン	+++	++
DL-ノルバリン	++	++
DL-ノルロイシン	++	++
DL-メチオニン	++	++
DL-スレオニン	+	-
ザルコシン	-	-
β -ウレイドプロピオン酸	++++	-
ウレイドコハク酸	-	-
DL-5-メチルヒダントイン	-	++
DL-5-フェニルヒダントイン	-	++
DL-5-p-ヒドロキシ フェニルヒダントイン	-	++

アミノ酸への転換率

- : 0%
 + : < 10%
 ++ : < 50%
 +++ : < 80%
 ++++ : 100%

実施例 4

コマモナス sp. E 2 2 2 C 株デカルバミラーゼの生産増強物質

コマモナス sp. E 2 2 2 C 株を培養する際に、デカルバミラーゼ生産を増加させる酵素生産増加物質の探索を行なった。

栄養培地である培地 D (1g/l KH_2PO_4 、 1g/l K_2HPO_4 、 0.3g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 3g/l 酵母エキス、 3g/l 肉エキス、 10g/l グリセロール、 2g/l ポリペプトン (pH 7.0)) に、図 2 に示す化合物を 0.15% (w/v) の濃度で添加し、菌を植えて 28°C で 2 日間振盪培養した。

この培養液 1 ml を遠心分離し、菌体を $100\text{ }\mu\text{l}$ の反応液 (200mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0)、 35mM C-D-HPG) に懸濁し、 30°C で 24 時間反応させ、生成した D-HPG を、実施例 2 に示す方法に従い、HPLC により定量した。その結果、図 2 に示す様に、尿素、 β -ウレイドプロピオン酸、D-フェニルグリシン、N-カルバミル-DL-メチオニンにより活性が増強されることがわかった。

実施例 5

コマモナス sp. E 2 2 2 C が生産するデカルバミラーゼの精製

コマモナス sp. E 2 2 2 C を 28°C にて、 β -ウレイドプロピオン酸 (0.15% (w/v)) を添加した実施例 4 に記載の培地 D で 3 日間振盪培養し、合計 3.6 l の培地を遠心分離して菌体を分離した。この菌体を 10mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) 100ml に懸濁し、超音波によって破碎し、遠心分離によって残渣を除いた。この粗酵素液に硫酸を添加しつつ、飽和濃度の 20% から 40% までの濃度での硫酸沈澱画分を遠心分離によって分離し、上記緩衝液に溶解させた。

この酵素液 177ml を上記緩衝液 10l に対して 12 時間透析し、DE

AE-セファセル (Sephacel) カラム ($\phi 5 \times 15$ cm) に吸着させ、0～1 MのNaCl直線型濃度勾配で溶出させ、活性画分を集めた。この溶出液のNaCl濃度を4 Mに合わせ、フェニルセファロース (Phenyl-Sepharose) CL-4Bカラム ($\phi 1.5 \times 15$ cm) に吸着させ、4～0 MのNaCl直線型濃度勾配で溶出させ、活性画分を集めてYM-10膜 (アミコン社) を用いて限外濾過により濃縮した。

この濃縮液 (5 ml) を0.2 M NaClを含む上記緩衝液中、セファクリル (Sephacryl) S-200HRカラム ($\phi 1.8 \times 80$ cm) を用いてゲル濾過し、活性画分を透析により脱塩した後、ヒドロキシアパタイトカラム ($\phi 1.2 \times 10$ cm) に吸着させ、0～1 Mのリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) の直線型濃度勾配で溶出し、活性画分 (8.5 ml) を10 mMリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) 500 mlに対し、12時間透析した。これをモノ (Mono) Q HR5/5カラムに吸着させ、0～1.0 M NaClの直線型濃度勾配で溶出させて、この活性画分 (1.2 ml) を精製酵素液として分析に用いた。

以上の精製操作により、表2に示す様に、細胞破碎上清と比較して、比活性が108倍向上し、その際の酵素活性回収率は約2%であった。またこの精製酵素10 mgをキングとレムリーの方法 [King, J., Laemmli, U. K., ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology) 62巻、465-477 (1971)] により10%ポリアクリルアミドゲルを用いたSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に付したところ、図3に示す様に、分子量38,000付近に単一バンドが得られた。

表2
コマモナス s p . E 2 2 2 c デカルバミミラーゼの精製

精製段階	蛋白量 (mg)	酵素活性 (U)	比活性 (U/mg)	収率 (%)
1) 無細胞抽出液	6316	23.5	0.0037	100
2) 硫酸沈殿画分	2362	21.2	0.0090	90.2
3) DEAE-セファセル画分	146	21.6	0.15	91.9
4) フェニル-セファロース画分	40.0	10.9	0.27	46.4
5) セファクリル S-200 HR 画分	23.8	6.6	0.28	29.1
6) ヒドロキシアパタイト 画分	2.5	0.7	0.28	3.0
7) モノQ HR 5/5 画分	1.2	0.48	0.40	2.0

また、セファデックス (Sephadex) G-150 カラム ($\phi 1.5 \times 85$ cm) を用い、0.2 M NaCl と 0.1 mM ジチオスレイトール (DTT) を含む 10 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) でゲル濾過を行なったところ、図 4 に示す様に、分子量 111,000 付近に溶出された。

実施例 6

コマモナス sp. E222C デカルバミラーゼの性質

実施例 5 で得た酵素液を用い、コマモナス sp. E222C が産生するデカルバミラーゼの反応至適 pH および反応至適温度を調べた。

反応至適 pH は、以下の方法によって測定した。反応液 ($500 \mu\text{l}$) の緩衝液 (濃度 200 mM) として、pH 4.2~5.9 では酢酸-塩酸緩衝液、pH 5.0~8.8 ではリン酸カリウム緩衝液、pH 7.6~9.9 ではトリス-塩酸緩衝液及び pH 8.9~11.1 ではグリシン-NaOH 緩衝液をそれぞれ用い、10 mM の N-カルバミル-D-フェニルアラニンと酵素液を添加したものを反応液として用い 30°C で 20 分間反応させ、 $500 \mu\text{l}$ エタノールを添加して反応を停止させた。

生成した D-フェニルアラニンの定量は、200 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0)、1.5 mM 4-アミノアンチピリン、2.1 mM フェノール、2.25 u パーオキシダーゼ (西洋わさび由来、カルザイム・ラボラトリー (CALZYME Lab.) 社製) 及び 0.375 単位の D-アミノ酸オキシダーゼ (シグマ社製) を含む反応液に、上記酵素反応液の 1 部を添加し (最終容量 $500 \mu\text{l}$)、 37°C で 60 分間反応させて 500 nm の吸光度の増加を測定することによって行った。

また、反応至適温度は、リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) を用いて上記と同様の反応液組成で、 10°C ~ 80°C で 20 分間反応させ、生成したアンモニアを、インドフェノール法 [ボルター (Bollter, W. T.)

ら、アナリティカル・ケミストリー (Analytical Chemistry) 33巻、
592-594 (1961)) によって測定した。

以上の結果を図5および図6に示す。コマモナスsp. E222Cのデカルバミラーゼでは反応至適pHがpH 8~9で、反応至適温度が40℃であることがわかる。

实施例 7

コマモナスsp. E222C株デカルバミラーゼのアミノ酸配列

実施例 5 で得た酵素液を用い、デカルバミラーゼ蛋白のアミノ末端のアミノ配列の決定を行なった。酵素液をセントリコンー 10 マイクロセントレーター（アミコン社製）を用いて脱塩し、パルス式液相プロテインシーケンサーにチャージし、解析を行なったところ、デカルバミラーゼ蛋白のアミノ末端の配列は

1 5 10
Ser-Arg-Ile-Val-Asn-Tyr-Ala-Ala-Ala-Gln-Leu-
15 20
Gly-Pro-Ile-Gln-Arg-Ala-Asp-Ser-(Arg)-Ala-Asp
25 30
-Val-Met-Glu-(Arg)-Leu-Leu-Ala-His

(20番目及び26番目のArgはピークが不明瞭で確定できなかった。)であることがわかった。

实施例 8

ブラストバクター-sp. A17p-4株デカルバミラーゼの生産増強物質

ブラストバクターsp. A17p-4株を培養する際に、デカルバミラーゼ生産を増加させる酵素生産増強物質の探索を行なった。

実施例 4 で用いたのと同じ培地 D に図 7 に示す化合物を 0.15% (w/v) 添加し、これに植菌し、28℃で3日間振盪培養した。実施例 4 に示し

た方法で、反応温度のみを40℃として生成したD-HPGをHPLCで定量したところ、図7に示す様に、ウラシル、ジヒドロウラシルまたはβ-ウレイドプロピオン酸を添加した場合、デカルバミラーゼの生産量が増加することがわかった。

さらに、金属イオンの添加効果を調べるため、培地Dに0.15%(w/v)のウラシルを添加し、さらに図8に示す金属イオンを2mMの濃度で添加し、この培地に植菌し、28℃で4日間振盪培養した。そして生成したD-HPGを定量したところ、図8に示す様に、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Li^{+} 、 Cs^{+} 、 Be^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Al^{3+} 等のイオンを添加することにより、デカルバミラーゼの生産量が増加することがわかった。

実施例9

ブラストバクターsp. A17p-4が生産するデカルバミラーゼの精製

ブラストバクターsp. A17p-4を実施例4で用いたのと同じ培地Dに、0.15%(w/v)のウラシルと2mMの $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ を添加し、この培地に植菌し、28℃で7日間振盪培養した。合計4.8lの培養液を遠心分離し、菌体を10mMリン酸カリウム緩衝液120mlに懸濁し、直径0.25mmのガラスビーズ[ダイノーミル・ケイ・ディ・エル(Dyno-Mill KDL)(スイス)]を用いて、5℃で20分間破碎し、遠心分離によって残渣を除いた。この粗酵素液に硫安を添加しつつ、飽和濃度の20%から40%までの濃度での硫安沈澱画分を遠心分離によって分離し、上記緩衝液に溶解させた。

この酵素液41mlを5lの上記緩衝液に対して12時間透析し、実施例5に示す方法によってDEAE-セファセルカラムおよびフェニルセファロースCL-6Bカラムによって精製を行ない、限外濾過によって濃縮した。この濃縮液(3ml)を0.2M NaClを含む上記緩衝液中、セファ

デックスG-150カラム($\phi 1.5 \times 80$ cm)を用いてゲル濾過し、活性画分を透析により脱塩した後、実施例5に示す方法によってモノQHR5/5カラムを用いて精製し、活性画分(2 ml)を精製酵素液として分析に用いた。以上の精製操作により、表3に示す様に、細胞破碎上清と比較して、比活性が37倍向上し、その際の酵素活性回収率は2.3%であった。

表 3

プラストバクター s p . A 1 7 p - 4 デカルバミラーゼの精製

精製段階	蛋白量 (mg)	酵素活性 (U)	比活性 (U/mg)	収率 (%)
1) 無細胞抽出液	4657	52.0	0.011	100
2) 硫酸沈殿画分	797	30.2	0.038	58.1
3) DEAE-セファセル画分	284	18.3	0.064	35.2
4) フェニルセルロース画分	89.6	7.6	0.085	14.6
5) セファデックス G-150 画分	15.4	4.1	0.27	7.9
7) モノQ HR 5/5 画分	2.9	1.2	0.41	2.3

またこの精製酵素をSDS-ポリアクリルアミド電気泳動に付したところ、図9に示す様に、分子量39,000付近に単一バンドが得られた。また、実施例5に示す方法によってセファデックスG-150カラムによるゲル濾過を行なったところ、図10に示す様に、分子量120,000付近に溶出された。

実施例10

ブラストバクターsp. A17p-4デカルバミラーゼの性質

実施例9で得た酵素液を用い、ブラストバクターsp. A17p-4デカルバミラーゼの反応至適pH及び反応至適温度を調べた。いずれの場合も、反応は実施例6に示す方法に従って行った。これらの結果を図11及び図12に示す。ブラストバクターsp. A17p-4デカルバミラーゼの反応至適pHは9であり、反応至適温度は50℃であることがわかった。

実施例11

ブラストバクターsp. A17p-4デカルバミラーゼのアミノ酸配列

実施例9で得た酵素液を用い、デカルバミラーゼ蛋白のアミノ末端アミノ酸配列の決定を実施例7と同様の方法により行なったところ、デカルバミラーゼ蛋白のアミノ末端のアミノ酸配列は、

1	5	10
Ala-Arg-Lys-Leu-Asn-Leu-Ala-Val-Ala-Gln-Leu-		
	15	20
Gly-Pro-Ile-Ala-Arg-Ala-Glu-Thr-Arg-Asp-Gln-		
	25	30
Val-Val-Ala-Arg-Leu-Met-Glu-Met-Met-Lys-Glu-		
	35	40
Ala-Lys-Ser-Ser-(Arg)-Gly-Thr		

(38番目のArgはピークが不明瞭で確定できなかった。)であることが

わかった。

実施例 12

表4のリゾビウム属及びブラディリゾビウム属の株7株について、1mlの805液体培地（イーストエキス 1g/l、マンニトール 5g/l、 K_2HPO_4 0.7g/l、 KH_2PO_4 0.1g/l、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1g/l、C-D-HPG 1g/l (pH 7.0)）に終濃度1g/lのC-D-HPG又はC-D-Alaを添加した培地に植菌し、30℃で24時間振とう培養した。菌を遠心分離によって集め、0.5mlの1% C-D-HPG又はC-D-Ala、0.1MK-リン酸緩衝液 (pH 7.0)、0.1%トリトン X-100に懸濁した。37℃で振とうしながら24時間反応後、実施例1に示す方法によって薄層クロマトグラフィーによって分析した。表4に示すようにブラディリゾビウム属の株に脱カルバミル活性が存在することがわかった。

表 4

菌株名	デカルバミラーゼ活性
リゾビウム・ロティ (<i>Rhizobium loti</i>) IF0 14779	++
リゾビウム・メリロティ (<i>Rhizobium meliloti</i>) IF0 14782	++
リゾビウム・フレディイ (<i>Rhizobium Fredii</i>) IF0 14780	++
リゾビウム・カレガエ (<i>Rhizobium galegae</i>) IF0 14965	++
リゾビウム・フアクイイ (<i>Rhizobium huakuii</i>) IF0 15243	+
ブラディリゾビウム・ジャポニカム (<i>Bradyrhizobium japonicum</i>) IF0 14783	+
ブラディリゾビウム sp. (<i>Bradyrhizobium</i> sp.) IF0 15003	+

実施例 13

実施例 1 に示す方法によって、土壌よりさらにスクリーニングを行った。スクリーニングを、N-カルバミル-D-ロイシン (C-D-Leu)、N-カルバミル-D-アラニン (C-D-Ala)、N-カルバミル-D-フェニルグリシン (C-D-PG) 又は DL-5-メチルヒダントイン (DL-Ala-hyd) を炭素源又は窒素源として用いて行った。生育した菌のうち、9 株につき C-D-Ala と C-D-HPG を用い、実施例 12 と同様に脱カルバミル活性を調べた。結果は、表 5 に示すように、C-D-HPG に対しより活性の高い菌株と C-D-Ala に対しより活性の高い菌株とがあった。

表 5

<u>菌株名</u>	<u>生育基質</u>	<u>活性</u>
リゾビウム sp. KNK1415	C-D-PG	+++ (C-D-HPG)
アルカリゲネス・キシロ		
ソキシダンス・subsp.		
デニトリフィカンス CL66-2a	C-D-Leu	++ (C-D-HPG)
CL67-1	C-D-Leu	++ (C-D-HPG)
CL85-1	C-D-Leu	+(C-D-HPG)
CA17-1	C-D-Ala	+(C-D-Ala)
アルスロバクター		
sp.	CA17-2	++ (C-D-Ala)
	CA77-2	++ (C-D-Ala)
	AH71-1	+(C-D-Ala)
	AH57-1	++ (C-D-Ala)

実施例 14

実施例 3 で得られたリゾビウム sp. KNK 1415 を 10 l の SE 培地 (ショ糖 23 g/l、酵母エキス 4 g/l、尿素 2 g/l、KH₂

PO_4 2 g/l、 Na_2HPO_4 2 g/l、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g/l、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g/l (pH 6.5)) に植菌し、30℃で40時間振とう培養した。遠心分離によって集菌し、0.9%食塩水で菌体を洗浄後、超音波により菌体を破碎し、残渣を遠心で除いた後、プロタミン硫酸処理(0.1 mg/mg 蛋白)により除核酸した。そして遠心した上清を50℃、30分間熱処理し、変性した蛋白を遠心で除き、30%飽和となる様に硫酸を添加した。沈殿を遠心分離によって集め、500 mlの20 mM Tris·HCl (pH 7.5)、2 mM DTTに溶解し、同緩衝液に透析後、DEAEセルロースカラムに吸着させ、10 mM ナーリン酸緩衝液(pH 7.2)、0.15 M NaCl、1 mM DTTで溶出した。この溶出液をYM-10膜(アミコン社)を用いて限外濾過による濃縮を行った。この酵素液をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分析したところ、約35,000付近にこのデカルバミラーゼは泳動された。

実施例 15

実施例 14 で得られたデカルバミラーゼを分析したSDS-ポリアクリルアミドゲルよりデカルバミラーゼのバンド部分のゲルを切り出し、溶出バッファー(50 mM Tris·HCl (pH 7.5)、0.1% SDS、0.1 mM EDTA、150 mM NaCl、5 mM DTT)中でホモジナイズし、室温で溶出させた。この抽出液を限外濾過によって濃縮し、逆相HPLCカラム(AP-303; YMC社製)にチャージし、アセトニトリルの濃度勾配により溶出させた。このデカルバミラーゼを含む画分を気相プロテイン・シーケンサー(アプライド・バイオシステム社製)にチャージし、解析したところ、デカルバミラーゼのアミノ末端の配列は

1 5 10
Thr-Arg-Gln-Met-Ile-Leu-Ala-Val-Gly-Gln-

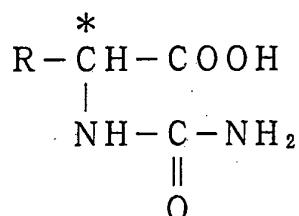
であることがわかった。

発明の効果

抗生物質の中間原料等として重要なD- α -アミノ酸類を製造する新規な脱カルバミル酵素を発見したことにより、従来とは違った条件、例えばpH 8~9での反応や50℃での反応が行える様になり、効率的にD-アミノ酸を製造することが可能となった。

請 求 の 範 囲

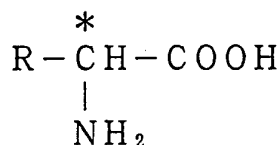
1. 一般式：



[式中、Rはフェニル基、水酸基で置換されたフェニル基、置換または未置換アルキル基、もしくはチエニル基を示す。]

で表わされるN-カルバミル-D- α -アミノ酸に、水性媒体中で、微生物の産生する酵素を作用させ、

一般式：



[式中、Rは前記と同意義である。]

で表わされるD- α -アミノ酸を製造する方法において、

N-カルバミル-D- α -アミノ酸をD- α -アミノ酸に変換する酵素デカルバミラーゼとして、コマモナス (Comamonas) 属、ブラストバクター (Blastobacter) 属、アルカリゲネス (Alcaligenes) 属、スポロサルシナ (Sporosarcina) 属、リゾビウム (Rhizobium) 属、ブラディリゾビウム (Bradyrhizobium) 属またはアルスロバクター (Arthrobacter) 属に属する微生物が産生することのできる酵素を用いることを特徴とするD- α -アミノ酸の製造法。

2. 該微生物が産生することのできるデカルバミラーゼを、培養液、菌

体、菌体破砕物、菌体抽出物、菌体処理物、粗酵素、精製酵素固定化菌体または固定化酵素として作用させる請求項1記載の製造法。

3. 該微生物が、コマモナスsp. E 2 2 2 C (FERM BP第4411号)、ブラストバクターsp. A 1 7 p-4 (FERM BP第4410号)、アルカリゲネスsp. E 2 1 5 (FERM BP第4409号)、スポロサルシナsp. NCA 2 8 -b (FERM BP第4408号)、リゾビウムsp. KNK 1 4 1 5 (FERM BP第4419号)、ブラディリゾビウム・ジャポニカム (Bradyrhizobium japonicum) I F O 1 4 7 8 3、ブラディリゾビウムsp. I F O 1 5 0 0 3またはアルスロバクターsp. C A 1 7 -2 (FERM BP第4420号)である請求項1または2記載の製造法。

4. デカルバミラーゼの産生増強物質を添加した培地で、該微生物を培養し、産生したデカルバミラーゼを作用させる請求項1または2記載の製造法。

5. デカルバミラーゼ産生増強物質が、D-アミノ酸、N-カルバミル- α -アミノ酸、5-置換ヒダントイン類、ピリミジン代謝物または金属イオンである請求項4記載の製造法。

6. 該微生物がコマモナス属の微生物であり、産生増強物質が尿素、 β -ウレイドプロピオン酸、D-フェニルグリシンまたはN-カルバミル-DL-メチオニンである請求項4記載の製造法。

7. 該微生物がブラストバクター属に属する微生物であり、産生増強物質が、ウラシル、ジヒドロウラシル、 β -ウレイドプロピオン酸、 Li^+ 、 Cs^+ 、 Be^+ 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Co^{2+} または Al^{3+} である請求項4記載の製造法。

8. 水性媒体のpHを6~11に保持する請求項1記載の製造法。

10. 40℃～50℃でデカルバミラーゼを作用させる請求項1記載の造法。

12. 至適温度が40℃～50℃にあるデカルバミラーゼ

14. 該酵素のアミノ末端側のアミノ酸配列が

15. 該酵素のアミノ末端側のアミノ酸配列が

である、ブラストバクター-sp. A17p-4が産生する請求項13記載の

デカルバミラーゼ。

16. 該酵素のアミノ末端側のアミノ酸配列が、

1 5 10
Thr-Arg-Gln-Met-Ile-Leu-Ala-Val-Gly-Gln-

であるリゾビウムsp. KNK 1415が産生する請求項13記載のデカルバミラーゼ。

☒ 1

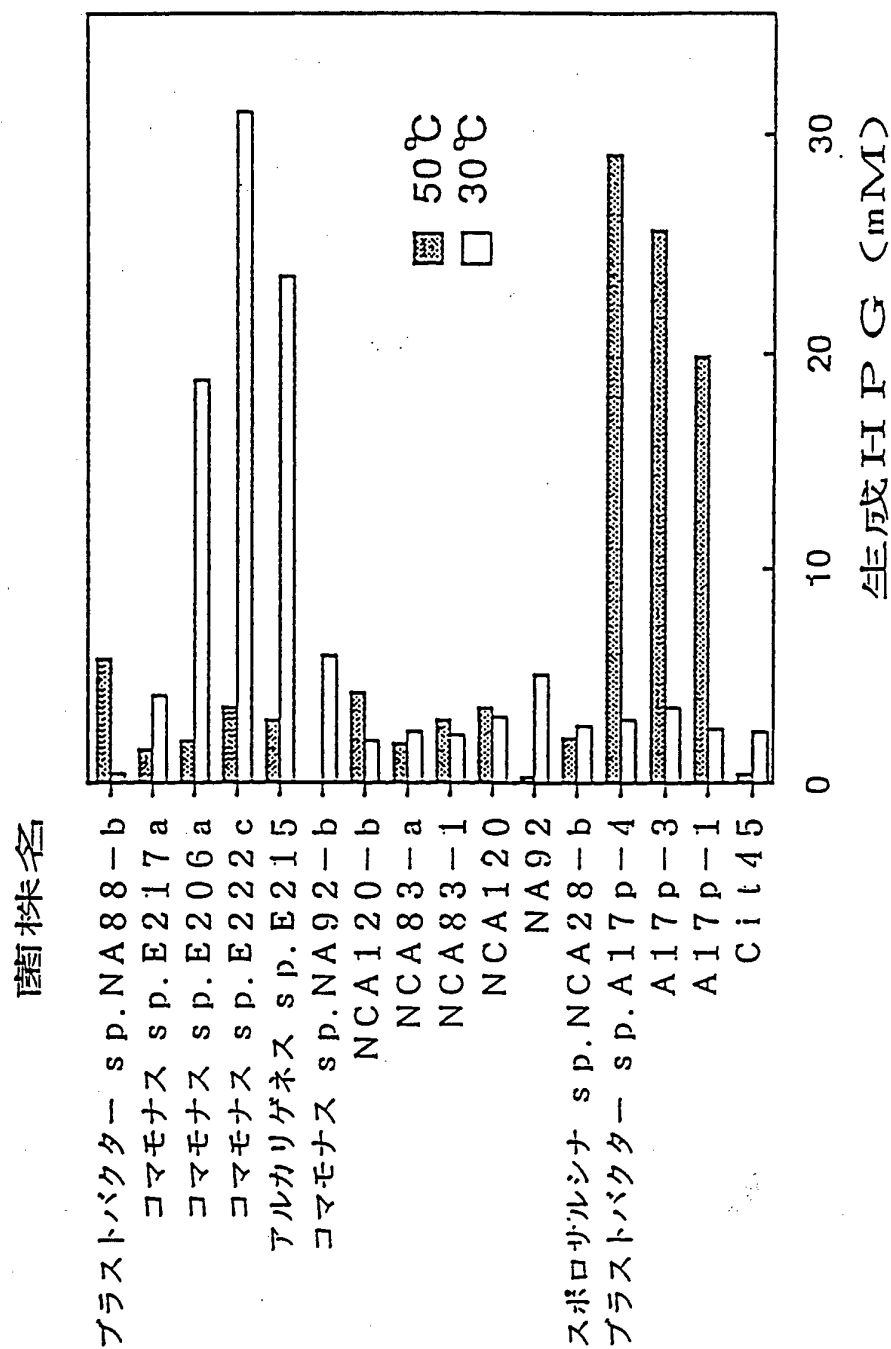


图 2

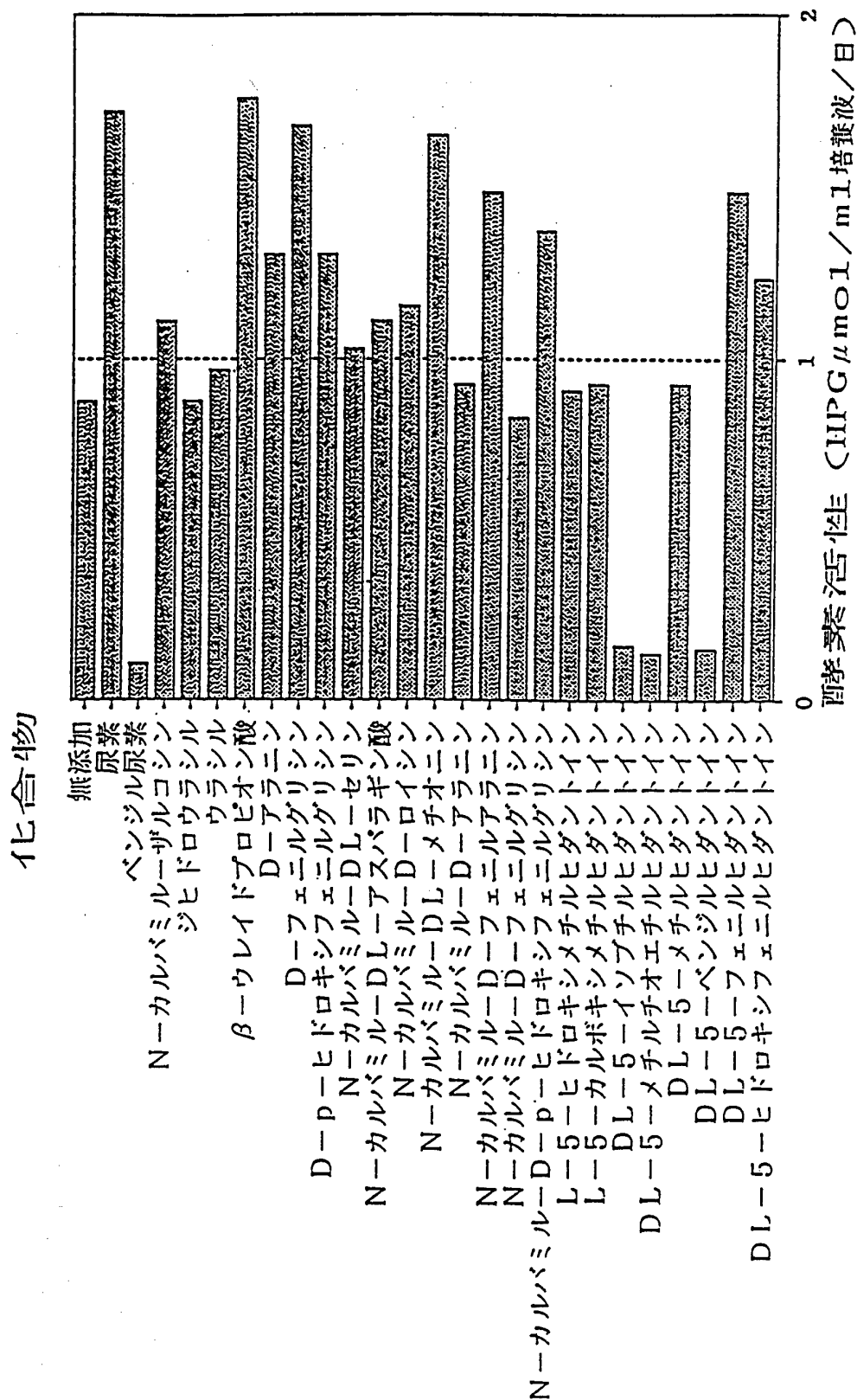
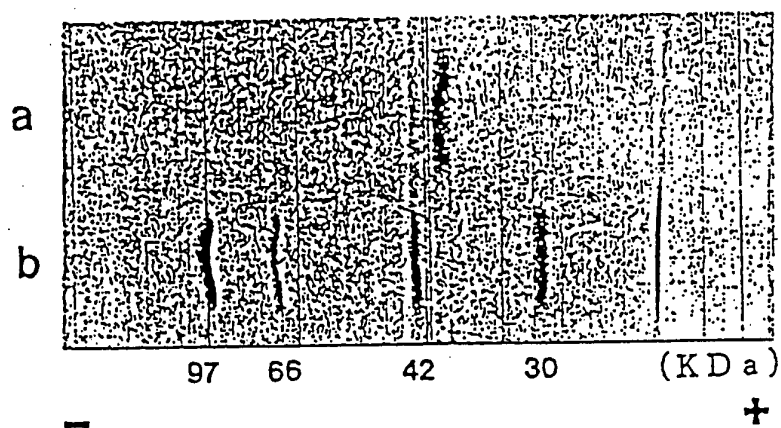


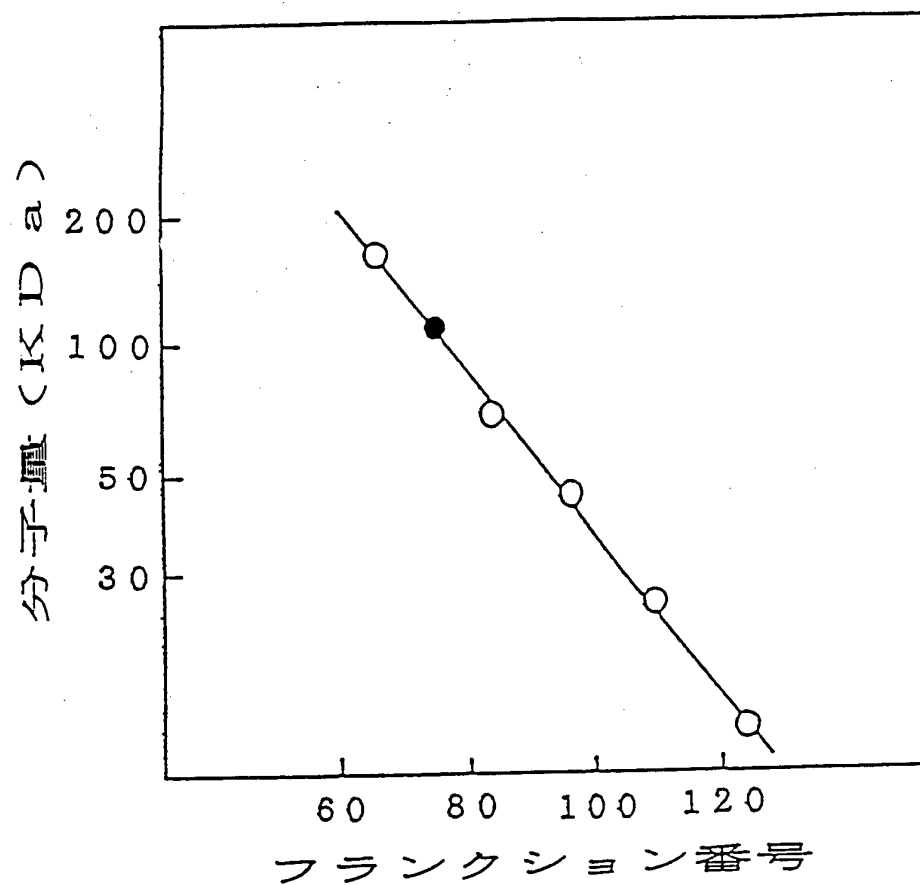
図 3



a : コマモナス sp. E222c 精製デカルバミラーゼ

b : 分子量マーカー

図 4

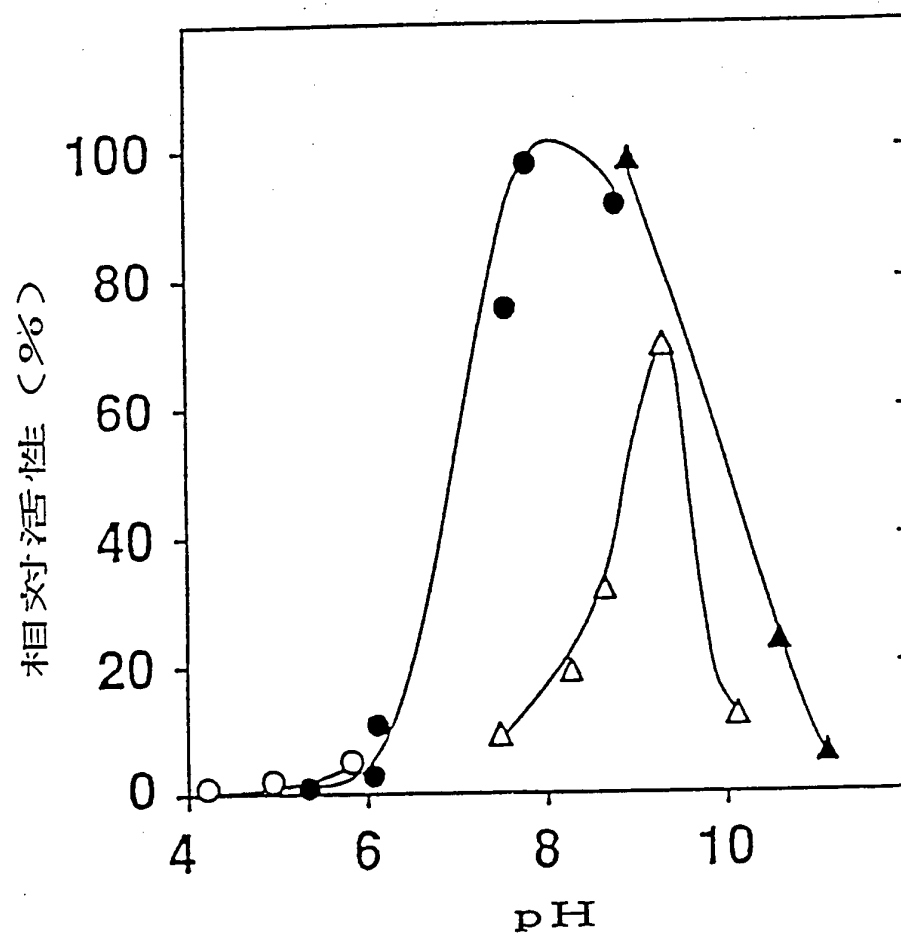


● : コマモナス sp. E222c デカルバミラーゼ

○ : 分子量マーカー (左から順に)

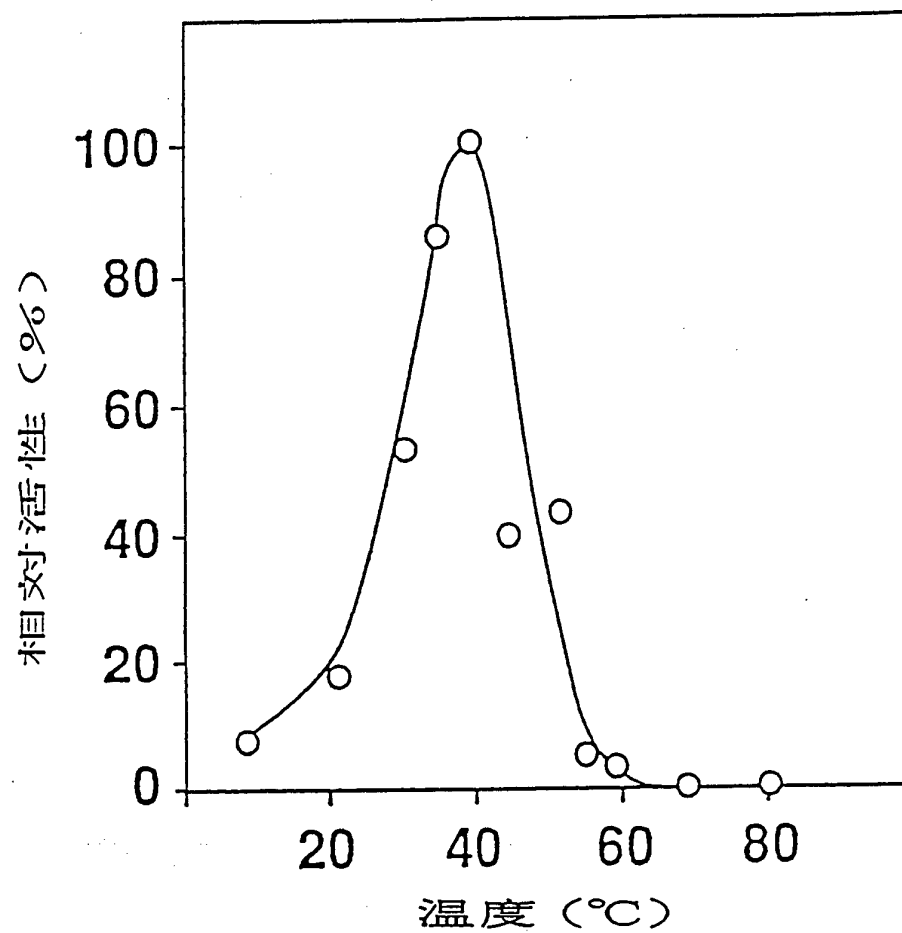
アルドラーゼ	: 158,000 ダルトン
牛血清アルブミン	: 68,000 ダルトン
卵白アルブミン	: 45,000 ダルトン
キモトリプシノーゲンA	: 25,000 ダルトン
チトクロムC	: 12,500 ダルトン

図 5



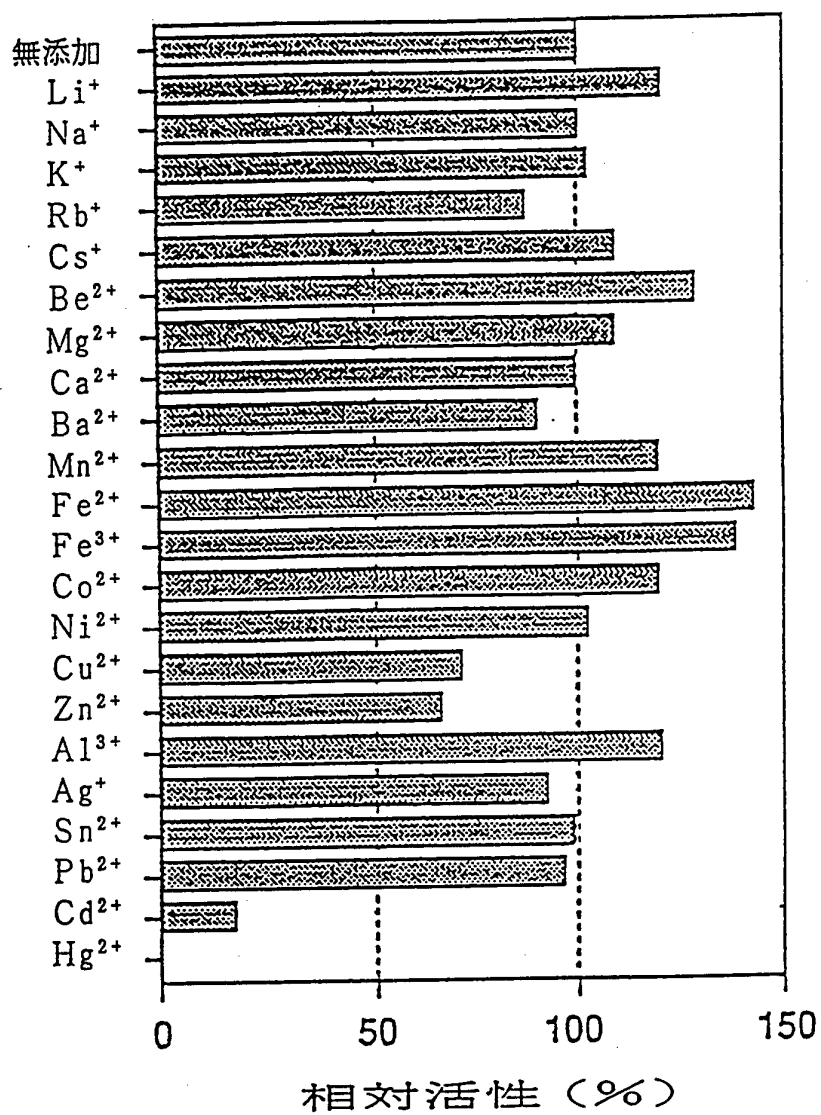
相対活性は、pH 7.8 のデカルバミラーゼ活性を 100% とした相対値である。

図 6



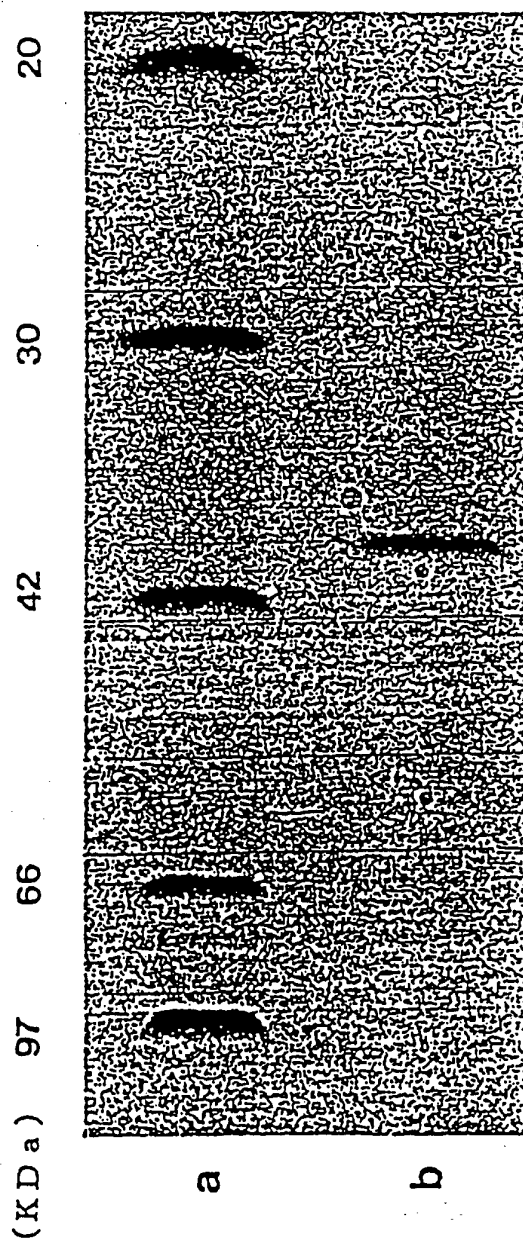
相対活性は温度 40℃ のデカルバミラーゼ活性を 100% とした相対値である。

図 8



相対活性は金属イオン無添加培養時のデカルバミラーゼ活性を100%とした相対値である。

図 9

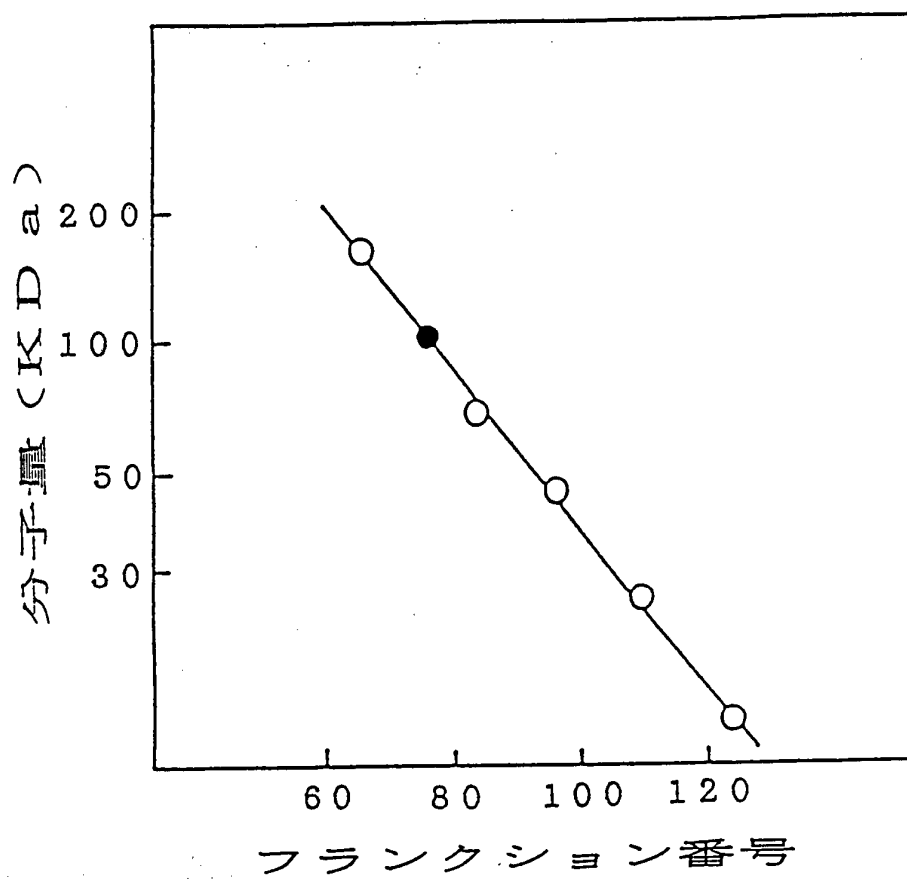


a : 分子量マーカー
b : プラストバクター sp. A17p-4 精製デカルバミラーゼ

+

-

図10

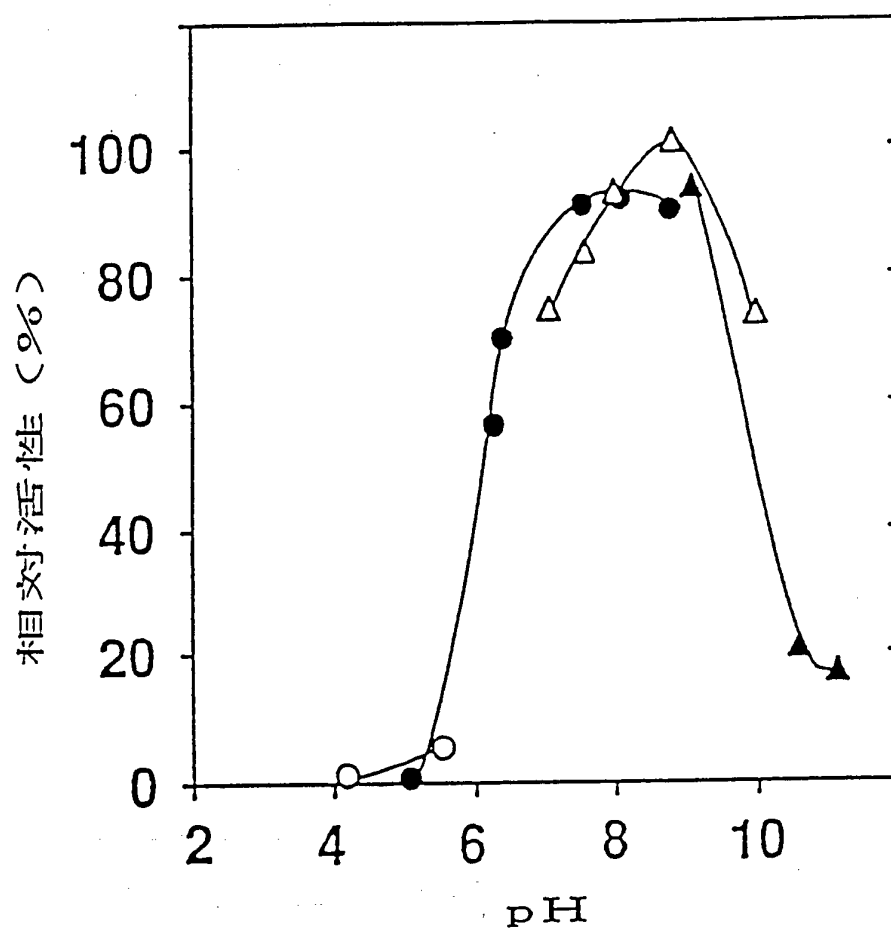


● : プラストバクター sp. A17p-4 デカルバミラーゼ

○ : 分子量マーカー (左から順に)

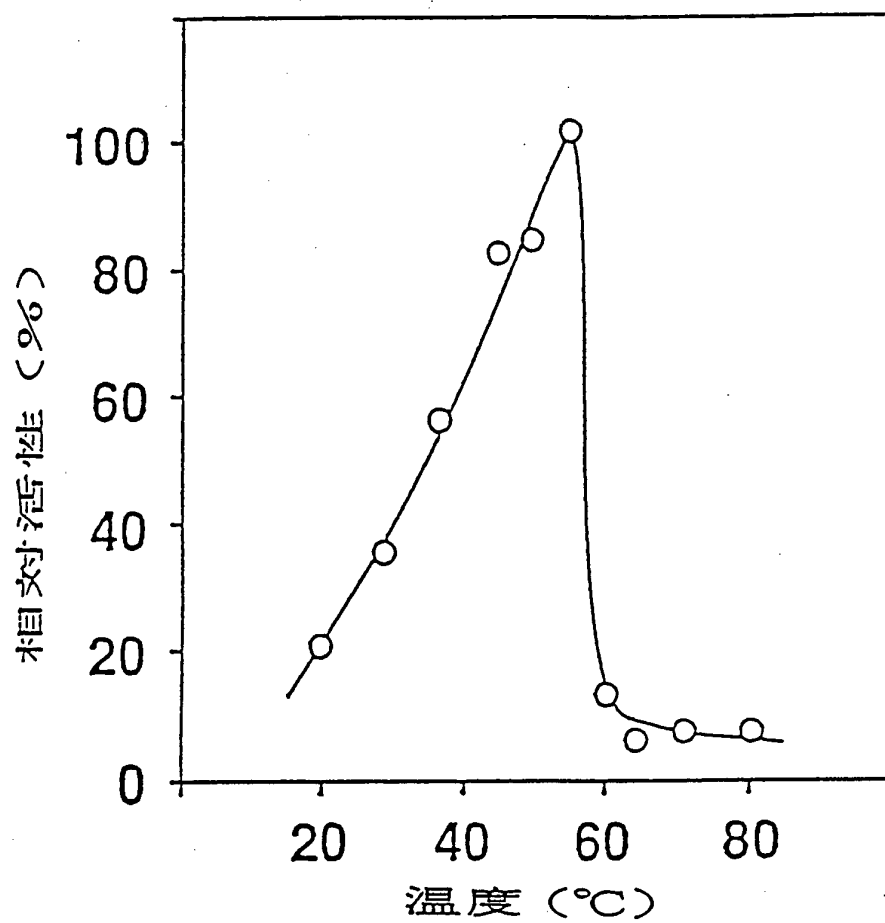
アルドラーゼ	: 158,000	ダルトン
牛血清アルブミン	: 68,000	ダルトン
卵白アルブミン	: 45,000	ダルトン
キモトリプシノーゲンA	: 25,000	ダルトン
チトクロムC	: 12,500	ダルトン

図 11



相対活性は、pH 9.0のデカルバミラーゼ活性を100%とした相対値である。

図 12



相対活性は温度 50 °C のデカルバミラーゼ活性を 100 とした相対値である。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP93/01408

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int. Cl ⁵ C12P13/04, C12N9/80//C12N1/20, (C12P13/04, C12R1:01), (C12P13/04, C12R1:05), (C12P13/04, C12R1:06), According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int. Cl ⁵ C12P13/04, C12N9/80, C12N1/20 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAS ONLINE, BIOSIS PRE VIEWS, WPI		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	JP, B1, 57-18793 (Ajinomoto Co., Inc.), April 19, 1982 (19. 04. 82), (Family: none)	1-2/1-10
A	JP, B1, 1-48758 (Kanegafuchi Chemical Industry Co., Ltd.), October 20, 1989 (20. 10. 89), & BE, A, 881547 & GB, B, 2042531 & JP, B, 62-30758 & IT, B, 1143925	1-16
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search December 15, 1993 (15. 12. 93)		Date of mailing of the international search report January 11, 1994 (11. 01. 94)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP93/01408

A(Continuation). CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

(C12P13/04, C12R1:41), (C12N9/80, C12R1:01),
(C12N9/80, C12R1:05), (C12N9/80, C12R1:06),
(C12N9/80, C12R1:41), (C12N1/20, C12R1:01),
(C12N1/20, C12R1:05), (C12N1/20, C12R1:06),
(C12N1/20, C12R1:41)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl⁵ C12P13/04, C12N9/80//C12N1/20, (C12P13/04, C12R1:01), (C12P13/04, C12R1:05), (C12P13/04, C12R1:06),											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl⁵ C12P13/04, C12N9/80, C12N1/20 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CAS ONLINE, BIOSIS PRE VIEWS, WPI											
C. 関連すると認められる文献 <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th>関連する 請求の範囲の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X/Y</td> <td>JP, B1, 57-18793 (味の素株式会社), 19. 4月. 1982 (19. 04. 82) (ファミリーなし)</td> <td>1-2/1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>JP, B1, 1-48758 (鐘淵化学工業株式会社), 20. 10月. 1989 (20. 10. 89) & BE, A, 881547 & GB, B, 2042531 & JP, B, 62-30758 & IT, B, 1143925</td> <td>1-16</td> </tr> </tbody> </table> ☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。 * 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献			引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	X/Y	JP, B1, 57-18793 (味の素株式会社), 19. 4月. 1982 (19. 04. 82) (ファミリーなし)	1-2/1-10	A	JP, B1, 1-48758 (鐘淵化学工業株式会社), 20. 10月. 1989 (20. 10. 89) & BE, A, 881547 & GB, B, 2042531 & JP, B, 62-30758 & IT, B, 1143925	1-16
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号									
X/Y	JP, B1, 57-18793 (味の素株式会社), 19. 4月. 1982 (19. 04. 82) (ファミリーなし)	1-2/1-10									
A	JP, B1, 1-48758 (鐘淵化学工業株式会社), 20. 10月. 1989 (20. 10. 89) & BE, A, 881547 & GB, B, 2042531 & JP, B, 62-30758 & IT, B, 1143925	1-16									
国際調査を完了した日 15. 12. 93		国際調査報告の発送日 11. 01. 94									
名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 齊 藤 真由美 4 B 8 9 3 1 電話番号 03-3581-1101 内線 3448									

A欄の続き

(C12P13/04, C12R1:41), (C12N9/80, C12R1:01),
(C12N9/80, C12R1:05), (C12N9/80, C12R1:06),
(C12N9/80, C12R1:41), (C12N1/20, C12R1:01),
(C12N1/20, C12R1:05), (C12N1/20, C12R1:06),
(C12N1/20, C12R1:41)